

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini mencakup bidang Obstetri Ginekologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

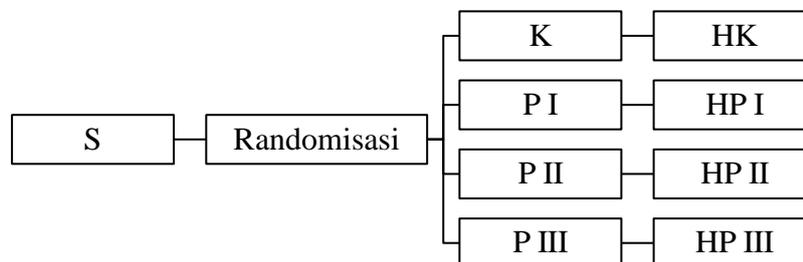
#### **3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian**

- a. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- b. Pembuatan preparat uterus hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- c. Pemeriksaan histopatologi endometrium dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soeratno Gemolong.
- d. Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan Maret hingga Juni 2016.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan desain yang dipakai adalah *The Post Only Control Group* yang menggunakan mencit Balb/c betina dalam periode gestasi sebagai sampel penelitian.

Skema rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 13. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel keseluruhan

K : Kelompok kontrol

P I : Kelompok perlakuan I , diberikan diit standar dan ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dosis 1.365 mg/kgBB/hari.

P II : Kelompok perlakuan II, diberikan diit standar dan ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dosis 4.095 mg/kgBB/hari.

P III : Kelompok perlakuan III, diberikan diit standar dan ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dosis 12.285 mg/kgBB/hari

HK : Pengamatan gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) kelompok kontrol

HPI : Pengamatan gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) kelompok perlakuan I

HP II : Pengamatan gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) kelompok perlakuan II

HP III: Pengamatan gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) kelompok perlakuan III

### **3.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi**

Mencit Balb/c betina dalam periode gestasi, berat badan 20-35 gram, sehat, tidak ada kelainan morfologi, yang dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

#### **3.4.2 Sampel**

##### 3.4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Mencit Balb/c betina dalam periode gestasi
- b. Berat badan 20-35 gram
- c. Usia 2-3 bulan
- d. Sehat
- e. Tidak ada kecacatan morfologi

##### 3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat kecacatan morfologi selama penelitian
- b. Mati selama adaptasi dan perlakuan

#### **3.4.3 Cara Sampling**

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara *random sampling*.

#### **3.4.4 Besar Sampel**

Menurut pedoman WHO, penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, membutuhkan jumlah sampel minimal 5 ekor pada tiap kelompok. Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan yaitu 20 ekor. Untuk menghindari *drop-out*, sampel ditambahkan 10% dalam tiap

kelompok sehingga jumlah sampel menjadi 6 ekor dalam tiap kelompok, sehingga jumlah sampel seluruhnya menjadi 24 ekor.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* per oral pada dosis bertingkat yaitu : dosis I (1.365 mg/kgBB/hari), dosis II (4.095 mg/kgBB/hari), dan dosis III (12.285 mg/kgBB/hari).

#### **3.5.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi endometrium yaitu ketebalan endometrium mencit Balb/c dalam periode gestasi.

### 3.6 Definisi Operasional

Tabel 6. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis I	Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis 1.365 mg/kgBB/hari diberikan per oral.	mg/kgBB /hari	Rasio
Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis II	Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis 4.095 mg/kgBB/hari diberikan per oral.	mg/kgBB /hari	Rasio
Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis III	Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan <i>Tamarindus indica</i> dosis 12.285 mg/kgBB/hari diberikan per oral.	mg/kgBB /hari	Rasio
Gambaran histopatologi endometrium mencit Balb/c	Gambaran histopatologi endometrium yaitu ketebalan endometrium mencit Balb/c yang dilihat dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x pada 5 anotasi dan menggunakan program Leica Application Suite.	mm	Rasio

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- a. Mencit Balb/c betina pada periode gestasi
- b. Ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica*
- c. Bahan-bahan untuk metode baku histologis pemeriksaan jaringan :
  1. Alkohol bertingkat 50%, 70%, 80%, 95%

2. Aquades
  3. Hematoksilin Eosin
  4. Larutan *buffer formalin* 10%
  5. Larutan *Xylol*
  6. Parafin
  7. Albumin
  8. Cairan *acetone*
  9. *Canada balsam*
- d. Makanan dan minuman mencit Balb/c

### **3.7.2 Alat**

#### 3.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a. Kandang mencit Balb/c
- b. Sonde
- c. S spuit 1 cc (tuberculin)
- d. Neraca O Hauss

#### 3.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a. Tabung kaca untuk menyimpan organ
- b. Rak tabung
- c. Gunting operasi lurus tajam/tumpul
- d. Scalpel
- e. Pinset chirurgis

#### 3.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologi

- a. *Water bath*

- b. Kaca objek dan kaca preparat
- c. Kamera digital
- d. Mikroskop cahaya

### **3.7.3 Jenis data**

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) mencit Balb/c dalam periode gestasi dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* per oral dengan dosis bertingkat.

### **3.7.4 Cara Kerja**

Cara kerja pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memilih 24 ekor mencit Balb/c betina yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Membagi mencit Balb/c menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 mencit Balb/c yang dipilih secara acak.
2. Melakukan proses adaptasi terhadap mencit Balb/c betina selama 7 hari di laboratorium, diletakkan dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
3. Menimbang berat badan masing-masing mencit.
4. Pada hari ke-7 sampai hari ke-17 periode gestasi, kelompok I diberikan ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dengan dosis I (1.365 mg/kgBB/hari), kelompok II dengan dosis II (4.095 mg/kgBB/hari), kelompok III dengan dosis III (12.285 mg/kgBB/hari).

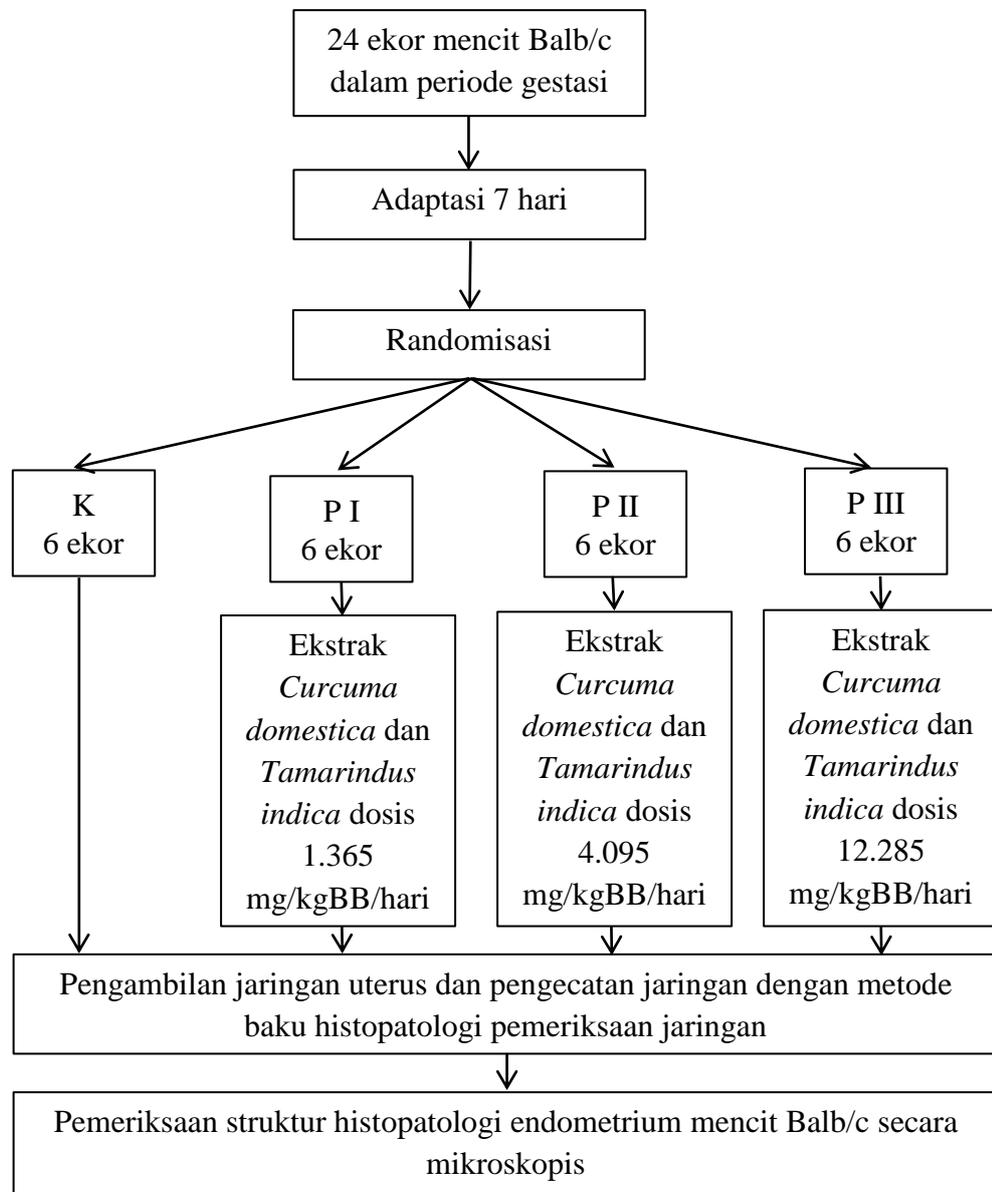
Masing-masing dosis dicampur dengan aquades sampai 1 ml kemudian diberikan secara oral dengan menggunakan sonde.

5. Pada hari ke-18 periode gestasi masing-masing mencit Balb/c ditimbang berat badannya.
6. Mencit Balb/c kemudian diterminasi dengan cara pembiusan ether.
7. Mencit dibedah, pengambilan organ uterus pada bagian corpus uteri, kemudian diisolasi dalam *buffer formalin* 10% dan selanjutnya dibuat sediaan histologis dengan metode paraffin dan pewarnaan hematoksilin-eosin dengan tebal sayatan 6  $\mu\text{m}$ .
8. Prosedur pembuatan sediaan histologis uterus dengan metode paraffin adalah sebagai berikut :
  - a. Jaringan yang sudah difiksasi dalam larutan *buffer formalin* 10 %
  - b. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam cairan *aceton* selama 3 x 20 menit dengan tujuan untuk menghilangkan air yang melekat pada organ (dehidrasi)
  - c. Kemudian dimasukkan ke dalam *xylol* selama 1 jam dengan tujuan membersihkan organ dari *aceton*.
  - d. Parafin dipanaskan dengan oven
  - e. Dari *xylol* dimasukkan ke dalam parafin oven selama 3 jam
  - f. Kemudian parafin didinginkan di dalam blok parafin sampai kering
  - g. Setelah kering, parafin dipotong dengan menggunakan mikrotom putar setebal 6  $\mu\text{m}$

- h. Hasil pemotongan dimasukkan dalam *water bath* berisi *aquabidest* yang telah dihangatkan sampai suhu 45 ° C-50°C
  - i. Mengambil sayatan yang berada di *water bath* dengan *objek glass* yang sudah diolesi dengan *albumin mayer*
  - j. Sayatan yang sudah berada di atas *objek glass* dibiarkan kering selama 12 jam
  - k. Setelah kering lakukan pewarnaan dengan menggunakan hematoksilin eosin.
9. Prosedur pewarnaan dengan menggunakan hematoksilin eosin, sebagai berikut :
- a. *Slide* dimasukkan ke dalam cairan *xylol* I, II, III dengan permukaan yang mengandung sayatan menghadap ke depan, masing-masing selama 5 menit
  - b. Pindahkan *slide* ke dalam larutan alkohol absolut selama 5 menit, kemudian ke alkohol 95%, 80%, 70%, dan 50%, masing-masing selama 10 menit
  - c. Pindahkan *slide* ke dalam akuades selama 10 menit
  - d. *Slide* dimasukkan ke dalam larutan pewarna hematoksilin selama 2-3 menit
  - e. Bilas *slide* dengan akuades sebanyak 2 kali
  - f. *Slide* dipindahkan ke dalam eosin selama 30 detik
  - g. *Slide* dipindahkan berturut-turut ke alkohol 70%, 80% 95% dan alkohol absolut dengan waktu yang sama

- h. *Slide* dipindahkan lagi ke *xylol* I, *xylol* II masing-masing selama 5 menit.
  - i. *Slide* diangkat dari *xylol* II, kemudian ditetesi *canada balsam*
  - j. Menutup *slide* dengan kaca penutup dan dibiarkan kering.
10. Kemudian dilakukan pengamatan preparat dan diukur ketebalan endometrium dengan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 40x pada 5 anotasi dan menggunakan program Leica Application Suite.
11. Lalu membandingkan ketebalan endometrium antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 15. Bagan Alur Penelitian

### 3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program computer *SPSS for windows*. Data gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) mencit Balb/c periode gestasi menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, ( $p > 0,05$ ). Kemudian dilakukan uji homogenitas varian. Data yang normal dan varian data sama dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan analisa *Post Hoc*. Uji *Post Hoc* memiliki ketentuan :

- a.  $p < 0,05$  maka ada perbedaan yang bermakna
- b.  $p \geq 0,05$  maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang bermakna, maka interpretasinya yaitu: terdapat perbedaan yang bermakna antara gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) mencit betina BALb/c pada periode gestasi dengan pemberian per oral ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dengan dosis bertingkat. Jika didapatkan hasil yang tidak bermakna, maka interpretasinya yaitu : tidak ada perbedaan yang bermakna antara gambaran histopatologi endometrium (ketebalan endometrium) mencit betina Balb/c pada periode gestasi dengan pemberian per oral ekstrak *Curcuma domestica* dan *Tamarindus indica* dengan dosis bertingkat.

### 3.10 Etika Penelitian

Pengajuan *Ethical Clearance* kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah dilakukan dan disetujui sebelum penelitian berlangsung. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Hewan

