

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini mencakup bidang Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

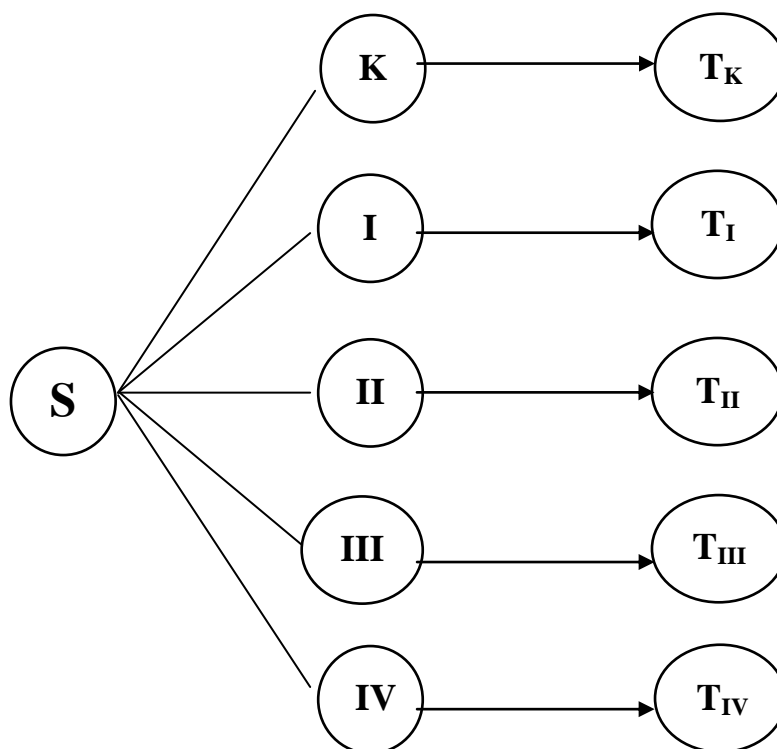
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan Maret 2016 hingga Mei 2016. Mencit Balb/c diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan metanil yellow yang dicampur dalam akuades dan ekstrak meniran selama 30 hari, terminasi dan pembuatan blok parafin sampai pengecatan jaringan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Sedangkan interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan gaster dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true eksperimental* laboratorik dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit Balb/c sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Kelompok Sampel

K = Kelompok Kontrol (pakan dan minum standart)

I = Kelompok Perlakuan I (Metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml aquades/hari)

II = Kelompok Perlakuan II (Metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml aquades/hari + ekstrak meniran 1,4 mg sebanyak 0,3 ml/hari)

III = Kelompok Perlakuan III (Metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml aquades/hari + ekstrak meniran 2,8 mg sebanyak 0,3 ml/hari)

IV = Kelompok Perlakuan IV (Metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml aquades/hari + ekstrak meniran 5,6 mg sebanyak 0,3 ml/hari)

Tk = Tes Kelompok Kontrol

TI = Tes Kelompok Perlakuan I

TII = Tes Kelompok Perlakuan II

TIII = Tes Kelompok Perlakuan III

TIV = Tes Kelompok Perlakuan IV

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target adalah mencit Balb/c jantan.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah mencit Balb/c jantan yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Airlangga Surabaya.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a) Mencit strain Balb/c
- b) Jantan
- c) Berat badan 20 - 25 gram
- d) Usia 2-3 bulan

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a) Mencit terlihat sakit, tidak aktif bergerak

3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umum dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari mencit Balb/c sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok mencit yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental.⁴¹ Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan 5 ekor, oleh karena terdapat 5 kelompok maka diperlukan 25 ekor mencit.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bertingkat ekstrak meniran yang diberikan peroral.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Ekstrak meniran dosis bertingkat peroral	Ekstrak meniran peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit Balb.c sesuai kelompoknya. Ekstrak meniran 1,4 mg sebanyak 0,3 ml/hari pada kelompok II, ekstrak meniran 2,8 mg sebanyak 0,3 ml/hari pada kelompok III, dan ekstrak meniran 5,6 mg sebanyak 0,3 ml/hari pada kelompok IV. Volume ekstrak meniran dosis bertingkat diukur menggunakan gelas ukur dengan melarutkan gram ekstrak meniran murni ke dalam 100 ml akuades. Setelah itu ekstrak meniran diberikan per-sonde selama 30 hari. Dosis ekstrak meniran telah disesuaikan dengan perhitungan.	Miligram/ mililiter	Ordinal
Tergantung	Gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c	Gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE). Preparat tersebut diamati dengan	-	Rasio

mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali, diperiksa integritas mukosa. Tingkat kerusakan untuk satu mencit didapat dari rerata lima lapangan pandang.

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

- 1) Mencit Balb/c jantan
- 2) Ekstrak meniran
- 3) Metanil Yellow
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Hematoksin Eosin
 - c. Larutan xylol
 - d. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e. Akuades

3.7.2 Alat Penelitian

3.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a) Kandang mencit Balb/c
- b) Sonde
- c) Gelas ukur
- d) Spuit 1 cc (tuberculin)

3.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a) Skalpel
- b) Pinset *chirurgis*
- c) Gunting operasi lurus tajam/tumpul
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

3.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

- a) Mikroskop binokuler
- b) *Object glass* dan *deck glass*
- c) Kamera digital

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c dari kelompok pemberian ekstrak meniran peroral dosis bertingkat dengan induksi metanil yellow peroral dosis tunggal dan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

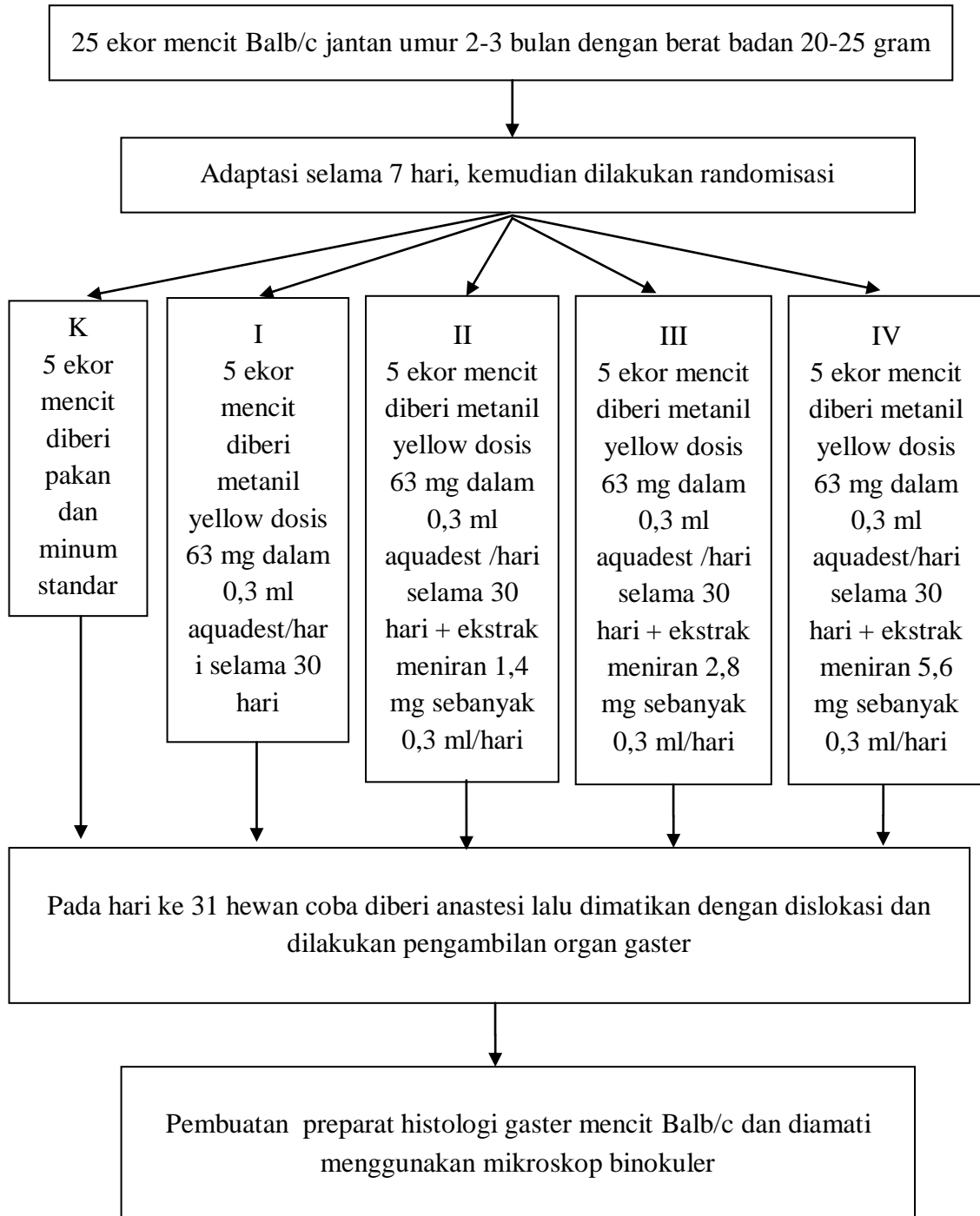
- a) Dua puluh lima ekor mencit Balb/c yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- b) Pada hari ke-8, mencit Balb/c dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit Balb/c yang dipilih secara acak.
- c) Menimbang berat badan masing-masing mencit.
- d) Mulai hari ke-8 selama 30 hari pada kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang diberikan akuades 1 ml dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok I diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg/hari yang dicampur dalam akuades sampai 0,3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 0,3 ml dan ekstrak meniran 1,4 mg sebanyak 0,3 ml/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok III diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 0,3 ml dan ekstrak meniran 2,8 mg sebanyak 0,3 ml/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok IV diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 0,3 ml dan ekstrak meniran 5,6 mg sebanyak 0,3 ml/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*.

- e) Setelah 30 hari masing-masing mencit ditimbang berat badannya.
- f) Mencit Balb/c dianastesi dan dimatikan dengan cara dislokasi leher.
- g) Mengambil organ gaster. Sampel gaster tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian gaster dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel gaster mencit Balb/c ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin. Dari setiap sampel gaster kiri dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan pandang tersebut kemudian dicari rerata skor untuk penilaian satu mencit. Perhitungan skor berdasarkan modifikasi Barthel manja skor tingkat kerusakan yang diamati sebagai berikut:.

Tabel 4. Skor Barthel manja tingkat kerusakan gaster⁴²

Skor	Integritas Epitel Mukosa
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel (1-10 sel epitel/lesi)
3	Ulserasi epitel (>10 sel epitel/ lesi)

3.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh akan diolah dengan program komputer dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, jika $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* (*Mann Whitney test*).

- a. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c pada pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L.*) dosis bertingkat dengan induksi metanil yellow peroral selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis gaster mencit Balb/c pada pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L.*) dosis bertingkat dengan induksi metanil yellow peroral selama 30 hari.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearence dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro akan diajukan sebelum penelitian dilakukan. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, metanil yellow dosis bertingkat dicampur dengan akuades hingga 1 ml kemudian disondekan sedangkan untuk ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L.*) diberikan dengan dosis berbeda-beda menggunakan sonde. Hewan diberi anestesi dan diterminasi dengan cara dislokasi leher (dekapitasi). Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 5. Jadwal penelitian

No.	Kegiatan	Waktu (Bulan ke)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Penyusunan proposal								
2	Seminar proposal penelitian								
3	Revisi proposal penelitian								
4	Pelaksanaan penelitian (pemilihan sampel, perlakuan, terminasi)								
5	Pengumpulan dan pengolahan data								
6	Penyusunan laporan hasil								
7	Seminar hasil penelitian								