

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

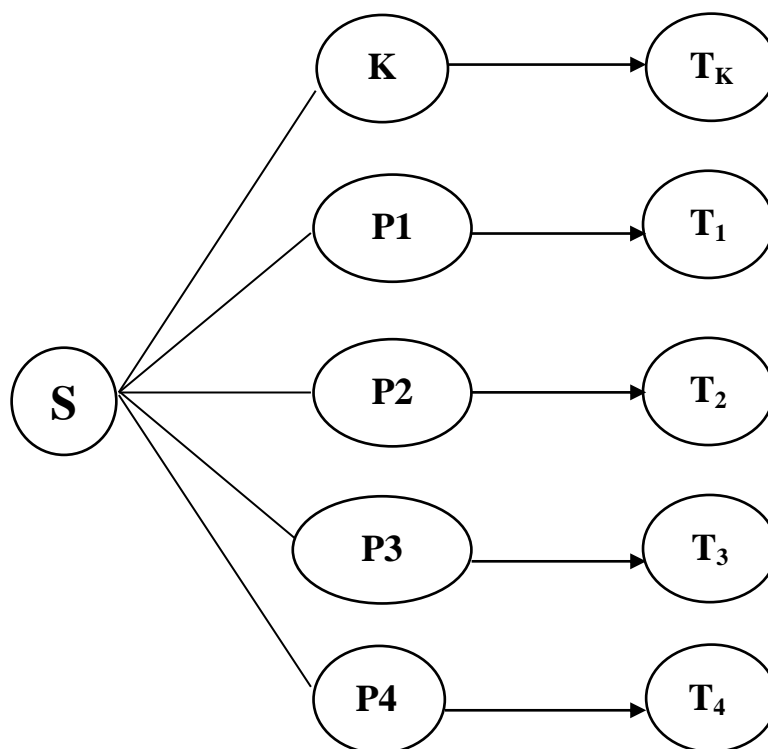
#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2016 hingga Mei 2016 di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, pembuatan preparat histopatologi di Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro, dan interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan ginjal 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 with Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit Balb/c sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



**Gambar 9.** Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Kelompok Sampel

K = Kelompok Kontrol

P1 = Kelompok Perlakuan 1 (metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml air/hari)

P2 = Kelompok Perlakuan 2 (metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 1,4 mg dalam 0,3 ml air/hari)

P3 = Kelompok Perlakuan 3 (metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 2,8 mg dalam 0,3 ml air/hari)

P4 = Kelompok Perlakuan 4 (metanil yellow peroral 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 5,6 mg dalam 0,3 ml air/hari)

T<sub>K</sub> = Tes Kelompok Kontrol

T<sub>1</sub> = Tes Kelompok Perlakuan 1

T<sub>2</sub> = Tes Kelompok Perlakuan 2

T<sub>3</sub> = Tes Kelompok Perlakuan 3

T<sub>4</sub> = Tes Kelompok Perlakuan 4

### **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**

1. Mencit strain Balb/c
2. Jantan
3. Berat badan 20 - 25 gram
4. Umur 2-3 bulan
5. Mencit dalam keadaan sehat dan aktif

### **3.4.3.2 Kriteria *Drop out***

Kriteria *drop out* dari penelitian ini adalah mencit mati atau sakit saat penelitian berlangsung.

### **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 di mana jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal lima ekor.<sup>45</sup> Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah enam lima mencit jantan tiap kelompok. Terdapat lima kelompok yang terdiri dari satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan. Jumlah sampel seluruhnya adalah 25 ekor mencit Balb/C jantan.

### 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 mikroskopis ginjal mencit Balb/c.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3.** Definisi Operasional

<b>Nama Variabel</b>	<b>Definisi Operasional</b>	<b>Unit</b>	<b>Skala</b>
Ekstrak meniran dosis bertingkat peroral	Ekstrak meniran peroral dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok P2 sebanyak 1,4 mg dalam 0,3 ml air/hari; 2,8 mg dalam 0,3 ml air/hari pada kelompok P3; dan 5,6 mg dalam 0,3 ml air/hari pada kelompok P4. Setelah itu ekstrak meniran diberikan sonde peroral selama 30 hari	mililiter	Ordinal
Gambaran mikroskopis ginjal mencit Balb/c	Gambaran mikroskopis ginjal mencit Balb/c dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang. Gambaran mikroskopis ginjal mencit Balb/c dinilai berdasarkan degenerasi dan nekrosis yang terjadi dan diambil rerata tiap kelompok lalu dibandingkan antar kelompok.	-	Rasio

**Tabel 4.** Kriteria Pembacaan Derajat Histopatologi Ginjal<sup>8</sup>

<b>Degenerasi</b>	<b>Skor</b>	<b>Nekrosis</b>	<b>Skor</b>
< 25%	1	< 25%	1
25-<50%	2	25-<50%	2
50-<75%	3	50-<75%	3
75-100%	4	75-100%	4

### **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**

1. Kandang mencit Balb/c
2. Sonde
3. Gelas ukur
4. Sduit 1 cc (tuberculin)

### **3.7.2.2 Alat untuk Terminasi**

1. Skalpel
2. Pinset *chirurgis*
3. Gunting operasi lurus tajam/tumpul
4. Botol kaca untuk menyimpan organ

### **3.7.2.3 Alat untuk Pemeriksaan Histopatologis**

1. Mikroskop binokuler
2. *Object glass* dan *deck glass*
3. Kamera digital

### **3.7.3 Jenis Data**

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran mikroskopis ginjal 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**

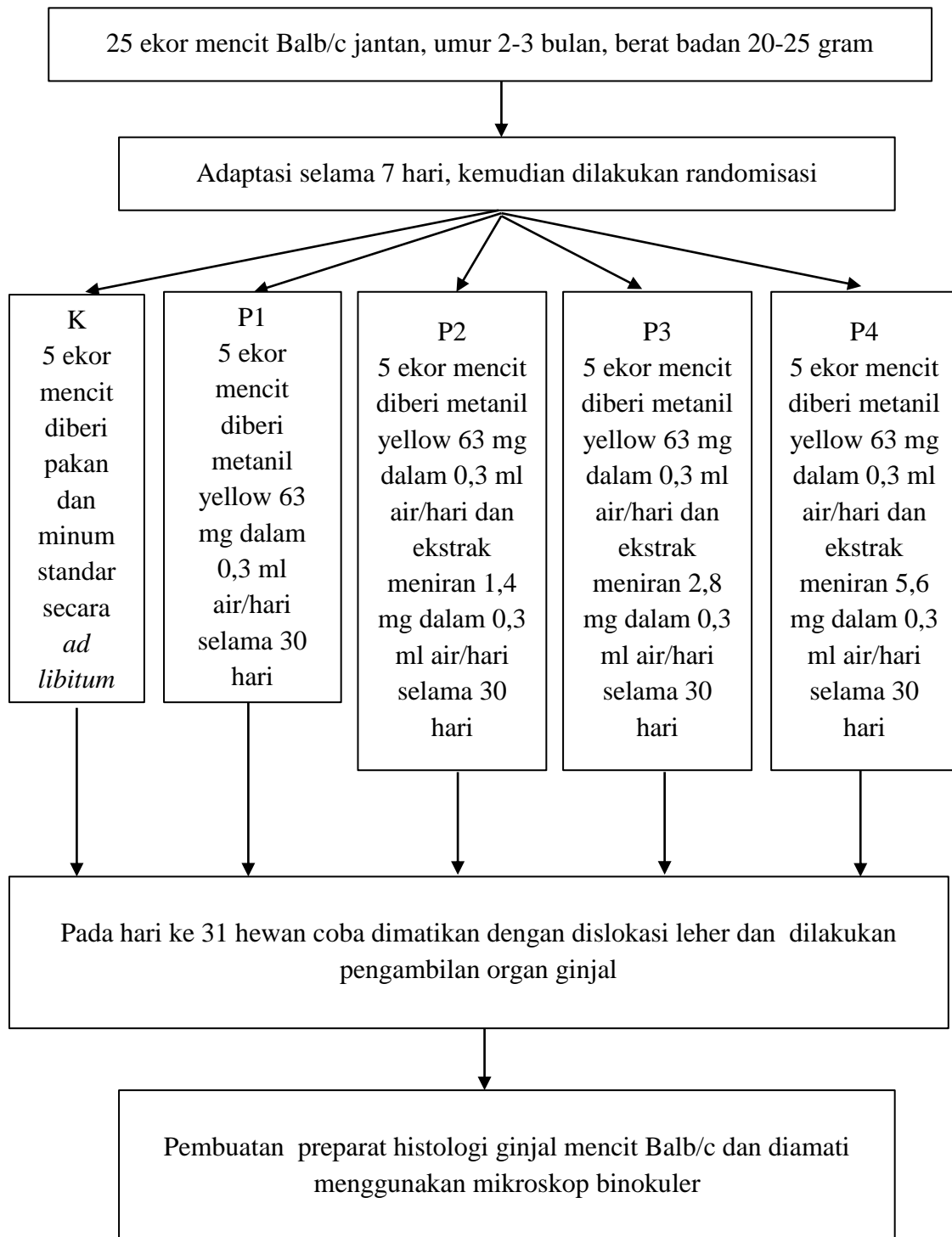
1. Dua puluh lima ekor mencit Balb/c yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.

2. 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.
3. Menimbang berat badan masing-masing mencit.
4. 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 P1 diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg dalam 0,3 ml air/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok P2 diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 1,4 mg dalam 0,3 ml air/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok P3 diberikan metanil yellow dengan dosis 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 2,8 mg dalam 0,3 ml air/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok P4 diberikan metanil yellow dengan 63 mg dalam 0,3 ml air/hari dan ekstrak meniran 5,6 mg dalam 0,3 ml air/hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*.
5. Mencit Balb/c dinarkose terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dislokasi leher.
6. Mengambil organ ginjal. Sampel ginjal tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian buffer formalin 10%.



7. Meletakkan tabung yang berisi sampel ginjal mencit Balb/c ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin. Dari setiap sampel ginjal 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. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran mikroskopis pada ginjal yaitu degenerasi dan nekrosis.

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 10.** 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 SPSS 21.0 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  $p > 0,05$ ; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran mikroskopis ginjal 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 mikroskopis ginjal 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 Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah 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 diterminasi dengan cara dislokasi leher dengan sebelumnya dilakukan narkose terlebih dahulu. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku mikroskopis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.