

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

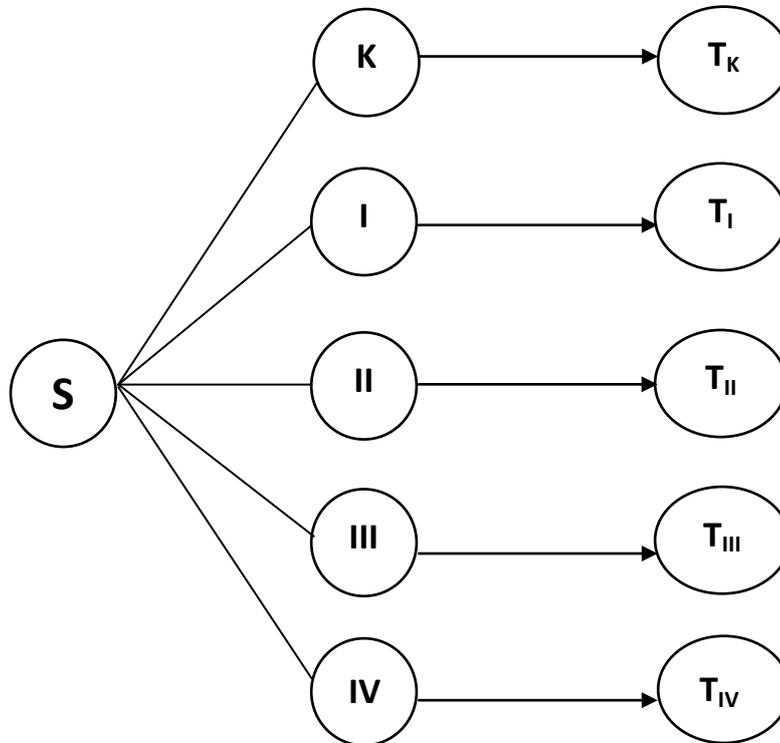
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan Desember 2015 hingga Mei 2016. Mencit *Balb/c* diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan perlakuan selama 30 hari dan terminasi dilakukan pada Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Sedangkan pembuatan blok parafin sampai pengecatan jaringan dilakukan di Laboratorium Central Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan hepar 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 8.Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Kelompok Sampel

K = Kelompok Kontrol

I = Kelompok Perlakuan I (*Methanyl yellow* peroral 63 mg/hari dalam 0,3 ml aquadest)

II = Kelompok Perlakuan II (*Methanyl yellow* peroral 63 mg/hari + ekstrak meniran 1,4 mg/hari dalam 0,3 ml aquadest)

III = Kelompok Perlakuan III (*Methanyl yellow* peroral 63 mg/hari + ekstrak meniran 2,8 mg/hari dalam 0,3 ml aquadest)

IV = Kelompok Perlakuan IV (*Methanyl yellow* peroral 63 mg/hari + ekstrak meniran 5,6 mg/hari dalam 0,3 ml aquadest)

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.

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
- e) Mencit dalam keadaan sehat dan aktif

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a) Terdapat kelainan anatomi

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. Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor. Pada penelitian ini setiap kelompok perlakuan menggunakan 6 ekor sampel setiap perlakuan, karena terdapat 5 kelompok maka diperlukan 30 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 hepar mencit *Balb/c*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri L</i> peroral dosis bertingkat	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri L</i> peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit <i>balb/c</i> sesuai kelompoknya. 0 ml/hari pada kelompok kontrol, 1 dosis terapeutik pada kelompok 1, ½x dosis terapeutik pada kelompok 2, ¼ x dosis subterapeutik pada kelompok 3. Volume Ekstrak <i>Phyllanthus niruri L</i> peroral dosis bertingkat diukur dengan spuit 1cc (tuberculin). Setelah itu diberikan per sonde selama 30 hari.	Mililiter	Ordinal

Tergantung	Gambaran histopatologi mencit <i>Balb/c</i>	Gambaran histopatologis hepar mencit <i>Balb/c</i> dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang	Ordinal
------------	---	--	---------

Kriteria pembacaan derajat histopatologi hepar berdasarkan derajat histopatologi hepar berdasarkan Knodel score modifikasi

Tabel 3. Kriteria pembaca derajat histopatologi hepar

Intralobular Degeneration	Score	Portal Inflammation	Score
None	0	No Portal Inflammation	0
Mild (Acidophilic bodies, ballooning degeneration in one third of lobules or nodules)	1	Mild (sprinkling of inflammatory cells in less than one third of portal tract)	1
Moderate (Involvement of freather than two third of lobules or nodules)	2	Moderate (increased inflammatory cells in one thirds to two thirds of portal tracts)	2
Marked (Involvement of greater than two thirds of lobules or nodules)	3	Marked (increased inflammatory cells in one third to two thirs of portal tracts)	3

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

- 1) Mencit *Balb/c* jantan
- 2) Ekstrak meniran
- 3) *Methanyl yellow*
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Hematoksilin 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 terminasi

- 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 cahaya
- b) *Object glass* dan *deck glass*
- c) Kamera digital

3.7.3 Jenis Data

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

3.7.4 Cara Kerja

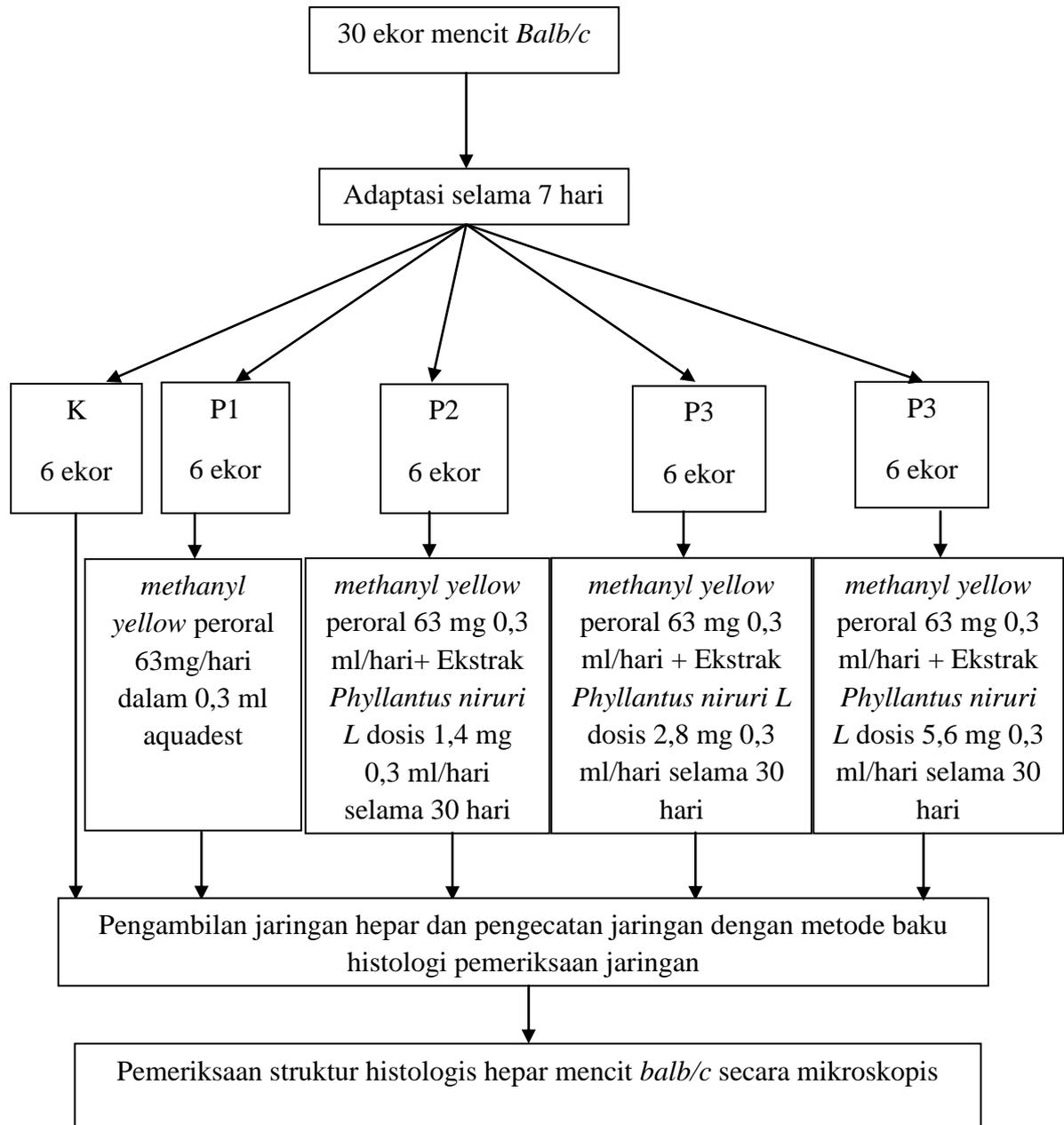
- a) Tiga puluh ekor mencit *Balb/c* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- b) Pada hari ke-8, mencit *Balb/c* dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit *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 *methanyl 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 *methanyl 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 *methanyl 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 *methanyl 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) Mencit *Balb/c* dinarkose terlebih dahulu lalu dimatikan dengan dislokasi leher.
- f) Mengambil organ hepar. Sampel hepar tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian hepar dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- g) Meletakkan tabung yang berisi sampel hepar mencit *Balb/c* ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Dari setiap sampel hepar 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. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histopatologi pada hepar yaitu degenerasi dan nekrosis.

3.8 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)*.^{33,34}

- 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 hepar mencit *Balb/c* pada pemberian *methanyl yellow* peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis hepar mencit *Balb/c* pada pemberian *methanyl yellow* peroral dosis bertingkat 30 hari.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearence dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian dilakukan. Mencit *Balb/c* dipelihara di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, *methanyl yellow* dosis bertingkat dicampur dengan akuades hingga 1 ml kemudian disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher (dekapitasi). Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan (*Lampiran 2*). Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Waktu (Bulan ke)					
		1	2	3	4	5	6
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						■