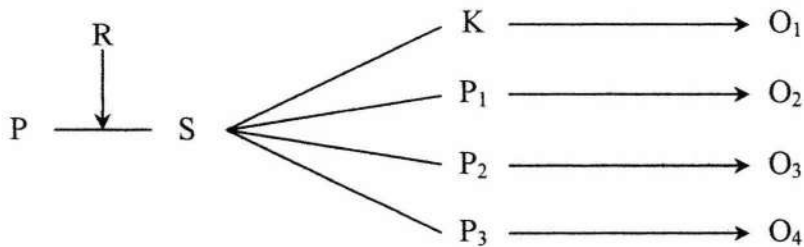


BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah Eksperimental Murni (*True Experimental*) dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design* (Zainudin, 2000). Rancangan ini digunakan karena tidak dilakukan pengukuran awal, dan semua kelompok dianggap berasal dari populasi yang sama. Dalam penelitian ini karena menggunakan lebih dari satu kelompok perlakuan maka bentuk rancangannya digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1. Bagan Rancangan penelitian *Post Test Only Design*

Keterangan :

- P : Populasi
- R : Randomisasi
- S : Sampel
- K : Kelompok kontrol diberikan asam retinoat + CMC 0,5% sebanyak 0,2 ml
- P₁ : Kelompok perlakuan diberikan asam retinoat + khitosan 15 mg/kg/BB
- P₂ : Kelompok perlakuan diberikan asam retinoat + khitosan 30 mg/kg/BB
- P₃ : Kelompok perlakuan diberikan asam retinoat + khitosan 45 mg/kg/BB
- O₁ : Data post test kelompok kontrol yang diberi retinoat + CMC 0,5% sebanyak 0,2 ml
- O₂ : Data post test kelompok perlakuan asam retinoat + khitosan 15 mg/kg/BB
- O₃ : Data post test kelompok perlakuan asam retinoat + khitosan 30 mg/kg/BB
- O₄ : Data post test kelompok perlakuan asam retinoat + khitosan 45 mg/kg/BB

4.2 Populasi Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi penelitian adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) betina bunting yang berusia umur lebih kurang 8-10 minggu dengan berat badan antara 20-25 gram sejumlah 35 ekor diperoleh dari Laboratorium Anatomi FK Unair.

Besar sampel ditentukan dengan rumus Lameshow (1990), yaitu :

$$(k - 1)(r - 1) \geq 20$$

k : jumlah macam perlakuan

r : jumlah replikasi untuk tiap kelompok

Hasil : k = 5 maka r = 6

Dari hasil perhitungan di atas didapatkan besar sampel minimal adalah 6

Pada penelitian ini untuk mengantisipasi unit eksperimen yang diperkirakan hilang atau mati dilakukan koreksi dengan memperhatikan faktor resiko dengan rumus $1/(1-f) \times r$, sedangkan f sebesar 10 % sehingga hasilnya adalah :

$$1 / 1 - f \times 6 = 6,6 \text{ dibulatkan menjadi } 7$$

Jadi jumlah per kelompok adalah 7 ekor, sehingga total populasi adalah $7 \times 4 = 28$

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara random, karena populasi pada penelitian ini dianggap homogen maka cara random yang digunakan adalah *Simple Random Sampling* (Zainudin, 2000).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (Independen)

Pemberian Khitosan dengan dosis 15 mg, 30 mg dan 45 mg/kg/BB diberikan 1 jam sesudah diberikan asam retinoat.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

- a. Kelainan bentuk rangka atau morfolgi rangka (Kelainan Perkembangan).
- b. Kelambatan penulangan.

4.3.3 Variabel Kendali

- a. Strain, umur dan berat badan mencit.
- b. Suhu, kelembaban kandang, periodisitas sinar, pakan dan minum selama pemeliharaan.

4.3.4 Definisi Operasional

- a. Dosis asam retinoat adalah jumlah asam retinoat 60 mg/kg/BB yang dilarutkan dengan minyak wijen sehingga mempunyai volume 0,2 ml (sesuai dengan kapasitas lambung mencit) diberikan secara gavage.
- b. Dosis khitosan adalah jumlah khitosan yang dilarutkan dalam *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) 0,5% dengan dosis berbeda yaitu 15 mg, 30 mg dan 45 mg/kg/BB diberikan 1 jam setelah pemberian asam retinoat.
- c. Kelainan morfologi rangka aksial dan apendikular adalah kelainan bentuk pada cranium, vertebral servikalis, vertebral torakalis, vertebral lumbalis, vertebral sakrokaudalis, sternum dan costae serta rangka anggota depan dan belakang.
- d. Kelambatan penulangan adalah kelainan dari jumlah tulang supraoksipital, tidak sesuainya jumlah tulang cervikalis, jumlah tulang sakrokaudalis, jumlah tulang anggota depan dan jumlah tulang anggota belakang.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/C yang berumur 8-10 minggu, dengan berat antara 20-25 gr dalam kondisi sehat. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat kasa beralaskan sekam yang ditempatkan di rumah hewan/Laboratorium Anatomi FK Unair, diberi makan pelet (Par G) dan diberi minum air bersih secara *ad libitum* (berlimpah).

4.4.2 Bahan Perlakuan

Bahan yang digunakan pada hewan coba adalah :

- a. Minyak wijen sebagai pelarut dari asam retinoat
- b. *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) 0,5 % sebagai pelarut khitosan
- c. Asam retinoat yang telah dilarutkan dengan minyak wijen dengan dosis 60 mg/kg/BB
- d. Khitosan yang telah dilarutkan dengan CMC 0,5% dengan dosis 15, 30 dan 45 mg/kg/BB
- e. Bahan yang digunakan untuk pewarnaan tulang keras adalah alkohol absolut (96%), KOH 1%, alizarine red S, glycerin.

4.4.3 Instrumen Penelitian

- a. Alat untuk pemeliharaan mencit (*Mus musculus*)

Kandang untuk pemeliharaan mencit yaitu bak plastik dengan kawat kasa sebagai penutup, botol minum dan tempat makan.

- b. Alat untuk pemberian Asam retinoat dan Khitosan
Sonde untuk pemberian secara “*gavage*” (*gastric lavage*)
- c. Alat untuk pengambilan fetus mencit
Seperangkat alat bedah mikro, botol dengan tutupnya untuk tempat fetus
- d. Alat untuk pewarnaan tulang
Botol atau tabung untuk merendam.

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1 Penelitian ini direncanakan dilakukan di laboratorium Anatomi FK Unair untuk pemeliharaan, pembiakan dan perlakuan hewan percobaan serta pengambilan fetus mencit. Sedangkan pewarnaan tulang dilakukan di Laboratorium FMIPA Unair. Waktu penelitian bulan September 2007 - Juli 2008.

4.6 Prosedur Pengambilan data

4.6.1 Persiapan

Sebelum diberikan perlakuan mencit betina dan jantan diaklimatisasi selama 1 minggu di dalam laboratorium hewan. Mencit dipelihara dalam kandang plastik yang ditutup dengan kawat kasa. Kandang mempunyai aliran udara yang baik dengan penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Makanan adalah pelet Par G dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Kandang dibersihkan dan sekam diganti setiap 3 hari sekali.

4.6.2 Tahap Mengawinkan

Mencit betina yang berusia 8-10 minggu dan berat mencapai 20-25 gram diletakkan dalam kandang, kemudian diidentifikasi masa estrusnya dengan melihat vulva yang menjadi kemerahan dan sedikit membengkak. Kemudian dikawinkan dengan mencit jantan dengan sistem harem yaitu 1 jantan dan 2 betina, dan penerangan diatur sedemikian rupa sehingga 12 jam terang dan 12 jam gelap. Kemudian keesokan harinya sebelum jam 07.00 mencit betina diperiksa adanya sumbat vagina (*vaginal plug*) yang menutup dari servik sampai vagina. Jika pada mencit betina ditemukan *vaginal plug* yang berwarna putih, kemudian betina dipisah dari jantan saat ini adalah hari ke-0 kebuntingan. Berat badan ditimbang dan dicatat.

4.6.3 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Hewan Percobaan

- a. K : Kelompok kontrol mencit diberikan asam retinoat 60 mg/kg/BB ditambah dengan CMC 0,5% sebanyak 0,2 ml.
- b. P1 : Kelompok perlakuan 1 mencit diberikan asam retinoat 60 mg/kg/BB + khitosan 15 mg/kg/BB
- c. P2 : Kelompok perlakuan 2 mencit diberikan asam retinoat 60 mg/kg/BB + khitosan 30 mg/kg/BB
- d. P3 : Kelompok perlakuan 3 mencit diberikan asam retinoat 60 mg/kg/BB + khitosan 45 mg/kg/BB

Kemudian pada hari ke-18 kebuntingan hewan percobaan dikorbankan dengan cara dislokasi servikal, kemudian embrio mencit dikeluarkan dengan cara melakukan pembedahan pada uterus induk mencit dengan sayatan vertikal sepanjang *midline* tubuh.

4.6.4 Pengambilan Fetus

Setelah dilakukan pembedahan fetus dikeluarkan dari uterus dan memecah selaput amnion kemudian memisahkan dengan placentanya. Kemudian dilakukan penimbangan dan pada masing-masing fetus dimatikan dengan memasukkan fetus ke dalam tabung yang berisi larutan alkohol 70%. Setelah mati dieviserasi dan dibuang kulit serta lemaknya kemudian difiksasi dengan alkohol 96% dan diberi label.

4.6.5 Pewarnaan Tulang

Setelah semua embrio mencit terkumpul, kemudian dilakukan pewarnaan pada tulang dengan alizarin red S. Prinsip pewarnaan tulang dengan alizarin red S adalah :

- a. Fetus dieviserasi dan dibuang kulitnya kemudian difiksasi dalam alkohol 96% minimal 1 minggu.
- b. Specimen direndam dalam larutan KOH 1% sampai otot terlihat transparan, selama \pm 1-2 hari.
- c. Specimen dipindahkan ke dalam larutan 0,005% Alizarin Red S dalam larutan KOH 1% dan ditunggu 1-2 hari, sampai tulang berwarna merah.
- d. Specimen direndam dalam dalam larutan KOH 1%, kemudian dijernihkan dalam larutan campuran KOH dan gliserin
 - KOH : Gliserin = 3 : 1 selama satu hari
 - KOH : Gliserin = 1 : 1 selama satu hari
 - KOH : Gliserin = 1 : 3 selama satu hari
- e. Specimen disimpan dalam Gliserin 100%.

Bila pewarnaan sudah selesai dan tulang berwarna merah diidentifikasi adanya kelainan rangka dan kelambatan penulangan pada fetus menci.

4.6.6 Pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan melihat morfologi dan kelainan bentuk rangka aksial dan kelambatan penulangan.

4.6.6.1 Kelainan morfologi atau kelainan bentuk

Kelainan morfologi dibagi dua, yaitu :

1. Kelainan morfologi rangka aksial yang meliputi :

– Cranium

Pada cranium yang diidentifikasi adalah tulang supra occipital. bentuk normal, terbelah atau kecil.

– Vertebra servikalis, torakalis, lumbalis dan sakrokaudalis

Tulang ini yang diidentifikasi adalah bentuk centrum dan arcus. Apakah sudah terbentuk normal, tidak terbentuk, mengecil atau salah letak.

– Sternum

Pada tulang sternum bentuknya dibandingkan dengan yang normal, apakah ada rudimentary, partially ossified, poorly ossified, thickened, dumbbell-shaped, asymmetrically dumbbell-shaped dan lain-lain.

– Costae, Ribs

Tulang rusuk yang diidentifikasi adalah bentuknya apakah ada yang fusi, salah letak tidak terbentuk dan lain-lain.

2. Kelainan rangka apendikular

Rangka anggota depan dan belakang. Pada rangka anggota depan dan belakang apakah ada sindaktili, paridaktili, ectodacily, metacarpal, metatarsal, phalanges distal, phalanges proximal terbentuk atau tidak, bentuk normal atau tidak.

4.6.6.2 Kelambatan penulangan

Indikator kelambatan penulangan pada umumnya diamati pada tulang :

1. Tulang supraoksipital

Pada tulang supraoksipital yang diidentifikasi adalah bentuknya terbelah, normal atau lebih kecil.

2. Jumlah tulang vertebra servikalis

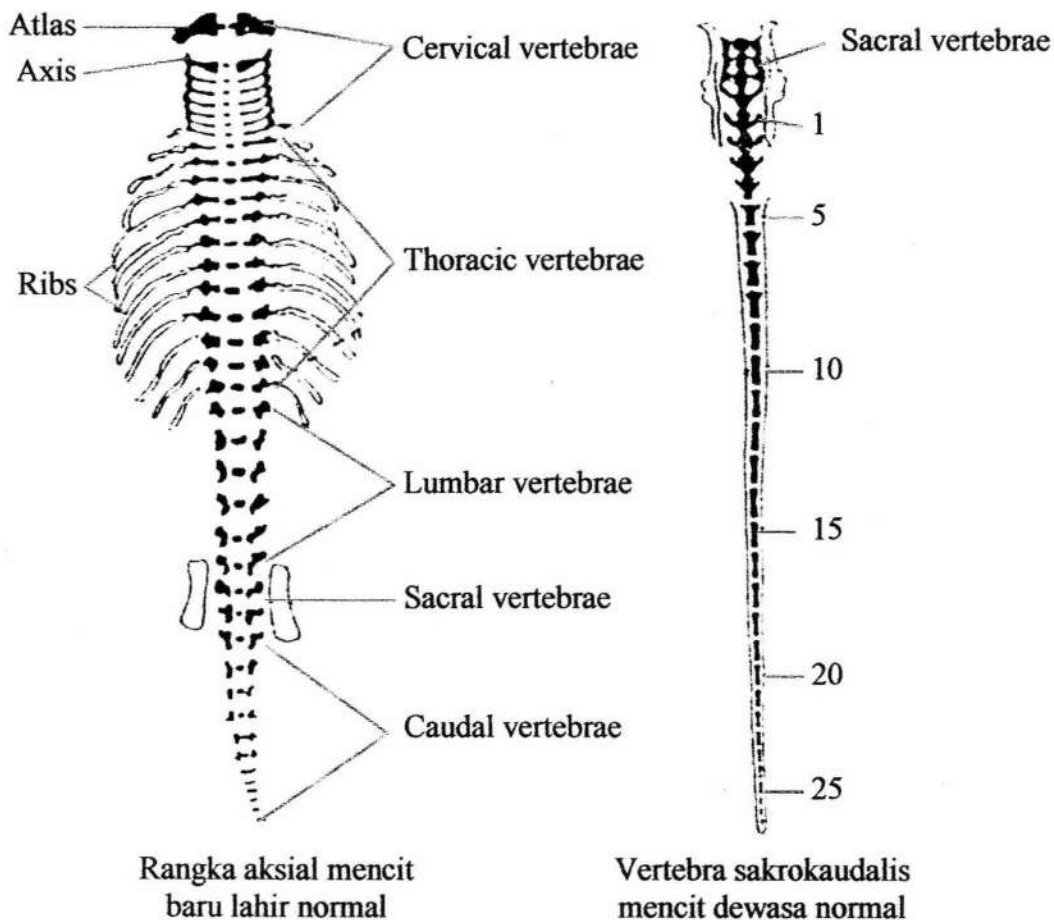
Jumlah normal tulang vertebra servikalis adalah 7 buah, diidentifikasi jumlah normal, kurang atau lebih.

3. Jumlah tulang sakrokaudalis

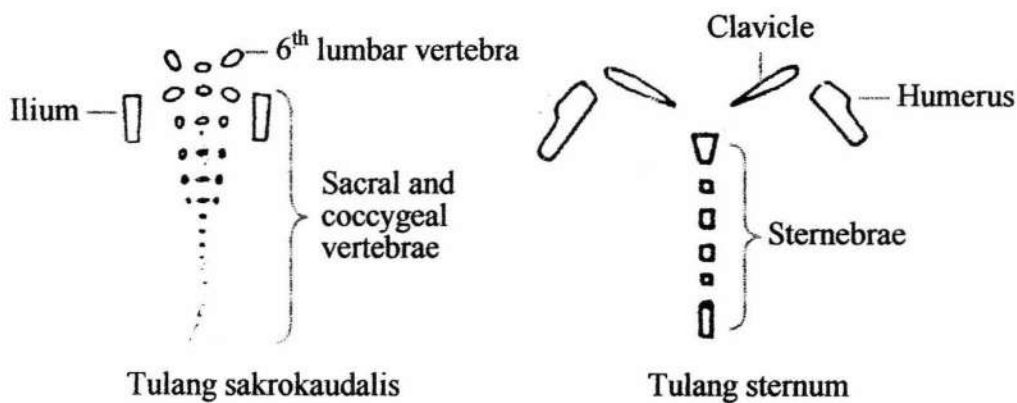
Jumlah normal tulang sakrokaudalis adalah 15 buah, diidentifikasi jumlah normal, kurang atau lebih.

4. Jumlah tulang digit tangan dan kaki

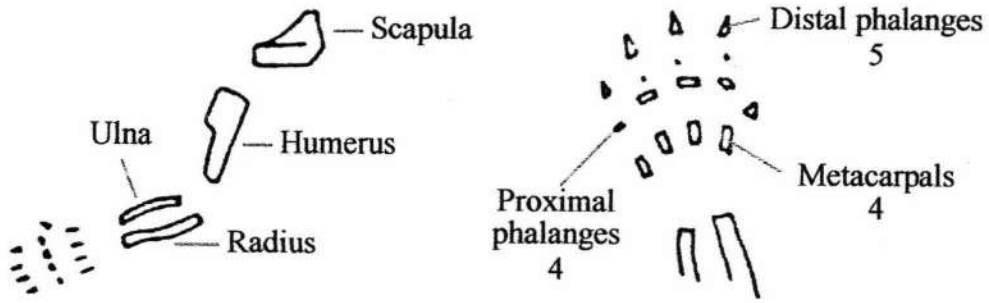
Pada tulang digit tangan normal, jumlah metacarpal 5 buah, phalanges proximal 4 buah dan phalanges distal 5 buah. Sedangkan pada tulang digit kaki normal, jumlah metatarsal 5 buah, phalanges proximal 4 buah dan phalang distal 5 buah. Diamati jumlah normal, kurang karena tidak atau belum terbentuk atau jumlahnya lebih.



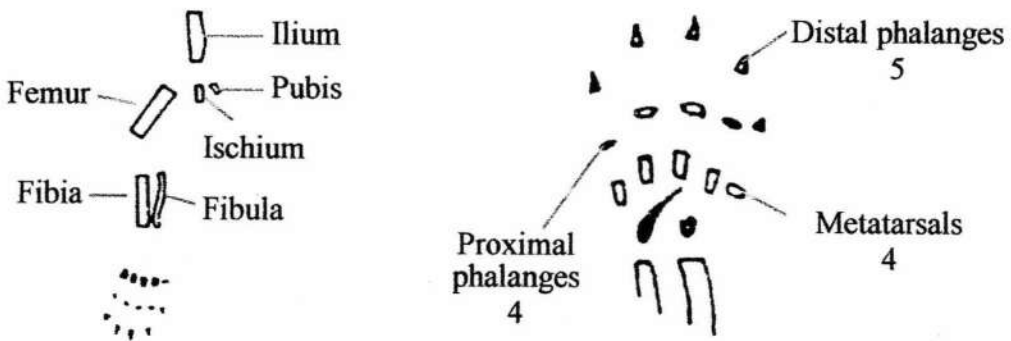
Gambar 4.2 Rangka aksial dan vertebra sakrokaudalis (Taylor, 1986)



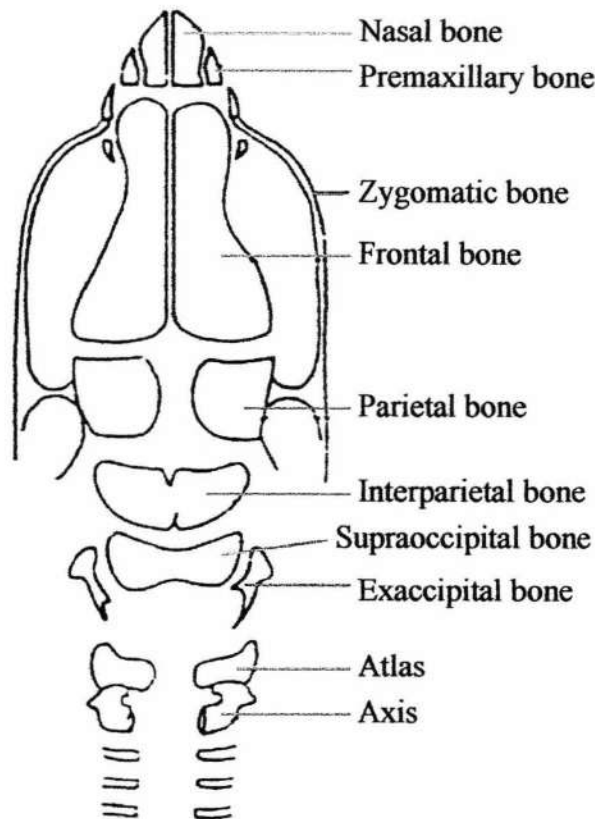
Gambar 4.3 Tulang sakrokaudalis dan tulang sternum (Taylor, 1986)



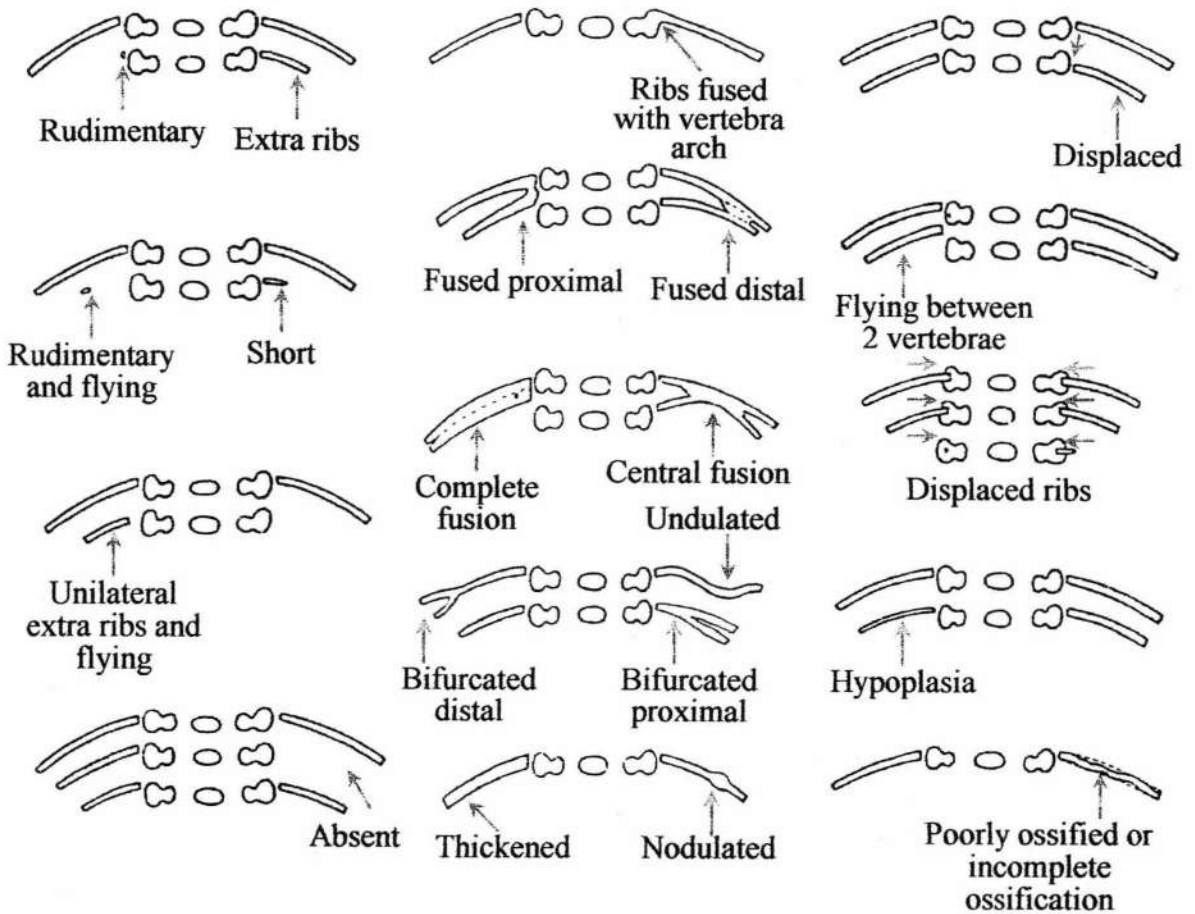
Gambar 4.4 Rangka Anggota Depan (Taylor, 1986)



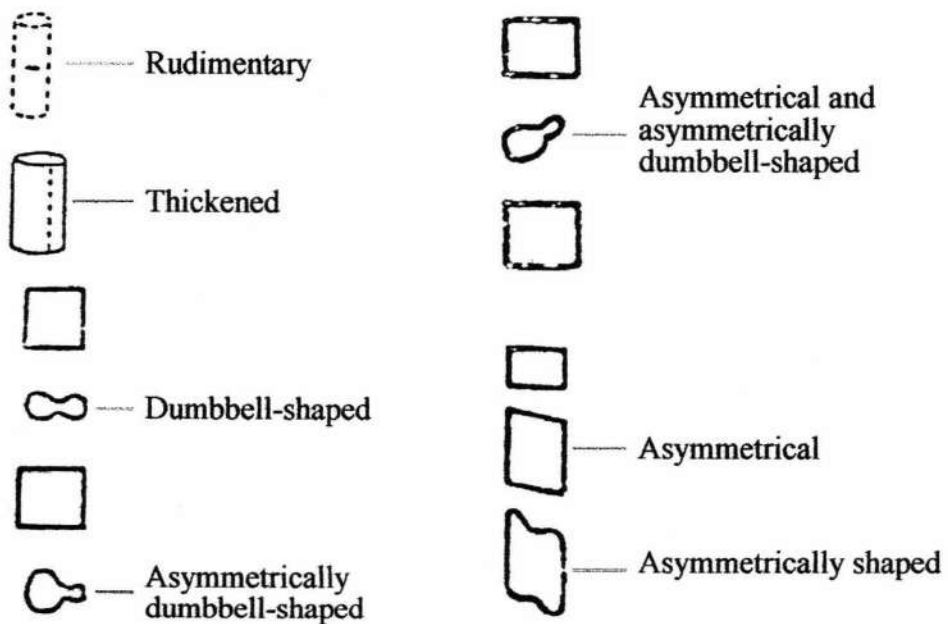
Gambar 4.5 Rangka Anggota Belakang (Taylor, 1986)



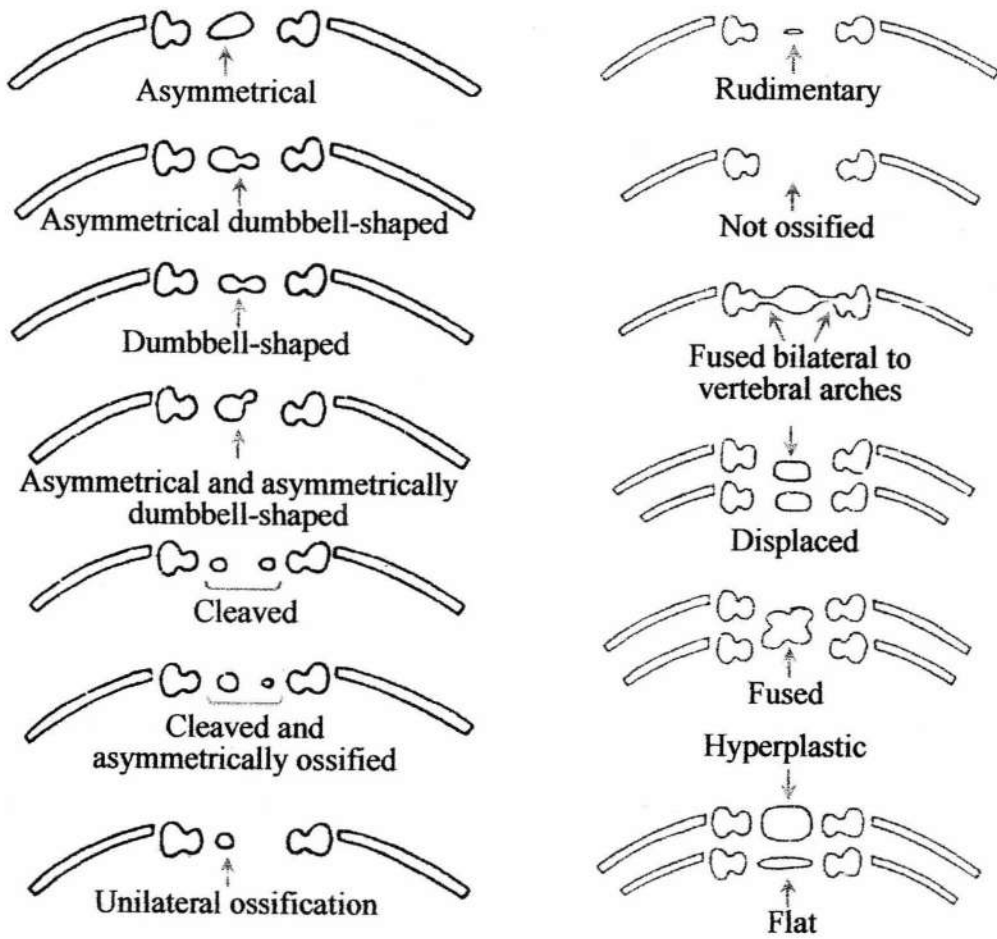
Gambar 4.6 Tulang supraoksipital (Taylor, 1986)



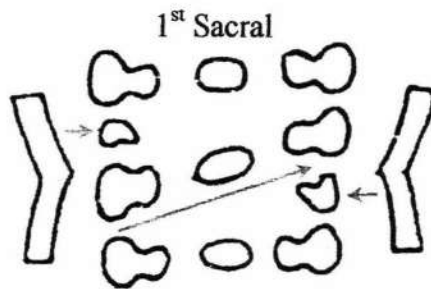
Gambar 4.7 Kelainan tulang rusuk (Taylor, 1986)



Gambar 4.8 Kelainan tulang sternum (Taylor, 1986)



Gambar 4.9 Kelainan vertebra torakalis (Taylor, 1986)

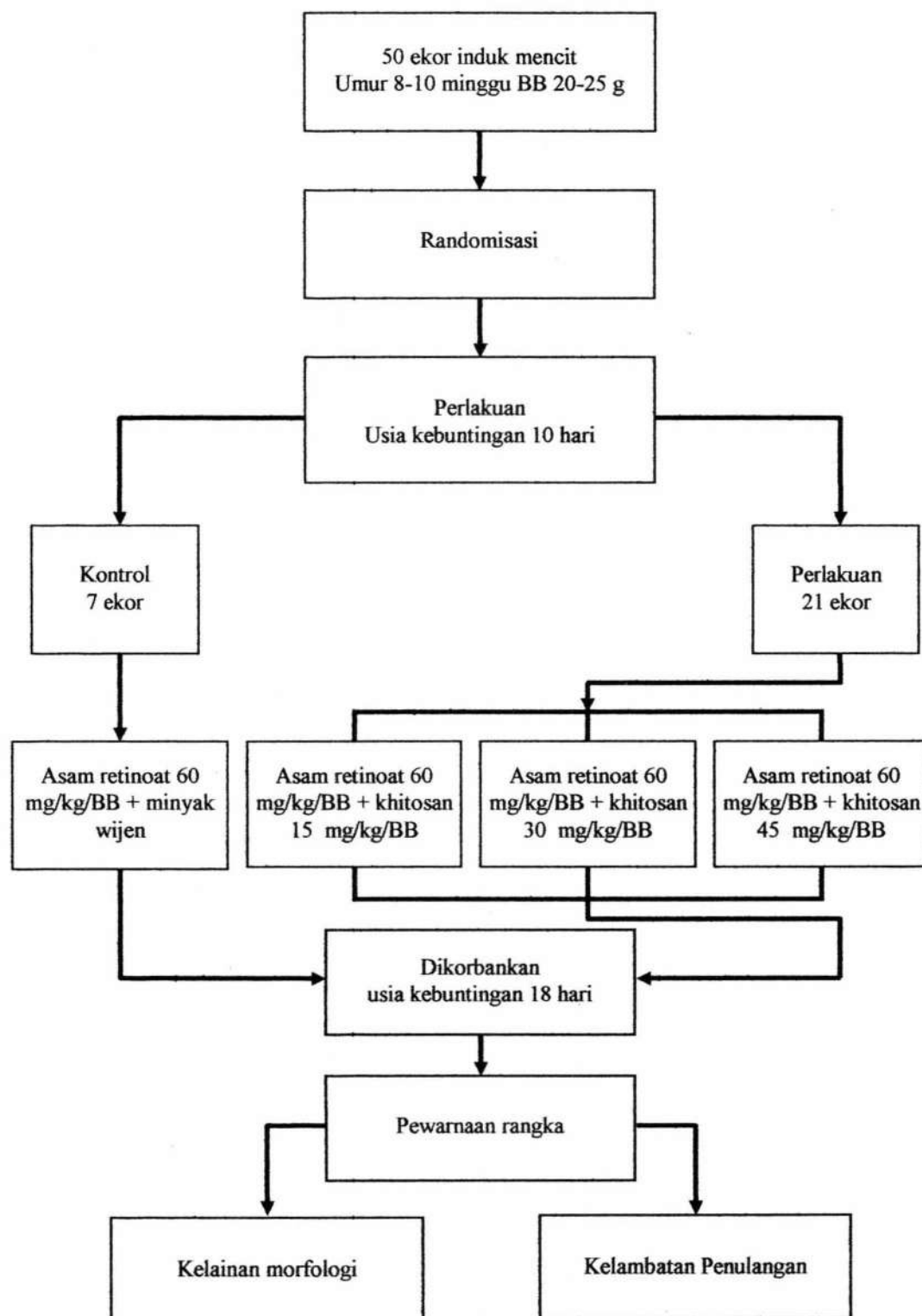


Gambar 4.10 Kelainan tulang sacralis (Taylor, 1986)

4.7 Analisis

Analisis data dari penelitian ini, utamanya pada data ordinal menggunakan analisis varian (*Oneway Anova*) dengan derajat kemaknaan 5% dan bila terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) sehingga diketahui pasangan kelompok yang berbeda. Sedangkan Wilcoxon Signed Ranks Test digunakan pada data nominal yaitu ada tidaknya perbedaan kelainan morfologi rangka.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.11 Bagan Kerangka Operasional