

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi pada penelitian ini yakni minyak atsiri rimpang temulawak.

##### **2. Sampel**

Sampel yang peneliti terapkan dalam pelaksanaan penelitian kali ini yakni minyak atsiri rimpang temulawak yang didapat dari PT. Syailendra Indonesia.

#### **B. Subyek Penelitian**

Subyek dari penelitian kali ini yakni mencit jantan (*Mus musculus* L.) dengan usia 2-3 bulan, berat 20-40 gram. Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas gastroprotektif pada hewan uji dengan parameter TNF $\alpha$ , jumlah tukak, pH lambung, keparahan tukak, dan histopatologi lambung. Penelitian dilaksanakan di laboratorium pusat penelitian pangan dan gizi serta laboratorium patologi anatomi fakultas kedokteran hewan Universitas Gadjah Mada.

#### **C. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dari pelaksanaan penelitian kali ini yakni inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak yang akan diuji aktivitas gastroprotektif pada hewan uji mencit.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang sudah peneliti identifikasi terlebih dulu bisa diklasifikasikan menjadi bermacam variabel, diantaranya yakni variabel bebas, kendali, serta tergantung.

Variabel bebas yakni sebuah variabel dimana secara sengaja peneliti ubah sehingga pengaruhnya pada variabel tergantung bisa dipelajari. Variabel bebas yang diterapkan dalam penelitian kali ini yakni variabel yang pengaruhnya diteliti dengan sengaja pada variabel tergantung, dimana yang diterapkan yakni konsentrasi inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak.

Variabel terkendali yakni sebuah variabel yang mampu memberi pengaruh untuk variabel tergantung dimana membuat kualifikasinya harus ditetapkan supaya hasil yang didapat tidak

menyebar serta bisa diulang peneliti lainnya dengan tepat. Variabel kendali yang diterapkan yakni minyak atsiri rimpang temulawak, hewan uji mencit, kondisi peneliti, kondisi dari laboratorium yang dipergunakan seperti juga alat-alat, bahan, serta media yang dipergunakan.

Variabel tergantung yakni pusat dari titik masalah yang diterapkan menjadi pilihan penelitian, dimana yang peneliti pilih yakni adalah aktivitas gastroprotektif inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak terhadap tukak lambung pada mencit yang diinduksi stres dengan parameter jumlah TNF $\alpha$ , jumlah tukak, pH lambung, keparahan tukak lambung, dan histopatologi lambung.

#### **D. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, minyak atsiri rimpang temulawak diperoleh dari PT. Syailendra Indonesia yang memiliki CoA (*Certificated of Analyze*).

Kedua, efek gastroprotektif adalah efek protektif terhadap mukosa lambung atau gastro dengan menaikkan pH lambung dan menurunkan kadar TNF $\alpha$ , jumlah tukak, keparahan tukak, dan hasil uji histopatologi lambung.

Ketiga, Gastroprotektif alternatif yang digunakan yaitu aroma dari minyak atsiri rimpang temulawak yang digunakan sebagai pencegahan stres sehingga tidak terjadi penurunan pH lambung.

Keempat, metode ultrasonik adalah metode yang bertujuan membuat hewan uji menjadi stres dengan frekuensi 26.000 Hz. Induksi ini dilakukan selama 14 hari dengan durasi 15 menit setiap hari.

Kelima, TNF $\alpha$  merupakan sitokin utama pada respons inflamasi akut, pengambilan sampel berupa darah vena dilakukan pada hari ke-0 dan ke-15.

Keenam, pH lambung adalah kadar asam yang berada di lambung memiliki rentang 3-5 pada hari ke-14 pengamatan setelah diterapi dengan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak.

Ketujuh, jumlah tukak adalah jumlah banyaknya tukak atau luka yang ada di lambung pada hari ke-14 setelah pengukuran pH lambung

Kedelapan, keparahan tukak merupakan pengukuran tukak atau luka di lambung dengan menggunakan jangka sorong. .

Kesembilan, histopatologi adalah prosedur yang melibatkan pemeriksaan jaringan lambung yang diambil, diberi perlakuan, dilihat, dan menilai tingkat keparahan tukak dibawah mikroskop.

## **E. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan yang peneliti pergunakan yakni: minyak atsiri rimpang temulawak, ranitidin, CMC Na 1 %, alkohol, larutan Netral Buffer Formalin 10% untuk fiksasi, dan *haematoxylline-eosin*.

### **2. Alat**

Alat-alat yang dipergunakan yakni: alat gelas laboratorium, jangka sorong, gunting bedah, kamera digital, mikroskop elektrik, neraca listrik, oral sonde, pH meter, ELISA kit, dan timbangan hewan.

## **F. Jalannya Penelitian**

### **1. Minyak atsiri rimpang temulawak**

Minyak atsiri rimpang temulawak yang diperoleh dari PT. Syailendra Indonesia yang memiliki CoA.

### **2. Pemeriksaan organoleptis minyak atsiri rimpang temulawak**

Minyak atsiri hasil destilasi diambil dengan volume yang cukup untuk pengamatan dan ditempatkan dalam wadah berbahan kaca bersih dan bening kemudian diamati aspek bentuk, warna, kejernihan, aroma, dan rasa (Gunawan dan Mulyani, 2004)

### **3. Identifikasi minyak atsiri**

Identifikasi minyak atsiri rimpang temulawak dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu:

Pertama, meneteskan 1 tetes minyak atsiri pada kertas saring dan didiamkan beberapa menit. Apabila kertas saring tidak ada noda yang tertinggal sama sekali, maka minyak atsiri tersebut terbukti kemurniannya.

Kedua, meneteskan minyak atsiri pada permukaan air, maka minyak atsiri rimpang temulawak akan menyebar dan permukaan air akan tampak jernih (Guenther, 1990).

### **4. Penetapan bobot jenis minyak atsiri**

Menimbang pikno kosong bersih dan kering dalam suhu ruang. Menimbang pikno kosong tersebut dengan teliti dan cermat. Memasukkan air pada pikno tersebut kemudian menimbang dengan teliti, dan mengganti air tersebut dengan minyak atsiri dan menimbang pikno berisi minyak atsiri tersebut. Dari data penimbangan tersebut dapat diketahui bobot jenis minyak atsiri dengan cara berat pikno beserta minyak atsiri dikurangi dengan berat pikno kosong, kemudian dibagi dengan berat pikno berisi air yang telah dikurangi berat pikno kosong.

### 5. Penetapan indeks bias minyak atsiri

Minyak atsiri dari rimpang temulawak diperiksa indeks bias dengan satu kali pengulangan, dengan menggunakan *refractometer* dengan cara badan prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang sudah terbasahi dengan alkohol. Mengatur refraktometer sehingga skala nampak jelas, mencatat temperatur ruangan tempat bekerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diputar hingga batas gelap dan terang tepat pada satu garis silang kemudian membaca skala dan mencatat sebagai indeks bias (Guenther, 1987).

### 6. Penetapan kelarutan dalam alkohol 70%

Uji kelarutan minyak atsiri dalam alkohol dilakukan dengan cara memipet 1 mL minyak ke dalam gelas ukur 10 mL ditambahkan alkohol 70% dengan cara bertahap, pada setiap menambahkan alkohol kocok dan amati kejernihannya (Badan Standart Nasional Indonesia, 2001)

### 7. Persiapan hewan uji

Mencit putih jantan merupakan hewan uji yang digunakan pada penelitian ini. Hewan uji yang digunakan penelitian ini adalah sebanyak 30 ekor. Mencit sebanyak 30 ekor diadaptasikan selama seminggu (7 hari) dan dirawat baik dengan cara memberi makan dan minum secara teratur agar mencit sehat dan berat badan tidak berkurang, serta mencit tidak mengalami diare dengan suhu tubuh mencit optimum rata-rata 37°C. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini harus mencit yang jantan, sehat, berumur 2-3 bulan, bulu sehat, bersih, dan berat badan mencit 20-30 gram, serta mencit tersebut tidak mengalami stress dengan ciri-ciri aktif bergerak. Mencit yang terlalu diam juga tidak digunakan dalam penelitian ini dikuatirkan mencit tersebut sedang sakit

### 8. Pembuatan konsentrasi minyak atsiri

Konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak dalam penelitian ini adalah 0,5%; 1%; dan 2%. Konsentrasi akan dibuat sebanyak 10 mL dari minyak atsiri rimpang temulawak. Memerlukan pengenceran untuk pembuatan variasi konsentrasi tersebut dengan menambah air (pembawa). Pembuatan konsentrasi 0,5%; 1%; dan 2% dilakukan dengan pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak 1 tetes, 2 tetes dan 4 tetes dalam 10 mL air.

Pengaplikasian aroma dari minyak atsiri, dalam penelitian ini menggunakan metode inhalasi. Metode inhalasi bekerja dengan

membebaskan molekul minyak atsiri yang paling ringan kemudian molekul yang lebih berat dengan media pembawa air secara berurutan. Pengaturan suhu sangat penting untuk mencegah agar minyak atsiri terlalu panas, karena apabila terlalu panas minyak atsiri tersebut cepat habis dan molekul-molekul berat akan terbakar sehingga menimbulkan bau hangus. Metode aplikasi untuk mendapatkan efek aroma minyak atsiri secara inhalasi ada beberapa cara yaitu pengusapan langsung di tangan, alat penguap, rendaman, botol penyemprotan dan *diffuser*. *Diffuser* merupakan metode yang digunakan dalam praktik sehari-hari yaitu dengan meneteskan minyak ke dalam wadah yang berisi aquades dengan konsentrasi tertentu.

## **9. Pembuatan suspensi Na-CMC 1% (*Natrium Carboxil Metil Selulosa*)**

Suspensi Na-CMC 1% dibuat dengan cara menimbang 1 gram CMC-Na, lalu dilarutkan dengan aquades panas sedikit demi sedikit sampai larut. Sisa aquadest ditambahkan sampai didapat volume larutan Na-CMC sebanyak 100mL, sehingga diperoleh larutan Na-CMC 1% yang digunakan sebagai larutan pembawa. Larutan Na-CMC digunakan sebagai *suspending agent* dalam konsentrasi 0,25% -1,0% (Rowe *et al.*, 2006).

## **10. Penetapan dosis ranitidin**

Dosis ranitidin dihitung berdasarkan dosis lazimnya kemudian dikonversikan kedalam mencit. Ranitidin dengan dosis 150 mg/kg BB manusia diberikan sehari 2 kali. Kemudian konversi pada mencit dengan berat badan 20gram yaitu 0,0026. Sehingga dosis yang diberikan pada mencit yaitu  $300\text{mg} \times 0,0026 = 0,8\text{mg}/20\text{gram BB}$  mencit. Pemberian ranitidin kepada mencit dengan cara ranitidin digerus terlebih dahulu kemudian dimasukkan kedalam lumpang dan ditambah larutan koloid NA-CMC 1% b/v sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu dimasukkan kedalam labu ukur 100mL dan ditambah larutan koloid Na-CMC 1% hingga volume 100mL.

## **11. Pembagian kelompok uji**

Pengujian dalam penelitian ini menggunakan 30 mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang telah mengalami perlakuan adaptasi selama 7 hari. Pembagian kelompok uji dibuat menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan.

Kelompok pertama adalah kelompok kontrol normal yang tidak dilakukan induksi stres.

Kelompok kedua adalah kelompok kontrol negatif yang hanya diinduksi stres dengan ultrasonik.

Kelompok ketiga adalah kelompok positif, mencit putih jantan diinduksi ultrasonik dan diberikan ranitidin 0,8 mg/20gram BB mencit yang diberikan secara peroral.

Kelompok keempat adalah kelompok perlakuan mencit putih jantan diinduksi ultrasonik dan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak 0,5%.

Kelompok kelima adalah kelompok perlakuan mencit putih jantan diinduksi ultrasonik dan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak 1%.

Kelompok keenam adalah kelompok perlakuan mencit putih jantan diinduksi ultrasonik dan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak 2%.

## **12. Tahap percobaan dalam penelitian**

Hewan uji sebanyak 30 ekor mencit putih jantan yang telah diadaptasikan. Semua mencit dilakukan pengambilan darah untuk menghitung kadar TNF  $\alpha$  (awal). Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok satu merupakan kelompok normal sehingga tidak diinduksi stres dan diinduksi apapun. Kelompok dua untuk kontrol negatif merupakan kelompok yang hanya diinduksi stres dengan ultrasonik tanpa adanya induksi lainnya. Kelompok tiga sebagai kontrol positif untuk hewan uji diinduksi stres dan obat ranitidin 0,8 mg/20gram BB mencit yang diberikan secara peroral. Kelompok keempat sebagai kontrol perlakuan untuk hewan uji diinduksi stres dan diberikan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 0,5%. Kelompok kelima sebagai kontrol perlakuan untuk hewan uji diinduksi stres dan diberikan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 1%. Kelompok keenam sebagai kontrol perlakuan untuk hewan uji diinduksi stres dan diberikan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 2%.

Pemberian sediaan dan stres dilakukan selama 14 hari. Stres terjadi karena induksi ultrasonik yang dilakukan selama 14 hari, setiap hari diinduksi selama 15 menit. Induksi stres ultrasonik adalah induksi stres yang dilakukan dengan induksi suara dengan frekuensi 26.000Hz. Mencit pada hari ke 14 setelah perlakuan, diambil darahnya kemudian diukur kadar TNF- $\alpha$  (akhir) untuk melihat inflamasi mencit selama perlakuan. Setelah pengambilan darah, mencit kemudian dikorbankan

untuk diukur pH lambung, menghitung jumlah tukak, keparahan tukak lambung, dan uji histopatologi, pada uji histopatologi setiap kelompok diambil 3 sampel untuk pengujinya. Kemudian analisis data menggunakan Anova

### 13. Pengukuran kadar TNF $\alpha$

Pengukuran kadar TNF $\alpha$  dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-14 setelah pemberian inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak. Sampel berupa darah vena diambil menggunakan tabung non EDTA dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 1000x gaya gravitasi sentrifugal kemudian sampel dipisahkan dan serumnya disimpan pada suhu <-20°C. Sampel yang berupa serum darah diuji menggunakan metode ELISA Sandwich, dilakukan pengenceran 20 kali *wash buffer* menjadi 1 kali dengan *deionized water*. *Lyophilized human TNF- $\alpha$  standard* diganti dengan ditambahkan volume dari Assay Buffer A yang diindikasikan pada label vial untuk membuat *standard stock solution* 20ng/mL. Sampel pada umumnya dianalisis tanpa pelarut, namun apabila pelarut dibutuhkan, maka dapat menggunakan *assay buffer A* sebagai pelarut.

Prosedur *assay* dilakukan dengan menyiapkan 500  $\mu$ L dari 8000 pg/mL *top standard* dengan melarutkan 25  $\mu$ L dari *standard stock solution* pada 475  $\mu$ L dari assay buffer A. Pelarutan dilakukan enam kali lipat dari 8000 pg/mL *top standard* pada tabung yang berbeda menggunakan *assay buffer A* sebagai pelarut. Konsentrasi human TNF- $\alpha$  didapatkan sebanyak 8000 pg/mL, 4000 pg/mL, 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL. Assay buffer A berfungsi sebagai *zero standard* (0 pg/mL).

*Plate* dicuci sebanyak empat kali dengan sekurangnya 300  $\mu$ L dari 1 kali *wash buffer* untuk setiap *well*, sisa *buffer* dihilangkan dengan cara menekan *plate* pada bagian atas dan bawahnya menggunakan kertas pengering (*absorbent paper*). Kemudian, sebanyak 50  $\mu$ L ditambahkan dari *assay buffer A* untuk setiap *well* yang mengandung larutan standar ataupun sampel dan 50  $\mu$ L dari larutan standar atau sampel pada *well*. *Plate* ditutup menggunakan *plate sealer* dan diinkubasi dalam suhu ruangan serta digetarkan dengan kecepatan 200 rpm selama 2 jam. Isi *plate* dibuang lalu dicuci sebanyak 4 kali menggunakan 1 kali *wash buffer* dengan cara yang sama. Selanjutnya, 100  $\mu$ L ditambahkan dari *human TNF- $\alpha$  detection antibody solution* pada setiap *well*, *plate* ditutup, dan diinkubasi dalam temperatur ruangan dan digetarkan selama satu jam. Isi *plate* dibuang ke pembuangan lalu cuci *plate* sebanyak empat kali

menggunakan 1 kali *wash buffer*. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan *Avidin-HRP B* ditambahkan pada setiap *well*, *plate* ditutup, diinkubasi dalam suhu ruangan dan digetarkan selama 30 menit. Isi pada *plate* kemudian dibuang dan *plate* dicuci sebanyak 5 kali dengan 1 kali *wash buffer*, dimana pada tahap pencucian terakhir *well* direndam dalam 1 kali *wash buffer* selama 30 detik-1 menit pada setiap siklus pencucian. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  *substrate solution D* ditambahkan pada setiap *well* dan diinkubasi dalam waktu 15 menit pada keadaan gelap. *Well* yang mengandung *human TNF- $\alpha$*  akan menunjukkan perubahan warna menjadi biru dimana dengan intensitas warna yang semakin pekat maka semakin tinggi konsentrasinya. Reaksi diberhentikan dengan ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  larutan *stop solution* pada setiap *well* dan warna larutan akan berubah menjadi kuning. Tingkat penyerapan dihitung pada 450 nm setelah reaksi berhenti dalam waktu 30 menit. Kadar *TNF- $\alpha$*  pada *plate* ditandai dengan perubahan warna menjadi biru setelah diberi *TMB reagent* dan berubah menjadi warna kuning setelah diberi *stop solution*. Warna kuning yang dihasilkan semakin pekat, maka semakin tinggi kadar absorbansi *TNF- $\alpha$*  (Amin *et al.*, 2022).

#### **14. Pengukuran pH cairan lambung**

pH lambung diukur setelah hari ke 14 setelah diterapi dengan inhalasi minyak atsiri rimpang temulawak melalui pembedahan abdomen, selanjutnya pilorus serta esophagus diikat. Keluarkan lambung melalui pemotongan duodenum sisi atas serta esophagus. Injeksikan NaCl 0,2 ml pada lambung selanjutnya bedah bagian kuvatura mayor, keluarkan cairan lambung, ditampung serta tentukan pH dari cairan lambung tersebut mempergunakan pH meter (Suhatri *et al.*, 2015).

#### **15. Penilaian jumlah tukak**

Lambung dari mencit setelah hari ke 14 yang sudah diukur pH dilakukan pembedahan lambung kemudian lambung dibentangkan serta dihitung jumlah tukaknya.

#### **16. Penilaian keparahan tukak**

Penilaian untuk keparahan lambung ini dilaksanakan melalui pengukuran diameter dari tukak lambung tikus yang sudah melalui pembedahan mempergunakan jangka sorong setelah lambung dihitung jumlah tukak pada hari ke 14. Mengacu dari data yang diperoleh, selanjutnya indeks tukak bisa dihitung melalui penjumlahan data yang diperoleh melalui:

$$U = U_N + U_S + (U_P \times 10^{-1})$$

Dimana:

U = indeks tukak

- $U_N$  = rata-rata jumlah tukak setiap hewan  
 $U_S$  = rata-rata keparahan tukak  
 $U_P$  = persentasi hewan dengan tukak

## 17. Uji histopatologi

Pada uji histopatologi dilakukan hari ke 14 setelah dilakukan pengukuran pH, jumlah tukak, dan penilaian keparahan tukak. Lambung diawetkan pada larutan formalin. Pembuatan preparat histopatologi dapat dilihat secara mikroskopik terdiri dari tahap-tahap sebagai berikut:

Spesimen dipotong sesuai dengan yang diinginkan setebal 1-2 mm. Kemudian difiksasi dengan menggunakan larutan formalin 10% didalam phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4 minimal 6-7 jam. Selanjutnya difiksasi kembali dengan menggunakan larutan formalin 10% (1) dan (2) selama 1 jam. Lalu, dehidrasi dengan merendam spesimen ke dalam etanol 70%, 80%, dan 96% masing-masing selama 1 jam 30 menit. Tahap dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dan jaringan yang telah difiksasi agar nantinya mudah dilakukan parafinisasi. Kemudian dilakukan penjernihan dengan merendam spesimen kedalam xilena (1), (2), dan (3) selama 2 jam. Tahap penjernihan bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan. Kemudian *Embedding* dengan menggunakan paraffin cair 56°C (1), (2) selama 2 jam. *Blocking* pada *cassete* dan didinginkan pada suhu 4 °C beberapa saat. Spesimen dipotong dengan menggunakan mikrotom setebal 2-3 $\mu$ m kemudian dimasukkan di atas kaca objek yang telah diolesi gliserin.

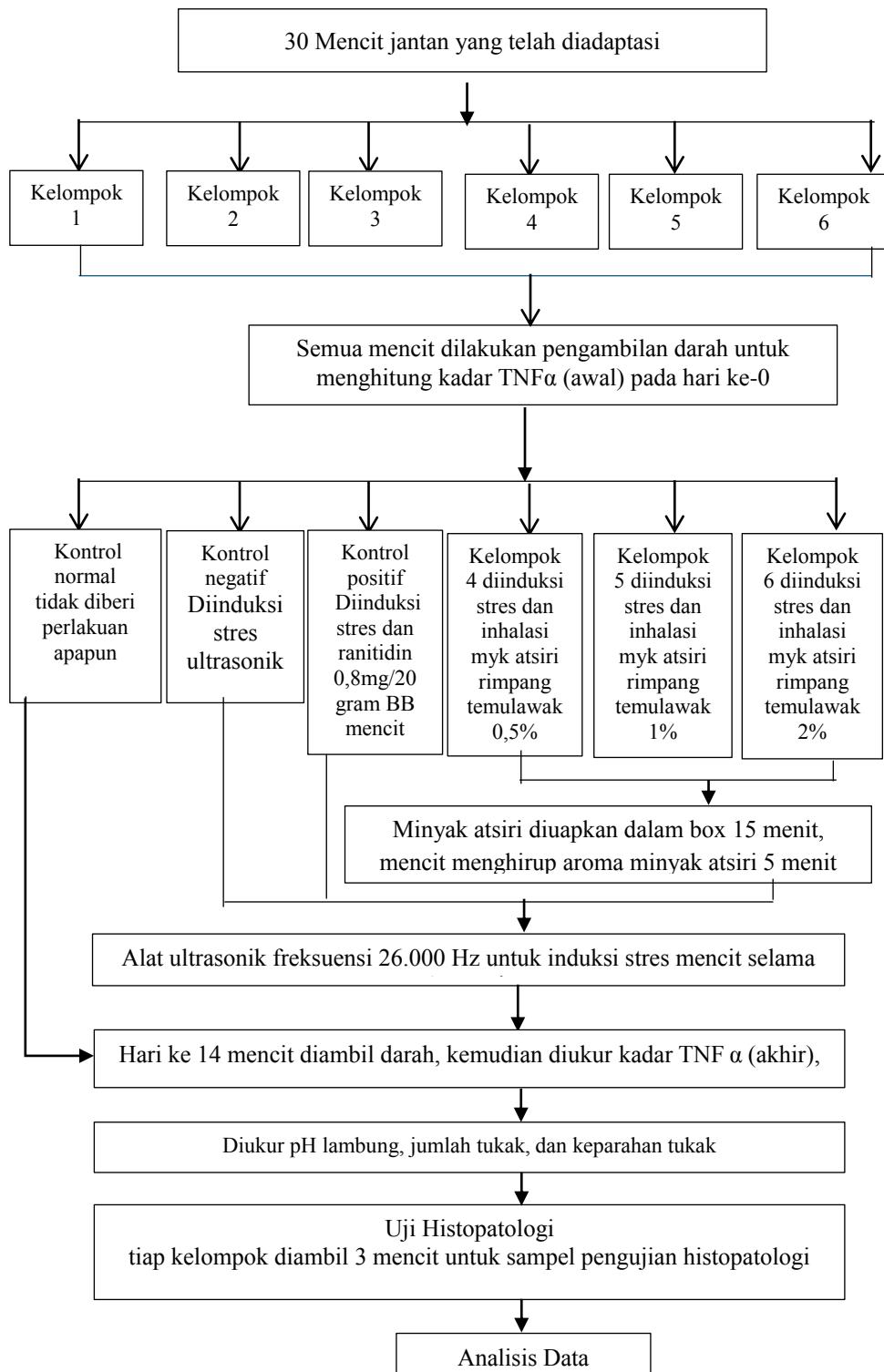
Dilakukan deparafinisasi dengan menggunakan xilol (1), (2), dan (3) selama 15 menit. Direhidrasi dengan menggunakan alkohol 96%, 80%, dan 50% masing-masing selama 15 menit. Dibersihkan dengan menggunakan air mengalir kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (rendam ke dalam zat warna *Hematoxylin mayers* selama 5 menit kemudian cuci dengan air mengalir, setelah itu direndam ke dalam larutan eosin 1% selama 1 menit. Dihidrasi dengan etanol 80%, 96%, dan absolut masing-masing 1 menit lalu dikeringkan. Direndam dalam larutan xylene selama 1 menit, kemudian dituup dengan kaca objek yang telah diberi *Canada balsam*. Diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x10 dan 10x40 (Maria *et al.*, 2017). Stres akut dapat mempengaruhi keseimbangan kimia dan fisiologi tubuh termasuk dalam sistem pencernaan. Stres dapat menyebabkan peningkatan produksi asam lambung, penurunan aliran darah ke lambung dan kerusakan pada sel lambung. Semua itu dapat berujung pada

kerusakan seluler terutama nekrosis, infiltrasi limfosit, edema dan vasodilatasi.

### **G. Analisis Hasil**

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik yang digunakan uji normalitas, untuk uji terdistribusi normal dilanjut dengan metode *Shapiro wilk* (SW). Jika data tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* kemudian dilakukan uji *Man Whitney* untuk melihat ada perbedaan tiap kelompok. Jika data terdistribusi normal ( $p<0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji parametrik analisis varian satu arah (ANOVA). Diujii dengan *Post Hoc* untuk melihat apakah terdapat perbedaan nyata diantara masing-masing kelompok perlakuan. Data efek gastroprotektif dianalisis secara kuantitatif dengan mengukur kadar TNF- $\alpha$ , pH lambung, jumlah tukak lambung, keparahan tukak lambung, histopatologi, kemudian dilanjutkan analisis statistik.

## H. Skema Jalan Penelitian



Gambar 7. Skema jalan penelitian