

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

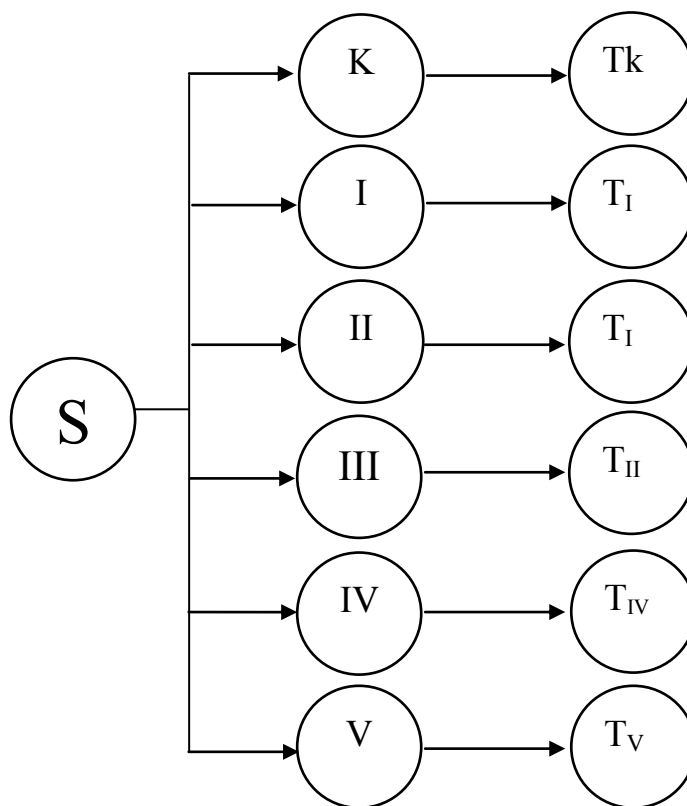
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan April 2013 – Juli 2013. Tikus wistar diadaptasi 1 minggu, kemudian diberikan Rhodamine B sesuai dosis per perlakuan/kgBB/hari dicampur dalam aquades, terminasi dan pembuatan blok paraffin dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Interpretasi hasil Patologi Anatomi sampel jaringan Hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan bantuan dokter spesialis patologi anatomi dan dibantu residen patologi anatomi.

4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental* laboratorik dengan rancangan *Post Test only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa tikus wistar sebagai objek penelitian.

Gambar**Gambar 4.1** Rancangan penelitian

Keterangan:

S = Kelompok sampel

T = Tes yang diterapkan pada tiap kelompok tikus

K = Kelompok kontrol (Rhodamine B peroral 0 mg/kgBB/hari)

I = Kelompok perlakuan 1 (Rhodamine B peroral 55,44 mg/kgBB/hari)

II = Kelompok perlakuan 2 (Rhodamine B peroral 110,88 mg/kgBB/hari)

III = Kelompok perlakuan 3 (Rhodamine B peroral 221,75mg/kgBB/hari)

IV = Kelompok perlakuan 4 (Rhodamine B peroral 443,5 mg/kgBB/hari)

V = Kelompok perlakuan 5 (Rhodamine B peroral 887 mg/kgBB/hari)

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi target

Adalah tikus wistar jantan.

4.4.2 Populasi terjangkau

Adalah tikus wistar jantan galur murni, umur 3-4 bulan, berat badan menyesuaikan, sehat, tidak ada kelainan anatomi, dan diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

4.4.3 Sampel

4.4.3.1 Kriteria inklusi

Tikus galur murni jenis wistar kelamin jantan

- a) Berat badan : disesuaikan dengan usia tikus
- b) Usia 3-4 bulan
- c) Tikus dalam keadaan sehat dan aktif
- d) Tidak ada kelainan anatomi secara makroskopis

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Tikus terlihat tidak aktif
- b) Tikus mati sewaktu penelitian

Alasan kriteria eksklusi :

- a) Menghindari faktor perancu
- b) Sulit melakukan pengawasan 24 jam terhadap sampel, bila mati tanpa pengawasan dan baru diketahui setelah beberapa saat, hasil kematian sel yang terlihat bisa saja bukan karena Rhodamine B nya, namun karena proses alami kematian sel akibat fase awal kematian sampel. Hal ini hanya akan menyebabkan kerancuan.

4.4.4 Cara pengambilan sampel

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

4.4.5 Besar sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental. Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor, oleh karena terdapat 6kelompok maka digunakan 30 ekor tikus wistar jantan.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bertingkat Rhodamine B peroral selama 12 minggu.

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat fibrosis hepar tikus wistar jantan.

4.6 Definisi operasional variable

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Nilai	Skala
Bebas	Rhodamine B Peroral Dosis bertingkat	Rhodamine B peroral dosis bertingkat yang diberikan pada tikus wistar sesuai kelompoknya. 1/16 x Dosis letal pada kelompok 1, 1/8 x dosis letal pada kelompok 2, 1/4 x dosis letal pada kelompok 3, 1/2 x dosis letal pada kelompok 4, 1x letal pada kelompok 5, 0 ml/hari pada kelompok kontrol; Volume rhodamine B dosis bertingkat diukur dengan timbangan miligram setelah itu dicampur dengan akuades hingga 3 ml dan diberikan per sonde selama 12 minggu. Dosis lethal oral akut pada penelitan sebelumnya adalah 877 mg/kgBB/hari	1.55,44 mg/kg BB 2.110,88mg/kg BB 3.221,75mg/kg BB 4.443,5mg/kg BB 5.887 mg/kg BB	Rasio
Tergantung	Tingkat fibrosis hepar tikus wistar	Tingkat fibrosis hepar tikus wistar didapatkan dengan menilai gambaran hepatosit dengan mikroskop perbesaran 100x dan 400x, 5 lapangan pandang, dan dinilai menggunakan "Ishak Scoring System"	Hasil dimasukkan ke "Ishak Scoring System" untuk dilakukan pengukuran skala fibrosis hepar	Rasio

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Asam pikrat
- 3) Rhodamine B
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Hematoksilin Eosin
 - c) Larutan Xylol
 - d) Akuades

4.7.2 Alat

4.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a) Kandang tikus
- b) Sonde

4.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a) Scalpel
- b) Pinset
- c) Gunting operasi
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

4.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

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

4.7.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian tingkatan fibrosis Hepar tikus wistar jantan dari kelompok paparan Rhodamine B peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

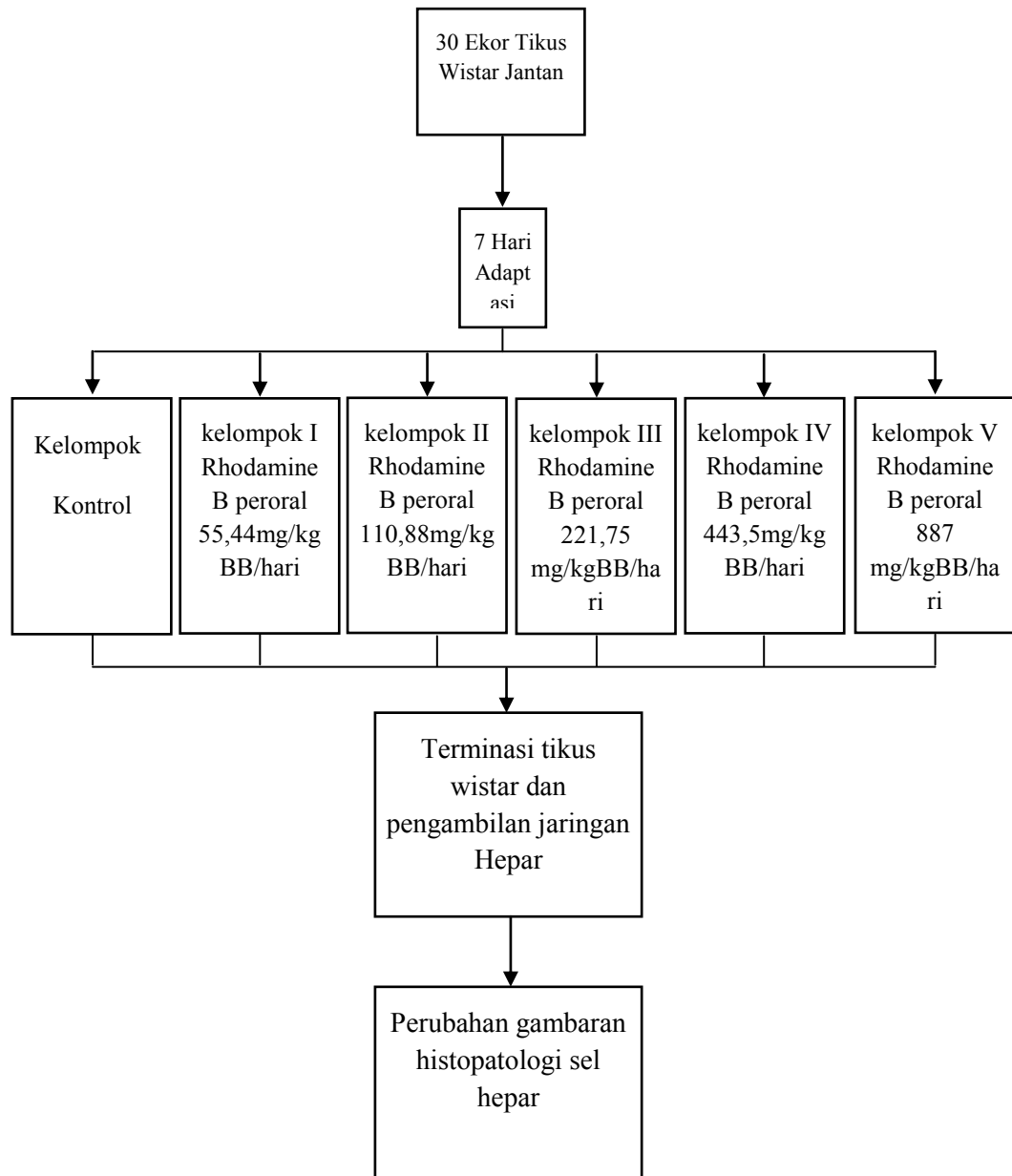
1. 30 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*
2. Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih secara acak. Kemudian diberi tanda dengan asam pikrat pada daerah berbeda.
3. Masing-masing tikus ditimbang berat badannya
4. Mulai hari ke-8 selama 12 minggu pada kelompok I diberikan Rhodamine B dengan dosis 55,44 mg/kg BB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan

standard an minum ad libitum. Kelompok II diberikan Rhodamine B dengan dosis 110,88mg/kg BB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum ad libitum. Kelompok III diberikan Rhodamine B dengan dosis 221,75mg/kg BB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard dan minum ad libitum. Kelompok IV diberikan Rhodamine B dengan dosis 443,5mg/kg BB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*. Kelompok V diberikan Rhodamine B dengan dosis 887 mg/kg BB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*.

5. Setelah 12 minggu masing-masing tikus ditimbang berat badannya
6. Tikus wistar dimatikan dengan cara dislokasi leher
7. Organ hepar diambil. 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%
8. Tabung berisi sampel hepar tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan hematoksin Eosin. Dari setiap sampel hepar dibuat preparat dengan potongan axial. Preparat tersebut dibaca tiap lapangan pandang dengan pembesaran 400x.

Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histopatologis yaitu fibrosis pada hepar dengan menilai sel hepatosit yang nampak di sekitar area porta, dan dilanjutkan dengan penggunaan “Ishak Scoring System” yang berguna untuk scoring stadium fibrosis. Pembacaan diarahkan dokter spesialis patologi anatomi, dan dibantu residen patologi anatomi.

4.8 Alur penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian

4.9 Analisis Data

Karena bentuk data yang diperoleh sudah dalam bentuk ordinal, data langsung diuji beda dengan menggunakan statistik *non parametric Kruskal Wallis*, jika $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

- a) Jika $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b) Jika $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda dan bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna dari skor fibrosis hepar tikus wistar pada pemberian Rhodamine B peroral dosis bertingkat selama 12 minggu.

Sebaliknya jika didapatkan hasil yang tidak berbeda makna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap skor fibrosis hepar tikus wistar pada pemberian Rhodamine B peroral dosis bertingkat 12 minggu.

4.10 Etika penelitian

Sebelum penelitian dilakukan telah dimintakan *Ethical Clearance* dari komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. (F-MIPA UNNES). Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*, untuk kemudian disondakan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. seluruh yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti