

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

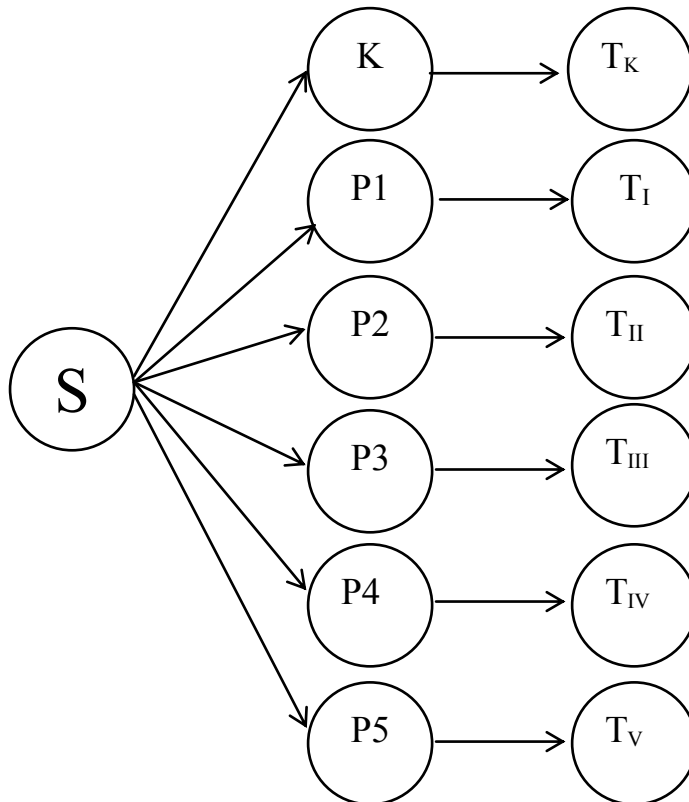
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada 12 April 2013 – 19 Juli 2013. Tikus wistar diadaptasi 1 minggu, kemudian diberikan Rhodamin B yang dicampur dalam akuades, terminasi dan pembuatan blok parafin dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan interpretasi hasil Patologi Anatomi sampel jaringan Limpa dilakukan di Laboratorium Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Interpretasi diarahkan 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
- K = Kelompok perlakuan 1 (Rhodamine B peroral 0 mg/kgBB/hari)
- P1 = Kelompok perlakuan 2(Rhodamine B peroral 55,4375mg/kgBB/hari)
- P2 = Kelompok perlakuan 3(Rhodamine B peroral 110,875mg/kgBB/hari)
- P3 = Kelompok perlakuan 4(Rhodamine B peroral 221,75mg/kgBB/hari)
- P4 = Kelompok perlakuan 5(Rhodamine B peroral 443,5mg/kgBB/hari)
- P5 = Kelompok perlakuan 6(Rhodamine B peroral 887 mg/kgBB/hari)

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi target

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) Anatomi normal

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Tikus sakit dan terlihat pasif (tidak lincah)
- b) Tikus mati sewaktu penelitian berlangsung

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 6 kelompok maka diperlukan minimal 30 ekor tikus.

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 gambaran histomorfometris limpa tikus wistar jantan.

4.6 Definisi operasional variabel

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. 0ml/hari pada kelompok 1, 1/16 x dosis letal pada kelompok 2, 1/8 x dosis letal pada kelompok 3, 1/4 x dosis letal pada kelompok 4, 1/2xletal pada kelompok 5, 1 x Dosis letal	1.kontrol 2.55,4375 mg/kg BB 3.110,875 mg/kg BB 4.221,75 mg/kg BB 5.443,5 mg/kg BB 6.887 mg/kg BB	Rasio

		ml/hari pada kelompok kontrol; Volume rhodamine B dosis bertingkat diukur menggunakan spuit 1cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 3 ml dan diberikan per sonde selama 12 minggu. Dosis lethal oral akut pada penelitian sebelumnya adalah 877 mg/kgBB/hari		
Tergantung	Gambaran histomorfometri limpa tikus wistar	Gambaran histomorfometri limpa tikus wistar didapatkan dengan menghitung diameter centrum germinativum, diameter folikel pulpa putih, dan jarak zona marginalis pada tikus wistar yang telah dicat <i>HE (Hematoksilin Eosin)</i> kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali, kemudian difoto dengan menggunakan camera eyepiece lalu diukur menggunakan software imageJ. diukur 5 folikel kemudian dirata-rata	Diameter centrumgerminativum, diameter folikel pulpa putih, jarak zona marginalis	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 histomorfometri pemeriksaan jaringan :

- a) Larutan buffer formalin 10%

- b) Hematoksilin Eosin
- c) Larutan Xylol
- d) Alkohol bertingkat 30%,40%,50%,70%,80%,90%,96%
- e) Akuades

4.7.2 Alat

4.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a) Kandang tikus
- b) Sonde
- c) Spuit 1cc (tuberculin)

4.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a) Scalpel
- b) Pinset chirurgis
- c) Gunting oprasi lurus tajam/tumpul
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

4.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histomorfometris

- a) Mikroskop cahaya
- b) *Object glass* dan *deck glass*
- c) eyepiece digital camera.
- d) Software imageJ

4.7.3 Jenis data

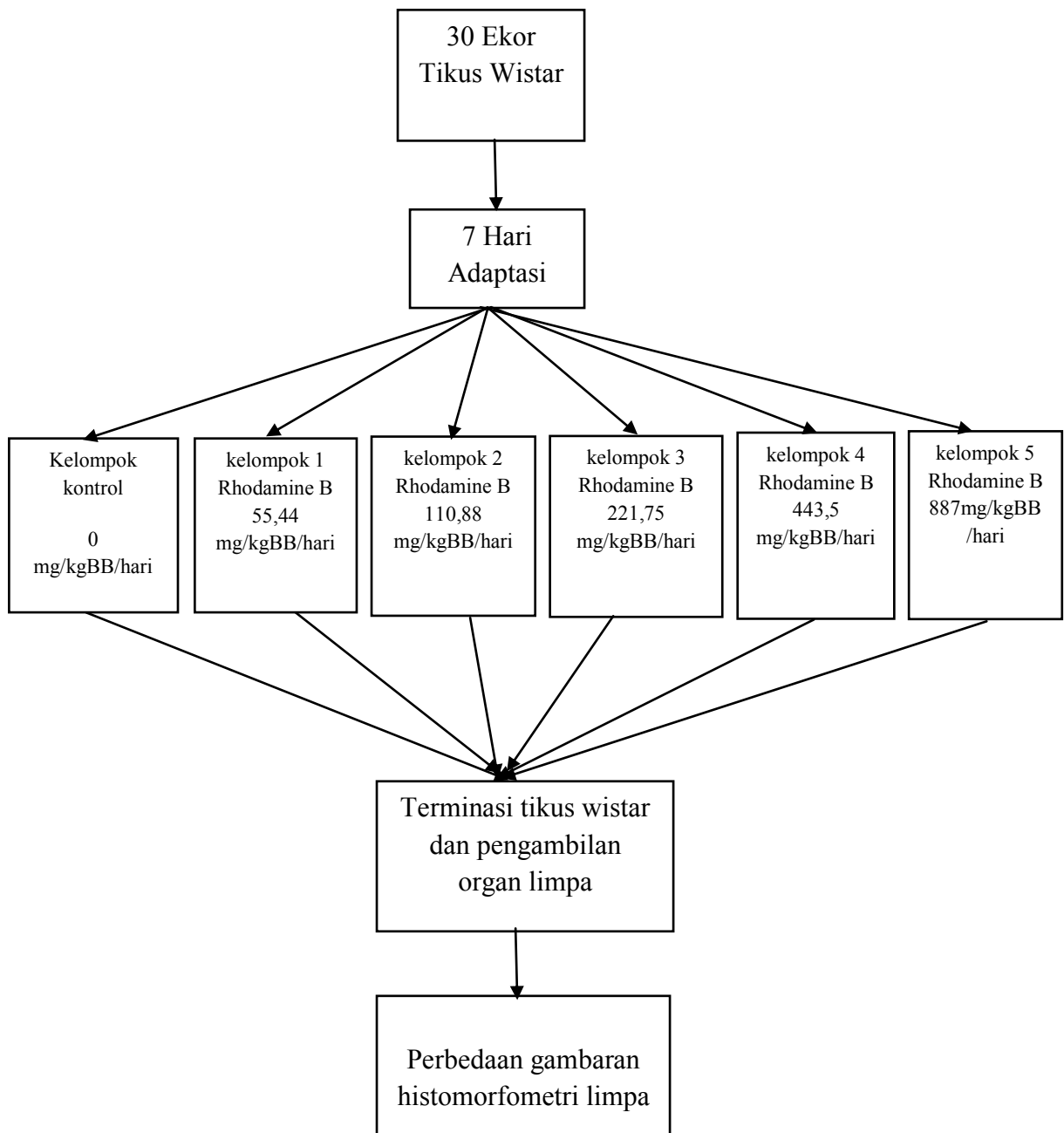
Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran histomorfometris Limpa tikus wistar jantan dari kelompok paparan Rhodamine B peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

- a) 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*
- b) 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
- c) Masing-masing tikus ditimbang berat badannya
- d) Mulai hari ke-8 selama 12 minggu pada Kelompok I diberikan Rhodamine B dengan dosis 55,44 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan Rhodamine B dengan dosis 110,88 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok III diberikan rhodamine B dengan dosis 221,75 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*. Kelompok IV diberikan rhodamine B dengan dosis 443,5 mg/kgBB/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/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*
- e) Setelah 12 minggu masing-masing tikus ditimbang berat badannya
- f) Tikus wistar dimatikan dengan cara dislokasi leher
- g) Organ limpa diambil. Sampel limpa tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian limpa dan 9 bagian buffer formalin 10%

Tabung berisi sampel limpa tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histomorfometri dengan pewarnaan hematoxilin Eosin (HE). Dari setiap sampel limpa dibuat preparat dengan potongan membujur. Pengamatan preparat histomorfometri limpa dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 100x. lalu difoto dengan menggunakan eyepice camera, lalu diameter centrum germinativum, diameter flikel pulpa dan jarak zona marginalis pada limpa diukur dengan menggunakan software ImageJ .Hasil pengamatan dikosultasikan ke dokter spesialis patologi anatomi.

4.8 Alur penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian

4.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik *parametric One Way Anova*, jika $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila ditribuikan 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 sraristik *non-parametric Kruskal-Wallis*, jika didapat $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.²⁶

- a. Jika $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda dan bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran hostomorfometri Limpa 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 gambaran hostomorfometri limpa tikus wistar pada pemberian Rhodamine B peroral dosis bertingkat 12 minggu.

4.10 Etika penelitian

Sebelum penelitan dilakukan telah dimintakan *Ethical Clearnce* dari komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Tikus wistar dipelihara di Laboraturium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negrti Semarang. (F-MIPA UNNES). Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk kemudian disondekan. Hewan

