

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang Lingkup Penelitian

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

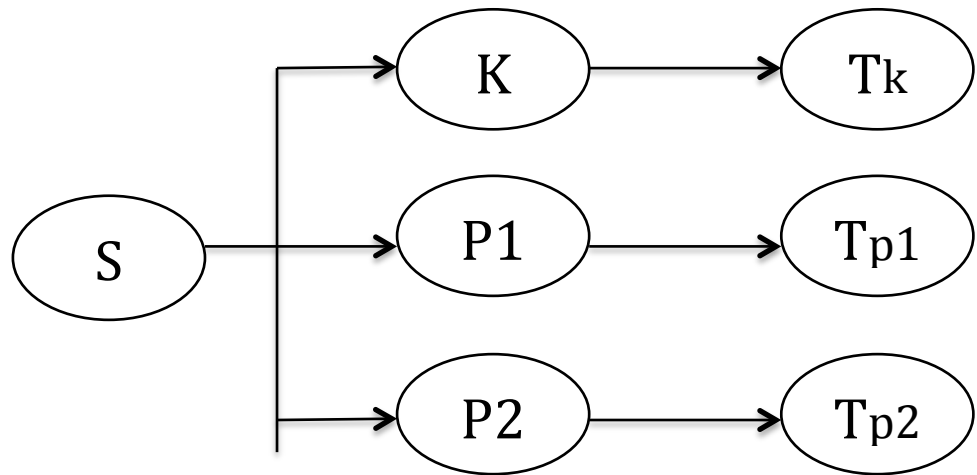
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Adaptasi tikus wistar, perlakuan paparan dengan boraks peroral dosis 300 dan 600 mg/kgBB/ hari yang diberikan dengan cara sonde selama 28 hari. Pembuatan blok paraffin sampai pengecatan jaringan dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (F-MIPA UNNES). Sedangkan interpretasi hasil makroskopis dan mikroskopis sampel hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilaksanakan selama 28 hari, yaitu mulai Maret 2013 hingga April 2013.

4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *post test only control group design* yang menggunakan hewan coba tikus wistar sebagai objek percobaan.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Keterangan :

S = kelompok sampel

K = kelompok kontrol (boraks peroral 0 mg/kgBB)

P1 = kelompok perlakuan 1 (boraks peroral 300 mg/kgBB)

P2 = kelompok perlakuan 2 (boraks peroral 600 mg/kgBB)

Tk = tes kelompok kontrol

Tp1 = tes kelompok perlakuan 1

Tp2 = tes kelompok perlakuan 2

4.4. Populasi dan Sampel

4.4.1. Populasi Target

Populasi target adalah tikus wistar jantan.

4.4.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus wistar jantan keturunan murni, umur 3 bulan, berat badan 150 – 200 gram, sehat, dan tidak ada abnormalitas anatomi,

dan diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (F-MIPA UNNES).

4.4.3. Sampel

4.4.3.1. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Sehat
- 3) Anatomi tampak normal
- 4) Berat badan 150 – 200 gram
- 5) Umur 3 bulan

4.4.3.2. Kriteria Ekslusi

- 1) Tikus sakit dan terlihat tidak aktif sewaktu mendapat perlakuan
- 2) Tikus mati sewaktu mendapat perlakuan

4.4.4. Cara Pengambilan Sampel

Cara pengambilan sampel adalah dengan menggunakan *simple random sampling*. Randomisasi dilakukan pada tikus yang telah memenuhi kriteria inklusi dan ekslusi serta telah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

4.4.5. Besar Sampel

Berdasarkan WHO, maka besar sampel setiap kelompok perlakuan minimal 5 tikus.³⁰ Karena akan dilakukan percobaan terhadap 3 kelompok dan untuk tiap kelompok ditambahkan 2 ekor tikus sebagai cadangan, maka total tikus yang dibutuhkan adalah 21 ekor.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Boraks peroral dosis bertingkat.

4.5.2. Variabel Tergantung

Gambaran makroskopis dan mikroskopis hepar tikus wistar.

4.6. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Boraks	<p>Boraks yang digunakan adalah boraks berbentuk serbuk yang umumnya beredar di masyarakat. Boraks diberikan per oral, untuk kelompok kontrol dosis 0mg/kgbb/hari. Boraks dosis 300 mg/kgBB/hari sebagai kelompok perlakuan 1, dan dosis 600 mg/kgBB/hari sebagai kelompok perlakuan 2.</p> <p>Cara memasukkan boraks peroral adalah dengan cara mencampurkan dosis boraks tersebut dengan air minum tikus sebanyak 3 ml. Kemudian air minum tersebut dimasukkan ke traktus digestivus dengan cara sonde 1 kali per hari. Boraks diberikan selama 28 hari, pada hari ke 28 dilakukan terminasi dislokasi leher pada tikus wistar kemudian diambil heparnya lalu dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis kemudian dilihat perbedaannya</p>	Ordinal

dengan kelompok kontrol.

Tergantung	Gambaran makroskopis hepar tikus wistar	Gambaran makroskopis pada penelitian kali ini dinilai dengan melihat kerusakan permukaan hepar tikus wistar, normal diberikan jika permukaan hepar adalah rata dan halus, sedangkan penilaian abnormal diberikan jika terdapat jaringan ikat, kista, abses, atau benjolan-benjolan pada permukaan hepar, dengan nilai sebagai berikut : 1) Nilai 0 : Normal 2) Nilai 1 : abnormal <25% 3) Nilai 2 : abnormal 26-50% 4) Nilai 3 : abnormal 51-75% 5) Nilai 4 : abnormal 76-100%	Ordinal
Tergantung	Gambaran Mikroskopis Hepar tikus wistar	Gambaran mikroskopis hepar diperoleh dengan cara membuat preparat hepar menggunakan pengecatan Hematoksilin Eosin(HE), kemudian diamati gambaran mikroskopisnya di daerah sekitar vena sentralis dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x pada 4 lapangan pandang masing-masing 25 sel. Gambaran mikroskopis hepar tikus wistar dinilai dengan menghitung tingkat kerusakan tingkat heptosit berdasarkan skor derajat perubahan struktur histopatologis sel hepar menurut <i>Manja Roenigk</i> , dengan kriteria penilaian sebagai berikut : 1) Nilai 1 : Normal	Numerik

- 2) Nilai 2 : Degenerasi albuminosa
 - 3) Nilai 3 : Degenerasi hidropik
 - 4) Nilai 4 : Nekrosis
-

4.7. Cara Pengumpulan Data

4.7.1. Bahan

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Boraks
- 3) Asam pikrat
- 4) Air
- 5) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Paraffin
 - c) Albumin
 - d) *Hematoksin Eosin*
 - e) Asam asetat
 - f) Larutan *Xylol*
 - g) Alkohol bertingkat
 - h) Aquades

4.7.2. Alat

4.7.2.1. Alat Pemberi Perlakuan

- 1) Kandang tikus
- 2) Sonde
- 3) Spuit 5cc

4.7.2.2. Alat Otopsi

- 1) Scalpel
- 2) Pinset
- 3) Gunting
- 4) Botol untuk menyimpan organ

4.7.2.3. Alat Pemeriksaan Makroskopis

- 1) Kaca pembesar
- 2) Kamera digital

4.7.2.4. Alat Pemeriksaan Mikroskopis

- 1) Mikroskop cahaya
- 2) *Object glass* dan *deck glass*
- 3) Kamera digital

4.7.3. Jenis Data

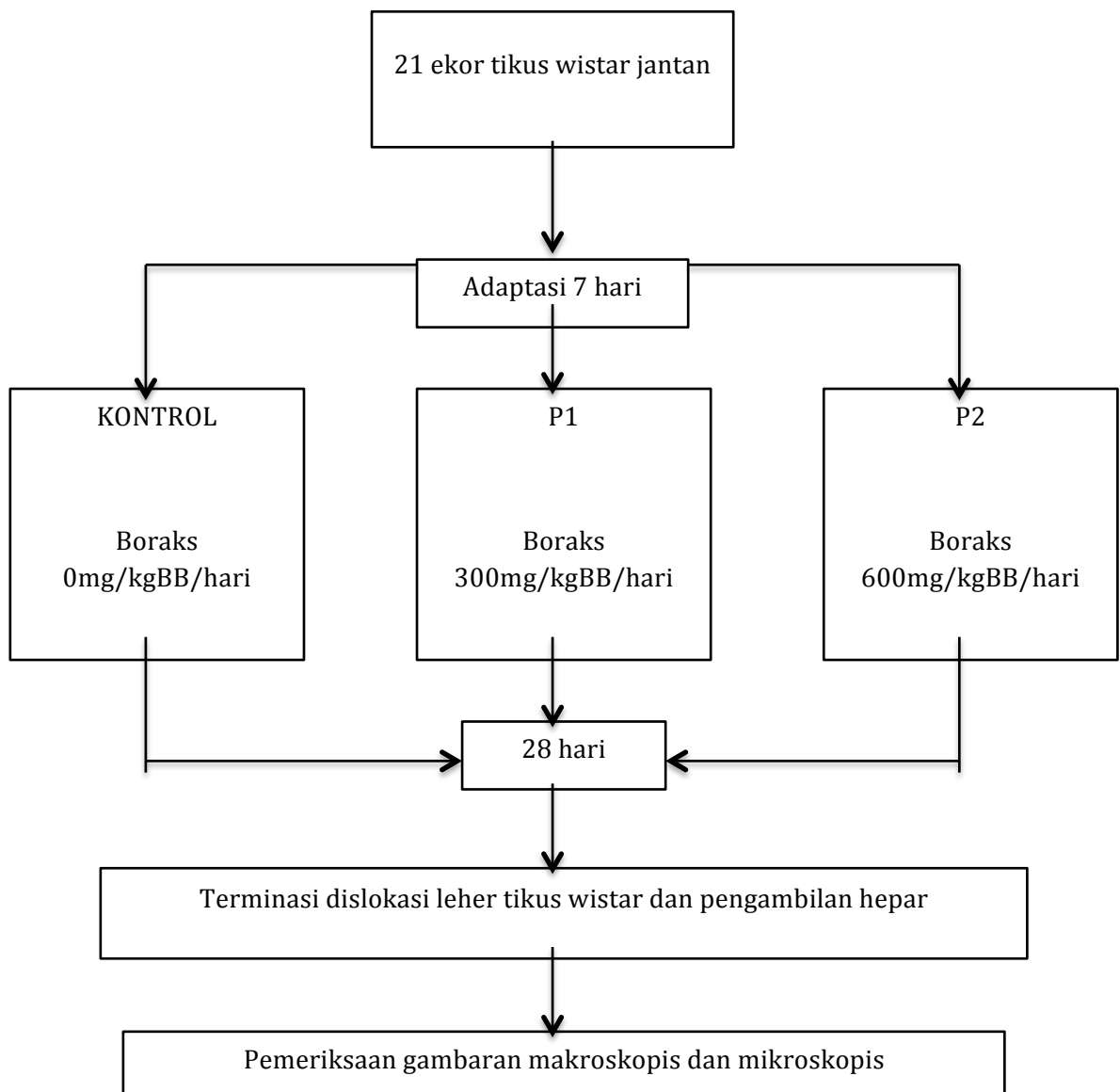
Data yang dikumpulkan merupakan data primer, yaitu data berasal dari penelitian perubahan makroskopis dan mikroskopis hepar tikus wistar dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi paparan boraks peroral dosis bertingkat.

4.7.4. Cara Kerja

- 1) Melakukan adaptasi terhadap 21 ekor tikus wistar jantan selama 7 hari di laboratorium dengan kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- 2) Pada hari ke-1 setelah adaptasi, membagi tikus wistar menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 7 ekor tikus wistar yang dipilih secara acak. Kemudian memberi tanda dengan asam pikrat pada daerah yang berbeda yaitu kepala dan punggung.
- 3) Menimbang berat badan masing-masing tikus.
- 4) Mulai hari ke-1 sampai hari ke-28 pada kelompok kontrol (K) diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum* diberi boraks dengan dosis 0mg/kgBB/hari. Kelompok Perlakuan 1 (P1) diberikan boraks dengan dosis 300 mg/kgBB/hari yang dicampur dengan air minum sebanyak 3 ml dan diberikan peronde sekali sehari, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok Perlakuan 2 (P2) diberikan boraks dengan dosis 600 mg/kgBB/hari yang dicampur dengan air minum sebanyak 3 ml dan diberikan peronde sekali sehari, pakan standar dan minum *ad libitum*.
- 5) Pada hari ke-28 mematikan tikus wistar dengan cara dislokasi leher.
- 6) Melakukan otopsi pada masing – masing tikus dan mengambil hepar kemudian sampel hepar tersebut kemudian diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet bufer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian hepar dan 9 bagian bufer formalin 10%.
- 7) Meletakkan tabung berisi sampel hepar tikus wistar ke rak tabung kemudian melakukan penilaian perubahan makroskopis hepar sesuai dengan tingkat kerusakan permukaan hepar, kemudian membuat preparat histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*. Dari setiap sampel

hepar dibuat preparat dengan potongan longitudinal. Preparat tersebut akan dibaca 100 sel dalam empat lapangan pandang dengan perbesaran 400x didaerah sekitar vena sentralis. Sasaran yang dibaca adalah perubahan mikroskopis sel hepar tikus wistar dengan penilaian *Manja Roenigk*.

4.8. Alur Penelitian



4.9. Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS. Data di uji normalitas menggunakan *Shapiro wilk*, kemudian dilanjutkan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan pada semua kelompok, apabila didapatkan perbedaan pada semua kelompok, kemudian dilanjutkan uji beda menggunakan *Mann Whitney* untuk mengetahui beda antar 2 kelompok.

4.10. Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan akan dimintakan *Ethical Clearence* 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 perlakuan, boraks dosis bertingkat dicampur dengan air hingga 3 ml kemudian dimasukkan peroral dengan cara disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

4.11. Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literatur	■																			
Penyusunan Proposal	■																			
Seminar Proposal								■												
Persiapan Penelitian								■	■	■	■	■								
Penelitian													■	■	■	■				
Analisis Data dan Evaluasi																	■	■	■	
Penulisan Laporan																	■	■	■	■
Seminar Hasil																				■