

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

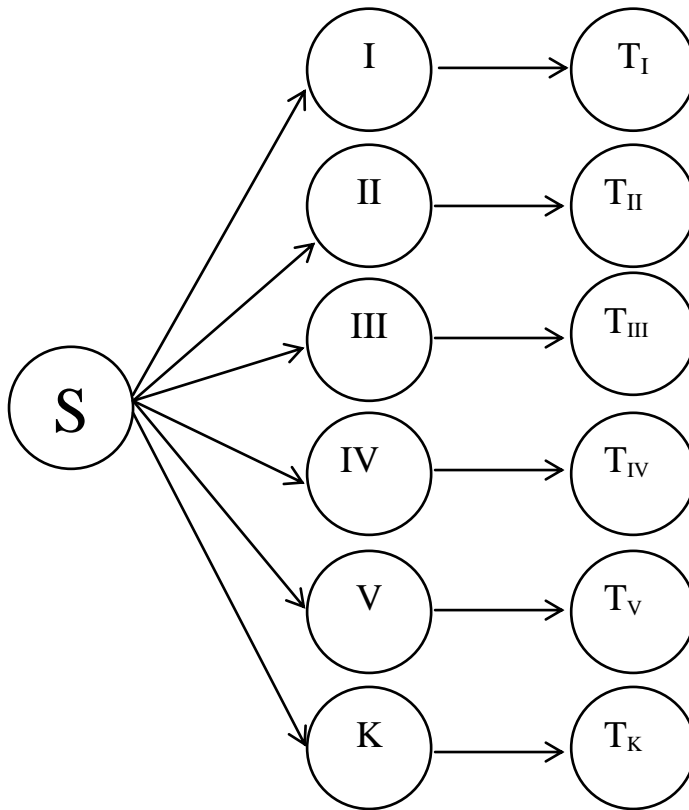
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan Maret 2013 – Juni 2013. Tikus wistar diadaptasi 1 minggu, kemudian diberikan Rhodamine B yang dicampur dalam aquades, terminasi dan pembuatan blok paraffin dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan interpretasi hasil Patologi Anatomi sampel jaringan Testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro oleh dokter spesialis 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 4. Rancangan penelitian

Keterangan:

- S = Kelompok sampel
- I = Kelompok perlakuan 1(Rhodamine B peroral 887 mg/kgBB/hari)
- II = Kelompok perlakuan 2(Rhodamine B peroral 443,5mg/kgBB/hari)
- III = Kelompok perlakuan 3(Rhodamine B peroral 221,75mg/kgBB/hari)
- IV = Kelompok perlakuan 4(Rhodamine B peroral 110,875mg/kgBB/hari)
- V = Kelompok perlakuan 5(Rhodamine B peroral 55,4375mg/kgBB/hari)
- K = Kelompok kontrol (Rhodamine B peroral 0 mg/kgBB/hari)
- T_I = Test kelompok perlakuan 1
- T_{II} = Test kelompok perlakuan 2
- T_{III} = Test kelompok perlakuan 3
- T_{IV} = Test kelompok perlakuan 4
- T_V = Test kelompok perlakuan 5

T_k = Test kelompok kontrol

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

- a) Tikus galur murni jenis wistar kelamin jantan
- b) Berat badan : disesuaikan dengan usia tikus
- c) Usia 3-4 bulan
- d) Tikus dalam keadaan sehat dan aktif
- e) Anatomi tampak normal

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Tikus sakit dan terlihat pasif
- 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 histopatologis tubulus seminiferous testis tikus wistar jantan

4.6 Definisi operasional variabel

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Nilai	Skala
Bebas	Rhodamin B peroral dosis bertingkat	Rhodamin B peroral dosis bertingkat yang diberikan pada tikus wistar sesuai kelompoknya. 1 x Dosis letal pada kelompok 1, 1/2 x dosis letal pada kelompok 2, 1/4 x dosis letal pada kelompok 3, 1/8 x dosis letal pada kelompok 4, 1/16 x letal pada kelompok 5, 0 ml/hari pada kelompok kontrol; Berat rhodamine B dosis bertingkat diukur menggunakan timbangan milimeter. 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	1) 887mg/kg BB 2) 443,5mg/kg BB 3) 221,75mg/kg BB 4) 110,88mg/kg BB 5) 55,44mg/kg BB 6) 0mg/kg BB	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologi s testis tikus wistar	Gambaran histopatologis testis tikus wistar didapatkan mengamati sel germ yang berada di dalam tubulus seminiferous dengan	Scoring	Ordinal

Tabel 2. Definisi operasional variable(lanjutan)

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Nilai	Skala
		mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali dalam 5 lapangan pandang dan menggolongkannya dalam <i>Johson's score</i> .		

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Asam pikrat
- 3) Rhodamin B
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Larutan *Bouin*
 - c) Paraffin
 - d) Albumin
 - e) Hematoksilin Eosin
 - f) Asam asetat
 - g) Larutan Xylol
 - h) Alkohol bertingkat 30%,40%,50%,70%,80%,90%,96%

- i) 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) Skalpel
- b) Pinset
- c) Gunting
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

4.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

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

4.7.3 Jenis data

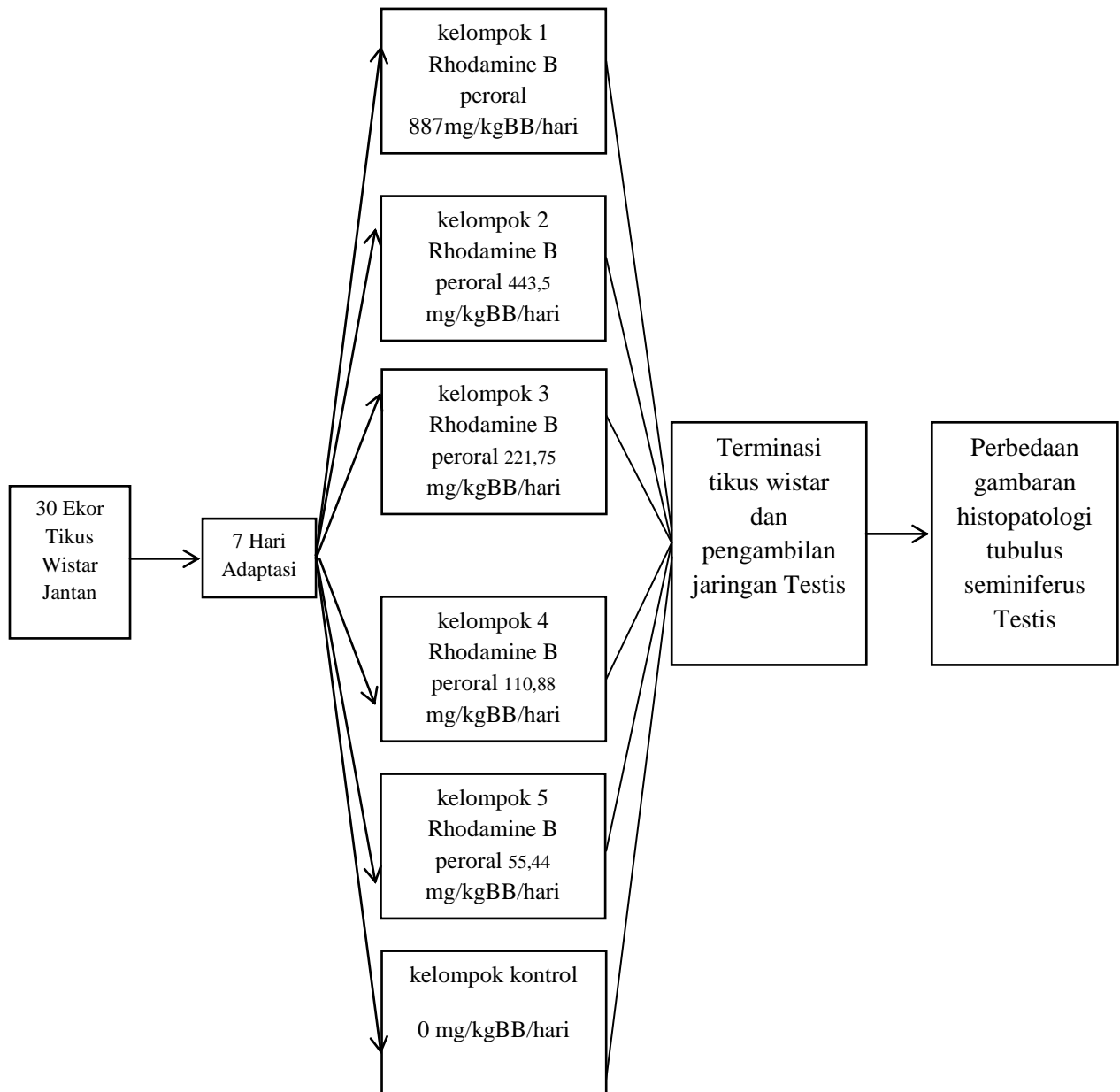
Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran histopatologis testis tikus wistar jantan dari kelompok paparan Rhodamin B peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

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 Rhodamin B dengan dosis 887mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan Rhodamin B dengan dosis 443,5 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok III diberikan Rhodamin B dengan dosis 221,75 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok IV diberikan Rhodamin B dengan dosis 110,88mg/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 55,44 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*. Kelompok terakhir adalah Kelompok Kontrol diberikan 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 testis diambil. Sampel testis tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian testis dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Tabung berisi sampel testis tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan hematoksilin Eosin. Dari setiap sampel testis dibuat preparat dengan potongan axial. Preparat tersebut dibaca tiap lapangan pandang dengan pembesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histopatologis pada testis dengan menghitung sel alveoli normal yang tampak. Pembacaan diarahkan dokter spesialis patologi anatomi, dan dibantu residen patologi anatomi.

4.8 Alur penelitian



Gambar 5. 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 srarisrik *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 $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda dan bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis testis tikus wistar pada pemberian Rhodamin B peroral dosis bertingkat selama 12 minggu.

Sebaliknya jika didapatkan hasil yang tidak berbeda makna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologi testis tikus wistar pada pemberian Rhodamin B peroral dosis bertingkat 12 minggu.

4.10 Etika penelitian

Sebelum penelitian dilakukan akan 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 perlakuan, Rhodamin B dosis bertingkat di campur dengan akuades hingga 3 ml kemudian disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.