

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang lingkup penelitian**

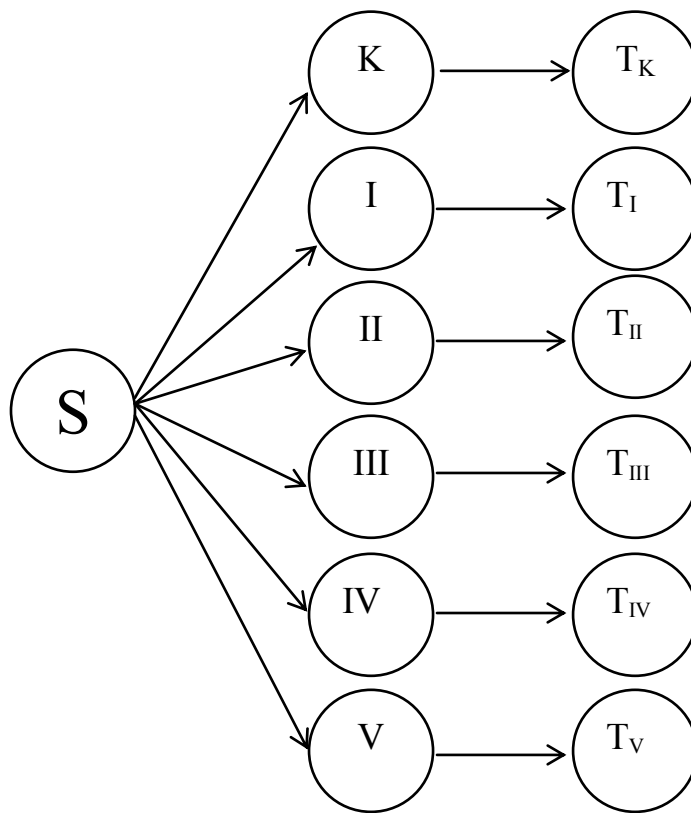
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Patologi Anatomi.

#### **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 rhodamin B mg/kgBB/hari dicampur dalam aquades dan terminasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan pembuatan blok paraffin dan interpretasi hasil Patologi Anatomi sampel jaringan ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

#### **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 5.** Rancangan penelitian

Keterangan:

- S = Kelompok sampel
- K = Kelompok kontrol (Rhodamine B peroral 0 mg/kgBB/hari)
- I = Kelompok perlakuan 1 (Rhodamine B peroral 55,43 mg/kgBB/hari)
- II = Kelompok perlakuan 2 (Rhodamine B peroral 110,875 mg/kgBB/hari)
- III = Kelompok perlakuan 3 (Rhodamine B peroral 221,75 mg/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)
- T<sub>k</sub> = Test kelompok kontrol
- T<sub>I</sub> = Test kelompok perlakuan 1
- T<sub>II</sub> = Test kelompok perlakuan 2

- T<sub>III</sub> = Test kelompok perlakuan 3  
T<sub>IV</sub> = Test kelompok perlakuan 4  
T<sub>V</sub> = Test kelompok perlakuan 5

#### **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) Tidak terlihat kelainan anatomi secara makroskopis

###### **4.4.3.2 Kriteria eksklusi**

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

#### **4.4.4 Cara pengambilan sampel**

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*sample 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 histopatologi ginjal tikus wistar.

#### 4.6 Definisi operasional variabel

**Tabel 2.** 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. 0 ml/hari pada kelompok control, 1/16x Dosis lethal pada kelompok 1, 1/8x dosis lethal pada kelompok 2, 1/4x dosis lethal pada kelompok 3, 1/2x dosis lethal pada kelompok 4, 1x lethal pada kelompok 5. Volume rhodamin 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 penelitan sebelumnya adalah 887 mg/kgBB/hari	1) 0 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia) 2) 55,44 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia) 3) 110,88 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia) 4) 221,75 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia) 5) 443,5 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia) 6) 887 mg/kg BB (berat badan menyesuaikan usia)	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologis ginjal tikus wistar	Gambaran histologis ginjal tikus wistar didapatkan dengan menghitung jumlah tubulus normal pada tikus wistar yang telah dicat <i>HE (Hematoksilin Eosin)</i> dan <i>PAS-Jones</i> , kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dalam 5 lapangan pandang. Penilaian gambaran histologis ginjal sesuai		Rasio

---

dengan ciri-ciri sebagai berikut.<sup>23-24</sup>

1. Lumen kecil tidak rata dan dibentuk oleh selapis sel kuboid besar.
  2. Sitoplasma eosinofilik kuat dan bergranul.
  3. Terdapat brush border, namun tidak selalu ada pada setiap sel.
  4. Inti besar dan bulat terletak agak kearah basis
  5. Membrana basalis terlihat jelas dengan pewarnaan PAS.
  6. Tidak terdapat degenerasi albuminosa.
  7. Tidak terdapat *protein cast*.
- 

## 4.7 Cara pengumpulan data

### 4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Tikus wistar
- 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) *Jones-PAS-M Stain Kit*
- g) Asam asetat
- h) Larutan *Xylol*
- i) Alkohol bertingkat 30%,40%,50%,70%,80%,90%,96%
- j) Akuades

#### **4.7.2 Alat**

##### **4.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan**

- a) Kandang tikus
- b) Sonde (sprit dengan ujung tumpul berbahan timah, d=2mm)
- c) Sprit 1cc (tuberculin)
- d) Sprit 5 cc

##### **4.7.2.2 Alat untuk otopsi**

- a) Skalpel
- b) Pinset *chirurgis*
- 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 histopatologi ginjal tikus wistar dari kelompok paparan Rhodamine B peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

### 4.7.4 Cara kerja

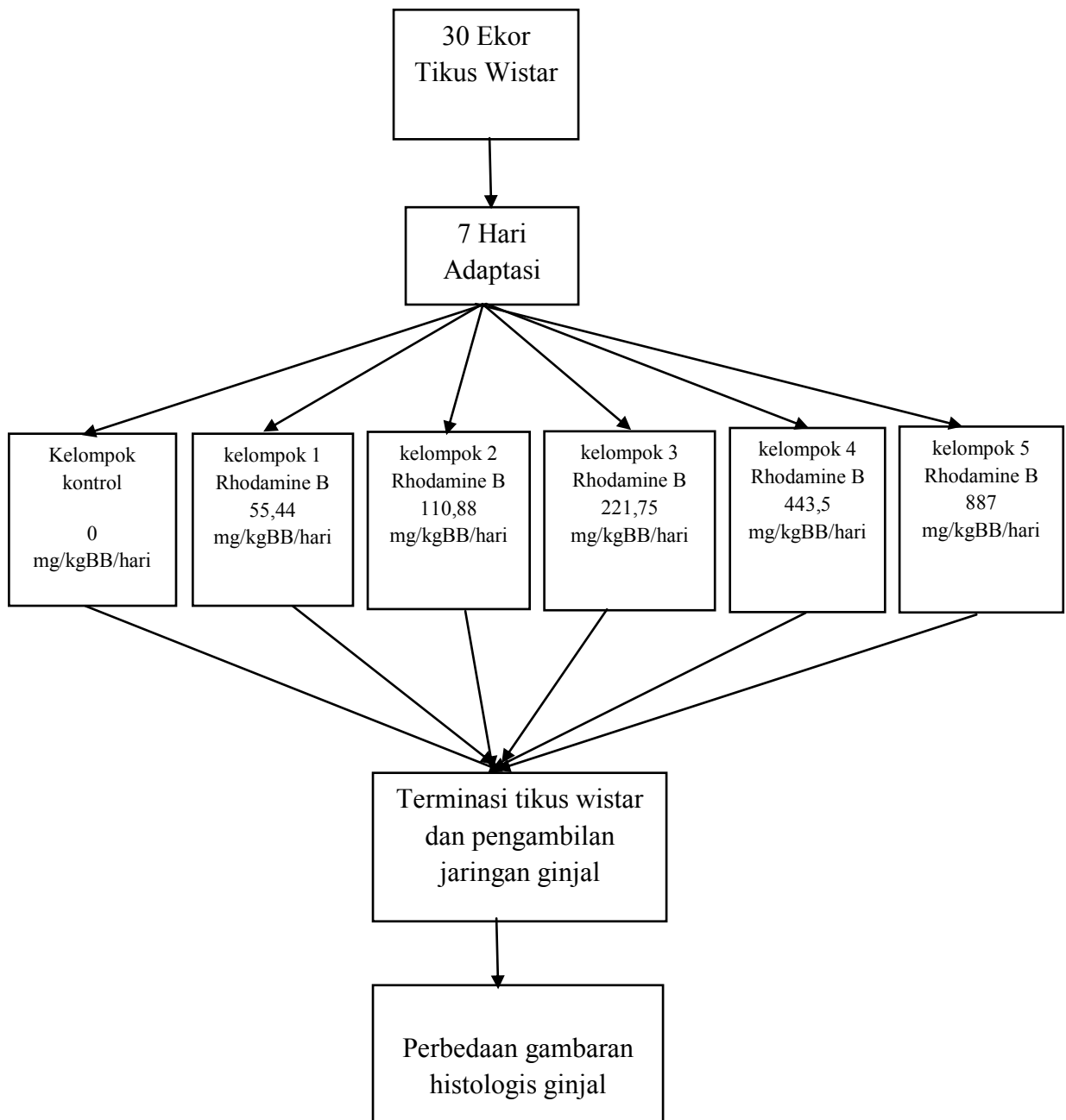
- a) 30 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*
- b) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih 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 standar dan 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*. 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 ginjal diambil. Sampel ginjal tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Tabung berisi sampel ginjal tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan *hematoksilin Eosin* dan *PAS-Jones*. Dari setiap sampel ginjal dibuat preparat dengan potongan koronal. Preparat tersebut dibaca jumlah tubulus normal dalam 5 lapangan pandang dengan perbesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah melihat perubahan abnormal gambaran histopatologi pada ginjal dengan menghitung tubulus normal.

#### 4.8 Alur penelitian



**Gambar 6.** Alur penelitian

#### 4.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Pada penelitian ini didapatkan distribusi data tidak normal, atau varians data tidak sama maka ditransformasi. Setelah ditransformasi tetap tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik *non-parametric Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)* untuk perbandingan antar kelompok.<sup>30</sup>

#### 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.