

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

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

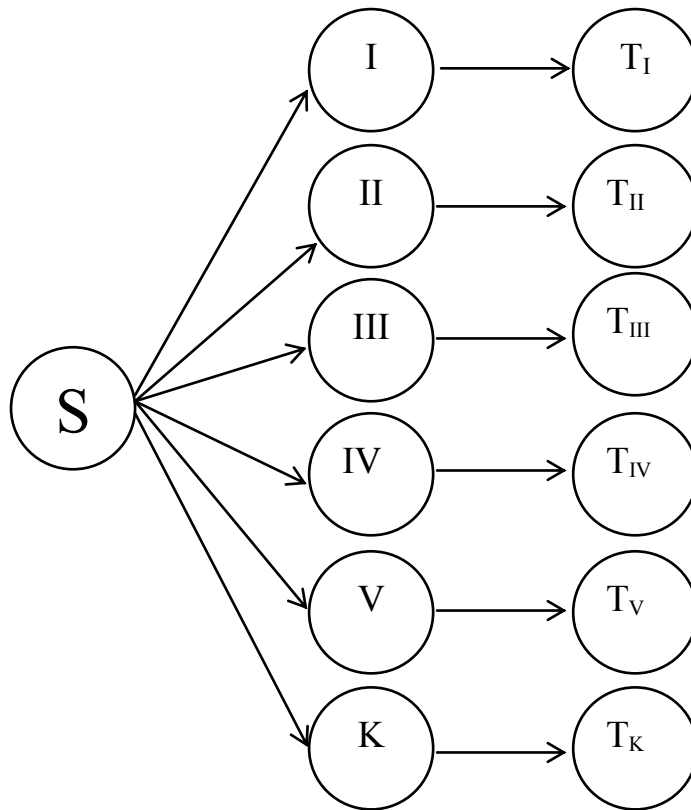
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Patologi Anatomi.

#### **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 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 paru dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi 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 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 110,87mg/kgBB/hari)
- III = Kelompok perlakuan 3(Rhodamine B peroral 221,75mg/kgBB/hari)
- IV = Kelompok perlakuan 4(Rhodamine B peroral 443,5mg/kgBB/hari)
- V = Kelompok perlakuan 5(Rhodamine B peroral 887mg/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 200-250, 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 : 200-250
- c) Usia 3-4 bulan
- d) Tikus dalam keadaan sehat dan aktif
- e) Tidak ada kelainan anatomi secara makroskopis

###### **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 Rhodamine B peroral dosis bertingkat selama 12 minggu.

#### **4.5.2 Variabel tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat fibrosis paru 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. 0 mg/hari pada Kelompok Kontrol, 1/16 x 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, 1 x Dosis letal pada Kelompok 5; Besar jumlah Rhodamine B dosis bertingkat diukur menggunakan timbangan miligram. Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 3 ml dan diberikan per sonde selama 12 minggu. Dosis letal oral akut pada penelitian sebelumnya adalah 877 mg/kgBB/hari	0 mg/kg BB 55,44 mg/kg BB 110,88 mg/kg BB 221,75 mg/kg BB 443,5 mg/kg BB 887 mg/kg BB	Rasio
Tergantung	Tingkat fibrosis paru tikus wistar	Tingkat fibrosis paru diklasifikasikan menggunakan <i>Modified Aschroft Scale</i> . Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x dalam 5 lapangan pandang	Tingkat fibrosis paru dengan <i>Modified Aschroft Scale</i>	Ordinal

## 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) Weigert (Van Gieson A+B)
- c) Paraffin
- d) Albumin
- e) MG I, MG II, dan MG III
- 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 tingkat fibrosis paru tikus wistar jantan dari kelompok paparan Rhodamine B peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

#### 4.7.4 Cara kerja

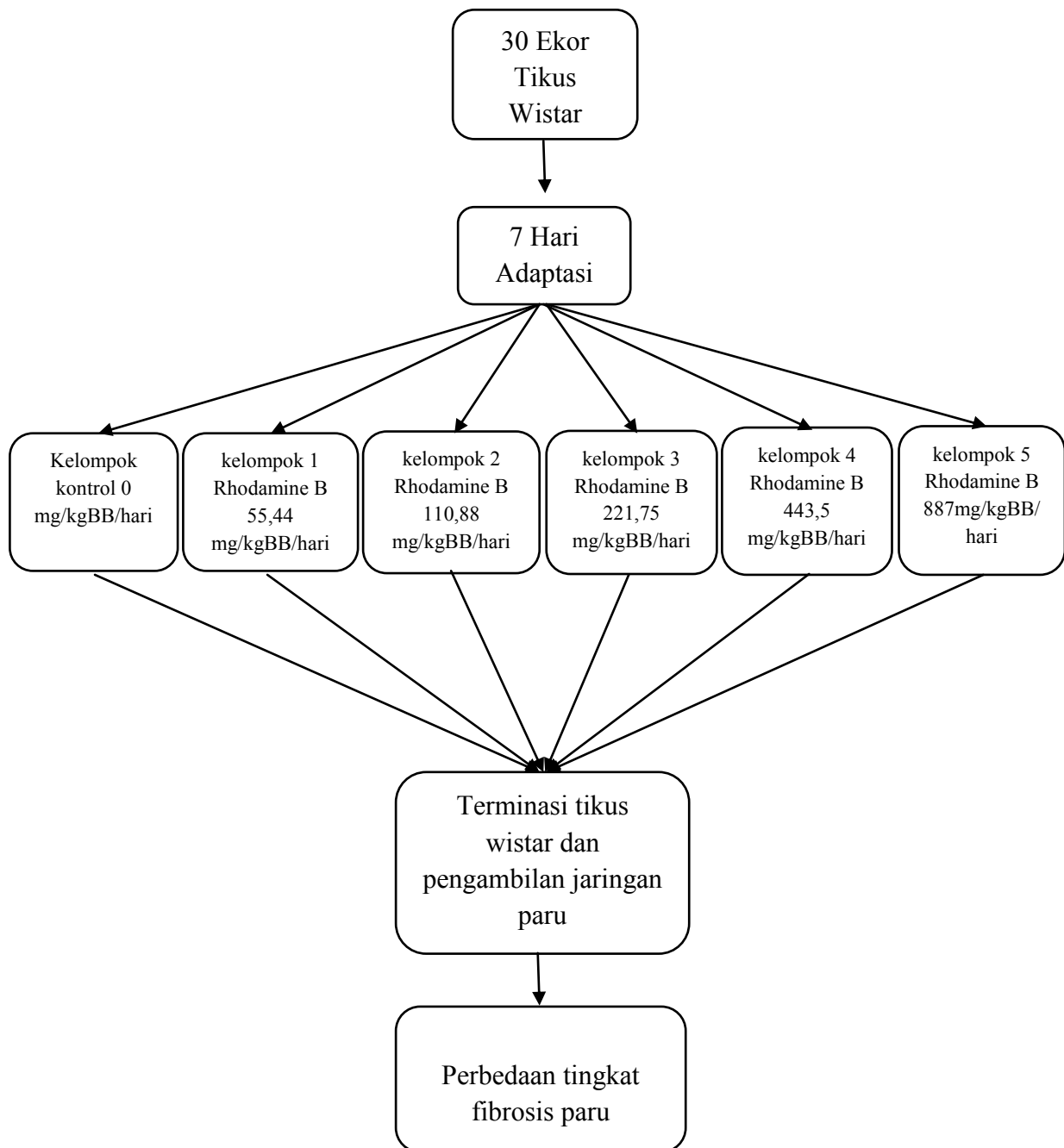
- a) 30 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*
- b) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih 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 110,88mg/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 443,5mg/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 887mg/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 paru diambil. Sampel paru tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian paru dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Tabung berisi sampel paru tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Masson's Trichrome. Dari setiap sampel paru dibuat preparat dengan potongan koronal. Preparat tersebut dibaca tiap lapangan pandang dengan pembesaran 100x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal tingkat fibrosis pada paru dengan mengamati tingkat fibrosis yang tampak. Pembacaan diarahkan dokter spesialis patologi anatomi, dan dibantu residen patologi anatomi.



#### 4.8 Alur penelitian



**Gambar 4.2** Alur penelitian

#### 4.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan dilakukan uji beda menggunakan statistik *non-parametric Kruskal-Wallis*, jika didapat  $p < 0,05$  dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.<sup>25</sup>

- 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 tingkat fibrosis paru 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 tingkat fibrosis paru 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 perlakuan, Rhodamine 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.