

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

IV.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan meliputi pemeliharaan hewan coba di Laboratorium MIPA UNNES dan dilakukan pemberian warfarin LD₅₀ dan LD₁₀₀, kemudian dilakukan percobaan di Laboratorium Forensik RSUP. Dr. Kariadi Semarang dengan mengamati efek toksik keracunan warfarin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan hingga mati, setelah itu dilakukan pemeriksaan dalam untuk melihat secara makroskopis perubahan yang terjadi pada organ dalam tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Sedangkan uji histopatologi organ Paru dan Usus halus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diberi Warfarin LD₅₀ dan LD₁₀₀ dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Waspada, Semarang.

IV.2. Rencana Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan hewan coba sebagai obyek percobaan. Skema rancangan penelitian

untuk melihat perubahan makroskopis dan histopatologi pada organ tikus putih yang diberi Warfarin LD₅₀ dan LD₁₀₀.

IV.3. Materi Penelitian

IV.3.1. Hewan Coba

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan umur lebih dari 90 hari dengan berat 150-200 gr. Hewan coba dipelihara di Kandang Hewan Coba dalam bak kandang plastik dengan alas sekam, dengan bagian atas kandang diberi tutup kawat strimin sedemikian rupa sehingga tikus tidak lepas. Suhu ruang hewan percobaan 18-26°C dan dalam ruangan berventilasi cukup. Pakan tikus berupa pellet (*Charoen Pokphan 511 Starter*) dan minum dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara *ad libitum*.

IV.3.2. Obat/ Racun

Penelitian ini menggunakan bahan yang berasal dari senyawa kimia berupa tablet, yaitu warfarin (*Simarc®*) 2 mg. Pemberian paparan Warfarin (*Simarc®*) yang telah dicampur aquadest dengan dosis 200 mg/Kg kepada kelompok LD₅₀ dan dosis 400mg/Kg kepada kelompok LD₁₀₀ menggunakan metode *force feeding/ intragastric*.

IV.3.3. Bahan Kimia

Larutan *buffer* yang akan digunakan sebagai larutan fiksasi pada organ paru, hati, dan usus halus agar terhindar dari proses pembusukan adalah larutan buffer

formalin 10 %. Bahan kimia tersebut akan diambil dari Laboratorium Forensik RSUP. Dr. Kariadi Semarang. Larutan yang akan digunakan sebagai pelarut dari Warfarin adalah aquadest.

IV.3.4. Alat Penelitian

Alat untuk pembuatan pencampuran senyawa/ racun yang digunakan yaitu mortir dan stamper, serta gelas ukur.

Alat untuk memasukan/ memaparkan Warfarin pada hewan coba, pemeriksaan luar, pemeriksaan dalam dan pengambilan organ untuk pemeriksaan histopatologi serta dokumentasi yaitu skapel, gunting, pisau dapur, pinset bedah, sonde/ *gastric tube*, kamera, *stopwatch*, paku payung, wadah sample.

IV.4. Metode Penelitian

IV.4.1. Populasi

Populasi yang diteliti adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.

IV.4.2. Sampel

IV.4.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi adalah kriteria dimana subjek penelitian dapat mewakili dalam sampel penelitian yang memenuhi syarat sebagai sampel.

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah :

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan
- Umur 90 - 120 hari

- Berat > 150-200 gr
- Tikus dalam kondisi sehat : gerakan-gerakan makan, minum, keadaan tenang, tidak ada luka dan cacat.

IV.4.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi adalah kriteria dimana subjek penelitian tidak dapat mewakili sampel karena tidak memenuhi syarat sebagai sampel. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah :

- Tikus dalam kondisi sakit
- Tikus mati
- Tikus stress

IV.4.2.3. Besar Sampel

Besar sampel penelitian menggunakan 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan pada kelompok perlakuan dengan LD₅₀, 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan pada kelompok perlakuan dengan LD₁₀₀ dan 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan kelompok kontrol.

Besar sample yang diuji ditentukan dengan rumus Federer yaitu :

$$(n-1) \cdot (t-1) \geq 15$$

dimana:

n = Jumlah sample tiap kelompok

t = Jumlah Kelompok

dengan t = 3, maka didapatkan jumlah sample yang dibutuhkan :

$$(n-1) \cdot (t-1) \geq 15 \rightarrow (n-1) \cdot (3-1) \geq 15 \rightarrow (n-1) \cdot (2) \geq 15 \rightarrow 2n -$$

$$2 \geq 15 \rightarrow 2n \geq 17 \rightarrow n \geq 17/2 = 8,5 \approx 9. \text{ Berdasarkan}$$

perhitungan rumus diatas, maka besar sample pada penelitian

ini adalah lebih dari/ sama dengan 9 ekor tiap kelompok.

IV.4.2.4. Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan penghitungan umur dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan semenjak lahir sehingga dipastikan umur tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan diatas tiga bulan. Selanjutnya dilakukan pengukuran berat badan dan memastikan jenis kelamin.

IV.4.3. Variabel dan Definisi Operasional

IV.4.3.1. Variabel

a. Variabel independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah obat warfarin dengan dosis LD₅₀ 200 mg/kgBB dan LD₁₀₀ 400 mg/kgBB.

b. Variabel dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah efek toksik terhadap tikus berupa pemeriksaan makroskopik dan histopatologi organ.

c. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah stress pada hewan coba, kondisi kandang.

IV.4.3.2. Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No	Variable	Definisi Operasional	Nilai	Skala
1	Warfarin	Antikoagulan generasi pertama ang berfungsi menghmbiasi vit K dalam proses koagulasi	1. LD50 dengan dosis 200mg/kgbb 2. LD100 dengan dosis 400mg/kgbb	Rasio
2	Gambaran makroskopis organ Paru dan Usus Halus	Gambaran Makroskopis yang dimaksud adalah pengukuran ukuran yang terdiri dari panjang,lebar,dan pengukuran berat organ	1. Panjang (Centimeter) 2. Lebar (Centimeter) 3. Berat (Gram)	Rasio

3	Gambaran mikroskopis organ Paru	Gambaran Mikroskopis yang dimaksud adalah menilai gambaran perdarahan pada jaringan organ paru dengan mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 100X dengan 5 lapangan pandang.	0. 0% 1. <25% 2. 25% - 50% 3. 50% - 75% 4. 75% - 100%	Rasio
4	Gambaran mikroskopis organ Usus Halus	Gambaran mikroskopis usus halus yang dimaksud adalah menilai tingkat kerusakan usus halus dengan mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 400X dengan 5 lapangan pandang. Penilaian tingkat kerusakan usus halus dengan menggunakan system skoring modifikasi Barthel Manja	0. Normal 1. Deskuamasi epitel 2. Erosi mukosa 3. Ulserasi 4. Perdarahan	Ordinal

IV.4.4. Pembuatan larutan warfarin dengan cara dilarutkan dalam aquadest

Warfarin yang diberikan pada hewan coba dilarutkan dalam aquadest yang bersifat netral, tidak mempunyai efek toksik.

Warfarin (*Simarc®*) dihitung sesuai dosis untuk kelompok LD₅₀ dan LD₁₀₀, dimasukkan ke dalam mortir dan dihaluskan dengan menggunakan stamper. Selanjutnya ditambahkan dengan aquadest dengan volume tertentu. Selanjutnya diaduk sampai terlarut dan homogen. Pembuatan larutan Warfarin (*Simarc®*) diperhitungkan sehingga volume yang diberikan ke tikus antara 1,0-5,0 ml. dengan memperhitungkan volume kapasitas lambung tikus.

Rumus umum yang digunakan adalah⁴⁰ :

$$\text{Volume pemberian Warfarin dosis LD}_{50} = \frac{\text{Berat badan tikus}}{1000} \times \frac{200}{\text{kadar Warfarin}}$$

Sebanyak 100,0 mg Warfarin ditimbang dan dilarutkan dalam 5,0 ml aquadest, hingga diperoleh larutan Warfarin dengan kadar 20 mg/ ml. Tikus dengan berat badan 200 gr membutuhkan Warfarin 40 mg atau sebanyak 2 ml larutan Warfarin.

$$\text{Volume pemberian Warfarin dosis LD}_{100} = \frac{\text{Berat badan tikus}}{1000} \times \frac{400}{\text{kadar Warfarin}}$$

Sebanyak 100,0 mg Warfarin ditimbang dan dilarutkan dalam 5,0 ml Aquadest, hingga diperoleh larutan Warfarin dengan kadar 20 mg/ ml. Tikus dengan berat badan 200 gr membutuhkan Warfarin 80 mg atau sebanyak 4 ml larutan Warfarin.

IV.4.5. Perlakuan pada Hewan Percobaan

1. Melakukan pengumpulan 27 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.
2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.
3. Memberi Warfarin yang telah dicampur Aquadest dengan dosis 200 mg/Kg kepada kelompok LD₅₀ dan dosis 400mg/Kg kepada kelompok LD₁₀₀ . menggunakan metode *force feeding/ intragastric*.
4. Pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang mati akibat perlakuan pemberian Warfarin, akan dilakukan otopsi dengan membuat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial toraks. Menilai keadaan organ paru dan usus halus.
5. Mengambil sample organ yang akan diperiksa dan memasukan kedalam wadah yang berisi larutan buffer formalin.
6. Melakukan pemeriksaan Histopatologi pada sample yang telah diambil.

IV.5. Evaluasi Hasil dan Analisis Data

Evaluasi hasil uji pemberian Warfarin meliputi pengamatan kematian hewan coba, pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi bentuk, ukuran, warna, bintik perdarahan, pelebaran pembuluh darah, kerusakan pada organ Paru, dan Usus halus. Sedangkan mikroskopis melihat gambaran histopatologi dari organ Paru, dan Usus Halus meliputi jaringan hiperemik, perdarahan, tanda peradangan, dan tanda nekrotik. Untuk mendeskripsikan efek toksisitas dari Warfarin antar kelompok perlakuan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak computer.

IV.6. Rancangan Penelitian

Penelitian ini mempunyai tipe perancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mempunyai 2 kelompok perlakuan. Dengan uji validitas menggunakan rumus RAL

$$t (r - 1) \geq 15$$

Dimana : t = Kelompok perlakuan

 r = Pengulangan