

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup Penelitian

4.1.1 Ruang Lingkup Keilmuan

Penelitian ini mencakup bidang Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

4.1.2 Ruang Lingkup Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

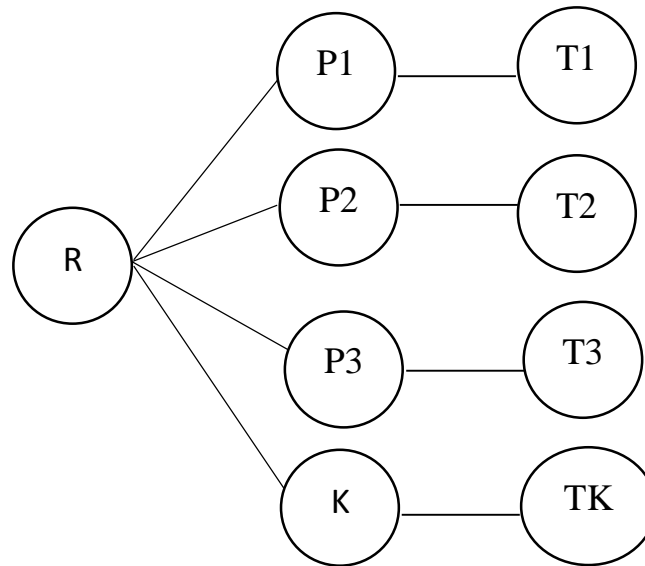
4.1.3 Ruang Lingkup Waktu

Penelitian, pengumpulan dan analisa data dilakukan dari bulan Maret-Mei 2015

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan tikus wistar sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 4. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Randomisasi.

P1 : Tikus diberi pakan yang dicampur dengan Tawas dengan dosis 2400mg/kgBB/hari.

P2 : Tikus diberi pakan yang dicampur dengan Tawas dengan dosis 1600mg/kgBB/hari.

P3 : Tikus diberi pakan yang dicampur dengan tawas dengan dosis 800mg/kgBB/hari.

K : Kelompok kontrol, tidak mendapat perlakuan

T1 : Tes Kelompok Perlakuan 1

T2 : Tes Kelompok Perlakuan 2

T3 : Tes Kelompok Perlakuan 3

TK : Tes Kelompok Kontrol

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi Target

Populasi target adalah tikus wistar jantan.

4.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negri Semarang.

4.3.3 Sampel

4.3.3.1 Kereteria Inklusi

- a) Tikus wistar jantan
- b) Umur 2-3 bulan
- c) ± 200 gram
- d) Tikus dalam keadaan sehat dan lincah

4.3.3.2 Kereteria Esklusi

- a) Mati pada saat perlakuan
- b) Perilaku berubah (tidak doyan makan, lemah dan tidak lincah)

4.3.4 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umum dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari tikus wistar sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok tikus yang suda diadaptasi pakan selama 1 minggu.

4.3.5 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 4 kelompok maka diperlukan minimal 20 ekor tikus.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bertingkat Tawas pada pakan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis ginjal tikus wistar.

4.5 Definisi Oprasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Dosis bertingkat tawas pada pakan	Tawas yang diberikan dibeli dari toko bahan kimia yang ada di Semarang, diberikan bersama dengan pakan standart tikus dengan konsentrasi 4%,8% dan 12%. Kebutuhan pakan tikus adalah 10% dari berat badan tikus, sehingga jika berat badan tikus rata-rata 200 gram maka jumlah kebutuhan pakan per gram berat badan adalah 20 gram. Tawas yang diberikan dalam bentuk kristal adalah 4%, 8%, dan 12% dari 20 gram yaitu 0,8gram, 1,6gram, 2,4 gram yang dicampur dalam pakan tersebut.	miligram	Ordinal
Tergantung	Gambaran histopatologis ginjal tikus wistar	Gambaran histopatologis hepar tikus wistar dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.		rasio

Tabel 3. Kriteria Pembacaan Derajat Histopatologi Ginjal

Degenerasi	Skor	Nekrosis	Skor
<25%	1	25%	1
25-<50%	2	26 – 49 %	2
50-<75%	3	50 – 74 %	3
75-100%	4	75 – 100 %	4

4.6 Cara Pengumpulan Data

4.6.1 Bahan Penelitian

- 1) Tikus wistar
- 2) Tawas
- 3) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Hematoksin Eosin
 - c) Larutan xylol
 - d) Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e) aquades
- 4) Makanan dan Minuman Tikus

4.6.2 Alat Penelitian

- a) Kandang tikus wistar beserta tempat minumnya
- b) Satu set alat bedah minor (untuk mengambil organ tikus)
- c) Alat untuk proses mikroteknik pembuatan preparat histologi : deckglass, objekglass, mikrotom, oven, cetakan paraffin.
- d) Mikroskop cahaya.
- e) kamera digital

4.6.3 Jenis Data

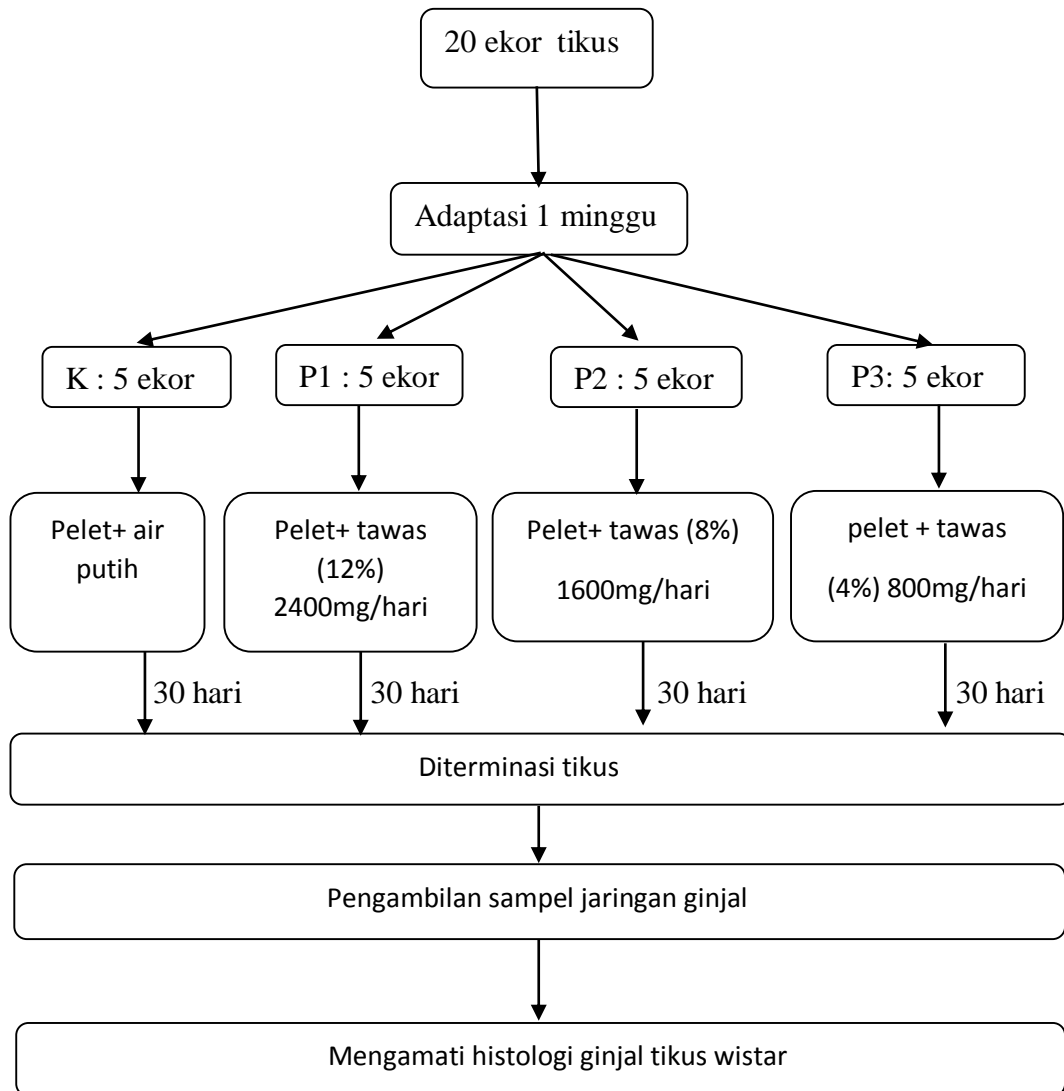
Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran histopatologis ginjal tikus wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

4.6.4 Cara Kerja

- a) Dua puluh ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di labortaorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standart dan minum *ad libitum*.
- b) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih secara acak.
- c) Menimbang berat badan masing-masing tikus.
- d) Mulai hari ke-8 selama 30 hari pada kelompok 1 diberi tawas dengan dosis 2400 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok 2 diberikan tawas dengan dosis 1600 mg/kgBB/hari yang diberikan dalam pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok 3 diberikan tawas dengan dosis 800mg/kgBB/hari yang dicampur dalam pakan standar dan diberi minum *ad libitum*, kelompok terakhir adalah kelompok kontrol yang diberi pakan dan minuman *ad libitum* tanpa pemberian tawas.
- e) Setelah 30 hari masing-masing tikus ditimbang berat badanya.

- f) Tikus wistar dimatikan (dekapitasi) dengan cara dislokasi leher
- g) Mengambil organ ginjal. Sampel ginjal tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan bagian bufer formalin 10%
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel ginjal Tikus wistar ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode buku histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin(lampiran2). Dari setiap sampel ginjal dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 400x. Pembacaan preparat dari 10 lapangan pandang untuk sepasang ginjal dicari rerata skor untuk penilaian satu tikus. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histologi pada ginjal yaitu degenerasi dan nekrosis .

4.7 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

4.8 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh akan diolah dengan program komputer SPSS 21.0 dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik One Way Anova, Jika $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi 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 statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji Post Hoc (Mann Whitney test).

- a. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis ginjal tikus wistar pada pemberian Tawas dosis bertingkat selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis ginjal tikus wistar pada pemberian tawas dosis bertingkat selama 30 hari.

4.9 Etika Penelitian

Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian dilakukan. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (FMIPA UNNES). Hewan diberi makan dan minuman *ad libitum*. Untuk perlakuan, Tawas dosis bertingkat dicampur dengan tawas dengan konsentrasi 4%, 8%, dan 12%. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher (dekapitasi). Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan (lampiran 2) seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.