

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini berkaitan dengan Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, dan Toksikologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di *Animal Care* Universitas Negeri Semarang. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang. Penelitian ini dilakukan pada awal sampai pertengahan tahun 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan hewan percobaan dengan rancangan *post test only control group*. Penelitian ini menggunakan 3 (tiga) kelompok, yaitu kelompok tidak diberi merkuri klorida, kelompok perlakuan diberi merkuri klorida dengan dosis 10 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan diberi merkuri klorida dengan dosis 20 mg/kgBB. Penelitian dilakukan saat *post test* dengan membandingkan hasil observasi antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target adalah tikus *Wistar*.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus *Wistar* yang diperoleh dari *Animal Care* Universitas Negeri Semarang.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Wistar* jantan
- b. Usia 2-3 bulan
- c. Berat badan 150-250 gram
- d. Dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan anatomi

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tidak bisa makan dan minum secara alamiah
- b. Tikus yang mengalami sakit atau mati

3.4.4 Cara Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling*. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus *Wistar* yang sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan pada penelitian adalah 9 ekor untuk masing-masing kelompok perlakuan, jumlah ini ditentukan berdasarkan perhitungan rumus Federer, yaitu dengan rumus dan perhitungan: ³²

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

n = besar sampel

t = besar kelompok sampel

$$(n-1) \times (3-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5 \rightarrow n = 9$$

Ada tiga kelompok percobaan dalam penelitian ini, sehingga jumlah tikus *Wistar* yang menjadi sampel dalam penelitian ini ada 27 ekor, dengan 9 ekor tikus *Wistar* pada masing-masing kelompok.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian merkuri klorida per oral dengan berbagai dosis.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi ginjal tikus *Wistar*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 4 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Skala
1.	Merkuri klorida per oral berbagai dosis	Pemberian garam merkuri HgCl ₂ dengan dosis 0, 10, dan 20 mg/kgBB. Penentuan dosis perlakuan berdasarkan dosis LD-50, yaitu 40 mg/kgBB, lalu diambil dosis seperempat dosis letal dan setengah dosis letal, yaitu 10 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB. HgCl ₂ dilarutkan dalam air minum yang disondekan. Setiap pagi pada jam yang sama selama 14 hari, masing-masing tikus diberi 2 ml air sesuai kelompoknya menggunakan sonde secara hati-hati.	Pada kelompok dengan dosis 10 mg/kgBB untuk 14 hari, maka dosis untuk seekor tikus setiap hari adalah 0,7 mg/kgBB. Dengan berat badan tikus 200 gram, maka jumlah HgCl ₂ yang diterima seekor tikus setiap hari adalah 0,14 mg. Jumlah HgCl ₂ untuk seluruh tikus selama penelitian adalah 0,14 mg x 9 ekor x 14 hari = 17,64 mg. Dengan perhitungan yang sama, untuk kelompok dosis 20 mg/kgBB, maka dosis untuk seekor tikus setiap hari adalah 1,4 mg/kgBB dan jumlah HgCl ₂ yang diterima seekor tikus setiap hari adalah 0,28 mg. Jumlah HgCl ₂ untuk seluruh tikus selama penelitian adalah 35,28 mg. Total HgCl ₂ yang dibutuhkan adalah 17,64 + 35,28 = 52,92 ≈ 53 mg.	Nominal

			Jumlah aquades yang dibutuhkan sebagai pelarut HgCl ₂ kedua kelompok perlakuan adalah 2 x 2 ml x 9 ekor x 14 hari = 504 ml.	
2.	Gambaran Histopatologi Ginjal	Preparat jaringan ginjal dibuat menggunakan pengecatan Hematoksilin dan Eosin (HE). Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali pada bagian tubulus proksimal. Setiap preparat diamati pada 5 lapangan pandang berbeda yang dianggap mewakili gambaran keseluruhan. Pengamatan dilakukan sebanyak 2 kali dan diambil derajat kerusakan tertinggi pada masing-masing preparat.	Penilaian derajat kerusakan histopatologi ginjal tikus <i>Wistar</i> berdasar: - 0 : normal - 1 (ringan) : dilatasi tubulus - 2 (sedang) : degenerasi albuminosa - 3 (berat) : nekrosis sel tubulus	Ordinal

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat dan Bahan

1. Perlakuan
 - a. Tikus *Wistar* jantan sebanyak 27 ekor
 - b. Kandang tikus *Wistar*
 - c. Tempat makan dan minum tikus
 - d. Makanan standar untuk tikus
 - e. Alat sonde
 - f. Air minum standar untuk kelompok kontrol

- g. Larutan merkuri klorida untuk kelompok perlakuan.
- 2. Perlakuan euthanasi
 - a. Pisau skalpel
 - b. Pinset bedah (chirurgis)
 - c. Gunting operasi lurus tajam / tumpul
 - d. Botol plastik bertutup dan berlabel berisi buffer formalin 10% dengan volume 10 kali dari sampel organ yang dimasukkan.
- 3. Pembuatan slide sediaan histopatologi dan interpretasinya
 - a. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan, yaitu larutan Bouin, larutan buffer formalin 10%, parafin, albumin, hematoksilin eosin, larutan xylol, alkohol 30%, alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, dan aquades.
 - b. Mikroskop cahaya dengan perbesaran hingga 400 kali
 - c. Kamera digital untuk dokumentasi

3.7.2 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari ginjal tikus *Wistar*, dimana dilakukan pengamatan gambaran histopatologi dan dinilai berdasarkan kerusakan sel tubulus proksimal ginjal pada setiap daerah preparat, kemudian digolongkan menurut derajat kerusakan. Hasilnya dibandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

3.7.3 Cara Kerja

Sejumlah 27 ekor tikus *Wistar* jantan dipelihara di dalam ruang laboratorium tempat pemeliharaan hewan coba. Sebelum digunakan untuk penelitian, semua tikus diadaptasikan dahulu selama 7 hari. Tikus dikandangkan sesuai kelompoknya dalam ruangan tertutup dengan ventilasi yang cukup dan pencahayaan memadai. Semua hewan coba diberi makanan dan minuman standar secara *ad libitum*.

Pada hari ke-8, 27 ekor tikus *Wistar* dibagi menjadi 3 kelompok; dimana masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang ditentukan secara acak, yaitu kelompok kontrol atau K (diberi aquades murni yang tidak mengandung merkuri klorida), kelompok perlakuan 1 atau P1 (diberi larutan merkuri klorida dengan dosis 10 mg/kgBB), dan kelompok perlakuan 2 atau P2 (diberi larutan merkuri klorida dosis 20 mg/kgBB).

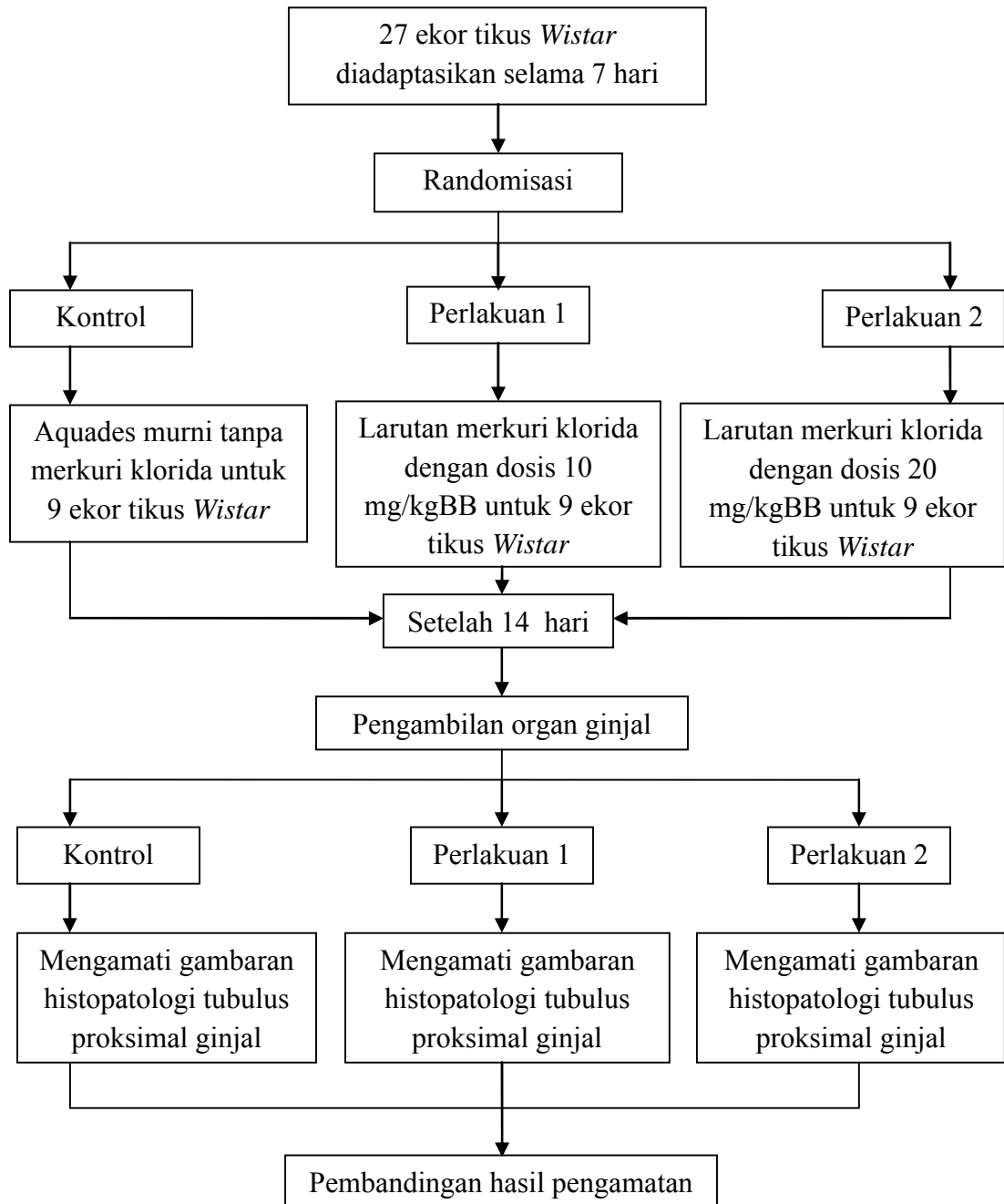
Pada kelompok K, sebanyak 2 ml aquades murni disonde ke masing-masing tikus. Stok larutan merkuri klorida selama penelitian dibuat dengan dicampurnya 53 mg merkuri klorida dalam 504 ml aquades sampai homogen. Stok itu disimpan dalam botol plastik yang ditutup rapat dan diletakkan dalam lemari tertutup. Pada kelompok P1 dan kelompok P2, diambil beberapa ml dari stok larutan merkuri klorida berdasarkan kelompok dosis dan berat badan masing-masing tikus (seperti pada lampiran), lalu ditambahkan aquades sampai volumenya 2 ml dan diberikan pada tikus melalui sonde. Air minum diberikan menggunakan sonde secara hati-hati oleh tenaga ahli setiap pagi pada jam yang

sama selama 14 hari. Pada hari berikutnya untuk kelompok P1 dan kelompok P2, stok larutan merkuri klorida diaduk kembali dahulu sampai homogen sebelum diambil lagi.

Pada hari ke-22, dilakukan euthanasi pada tikus sesuai protokol perlakuan hewan coba. Teknik euthanasi yang digunakan adalah teknik anestesi overdosis dengan menggunakan ether (AVMA, 2000; Inglis 1980). Awalnya, 10-20 ml ether dituang ke dalam kapas yang telah diletakkan dalam toples. Tikus yang akan dikorbankan selanjutnya dimasukkan ke dalam toples, kemudian ditutup rapat. Dilakukan pengamatan terhadap nafas dan denyut jantung. Apabila tikus sudah tidak bernafas, tutup toples dibuka, hewan diletakkan di tempat nekropsi. Sebelum dilakukan pembedahan, dilakukan pengamatan kembali denyut jantung dan nafas untuk memastikan hewan telah benar-benar mati. Dilakukan pengambilan organ ginjal tikus.

Organ ginjal itu dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian buffer formalin 10%. Tabung berisi sampel ginjal tikus *Wistar* itu kemudian diserahkan ke bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin dan dilakukan pembacaan oleh dokter spesialis patologi anatomi. Pembacaan dilakukan pada 5 lapangan pandang yang dianggap mewakili gambaran keseluruhan dengan perbesaran 400 kali dan dinilai derajat kerusakannya berdasarkan jenis kelainan histopatologi yang ditemukan pada tubulus proksimal ginjal. Data pengamatan ditulis dalam formulir dan dianalisis.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan akan diuji normalitas untuk mengetahui apakah persebaran datanya normal menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Apabila didapatkan distribusi datanya normal dengan variasi data homogen, maka dilanjutkan analisis data untuk menguji perbedaannya dengan menggunakan uji parametrik *One Way Anova*, jika nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *post hoc*. Namun, apabila didapatkan distribusi datanya tidak normal, maka dilanjutkan analisis data menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, jika nilai $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.³⁶

3.10 Etika Penelitian

Etika penelitian telah diperoleh dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor: 400/EC/FK-RSDK/2016.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 5 Jadwal penelitian

Program	Bulan																			
	2				3				4				5				6			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Persiapan																				
a. Proposal penelitian																				
b. Ethical clearance																				
c. Persiapan																				

