

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang lingkup penelitian**

Ruang lingkup keilmuan dari penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, Ilmu Farmakologi.

#### **3.2 Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Negeri Semarang (UNNES) sebagai tempat pemeliharaan dan tempat perlakuan penelitian terhadap hewan coba, Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soeratto Gemolong sebagai tempat pembuatan preparat dan pemeriksaan mikroskopis. Penelitian dilakukan setelah mendapatkan *ethical clearance* dimulai dari bulan April 2016.

#### **3.3 Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain yang dipakai adalah *post test only with control group design*. Menggunakan 7 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol negatif. Penelitian hanya dilakukan pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi antara kelompok kontrol dengan kelompok eksperimental. Output yang dinilai adalah gambaran histopatologi paru tikus wistar tersebut.

### **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 jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang (UNNES).

#### **3.4.3 Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan adalah tikus wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut :

##### **3.4.3.1 Kriteria inklusi**

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Usia 2-3 bulan
- 3) Berat badan 150-250 gram
- 4) Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

##### **3.4.3.2 Kriteria eksklusi**

- 1) Tikus wistar mati selama proses aklimatisasi
- 2) Tikus dalam keadaan sakit
- 3) Tikus memiliki kelainan anatomi

#### **3.4.4 Cara sampling**

Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan dengan *allocation random sampling*. Randomisasi

langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus wistar yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen.

#### **3.4.5 Besar sampel**

Penentuan besar sampel penelitian menggunakan ketentuan *World Health Organization* (WHO) dengan jumlah minimal sampel 5 ekor tikus wistar pada masing-masing kelompok. Sehingga pada penelitian ini akan digunakan 35 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, 3 kelompok kontrol positif, serta 1 kelompok kontrol negatif yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus wistar.

### **3.5 Variabel penelitian**

#### **3.5.1 Variabel bebas**

Variabel bebas adalah ranitidin dan metanol dosis bertingkat.

#### **3.5.2 Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi paru tikus wistar.

### 3.6 Definisi operasional variabel

**Tabel 2.** Definisi operasional variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
<b>A. Variabel bebas</b>				
1.	Metanol dosis $\frac{1}{4}$ , $\frac{1}{2}$ , 1 LD-100.	Dosis yang akan digunakan adalah dosis letal dari metanol yaitu $\frac{1}{4}$ LD-100 yaitu 3,5 g/kgBB, $\frac{1}{2}$ LD-100 yaitu 7 g/kgBB dan LD-100 yaitu 14 g/kgBB single dose per oral yang diukur dengan timbangan	Gram (g)	Rasio
2.	Ranitidin dosis 30 mg/kgBB.	Dosis ranitidin yang akan diberikan adalah 30 mg/kg intraperitoneal single dose 1 jam setelah pemberian metanol. Pengukuran dosis diukur dengan menggunakan pipet ukur.	Ya dan Tidak	Nominal
<b>B. Variabel terikat</b>				
3.	Gambaran histopatologi paru tikus wistar berupa oedema, destruksi septum, infiltrasi radang.	Gambaran histopatologi paru tikus wistar dibawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE). Pengamatan dilakukan terhadap sel limfosit untuk menentukan derajat infiltrasi sel radang, edema paru dan destruksi dinding alveoli menggunakan kriteria <i>Hansel dan Barnes</i>	- Normal (0%) - Ringan (>0% - <30%) - Sedang (>30%-<60%) - Berat (> 60%)	Interval

dalam 5 lapangan pandang  
dengan perbesaran 400x

---

### **3.7 Cara pengumpulan data**

#### **3.7.1 Bahan**

- 1) Tikus wistar usia 2-3 bulan berat badan 150-250 gram
- 2) Metanol 1/4 LD-100 yaitu 3,5 g/kgBB, 1/2 LD-100 yaitu 7 g/kgBB dan LD-100 yaitu 14 g/kgBB.
- 3) Makanan dan minuman tikus wistar
- 4) Ranitidin
- 5) Nitrous oksida
- 6) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan yaitu:
  - a. Larutan Bouin
  - b. Larutan buffer formalin 10%
  - c. Paraffin
  - d. Albumin
  - e. Hematoksilin Eosin
  - f. Larutan Xylol
  - g. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%
  - h. Aquades

#### **3.7.2 Alat**

- 1) Alat untuk perlakuan
  - a. Kandang tikus wistar beserta botol minum dan tempat makan
  - b. Sonde lambung

- 2) Alat untuk mengambil organ (minor set)
  - a. Pisau skapel
  - b. Pinset bedah (chirurgis)
  - c. Gunting operasi lurus tajam / tumpul
- 3) Alat untuk pemeriksaan histopatologi
  - a. Mikroskop
  - b. *Objeck glass*
  - c. Botol kaca untuk menyimpan organ
  - d. Kamera digital

### **3.7.3 Jenis data**

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

### **3.7.4 Cara kerja**

Penelitian ini menggunakan 35 ekor tikus wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat 150-250 gram yang telah diaklimatisasi dengan dikandangkan berkelompok dan diberi makan dan minum standar yang sama secara *ad libitum* selama 7 hari. Kemudian hari ke-8 secara acak, dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang diberi tanda pada daerah yang berbeda yaitu kepala, punggung, perut dan tanpa tanda. Selanjutnya masing-masing tikus ditimbang, dilakukan pengukuran suhu dan pemeriksaan fisik dada meliputi inspeksi dan auskultasi.

Ke-7 kelompok tersebut adalah :

Kontrol negatif (K0) : tidak diberi metanol (tanpa tanda)

Kontrol positif : (tanda warna biru)

- K1 : diberi metanol 3,5 g/kgBB (tanda di kepala)
- K2 : diberi metanol 7 g/kgBB (tanda di punggung)
- K3 : diberi metanol 14 g/kgBB (tanda di perut)

Perlakuan : (tanda warna kuning)

- P1 : diberi metanol 3,5 g/kgBB + ranitidin 30 mg/kgBB  
(tanda di kepala)
- P2 : diberi metanol 7 g/kgBB + ranitidin 30 mg/kgBB  
(tanda di punggung)
- P3 : diberi metanol 14 g/kgBB + ranitidin 30 mg/kgBB  
(tanda di perut)

Sebelum pemberian metanol, tikus diberi nitrous oksida terlebih dahulu selama 16 jam dengan *flow rate* 2L/min. Kelompok kontrol negatif tidak dikenakan perlakuan apapun kemudian dilakukan dekapitasi. Kelompok kontrol positif diberi metanol dengan dosis bertingkat. Kelompok perlakuan diberi larutan metanol dosis bertingkat dan ranitidin. Pemberian metanol diberikan dengan sonde sampai habis. Setelah pemberian metanol sesuai waktu yang telah ditentukan, jika tidak terjadi drop out pada tikus, tikus kemudian didekapitasi yang sebelumnya dilakukan anestesi dengan eter terlebih dahulu.

Setelah tikus didekapitasi, selanjutnya dilakukan bedah minor untuk mengambil organ paru. Organ paru tikus wistar tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10% untuk diolah mengikuti

metode baku histologi dengan pewarnaan Hemaktosilin Eosin (HE). Masing-masing preparat dibaca gambaran histopatologi di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Data pemeriksaan ditulis dalam formulir untuk kemudian dianalisa. Untuk menghindari bias, analisa hasil akan dilakukan dengan menggunakan teknik *double blind*, dimana kedua pemeriksa tidak tahu tiap-tiap anggota kelompok perlakuan maupun kontrol sehingga diharapkan akan diperoleh hasil pemeriksaan yang objektif.

Derajat kerusakan paru ditentukan dengan adanya edema alveolus, destruksi dinding alveoli, dan infiltrasi sel radang.

1) Edema alveolus

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi struktur perubahan histologis

1 = edema pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = edema pada sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapangan pandang.

3 = edema pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

2) Destruksi septum alveolar

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi perubahan struktur histologis

1 = destruksi septum alveolar pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang.

2 = destruksi septum alveolar pada sepertiga hingga dua pertiga dari



seluruh lapangan pandang.

3 = destruksi septum alveolar pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang.

### 3) Infiltrasi sel radang

Dengan skoring:

0 = tidak terjadi perubahan struktur histologis

1 = infiltrasi sel radang pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang.

2 = infiltrasi sel radang pada sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapangan pandang.

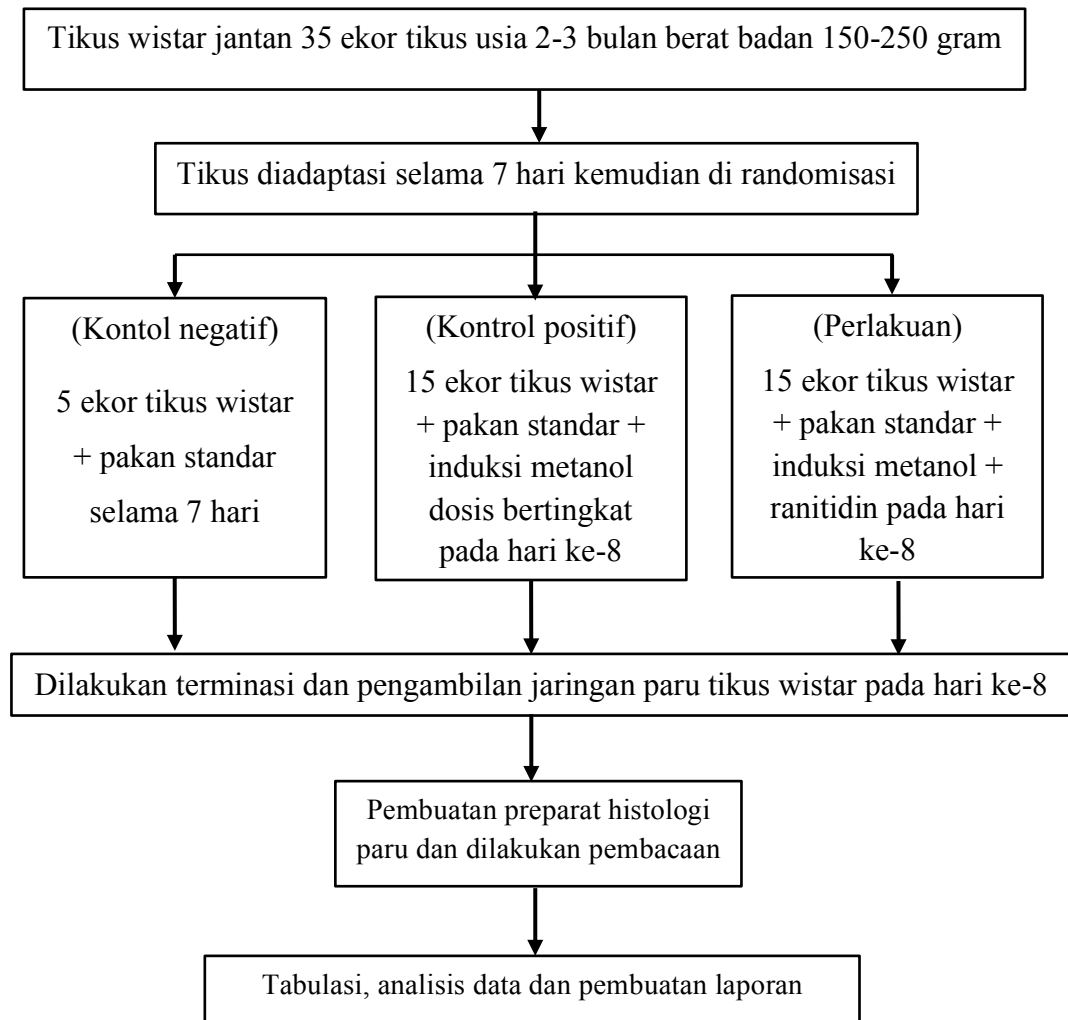
3 = infiltrasi sel radang pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang.

Kriteria penilaian derajat kerusakan alveolus

**Tabel 3.** Kriteria penilaian derajat kerusakan alveolus paru menurut Hansel dan Barnes.<sup>41</sup>

<b>Kriteria</b>	<b>Keterangan</b>	<b>Nilai Variasi</b>
Normal	Tidak terdapat perubahan histologis	0
Kerusakan Ringan	Kerusakan alveolus paru >0% - < 30% dari seluruh lapangan	1
Kerusakan Sedang	Kerusakan alveolus paru > 30% - < 60% dari seluruh lapangan pandang	2
Kerusakan Berat	Kerusakan alveolus paru > 60% dari seluruh lapangan pandang	3

### 3.8 Alur penelitian



**Gambar 8.** Bagan alur penelitian

### 3.9 Analisis data

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan program komputer *SPSS for Windows*. Uji normalitas dengan *Saphiro-Wilk*. Apabila didapatkan distribusi data normal maka dilanjutkan analisis data dengan uji *Independent Samples T-Test*. Apabila didapatkan distribusi data tidak normal dilakukan uji *Mann Whitney*.

