

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1. Lingkup Tempat

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Animal Care Universitas Negeri Semarang (UNNES). Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi, Semarang.

3.1.2. Lingkup Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada awal sampai pertengahan tahun 2016.

3.1.3. Lingkup Ilmu

Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, Toksikologi

3.2. Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini, penelitian akan dilakukan memakai jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only with control group design*. Menggunakan 3 (tiga) kelompok, yaitu kelompok perlakuan dosis 20 mg/kg BB, kelompok perlakuan 10 mg/kg BB dan kelompok kontrol. Penelitian hanya dilakukan pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi antara kelompok control, kelompok eksperimental dosis 20 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah merkuri inorganik yaitu mercuric chloride.

3.3.2. Variabel Tergantung

Variable tergantung dalam penelitian ini adalah kerusakan hepar yang dilihat melalui gambaran histopatologis dengan menggunakan mikroskop cahaya

3.4. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Skala
1.	Mercuric chloride	Pada penelitian ini, mercuric chloride atau $HgCl_2$ akan diberikan melalui air minum dengan dosis 20 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB. Dosis ditentukan berdasarkan dosis lethal merkuri yaitu 40 mg/kg BB kemudian diambil dosis sebesar setengah dan	Karena pemberian air mengandung merkuri tiap tikus disamakan yaitu 3 ml. Supaya didapatkan dosis merkuri yang diinginkan maka pembuatan air minum bercampur merkuri dihitung dengan rumus: Pada kelompok 20 mg/kg BB, dengan BB tikus 250 gr maka	Rasio

		<p>seperempat dari dosis tersebut maka didapatkan dosis 20 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB.</p> <p>Masing-masing diberikan memakai sonde sebanyak 2 ml secara hati-hati sehingga tidak menimbulkan stress pada tikus setiap hari pada pagi hari dan jam yang sama selama 14 hari.</p>	<p>dosis yang diharapkan dikonsumsi tikus adalah 5 mg</p> <p>Merkuri yang dilarutkan pada 1 liter air kelompok dosis 20 mg/kg BB atau X:</p> $X / 1000 \text{ ml} \times 2 \text{ ml} = 5 \text{ mg} / 14 \text{ hari}$ $X / 1000 \times 2 = 5 / 14$ $X = (5 \times 1000) / (14 \times 2)$ $X = 119,05 \text{ mg} \rightarrow 119 \text{ mg}$ <p>Dengan rumus yang sama maka untuk kelompok dosis 10 mg/kg BB diperlukan merkuri sebanyak $119 / 2$ yaitu 59,5 mg untuk dilarutkan dalam 1 liter air</p>	
2.	Gambaran Histo-patologis Hepar	Gambaran mikroskopis hepar tikus Wistar pada penelitian ini, diperoleh dengan cara membuat	Penilaian terhadap gambaran mikroskopis organ hepar tikus Wistar ini dilakukan berdasarkan tingkat kerusakan sel hepatosit	Ordinal

		<p>preparat hepar dengan menggunakan pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE). Preparat tersebut di amati di sekitar vena sentralis, dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada 5 lapangan pandang yang masing - masing terdiri dari 25 sel yang dianggap mewakili gambaran keseluruhan.</p>	<p>dan perubahan struktur histopatologi sel hepar, dengan acuan scoring menurut Manja Roenigk, sebagai berikut :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Normal : tampak sel berbentuk polygonal, sitoplasma berwarna merah homogen, dinding sel berbatas tegas. 2) Degenerasi parenkimatosa (Sedang): pembengkakan sel, sitoplasma keruh dan adanya granula. 3) Degenerasi hidropik (Sedang): terdapat akumulasi cairan dan terdapat banyak vakuola. 4) Nekrosis (Berat): kematian sel, terdapat 3 bentuk yaitu : 	
--	--	--	--	--

			<p>a) Piknotik : tampak inti sel kecil berwarna gelap dan sitoplasma sel kemerahan.</p> <p>b) Karioreksis : sel mengecil, bentuk ireguler, fragmentasi inti sel.</p> <p>c) Kariolisis : inti sel hilang</p>	
--	--	--	---	--

Tabel 5. Definisi operasional variable

3.5. Populasi dan Sampel

3.5.1. Populasi Penelitian

a. Populasi Target

Populasi yang diteliti adalah tikus Wistar.

b. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus Wistar yang diperoleh dari

Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang.

3.5.2. Sampel Penelitian

3.5.2.1. 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

3.5.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang mengalami gangguan pencernaan dan penyerapan.
- b. Tikus yang mengalami mati.

3.5.2.3. Besar Sampel

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan ketentuan rumus

Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$

t = jumlah kelompok

n = besar sampel

Pada penelitian jumlah kelompok (t)= 3 sehingga didapatkan

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

$$2n - 2 \geq 15$$

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

sehingga pada penelitian ini akan digunakan 27 ekor tikus Wistar yang dibagi dalam 3 kelompok yaitu 9 tikus dalam kelompok perlakuan 20 mg/kg BB, 9 tikus dalam kelompok 10 mg/kg BB dan 9 tikus dalam kelompok control.

3.5.2.4. Cara Pengambilan Sampel

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 sehingga dianggap cukup homogen.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat untuk perlakuan

- a. Tikus Wistar sebanyak 27 ekor
- b. Kandang tikus Wistar
- c. Tempat makan dan minum tikus
- d. Makanan standard untuk tikus
- e. Air minum standard untuk kelompok kontrol

- f. Air minum yang mengandung mercuric chloride 20 mg/kg BB
- g. Air minum yang mengandung mercuric chloride 10 mg/kg BB
- h. Sonde untuk meminumkan air perlakuan

3.6.2. Alat untuk pengambilan organ (hati)

- a. Pisau skapel
- b. Pinset bedah (chirurgis)
- c. Gunting operasi lurus tajam / tumpul
- d. Toples kaca berisi kapas yang telah dituang 10-20 ml ether untuk anasthesi
- e. Botol plastic bertutup, berlabel, berisi buffer formalin 10% dengan volume 10x dari volume sampel organ yang dimasukkan

3.6.3. Alat untuk pembuatan slide sediaan histopatologi dan interpretasinya

- a. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan yaitu larutan Bouin, larutan buffer formalin 10%, parafin, albumin, hematoxilin eosin, larutan xylol, alkohol 30%, alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, dan aquades.
- b. Mikroskop cahaya hingga pembesaran 400x
- c. Kamera digital untuk dokumentasi

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Jenis data

Data yang didapat dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian berupa tingkat kerusakan hepar tikus Wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok control.

3.7.2 Langkah kerja penelitian

Sejumlah 27 ekor tikus Wistar jantan akan dilakukan adaptasi selama 7 hari di laboratorium dengan kandang tunggal tertutup, pencahayaan dan ventilasi cukup. Suhu ruangan 27-32⁰C, penerangan diatur sesuai siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Semua hewan diberi pakan standar AD II serta minuman air RO yang sama (*ad libitum*). Setiap hari dilakukan pembersihan kandang dan monitoring kesehatan hewan coba.

Pada hari ke-8, tikus Wistar dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 9 ekor tikus yang diberi tanda pada kepala sebagai tanda kelompok perlakuan 20 mg/kg BB, 9 ekor tikus diberi tanda di punggung sebagai kelompok perlakuan 10 mg/kg BB dan 9 ekor tikus sebagai kelompok kontrol. Selanjutnya masing-masing tikus ditimbang, dilakukan pengukuran suhu dan pemeriksaan fisik dada meliputi inspeksi dan auskultasi.

Kelompok control diberi minuman air minum standard sebanyak 3 ml memakai sonde setiap hari pada pagi hari pada jam yang sama kemudian diberi makanan dan minuman standard selama 14 hari kemudian dilakukan terminasi memakai ether pada hari ke 21 bersamaan dengan hewan pada kelompok

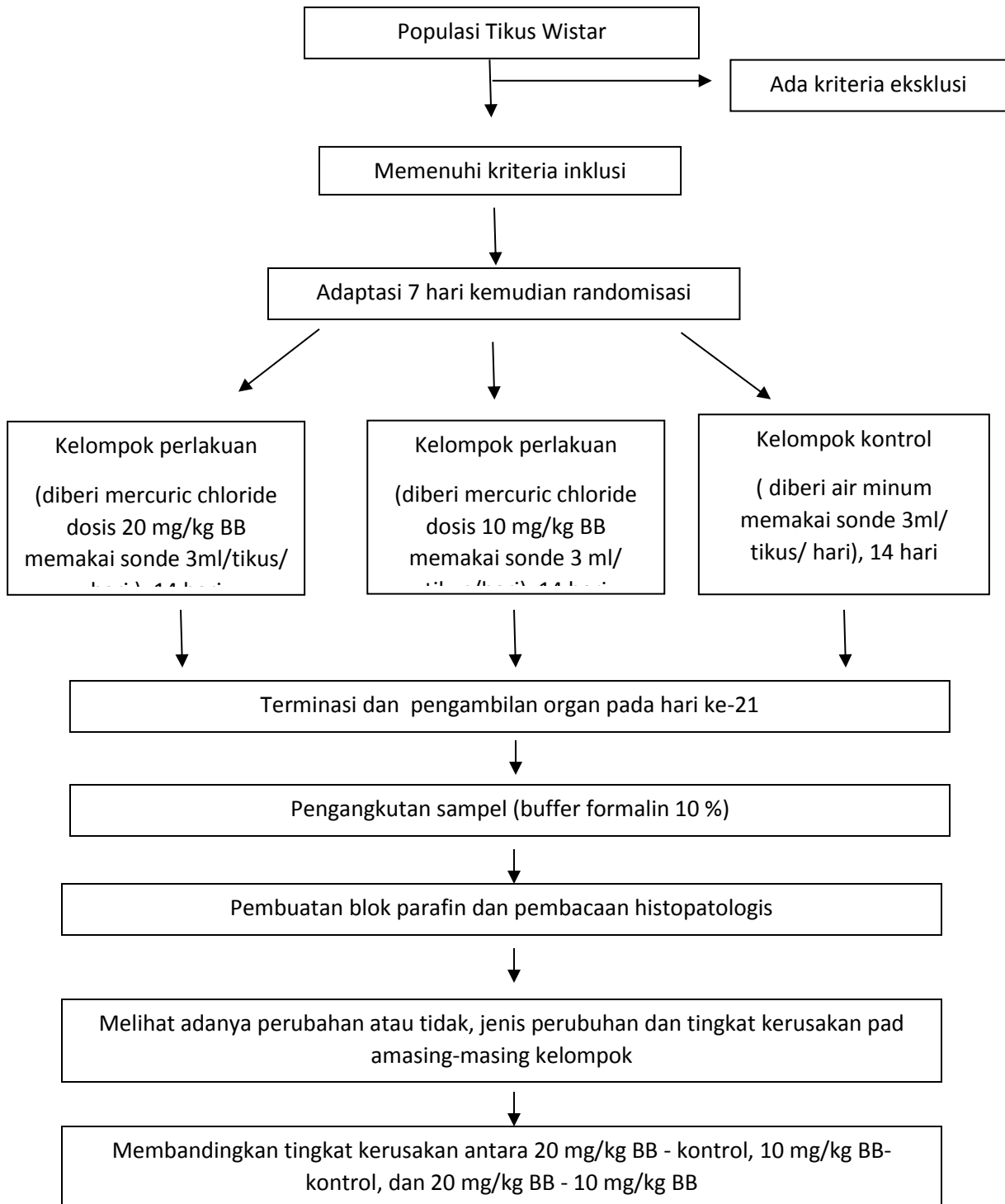
percobaan. Kelompok perlakuan 20 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB diberi mercuric chloride (HgCl_2) selama 14 hari . Pemberian mercuric chloride pada kelompok 20 mg/kg BB diberikan dengan cara mencampurkan garam merkuri klorida (HgCl_2) sebanyak 119 mg pada 1 liter air minum lalu diaduk hingga rata sehingga didapatkan air minum dengan konsentrasi merkuri sebesar 119,05 ppm. Kemudian air dengan konsentrasi 119 ppm tersebut akan diambil sebanyak 3 ml dan diberikan ke tikus coba memakai sonde secara hati-hati agar tidak menimbulkan stress . Langkah selanjutnya adalah membuat air minum lagi dengan konsentrasi 59,5 ppm untuk kelompok perlakuan 10 mg/ kg BB dengan langkah seperti pembuatan air minum dengan kelompok 20 mg/kg BB hanya saja kali ini garam merkuri yang dilarutkan sebanyak 59,5 mg dan diberikan kepada tikus dengan memakai sonde sebanyak 3ml seperti pada kelompok 20 mg/kg BB. Selama perlakuan, pemberian air melalui sonde akan dilakukan tenaga berpengalaman agar tidak menimbulkan stress berlebih. Bila pada hari itu air merkuri tidak habis untuk diberikan pada hewan perlakuan maka setiap hari sebelum pengambilan air merkuri pada tempat air besar yang berisi air merkuri tadi maka akan dilakukan pengadukan pada air minum agar garam merkuri tidak mengendap dan campuran tetap homogen. Setelah pemberian mercuric chloride sesuai waktu yang telah ditentukan yaitu 14 hari jika tidak terjadi drop out pada tikus, tikus kemudian dimasukkan ke dalam toples bening berisi kapas yang telah dituang ether 10-20 ml dan ditutup rapat. Dilakukan pengamatan nafas dan denyut jantung dan bila sudah tidak bernafas

maka toples dibuka dan tikus diambil lalu dilakukan pemeriksaan nafas dan denyut jantung kembali untuk memastikan baru kemudian dilakukan dekapitasi.

Selanjutnya dilakukan autopsi untuk pengambilan organ hepar. Organ hepar tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10% , dilakukan dehidrasi kemudian dimasukkan ke blok paraffin. Blok Paraffin yang berisi hepar kemudian dipotong dengan menggunakan microtome dengan ketebalan 5-6 μm . Kemudian sampel hepar tikus Wistar diserahkan ke Bagian Patologi Anatomi untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hemaktosilin Eosin. Pembacaan kemudian dilakukan dengan perbesaran 1000x dan dihitung. Pembacaan ini diarahkan dokter spesialis patologi anatomi.

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.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

3.9 Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan diuji normalitas untuk mengetahui apakah persebaran datanya normal dengan *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel < 50 . Bila didapatkan distribusi datanya normal di mana didapatkan nilai p bermakna yaitu nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan analisis data untuk menguji perbedaannya dengan menggunakan uji parametrik *One Way Anova* atau memakai bila *Kruskal-Wallis* distribusinya tidak normal. Dilanjutkan dengan uji Independent t test untuk distribusi data normal atau Mann Whitney untuk distribusi data tidak normal untuk membandingkan antar kelompok.

3.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan protokol telah dimintakan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor: 397/EC/FK-RSDK/2016.

3.11 Jadwal Penelitian

Program	Bulan																			
	1				2				3				4				5			
	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 material			■	■																
d. Diskusi			■	■																
2. Operasional																				
a. Skrining data				■																
b. Pengumpulan sampel				■	■															
c. Konsultasi				■	■															
3. Eksperimen																				
a. Intervensi						■	■													
b. Feedback							■	■												
c. Konsultasi								■												
4. Seminar																				
a. Progres report									■	■										
b. Feedback											■									
5. Laporan akhir																				
a. Konsultasi											■									
b. Analisis data												■	■	■						
c. Presentasi														■						
d. Revisi															■	■	■	■		
e. Publikasi																				■