

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1 Lingkup Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang, Laboratorium Histologi Universitas Diponegoro, Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Diponegoro.

3.1.2 Lingkup Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Maret 2016.

3.1.3 Lingkup Ilmu

Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, Ilmu Farmakologi.

3.2 Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini, maka jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Menggunakan 7 (tujuh) kelompok, yaitu 3 (tiga) kelompok perlakuan, 3 (tiga) kelompok kontrol positif, dan 1 (satu) kelompok kontrol negatif. Penelitian hanya dilakukan pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi antara kelompok kontrol dengan kelompok eksperimental.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah dosis metanol dan ranitidin.

3.3.2 Variabel Tergantung

Variable tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat kerusakan sel neuron pada putamen otak.

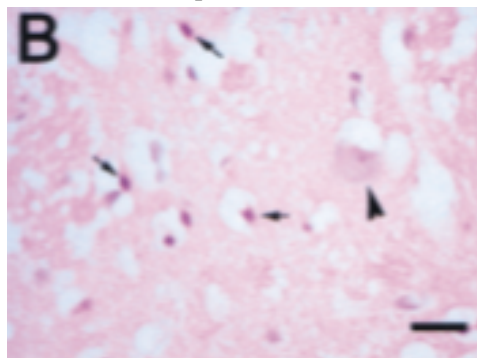
3.4 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Skala	Nilai
Variabel Bebas :				
1.	Metanol	Dosis yang akan digunakan adalah dosis <i>lethal</i> dari metanol yaitu 14g/kgBB, 1/2x dari dosis <i>lethal</i> metanol yaitu 7g/kgBB, dan 1/4x dosis <i>lethal</i> metanol yaitu 3,5g/kgBB single dose per oral yang diukur dengan menggunakan timbangan	Rasio	Ditetapkan berdasarkan dosis pada penelitian sebelumnya yaitu 14g/kgBB yang kemudian ditetapkan dosis bertingkatnya 1/2x dosis, dan 1/4x dosis
2.	Ranitidin	Dosis ranitidin yang akan diberikan adalah 30 mg/kg intraperitoneal single dose 4 jam setelah pemberian metanol. Pengukuran dosis diukur dengan menggunakan pipet ukur.	Rasio	Ditetapkan berdasarkan penelitian sebelumnya.

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Variabel Tergantung :

3..	Jumlah nekrosis neuron pada putamen	Pengukuran ini dilakukan dengan melihat preparat histopatologi di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Dihitung jumlah kerusakan sel neuron tikus wistar dalam 100 sel neuron kemudian dihitung dalam bentuk persentase dengan derajat kerusakan neuron yang kemudian dikelompokkan berdasarkan <i>grading</i> histopatologi kerusakan sel neuron putamen.	Numerik yang kemudian menjadi ordinal	Tergantung pengaruh variabel bebas yang kemudian dikelompokkan berdasarkan : Grade I : 0-25% Grade II : 26-50% Grade III : 51-75% Grade IV : 76-100%
-----	-------------------------------------	---	---------------------------------------	--



Gambar 3.1 Nekrosis neuron
Tanda-tanda dari terjadinya nekrosis pada sel neuron putamen adalah terjadi pembengkakan neuron, penyusutan neuron, dan eosinifilia pada striatum

Tabel 2. Definisi operasional variabel (lanjutan)

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 35 ekor 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 Wistar mati sewaktu adaptasi
- b. Tikus dalam keadaan sakit
- c. Tikus memiliki kelainan anatomi

3.5.2.3 Besar Sampel

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan ketentuan WHO yaitu minimal 5 (lima) ekor tikus pada masing-masing kelompok. Sehingga pada penelitian ini akan digunakan 35 ekor tikus Wistar yang dibagi dalam 3 (tiga) kelompok perlakuan, 3 (tiga) kelompok kontrol positif, serta 1 (satu) kelompok kontrol negatif yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus wistar.

3.5.2.4 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan dengan *allocation random sample*. 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. Kandang tikus Wistar
- b. Sonde (sprit dengan ujung tumpul terbuat dari timah diameter 2 mm)

3.6.2 Alat untuk bedah minor / otopsi

- a. Pisau skapel
- b. Pinset bedah (*chirurgis*)
- c. Gunting operasi lurus tajam / tumpul

3.6.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

- a. Mikroskop
- b. *Object glass*
- c. Botol kaca untuk menyimpan organ
- d. Kamera digital

3.6.4 Bahan

Bahan untuk percobaan ini :

- a. Tikus Wistar sebagai subjek penelitian
- b. Ranitidin

- c. Metanol sesuai dosis yang dibutuhkan: 3,5 g/kgBB, 7 g/kgBB, 14 g/kgBB
- d. Nitrous oksida sebagai penurun kadar folat
- e. Eter sebagai anestesi inhalan umum
- f. 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.

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Jenis data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian berupa tingkat kerusakan sel neuron pada putamen tikus *Wistar* dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol

3.7.2 Alur penelitian

Sejumlah 35 ekor tikus *Wistar* jantan akan dilakukan adaptasi selama 7 hari di laboratorium dengan kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minuman yang sama (*ad libitum*).

Pada hari ke-8, tikus *Wistar* 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)

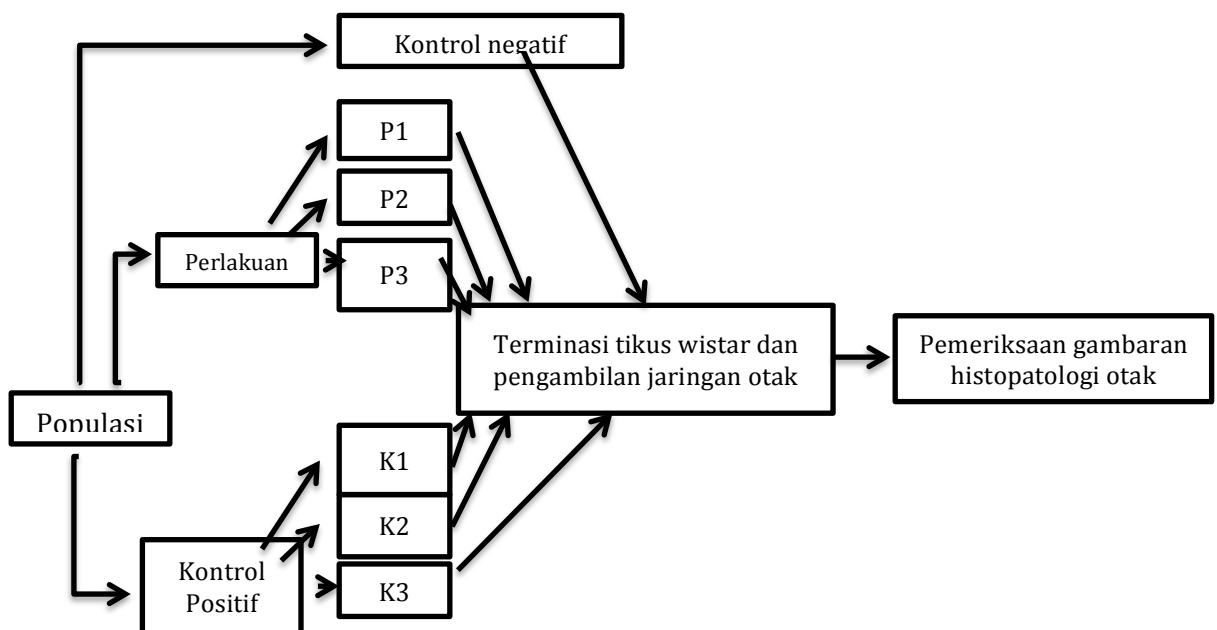
- P1 : diberi metanol 3,5 g/kgBB + ranitidin (tanda di kepala)
- P2 : diberi metanol 7 g/kgBB + ranitidin (tanda di punggung)
- P3 : diberi metanol 14 g/kgBB+ ranitidin (tanda di perut)

Kelompok kontrol negatif tidak dikenakan perlakuan apapun kemudian diberi anestesi dengan eter yang 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, tikus kemudian diberi anestesi dengan eter lalu dilakukan didekapitasi (dislokasi leher).

Setelah tikus didekapitasi, organ otak diambil, kemudian diukur dan ditimbang. Organ otak tersebut kemudian diamati secara makroskopik dan dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian otak dan 9 bagian unbuffered formalin 10%. Kemudian tabung berisi sampel otak tikus wistar tersebut diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hemaktosilin Eosin. Otak tikus wistar tersebut kemudian dilakukan histoplast parafin yang bertujuan untuk

mempermudah pemotongan. Untuk melihat bagian caudo-putamen tikus wistar, dilakukan pemotongan otak dengan potongan -0.82 anterior bregma yang dipotong secara axial setipis mungkin sesuai yang dapat dilakukan dengan menggunakan mikrotom. Pembacaan kemudian dilakukan dengan perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel yang nekrosis tiap lapangan pandang yang nantinya akan didapatkan persentase kerusakan sel dengan lapangan pandang besar yang kemudian dikonversikan dalam bentuk ordinal / *grading*. Pembacaan ini diarahkan dokter spesialis patologi anatomi yang dibantu oleh residen patologi anatomi.

Data pemeriksaan ditulis dalam formulir untuk kemudian dianalisa.



Gambar 9. Alur penelitian

3.8 Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 16.00 dan diuji normalitas untuk mengetahui apakah persebaran datanya normal dengan *Saphiro Wilk*. Karena didapatkan distribusi data yang tidak normal, maka dilanjutkan analisis data untuk menguji perbedaannya dengan menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*, yang kemudian dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Mann-Whitney*.

3.9 Etika Penelitian

Etika penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran UNDIP / RSUP dr. Karyadi Semarang dengan nomor 517/EC/FK-RSDK/2016.

3.10 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																			■	

Tabel 4. Jadwal penelitian.