

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian pada bidang Ilmu Kedokteran Forensik dan Patologi Anatomi .

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Forensik Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Dr. Kariadi Semarang dan dilakukan pembuatan slide patologi anatomi dilanjutkan pembacaan slide patologi anatomi di Laboratorium Patologi Anatomi Akurat pada bulan Juni 2017.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai obyek percobaan.

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 terdapat pada Laboratorium dan Rumah Sakit Hewan Dinas Peternakan Provinsi Jawa Timur.

3.4.3 Sampel Penelitian

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- 1) Tikus Wistar jantan
- 2) Usia 8 – 12 minggu
- 3) Berat 150 - 250 gram

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus tidak aktif bergerak
- 2) Tikus memiliki kelainan anatomi

3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan. Randomisasi dapat langsung dilakukan karena sampel sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel tikus Wistar ditentukan dengan ketentuan WHO yaitu minimal 5 sampel per kelompok. Dalam rangka mengantisipasi adanya *drop out* ditambah 10% dari tiap kelompok yaitu 0.5 dengan pembulatan menjadi 1. Total terdapat 4 kelompok sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 24 ekor tikus.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah luka bakar intravital, perimortem dan postmortem.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi usus halus tikus Wistar.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	Luka Bakar Pemberian luka termal menggunakan metal yang dipanaskan dengan api dari kompor hingga suhu 100°C diukur dengan termometer kemudian ditempelkan selama 10 detik pada dorsal dan ventral tikus seluas 30% luas permukaan tubuh tikus.		-
2.	Waktu Paparan Luka Bakar - Intravital : diberikan paparan segera setelah teranestesi dengan ether dosis 5ml; - Perimortem : diberikan paparan setelah 10 menit tikus diterminasi dengan anestesi dosis letal menggunakan ether 10ml dan dipastikan telah mati; dan - Postmortem : diberikan paparan setelah 3 jam tikus diterminasi dengan anestesi dosis letal menggunakan ether 10ml;		-

3. Gambaran Histopatogi Usus Halus Yang dilihat adalah infiltrasi leukosit, dan vasodilatasi vaskular yang akan dinilai terpisah

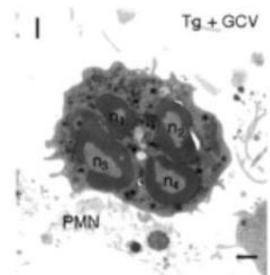
A. Infiltrasi leukosit

Inflamasi adalah reaksi lokal jaringan terhadap infeksi atau cedera yang melibatkan banyak mediator. Infiltrasi sel-sel inflamatorik terjadi ketika sel-sel inflamatorik seperti neutrofil, eosinofil, limfosit, sel monosit, makrofag dan sel mast menyusup di sekitar pembuluh darah (Infiltrasi perivaskular) dalam keadaan inflamasi akut maupun kronik

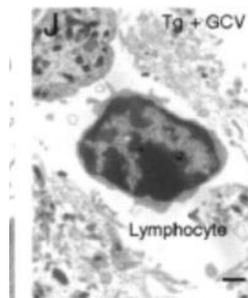
Sel radang dinilai dengan Ordinal kriteria sebagai berikut:

- 0 = 0-5 sel radang
- 1 = 6-10 sel radang
- 2 = 11-20 sel radang
- 3 = ≥ 21 sel radang

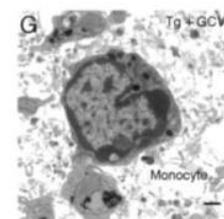
Jumlah sel dihitung pada 5 lapangan pandang besar (pembesaran 400x) kemudian dicari rata-rata.³³



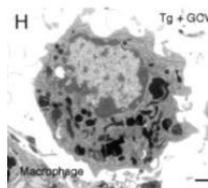
Gambar 9. Sel *Polymorphonuclear*³⁴



Gambar 10. Sel Limfosit³⁴



Gambar 11. Sel Monosit³⁴



Gambar 12. Sel Makrofag³⁴

<p>B. Vasodilatasi vaskular Pelebaran pembuluh darah akibat otot-otot polos pada dinding pembuluh darah mengalami relaksasi. Vasodilatasi adalah salah satu manifestasi pertama inflamasi akut. Vasodilatasi dipicu oleh aktivitas beberapa mediator, terutama histamin dan nitric oxide (NO) pada otot polos pembuluh darah.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Terdapat vasodilatasi 2. Tidak terdapat vasodilatasi 	Nominal
--	--	---------

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk percobaan ini:

1. 24 ekor tikus Wistar
2. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a. Larutan Bouin
 - b. Larutan buffer formalin 10%
 - c. Parafin
 - d. Albumin
 - e. Hematoksilin Eosin
 - f. Larutan xylol
 - g. Alkohol bertingkat: 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%

- h. Aquades
3. Obat untuk anestesi menggunakan larutan Eter
4. Pakan dan minum standar tikus
5. *Deckglass* dan *objectglass*
6. Ether

3.7.2 Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam percobaan ini:

1. Balok *stainless steel* ukuran 3 x 10 cm dan 5,5 x 2 cm
2. Kompor gas
3. Stoples
4. Sendok teh
5. Pencukur rambut merek WAHL 6115
6. Kapas/kassa
7. Termometer infrared WH380
8. Kandang tikus
9. Masker dan sarung tangan
10. Plastik, spidol, dan label kertas
11. Alat untuk mengambil organ (bedah minor): pisau skapel, pinset bedah, gunting, wadah
12. Alat untuk pembuatan preparat patologi anatomi
13. Alat untuk melihat gambaran histopatologi: mikroskop
14. Tabung

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian dengan melihat perbedaan gambaran histopatologi usus halus tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan.

3.7.4 Cara Kerja

1. 24 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok 6 ekor dengan keterangan kelompok sebagai berikut :
 - K = kelompok kontrol, yaitu tikus yang tidak diberi perlakuan apapun.
 - P1 = kelompok perlakuan 1, yaitu tikus yang diberi luka bakar intravital dan masing-masing tikus diberi tanda P1.1, P1.2, P1.3, P1.4, P1.5, P1.6 dengan spidol pada punggung tikus.
 - P2 = kelompok perlakuan 2, yaitu tikus yang diberi luka bakar perimortem dan masing-masing tikus diberi tanda P2.1, P2.2, P2.3, P2.4, P2.5, P2.6 dengan spidol pada ekor tikus.
 - P3 = kelompok perlakuan 3, yaitu tikus yang diberi luka bakar postmortem dan masing-masing tikus diberi tanda P3.1, P3.2, P3.3, P3.4, P3.5, P3.6 dengan spidol pada kepala tikus.
2. Masing-masing kelompok tikus dikandangkan dan diberi pakan standar serta minum secukupnya selama 1 minggu
3. Masing-masing tikus diukur berat badannya. Kemudian melalui *Meeh's formula* dihitung luas permukaan tubuh tikus dengan berat badan yang telah diketahui. Meeh's formula : $A = 10 \times W^{2/3}$ dimana A adalah luas

dalam cm^2 dan W adalah berat dalam gram. Setelah diketahui total luas permukaan tubuh masing-masing tikus, kemudian dihitung 30% luas permukaan tubuh masing-masing tikus.

4. Kelompok kontrol lalu diterminasi tanpa diberi perlakuan apapun. Terminasi menggunakan inhalasi ether dosis letal sesuai *American Veterinary Medical Association's (AVMA) guidelines on euthanasia 2007*. Terminasi dilakukan dengan cara meletakkan kapas di dalam stoples pada bagian dasar, lalu kapas dibasahi dengan 10 ml larutan ether. Stoples ditutup rapat. Kemudian dilakukan pemantauan terhadap nafas dan denyut jantung untuk memastikan tikus telah mati dengan meraba dada tikus.
5. Kelompok P1 terlebih dahulu dilakukan anestesi menggunakan metode inhalasi ether. Anestesi dilakukan dengan cara meletakkan kapas di dalam stoples pada bagian dasar, kemudian kapas dibasahi dengan 5 ml ether dan dibiarkan hingga 5 menit. Setelah itu tikus dikeluarkan dari stoples dan rambut tikus dicukur pada bagian dorsal dan ventral menggunakan pencukur rambut. Kemudian balok stainless steel dipanaskan dengan api dari kompor hingga suhu mencapai 100°C yang diukur dengan termometer infrared. Balok tersebut kemudian ditempelkan pada tubuh tikus baik pada dorsal maupun ventral dengan ukuran 30% luas permukaan tubuh tikus yang telah dihitung pada masing-masing tikus menggunakan *Meeh's formula*. Tikus dibiarkan 3 jam dengan tujuan memberikan waktu bagi tikus untuk merespons luka bakar tersebut. Apabila setelah 3 jam tikus tidak mati, tikus diterminasi

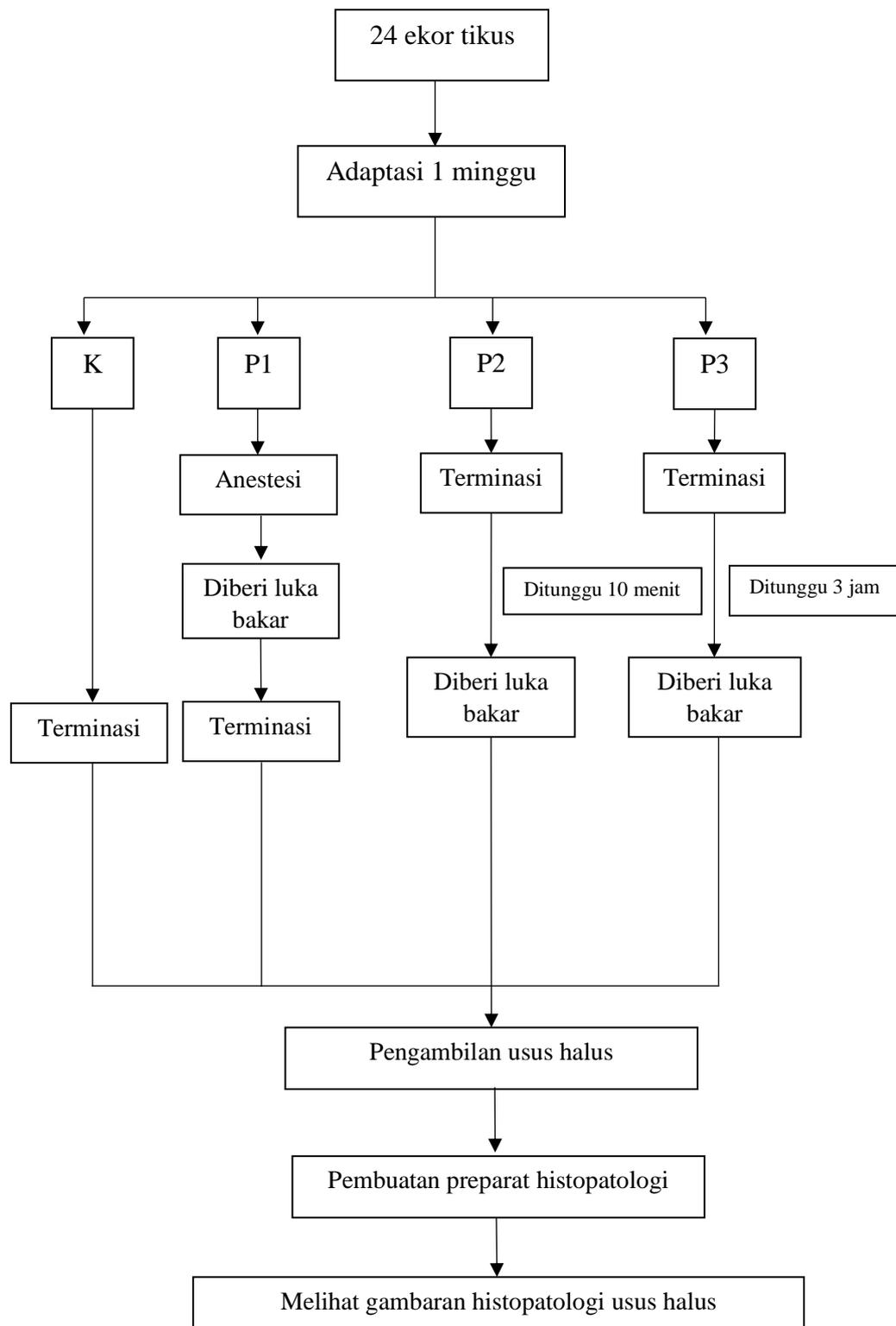
menggunakan metode inhalasi dosis letal ether seperti pada kelompok kontrol.

6. Kelompok P2 diterminasi menggunakan metode inhalasi dosis letal ether seperti pada kelompok kontrol. Tikus dipastikan telah mati kemudian rambut tikus dicukur pada bagian dorsal dan ventral menggunakan pencukur rambut. Setelah 10 menit sejak dipastikan kematian tikus, balok *stainless steel* yang telah dipanaskan dengan api dari kompor hingga mencapai 100°C yang diukur dengan termometer ditempelkan pada tubuh tikus baik pada dorsal maupun ventral dengan ukuran 30% luas permukaan tubuh tikus yang telah dihitung pada masing-masing tikus menggunakan *Meeh's formula*.
7. Kelompok P3 diterminasi menggunakan metode inhalasi dosis letal ether seperti pada kelompok kontrol. Tikus dipastikan telah mati kemudian rambut tikus dicukur pada bagian dorsal dan ventral menggunakan pencukur rambut. Setelah 3 jam sejak dipastikan kematian tikus, balok *stainless steel* yang telah dipanaskan dengan api dari kompor hingga mencapai 100°C yang diukur dengan termometer ditempelkan pada tubuh tikus baik pada dorsal maupun ventral dengan ukuran 30% luas permukaan tubuh tikus yang telah dihitung pada masing-masing tikus menggunakan *Meeh's formula*.
8. Setiap kelompok tikus dibaringkan telentang untuk kemudian dilakukan pembedahan. Usus halus diambil dan dibersihkan dari jaringan ikat maupun pembuluh darah yang tersisa. Lalu diletakkan pada wadah

dengan diberi larutan formalin 10% dan setiap wadah diberi label sesuai masing-masing kelompok perlakuan seperti pada nomor 1.

9. Usus halus diambil untuk dibuat sediaan mikroskopis. Selanjutnya diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan hematoksilin eosin.
10. Dari setiap tikus dibuat satu preparat usus halus, dan tiap preparat diamati pada lima lapangan pandang yaitu keempat sudut dan bagian tengah dengan pembesaran 400x
11. Sasaran yang dibaca adalah infiltrasi leukosit dan vasodilatasi vaskular.
12. Data pemeriksaan dicatat untuk kemudian dianalisis.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 13. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Gambaran histopatologis yakni infiltrasi leukosit dan vasodilatasi vaskular dianalisis secara terpisah. Data infiltrasi leukosit yang berskala ordinal dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Saphiro-Wilk*. Bila distribusi data normal, dilakukan uji beda dengan statistik parametrik *One Way Annova*, jika $P \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, dilakukan uji beda dengan statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $P \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data vasodilatasi vaskular yang berskala nominal dilakukan uji statistik menggunakan uji *Chi-Square*.

3.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

