

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan dilakukan pembuatan slide patologi anatomi dilanjutkan pembacaan slide patologi anatomi di Bagian Patologi Anatomi dr. Adjeg pada bulan Juli 2017.

1.3 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.

Perlakuan dalam penelitian adalah melihat adanya perbedaan gambaran histopatologi otak pada tikus Wistar yang diberi luka bakar intravital, perimortem, dan postmortem.

1.4 Populasi dan Sampel

1.4.1 Sampel Penelitian

1.4.1.1 Kriteria Inklusi

- 1) Tikus Wistar jantan
- 2) Usia 8 – 12 minggu
- 3) Berat 275 – 375 gr

1.4.1.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus dalam keadaan sakit
- 2) Tikus memiliki kelainan anatomi
- 3) Tikus mati sewaktu mendapat perlakuan

1.4.2 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.

1.4.3 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.

1.5 Variabel Penelitian

1.5.1 Variabel Bebas

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

1.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi otak tikus Wistar.

1.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	Luka bakar		Ordinal
	<p>Pemberian luka termal menggunakan metal yang dipanaskan dengan api dari kompor hingga suhu 100°C yang diukur dengan thermometer infrared kemudian ditempelkan selama 10 detik pada dorsal dan ventral tikus seluas 30% luas permukaan tubuh tikus</p>		
2.	Waktu pemaparan :		

- Intravital : diberikan paparan segera setelah teranestesi dengan ether selama 10 menit;

- Perimortem : diberikan paparan setelah 10 menit tikus diterminasi dengan anestesi overdosis menggunakan ether dan dipastikan telah mati; dan

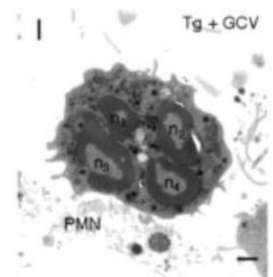
Postmortem : diberikan paparan setelah 3 jam tikus diterminasi dengan anestesi overdosis menggunakan ether;

- | | | |
|----|--|---|
| 3. | Gambaran Histopatologi otak | Sel radang dinilai Ordinal |
| | 1. Infiltrasi leukosit | dengan sistem |
| | 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 | skoring, dimana:
0 = 0-5 sel radang
1 = 6-10 sel radang
2 = 11-20 sel radang |

monosit, makrofag dan sel mast menyusup di sekitar pembuluh darah (Infiltrasi perivaskular) dalam keadaan inflamasi akut maupun kronik

3 = ≥ 21 sel radang

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

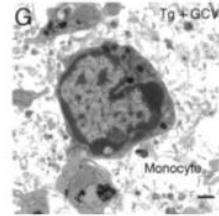


Gambar 12. Sel *Polymorphonuclear*

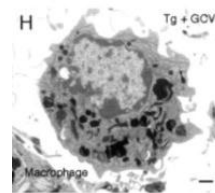


Gambar 13. Sel

Limfosit

**Gambar 14.** Sel

Monosit

**Gambar 15.** Sel

Makrofag

2. Vasodilatasi vaskuler

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,

- | | |
|-------------------|---------|
| 1. Terdapat | Nominal |
| vasodilatasi | |
| 2. Tidak terdapat | |
| vasodilatasi | |

terutama histamin dan nitric oxide (NO) pada otot polos pembuluh darah.

1.7 Cara Pengumpulan Data

1.7.1 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*.

1.7.2 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 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

1.7.3 Jenis Data

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

1.7.4 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.

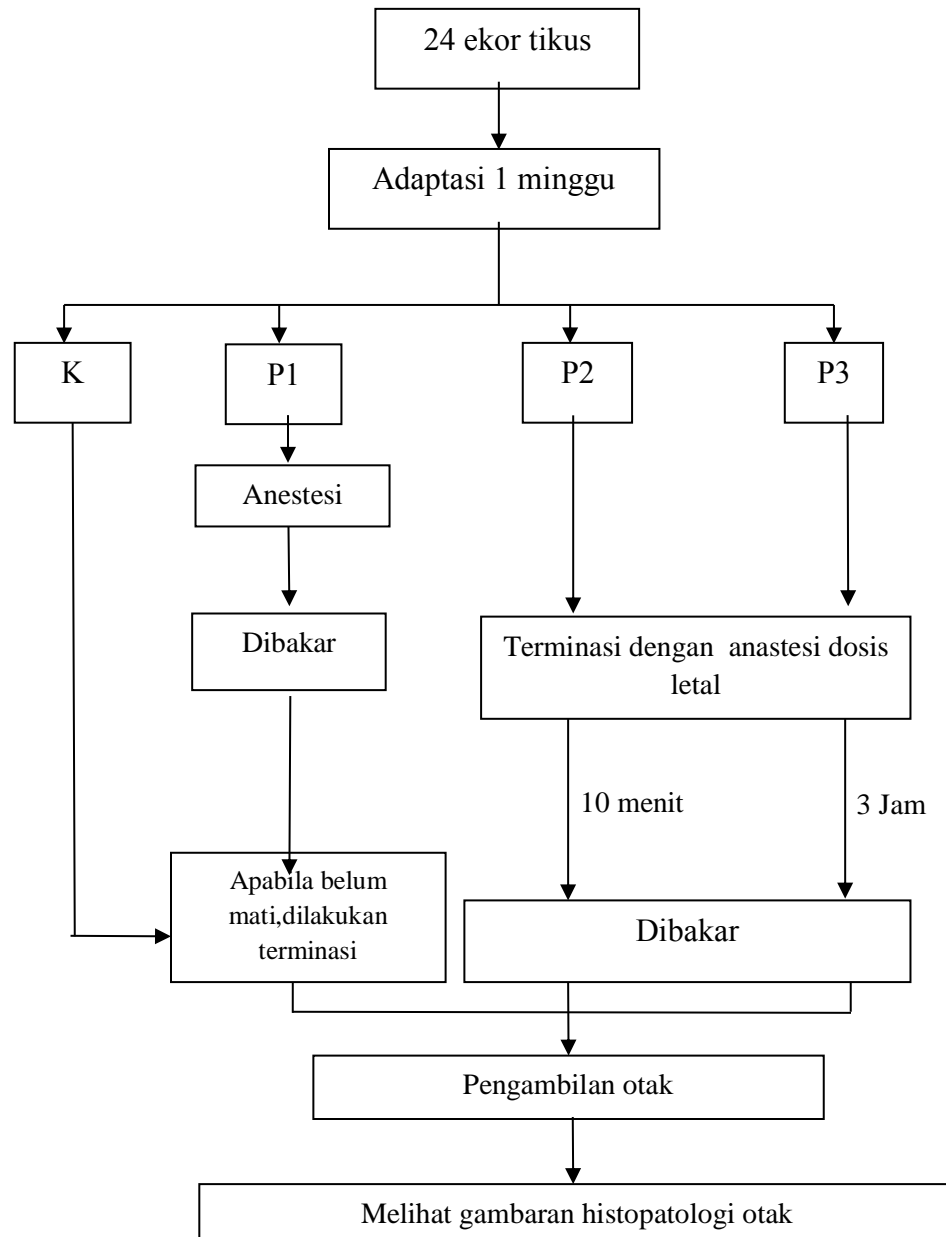
4. Kelompok kontrol lalu diterminasi tanpa diberi perlakuan apapun. Terminasi menggunakan inhalasi ether dosis letal sesuai *American Veterinary Medical Association's (AVMA) guidelines on euthanasia* 2007. Terminasi dilakukan dengan cara meletakkan kapas di dalam stoples pada bagian dasar, lalu kapas dibasahi dengan 10 ml larutan ether. Stoples ditutup rapat. Kemudian dilakukan pemantauan terhadap nafas dan denyut jantung untuk memastikan tikus telah mati dengan meraba tidak adanya detak jantung.
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 tengkurap untuk kemudian dilakukan pembedahan. Otak 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. Otak diambil untuk dibuat sediaan mikroskopis. Selanjutnya diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan hematoksilin eosin.
10. Dari setiap tikus dibuat satu preparat otak, 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.

1.8 Alur Penelitian



Gambar 16 . Alur Penelitian

1.9 Analisis Data

Uji yang digunakan untuk parameter vasodilatasi vaskuler menggunakan uji *Chi-Square* bila memenuhi syarat. Bila tidak memenuhi syarat maka akan dilakukan penggabungan sel untuk kembali diuji dengan *Chi-Square*. Kemudian jika $P \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna. Jika $P > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna. Sedangkan untuk parameter infiltrasi leukosit dilakukan uji beda menggunakan statistik non-parametrik Kruskal Wallis, jika didapatkan $p < 0,005$ dilanjutkan uji Post Hoc (*Mann Whitney Test*).

1.10 Etika Penelitian

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

1.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan	Bulan	Bulan	Bulan	Bulan	Bulan
	1	2	3	4	5	6
Penyusunan proposal	■					
Seminar proposal				■		
Persiapan penelitian				■		
Penelitian					■	
Input data penelitian					■	
Pengolahan data penelitian					■	
Penulisan laporan						■
Seminar hasil						■