

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

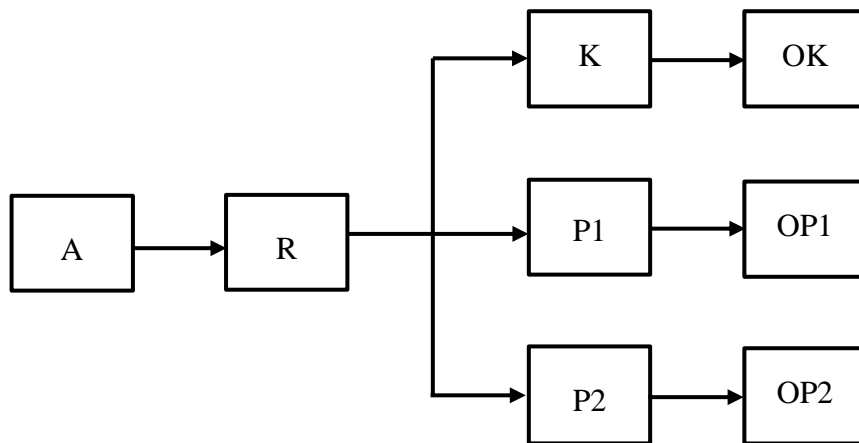
Penelitian ini adalah penelitian bidang Ilmu Kedokteran Forensik, Patologi Klinik, dan Toksikologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pengadaan hewan coba, intervensi terhadap hewan coba, pengambilan sampel, dan pemeriksaan kadar hemoglobin serta hematokrit. Penelitian ini dimulai dari bulan April sampai Juni 2018.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design*, menggunakan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian timbal asetat dan kalsium karbonat secara per oral, sedangkan luarannya (*outcome*) adalah kadar hemoglobin dan hematokrit mencit jantan.



Gambar 9. Rancangan penelitian

Keterangan:

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol, mencit diberi aquades murni selama 30 hari

P1 : Kelompok mencit yang diberi pakan standar dan timbal asetat dosis 10 mg/kgBB selama 30 hari¹⁰

P2 : Kelompok mencit yang diberi pakan standar, timbal asetat dosis 10 mg/kg dan kalsium karbonat dosis 62,5 mg/kgBB selama 30 hari¹³

OK : Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dan hematokrit mencit kelompok K

OP1 : Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dan hematokrit mencit kelompok P1

OP2 : Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dan hematokrit mencit kelompok P2

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, yaitu:

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

- 1) Jenis kelamin jantan
- 2) Usia mencit 6-8 minggu sebelum adaptasi
- 3) Berat badan mencit 20-30 gram

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Mencit terlihat sakit (tidak aktif bergerak)
- 2) Kelainan anatomis pada mencit

3.4.2.3 Kriteria Drop Out

- 1) Mencit mati saat penelitian

3.4.3 Cara Sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

3.4.4 Besar Sampel

Jumlah sampel minimal menurut kriteria WHO adalah 5 ekor mencit perkelompok. Pada penelitian ini terdapat 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 15 ekor mencit jantan Balb/c. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out* maka diberikan satu ekor mencit tambahan setiap kelompok. Jadi, pada penelitian ini digunakan 18 ekor mencit jantan Balb/c yang terbagi dalam 3 kelompok.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- 1) Pemberian kalsium

3.5.2 Variabel Terikat

- 1) Kadar hemoglobin
- 2) Kadar hematokrit

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Pemberian Kalsium	Pemberian kalsium dilakukan pada kelompok P2. Kalsium diberikan dalam bentuk kalsium karbonat. Kalsium karbonat merupakan bentuk garam kalsium dengan kandungan kalsium elemental yang paling tinggi, yaitu 40%. Pemberian kalsium karbonat menggunakan dosis 62,5 mg/kgBB ¹³ . Kalsium karbonat terlebih dahulu dilarutkan dalam aquades kemudian disondekan kepada mencit setiap pagi pada jam yang sama selama 30 hari. Setiap 0,2 mL larutan kalsium karbonat dibuat setara untuk dosis 10 gram mencit sehingga mencit dengan berat badan 20-30 gram diberikan larutan kalsium karbonat sebanyak 0,4-0,6 mL.	Ya/tidak	Nominal

2	Timbal	<p>Penginduksian timbal dilakukan pada kelompok P1 dan P2. Timbal diberikan dalam bentuk larutan timbal asetat dengan dosis 10 mg/kgBB. Kalsium karbonat terlebih dahulu dilarutkan dalam aquades kemudian disondekan kepada mencit setiap pagi pada jam yang sama selama 30 hari. Setiap 0,1 mL larutan timbal asetat dibuat setara untuk dosis 10 gram mencit sehingga mencit dengan berat badan 20-30 gram diberikan larutan timbal asetat sebanyak 0,2-0,3 mL</p>	Ya/tidak	Nominal
3	Kadar Hemoglobin	<p>Kadar hemoglobin menunjukkan konsentrasi hemoglobin dalam darah. Pemeriksaan kadar hemoglobin pada mencit dilakukan setelah perlakuan selama 30 hari. Darah diambil melalui plexus retroorbitalis kemudian diperiksa dengan metode <i>impedance</i> menggunakan alat <i>hematology analyzer sysmax KX-21</i>. Kadar hemoglobin normal untuk mencit Balb/c adalah 11,6-15,8 g/dL⁴⁴.</p>	g/dL	Rasio
4	Kadar hematokrit	<p>Kadar hematokrit menunjukkan rasio volume eritrosit terhadap volume darah total. Pemeriksaan kadar hematokrit pada mencit dilakukan setelah melakukan perlakuan selama 30 hari. Darah diambil melalui plexus retroorbitalis kemudian diperiksa dengan metode <i>impedance</i> menggunakan alat <i>hematology analyzer sysmax KX-21</i>. Nilainya didapatkan dari pengalihan antara jumlah eritrosit dengan volume rata-rata eritrosit. Kadar hematokrit normal mencit Balb/c adalah 37,4-51,7%⁴⁴.</p>	Persen (%)	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Pakan standar
- 2) Timbal asetat
- 3) Kalsium karbonat
- 4) Aquadest
- 5) Antikoagulan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)

3.7.2 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Timbangan hewan
- 3) Timbangan analitis
- 4) Sonde lambung
- 5) Sduit
- 6) Tabung Eppendorf
- 7) *Hematology Analyzer Sysmax KX-21*

3.7.3 Jenis Data

Kadar hemoglobin dan hematokrit setelah pemberian timbal asetat serta kalsium karbonat pada mencit Balb/c merupakan data primer.

3.7.4 Cara Kerja

Sejumlah 18 ekor mencit Balb/c jantan dipelihara di dalam ruang laboratorium tempat pemeliharaan hewan coba. Sebelum digunakan untuk penelitian, semua mencit diadaptasi dahulu selama 7 hari. Mencit dikandangkan sesuai kelompoknya dalam ruangan tertutup dengan ventilasi yang cukup dan

pencapaian memadai. Semua hewan coba diberi makanan dan minuman standar secara *ad libitum*.

Pada hari ke-8, 18 ekor mencit dibagi menjadi 3 kelompok di mana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor yang ditentukan secara acak, yaitu:

K: mencit hanya diberi aquades murni tanpa mengandung timbal asetat dan kalsium klorida.

P1: mencit diberi larutan timbal asetat dengan dosis 10 mg/kgBB.

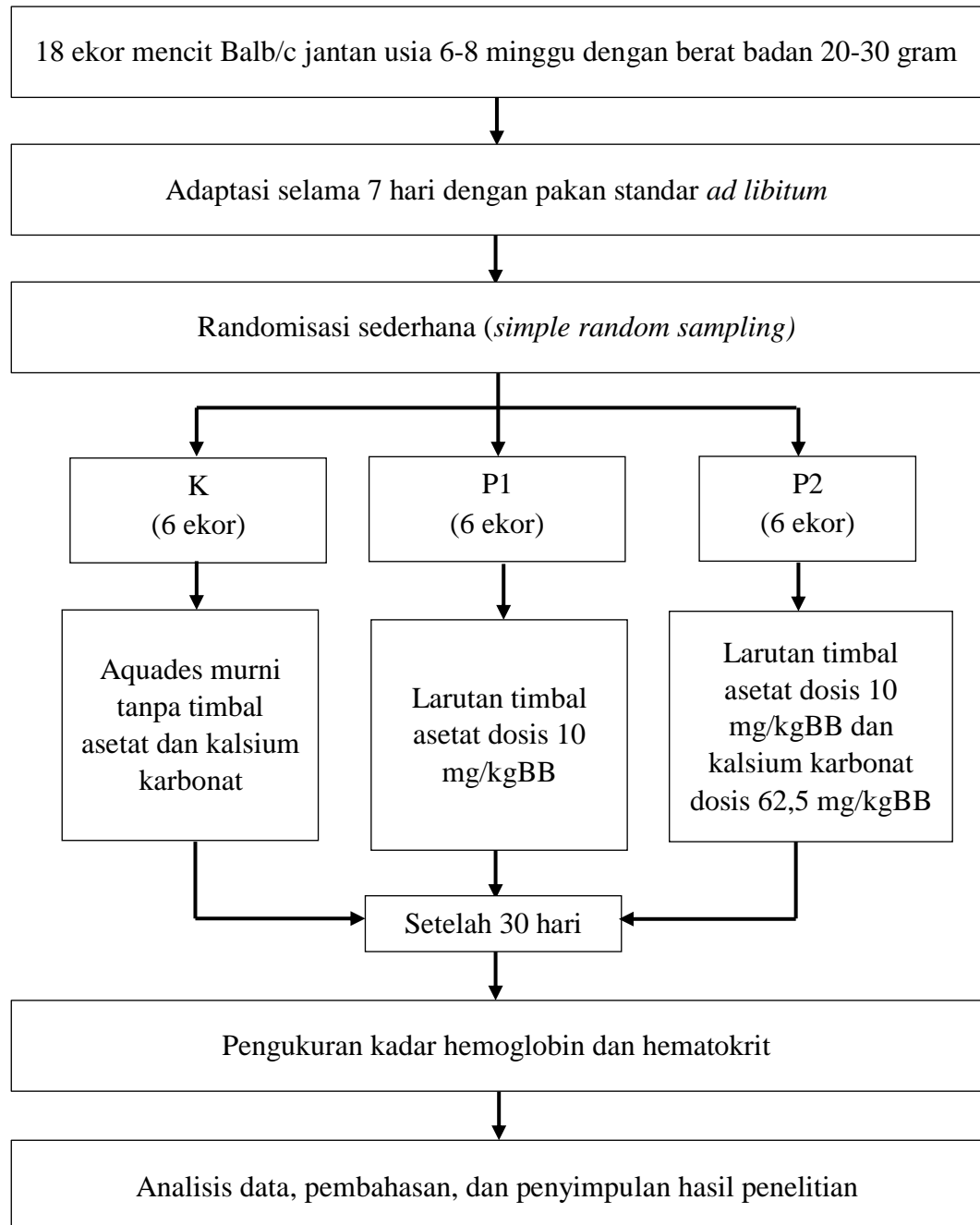
P2: mencit diberi larutan timbal asetat dengan dosis 10 mg/kgBB serta larutan kalsium karbonat dosis 62,5 mg/kgBB.

Perlakuan tersebut berlangsung selama 30 hari dan diberikan menggunakan sonde oleh tenaga ahli setiap pagi pada jam yang sama.

Selanjutnya, dilakukan pengambilan darah melalui pleksus retroorbitalis sebanyak ± 1 ml. Sampel darah yang diambil ditempatkan di tabung Eppendorf yang telah berisi antikoagulan EDTA. Selanjutnya, sampel darah diperiksa profil darah lengkap dengan alat *hematology analyzer sysmax KX-21*. Parameter yang digunakan adalah kadar hemoglobin dan hematokrit.

Setelah perlakuan dan pengambilan sampel darah pada hewan coba selesai, mencit dianestesi kemudian diterminasi dengan mendislokasi sendi *atlantooccipital* dan dikubur oleh ahli dari laboratorium LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan program komputer penganalisa statistik. Data yang didapatkan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui apakah persebaran datanya normal menggunakan uji *Saphiro-Wilk*.

Apabila data berdistribusi normal, dilakukan uji parametrik *One-Way ANOVA* untuk menganalisis perbedaan antarkelompok. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna. Uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene test* untuk melihat varian data. Varian sama dilanjutkan uji *post hoc Bonferroni* dan varian berbeda menggunakan uji *post hoc Tamhane's*.

Apabila data tidak berdistribusi normal dan mempunyai varian yang berbeda, dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance penelitian telah diajukan dan mendapat persetujuan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr.Kariadi Semarang untuk seluruh hewan coba.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan ke-					
	1	2	3	4	5	6
Studi literatur	■	■				
Penyusunan proposal	■	■				
Seminar proposal			■			
Persiapan peminjaman laboratorium			■			
Persiapan alat & bahan			■			
Pelaksanaan penelitian				■	■	■
Pengumpulan dan analisis data				■	■	■
Penyusunan laporan hasil				■	■	■
Seminar hasil					■	■