

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini meliputi bidang Patologi Anatomi dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

3.2.1 Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

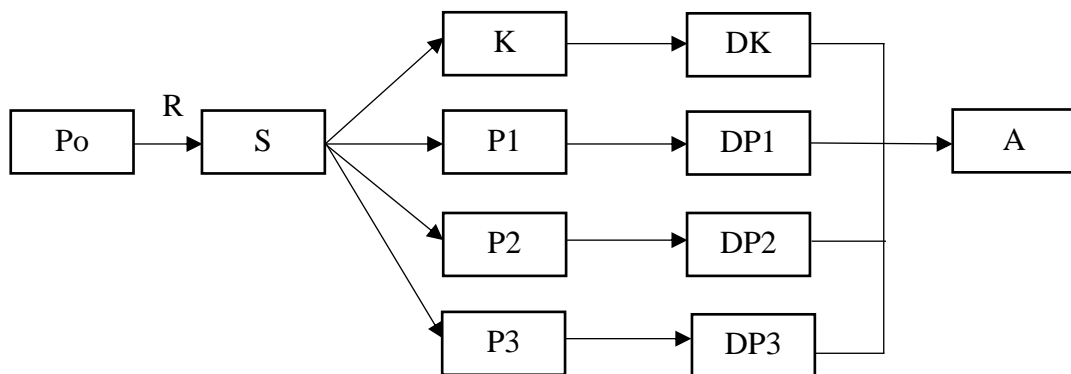
3.2.2 Terminasi tikus dan pengambilan organ limpa dilakukan di Laboratorium Hewan Coba, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

3.2.3 Pemeriksaan histopatologi organ limpa dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang

3.2.4 Penelitian ini dilaksanakan selama 9 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal pada bulan Februari 2018 sampai dengan tahap penyusunan laporan hasil pada bulan Oktober 2018.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *True Experimental* dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba tikus *Wistar* jantan sebagai objek penelitian.



Bagan 3. Rancangan penelitian

Keterangan:

Po : Populasi tikus

R : *Random sampling* sederhana

S : Sampel

K : Kelompok kontrol. Tikus *Wistar* diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan akuades selama 14 hari untuk menghasilkan stres yang sama dengan 3 kelompok perlakuan lain

P1 : Kelompok perlakuan 1. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan pupuk nanosilika dengan konsentrasi 7 ml/L selama 14 hari.

P2 : Kelompok perlakuan 2. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan pupuk nanosilika dengan konsentrasi 35 ml/L selama 14 hari.

P3 : Kelompok perlakuan 3. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan pupuk nanosilika dengan konsentrasi 175 ml/L selama 14 hari.

DK, DP1, DP2, DP3 : Data hasil pengamatan gambaran histopatologi organ limpa tikus *Wistar* jantan

A : Analisis data

3.4 Populasi dan sampel penelitian

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan yang diperoleh dari Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

3.4.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan yang memenuhi kriteria penelitian sebagai berikut:

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Usia 7-9 minggu
- 2) Berat badan rata-rata 250-300 gram

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

Terdapat kecacatan anatomis

3.4.2.3 Kriteria *drop out*

Mati selama penelitian

3.4.3 Besar sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook* dan *World Health Organization (WHO)* adalah 5 ekor tiap kelompok dengan prinsip *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.^{51,52} Tikus *Wistar* jantan yang digunakan 5 ekor pada masing-masing kelompok, sehingga jumlah tikus yang digunakan adalah 20 ekor. Untuk mengantisipasi *drop out*, ditambahkan 1 ekor pada masing-masing kelompok. Sehingga, besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus.

3.4.4 Cara sampling

Sampling pada penelitian ini dilakukan dengan metode *Simple Random Sampling*. Sampel penelitian diambil dari populasi yang mempunyai sifat-sifat sesuai dengan kriteria inklusi dan tidak termasuk dengan kriteria eksklusi.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Pupuk nanosilika

3.5.2 Variabel terikat

Pelebaran diameter pulpa putih dan jarak zona marginalis pada gambaran histopatologi organ limpa tikus *Wistar* jantan

3.6 Definisi operasional

Tabel 3. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Pupuk nanosilika	Pupuk nanosilika yang digunakan adalah DIPONE Nanosil. Diberikan paparan pupuk nanosilika secara inhalasi menggunakan <i>spray</i> . Sediaan pupuk nanosilika dibuat dalam konsentrasi 7, 35, dan 175 ml/L untuk setiap kelompok perlakuan. Perlakuan diberikan setiap hari selama 14 hari. Disemprotkan pada setiap tikus yang ditempatkan pada <i>modified nose-only inhalation chamber</i> .	ml/L	Nominal
2.	Diameter pulpa putih limpa dan jarak zona marginalis	Gambaran histopatologi limpa tikus <i>Wistar</i> jantan didapatkan dengan mengukur diameter pulpa putih dan jarak zona marginalis pada tikus <i>Wistar</i> jantan yang telah dicat <i>HE (Hematoksilin Eosin)</i> kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dengan menggunakan <i>micrometer</i> , diukur 5 folikel kemudian dirata-rata	<i>Micrometer</i> (μm)	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Makanan dan minuman standar hewan percobaan
- 2) Tikus strain *Wistar* jantan
- 3) Bahan pengecatan preparat histopatologi dengan pengecatan HE:

- a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Albumin
 - c. Parafin
 - d. Hematoksin-Eosin
 - e. Larutan xylol
 - f. Alkohol bertingkat
 - g. Akuades
 - h. Eter
- 4) Akuades
 - 5) Pupuk nanosilika

3.7.2 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) *Spray*
- 3) *Modified nose-only inhalation chamber*
- 4) Timbangan duduk dan timbangan neraca
- 5) Alat bedah hewan percobaan: skalpel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin
- 6) Alat pembuatan preparat histopatologi: mikrotom, oven, cetakan parafin
- 7) Alat untuk melihat histopatologi limpa: *deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya
- 8) Alat untuk mengukur diameter pulpa putih dan jarak zona marginalis: *Micrometer*

9) Gelas ukur dan pengaduk

10) Pemanas dan pemotong

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan bersumber dari hasil pemeriksaan gambaran histopatologi limpa tikus *Wistar* jantan yang diberikan paparan inhalasi pupuk nanosilika.

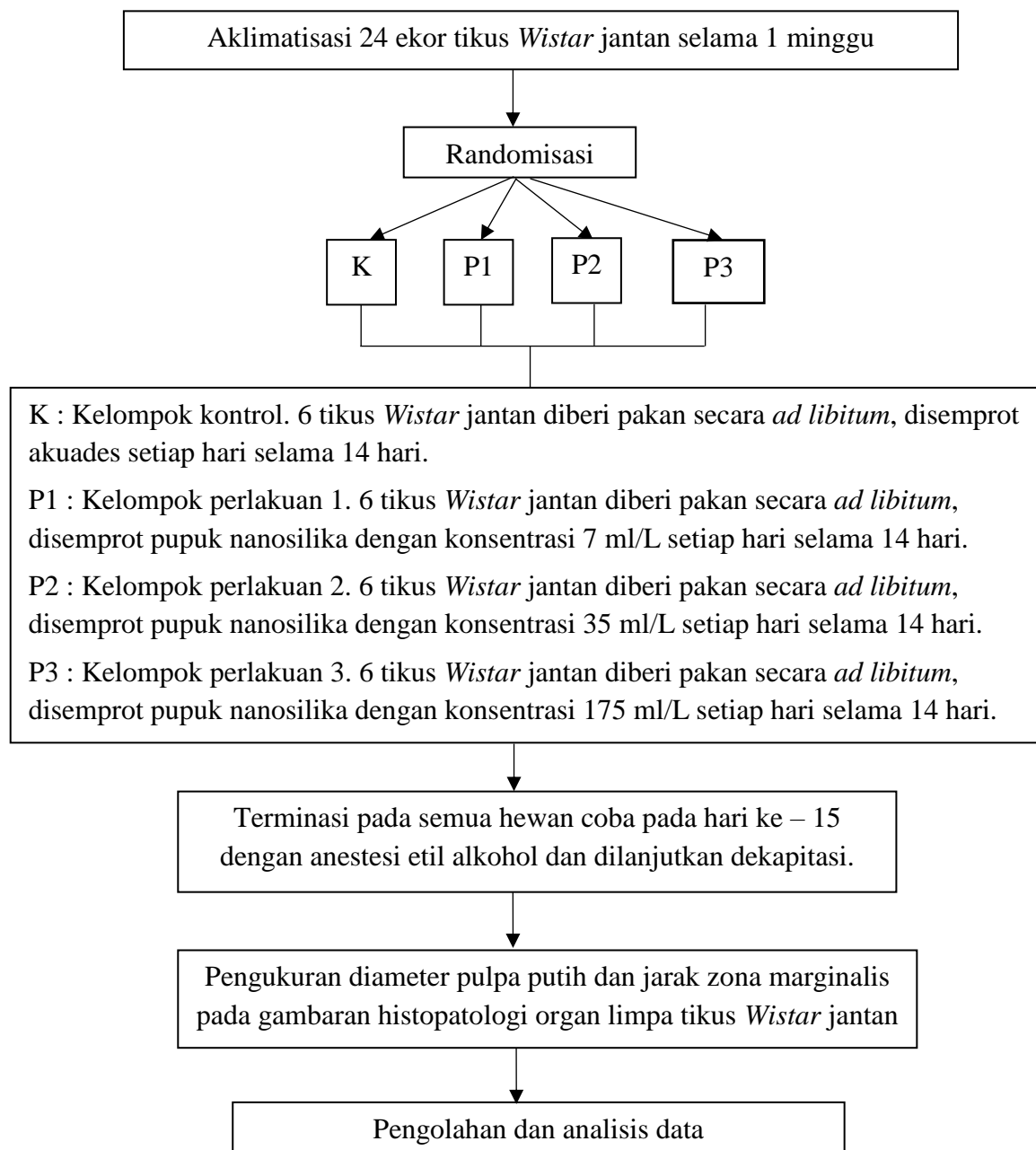
3.7.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Melakukan aklimatisasi hewan coba selama satu minggu di laboratorium dan diberikan pakan standar.
- 2) Memilih sampel dengan metode *simple random sampling*. 24 ekor tikus strain *Wistar* jantan dibagi menjadi 4 kelompok.
- 3) Mempersiapkan pupuk nanosilika dengan konsentrasi 7 ml/L, 35 ml/L, dan 175 ml/L dan akuades
- 4) Memberi perlakuan pada tiap kelompok, yaitu:
 - a. K : Kelompok kontrol. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprot akuades untuk menghasilkan stres yang sama dengan 3 kelompok perlakuan lain.
 - b. P1 : Kelompok perlakuan 1. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprot pupuk nanosilika dengan konsentrasi 7 ml/L setiap hari selama 14 hari.

- c. P2 : Kelompok perlakuan 2. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprot pupuk nanosilika dengan konsentrasi 35 ml/L setiap hari selama 14 hari.
 - d. P3 : Kelompok perlakuan 3. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprot pupuk nanosilika dengan konsentrasi 175 ml/L setiap hari selama 14 hari.
- 5) Melakukan terminasi pada semua hewan coba pada hari ke – 15 dengan anestesi etil alkohol dan dilanjutkan dekapitasi.
 - 6) Membedah dan mengambil bagian organ limpa tikus *Wistar* jantan untuk ditimbang dan dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE (lampiran 1).
 - 7) Mengukur diameter pulpa putih dan jarak zona marginalis pada preparat organ limpa tikus *Wistar* jantan dengan mikroskop cahaya medan terang pada perbesaran 100x diukur dengan menggunakan *micrometer*, diukur pada 5 folikel kemudian diambil rata-rata.
 - 8) Hasil pengamatan dikonsultasikan ke dokter spesialis patologi anatomi

3.8 Alur Penelitian



Bagan 4. Alur Penelitian

3.9 Pengolahan dan Analisis Data

3.9.1 Pengolahan Data

Data yang telah terkumpul diolah melalui proses *editing*, *coding*, *entrying* dan *cleaning* data, kemudian dianalisis secara statistik menggunakan program statistik. Data tersebut diolah dengan beberapa tahap pengolahan data sebagai berikut:

- 1) *Editing*. Dilakukan *editing* untuk meneliti kelengkapan data, kesinambungan data, dan keseragaman data sehingga validitas data terjamin.
- 2) *Coding*. Hasil data yang didapatkan selanjutnya diberikan kode-kode khusus untuk memudahkan dalam pengolahan data.
- 3) *Entrying*. Data-data yang telah diubah menjadi kode-kode khusus selanjutnya dimasukkan ke dalam program statistik komputer untuk diolah.
- 4) *Cleaning*. Peneliti melakukan pengecekan kembali data yang telah dimasukkan dalam program computer (*entry*). Apabila ada data yang tidak lengkap atau tertukar, peneliti segera memperbaikinya dengan data yang sesuai.

3.9.2 Analisis Data

Data gambaran histopatologi limpa tikus *Wistar* jantan berupa diameter pulpa putih dan jarak zona marginalis kemudian di uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk*. Apabila data terdistribusi normal dilanjutkan menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila data tidak terdistribusi normal, dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, kemudian dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi, Semarang, pada tanggal 28 Juni 2018 dengan nomor 79/EC/H/FK-RSDK/VI/2018.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan								
	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Spt	Okt
Penyusunan proposal									
Pengujian proposal									
Pelaksanaan penelitian									
Pembuatan preparat histopatologi									
Pembacaan preparat histopatologi									
Pengolahan data									
Pengujian hasil akhir									