

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam lingkup disiplin Patologi Anatomi dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

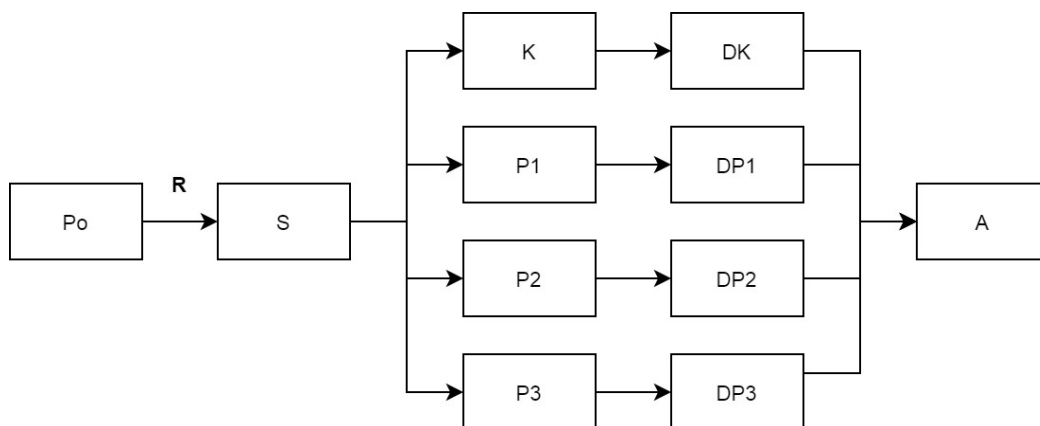
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Universitas Negeri Semarang sebagai tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang sebagai tempat pemeriksaan histopatologi organ hepar.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal pada bulan Februari 2018 sampai dengan tahap penyusunan laporan hasil pada bulan Agustus 2018.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

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



Bagan 3. Desain penelitian

Keterangan:

Po: Populasi tikus

R: *Random sampling* sederhana

S: Sampel

K: Kelompok kontrol. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan akuades 2 kali sehari 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 yang dicampur air dengan konsentrasi 7 ml/L 2 kali sehari selama 14 hari

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

P3: Kelompok perlakuan 3. Tikus *Wistar* jantan diberi pakan secara *ad libitum*, disemprotkan pupuk nanosilika yang dicampur air dengan konsentrasi 175 ml/L 2 kali sehari selama 14 hari

DK, DP1, DP2, DP3: Data hasil pengamatan histopatologi (Hepar kelompok K, P1, P2)

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 dipilih dengan metode *Simple Random Sampling* dengan 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

Besar sampel dihitung menggunakan panduan *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook* dan *World Health Organization (WHO)* dimana terdapat 5 ekor tiap kelompok dengan prinsip *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.^{42,43} Dalam masing-masing kelompok menggunakan 5 ekor tikus *Wistar* jantan, sehingga jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor. *Drop out* diantisipasi dengan menambahkan 1 ekor tikus pada masing-masing kelompok. Dengan jumlah total tikus pada tiap kelompok sebanyak 6 ekor, maka besar keseluruhan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 24 ekor tikus.

3.4.4 Cara Sampling

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

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Pupuk nanosilika

3.5.2 Variabel Terikat

Gambaran degenerasi/nekrosis sel hepar dan infiltrasi sel inflamasi pada periporta

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Pupuk nanosilika	Diberikan paparan pupuk nanosilika “DIPONE Nanosilika” secara inhalasi menggunakan spray. Sediaan pupuk nanosilika dibuat dalam konsentrasi berikut: 7ml/L, 35ml/L, 175ml/L dengan mencampurkannya dengan 1 liter air untuk setiap kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 secara berurutan. Perlakuan diberikan 2 kali setiap hari selama 14 hari dan disemprotkan pada tiap tikus yang dimasukkan ke dalam <i>modified nose-only inhalation chamber</i> , yaitu wadah dimana tikus terisolasi/terfiksasi kecuali bagian hidung. Perlakuan diberikan dengan cara menyemprotkan pupuk nanosilika ke bagian hidung tikus yang terbuka dengan konsentrasi yang telah dibuat.	ml/L	Nominal
2.	Jumlah sel hepar yang mengalami degenerasi dan nekrosis di daerah periporta tikus <i>Wistar</i> jantan	Gambaran mikroskopis hepar diambil dari organ hepar tikus <i>Wistar</i> jantan dari kelompok kontrol dan perlakuan setelah 14 hari selesai perlakuan. Preparat dibuat dengan menggunakan metode baku pemeriksaan histologi jaringan dengan pengecatan HE yang dapat dilihat pada lampiran 5. Dari setiap tikus dibuat dua sampai tiga preparat jaringan hepar dan tiap preparat dibaca dalam 5 lapang pandang daerah periporta dengan perbesaran awal 100x dan dilanjutkan dengan perbesaran 400x. Penghitungan jumlah sel hepar yang mengalami degenerasi dan/atau nekrosis diantara sel hepar per lapangan pandang periporta yang dilakukan dengan perbesaran 400x.	sel/lapangan pandang	Rasio

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
3.	Infiltrasi sel inflamasi di daerah porta organ hepar tikus <i>Wistar</i> jantan	<p>Gambaran mikroskopis hepar diambil dari organ hepar tikus <i>Wistar</i> jantan dari kelompok kontrol dan perlakuan setelah 14 hari selesai perlakuan.</p> <p>Preparat dibuat dengan menggunakan metode baku pemeriksaan histologi jaringan dengan pengecatan HE yang dapat dilihat pada lampiran 5.</p> <p>Dari setiap tikus dibuat dua sampai tiga preparat jaringan hepar dan tiap preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang daerah periporta dengan perbesaran awal 100x dan dilanjutkan dengan perbesaran 400x.</p> <p>Penilaian infiltrasi sel inflamasi pada porta berdasarkan <i>modified Knodell score</i>¹ yang dilakukan pada perbesaran 400x.</p> <p>Grade 0: Tidak ada sel inflamasi porta</p> <p>Grade 1: Ringan (terdapat sedikit sel-sel inflamasi pada kurang dari sepertiga saluran porta)</p> <p>Grade 2: Sedang (peningkatan sel inflamasi sampai sepertiga hingga dua pertiga saluran porta)</p> <p>Grade 3: Berat (Sebukun sel inflamasi yang padat sampai lebih dari dua pertiga saluran porta).</p>	-	Ordinal

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. Hematoksilin-Eosin
- e. Larutan xylol
- f. Alkohol bertingkat
- g. Akuades
- h. Eter
- 4) Akuades
- 5) Pupuk nanosilika
- 6) Etil alkohol

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 sinonasal: *deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya
- 8) Gelas ukur dan pengaduk
- 9) 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 sinonasal tikus *Wistar* jantan yang diberikan paparan inhalasi pupuk nanosilika.

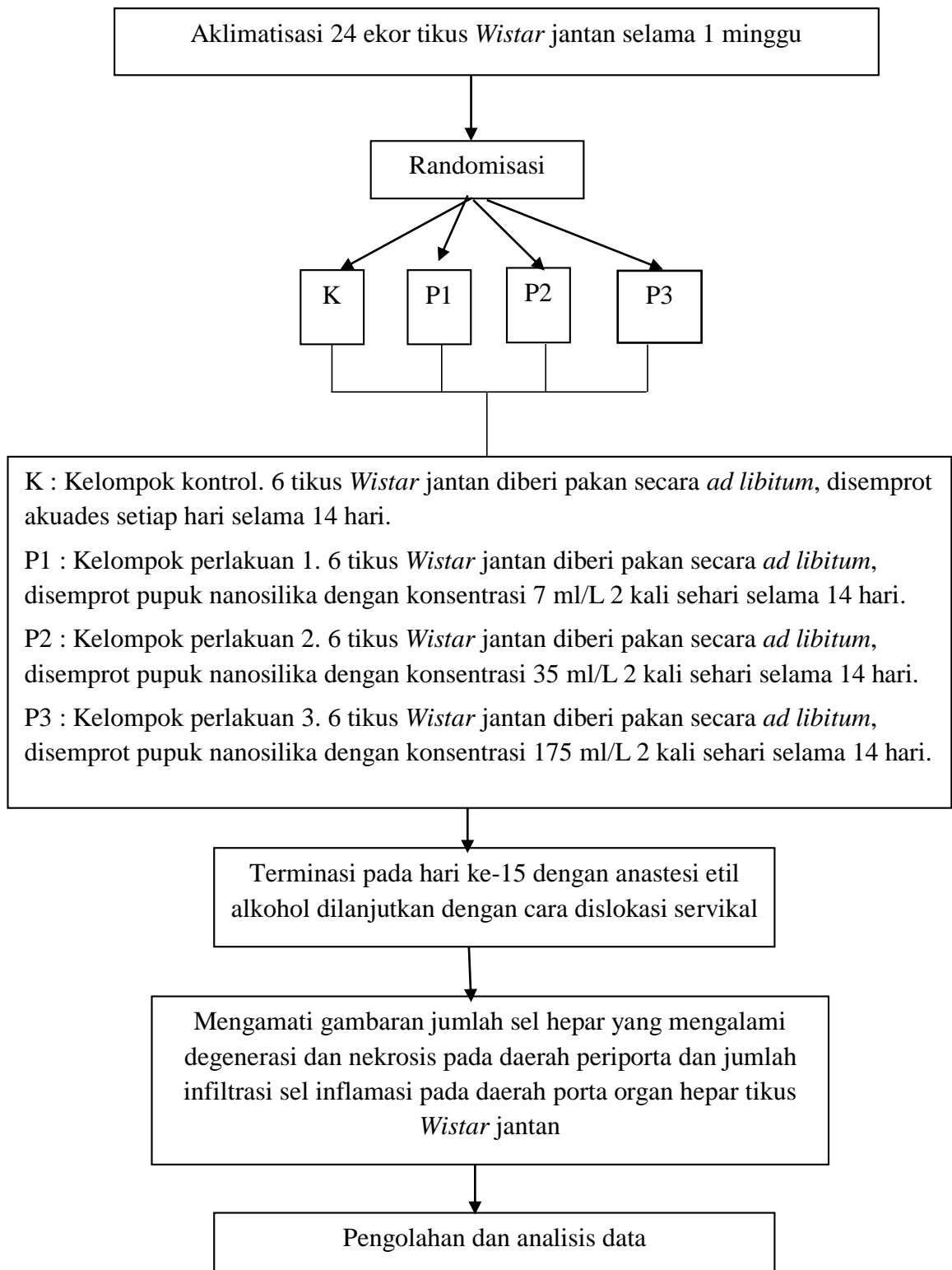
3.7.4 Cara Kerja

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 2 kali sehari selama 14 hari 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 2 kali 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 2 kali 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 2 kali setiap hari selama 14 hari.

- 5) Melakukan terminasi pada semua hewan coba pada hari ke-15 dengan anestesi etil alkohol dan dilanjutkan dengan dislokasi servikal
- 6) Membedah dan mengambil bagian organ hepar tikus *Wistar* jantan untuk ditimbang dan dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE (lampiran 5).
- 7) Mengamati gambaran histopatologi organ hepar berupa penghitungan jumlah sel yang mengalami degenerasi dan nekrosis pada daerah periporta dan derajat infiltrasi sel inflamasi pada daerah porta organ hepar tikus *Wistar* jantan dengan mikroskop cahaya medan terang pada perbesaran 400x dalam 5 lapangan pandang daerah periporta lalu dianalisa.
- 8) Pengolahan dan analisis data.

3.8 Alur Penelitian



Bagan 4. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

3.9.1 Pengolahan Data

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

- 1) *Editing*: Dilakukan *editing* untuk meneliti kelengkapan, kesinambungan, 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 komputer (*entry*). Apabila ada yang tidak lengkap atau tertukar, peneliti segera memperbaikinya dengan data yang sesuai.

3.9.2 Analisis Data

Data gambaran histopatologi berupa jumlah sel hepar yang mengalami degenerasi maupun nekrosis merupakan data rasio yang kemudian diuji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan didapatkan bahwa data terdistribusi tidak normal. Derajat Infiltrasi sel inflamasi pada porta yang

diperoleh merupakan data ordinal yang tidak perlu diuji normalitas. Karena data berdistribusi tidak normal, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*, kemudian dilanjutkan lagi dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*. Nilai p dianggap bermakna jika $p < 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi, Semarang dengan nomor No. 61/EC/H/FK-RSDK/V/2018 dan terlampir pada Lampiran 1.