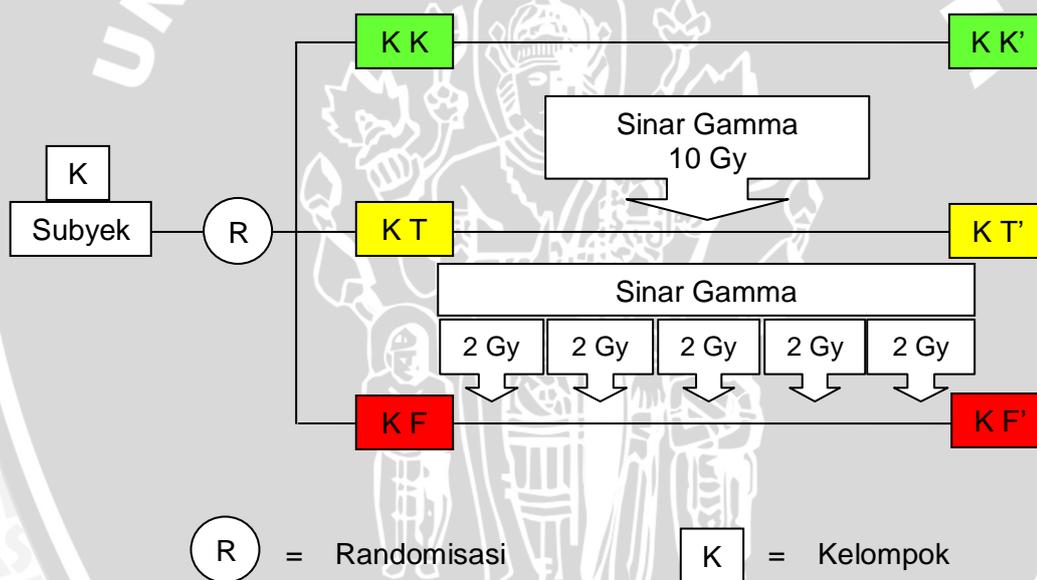


BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design*.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

- Kelompok Kontrol (K K) : Tanpa radiasi sinar gamma
- Kelompok Tunggal (K T) : Diberikan radiasi sinar gamma dosis tunggal
- Kelompok Fraksinasi (K F) : Diberikan radiasi sinar gamma dosis fraksinasi

Variabel bebas berupa data nominal dan variabel tergantung berupa data numerik sehingga menggunakan rancangan analisis ANOVA.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* varian Wistar jantan yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan kira-kira 200 gram. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang. Populasi hewan coba dibuat homogen dengan mempertahankan homogenitas strain, umur, berat badan, makanan, dan keadaan lingkungan sekitarnya sesuai dengan keperluan fisiologisnya.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus* varian wistar jantan berusia 2 – 3 bulan dengan berat badan kira-kira 200 gram. Jumlah perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tiga macam, yaitu :

Kelompok I : Tikus kontrol yang tidak diberi radiasi sinar gamma.

Kelompok II : Tikus yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal 10 Gy.

Kelompok III : Tikus yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis fraksinasi 10 Gy yang diberikan dengan dosis 2 Gy selama 5 hari berturut-turut.

Menurut Supranto (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana perhitungan besar sampel dapat dirumuskan:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

dimana: t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

Berdasarkan rancangan penelitian, dilakukan 3 macam perlakuan pada hewan coba sehingga besar sampel penelitian (jumlah replikasi) dapat dihitung seperti berikut:

$$(3-1) (r-1) \geq 15$$

$$2 (r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15/2$$

$$r-1 \geq 7,5$$

$$r \geq 7,5 + 1$$

$$r \geq 8,5 \approx 9$$

Menurut perhitungan, besar sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 9 ekor. Karena ada 3 kelompok, yaitu kelompok tikus kontrol, kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal, dan kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi, maka besar sampelnya adalah 9×3 , yaitu 27 ekor tikus.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

- Pemilihan hewan coba dilakukan di pusat pemeliharaan hewan coba di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang
- Pemeliharaan dan adaptasi hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Pemberian radiasi sinar gamma dilakukan di Instalasi Radiologi Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang
- Pembedahan organ dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan pembuatan slide

jaringan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

- Pemeriksaan morfologi sel epitel kolon dari tikus kontrol, tikus yang diberi radiasi dosis tunggal, dan tikus yang diberi radiasi dosis fraksinasi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Minggu pertama penelitian dihitung mulai saat pengurusan pernyataan kelaikan etik penelitian di Sekretariat *Ethical Clearance* yang bertempat di GPP lantai 4 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada minggu ke-9, tikus dewasa muda dengan umur seragam yang telah dipesan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang segera dilakukan persiapan, adaptasi, dan pemeliharaan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Kemudian pada minggu ke-9 hingga minggu ke-10, dilakukan pemberian radiasi sinar gamma dilakukan di Instalasi Radiologi Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang. Segera pada \pm 24 jam setelah pemberian radiasi sinar gamma dilakukan pembedahan organ kelompok tikus kontrol, tunggal, maupun fraksinasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pada minggu ke-10 hingga minggu ke-13 dilakukan pembuatan slide sediaan jaringan dan pengecatan immunohistokimia dengan parameter caspase-3 yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Selanjutnya pada minggu ke-13 hingga minggu ke-15 dilakukan pengamatan dan perhitungan sel epitel kolon

yang mengekspresikan caspase-3 di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung. Di bawah ini adalah penjelasan dari masing-masing variabel:

a. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah dosis radiasi sinar gamma, yang diberikan terdiri atas 3 macam, yaitu:

kontrol : tanpa pemaparan radiasi

tunggal : radiasi dosis tunggal 10 Gy (1 x 10 Gy)

fraksinasi : radiasi fraksinasi dengan jumlah dosis total 10 Gy (5 x 2 Gy)

b. Variabel Kendali

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali yaitu hewan percobaan (meliputi umur, jenis kelamin, dan berat badan), manajemen pemeliharaan hewan coba, cara kerja, serta peralatan yang digunakan.

c. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis sebagai efek biologi yang timbul akibat radiasi sinar gamma.

4.5 Definisi Operasional

- a. Radiasi dosis tunggal adalah pemberian radiasi dengan dosis 10 Gy dalam satu waktu.
- b. Radiasi dosis fraksinasi adalah pemberian radiasi dengan dosis 2 Gy setiap hari dalam 5 hari, sehingga jumlah total dosis radiasi 10 Gy.
- c. Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel secara fisiologis atau patologis yang dikenal dengan kematian sel terprogram. Apoptosis berfungsi untuk menjaga homeostasis pada diferensiasi dan proliferasi sel dalam jaringan, serta bertanggung jawab untuk mengontrol jumlah sel dalam suatu jaringan dan menyingkirkan sel-sel yang mengancam kehidupan suatu organisme.
- d. Morfologi sel epitel kolon yang mengalami apoptosis dilihat dengan pewarnaan immunohistokimia dengan parameter caspase-3 dan diamati dengan mikroskop digital *dotSlide* dengan perbesaran 200x. Kriteria yang digunakan untuk menentukan morfologi sel apoptosis yang memberikan ekspresi caspase-3 aktif adalah sel yang menunjukkan warna cokelat pada sitoplasma namun warna biru pada nukleusnya.
- e. Sel epitel kolon adalah sel epitel silindris selapis yang berada pada lapisan mukosa, yakni lapisan terdalam dari dinding kolon dan paling dekat dengan lumen, serta kelenjar intestinal/Kripte Lieberkuhn.
- f. Kolon merupakan salah satu organ yang terlibat dalam sistem pencernaan yang berfungsi utamanya untuk penyerapan air dan elektrolit dari residu makanan yang tidak tercerna dan kemudian

membentuk feses. Terdapat tiga bagian kolon yakni kolon asenden, kolon transversum, desenden, dan sigmoid.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan slide terfiksasi dari sampel jaringan yang diambil dari tikus yang dikorbankan berupa kolon adalah formalin 10%, alkohol 30%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, xilol, parafin lunak, parafin keras, gelatin 5%, aquades steril, dan larutan penyangga sodium sitrat. Sedang bahan yang diperlukan untuk uji imunohistokimia antara lain hidrogen peroksidase 3% dalam metanol, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Blocking Sniper Agent* (BSA) 1%, *Foetal Bofine Serum* (FBS) 5%, antibodi biotinilasi sekunder (*biotinylated anti-rat secondary antibody*), *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP), substrat 1,3-diamino benzidin (DAB), streptavidin, aquades, *tap water*, PBS/0,1%, *Tween 20*, serum normal, antibodi anti-caspase-3 aktif (Promega), *Mayer's Hematoxilen*, alkohol 70%-90%, xylena, dan *mounting media*.

4.6.2 Pakan dan Air Minum

Pakan tikus yang digunakan adalah sama dengan pakan dari tempat asalnya, yaitu pakan ayam petelur berupa pellet yang diperoleh dari PT Pokhand Indonesia. Pakan diberikan secara tidak terbatas (*ad libitum*). Sedangkan air minum yang diberikan adalah air bersih berasal dari PDAM Malang. Air minum ditempatkan dalam botol gelas, yang diletakkan pada anyaman kawat diatas kandang. Tikus dapat minum air dari botol tersebut melalui pipa. Air minum harus

tersedia terus-menerus, karena tiap hari seekor tikus dewasa minum 20-45 ml air.

4.6.3 Instrumen Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: kandang tikus dan perlengkapannya, alat fiksasi tikus, alat teleterapi radiasi Cobalt-60, toples berisi eter untuk terminasi, seperangkat alat bedah, tabung plastik untuk tempat pengawetan sampel, *object glass* beserta kotak penyimpanannya, kamera *Canon EOS 600D*, mikroskop digital *dotSlide*, aplikasi Olyvia, dan laptop.

4.6.3.1 Kandang Tikus

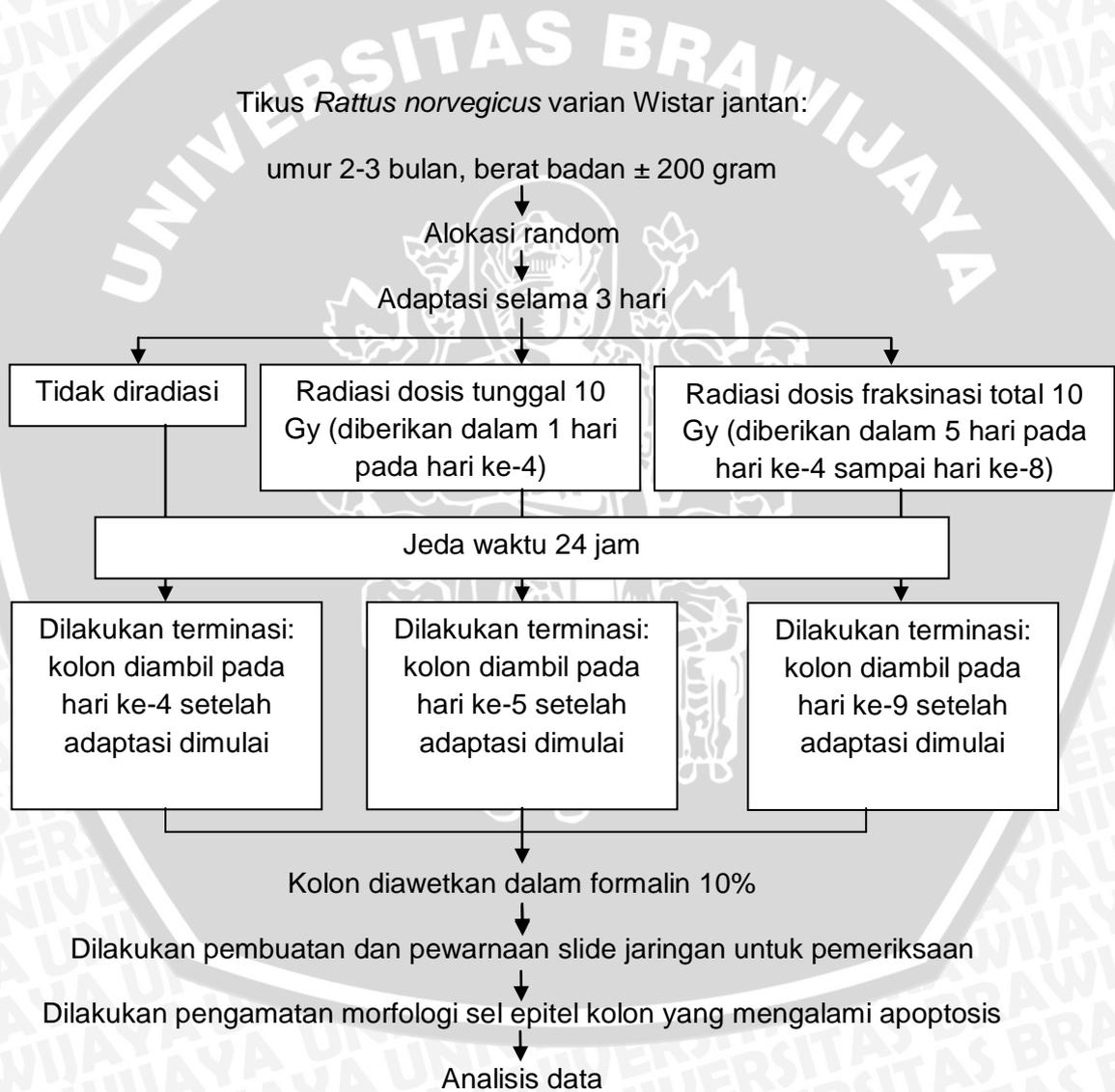
Kandang tikus terbuat dari kotak plastik dengan ukuran 40 x 31 x 14 sentimeter, dan ditutup dengan anyaman kawat yang bisa dilepas sehingga mudah dibersihkan. Alas kandangnya diberi sekam dan diganti setiap satu minggu sekali agar terjaga kebersihannya.

4.6.3.2 Alat Fiksasi

Alat fiksasi untuk tikus yang digunakan saat menerima radiasi sinar gamma dibuat dari kardus yang dibentuk menyerupai balok tanpa tutup dengan ukuran panjang 15 sentimeter, lebar 15 sentimeter, dan tinggi 25 sentimeter. Di dalam balok kardus terdapat sekat yang membagi balok menjadi 6 ruangan sama besar, dengan masing-masing ruangan berukuran 7,5x5x25 sentimeter. Ruangan di dalam balok kardus dibuat sesuai dengan ukuran tubuh hewan coba sehingga hewan coba terfiksasi dalam keadaan tubuh bagian dorsal menghadap ke atas saat proses pemberian radiasi sinar gamma berlangsung.

4.7 Metode Pengumpulan Data

Data secara primer diperoleh dari hasil pemeriksaan dan penghitungan sel epitel apoptosis pada slide kolon tikus *Rattus norvegicus* varian Wistar jantan, baik tikus kontrol maupun tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal dan dosis fraksinasi. Metode perlakuan pada hewan coba dapat dijelaskan pada skema di bawah ini:



Sebelum penelitian dimulai, dilakukan pengambilan tikus dari populasi yang sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan. Tikus-tikus tersebut dibagi menjadi 3 kelompok dengan teknik *simple random sampling* dan diberi label “kontrol”, “tunggal”, dan “radiasi”. Masing-masing kelompok terdiri atas 9 ekor tikus. Kelompok “kontrol” tidak diradiasi, kelompok “tunggal” diradiasi dengan dosis tunggal, sedangkan kelompok “fraksinasi” diradiasi dengan dosis fraksinasi. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik yang ditutupi jaringan kawat dan dialasi sekam. Pakan dan minum tikus yang diberikan sesuai dengan pakan dan minum yang diberikan pada tempat asalnya. Kemudian, adaptasi dilakukan selama 3 hari.

Pemaparan kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal sebesar 10 Gy dilakukan pada hari ke-4. Sedangkan pemaparan kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi sebesar 2 Gy selama 5 hari (dosis total 10 Gy) dilakukan pada hari ke-4 sampai hari ke-8. Jarak antara pesawat teleterapi radiasi Co-60 dengan tikus adalah 80 sentimeter (Susworo, 2007: 31). Lapang penyinaran pesawat teleterapi radiasi Co-60 adalah sebesar 15x15 sentimeter yang sesuai dengan ukuran panjang dan lebar alat fiksasi hewan coba. Waktu penyinaran pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal 10 Gy adalah sebesar 697 detik. Waktu penyinaran pertama pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 2 Gy selama 5 hari adalah sebesar 148 detik dengan *Depth Dose* (DD) sebesar 2,5 sentimeter. Sedangkan waktu penyinaran kedua sampai kelima pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 2 Gy selama 5 hari adalah sebesar 141 detik dengan *Depth Dose* (DD) sebesar 3 sentimeter. Karena hanya terdapat 6 ruangan pada alat fiksasi hewan coba, maka penyinaran untuk

masing-masing kelompok tikus yang diradiasi sinar gamma, baik dengan dosis tunggal maupun dosis fraksinasi, dilakukan dalam 2 tahap atau bergantian.

Setelah jeda waktu 24 jam, semua kolon dari masing-masing tikus pada semua kelompok diambil dengan mengorbankan tikus. Tikus dikorbankan dengan menggunakan eter. Proses pembedahan dan pengangkatan kolon dilakukan dengan hati-hati. Kolon dari tikus yang tidak diberi radiasi sinar gamma diambil pada hari ke-4 setelah adaptasi dimulai. Sedangkan kolon dari tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal dan dosis fraksinasi masing-masing diambil pada hari ke-5 dan ke-9 setelah adaptasi dimulai. Kolon hewan coba diawetkan dalam formalin 10%. Selanjutnya, sampel jaringan tersebut menjalani serangkaian proses hingga akhirnya terbentuk slide sediaan jaringan kolon dengan pewarnaan immunohistokimia menggunakan antibodi caspase-3. Analisa aktivitas apoptosis pada suatu populasi sel secara eksperimental berdasarkan parameter aktivitas caspase-3 merupakan metode yang terpercaya (Lee et.al., 2003). Kemudian dilakukan pemeriksaan morfologi sel epitel kolon yang mengalami apoptosis dengan parameter caspase-3, yakni sel epitel yang mengekspresikan caspase-3 pada sitoplasma sesuai dengan lokalisasinya (Bressenot, et.al, 2009). Perhitungan indeks apoptosis sel epitel kolon diperoleh melalui jumlah sel yang mengalami apoptosis dibagi jumlah sel epitel kolon yang diamati yakni 1000 sel. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dan untuk menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 400x sehingga didapatkan kurang lebih 1000 sel pada setiap slide sediaan jaringan (Soini et.al, 1998).

4.8 Pengolahan Data

Analisis statistik dilakukan dengan cara *One Way ANOVA* dengan menggunakan program SPSS 17. *One Way ANOVA* digunakan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua kelompok sampel berbeda secara signifikan atau tidak, yaitu untuk kelompok sampel yang tidak diberi radiasi, diberi radiasi dengan dosis tunggal, dan diberi radiasi dengan dosis fraksinasi. Variabel bebasnya adalah dosis radiasi sinar gamma dan variabel terganggunya adalah jumlah morfologi sel epitel kolon yang mengalami apoptosis, kemudian dicari median dan standar deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 0,05$ dimana apabila diperoleh $p > 0.05$ artinya tidak ada perbedaan yang nyata, sebaliknya bila $p < 0.05$ menunjukkan ada perbedaan yang bermakna.

4.9 Jadwal Kegiatan

Dalam melaksanakan penelitian ini, penulis merancang jadwal kegiatan sebagai berikut:

- Tahap pertama pelaksanaan penelitian ini adalah mengurus pernyataan kelaikan etik penelitian di Sekretariat *Ethical Clearance* yang bertempat di Gedung Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang kemudian kegiatan tersebut dianggap sebagai minggu pertama penelitian.
- Minggu ke-1 hingga minggu ke-6 penelitian : Melakukan *follow up* terhadap pernyataan kelaikan etik penelitian.
- Minggu ke-7 penelitian : Memesan hewan coba di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

- Minggu ke-7 hingga minggu ke-8 penelitian : Mengurus surat pengantar penelitian untuk Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang di Sekretariat Tugas Akhir yang bertempat di Gedung Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Minggu ke-8 : Mengurus izin penelitian di Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang.
- Minggu ke-9 penelitian : Adaptasi hewan coba di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Minggu ke-9 hingga ke-13 penelitian : Melakukan penelitian (pemberian radiasi sinar gamma, pemotongan organ, serta pembuatan dan pewarnaan slide jaringan).
- Minggu ke-13 hingga minggu ke-20 penelitian : Melakukan pemeriksaan slide jaringan hasil penelitian, analisis data, dan penyelesaian tugas akhir.