

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian ini akan dilakukan dengan membandingkan hasil yang didapat sesudah perlakuan (*post-test*) dengan kontrol. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak kelompok karena rancangan tersebut memungkinkan untuk menyelidiki pengaruh dari dua jenis variabel atau lebih sekaligus. Kelompok perlakuan dibagi menjadi tiga, yaitu:

Kelompok I : Tanpa radiasi sinar gamma

Kelompok II : Diberikan radiasi sinar gamma dosis tunggal

Kelompok III : 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 Penelitian

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 dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Jenis kelamin jantan
2. Usia 2-3 bulan
3. Berat badan seragam kira-kira 200 gram

Kriteria Inklusi sampel adalah:

1. tikus *Rattus norvegicus* varian Wistar
2. Jenis kelamin jantan
3. Umur 2-3 bulan
4. Berat badan seragam sekitar 200 gram
5. Sehat dan tidak cacat

Kriteria Eksklusi adalah:

1. Mati ditengah penelitian
2. Tidak mendapatkan jumlah paparan sesuai dosis
3. Berat badan terlalu jauh dibawah 200 gram atau lebih diatas 200 gram
4. Sakit atau cacat karena perlakuan

Jumlah perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tiga macam, yaitu:

1. Tikus kontrol yang tidak diberi radiasi sinar gamma.
2. Tikus yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal 10 Gy.
3. 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, akan 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 retina 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

Tikus dewasa muda dengan umur seragam 2-3 bulan diperoleh dari Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang mulai bulan Juni 2012. Persiapan, adaptasi, dan pemeliharaan ketiga kelompok tikus dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni 2012. Pemberian radiasi sinar gamma dilakukan di Instalasi Radiologi Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang. Pembedahan organ kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma, baik dosis tunggal maupun dosis fraksinasi, dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang satu hari setelah dilakukan perlakuan. Pembuatan slide dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang setelah semua organ dari hewan coba terkumpul. Pengamatan dan pemeriksaan slide retina dilakukan di

Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang setelah pembuatan slide.

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 irradiasi dan cara pemberian sinar gamma, yang diberikan terdiri atas 3 macam, yaitu:

I: tanpa pemaparan radiasi

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

III: 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 yang meliputi:
 - Umur
 - Jenis kelamin
 - Berat badan
- Manajemen pemeliharaan hewan coba
- Cara kerja
- Alat-alat yang digunakan

c. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek biologi yang timbul akibat radiasi sinar gamma yang berupa perubahan morfologi sel retina yang mengalami apoptosis.

4.5 Definisi Operasional

- a. Radiasi dosis tunggal adalah pemberian radiasi terhadap tubuh dengan dosis tertentu yang keseluruhan dosisnya diberikan dalam satu kali penyinaran.
- b. Radiasi dosis fraksinasi adalah pemberian radiasi dengan dosis tertentu namun dibagi dalam dosis kecil dan diberikan beberapa kali dengan jeda waktu tertentu sampai dosis total yang diharapkan terpenuhi.
- c. Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel secara fisiologis, atau disebut juga dengan kematian sel terprogram..
- d. Sel retina adalah sel yang sensitif terhadap cahaya yang terdapat dilapisan dalam struktur organ mata. Sel batang dan kerucut adalah sel fotoreseptor di retina yang berfungsi untuk mendeteksi cahaya.
- e. Caspase-3 adalah suatu enzim yang diaktifkan saat sel sudah tidak dapat dipertahankan dan nantinya akan tampak perubahan warna sitoplasma sel menjadi coklat dengan inti ungu. Setelah sel positif mengalami aktivasi caspase-3 maka sel akan segera memunculkan morfologi sel apoptosis.

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 mata adalah formalin 10%, alkohol 30%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, xilol, parafin lunak, parafin keras, gelatin 5%, dan dH₂O. Sedang bahan

yang diperlukan untuk uji imunohistokimia antara lain hidrogen peroksidase 3% dalam metanol, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), substrat 1,3-diamino benzidin (DAB), konjugat streptavidin terhadap peroksidase (Lab Vision), streptavidin, antibodi biotinilasi sekunder (*biotinylated anti-rabbit secondary antibody*), aquades, PBS/0,1%, *Tween 20*, serum normal, antibodi anti caspase-3 aktif (Promega), Hematoxilin, 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 di atas 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, seperangkat alat bedah, dan kamera Canon EOS 600D.

4.6.3.1 Kandang Tikus

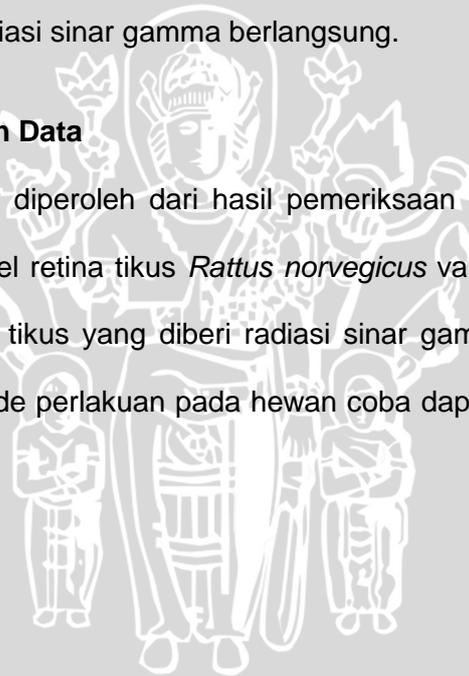
Kandang tikus terbuat dari kotak plastik dengan ukuran 40 x 31 x 14 sentimeter, dan ditutup dengan anyaman kawat yang bisa dilepas sehingga mudah dibersihkan. Alas kandangnya diberi sekam dan diganti setiap satu minggu sekali agar terjaga kebersihannya.

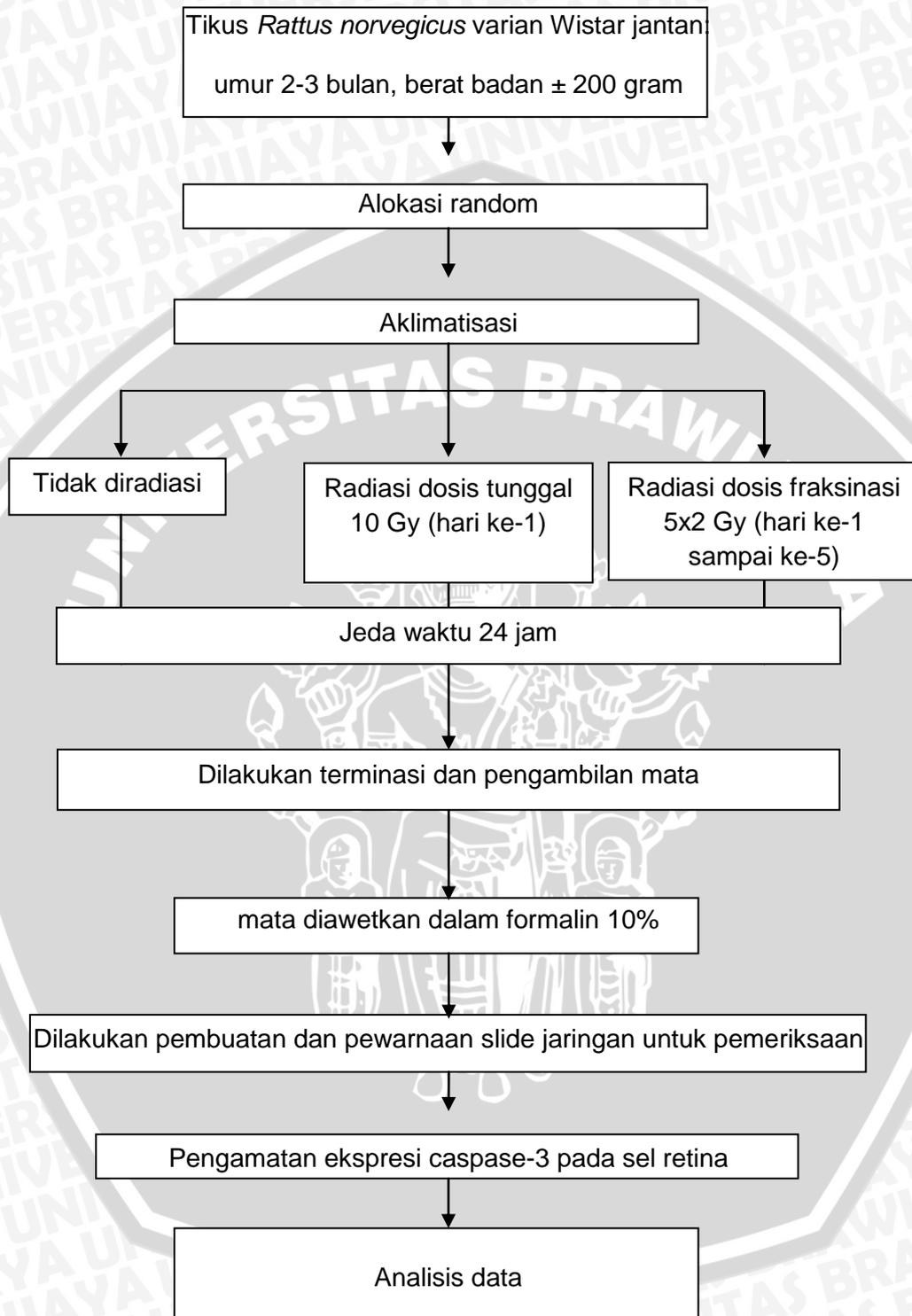
4.6.3.2 Alat Fiksasi

Alat fiksasi untuk tikus yang digunakan saat menerima radiasi sinar gamma dibuat dari kardus yang dibentuk menyerupai balok tanpa atap 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 7,5 x 5 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 apoptosis pada slide sel retina 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:





4.7.1 Adaptasi Tikus

Sebelum penelitian dimulai, dilakukan pengambilan tikus dari populasi yang sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan. Tikus-tikus tersebut dibagi menjadi 3 kelompok secara random dan diberi label I, II, dan III. Masing-masing kelompok terdiri atas 9 ekor tikus. Kelompok I tidak diradiasi, kelompok II diradiasi dengan dosis tunggal, sedangkan kelompok III 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. Pakan diberikan secara tidak terbatas (*ad libitum*). Kemudian, adaptasi dilakukan selama tiga hari. 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.

4.7.2 Proses Radiasi Sinar Gamma

Pada hari pertama perlakuan dilakukan terminasi terhadap hewan coba kelompok I yang tidak diradiasi. Radiasi sinar gamma dosis tunggal sebesar 10 Gy dilakukan pada kelompok hewan coba II pada hari pertama. Sedangkan radiasi sinar gamma dosis fraksinasi sebesar 10 Gy masing-masing 2 Gy setiap hari dilakukan pada hewan coba pada hari pertama sampai hari ke lima. Jarak antara alat radioterapi Cobalt-60 dengan tikus adalah 80 sentimeter. Lapangan penyinaran alat radioterapi Cobalt-60 adalah 15 x 15 sentimeter yang sesuai dengan luas alat yang digunakan saat radiasi.

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. Proses terminasi dilakukan pada 24 jam pasca perlakuan karena secara teori proses apoptosis baru akan muncul 6-24 jam pasca paparan *trigger*.

4.7.3 Terminasi Tikus

Setelah jeda waktu 24 jam (1 hari), semua mata dari masing-masing tikus pada semua kelompok diambil dengan dilakukan terminasi pada tikus. Tikus diterminasi dengan menggunakan eter. Terminasi dilakukan dengan memasukkan satu ekor tikus ke dalam toples kaca berisi kapas yang telah dibasahi oleh eter. Setelah tikus dimasukkan, toples ditutup dan ditunggu selama kira-kira 5 menit.

4.7.4 Pembedahan, Pengambilan, dan Penyimpanan Organ Hewan Coba

Tikus dibedah oleh tenaga ahli dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan diambil matanya. Proses pengambilan organ mata disebut enukleasi. Proses enukleasi dimulai dengan membuka kelopak mata tikus. Selanjutnya orbita dilebarkan dengan memotong

ujung medial orbita kearah medial. Potong jaringan pengikat bulbus okuli dari sisi medial, lateral, superior, dan inferior. Selanjutnya dengan menggunakan forsep tarik bola mata dengan hati-hati dan potong saraf optikus. Kemudian mata disimpan di dalam wadah plastik berisi formalin 10% dan diberi label sesuai dengan kelompok perlakuan dan nomor spesimen. Selanjutnya, wadah plastik disimpan pada suhu ruang (25°C). Setelah itu, organ siap diproses untuk membuat slide kosong jaringan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dilakukan pengecatan imunohistokimia dengan antibodi caspase-3 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

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 retina 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.
- 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 minggu ke-10: Melakukan penelitian (pemberian radiasi sinar gamma, pemotongan organ, pembuatan dan pewarnaan slide jaringan).
- Minggu ke-11 hingga minggu ke-20 penelitian : Melakukan pemeriksaan slide jaringan hasil penelitian, analisis data, dan penyelesaian tugas akhir.