

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 (10 Gy)

Kelompok III : Diberikan radiasi sinar gamma dosis fraksinasi (5 x 2 Gy)

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, dan dinyatakan sehat pada pemeriksaan fisik (tidak cacat fisik). Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya 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 :

1. Jenis kelamin jantan
2. Usia 3-4 bulan
3. Berat badan seragam kira-kira 200 gram

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

1. Tikus kontrol
2. Tikus yang diradiasi dengan dosis tunggal 10 Gy
3. Tikus yang diradiasi 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 yang akan dilakukan 3 macam perlakuan pada hewan coba, maka 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. Maka digunakan besar sampel minimal untuk penelitian eksperimental yaitu 27 ekor, dimana masing-masing kelompok perlakuan menggunakan 9 ekor hewan coba.

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.
- Pemotongan organ dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan pembuatan slide jaringan dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Pemeriksaan morfologi sel gaster 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 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 Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang setelah semua organ dari hewan coba terkumpul. Pengamatan dan pemeriksaan slide jaringan gaster dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang setelah pembuatan slide.

4.4 Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini 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

Variabel Kendali disini adalah variabel yang diatur dan disamakan selama proses penelitian. Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali, yaitu:

1. Hewan percobaan yang meliputi
 - Umur
 - Jenis kelamin
 - Berat badan
2. Manajemen pemeliharaan hewan coba
3. Cara kerja
4. 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 gaster yang mengalami apoptosis.

4.5 Definisi Istilah / Operasional

- a. Radiasi dosis tunggal adalah penyinaran radiasi dosis 10 Gy yang diberikan satu kali saja.

- b. Radiasi dosis fraksinasi adalah penyinaran radiasi dosis 2 Gy 5 kali, selama 5 hari, dengan sekali penyinaran setiap harinya di waktu yang sama, sehingga jumlah total dosis radiasi 10 Gy.
- c. Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel secara fisiologis, atau disebut juga dengan “program kematian sel”. Apoptosis menjaga homeostasis pada diferensiasi dan proliferasi vertebra, dan bertanggung jawab untuk mengontrol jumlah sel dalam suatu jaringan dan menyingkirkan sel-sel yang mengancam kehidupan suatu organisme.
- d. Sel gaster yang mengalami apoptosis dilihat indeksnya setelah sebelumnya diberi pewarnaan imunohistokimia, kemudian diamati reaksi caspase-3 dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Kriteria yang digunakan untuk menentukan morfologi sel yang mengalami apoptosis dengan memberikan ekspresi caspase 3 aktif akan memberikan warna coklat kemerahan, sedangkan yang tidak mengekspresikan akan berwarna biru pada intinya.
- e. Sel gaster yang diamati adalah sel epitel silindris sebaris yang terdapat pada bagian mukosa gaster.
- f. Gaster merupakan saluran pencernaan yang terdiri dari 4 bagian, berurutan dari atas ke bawah, yaitu kardiak, fundus, korpus, dan pilorus. Tepi bagian tengah gaster yang berbentuk cekung disebut dengan *curvature minor*, sedang tepi bagian lateral disebut dengan *curvature mayor*.
- g. Hewan percobaan yang dipakai adalah tikus *Rattus norvegicus* varian wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat sekitar 200 gram.



- h. Hewan percobaan diberi radiasi dulu sebelum diambil organ gasternya.
- i. Penyinaran dilakukan di laboratorium Radiologi RSSA Malang.
- j. Radiasi yang digunakan adalah radiasi sinar gamma yang diemisikan oleh sumber radiasi Co_{60} atau Cobalt-60.
- k. Organ yang telah diambil, dalam penelitian ini yaitu gaster, diawetkan dalam cairan formalin 10% sebelum kemudian difiksasi dalam blok parafin untuk memudahkan pemotongan saat ditaruh pada kaca preparat.
- l. Penghitungan statistik pada percobaan ini menggunakan program Microsoft Excel 2010 dan SPSS 22.
- m. Uji statistik menggunakan metode *One-Way* ANOVA yang digunakan untuk menguji signifikansi perbedaan rata-rata pada lebih dari 2 sampel, yaitu untuk kelompok sampel yang tidak diberi radiasi, diberi radiasi dengan dosis tunggal, dan diberi radiasi dengan dosis fraksinasi.

4.6 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah sampel jaringan yang diambil dari tikus yang dikorbankan berupa organ gaster. Untuk pembuatan slide diperlukan : 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. Lalu bahan yang diperlukan untuk uji immunohistokimia antara lain hidrogen peroksidase 3% dalam methanol, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Blocking*

Sniper Agent (BSA) 1%, Foetal Bofine Serum (FBS) 5%, antibody 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, antibody anti-caspase-3 aktif (Promega), Mayer's Hematoxilen, alkohol 70%-90%, xylene, 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, seperangkat alat bedah, tabung plastik untuk mengawetkan organ, *object glass* beserta kotak penyimpanan, kamera *Canon EOS 600D*, kamera *Galaxy Tab 10.1*, kamera *Galaxy S4 Zoom*, mikroskop cahaya, dan komputer *desktop*.

4.6.3.1 Kandang Tikus

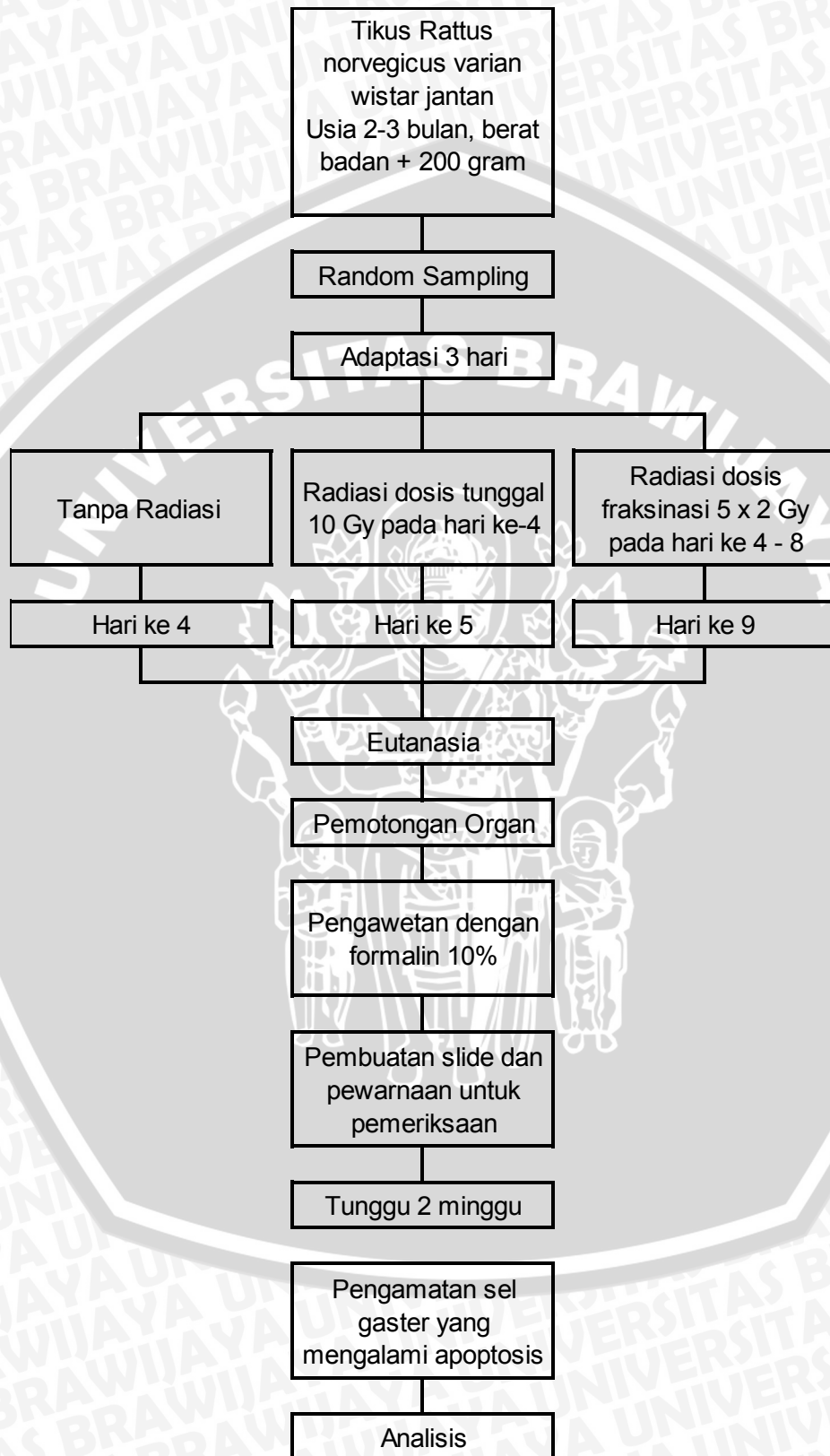
- Kandang tikus terbuat dari kotak plastik dengan ukuran 40 x 31 x 14 cm, dan ditutup dengan anyaman kawat yang bisa dilepas sehingga mudah dibersihkan.
- Alas kandangnya diberi sekam dan diganti setiap satu minggu sekali agar terjaga kebersihannya.

4.6.3.2 Alat Fiksasi saat Radiasi

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 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Data secara primer diperoleh dari hasil pemeriksaan pada sel gaster tikus *Rattus norvegicus* jantan var. Wistar. Metode perlakuan pada hewan coba, dapat dijelaskan pada skema di halaman berikut :



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

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 adalah kelompok yang 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. Kemudian, adaptasi dilakukan selama tiga hari.

Pada hari keempat dilakukan euthanasia terhadap hewan coba kelompok I yang tidak diradiasi. Radiasi sinar gamma dosis tunggal sebesar 10 Gy dilakukan pada kelompok hewan coba II pada hari ke empat. Sedangkan radiasi sinar gamma dosis fraksinasi sebesar 10 Gy masing-masing 2 Gy setiap hari dilakukan pada hewan coba pada hari ke empat sampai hari ke delapan. Jarak antara alat radioterapi Co-60 dengan tikus adalah 80 sentimeter. Lapangan penyinaran alat radioterapi Co-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.

4.8 Pengolahan Data

Analisis statistik dilakukan dengan cara *One-Way* ANOVA dengan menggunakan program SPSS 22. *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 tergantungnya adalah jumlah morfologi sel kelenjar saliva 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, diasumsikan bahwa minggu pertama mulainya kegiatan penelitian dan mengurus semua keperluan penelitian adalah minggu ke-1, maka penulis merancang jadwal kegiatan sebagai berikut:

1. Minggu ke-1 hingga minggu ke-6 penelitian : Melakukan *follow up* terhadap pernyataan kelaikan etik penelitian.
2. Minggu ke-7 penelitian : Memesan hewan coba di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.
3. 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.

4. Minggu ke-4 bulan Juni 2012 : Mengurus izin penelitian di Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang.
5. Minggu ke-9 penelitian : Adaptasi hewan coba di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
6. Minggu ke-9 hingga ke-10 penelitian : Melakukan penelitian (pemberian radiasi sinar gamma, pemotongan organ, serta pembuatan dan pewarnaan slide jaringan).
7. Minggu ke-11 hingga minggu ke-20 penelitian : Melakukan pemeriksaan slide jaringan hasil penelitian, analisis data, dan penyelesaian tugas akhir.

