

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Ruang Lingkup Penelitian

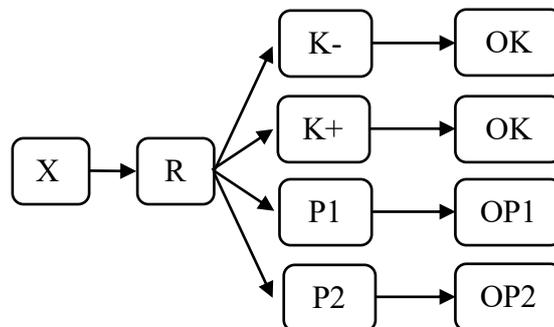
Ruang lingkup penelitian ini adalah bidang THT-KL dan Patologi Anatomi.

##### 4.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Islam Sultan Agung (Unisula) untuk perlakuan hewan coba, nekropsis dan pembuatan preparat histopatologi koklea. Pembacaan preparat dilakukan oleh 2 orang ahli Patologi Anatomi Laboratorium PA. Penelitian dilakukan pada bulan November sampai Desember 2021.

##### 4.1.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan bentuk penelitian Kuasi eksperimental (*posttest only Controlled group design*) dengan menggunakan tikus wistar sebagai subjek penelitian. Skema rancangan penelitian ditampilkan pada gambar berikut:



Gambar 12. Skema Penelitian

Keterangan :

- X : Masa aklimatisasi
- R. : Randomisasi
- KN : Kontrol negatif (Kelompok tikus yang tidak diberi apa pun)
- KP : Kontrol Positif (Kelompok tikus yang diberi 800 mg/kg bb selama 2 minggu pada hari ke 15-30)
- P1 : Perlakuan 1 (Kelompok tikus yang diberi SP 1 dosis 400 mg/kg bb selama 30 hari dilanjut penambahan 800 mg/kg bb selama 2 minggu pada hari ke 15-30)
- P2 : Perlakuan 2 (Kelompok tikus yang diberi SP dosis 1000 mg/kg bb selama 30 hari dilanjut penambahan 800 mg/kg bb selama 2 minggu pada hari ke 15-30)
- OKN : Pengamatan (observasi) pada kelompok Kontrol Negatif
- OKP : Pengamatan (observasi) pada kelompok Kontrol Positif
- OP1 : Pengamatan (observasi) pada kelompok Perlakuan 1
- OP2 : Pengamatan (observasi) pada kelompok Perlakuan 2

## **4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

### **4.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus wistar yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pendidikan Alam (FMIPA) Universitas Islam Sultan Agung.

### **4.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi, serta memiliki kriteria eksklusi dan *drop out*.

#### **4.2.2.1 Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Umur 8 minggu
2. Berat badan 150-200 gram

3. Sehat dan bergerak aktif. (Penampakan visual keadaan rambut tidak kusam, rontok)
4. Kondisi telinga tidak ada kelainan

#### **4.2.2.2 Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah penurunan berat badan drastis, lebih dari 10% setelah adaptasi. Adanya kelainan anatomi pada telinga tikus

#### **4.2.2.3 Kriteria Drop Out**

Kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah adanya tikus wistar yang mati saat penelitian dan sebelum tiba waktu pengambilan hasil. Penambahan sampel 10% kriteria *drop out* sehingga jumlah tikus masing-masing kelompok adalah 6 ekor. Total tikus wistar yang digunakan adalah 24 ekor.

#### **4.2.3 Cara Sampling**

Cara penelitian sampel adalah *random alokasi sampling* yaitu memilih sampel secara acak yang bertujuan agar semua objek populasi mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel. Tikus wistar yang masuk dalam kriteria inklusi dan sudah mengalami aklimatisasi selama 1 minggu dengan pemberian pakan standar kemudian dibagi menjadi 4 kelompok melalui randomisasi.

#### **4.2.4 Besar Sampel**

Penentuan besar sampel pada penelitian eksperimental hewan coba dilakukan berdasarkan kriteria WHO untuk perlakuan hewan adalah 5 (lima) ekor tiap kelompok, oleh karena berpegang pada kaidah prinsip '3R' (*Replacement, Reduction and Refinement*) Penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu; kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), dan kelompok perlakuan 2 (P2) yang masing-masing menggunakan 5 ekor tikus wistar, ditambah 10% kriteria *drop out* sehingga jumlah tikus masing-masing kelompok adalah 6 ekor. Total tikus wistar yang digunakan adalah 24 ekor.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas penelitian ini adalah SP

#### **4.3.2 Variabel Terikat/tergantung**

Variabel terikat penelitian ini adalah adanya perubahan histopatologi koklea

### **4.4 Definisi Operasional**

1. Pemberian SP (variabel bebas) adalah memberikan pakan SP bentuk cair dengan dosis sebesar 400 mg/kg bb dan 1000 mg/kg bb. Skala yang digunakan adalah skala nominal.

2. Perubahan histopatologi koklea (variabel terikat) adalah deskripsi perubahan histopatologi pada daerah koklea dengan perbesaran 400x. Kerusakan

dinilai dengan menghitung jumlah kelainan sel pada masing-masing slide (5 slide pada tiap tikus) dilakukan pengamatan histopatologi sel rambut, sel makrofag dan dilatasi vaskular. Skala yang digunakan adalah skala numerik.

## **4.5 Cara Pengumpulan Data**

### **4.5.1 Bahan**

1. (Merk Kanamycin MEIJI®, sedian botol Vial, pemberian injeksi subkutan)
2. SP (Merk Spirulina Gold, BPOM TR : 153 385 941 diproduksi oleh : CV. Jogja Natural Herbal)
3. Makan standar tikus wistar dan minum ad libitum
4. Bahan-bahan untuk pembuatan preparat histopatologi
  - a. Larutan *buffer* formalin
  - b. Parafin
  - c. Hematoxylin Eosin
  - d. Larutan xylol
  - e. Alkohol

#### 4.5.2 Alat

1. Kandang tikus berukuran 15 x 15 cm lengkap dengan tempat makan dan minum sebanyak 24 kandang untuk masing-masing tikus.
2. Jas laboratorium.
3. Kacamata atau *googles*.
4. Sarung tangan atau *gloves*.
5. Papan bedah.
6. Kertas pembersih (*Paper towel*) atau tissue.
7. Penggaris atau alat ukur sejenis.
8. Pipet sonde.
9. Alat untuk mengambil organ (minor set : pinset, *forsep*, gunting, *scalpel*, bisturi, jarum suntik, syringe).
10. Alat untuk membuat preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan parafin).
11. Alat untuk melihat preparat histologi koklea (*deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya)

#### 4.5.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yaitu data yang diperoleh dari penilaian perubahan histopatologi koklea tikus wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## 4.5.4 Cara Kerja

### 4.5.4.1 Perlakuan Hewan Coba

- 1 Tikus-tikus tersebut dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, setiap kelompok berjumlah 6 ekor tikus Galur Wistar dan di letakkan di kandang per kelompok.
- 2 Kelompok kontrol negatif (KN)  
Enam ekor tikus Galur Wistar pakan standar dan air minum ad libitum selama masa penelitian. Pada hari ke-31 dilakukan terminasi, kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi pada jaringan koklea tikus Galur Wistar dan diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan jaringan koklea.
- 3 Kelompok kontrol positif (KP)  
Enam ekor tikus Galur Wistar diberikan suntikan kanamisin subkutan dengan dosis 800 mg/kg bb dengan dosis terbagi 2 pada pukul 08.00 dan 20.00 selama 15 hari (hari ke 16-30), dan pakan standar dan air minum ad libitum selama masa penelitian. Pada hari ke-31 dilakukan terminasi, kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi pada jaringan koklea tikus Galur Wistar

dan diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan jaringan koklea.

- 4 Kelompok perlakuan 1 dosis spirulina 400 mg / kg bb (P1)

Enam ekor tikus Galur Wistar suntikan kanamisin subkutan dengan dosis 800 mg/kg bb dengan dosis terbagi 2 pada pukul 08.00 dan 20.00 selama 15 hari (hari ke 16-30), diberikan pakan standar dan air minum ad SP sebanyak 400 mg /kg bb selama masa penelitian dengan cara sonde peroral. Pada hari ke-31 dilakukan terminasi, kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi pada jaringan koklea dari tikus Galur Wistar dan diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan jaringan koklea.

- 5 Kelompok perlakuan 2 dosis spirulina 1000 mg / kg bb (P2)

Enam ekor tikus Galur Wistar suntikan kanamisin subkutan dengan dosis 800 mg/kg bb dengan dosis terbagi 2 pada pukul 08.00 dan 20.00 selama 15 hari (hari ke 16-30), diberikan pakan standar dan air minum ad SP sebanyak 1000 mg /kg bb selama masa penelitian dengan cara sonde peroral. Pada hari ke-31

dilakukan terminasi, kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi pada jaringan koklea dari tikus Galur Wistar dan diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan jaringan koklea.

#### **4.5.4.2 Pembuatan Preparat Histopatologi Koklea**

1. Tikus wistar diterminasi dengan metode pemberian kloroform.
2. Dilakukan proses nekropsi pada telinga hingga terangkat organ koklea.
3. Fiksasi pada organ koklea direndam di larutan *buffer* formalin 10% selama 24 jam dan dibenamkan dalam parafin yang dicairkan dan dibuat blok parafin. Fiksasi merupakan proses pengawetan protoplasma sehingga struktur jaringan tetap stabil dan tidak mengalami perubahan paska mati.
4. *Trimming* merupakan pemotongan sampel organ menjadi ukuran yang lebih kecil sehingga memudahkan tahap pembuatan preparat selanjutnya. Jaringan yang telah difiksasi selama 24 jam ditiriskan pada saringan kemudian dipotong menggunakan pisau

*scalpel* dengan ketebalan 1x1 cm disusun ke dalam *tissue cassette* dan diberi label.

5. Dehidrasi merupakan tahap pembedahan jaringan ke dalam beberapa larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat. Tujuan dari penggunaan alkohol bertingkat adalah agar tidak terjadi perubahan yang tiba-tiba pada sel jaringan. Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga dapat diisi dengan parafin atau zat lain untuk membuat blok preparat.
6. Penjernihan (*Clearing*) merupakan tahapan membuat jaringan menjadi jernih dan transparan menggunakan pelarut organik seperti *xylene* atau *toluene*. Tahap ini bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan digantikan dengan parafin.
7. Infiltrasi parafin (*Embedding*) yaitu proses perendaman jaringan dalam parafin yang dicairkan pada suhu 58-60°C selama 30 menit sampai 6 jam dalam inkubator bertujuan untuk mengeluarkan cairan pembersih (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin selain itu juga membuat jaringan tahan terhadap pemotongan.

8. Pengeblokan (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom menggunakan parafin.
9. Pemotongan (*Sectioning*) adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom. Tujuan dari pemotongan blok adalah untuk mendapatkan potongan jaringan yang tipis dengan ketebalan 3-8  $\mu\text{m}$ .
10. Evaluasi preparat setelah tahap pemotongan dilakukan untuk melihat preparat jaringan baik atau tidak sebelum dilakukan proses selanjutnya. Pembacaan preparat akan dilakukan oleh 2 ahli patologi anatomi. Preparat dilihat di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 100x dan 400x.

#### **4.5.4.3 Pengecatan Preparat Histopatologi dengan Hematoxylin Eosin**

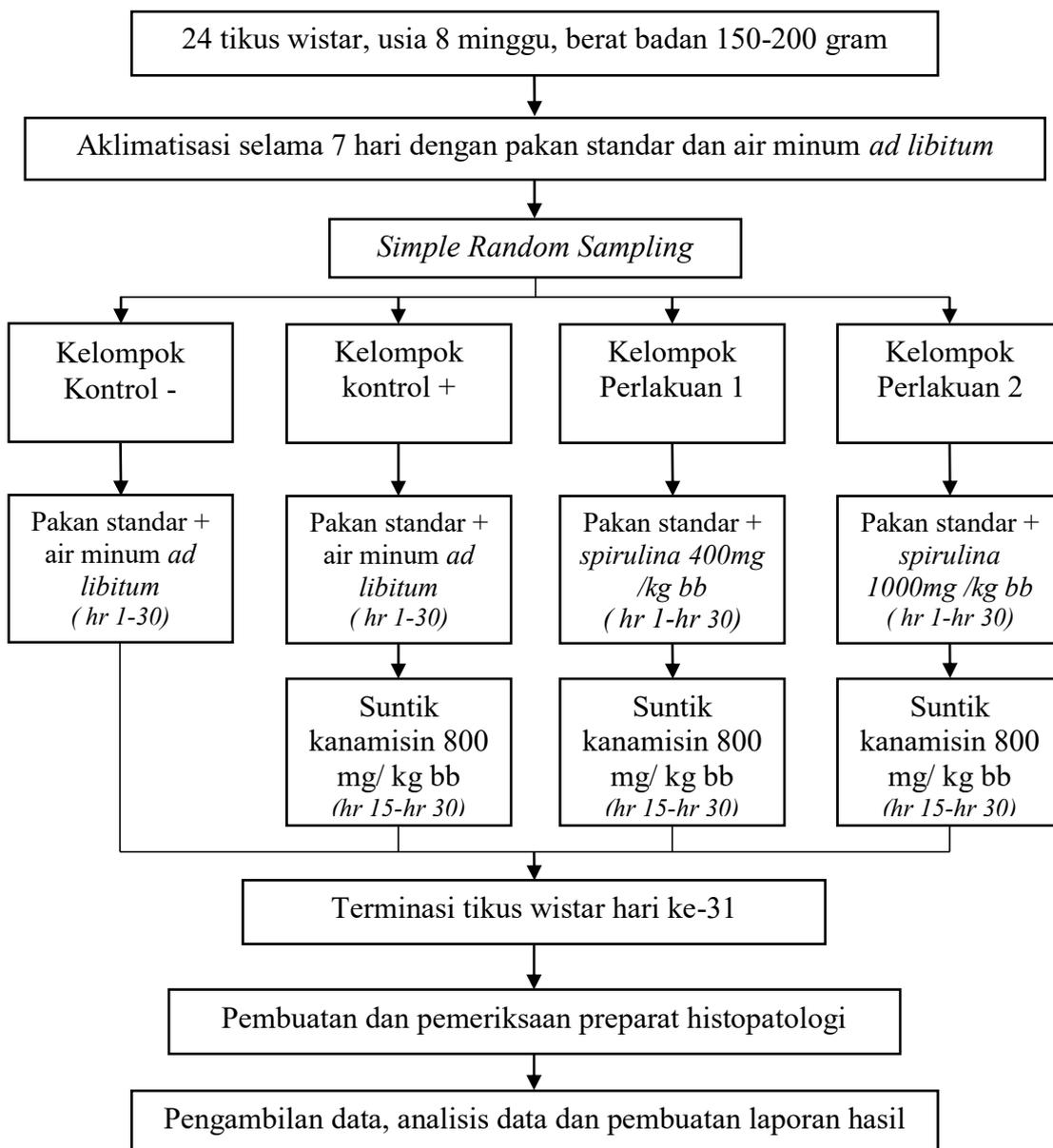
1. Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, secara berurutan masukkan slide ke dalam zat kimia. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xylol I, II, III masing-masing selama 5 menit.
2. Mengaliri dengan air mengalir 3 menit untuk menghilangkan sisa alkohol.

3. Memasukkan preparat ke dalam Hematoxylin selama 7 menit dilanjutkan masukkan preparat ke dalam larutan eosin 7 kali celup.
4. Memasukkan preparat ke dalam alkohol 70%, 80%, 95%, 100% untuk dehidrasi. Preparat diberi 1 tetes entelan dan ditutup objek glass.

#### **4.5.4.4 Pemeriksaan Preparat Histopatologi Koklea**

1. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus wistar, dan dari tiap tikus wistar dibuat 5 preparat.
2. Preparat dilihat di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 100x untuk menentukan letak koklea yang akan dilihat perubahan histopatologinya.
3. Membuat deskripsi perubahan histopatologi dengan perbesaran 400x pada setiap preparat jaringan koklea.
4. Menilai apakah ada perubahan dan derajat kerusakan pada koklea di tiap preparat histopatologi koklea kemudian dibandingkan satu sama lain secara statistik.

#### 4.6 Alur Penelitian



Gambar 13. Alur Penelitian

#### 4.7 Analisis Data

Data primer yang telah diperoleh diolah dengan program komputer Data dianalisis dengan menggunakan SPSS versi 25 *for windows* melalui proses *cleaning, editing, coding* dan *entrying*. Pada pengamatan histopatologi, data ordinal dilakukan uji kesesuaian kappa antar 2 pengamat setelah skor histopatologi diinterpretasikan. Data yang diamati dalam hal kesesuaian 3 parameter perubahan histopatologi koklea meliputi: jumlah sel rambut, jumlah sel makrofag dan dilatasi vaskular.

Kemudian, data skor histopatologi dianalisis dengan menggunakan uji hipotesis komparatif. Data dilakukan pengecekan uji normalitas. Apabila data berdistribusi normal, data dilakukan uji homogenitas dan dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way Anova* dengan post-hoc LSD. Namun, apabila data tidak berdistribusi normal, uji hipotesis yang dilakukan dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* dengan post-hoc *Mann-Whitney*. Nilai  $p < 0.05$  dianggap signifikan.

#### 4.8 Etika Penelitian

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan No 98/EC/H/KK-UNDIP/VIII/2021