

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental, desain *Post-test control group desain*. Postes untuk menganalisis perubahan gambaran histopatologi pada organ ginjal.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini adalah anak *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang diperoleh dari induk hamil yang sehat pada usia kehamilan 7 hari dan 11 hari yang telah diinduksi hipoksia iskemik dengan cara di ligasi arteri uterina unilateral. Ditentukan pula anak *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang diperoleh dari induk hamil yang sehat tanpa induksi hipoksia iskemik. Hewan uji dipelihara dan diberi makan minum *ad libitum*.

Setelah induk *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* hamil tersebut melahirkan, anak-anaknya ditimbang. Hanya anak yang berat badan lahir <5,50 gram yang dipilih sebagai subjek penelitian. Anak-anak tikus tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok 7 ekor. Anak-anak tikus yang lahir dikelompokkan berdasarkan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : Hewan uji yang dijadikan sebagai kelompok kontrol, tidak diinduksi hipoksia iskemik.

2. Kelompok 2 : Hewan uji dijadikan subyek penelitian, dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 7 hari.
3. Kelompok 3 : Hewan uji dijadikan subyek penelitian, dari induk yang diberikan induksi hipoksia iskemik pada usia kehamilan 11 hari.

Besar sampel ditentukan berdasarkan rumus WHO (1993) jumlah sampel setiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor tiap kelompok.

Kriteria Inklusi:

1. *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* jantan
2. Usia tikus 35 hari
3. Berat badan lahir <5,50 gram

Kriteria Eksklusi:

1. Tikus dalam keadaan sakit
2. Tikus mati sebelum pemeriksaan dilakukan

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY untuk pemeliharaan. Pemberian perlakuan induk, dan pembedahan dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Pembuatan preparat ginjal tikus dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM. Pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY oleh peneliti. Peneliti mengetahui preparat pada setiap kelompok. Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan.

D. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini antara lain:

1. Variabel bebas yaitu kelompok induk tikus berdasarkan pemberian perlakuan, yaitu induksi hipoksia iskemik pada usia 7 dan 11 hari.
2. Variabel tergantung adalah gambaran histopatologi ginjal *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* hipoksia iskemik prenatal.

E. Definisi Operasional

1. Tikus Putih Hipoksia Iskemik Prenatal

Induk tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* yang hamil diinduksi hipoksia iskemik prenatal dengan cara diligasi arteri uterina unilateral pada usia kehamilan 7 hari dan 11 hari, sehingga anaknya akan memiliki pengaruh dari induksi hipoksia. Anak yang lahir selanjutnya dipilih yang mempunyai jenis kelamin jantan dan berat badan lahir <5,50 gram. Setelah anak tikus berusia 35 hari kemudian anak tikus dimatikan dan diambil organnya untuk diamati.

2. Gambaran Histopatologi Ginjal

Preparat histopatologi ginjal dibuat dari bagian ginjal tikus putih yang sebelumnya sudah dieutanasia. Sampel diambil dengan alat-alat bedah standar dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung kecil berisi formalin. Sampel ginjal diawetkan dengan formalin sebelum dibuat menjadi preparat. Saat akan dijadikan preparat, sampel dipotong secara melintang.

Gambaran histopatologi ginjal *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* didapatkan dengan menghitung presentase sel abnormal pada ginjal tikus yang telah dicat *haematoxylin-eosin* (HE), kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dalam ± 5 lapangan pandang sejumlah 100 sel. Perubahan pada tubulus berupa degenerasi hidropis, apoptosis dan adanya endapan protein di lumen. Penilaian presentasi sel ginjal abnormal (%) menggunakan kriteria berikut ini (Wibowo, 2012):

- 1 = lesi $< 25\%$ total lapangan pandang
- 2 = lesi $25 - < 50\%$ total lapangan pandang
- 3 = lesi $50 - < 75\%$ total lapangan pandang
- 4 = lesi $\geq 75\%$ total lapangan pandang

F. Alat dan Bahan Penelitian

Rattus norvegicus galur *Sprague-dawley*, makan minum *ad libitum*, botol minum khusus untuk tikus, kandang tikus, sekam, peralatan bedah tikus, benang chromic, obat bius (ketamin dan kloroform), *povidone iodine*, tabung bius, alat timbang berat, alkohol, kapas, gelas preparat, mikroskop dan kamera, alat hitung, komputer alat hitung, pot untuk organ, formalin.

G. Jalannya penelitian

Tahapan penelitian yang dirancang untuk pengumpulan data adalah sebagai berikut :

1. Induk tikus yang hamil dikelompokkan secara acak.
2. Induk tikus hamil diinduksi hipoksia iskemik dengan dilakukan ligasi arteri uterina unilateral pada usia kehamilan 7 dan 11 hari sesuai masing-masing kelompok.
3. Induk tikus diberikan anestesi ketamin sebelum dilakukan pembedahan untuk dilakukan induksi hipoksia iskemik (ligasi arteri uterina unilateral)
4. Setelah anak-anak tikus lahir, kemudian dipelihara sampai pada usia 35 hari.
5. Selanjutnya anak-anak tikus dianestesi dengan kloroform untuk dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, seperti otak, jantung, paru, hati, ginjal
6. Setelah tikus dianestesi dan dimatikan, kemudian organ yang diambil dimasukkan kedalam pot berisi formalin,
7. Organ ginjal yang akan diteliti dibawa ke bagian Patologi Anatomi FK UGM untuk dibuat preparat dengan pengecatan HE (*Hematoxylin Eosin*).
8. Preparat diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali dalam ± 5 lapangan pandang sejumlah 100 sel.

H. Analisis Data

Data hasil skoring perubahan histopatologi *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* merupakan data dengan skala pengukuran ordinal, sehingga dapat langsung dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis* untuk menguji hipotesis perbedaan pada semua kelompok perlakuan. Kemudian, untuk mengetahui perbandingan pengaruh setiap kelompok terhadap kelompok

yang lain, digunakan uji *Mann-Whitney*. Data analisa didapatkan dari pengamatan gambaran histopatologi ginjal pada tikus hewan uji.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* galur *Sprague-dawley* jantan umur 35 hari dengan Berat badan lahir <5,50 gram yang tidak lepas dari perlindungan hak mencit sebagai makhluk hidup dan sudah mendapatkan surat keterangan kelayakan etik penelitian nomor 469/EP-FKIK-UMY/XI/2015. Selama penelitian, hewan uji dirawat dan diperlakukan sesuai etika penelitian. Saat akhir penelitian diperlukan pengambilan ginjal hewan uji, maka hewan uji dibunuh setelah dilakukan anastesi dengan kloroform.