

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, yaitu untuk mempelajari suatu fenomena dalam korelasi sebab–akibat, dengan cara memberikan suatu perlakuan pada subjek penelitian kemudian melihat dan mempelajari efek dari perlakuan tersebut (Notoatmodjo, 2012). Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test–only control group design*. Sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–10 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mengetahui gambaran mikroskopis dari organ esofagus tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang telah diberikan herbisida *paraquat* diklorida per–oral. Waktu penelitian adalah selama bulan oktober–november 2014.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–10 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Institut Pertanian Bogor (IPB). Sampel penelitian sebanyak 25 ekor tikus putih jantan yang dipilih secara acak yang dibagi menjadi 5 kelompok (4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol) sehingga 1 kelompok perlakuannya terdiri dari 5 ekor tikus. Penentuan besar sampel menurut rumus Frederer, yakni dengan jumlah sampel minimal 5 mencit untuk setiap kelompoknya.

Menurut Frederer (1967), rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ($n \geq 4,75$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* dari populasi yang ada.

Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih galur *Sprague dawley*
- b. Berjenis kelamin jantan
- c. Berat badan sekitar 100–150 gram
- d. Berusia sekitar kurang lebih 8–10 minggu (dewasa)
- e. Tingkah laku dan aktivitas normal
- f. Tidak ada kelainan anatomi yang tampak
- g. Tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif

Kriteria Ekslusi

- a. Penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus dan genital
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- c. Mati selama masa adaptasi tikus.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

- a. Hewan percobaan
- b. Makanan hewan percobaan berupa pelet

- c. Herbisida *paraquat* diklorida dengan merk *Gramoxone* yang akan diberikan ke hewan coba dengan cara per-oral dengan dosis yang berbeda disetiap kelompok perlakuanya.

2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin meliputi larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, *xylol*, pewarna hematoksilin dan Eosin, dan entelan.

3. Alat Penelitian

a. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toleda* dengan tingkat ketelitian 0,01 gram, untuk menimbang berat tikus
- 2) Sonde lambung
- 3) Minor Set, membedah tikus untuk mengidentifikasi esofagus
- 4) Kapas dan alkohol

b. Alat Pembuat Preparat Histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan yaitu *object glass*, *tissue cassette*, *deck glass*, *water bath*, *platening table*, *rotarymicrotome*, *autochnicom procesor*, *staining jar*, *staining rak*, kertas saring, histoplast dan parafin dispenser.

c. Alat pemeriksaan mikroskopis

Adapun alat yang digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis adalah Mikroskop, objek glass, cairan emersi, dan sebuah kamera digital yang berfungsi untuk mendokumentasikan gambaran yang didapatkan.

d. Kandang Hewan

Kandang hewan yang digunakan dalam percobaan berupa kandang dengan ukuran 15m^3 . Kandang terbuat dari *box* plastik, bagian dasarnya diberi kertas buram untuk mempermudah dalam membersihkan feses, dan ditutupi dengan bedding kawat. Setiap satu kali seminggu kandang dibersihkan. Tempat makan terbuat dari plastik dan diletakkan di dalam kandang. Tempat minum terbuat dari botol kaca yang digantung dengan ujungnya terbuat dari pipet yang ditancapkan pada tutup karet yang ujungnya dilubangi.

E. Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Percobaan

Tikus yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor langsung dimasukkan ke dalam kandang yang telah disiapkan dan diadaptasikan selama tujuh hari . Kandang mencit dibersihkan seminggu sekali dengan memberikan desinfektan pada lantainya. Setiap hari makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* (tak terbatas).

2. Prosedur pemaparan herbisida *paraquat diklorida*

- a. Hewan percobaan kelompok 1 (kelompok kontrol), diberi makan dan minum air putih, dan tidak dipaparkan dengan herbisida *paraquat diklorida* (kandang bebas herbisida *paraquat diklorida*).
- b. Hewan percobaan kelompok 2, diberi makan dan minum air putih, lalu dilakukan pemberian herbisida *paraquat diklorida* satu kali per hari secara per-oral dengan dosis 25 mg/kgBB selama 2 hari.
- c. Hewan percobaan kelompok 3, diberi makan dan minum air putih, lalu dilakukan pemberian herbisida *paraquat diklorida* satu kali per hari secara per-oral dengan dosis 50 mg/kg BB selama 2 hari.
- d. Hewan percobaan kelompok 4, diberi makan dan minum air putih, lalu dilakukan pemberian herbisida *paraquat diklorida* satu kali per hari secara per-oral dengan dosis 100 mg/kg BB selama 2 hari.
- e. Hewan percobaan kelompok 4, diberi makan dan minum air putih, lalu dilakukan pemberian herbisida *paraquat diklorida* satu kali per hari secara per-oral dengan dosis 200 mg/kg BB selama 2 hari.
- f. Setelah pemajanan selama 2 hari selesai, dilakukan euthenasia dengan menggunakan kloroform serta didekapitasi dan organ esofagus diambil untuk dibuat sediaan histologi dengan pewarnaan HE.

3. Pengambilan sampel organ

Pada hari ke 9 semua tikus yang masih hidup dibunuh dengan dekapitasi. Kemudian dilakukan nekropsi untuk pemeriksaan histopatologi dan

pengambilan sampel organ esofagus. Pembuatan preparat untuk diamati pada mikroskop cahaya dengan pewarnaan hematoxilin eosin.

Proses pembuatan sediaan histologi :

a. Fiksasi

Larutan fiksasi yang dipakai adalah fosfat buffer formalin, formulanya sebagai berikut :

Formalin	10cc
<i>Acid sodium phosphatemonohydrate</i>	0,4gr
<i>Anhydrous disodium phosphate</i>	0,65gr
Aquades	100cc

b. Dehidrasi

Dehidrasi memakai alkohol dengan yang makin pekat mulai dari alkohol 70%, 95%, hingga alkohol absolut.

1. Alkohol 75% selama 30 menit
2. Alkohol 95% selama 30 menit
3. Alkohol 100% selama 30 menit, diganti hingga 4x

c. Pembeningan

Memakai *xylol I* dan *xylol II* masing-masing selama 30 menit.

d. Impregnasi/embedding

Pembenaman dilakukan dengan paraffin cair selama 1 jam.

e. Pengecoran (pembuatan *paraffin block*).

f. Pengisian jaringan setebal 4–5 mikron.

g. Pewarnaan

Pewarnaan yang dipakai dengan menggunakan hematoksilin eosin.

Cara memulas dengan HE :

1. Masukkan preparat ke dalam *xylol* 3–5 menit.
2. Pindahkan ke *xylol II* selama 3–5 menit.
3. Masukkan berturut–turut ke dalam alkohol 100%, 95%, dan 70% masing–masing selama 3 menit.
4. Celupkan ke *aquades* sebanyak 4 celup.
5. Masukkan ke hematoksilin 5–10 menit.
6. Air mengalir 5 menit.
7. Masukkan ke HCl 1% sebanyak 3 celup (untuk diferensiasi).
8. Dibilas dengan air
9. Masukkan ke eosin 1% selama 1 menit
10. Pindahkan berturut–turut ke alkohol 70%,95%, 100% masing-masing 3 celup.
11. Masukkan ke *xylol I* dan *xylol II* berturut-turut.
12. Tutup dengan kaca penutup setelah ditetesi dengan minyak emersi terlebih dahulu.

4. Evaluasi Histopatologi

Evaluasi histopatologi dilakukan terhadap organ esofagus dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x10. Gambaran histopatologis esofagus yang dimaksud adalah menilai kerusakan mukosa esofagus secara mikroskopik dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400 kali dengan melihat seluruh lapangan pandang.

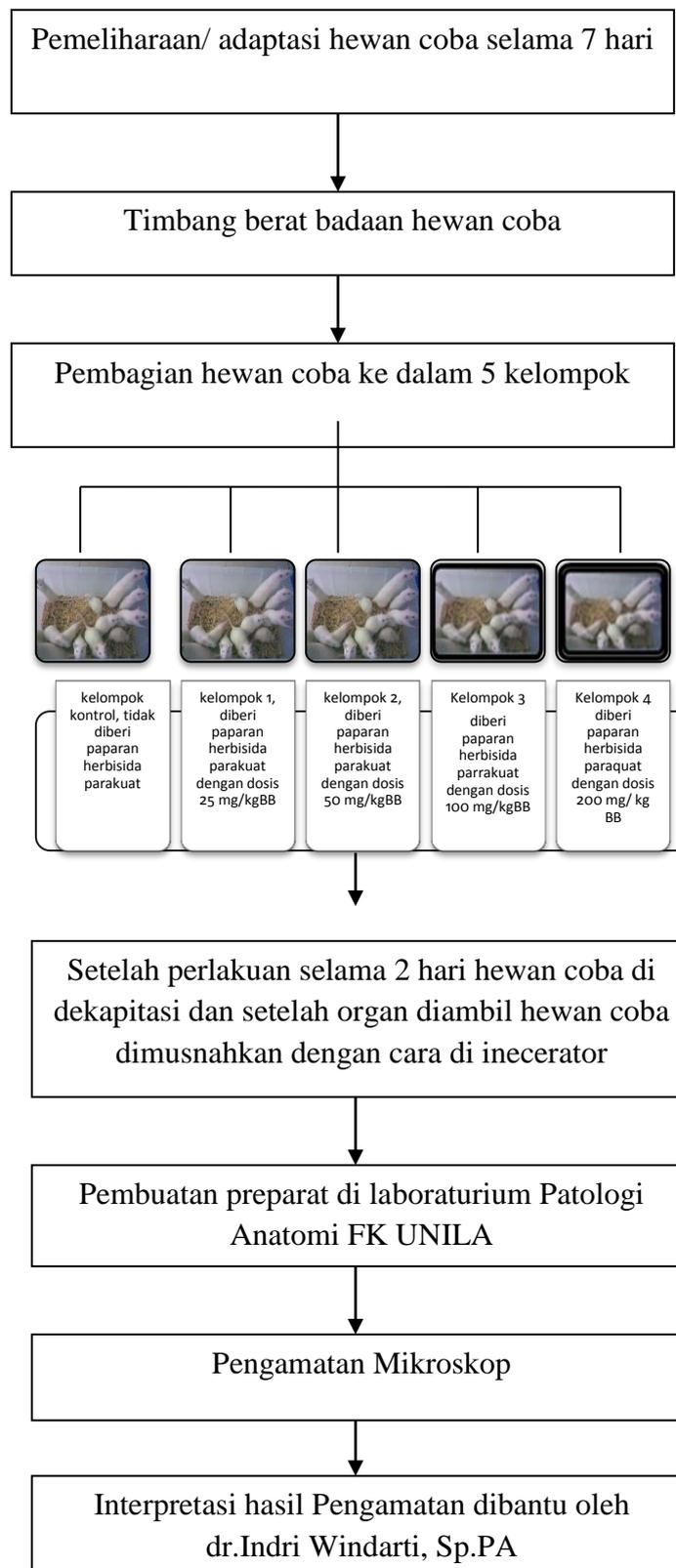
Kriteria tingkat kerusakan esofagus dihitung sebagai berikut:

1= Normal

2= Deskuamasi epitel

3= Erosi permukaan sel

4= Ulserasi



Gambar 9. Diagram alir penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian herbisida *paraquat* diklorida per-oral.

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah perubahan gambaran histopatologi esofagus hewan coba.

2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional seperti yang tertera pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Defnisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Skala
Dosis herbisida <i>paraquat</i> diklorida	Dosis Herbisida Per-oral Perlakuan 1: Kontrol Perlakuan 2: 25 mg/ kgBB Perlakuan 3: 50 mg/ kg BB Perlakuan 4: 100 mg / kgBB Perlakuan 5: 200 mg/ kg BB	Kategorik
Gambaran Histopatologi esofagus	Gambaran histopatologis esofagus yang dimaksud adalah menilai kerusakan mukosa esofagus secara mikroskopik dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400 kali dengan seluruh lapangan pandang dengan menilai derajat kerusakan yang paling tinggi. Penilaian kerusakan mukosa esofagus dengan sistem skor berdasarkan skoring Barthel Manja sebagai berikut: 1. Normal berarti tidak terdapat perubahan patologi. 2. Deskuamasi epitel berupa kerusakan ringan epitel tanda adanya celah. 3. Erosi permukaan epitel berupa celah pada satu sampai sepuluh epitel per lesi. 4. Ulserasi ditandai dengan adanya celah lebih dari sepuluh epitel per lesi, pada stadium ini biasanya terdapat jaringan granulasi dibawah epitel.	Numerik

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi dianalisis menggunakan program SPSS versi 20.0. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian, dilakukan uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang

sama atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Hipotesis dianggap bermakna bilap $<0,05$. Jika pada uji ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p<0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan (Dahlan, 2008).

H. Ethical Clearance

Penelitian yang akan dilakukan ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*.

Replacement adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan yang sudah dipertimbangkan dan diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun dari literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

Reduction adalah penggunaan hewan coba dalam penelitian dengan jumlah seminimal mungkin tetapi tetap mendapatkan hasil penelitian yang optimal. Dalam penelitian ini, sampel dihitung dengan menggunakan rumus Frederer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

Dan prinsip yang ketiga adalah *refinement* yang merupakan suatu tindakan memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.

1. Bebas dari rasa lapar dan haus, karena pada penelitian ini hewan coba akan diberikan makanan (pakan) standar dan minum secara tidak terbatas.
2. Bebas dari ketidaknyamanan, karena pada penelitian hewan coba ditempatkan di kandang dengan suhu terjaga 20^0-25^0C , berada jauh dari gangguan kebisingan, dan kebersihan kandang yang selalu terjaga sehingga mengurangi stress pada hewan coba.
3. Bebas nyeri dan penyakit .

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian ini telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan anastesi serta eutanasia dengan metode yang manusiawi oleh orang yang telah terlatih (Ridwan, 2013)