

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu untuk mempelajari suatu fenomena dalam korelasi sebab-akibat, dengan cara memberikan perlakuan pada subjek penelitian kemudian mempelajari efek 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 norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–10 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

### **3.2 Tempat dan Waktu**

Perlakuan hewan coba pada penelitian ini akan dilaksanakan selama bulan Oktober 2014 di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan pembuatan serta pengamatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### 3.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–10 minggu yang diperoleh dari laboratorium Unit Kandang Hewan Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor tikus putih jantan yang dipilih secara acak yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus Frederer.

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

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

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 jantan 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
- 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 Eksklusi

- a. Terdapat 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 pemberian perlakuan.

### **3.4 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.4.1 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan ada 1 yakni herbisida paraquat diklorida dengan dosis yang diberikan secara berbeda disetiap kelompoknya, yakni pada kelompok 2 dengan dosis 25 mg/kgBB, pada kelompok 3 dengan dosis 50 mg/kgBB, pada kelompok 4 dengan

dosis 100 mg/kgBB dan pada kelompok 5 dengan dosis 200 mg/kgBB.

### **3.4.2 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, xilol, pewarna Hematoksilin dan Eosin, dan Entelan.

### **3.4.3 Perangkat Penelitian**

#### **3.4.3.1 Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01g, untuk menimbang berat tikus, spuit oral 1cc, 3cc dan 5cc, sonde lambung, minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi), kandang tikus, mikroskop cahaya, gelas ukur dan pengaduk, serta kamera digital.

#### **3.4.3.2 Alat Pembuat Preparat Histopatologi**

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

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Prosedur Pemberian Dosis Herbisida Paraquat Diklorida**

Dosis herbisida paraquat diklorida yang digunakan pada eksperimen ini adalah 25 mg/kgBB untuk kelompok 2, 50 mg/kgBB untuk kelompok 3, 100 mg/kgBB untuk kelompok 4, dan 200 mg/kgBB untuk kelompok 5. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif sehingga tidak diberikan herbisida paraquat diklorida per-oral. Herbisida paraquat diklorida yang digunakan pada penelitian ini adalah herbisida dalam bentuk cair. Dosis herbisida cair yang digunakan adalah 276 SL atau sama dengan 276 mg/ml yang akan dilarutkan dengan air sesuai dengan dosis masing-masing kelompok sehingga mendapatkan jumlah sebanyak 1 ml. Berat rata-rata tikus putih jantan yang digunakan sebagai hewan coba pada eksperimen ini adalah 100 gram atau 0,1 kg sehingga didapatkan dosis herbisida paraquat diklorida untuk masing-masing tikus perkelompok adalah:

## 1) Dosis untuk tiap tikus kelompok 2

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (100 g)} &= 25 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} \\ &= 2,5 \text{ mg/100gBB} \end{aligned}$$

Dosis herbisida dalam bentuk cairan

$$\frac{276 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{2,5 \text{ mg/100gBB}}{x}$$

$$x = \frac{2,5 \text{ mg/100gBB}}{276 \text{ mg}}$$

$$x = 0,009 \text{ ml dibulatkan menjadi } 0,01 \text{ ml}$$

Dosis herbisida paraquat diklorida yang diberikan per-oral adalah

$$0,01 \text{ ml herbisida paraquat diklorida} + 0,99 \text{ ml air} = 1 \text{ ml}$$

## 2) Dosis untuk tiap tikus kelompok 3

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (100 g)} &= 50 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} \\ &= 5 \text{ mg/100gBB} \end{aligned}$$

Dosis herbisida dalam bentuk cairan

$$\frac{276 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{5 \text{ mg/100gBB}}{x}$$

$$x = \frac{5 \text{ mg/100gBB}}{276 \text{ mg}}$$

$$x = 0,0018 \text{ ml dibulatkan menjadi } 0,02 \text{ ml}$$

Dosis herbisida paraquat diklorida yang diberikan per-oral adalah

$$0,02 \text{ ml herbisida paraquat diklorida} + 0,98 \text{ ml air} = 1 \text{ ml}$$

## 3) Dosis untuk tiap tikus kelompok 4

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (100 g)} &= 100 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} \\ &= 10 \text{ mg/100gBB} \end{aligned}$$

Dosis herbisida dalam bentuk cairan

$$\frac{276 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg/100gBB}}{x}$$

$$x = \frac{10 \text{ mg/100gBB}}{276 \text{ mg}}$$

$$x = 0,036 \text{ ml dibulatkan menjadi } 0,04 \text{ ml}$$

Dosis herbisida paraquat diklorida yang diberikan per-oral adalah

$$0,04 \text{ ml herbisida paraquat diklorida} + 0,96 \text{ ml air} = 1 \text{ ml}$$

## 4) Dosis untuk tiap tikus kelompok 5

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (200 g)} &= 200 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} \\ &= 20 \text{ mg/100gBB} \end{aligned}$$

Dosis herbisida dalam bentuk cairan

$$\frac{276 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{20 \text{ mg/100gBB}}{x}$$

$$x = \frac{20 \text{ mg/100gBB}}{276 \text{ mg}}$$

$$x = 0,072 \text{ ml dibulatkan menjadi } 0,07 \text{ ml}$$

Dosis herbisida paraquat diklorida yang diberikan per-oral adalah

$$0,07 \text{ ml herbisida paraquat diklorida} + 0,93 \text{ ml air} = 1 \text{ ml}$$

Jadi, dosis toksik minimal herbisida paraquat diklorida yang diberikan per-oral pada penelitian ini adalah 0,01 ml.

### 3.5.2 Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok 1 (K1) sebagai kontrol negatif, hanya diberi aquadest. Kelompok 2 (K2) sebagai kontrol patologis, diberikan herbisida paraquat diklorida dengan dosis 2,5 mg/100gBB, kemudian untuk kelompok 3 (K3), diberi herbisida paraquat diklorida dengan dosis 5 mg/100gBB, untuk kelompok 4 (K4) diberi dosis 10 mg/100gBB dan kelompok 5 (K5) diberi dosis 20 mg/100gBB. Pemberian herbisida paraquat diklorida diberikan secara per-oral selama 2 hari.
- b. Selanjutnya tikus dilakukan anestesi kemudian didekapitasi dan dilakukan pembedahan.
- c. Dilakukan laparotomi untuk mengambil organ ginjal, setelah itu bangkai tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran ditempat khusus.
- d. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode *paraffin* dan pewarnaan *Hematoksin Eosin*.
- e. Sampel ginjal difiksasi dengan formalin 10%.
- f. Teknik pembuatan preparat :
  - 1) *Fixation*
    - a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ ginjal yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.

b) Mencuci dengan air mengalir.

2) *Trimming*

a) Mengecilkan organ  $\pm 3$  mm.

b) Memasukkan potongan organ ginjal tersebut ke dalam *embedding cassette*.

3) Dehidrasi

a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.

b) Berturut-turut melakukan perendaman organ ginjal dalam alkohol bertingkat 70%, 96%, alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 1 jam.

c) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing-masing selama 30 menit.

4) *Impregnasi*

*Impregnasi* dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu  $65,1^{\circ}\text{C}$ .

5) *Embedding*

a) Menuangkan paraffin cair dalam pan.

b) Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan.

c) Melepaskan *paraffin* yang berisi potongan ginjal dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu  $4-6^{\circ}\text{C}$  beberapa saat.

- d) Memotong *paraffin* sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel/pisau hangat.
- e) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- f) Memblok *paraffin* siap dipotong dengan mikrotom.

#### 6) *Cutting*

- a) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- b) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron.
- c) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- d) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- e) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.
- f) Mengeringkan *slide*. Jika sudah kering, *slide* dipanaskan untuk merekatkan jaringan dan sisa *paraffin* mencair sebelum pewarnaan.
- g) *Staining* (pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut: Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan Alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ di masukkan dalam zat warna *Harris Hematoxylin* selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ dalam Eosin selama 2 menit. Secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

#### 7) *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan *slide* di atas kertas tisu pada tempat datar, meneteskan dengan bahan *mounting* yaitu kanada balsam dan tutup dengan *cover glass* cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

#### 8) Pemeriksaan mikroskopis ginjal

*Slide* diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x dan 40x. Pengamatan dilakukan oleh peneliti dan pembimbing ahli. Gambaran kerusakan ginjal yang dilihat adalah

bagian glomerulus dan tubulus ginjal. Skala kerusakan sel dihitung secara semikuantitatif dalam seluruh lapang pandang.

a. Kerusakan glomerulus, dengan skor sebagai berikut:

0 = gambaran normal

1 = infiltrasi sel radang

2 = edema *spatium* Bowman

3 = nekrosis

b. Kerusakan tubulus ginjal, dengan skor sebagai berikut:

0 = gambaran normal

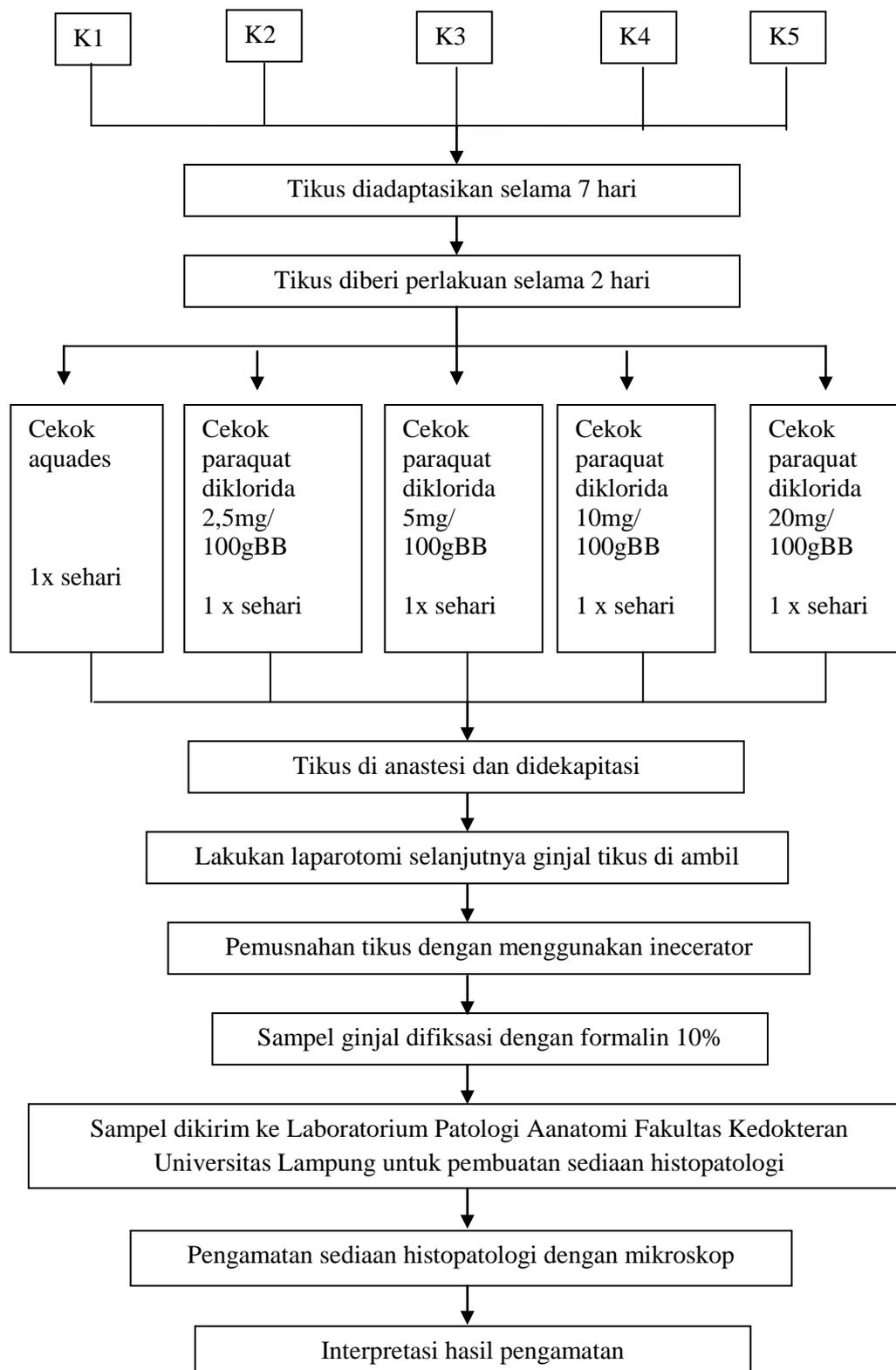
1 = infiltrasi sel radang

2 = pembengkakan sel epitel tubulus

3 = nekrosis

c. Kriteria Penilaian Derajat Kerusakan Ginjal

Penilaian derajat kerusakan ginjal diambil dari kerusakan tertinggi kemudian dihitung dari skor kerusakan glomerulus dan skor kerusakan tubulus ginjal dengan total skor kerusakan yaitu 0–6.



**Gambar 6.** Diagram Alur Penelitian

### **3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.6.1 Identifikasi Variabel**

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan herbisida golongan paraquat diklorida.

b. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah:

- 1) Gambaran histopatologi glomerulus ginjal hewan coba.
- 2) Gambaran histopatologi tubulus ginjal hewan coba.

### 3.6.2 Definisi Operasional

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut.

**Tabel 1.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis herbisida paraquat diklorida	Dosis letal paraquat adalah 20mg/100gBB. Kelompok 2 (perlakuan coba)=pemberian paraquat 2,5 mg/100gBB Kelompok 3 (perlakuan coba)=pemberian paraquat 5 mg/100gBB Kelompok 4 (perlakuan coba)=pemberian paraquat 10 mg/100gBB Kelompok 5 (perlakuan coba)=pemberian paraquat 20 mg/100gBB	Kategorik
Gambaran histopatologi ginjal bagian glomerulus dan tubulus	Gambaran kerusakan glomerulus ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dengan bagian perbesaran 10x dan 40x pada seluruh lapang pandang berdasarkan kriteria yang telah disebutkan, kerusakan glomerulus ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang, edema <i>spatium</i> Bowman dan nekrosis. Kerusakan tubulus ginjal ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang, pembengkakan sel epitel tubulus dan nekrosis tubulus.	Numerik

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan *software* statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel  $\leq 50$ . 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 bila  $p < 0,050$ . Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai  $p < 0,050$ , maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

### 3.8 Ethical Clearance

Penelitian ini telah lolos kaji etik oleh 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 sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

Selanjutnya *reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok percobaan dan  $n$  merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Prinsip yang ketiga adalah *refinement*. *Refinemenet* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi yaitu bebas dari rasa lapar dan haus, bebas dari ketidaknyamanan dan bebas dari nyeri serta penyakit dengan menjalankan program kesehatan.