

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang 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 digunakan sebagai subjek penelitian.

B. Tempat dan Waktu

Pemeliharaan dan pemberian perlakuan terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* pada penelitian ini dilakukan di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembedahan tikus dilaksanakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Bandar Lampung. Pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan 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 Unit Pengelola Hewan Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Menurut Federer (1967), rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

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

Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi:

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

$$5t - t - 5 + 1 \geq 15$$

$$4t - 4 \geq 15$$

$$4t \geq 19$$

$$t \geq 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan minimal sebanyak 5 ekor ($n \geq 4,75$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih dari populasi.

Adapun kelima kelompok tikus ini terdiri dari:

1. Kelompok 1 merupakan kelompok tikus putih yang tidak diberi herbisida paraquat diklorida per-oral. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok kontrol.
2. Kelompok 2 merupakan kelompok tikus putih yang diberi herbisida paraquat diklorida per-oral dengan dosis 25 mg/kgBB selama 2 hari.
3. Kelompok 3 merupakan kelompok tikus putih yang diberi herbisida paraquat diklorida per-oral dengan dosis 50 mg/kgBB selama 2 hari.
4. Kelompok 4 merupakan kelompok tikus putih yang diberi herbisida paraquat diklorida per-oral dengan dosis 100 mg/kgBB selama 2 hari.
5. Kelompok 5 merupakan kelompok tikus putih yang diberi herbisida paraquat diklorida per-oral dengan dosis 200 mg/kgBB selama 2 hari.

Adapun tikus yang digunakan pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Tikus putih galur *Sprague dawley*
2. Berjenis kelamin jantan
3. Berat badan sekitar 100 □ 150 gram
4. Berusia kurang lebih 8–10 minggu
5. Terdapat penampakan keadaan rambut tidak kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif
6. Tingkah laku dan aktivitas normal
7. Tidak ada kelainan anatomi yang tampak

Kriteria eksklusi pada penelitian ini antara lain:

1. Terdapat penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus dan genital
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium
3. Mati selama masa pemberian perlakuan

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan meliputi herbisida paraquat diklorida dengan dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB, tikus putih jantan, pakan dan minum tikus.

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

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Neraca analitik *Metler Toleda* dengan tingkat ketelitian 0,01 gram, untuk menimbang berat tikus
2. Sonde oral
3. Minor Set, membedah tikus untuk mengidentifikasi hati
4. Kapas dan alkohol
5. Kandang tikus dan botol minum tikus
6. Alat Pembuatan Preparat Histopatologi meliputi *object glass, deck glass, tissue cassette, rotarymicrotome, oven, water bath, latening table, autotechnicom processor, staining jar, staining rak*, kertas saring, histoplast, dan *paraffin* dispenser
7. Alat pemeriksaan mikroskopis yang terdiri dari mikroskop, gelas objek, dan cairan emersi
8. Kamera digital

E. Prosedur Penelitian

1. Perawatan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–10 minggu yang diperoleh dari Unit Pengelola Hewan Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor dimasukkan ke dalam kandang yang telah disiapkan dan diadaptasikan selama tujuh hari. Kandang tikus terbuat dari kotak plastik, bagian dasarnya diberi sekam

dan pasir hidrolit, dan ditutupi dengan *bedding* kawat. Kandang tikus dibersihkan seminggu sekali dengan memberikan desinfektan pada lantainya. Setiap hari makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

2. Prosedur Pemberian Dosis Herbisida Paraquat diklorida

Dosis herbisida paraquat diklorida yang digunakan pada penelitian 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 sehingga tidak diberikan herbisida paraquat diklorida per-oral. Berat rata-rata tikus putih jantan yang digunakan sebagai hewan coba pada penelitian ini adalah 100 gram atau 0,1 kg. Berdasarkan berat rata-rata tikus putih jantan tersebut akan dihitung dosis herbisida paraquat diklorida yang akan diberikan per-oral pada tikus putih jantan dalam satuan mg/100gBB.

Herbisida paraquat diklorida yang digunakan pada penelitian ini adalah herbisida dalam bentuk cair, sehingga dosis dalam satuan mg/100gBB akan dikonversikan dalam satuan mililiter (ml) berdasarkan dosis herbisida paraquat diklorida yang terdapat pada label kemasan yaitu 276 SL atau sama dengan 276 mg/ml. Hasil perhitungan dosis dalam satuan ml akan dilarutkan dengan air sesuai dengan dosis masing-masing kelompok sehingga mendapatkan jumlah sebanyak 1 ml cairan yang mengandung herbisida paraquat.

Perhitungan dosis herbisida paraquat diklorida yang akan diberikan per-oral untuk masing-masing tikus pada setiap kelompok adalah sebagai berikut.

1) Dosis untuk setiap 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 setiap 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 setiap 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 setiap 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

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

Pemberian herbisida paraquat diklorida dengan dosis yang berbeda untuk masing-masing kelompok tersebut dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan sonde oral.

3. Prosedur Pengelolaan Hewan Coba Pasca Penelitian

Sebelum dilakukan pembedahan untuk mengambil organ hati pada tikus, di akhir perlakuan terlebih dahulu tikus akan dianestesi dengan menggunakan *ketamine-xylazine* dengan dosis 75–100 mg/kg ditambah 5–10 mg/kg secara intraperitoneal dengan selama 10–30 menit. Setelah dianestesi, tikus diterminasi dengan cara melakukan dislokasi servikal (AVMA, 2013).

4. Prosedur Pengambilan Organ Hati

Dilakukan laparotomi kemudian hati tikus diambil untuk pembuatan sediaan mikroskopis. Setelah itu sample hati difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam. Lalu sampel tersebut dibuat dalam bentuk sediaan mikroskopis dengan menggunakan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksiklin Eosin (HE).

5. Prosedur Operasional Pembuatan Slide

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi menurut bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung antara lain sebagai berikut.

a. *Fixation*

- 1) Spesimen berupa potongan organ telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
- 2) Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali.

b. *Trimming*

- 1) Organ dikecilkan hingga ukuran ± 3 mm.
- 2) Potongan organ hati tersebut dimasukkan kedalam *tissue cassette*.

c. Dehidrasi

- 1) Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu.
- 2) Dehidrasi dengan:
 - a) Alkohol 70% selama 0,5 jam
 - b) Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - c) Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - d) Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - e) Alkohol absolut selama 1 jam
 - f) Alkohol absolut selama 1 jam
 - g) Alkohol absolut selama 1 jam
 - h) Alkohol *xylol* 1:1 selama 0,5 jam

d. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan *xylol* I dan II masing–masing selama 1 jam.

e. *Impregnansi*

Impregnansi dilakukan dengan menggunakan *paraffin* selama 1 jam dalam oven suhu 65°C.

f. *Embedding*

1) Sisa *paraffin* yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.

2) *Paraffin* cair disiapkan dengan memasukkan *paraffin* ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58°C.

3) *Paraffin* cair dituangkan ke dalam pan.

4) Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.

5) Pan dimasukkan ke dalam air.

6) *Paraffin* yang berisi potongan hati dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4–6°C beberapa saat.

7) *Paraffin* dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.

8) Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.

g. *Cutting*

1) Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.

2) Sebelum dilakukan pemotongan, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.

3) Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan

pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dan *disposable knife*.

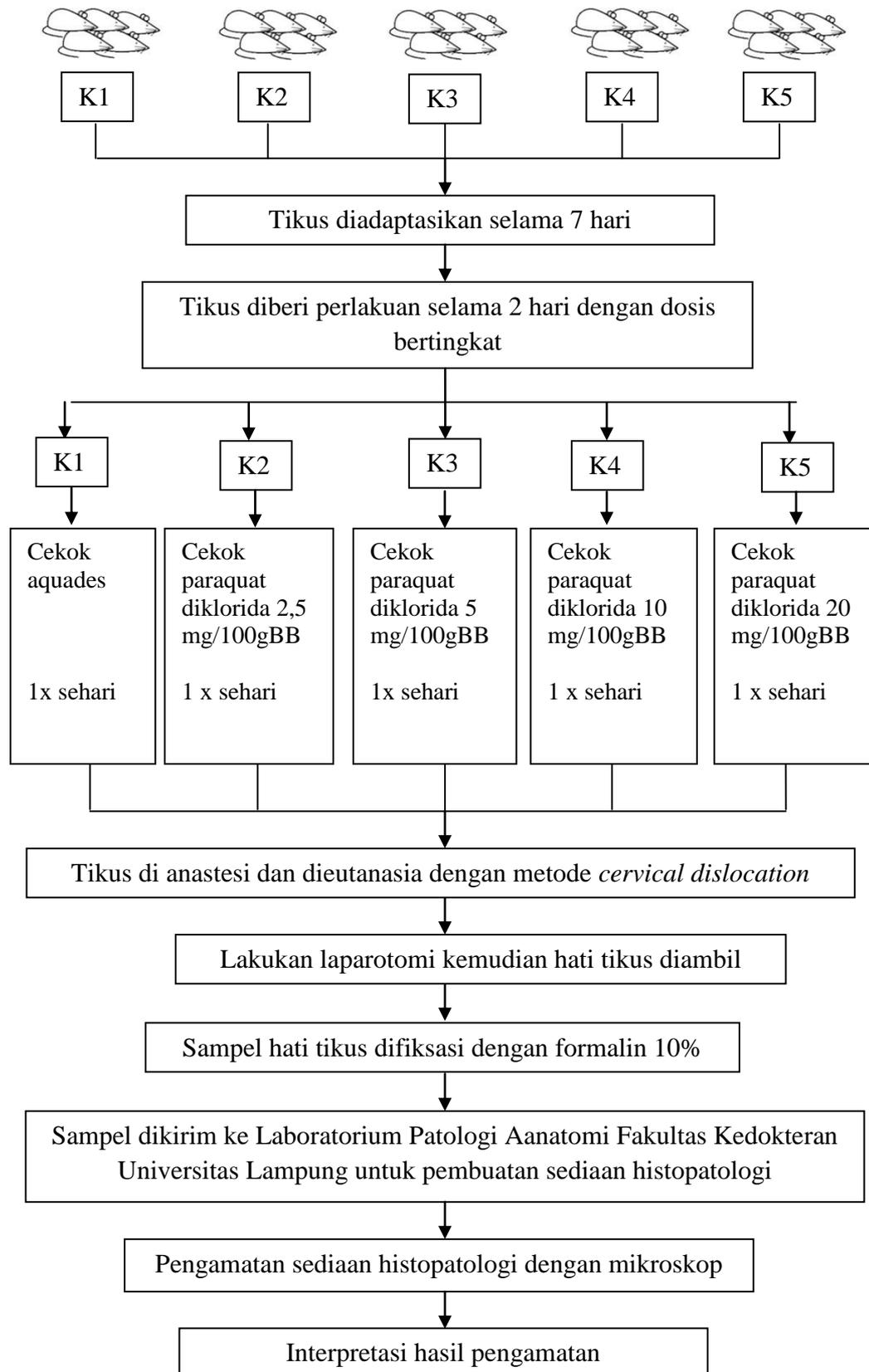
- 4) Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
 - 5) Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60⁰C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
 - 6) Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
 - 7) *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (Suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.
- h. *Straining* (Pewarnaan) dengan Prosedur Pulasan *Hematoksilin–Eosin*
- Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih slide yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut.
- 1) Dilakukan *deparaffinisasi* dalam:
 - a) Larutan *xylol* I selama 5 menit
 - b) Larutan *xylol* II selama 5 menit
 - c) Ethanol absolut selama 1 jam
 - 2) *Hydrasi* dalam:
 - a) Alkohol 96% selama 2 menit
 - b) Alkohol 70% selama 2 menit

- c) Air selama 10 menit
- 3) Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:
 - a) Harris hematoxylin selama 15 menit
 - b) Air mengalir
 - c) Eosin selama maksimal 1 menit
- 4) Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan:
 - a) Alkohol 70% selama 2 menit
 - b) Alkohol 96% selama 2 menit
 - c) Alkohol absolut 2 menit
- 5) Penjernihan:
 - a) Xylol I selama 2 menit
 - b) Xylol II selama 2 menit
- i. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu entelan dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.
- j. *Slide* dibaca dengan mikroskop

Slide dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi, diperiksa dibawah mikroskop cahaya dan dibaca oleh ahli histologi dan patologi anatomi.

Diagram alur penelitian tersaji pada gambar 9.



Gambar 9. Diagram alur penelitian.

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yakni variabel bebas (variabel *independen*) dan variabel terikat (variabel *dependen*). Adapun variabel penelitian pada penelitian ini adalah:

a. Variabel Bebas

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

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah perubahan gambaran pembengkakan hepatosit dan kongesti sinusoid hati tikus putih jantan galur *Sprague dawley*.

2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis herbisida paraquat diklorida	Dosis letal paraquat adalah 20 mg/100gBB <ul style="list-style-type: none"> • Kelompok 1 (kontrol normal) = pemberian aquades • Kelompok 2 (perlakuan coba) = pemberian paraquat diklorida 2,5 mg/100gBB • Kelompok 3 (perlakuan coba) = pemberian paraquat diklorida 5 mg/100gBB • Kelompok 4 (perlakuan coba) = pemberian paraquat diklorida 10 mg/100gBB • Kelompok 5 (perlakuan coba) = pemberian paraquat diklorida 20 mg/100gBB 	Kategorik
Pembengkakan hepatosit	Rerata skor skala penilaian gambaran pembengkakan hepatosit tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x pada seluruh lapang pandang. Skala penilaian: 0=tidak ada pembengkakan hepatosit 1=sedikit hepatosit yang mengalami pembengkakan (<25%) 2=sebagian hepatosit mengalami pembengkakan (25–50%) 3=banyak hepatosit yang mengalami pembengkakan (>50%)	Numerik
Kongesti sinusoid hati	Rerata skor skala penilaian gambaran kongesti sinusoid hati tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x pada seluruh lapang pandang. Skala penilaian: 0=tidak ada kongesti 1=kongesti ringan, yaitu kongesti sinusoid yang ditemukan pada daerah sekitar vena sentralis 2=kongesti sedang, yaitu kongesti sinusoid yang ditemukan pada daerah sekitar vena sentralis yang lebih lebar dari kongesti ringan 3=kongesti berat, yaitu kongesti sinusoid yang ditemukan pada daerah sekitar vena sentralis yang meluas ke vena porta	Numerik

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Selanjutnya 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 *KruskalWallis*. 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* atau *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

H. Ethical Clearance

Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba telah disepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraan dan diperlakukan secara manusiawi. Dengan demikian dalam pemanfaatan hewan coba harus diterapkan prinsip 3R data protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*. *Replacement* merupakan suatu prinsip yang menjelaskan bahwa 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. *Reduction* adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, seperti rasa lapar, haus, ketidaknyamanan, nyeri, dan penyakit (Ridwan, 2013). Penelitian ini telah mendapat persetujuan lolos kaji etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.