

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10–16 minggu yang dipilih secara random dan dibagi 5 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sedangkan untuk pemeliharaan dan pemberian intervensi tikus akan dilakukan di *Pet House* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Untuk pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Periode penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 3 bulan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10–16 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, sesuai dengan rumus Frederer.

Rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

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

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:

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

$$(n-1) 4 \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$(n-1) \geq 3,75$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n = 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

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

Adapun kelima kelompok tikus ini terdiri dari:

1. Kelompok I merupakan kelompok tikus yang tidak diberi paparan asap. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok kontrol normal.
2. Kelompok II merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap selama 60 menit secara terus-menerus.
3. Kelompok III merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap selama 120 menit secara terus-menerus.
4. Kelompok IV merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap selama 180 menit secara terus menerus.
5. Kelompok V merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap selama 240 menit.

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

- a) Tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif.
- b) Memiliki berat badan 100–150 gram.
- c) Berjenis kelamin jantan.
- d) Berusia sekitar kurang lebih 10–16 minggu (dewasa).

Kriteria eksklusi pada penelitian ini diantaranya :

- a) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

- b) Terlihat penampakan rambut kusam, rontok, botak, aktivitas kurang/ tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus dan genital setelah masa adaptasi.
- c) Mati selama masa pemberian perlakuan.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan penelitian

- a) Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian yaitu: bahan organik, seperti daun, ranting, batang pohon, kayu.
- b) Hewan Percobaan
Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10–16 minggu yang diperoleh dari Unit Pengelola Hewan Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- c) Makanan hewan percobaan berupa pelet.

2. Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah:

- a) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 gram, untuk menimbang berat tikus.
- b) Tungku untuk membakar bahan organik.
- c) Pipa.
- d) Kontainer plastik pengumpul asap.
- e) Bambu.

- f) Korek api.
- g) Sungkup asap.
- h) Alat pembuat preparat.
- i) Kapas alkohol.
- j) *Minor set*.
- k) Mikroskop.

E. Prosedur Penelitian

1. Adaptasi Tikus

Tikus sebanyak 25 ekor dibagi ke dalam 5 kandang dan diadaptasi selama 1 minggu sebelum perlakuan dimulai. Selama masa adaptasi tikus diberi makan berupa pelet dan air. Pengukuran berat badan tikus sebelum perlakuan.

2. Persiapan Asap Bakaran

Bakar bahan organik seperti daun, ranting, batang pohon, kayu pada tungku, kemudian tunggu sampai asap hasil bakaran sampai pada komptainer plastik pengumpul asap yang melewati oleh pipa,

3. Prosedur Pemberian Intervensi

Untuk pemberian intervensi dilakukan berdasarkan kelompok perlakuan. Kelompok I (K1) sebagai kontrol normal, dimana tidak diberi paparan asap. Kelompok II (P1) sebagai kontrol negatif, dimana dipaparkan asap bakaran organik selama 60 menit/hari. Kelompok III (P2) sebagai kontrol negatif, dimana dipaparkan asap bakaran organik selama 120 menit/hari.

Kelompok IV (P3) sebagai kontrol negatif, dimana dipaparkan asap bakaran organik selama 180 menit/hari. Kelompok V (P4) sebagai kontrol negatif, dimana dipaparkan asap bakaran organik selama 240 menit/hari.

Pemamparan asap bakaran organik dilakukan dengan cara membakar bahan organik yang disalurkan melalui pipa kedalam kontainer plastik. Pemaparan dilakukan pada kandang tikus yang berupa kontainer plastik sebagai tempat pengumpul asap.

Pemaparan dilakukan selama 60 menit untuk P1, P2 selama 120 menit, P3 selama 180 menit, kelompok P4 selama 240 menit. Perlakuan tersebut dilakukan selama 7 hari.

4. Prosedur Pengelolaan Hewan Coba Pasca Penelitian

Pada akhir penelitian tikus akan dianastesi dengan menggunakan *ketamine-xylazine* dengan dosis 75–100 mg/kg+5–10 mg/kg secara intraperitoneal dengan durasi selam 10–30 menit. Kemudian setelah tikus dianastesi akan dilakukan dislokasi servikal untuk menterminasi tikus (AMVA, 2013).

5. Prosedur Pengambilan Bagian Trakea

Pengambilan bagian trakea dilakukan dengan bedah thoraks, untuk pembuatan sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan menggunakan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksiklin Eosin (HE). Sample trakea difiksasi dengan formalin 10%.

6. Prosedur Operasional Pembuatan Slide

Pembuatan preparat Histopatologi menggunakan metode yang sudah ditetapkan Bagian Patologi Anatomi Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (Mahesya, 2014).

a) *Fixation*

- 1) Spesimen berupa potongan organ trakea yang 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 trakea tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

c) Dehidrasi

- 1) Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu.
- 2) Dehidrasi dengan:
 - i. Alkohol 70% selama 0,5 jam
 - ii. Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - iii. Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - iv. Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - v. Alkohol absolut selama 1 jam
 - vi. Alkohol absolut selama 1 jam

- vii. Alkohol absolut selama 1 jam
- viii. 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) *Impregnasi*

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan paraffin selama 1 jam dalam oven suhu 65⁰ C.

f) *Embedding*

- 1) Sisa parafin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
- 2) Parafin cair disiapkan dengan memasukkan parafin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58⁰C.
- 3) Parafin cair dituangkan ke dalam *pan*.
- 4) Dipindahkan satu persatu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
- 5) *Pan* dimasukkan ke dalam air.
- 6) Parafin yang berisi potongan paru dilepaskan dari *pan* dengan dimasukkan ke dalam suhu 4–6⁰ C beberapa saat.
- 7) Parafin 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.
- 9) Memblok parafin, siap dipotong dengan mikrotom.

g) *Cutting*

- 1) Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
- 2) Sebelum memotong, 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* dengan *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* 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) *Staining* atau pewarnaan dengan Harris Hematoksin–Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik, selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut :

1) Dilakukan deparafinisasi dalam:

- a. Larutan *xylol* I selama 5 menit
- b. Larutan *xylol* II selama 5 menit.
- c. *Ethanol* absolut selama 1 jam.

2) Hidrasi 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 Hematoksin selama 15 menit
- b. Dibilas dengan air mengalir
- c. Diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit.

4) Selanjutnya, didehidrasi dengan menggunakan:

- a. Alkohol 70% selama 2 menit
- b. Alkohol 96% selama 2 menit,
- c. Alkohol absolut selama 2 menit.

5) Penjernihan dengan:

- a. *Xylo I* selama 2 menit.
- b. *Xylo I* II selama 2 menit.

i) *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

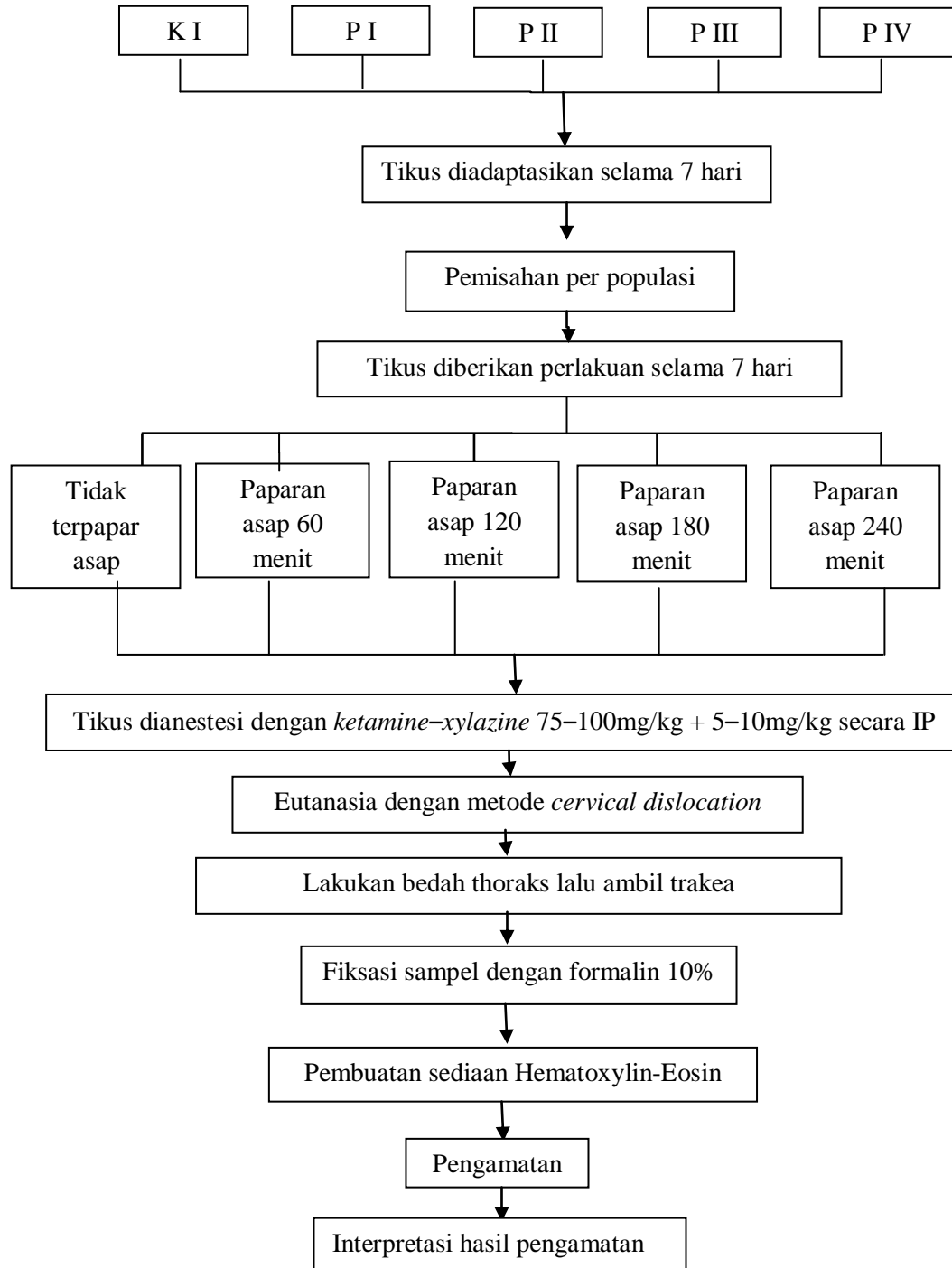
Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting*, yaitu entelan, dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j) *Slide* dibaca dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Preparat histopatologi dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dikonsultasikan dengan ahli Patologi Anatomi. Pengamatan mikroskopis dilakukan oleh peneliti sendiri.

7. Prosedur penelitian

Adapun rancangan penelitian dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Diagram Alur Penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

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

- a. Variabel bebas adalah perbedaan waktu paparan asap pembakaran bahan organik.
- b. Variabel terikat adalah perubahan gambaran histopatologi trakea tikus putih jantan galur *Sprague dawley*.

2. Definisi Operasional Variabel

Berikut definisi operasional dari variabel yang digunakan:

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Skala
Perbedaan lamanya paparan asap dari asap pembakaran bahan organik.	<ol style="list-style-type: none"> 1. K1 merupakan kelompok tikus yang tidak diberi paparan asap bahan organik. 2. P1 merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap bahan organik selama 60 menit/hari. 3. P2 merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap bahan organik selama 120 menit/hari. 4. P3 merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap bahan organik 180 menit/hari. 5. P4 merupakan kelompok tikus yang diberi paparan asap bahan organik selama 240 menit/hari 	Kategorik
Gambaran histopatologi trakea tikus putih jantan galur <i>Sprague dawley</i>.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sel goblet yang dihitung merupakan penjumlahan seluruh sel goblet pada epitel trakea yang diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada seluruh epitel yang melapisi trakea. 2. Persentase kehilangan silia yang dihitung merupakan pengamatan hilangnya silia dari lumen trakea yang diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada seluruh epitel yang melapisi trakea. 	Numerik

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang telah diperoleh akan diubah ke dalam bentuk tabel-tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer, yang terdiri dari beberapa langkah:

- a. Koding, untuk mengkonversikan data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
- b. *Data Entry*, memasukkan data ke dalam komputer.
- c. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke dalam komputer
- d. Output komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

2. Analisis Data

Hasil penelitian akan dianalisis menggunakan program analisis data. Untuk uji normalitas data dilakukan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel < 50 ($p > 0,05$). Lalu dilakukan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan metode uji non parametrik, digunakan uji *One Way Anova*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila nilai $p < 0,05$. Jika pada uji *ANOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc LSD*, dan jika

pada uji non parametrik *Kruskal–Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc Mann-Whitney*.

H. Etika Penelitian

Ilmuwan Penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R data protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. Untuk itu penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, karena penelitian ini memanfaatkan hewan percobaan dalam pelaksanaannya.