

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan pola *post test-only control group design*. Menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 8-10 minggu yang dipilih secara acak dan dikelompokkan dalam 5 kelompok.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober-November 2014 selama 2 hari masa perlakuan dengan terlebih dahulu menjalani masa adaptasi selama 7 hari. Perawatan dan perlakuan sampel bertempat di *pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin serum dilakukan di Laboratorium Loadika Metro.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi dan Sampel

1. Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur kurang dari 10 minggu yang diperoleh dari Unit pengelola hewan Laboratorium IPB.

2. Sampel penelitian

Penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* umur 8-10 minggu dengan rata-rata berat badan antara 100-150 gram. Sampel penelitian dipilih secara simple acak (*random sampling*) sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*. Dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*. Selama penelitian tikus tetap diberi makan campuran pelet dan diberi minum secukupnya, selain diberikan perlakuan.

Menurut Frederer (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, dapat dirumuskan:

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

Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan r merupakan jumlah sampel tiap kelompok.

Penelitian ini akan menggunakan lima kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi: (Frederer)

$$\begin{aligned} (t-1)(r-1) &\geq 15 \\ 4(r-1) &\geq 15 \\ 4r &\geq 19 \\ r &\geq 19/5 \\ r &\geq 4,75 \end{aligned}$$

Jadi sampel yang akan digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor dengan 1 tikus putih sebagai cadangan pada masing-masing kelompok sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor.

1. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*;
- b. Berat badan rata-rata antara 100-150 gram;
- c. Tikus berumur 8-10 minggu
- d. Didapatkan dari tempat pembiakan yang sama dan pakan yang sama.

2. Kriteria eklusi

Kriteria eklusi dari penelitian ini adalah:

- a. Terlihat sakit pada masa adaptasi (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus atau genital);
- b. Penurunan berat badan selama adaptasi lebih dari 10%;
- c. Mati selama pemberian perlakuan.

3.4 Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ada 1 yakni herbisida *paraquat* diklorida dengan dosis yang diberikan secara berbeda pada setiap kelompok, yakni pada kelompok satu, pada kelompok dua, pada kelompok tiga , pada kelompok empat dan pada kelompok lima.

2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Neraca analitik Metler Toleda untuk menimbang tikus
- Sduit oral
- Spektrofotometri

3. Prosedur Pemberian Dosis Herbisida *Paraquat*

Dosis herbisida *paraquat* 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 sehingga tidak diberikan herbisida *paraquat diklorida* per-oral, tetapi hanya diberikan aquades. Herbisida *paraquat* yang digunakan pada penelitian ini adalah herbisida dalam bentuk cair dengan dosis herbisida 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 ml herbisida *paraquat diklorida* + 0,99 ml air = 1 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

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

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

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

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 ml herbisida *paraquat diklorida* + 0,93 ml air = 1 ml

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

3.5 Prosedur Penelitian

1. Persiapan Kandang dan Tikus

Kandang tikus terbuat dari box plastik, bagian dasarnya diberi alas kertas untuk mempermudah dalam membersihkan kandang dari kotoran, dan ditutupi dengan pagar kawat. Kandang terdiri dari 5 kelompok (4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol) yang masing-masing dimasukan 5 ekor tikus. Tikus diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

Pengelompokan tikus (*Harmita & Radji, 2005*) sebagai berikut :

Dosis Herbisida Per- oral

Perlakuan 1 : 25 mg/kgBB

Perlakuan 2 :50 mg/kgBB

Perlakuan 3 : 100 mr/ kg BB

Perlakuan 4 : 200 gr / kgBB

Perlakuan 5 : kontrol

Sumber : Sembodo, 2010

2. Perlakuan terhadap tikus

Sebelum diberikan perlakuan, tikus diberi makan dan minum secara tak terbatas terlebih dahulu selama 24 jam. Kemudian kelompok perlakuan diberikan (peroral) formulasi herbisida yang mengandung bahan aktif paraquat diklorida dengan dosis bertingkat. Sementara kelompok kontrol diberikan dengan akuades. Pemberian dilakukan sebanyak satu kali (*single dose*) dengan menggunakan sonde lambung (Direktorat Pupuk dan Pestisida, 2004).

3. Pengambilan sampel

Pada hari ke 5 pada semua tikus yang masih hidup dilakukan pengambilan darah. Pengambilan dilakukan oleh petugas dari laboratorium hewan BVVP untuk menghindari dari kerusakan darah.

4. Evaluasi Biokimia

Evaluasi biokimia dilakukan terhadap serum tikus menggunakan alat Spektrofotometri untuk mengamati kadar ureum kreatinin nya. Spektrofotometri adalah suatu metoda analisis kimia yang didasarkan pada tercapainya kesamaan warna antara larutan sampel dan larutan standar, dengan menggunakan sumber cahaya polikromatis. Persyaratan larutan yang harus dipenuhi untuk absorpsi sinar tampak adalah larutan harus berwarna. Oleh karena itu metoda spektroskopi sinar tampak disebut juga dengan metoda kolorimetri dan alatnya disebut dengan kolorimeter. Kolorimeter didasarkan pada perubahan warna larutan yang sebanding dengan perubahan konsentrasi komponen pembentuk larutan. Pengecekan ini dilakukan di laboratorium Loadika Metro.

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Variabel Penelitian

3.6.1.1 Variabel Bebas

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

3.6.1.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah perubahan kadar ureum dan kreatinin serum hewan coba.

4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional

Variable	Defisini	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Herbisida paraquat	Pestisida yang akan diuji pada hewan coba untuk mengetahui kandungan toksisitas nya	Menggunakan gelas ukur	P1:25mg/KGBB P2:50 mg/kgBB P3:100mg/kgBB P4:200mg/kgBB	Kategorik
Ureum	Ureum merupakan produk akhir metabolisme nitrogen yang penting pada manusia, yang disintesa dari amonia, karbon dioksida, dan nitrogen amida aspatat (Harper H.A., 2005)	Menggunakan spektrofotometri	Mg/dl	Numerik

Variable	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Kreatinin	Kreatinin adalah protein yang merupakan hasil akhir metabolisme otot yang dilepaskan dari otot dengan kecepatan yang hampir konstan dan diekskresi dalam urin. (Harper H.A, 2005)	Menggunakan Spektofotometri	Mg/dl	Numerik

3.7 Analisis Data

Analisis data penelitian di proses dengan program SPSS versi 17.0 for windows dengan tingkat signifikansi $p = 0,05$, langkah-langkah nya sebagai berikut :

1. Uji normalitas data ($p > 0,05$)

Pengujian normalitas data menggunakan Shapiro Wilk test untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal. Hasil uji

normalitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik bila data tidak berdistribusi normal.

2. Uji homogenitas data ($p > 0,05$)

Pengujian homogenitas data menggunakan uji levene's untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data homogen atau non parametrik bila data tidak homogen.

3. Uji Parametrik (One-Way ANOVA)

Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, II, III, IV, dan V .

4. Analisis post hoc

Untuk mengetahui perbedaan pada kelompok perlakuan

3.8 Ethical Clearence

Ilmuwan penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3 R dalam protokol penelitian, yaitu: *replacement, reduction, dan refinement* (Depkes, 2007).

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. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer) (Depkes, 2007).

Reduction diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistik yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.

Refinement adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi (Depkes, 2007).

Yang pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya. Makanan dan air minum memadai dari kualitas, dibuktikan melalui analisa *proximate* makanan, analisis mutu air minum, dan uji kontaminasi secara berkala. Analisis pakan hewan untuk mendapatkan komposisi pakan, menggunakan metode standar.

Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidak-nyamanan, disediakan lingkungan bersih dan paling sesuai dengan biologi hewan percobaan yang dipilih, dengan perhatian terhadap: siklus cahaya, suhu, kelembaban lingkungan, dan fasilitas fisik seperti ukuran kandang untuk kebebasan bergerak, kebiasaan hewan untuk mengelompok atau menyendiri.

Berikutnya, hewan coba harus bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan. Penyakit dapat diobati dengan catatan tidak mengganggu penelitian yang sedang dijalankan. Bebas dari nyeri diusahakan dengan memilih prosedur yang meminimalisasi nyeri saat melakukan tindakan invasif, yaitu dengan menggunakan *analgesia* dan *anesthesia* ketika diperlukan. Euthanasia dilakukan dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba. Hewan juga harus bebas dari ketakutan dan stress jangka panjang, dengan menciptakan lingkungan yang dapat mencegah stress, misalnya memberikan

masa adaptasi/aklimatisasi, memberikan latihan prosedur penelitian untuk hewan (Depkes, 2007).

Semua prosedur dilakukan oleh tenaga yang kompeten, terlatih, dan berpengalaman dalam merawat/memperlakukan hewan percobaan untuk meminimalisasi stres. Hewan diperbolehkan mengekspresikan tingkah laku alami dengan memberikan ruang dan fasilitas yang sesuai dengan kehidupan biologi dan tingkah laku spesies hewan percobaan. Hal tersebut dilakukan dengan memberikan sarana untuk kontak social (bagi spesies yang bersifat sosial), termasuk kontak social dengan peneliti; menempatkan hewan dalam kandang secara individual, berpasangan atau berkelompok; memberikan kesempatan dan kebebasan untuk berlari dan bermain (Depkes, 2007).