

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan rancangan percobaan *post-test only control group design*. Pemilihan hewan uji sebagai subjek penelitian dilakukan dengan cara random pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol.

B. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* yang berusia 2 bulan, berjenis kelamin jantan, dan memiliki berat badan 40 - 90 gram. Hewan uji dipelihara di laboratorium hewan uji biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UMY.

1. Jumlah Subjek

Besarnya subjek dalam penelitian ini didapatkan dengan perhitungan :

$$\text{Rumus Frederer} = (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n = Jumlah subjek tiap kelompok perlakuan

r = Jumlah kelompok perlakuan

Sehingga didapatkan besar subjek :

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

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

$$(n-1) (3) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah subjek minimal yang dibutuhkan dalam setiap kelompok penelitian adalah enam ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar*. Namun, untuk menghindari kekurangan jumlah subjek yang dapat diakibatkan karena kematian hewan uji, maka jumlah total subjek yang digunakan dalam penelitian adalah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* yang terbagi dalam empat kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus putih jantan. Kelompok – kelompok tersebut adalah :

- a. Kelompok kontrol (K) : Kelompok hewan uji yang tidak mengalami pendedahan pada karbon aktif dan pewangi ruangan.
- b. Kelompok pewangi ruangan (P1) : Kelompok hewan uji yang hanya didedahkan pada pewangi ruangan.
- c. Kelompok karbon aktif (P2) : Kelompok hewan uji yang hanya didedahkan pada karbon aktif.
- d. Kelompok karbon aktif dan pewangi ruangan (P3) : Kelompok hewan uji yang didedahkan pada karbon aktif dan pewangi ruangan.

2. Kriteria Inklusi dan Eklusi

a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi subjek penelitian ini adalah :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar.
- 2) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi perlakuan pada usia 1 bulan.
- 3) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki berat badan awal 40 - 90 gram.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi subjek penelitian ini adalah :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mati saat berjalannya penelitian.
- 2) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang sakit, dinilai dari berat badan dan keaktifannya.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemberian perlakuan hewan uji selama 35 hari dengan lokasi penelitian sebagai berikut :

- a. Pemeliharaan dan perlakuan hewan uji dilakukan di laboratorium Hewan Uji Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- b. Pembedahan hewan uji dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY.

- c. Pembuatan preparat histologi organ pulmo dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
- d. Pengamatan dan Penilaian preparat serta pengumpulan data dilakukan di laboratorim Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

- a. Variabel bebas :

Pendedahan karbon aktif berbentuk serbuk yang dijual dipasaran dan pewangi ruangan berbentuk gel.

- b. Variabel terikat :

Gambaran histologi pulmo tikus putih (*Rattus norvegicus*).

- c. Variabel terkendali :

- 1) Subjek penelitian :

- a) Jenis kelamin : jantan

- b) Usia : 1 bulan

- c) Jenis tikus : *Rattus norvegicus* galur Wistar

- 2) Perawatan subjek : jenis dan kualitas makanan, minuman, dan jerami setiap subjek sama.

- 3) Bahan coba : penggunaan karbon aktif berbentuk serbuk dan pewangi ruangan berbentuk gel dengan aroma jeruk dalam merk yang sama.

2. Definisi Operasional

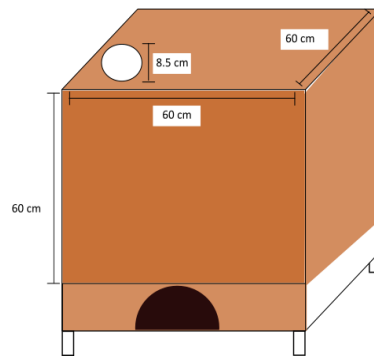
- a. Karbon aktif adalah karbon aktif berbentuk granular yang dijual dipasaran.
- b. Pewangi ruangan adalah pewangi ruangan sediaan gel beraroma jeruk dengan kadar formaldehida 0,62 ppm.
- c. Tikus putih adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* usia 1 bulan dengan pemberian makan secara ad libitum.
- d. Gambaran histologi pulmo adalah gambaran histologi yang meliputi ketebalan septum interalveolaris, diameter alveolus, dan peningkatan jumlah sel radang seperti limfosit, sel plasma, eosinofil dan PMN pada alveolus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diamati pada mikroskop binokuler dengan perbesaran 40 x 10 dalam 10 lapang pandang.
- e. Septum interalveolaris adalah unsur jaringan penyambung tipis antara alveolus. Ketebalan septum interalveolaris dihitung dari empat sisi yang berbeda kemudian dicari rata – ratanya.
- f. Diameter alveolus adalah diameter alveolus yang dihitung dari dua sisi yang berbeda kemudian dicari rata – ratanya.
- g. Sel limfosit merupakan sel darah putih yang ditemukan dalam darah serta jaringan getah bening. Memiliki ciri – ciri bulat, berinti besar, dengan sitoplasma sedikit dan berwarna biru.

- h. Sel neutrofil atau PMN (*polymorphonuclear*) adalah sel darah putih yang besar, berbentuk granulosit, sitoplasma jernih, memiliki lobus inti lebih dari dua
- i. Sel plasma adalah produk akhir dari aktivasi sel B yang mengalami diferensiasi, dan berfungsi sebagai penghasil antibodi spesifik untuk melawan antigen. Sel nampak berinti eksentris dengan sitoplasma berwarna biru.
- j. Sel eosinofil adalah sel darah putih yang khusus ditemukan akibat infeksi parasit atau bagian dari imun yang berkaitan dengan alergi dan diperantarai oleh IgE. Sel tampak memiliki sitoplasma merah dengan jumlah maksimal inti sebanyak dua lobus.
- k. Sel histiosit (makrofag) adalah sel jaringan yang berfungsi untuk fagositosis dan berasal dari monosit dan sirkulasi darah, dengan ciri – ciri berupa sel yang mirip dengan PMN namun berukuran lebih besar dan memiliki sitoplasma jernih.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

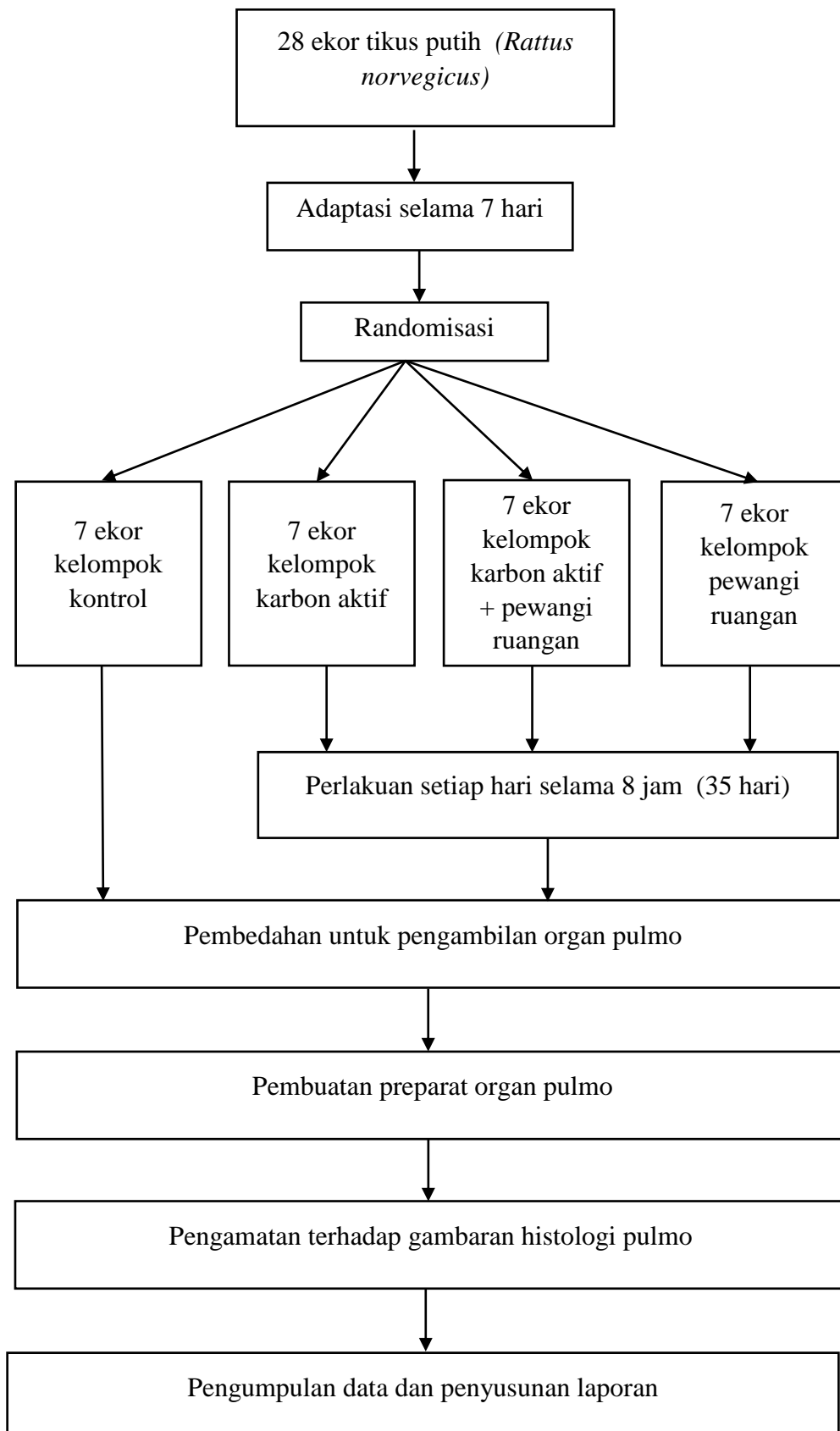
Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang pemeliharaan, kandang perlakuan, perlengkapan pemeliharaan tikus, perlengkapan bedah minor set, timbangan badan, tempat organ (pot air), mikroskop binokuler, software optilab, *bakerglass*, tisu dan kapas, set gelas, dan pipet tetes.



Gambar 3.1. Desain kandang perlakuan

2. Bahan Penelitian

Bahan – bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah air mineral dan pakan tikus *ad libitum*, sekam padi, karbon aktif granular, pewangi ruangan berbentuk gel dengan aroma jeruk, kloroform, formalin buffer 10%, NaCl fisiologis, dan aquades.

F. Jalannya Penelitian

G. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang memiliki galur, usia, dan jenis kelamin yang sama. Hewan uji diadaptasi selama 7 hari.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam perlakuan ini sebanyak 28 ekor tikus dan dibagi menjadi kelompok kontrol (K), kelompok pewangi (P1), kelompok karbon aktif (P2), dan kelompok karbon aktif dan pewangi (P3). Setiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tiap kelompok hewan uji diberi perlakuan pada satu kandang khusus yang telah dirancang sehingga pendedahan tidak mempengaruhi antar kelompok.

3. Pendedahan Hewan Uji

Pewangi ruangan berbentuk gel digantung pada tepi kandang perlakuan hewan uji pewangi (P1), karbon aktif digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok hewan uji karbon (P2), sedangkan karbon aktif dan pewangi ruangan berbentuk gel digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok hewan uji karbon dan pewangi (P3). Pendedahan dilakukan setiap hari dalam 8 jam selama 35 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan pada hewan uji dilakukan sesuai dengan pengelompokannya.

- a. Kelompok K adalah kelompok kontrol. Pada hewan uji ini tidak didedahkan pada karbon aktif maupun pewangi ruangan.
- b. Kelompok P1 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pada pewangi ruangan selama 35 hari.
- c. Kelompok P2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pada karbon aktif selama 35 hari.
- d. Kelompok P3 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pada karbon aktif dan pewangi ruangan selama 35 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman yang diberikan pada tiap kelompok hewan uji sama baik porsi maupun jenisnya. Pembersihan dan penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap dua hari sekali.

6. Pembedahan dan pengambilan organ

Pada hari ke-36 dari awal perlakuan, dilakukan pembedahan pada semua hewan uji. Pembedahan diawali dengan pemberian anastesi pada hewan uji yang berupa cairan kloroform 35%. Hewan uji yang telah dianastesi kemudian dibedah dengan menggunakan alat bedah minor kemudian diambil organ yang akan diteliti yaitu pulmo. Organ pulmo difiksasi dalam larutan formalin 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi.

7. Pembuatan Preparat

Organ pulmo yang disimpan dengan formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan metode parafin blok menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE).

8. Uji Histopatologi

Sebanyak 28 preparat, yang terbagi menjadi 7 preparat setiap kelompok diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x10 pada 10 kali lapang pandang. Setelah itu, keempat sisi alveolus diukur dengan bantuan *software* optilab untuk mengukur ketebalan septum interalveolaris dan diameter alveolusnya. Selain itu, dilakukan pengamatan jenis sel radang pada setiap preparat. Sel radang yang diamati berupa sel limfosit, sel PMN (*polymorphonuclear*), sel plasma, sel eosinofil, dan sel histosit (makrofag).

H. Analisa Data

Hasil pengukuran ketebalan septum interalveolaris, diameter alveolus, dan jumlah masing – masing jenis sel radang diuji normalitasnya dengan metode *Shapiro-Wilk*. Masing – masing data dari ketiga variabel berdistribusi normal, sehingga analisis statistik perbandingan parametrik dengan uji *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc* Duncan.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan *etichal clearance* dari Komisi Etik Penelitian FKIK UMY. Selama penelitian berlangsung, hewan uji

diperlakukan dengan tetap memperhatikan hak tikus sebagai makhluk hidup sesuai dengan kode etik penelitian.