

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorik dengan desain *The Post Test-Only Control Group* (rancangan eksperimental sederhana). Peneliti melakukan perlakuan pada sampel yang telah ditentukan, yaitu hewan uji coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan di laboratorium. Dalam penelitian ini subjek dibagi menjadi 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 7 hewan uji coba) secara acak. Perlakuan diberikan kepada kelompok dan satu kelompok menjadi kontrol. Setelah diberikan perlakuan selama 35 hari, keempat kelompok tersebut diobservasi kemudian hasil pengamatannya dianalisis dan dibuat suatu simpulan.

B. Subyek Penelitian

Populasi : tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan

Sampel : tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan
- b. Galur Wistar
- c. Umur 1 bulan
- d. Berat badan 40-90 gram
- e. Hewan percobaan diletakkan dalam ruangan dengan suhu udara berkisar antara 25-28° C.

- f. Dalam keadaan sehat (lincah) dan tidak terdapat kelainan anatomi
- g. Makanan yang diberikan berupa pakan standar dan air mineral

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan mati selama aklimatisasi dan perlakuan.

Penentuan sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer:

$$(k-1)(n-1) > 15$$

$$(4-1)(n-1) > 15$$

$$3(n-1) > 15$$

$$3n-3 > 15$$

$$3n > 18$$

$$n > 6$$

Keterangan :

k = jumlah kelompok

n = jumlah sampel dalam tiap kelompok

Pada penelitian ini jumlah sampel dalam tiap kelompok ditentukan sebanyak 7 ekor tikus putih (>6) dan jumlah kelompok tikus putih ada 4, sehingga penelitian ini membutuhkan 28 ekor tikus putih dari populasi yang ada. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *allocation random sampling*. Pengelompokan dilakukan secara acak (*Simple Random Sampling*). Sampel yang terpilih dibagi menjadi empat kelompok yaitu satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan dengan jumlah tikus 7 ekor tiap kelompok.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba, Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada untuk pembuatan preparat histologi hepar, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pembedahan, pengamatan dan penilaian preparat. Penelitian ini dilakukan selama dua bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian karbon aktif dan pewangi ruangan sesuai pembagian kelompok hewan uji coba.

2. Variabel Terikat atau Tergantung

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histologi hepar *Rattus norvegicus* yang telah diinduksi dengan pewangi ruangan dan karbon aktif sesuai dengan kelompok penelitian.

3. Variabel Luar

a. Variabel luar yang dapat dikendalikan

Variasi genetik, umur, suhu udara, berat badan, jenis pakan dan minum, kandang individu hewan coba yang berhubungan dengan aktivitas fisik hewan coba

b. Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan

Kondisi psikologis tikus putih, reaksi hipersensitivitas, keadaan awal hepar tikus putih.

E. Definisi Operasional

1. Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan merupakan suatu produk yang digunakan oleh masyarakat untuk menimbulkan aroma yang menyenangkan di dalam ruangan. Pewangi ruangan mengandung beberapa zat kimia yang berbahaya di dalam tubuh yaitu formaldehida, asetildehida, aseton, ethanol, phthalates, dll. Pada penelitian ini pewangi ruangan yang digunakan mengandung formaldehida sebesar 0,62 ppm dengan metode spektrofotometri UV-vis. Pewangi ruangan dipaparkan dengan memasukkan pewangi ruangan ke dalam kandang tikus perlakuan selama 8 jam/hari dalam 35 hari. Pewangi ruangan yang digunakan dalam bentuk gel dengan aroma jeruk.

2. Karbon Aktif

Karbon aktif merupakan material yang memiliki pori-pori yang banyak sehingga mempunyai daya serap yang tinggi. Sehingga karbon yang diaktivasi ini mempunyai kemampuan adsorpsi formaldehida. Pada penelitian ini karbon aktif dipaparkan dengan memasukkan karbon aktif ke dalam kandang tikus perlakuan selama 8 jam/hari dalam 35 hari. Karbon aktif yang digunakan adalah berbentuk granular.

3. Karbon Aktif dan Pewangi Ruangan

Pada penelitian ini karbon aktif dan pewangi ruangan dipaparkan dengan memasukkan karbon aktif dan pewangi ruangan ke dalam kandang tikus perlakuan selama 8 jam/hari dalam 35 hari. Karbon aktif yang digunakan dalam bentuk granular. Pewangi ruangan yang digunakan dalam bentuk gel dengan aroma jeruk

4. Kerusakan sel hepar

Kerusakan sel hepar adalah gambaran mikroskopis histologi sel hepar tikus yang dipaparkan oleh pewangi ruangan dan karbon aktif. Sel hepar yang normal memiliki bentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen (bersifat eosinofilik) dan memiliki dinding sel yang berbatas tegas. Memiliki inti sferis besar dan nukleolus. Sel hepar normal memiliki skor 1 menurut skor Manja Roenigk. Hal ini dinilai dari jumlah sel hepar yang mengalami kerusakan degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik, nekrosis. Kemudian dari jumlah sel yang mengalami kerusakan dihitung jumlah skor kerusakannya menurut skor Manja Roenigk.

a. Degenerasi Parenkimatososa

Degenerasi parenkimatososa : tampak sitoplasma keruh dan membengkak dengan munculnya granul-granul dalam sitoplasma karena terdapat endapan protein. Degenerasi parenkimatososa memiliki skor 2 menurut skor Manja Roenigk.

b. Degenerasi Hidropik

Degenerasi hidropik : tampak vakuola pada sitoplasma sel maupun di sekeliling inti sel. Sitoplasma pucat, mengalami vakuolisasi, dan vakuola tampak jernih karena adanya penimbunan cairan dalam sel dan terjadi pembengkakan sel. Degenerasi hidropik memiliki skor 3 menurut skor Manja Roenigk.

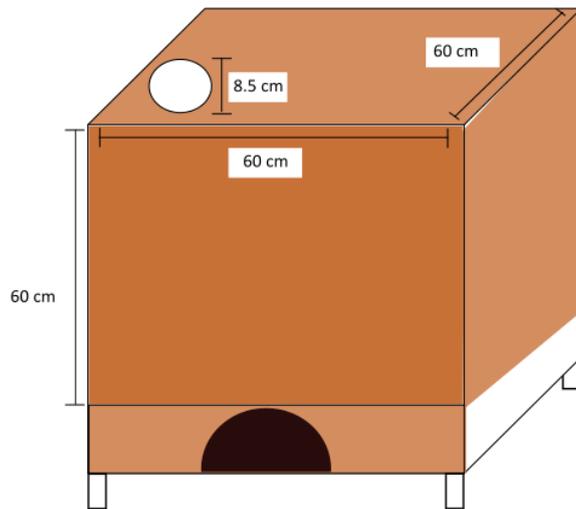
c. Nekrosis

Nekrosis : sel mengalami kematian sel dengan perubahan inti sel dengan terlihat lebih kecil, kromatin dan serabut retikuler menjadi berlipat-lipat. Nekrosis memiliki skor 3 menurut skor Manja Roenigk.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan adalah perlengkapan bedah hewan percobaan (minor set), perlengkapan pemeliharaan, alat untuk pembuatan preparat histologi, mikro pipet, pipet tetes, set gelas (cawan petri, pipet tetes, *object glass*, dll), kandang pemeliharaan (uk.45x35x12 cm), kandang perlakuan (uk.60x60x60 cm), kandang pendedahan, timbangan, handscoon, masker, botol minum, mikroskop cahaya, *software optilab*, tisu kering, wadah preparat basah.

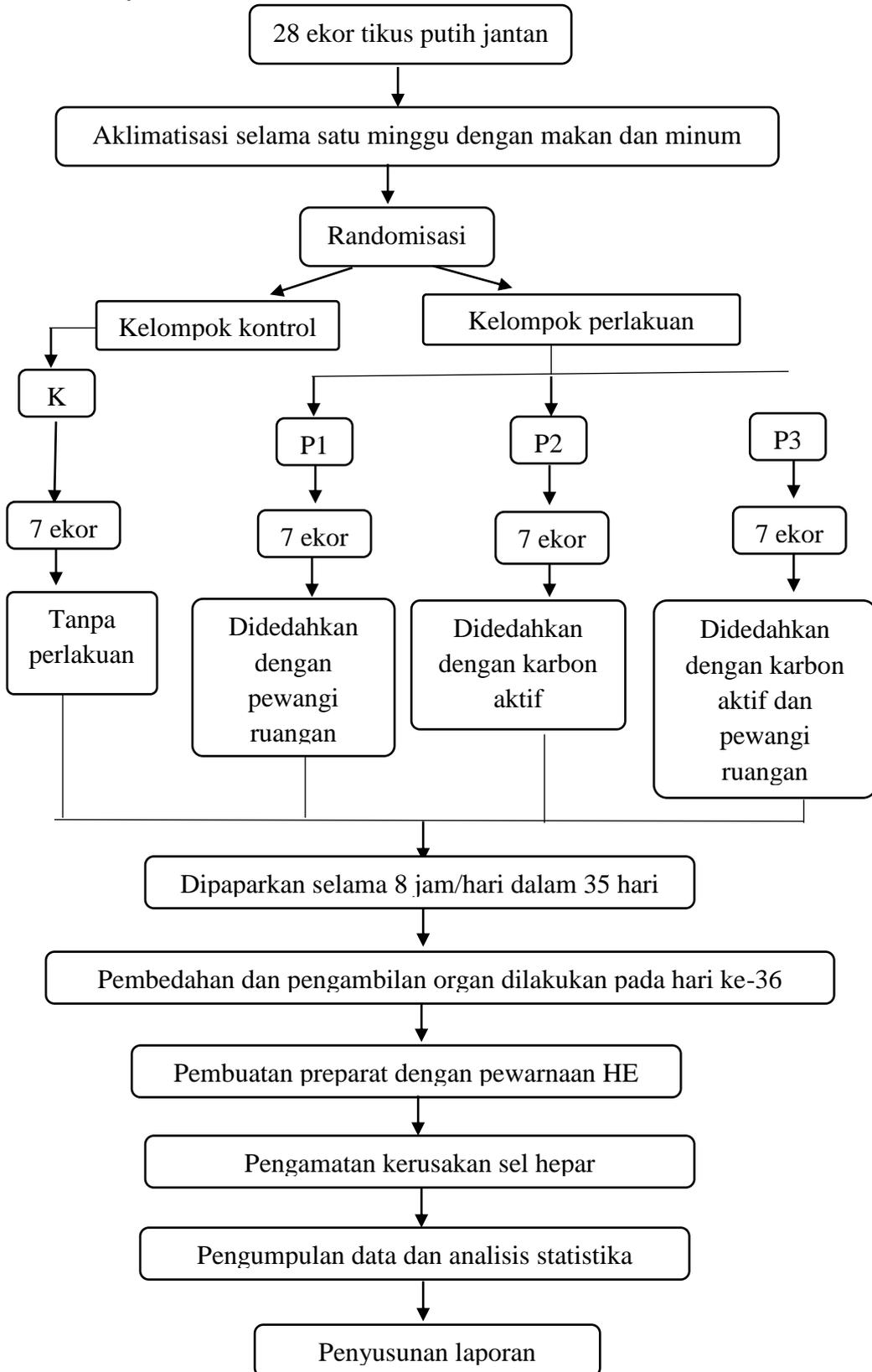


Gambar 9. Kandang Perlakuan

2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah 2 bungkus karbon aktif berbentuk granul, 2 bungkus pewangi ruangan berbentuk gel dengan aroma jeruk, kloroform, formalin buffer 10%, NaCl fisiologis, aquades, air mineral, pakan standar tikus, bahan untuk pembuatan preparat histologi dengan pengecatan HE.

G. Jalannya Penelitian



H. Cara pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran tingkat kerusakan sel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Seluruh subyek yang berjumlah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, dibuat 4 kelompok masing-masing terdiri dari 7 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang dibagi *secara simple random sampling*. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang diberi pakan standar serta minum dengan air mineral, sedangkan kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan yang mendapatkan pewangi ruangan, karbon aktif dan keduanya yang diberi pakan standar serta minum dengan air mineral. Keempat kelompok tersebut adalah:

K = Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral

P1 = Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan pewangi ruangan selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

P2 = Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan karbon aktif selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

P3 = Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan karbon aktif dan pewangi ruangan selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

Data yang diambil berupa gambaran hasil pengamatan mikroskopik preparat sel hepar tikus berupa skoring derajat kerusakan struktur sel hepar tikus yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik dengan perbesaran 400x melalui lima lapangan pandang yang berbeda yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat. Penilaian pembacaan preparat menggunakan sistem skor berdasarkan *Manja Roenigk*, yaitu dengan melihat derajat dan tingkatan kerusakan sel hepar yang berupa degenerasi parenkimatosia, degenerasi hidropik, nekrosis (sel piknotik, karioreksis, kariolisis).

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih yang dipilih sesuai ras, galur, jenis kelamin, umur yang telah ditentukan. Kemudian hewan uji ditimbang dan dipilih yang memenuhi berat badan 40-90 gram. Setelah itu, hewan uji yang telah dipilih dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dengan diberikan pakan standar dan minum di kandang perawatan.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Tikus yang memenuhi kriteri inklusi pada sampel diambil sebanyak 28 ekor kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dengan kode K dan 3 kelompok perlakuan dengan kode P1, P1 dan P3. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Kelompok kontrol (K) tidak dilakukan perlakuan, sedangkan kelompok perlakuan diberi perlakuan dengan pewangi ruangan (P1), karbon aktif (P2), karbon aktif dan pewangi ruangan (P3).

3. Pemaparan Karbon Aktif dan Pewangi Ruangan

Karbon aktif dan pewangi ruangan diletakan di dalam kandang perlakuan pada jarak yang aman dari hewan uji coba. Karbon aktif dan pewangi ruangan diletakan bersama dengan hewan uji coba. Pemaparan dilakukan selama 8 jam/hari selama 35 hari sesuai dengan kelompoknya.

4. Perlakuan

a. Kelompok Kontrol

Pada kelompok ini hewan uji coba hanya diletakan di dalam kandang perlakuan selama 8 jam/hari tanpa diberikan paparan berupa pewangi ruangan dan karbon aktif selama 35 hari.

b. Kelompok Pewangi Ruangan

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan berupa pewangi ruangan berbentuk gel selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

c. Kelompok Karbon Aktif

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan berupa karbon aktif selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

d. Kelompok Karbon Aktif dan Pewangi Ruangan

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan berupa karbon aktif dan

pewangi ruangan berbentuk gel selama 8 jam/hari dalam waktu 35 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman diberikan secara ad libitum setiap pagi hari. Setiap 2 hari sekali dilakukan penimbangan berat badan pada masing-masing tikus putih agar kesehatan hewan uji dapat terpantau. Pembersihan kandang dilakukan 2 hari sekali untuk menjaga higienitas dan menghindari faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberikan perlakuan sesuai kelompoknya selama 35 hari berturut-turut. Setelah hari ke-36 dilakukan pembedahan pada semua hewan uji coba dengan dilakukan anastesi terlebih dahulu menggunakan kloroform . Segera setelah nafasnya berhenti tikus dibedah dengan menggunakan peralatan bedah minor dan dilakukan pengambilan organ hepar. Sebelum dibuat menjadi preparat, organ yang diambil dimasukkan ke dalam toples yang berisi fomalin buffer 10% sampai seluruh bagian organ terendam. Jaringan yang berasal dari hewan tahapan pengambilan jaringan adalah sebagai berikut :

a. Pembiusan

Untuk membius hewan yang akan diambil jaringan tubuhnya dapat dilakukan dengan cara yaitu pembiusan inhalasi dengan menggunakan kloroform.

b. Pembedahan

Setelah hewan terbius sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan tubuh lalu dipotong-potong didalam cairan fisiologis (NaCl) untuk mendapatkan ukuran yang lebih kecil. Hal ini perlu dilakukan agar cairan fiksasi dapat masuk kedalam jaringan dengan mudah dan baik.

c. Isolasi jaringan tubuh

Potongan jaringan kemudian dimasukkan kedalam wadah-wadah kecil yang telah diberikan label/keterangan.

d. Penyimpanan

Wadah berisi cairan fiksasi larutan formalin buffer 10% dan jaringan kemudian disimpan ditempat yang sesuai hingga saat pemerosesan jaringan selanjutnya (Jusuf, 2009)

7. Pembuatan Preparat

Organ hepar yang telah dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer 10% dibuat preparat histologi dengan metode paraffin menggunakan teknik pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE).

Proses pembuatan preparat meliputi :

a. Dehidrasi

Langkah ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai

untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat

b. Pembeningan (*Clearing*)

Pembeningan adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin

c. Pembenaman (*Embedding/Impregnasi*)

Pembenaman (*impregnasi*) adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek.

d. Pengecoran (*Blocking*)

Pengecoran (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Cairan *paraffin* lalu dituangkan sedikit ke dalam cetakan blok. Masukkan potongan organ secara perlahan dan kemudian tuangkan kembali *paraffin* hingga merendam organ.

e. Pemotongan (*Mounting*)

Pemotongan (*mounting*) adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom (Jusuf, 2009).

8. Pewarnaan Preparat

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali / diamati dengan mikroskop. Pulasan (pewarna) yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu pulasan hematoksilin-eosin (HE). Pada pulasan HE digunakan 2 macam zat warna yaitu hematoksilin yang berfungsi untuk memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan counterstaining hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda dengan nuansa yang berbeda (Jusuf, 2009).

9. Pengamatan Histologis

Preparat diamati di sekitar daerah vena sentralis pada 200 sel hepar tiap lapang pandang. Pengamatan dilakukan pada 5 lapang di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x10 kali dan 40x10 kali. Skoring kerusakan sel hepar menggunakan skor Manja Roenigk (Garini, 2012).

I. Analisis Data

Data berupa hasil skoring kerusakan sel hepar ditabulasi dan dilanjutkan dengan melakukan uji sebaran data. Pada penelitian ini uji sebaran datanya tidak normal, sehingga pengolahan data dilanjutkan dengan uji statistik non

parametrik menggunakan *Kruskal Wallis*, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann Whitney*.

J. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang merupakan hewan berkelompok dan tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus diaklimatisasi dalam kandang pemeliharaan berukuran 45x35x12 cm dengan penutup yang terbuat dari kawat kasa yang diberi botol minum berisi air mineral dan diberikan pakan standar secara *ad libitum*. Kandang ditaruh dalam ruangan dengan temperatur suhu kamar. Pemeliharaan dilakukan di bawah pengawasan peneliti, yang terdiri dari pemberian makanan dan minuman standar, pemberian pewangi dan karbon aktif, pembedahan dan penyimpanan organ. Sebelum pembedahan, tikus diberikan anestesi terlebih dahulu menggunakan kloroform, kemudian dilakukan pembedahan tikus dengan menggunakan alat bedah minor. Kemudian dilakukan pengambilan organ hepar dan di masukkan ke dalam toples yang berisi larutan formalin buffer 10%. Kemudian dilakukan pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histologis pemeriksaan jaringan.