

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Only Control Group Design*. Pada kelompok hewan uji baik eksperimen maupun kontrol akan dirandomisasi.

B. Sampel Penelitian

Pada penelitian sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus Novergicus*) jantan, galur Spraque Dawley yang berumur 8 hari dengan jumlah 30 ekor. Sampel tersebut akan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol, kelompok yang dilakukan pendedahan pewangi ruangan gel, dan spray

1. Perhitungan Besar Sampel

Jumlah ulangan yang dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus *Federer* dengan kelompok perlakuan berjumlah 3.

Rumus *Federer* : $(n-1)(t-1) \geq 15$; jumlah $t = 3$ kelompok, $n =$ jumlah ulangan

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

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

2. Kriteria subjek penelitian

- a. Bayi tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, galur Spraque Dawley.
- b. Pendedahan subjek dimulai pada usia 8 hari.
- c. Subjek didapat dari induk yang sehat.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Penelitian dilakukan selama 8 bulan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gajah Mada.
3. Pengamatan preparat dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Pendedahan pewangi ruangan jenis gel dan spray.

2. Variabel terikat

Gambaran histologi kerusakan hepar pada tikus putih (*Rattus Novergicus*)

3. Variabel terkontrol

- a. Subjek penelitian.

- 1) Jenis kelamin semua sampel jantan.
- 2) Umur tikus 8 hari mulai dilakukan pendedahan.

3) Jenis tikus yang digunakan sama yaitu galur Spraque Dawley.

b. Perawatan subjek

Jenis dan kualitas makanan dan minuman diusahakan sama.

c. Bahan coba

Penggunaan pewangi ruangan dengan merek dan aroma yang sama pada jenis gel dan spray.

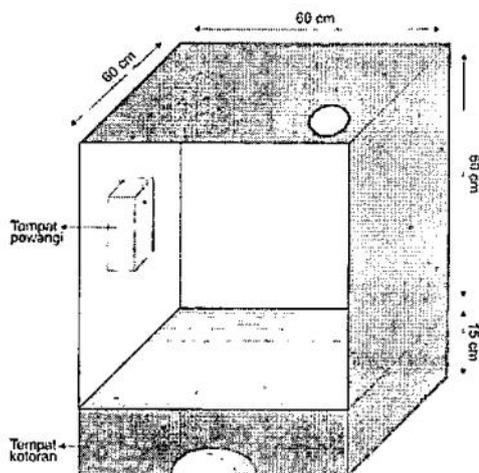
E. Definisi Operasional

1. Gambaran kerusakan histologi hepar pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

Gambaran histopatologis hepar tikus dinilai dengan menghitung tingkat kerusakan tingkat hepatosit berdasarkan skor derajat perubahan struktur histopatologis sel hepar menurut Manja Roenigk dikutip dari Sugeng (2012) sebagai berikut:

- a. Normal : tampak sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen, dinding sel berbatas tegas.
- b. Degenerasi parenkimatos: pembengkakan sel disertai sitoplasma keruh bergranula.
- c. Degenerasi hidropik : tampak sel sembab, akumulasi cairan dan terdapat banyak vakuola.
- d. Nekrosis : kerusakan permanen sel atau kematian sel, terdapat 3 bentuk yaitu :
 - a) Piknotik : tampak inti sel kecil berwarna gelap (basofilik) dan sitoplasma sel kemerahan.

- b) Karioreksis : sel mengecil, kontur sel ireguler, fagmentasi inti sel menjadi beberapa bagian kecil.
- c) Kariolisis : inti sel hilang
2. Pewangi ruangan gel : produk beraroma jeruk yang digunakan untuk mengurangi bau yang tidak menyenangkan di ruangan tertutup dengan bahan dasar gel.
 3. Pewangi ruangan spray : produk beraroma jeruk yang digunakan untuk mengurangi bau yang tidak menyenangkan di ruangan tertutup dengan bahan dasar cair.
 4. Bayi tikus : tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, galur Spraque Dowley yang didedahkan mulai umur 8 hari.
 5. Kandang perlakuan : kandang yang terbuat dari kayu dengan ukuran 60x60x60 cm dan ditambahkan kaki disetiap sisinya setinggi 15 cm.



Gambar 3. Kandang Perlakuan

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat yang digunakan adalah sebagai berikut :
 - a. Kandang perlakuan ukuran 60x60x60 cm
 - b. Kandang pemeliharaan
 - c. Timbangan badan merek Casbee (kapasitas 1000x0,1 g)
 - d. Pot air
 - e. Komputer
 - f. Software optilab
 - g. Mikroskop binokuler
 - h. Alat timbang organ merek ACIS dengan skala 0,01 g
 - i. Tisu dan kapas
 - j. Bakerglass
2. Bahan yang digunakan pada penelitian adalah sebagai berikut :
 - a. Tiga puluh ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, galur Spraque Dawley umur 8 hari.
 - b. Pewangi ruangan gel dan spray bermerek sama dengan aroma jeruk berbahan aktif formalin.
 - c. Aquades
 - d. Formalin 10%
 - e. Kloroform
 - f. NaCl fisiologis
 - g. Ajr Mineral
 - h. Pakan hewan percobaan (AD)

- i. Alkohol 70%

G. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji berupa bayi tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) yang sudah memenuhi kriteria subjek penelitian. Setelah itu hewan uji dilakukan uji adaptasi selama satu minggu di kandang pemeliharaan. Hewan uji dipelihara di kandang pemeliharaan dan diberikan makan serta minum standar.

2. Pengelompokkan Hewan Uji

Hewan uji yang diberikan perlakuan berjumlah 30 ekor dan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok K, kelompok P1, dan kelompok P2. Pembagian kelompok tersebut dilakukan secara acak dengan jumlah tiap kelompok 10 ekor. Tiap kelompok hewan uji akan diletakkan pada kandang khusus yang telah diberi label jenis perlakuan.

3. Pendedahan Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan gel digantung di tepi kandang perlakuan pada kelompok perlakuan gel. Pada kelompok perlakuan spray, pewangi disemprotkan 10 kali diawal pemaparan. Pendedahan pewangi ruangan dilakukan selama 67 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan diberikan sesuai dengan pembagian kelompok hewan uji.

- a. Kelompok P1 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan berbentuk gel. Dosis awal pendedahan pewangi ruangan gel adalah 15 menit. Dosis kemudian meningkat tiap 7 hari selama 67 hari. Pendedahan sehari dilakukan 2 kali pada pagi dan sore. Sampai hari ke-67, dosis akhir yang diberikan selama empat jam. Pendedahan dilakukan secara bertahap untuk menghindari kematian bayi tikus akibat organ tubuhnya yang belum terbentuk sempurna.
- b. Kelompok P2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan berbentuk spray. Dosis awal pendedahan pewangi ruangan spray adalah 15 menit. Dosis kemudian meningkat tiap 7 hari selama 67 hari. Pendedahan sehari dilakukan 2 kali pada pagi dan sore. Sampai hari ke-67, dosis akhir yang diberikan selama empat jam. Pendedahan dilakukan secara bertahap untuk menghindari kematian bayi tikus akibat organ tubuhnya yang belum terbentuk sempurna.
- c. Kelompok kontrol tidak didedahkan pewangi ruangan.

5. Pemeliharaan

Awal pemberian pakan standar hewan uji diberikan sebanyak 20 gr setiap hari. Jumlah pakan bertambah sesuai bertambahnya umur tikus.

Minum hewan uji diberikan setiap hari berupa air mineral.

Pembersihan kandang pemeliharaan tikus dilakukan 1 minggu sekali.

6. Pembedahan dan pengambilan organ

Pembedahan hewan uji dilakukan pada hari ke-68 diberikan pembedahan. Sebelum dibedah, tikus ditimbang terlebih dahulu. Tikus kemudian dimatikan dengan memasukkannya ke toples berisi kloroform 10% dan dibedah menggunakan alat bedah minor. Organ hepar diambil lalu disimpan pada pot air yang berisi formalin 10%.

7. Pembuatan preparat hepar yang telah diawetkan dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin menggunakan teknik perwarnaan Hematoxylin dan Eosin (HE).

8. Uji Histopatologi

Preparat yang telah selesai dibuat, diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x10 di daerah vena centralis sejumlah 5 lapang pandang dan dilihat apakah terdapat kerusakan pada sel hepar. Pengamatan dilakukan pada semua kelompok perlakuan.

H. Analisis data

Data yang telah diperoleh setelah penelitian diuji secara statistik. Untuk mengetahui normalitas distribusi data menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Diperoleh hasil distribusi datanya normal, kemudian dilakukan uji beda dengan *One Way Anova* dan uji analisis Post Hoc Tukey Test (Bonferroni) untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* jantan yang diperlakukan sebagai hewan uji namun tetap memperhatikan hewan uji tersebut sebagai makhluk hidup. Perlakuan pada tikus ini juga sesuai dengan kode etik perlakuan makhluk hidup selama masa perlakuan. Selain itu, saat akhir penelitian dilakukan pembedahan tikus untuk pengambilan organ hepar untuk mengetahui gambaran histologinya. Sebelum pembedahan tikus dibunuh dengan cara memasukkan ke dalam toples tertutup berisi kapas kloroform. Pembedahan dilakukan setelah tikus mati agar tidak menyakiti tikus

J. Alur Penelitian