

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Design penelitian yang dilakukan adalah adalah eksperimental murni dengan *Post Test Only Control Group Design* yaitu kegiatan percobaan yang dilakukan dengan cara memberikan intervensi pada tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* usia 2 bulan dengan cara memberikan paparan lalu dilakukan pengamatan setelah terjadinya paparan (post test). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang ditimbulkan (Perubahan Gambaran Histologi Sel Hepar), sebagai akibat dari adanya paparan dari obat nyamuk spray dan obat nyamuk *one push*.

B. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* Galur *Wistar* dengan usia dewasa 2 bulan sebanyak 30 ekor. Subyek yang diambil dalam penelitian ini mempunyai kriteria yaitu :

Kriteria Inklusi

1. Usia 2 bulan
2. Dalam keadaan sehat (lincah)
3. Berat badan 100-150 gram
4. Tidak terdapat kelainan anatomi
5. Hewan percobaan diletakkan dalam ruangan suhu berkisar 25-28°C

Kriteria Eklusi

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

Penentuan sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer:

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

$$(5-1)(n-1) > 15$$

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

$$4n-4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 5$$

Keterangan:

k= jumlah kelompok

n= jumlah sampel dalam setiap kelompok

Pada penelitian ini jumlah sampel dalam tiap kelompok ditentukan sebanyak 6 ekor tikus putih (>5) dan jumlah kelompok tikus putih ada 5, sehingga penelitian ini membutuhkan 30 ekor tikus putih dari populasi yang ada. Pengambilan sampel dilakukan dengan *allocation random sampling*. Pengelompokan dilakukan secara acak (*Simple Random Sampling*). Sampel terpilih dibagi menjadi lima kelompok yaitu satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan dengan jumlah tikus 6 ekor tiap kelompok.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang perlakuan hewan uji dan pembedahan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- b. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Asri Medical Center
- c. Pengamatan, penelitian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 125 hari

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

- a. Paparan obat nyamuk spray
- b. Paparan obat nyamuk *one push*

2. Variabel Tergantung

Perubahan gambaran histologi sel hepar tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* usia dewasa (2 bulan)

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 Oprasional

1. Obat Nyamuk *Spray*

Obat nyamuk spray adalah obat nyamuk dalam bentuk cairan. Cara penggunaan dari obat nyamuk jenis ini adalah dengan cara disemprotkan pada ruangan. Obat nyamuk spray memiliki 3 bahan aktif yaitu *pralethrin* (0,1%), *siflutrin* (0,05%) dan *d-allathrin* (0,057%) (Fumakila, 2015).

2. Obat Nyamuk *One push*

Obat nyamuk *one push* adalah obat nyamuk dengan sediaan berupa botol kecil. Obat nyamuk ini cara penggunaannya hanya satu kali semprot ke dalam ruangan. Obat nyamuk one push memiliki kandungan aktif *transfultrin* (21,3%) (Fumakila, 2015).

3. Perubahan Gambaran Histologi Hepar

Terjadi perubahan gambaran mikroskopik histologi sel hepar, kemudian dari jumlah sel yang mengalami kerusakan dihitung jumlah skor kerusakannya menurut skor Manja Roenigk.

a. Sel hepar normal

Sel hepar normal memiliki bentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen (bersifat eosinofilik) dan memiliki dinding sel yang berbatas tegas. Sel hepar normal memiliki skor 1 menurut skor Manja Roenigk.

b. 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.

c. Degenerasi hidropik

Sitoplasma pucat, tampak vakuola pada sitoplasma sel maupun disekeliling inti sel dan vakuola tampak jernih karna adanya penimbunan cairan dalam sel. Degenerasi hidropik memiliki skor 3 menurut skor Manja Roenigk.

d. Nekrosis

Sel mengalami kematian sel dengan perubahan inti sel dengan terlihat lebih kecil, kromatin dan serabut retikuler menjadi berlipat-lipat. Nekrosis memiliki skor 4 menurut skor Manja Roenigk.

Secara mikroskopis, setiap lobus hati terbagi menjadi struktur-struktur yang disebut lobulus. Setiap lobulus merupakan badan heksagonal yang terdiri dari lempeng-lempeng hati yang berbentuk kubus, tersusun radial mengelilingi vena sentralis yang mengalirkan darah dari lobulus. Diantara sel-sel hati terdapat kapiler-kapiler yang disebut sinusoid. Sinusoid dibatasi oleh sel *kupffer* yang fungsi utamanya menelan bakteri dan benda asing dalam darah (Price dan Lorraine, 2006)

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: kandang pemeliharaan, kandang perlakuan, sarung tangan, perlengkapan makan, minor set, mikroskop, gelas benda, sarung tangan latex, masker, papan pembedahan, pot air, dan software optilab.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* berumur 2 bulan, pakan standar tikus, air mineral, formalin buffer, kloroform, NaCl fisiologis, alkohol, kapas, obat nyamuk spray yang berbahan aktif Praletrin; Siflutrin; D-Aletrin, dan obat nyamuk *one push* yang berbahan aktif transfultrin

G. Jalannya Penelitian

1. Adaptasi hewan uji coba selama satu minggu terhadap kondisi laboratorium/penelitian. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum.
2. Pengelompokan hewan coba ke dalam 5 kelompok, yang terdiri dari:
 - a. Kelompok kontrol (K)
 - b. Kelompok perlakuan 1 (P1)
 - c. Kelompok perlakuan 2 (P2)
 - d. Kelompok perlakuan 3 (P3)
 - e. Kelompok perlakuan 4 (P4)

Setiap kelompok terdiri dari 6 tikus

3. Pemberian tanda pada semua subyek penelitian dengan menggunakan pikrat
4. Pemberian perlakuan :
 - a. Tikus dipindahkan ke kandang perlakuan sesuai kelompoknya
 - b. Tikus yang sudah dipindahkan ke kandang perlakuan kemudian didedahkan dengan obat nyamuk
 - c. Kandang kelompok perlakuan sebagai kontrol (K) dimasukan kedalam kandang dan tetap dibiarkan tanpa perlakuan.
 - d. Kandang kelompok perlakuan 1 (P1) menggunakan obat nyamuk *one push* selama 5 menit
 - e. Kandang kelompok perlakuan 2 (P2) menggunakan obat nyamuk *one push* selama 10 menit
 - f. Kandang kelompok perlakuan 3 (P3) menggunakan obat nyamuk *spray* selama 5 menit
 - g. Kandang kelompok perlakuan 4 (P4) menggunakan obat nyamuk *spray* selama 10 menit
 - h. Dilakukan perlakuan tersebut selama 60 hari
5. Pembedahan tikus :
 - a. Tikus di korbakan dengan cara kapas diberi larutan kloroform, kapas yang sudah diberi kloroform di letakkan di kandang tikus
 - b. Tikus yang sudah tidak sadarkan diri segera dibedah dengan menggunakan alat minor set untuk mengambil organ
 - c. Organ yang diambil adalah hepar, dibersihkan dengan NaCl

- d. Organ yang telah diambil dimasukan kedalam pot air yang telah di isi dengan formalin, kemudian ditutup dengan rapat
 - e. Pembuatan preparat dengan menggunakan metode blok paraffin, dengan tekhnik pewarnaan hematoxylin eosin.
6. Pengamatan preparat histologis hepar
 7. Pengumpulan data dan analisis statistika
 8. Penyusunan laporan

H. Cara Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran perubahan sel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dari kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari seluruh sampel berjumlah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, dibuat 5 kelompok masing-masing terdiri dari 6 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 obat nyamuk *one push* dan obat nyamuk *spray* yang diberi pakan standar serta minum dengan air mineral. Kelima 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 obat nyamuk *one push* selama 5 menit/hari dalam 60 hari

P2 : Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan obat nyamuk *one push* selama 10 menit/hari dalam 60 hari

P3 : Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan obat nyamuk *spray* selama 5 menit/hari dalam 60 hari

P4 : Tikus diberi pakan standar dan minum dengan air mineral serta mendapat perlakuan obat nyamuk *spray* selama 10 menit/hari dalam 60 hari

Data yang diambil berupa gambaran hasil pengamatan mikroskopik preparat hepar tikus berupa perubahan sel yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik dengan perbesaran 400x melalui lima lapang pandang yang berbeda.

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 100-150gram. Setelah itu, hewan uji yang telah dipilih dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dengan diberikan pakan standard dan minum di kandang perawatan.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi pada sampel diambil sebanyak 30 ekor kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dengan kode K dan 4 kelompok perlakuan dengan kode P1, P2, P3 dan P4. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Kelompok kontrol tidak dilakukan perlakuan, sedangkan kelompok perlakuan diberi perlakuan obat nyamuk *one push* dan *spray*.

3. Pemaparan Obat Nyamuk *One push* dan Obat Nyamuk *Spray*

Obat nyamuk *one push* dan obat nyamuk *spray* diletakkan di dalam kandang perlakuan pada jarak yang aman dari hewan uji coba. Obat nyamuk *one push* dan obat nyamuk *spray* diletakan bersama dengan hewan uji coba. Pemaparan dilakukan sesuai dengan waktu pada masing-masing kelompok.

4. Perlakuan

a. Kelompok Kontrol

Pada kelompok ini hewan uji coba hanya diletakan di dalam kandang perlakuan tanpa diberikan paparan berupa obat nyamuk *one push* dan obat nyamuk *spray* selama 60 hari.

b. Kelompok Obat Nyamuk *One Push 5 Menit*

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan obat nyamuk *one push* selama 5 menit/hari dalam waktu 60 hari.

c. Kelompok Obat Nyamuk *One Push 10 Menit*

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan obat nyamuk *one push* selama 10 menit/hari dalam waktu 60 hari.

d. Kelompok Obat Nyamuk *Spray 5 Menit*

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan obat nyamuk *spray* selama 5 menit/hari dalam waktu 60 hari.

e. Kelompok Obat Nyamuk *Spray* 10 Menit

Pada kelompok ini hewan uji coba diletakan di dalam kandang perlakuan dengan diberikan paparan obat nyamuk spray selama 10 menit/hari dalam waktu 60 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman diberikan setiap sore hari. Setiap seminggu sekali dilakukan penimbangan berat badan pada masing-masing tikus putih agar kesehatan hewan uji dapat terpantau. Pembersihan kandang dilakukan 3 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 60 hari berturut-turut. Setelah hari ke-61 dilakukan pembedahan pada semua hewan uji coba dengan dilakukan anastesi terlebih dahulu menggunakan khloroform. 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 formalin 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 khloroform.

b. Pembedahan

Setelah hewan terbius sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan tubuh lalu dipotong-potong di dalam 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 pemerosesan jaringan selanjutnya.

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 meliputi:

a. Dehidrasi

Langkah ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan paraffin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan paraffin 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 paraffin.

c. Pembenaman (*Embedding/Impregnasi*)

Pembenaman adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan paraffin. 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 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 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 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 preparat histologi hepar

Preparat dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dalam 5 lapang pandang, yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat. Sasaran yang dibaca adalah tingkat kerusakan hepatosit dengan menggunakan kriteria penilaian derajat perubahan struktur histopatologi

hepatosit berdasarkan skoring kriteria Manja Roenigk yang dapat dilihat pada Tabel 1.

I. Analisis Data

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan terhadap sel hepar dilakukan uji normalitas terhadap sebaran data menggunakan Kolmogorov-Smirnov. Didapatkan sebaran data yang tidak normal, maka dilanjutkan dengan analisis statistik uji non parametric perbandingan yaitu uji *Khruskal Wallis*.