

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian menggunakan desain penelitian Eksperimental Murni dengan *post test only control group design* yaitu 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 Renal) sebagai suatu akibat dari adanya paparan dari obat nyamuk spray dan obat nyamuk one push.

B. Subjek penelitian

Menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* Galur Wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi:

Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan
- b. Galur wistar
- c. Umur 2 bulan
- d. Berat badan 100-150gram
- e. Hewan percobaan diletakkan dalam ruangan dengan suhu berkisar 25-28°C
- f. Dalam keadaan sehat (lincah) dan tidak terdapat kelainan anatomi
- g. Makanan yang diberikan berupa pakan standar dan air mineral

Kriteria Eksklusi

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

Penentuan sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer:

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

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

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

$$4n-4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 5$$

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 cara *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 pemeliharaan hewan uji dan pembedahan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- b. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Centre
- 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 kurang lebih 125 hari

D. Variabel

1. Variabel Bebas

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

2. Variabel Tergantung

Perubahan gambaran histologi renal tikus *Rattus norvegicus* Galur Wistar usia dewasa (2 bulan)

E. Definisi Operasional

1. Obat nyamuk spray

Obat nyamuk spray adalah obat nyamuk dalam bentuk cairan. Cara penggunaan dari obat nyamuk jenis ini yaitu dengan cara disemprotkan pada ruangan. Obat nyamuk spray memiliki 3 bahan aktif yaitu *praletrin* (0,1%), *sifultrin* (0,05%) dan *d-alettrin* (0,57%). (Fumakila, 2015)

2. Obat nyamuk one push

Obat nyamuk one push adalah obat nyamuk dengan sediaan berupa botol kecil yang berisikan 10 ml. Obat nyamuk jenis ini penggunaannya hanya memerlukan satu kali semprot pada ruangan. Obat nyamuk one push memiliki kandungan aktif *transfultrin* (21,3%). (Fumakila, 2015)

3. Perubahan gambaran histologi renal

Diamati perubahan histologi berupa pelebaran lumen glomerulus dan penyempitan *space bowman* dengan 10 bagian lapang pandang dan dengan perbesaran 40X.

- a. Lumen glomerulus: bagian ginjal yang merupakan anyaman pembuluh darah kapiler dimana dindingnya bertaut menjadi satu dengan dinding kapsula bowman. Glomerulus berfungsi untuk menyaring darah, hasil saringan glomerulus adalah urin primer yang mengandung air, garam, asam amino, glukosa, urea dan zat-zat lain. Hasil penyaringan ini kemudian di tampung oleh kapsula bowman. (Junqueira, 1998)

- b. *Space bowman*: suatu ruangan atau celah antara kapsula bowman dengan lumen glomerulus.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang akan digunakan adalah kandang pemeliharaan, kandang perlakuan, perlengkapan makan, perlengkapan bedah hewan percobaan (minor set), mikroskop cahaya, gelas benda, papan pembedahan, pot air, software optilab, sarung tangan latex, masker, tisu kering.

2. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah obat nyamuk spray, obat nyamuk one push, pakan standar tikus, air mineral, formalin buffer 10%, khloroform, NaCl fisiologis, alkohol 70%, kapas, bahan untuk pembuatan preparat histologi dengan pengecatan HE.

G. Jalannya Penelitian

1. Aklimatisasi atau adaptasi hewan coba selama satu minggu
2. Pengelompokan hewan coba ke dalam lima kelompok, yang terdiri dari:
 - c. Kelompok kontrol
 - d. Kelompok eksperimental 1
 - e. Kelompok eksperimental 2
 - f. Kelompok eksperimental 3
 - g. Kelompok eksperimental 4

Setiap kelompok terdiri dari 6 tikus

3. Pemberian tanda pada subjek penelitian dengan menggunakan pikrat
4. Pemberian perlakuan:
 - a. Tikus dipindahkan ke kandang perlakuan
 - b. Tikus yang telah dipindahkan ke kandang perlakuan di dedahkan dengan obat nyamuk
 - c. Tikus kelompok 1 sebagai kontrol dimasukkan ke dalam kandang dan tetap dibiarkan tanpa perlakuan
 - d. Tikus kelompok 2 dengan menggunakan obat nyamuk *one push* selama 5 menit
 - e. Tikus kelompok 3 dengan menggunakan obat nyamuk *one push* selama 10 menit
 - f. Tikus kelompok 4 dengan menggunakan obat nyamuk *spray* selama 5 menit
 - g. Tikus kelompok 5 dengan menggunakan obat nyamuk *spray* selama 10 menit
 - h. Dilakukan perlakuan selama 60 hari
5. Pembedahan tikus
 - a. Tikus di bius dengan cara kapas diberi kloroform kemudian diletakkan di dalam kandang
 - b. Bedah tikus dengan menggunakan alat minor set
 - c. Organ yang di ambil adalah renal
 - d. Organ yang telah di ambil dimasukkan ke dalam pot air yang telah diisi dengan formalin, kemudian di tutup dengan rapat

- e. Pembuatan preparat dengan menggunakan metode blok paraffin, dengan teknik pewarnaan hematoxilyn eosin
6. Pengamatan preparat renal
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 diameter glomerulus dan ukuran *space bowman* 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 renal tikus berupa perubahan diameter glomerulus dan ukuran *space bowman* yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik dengan perbesaran 400x melalui sepuluh lapang pandang yang berbeda. Penilaian pembacaan preparat dengan cara mengukur diameter glomerulus dan ukuran *space bowman*.

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 an 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 diletakan 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

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.

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.

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.

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.

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 secara *ad libitum* 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 renal. 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 ditriming dan difiksasi dalam NaCl fisiologis.

c. Isolasi jaringan tubuh

Potongan jaringan kemudian dimasukkan kedalam pot air 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 renal 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 Histologis

Preparat diamati pada bagian korteks yaitu lumen glomerulus dan *space bowman* tiap lapang pandang. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x10 kali dan 40x10 kali.

I. Cara pengumpulan Data

Data ditabulasi dan dilanjutkan dengan melakukan uji normalitas terhadap sebaran data. Pada penelitian ini sebaran data normal, maka dilanjutkan dengan analisis statistik uji parametrik perbandingan yaitu uji *One Way Annova*.