

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni dengan rancangan percobaan *post test only control group design*. Pengambilan hewan uji sebagai sampel dilakukan dengan cara random pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

#### **B. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian ini adalah adalah 30 ekor tikus *Rattus norvegicus Galur Wistar* jantan dengan usia dewasa 2 bulan. Subyek yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kriteria yaitu :

Kriteria inklusi :

- a. Usia 2 bulan
- b. Sehat
- c. Berat 200-250 gram
- d. Tidak ada kelainan anatomi

Kriteria eksklusi :

- a. Terdapat kelainan anatomi
- b. Tikus tidak sehat

## **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 histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Center Yogyakarta.
- c. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan selama 120 hari.

## **D. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel Bebas**

Pemberian perlakuan obat nyamuk *one push* selama 5 menit dan 10 menit serta obat nyamuk *spray* selama 5 menit dan 10 menit selama 60 hari.

## 2. Variabel Terikat

Perubahan gambaran histologi pada diameter trakhea, ketebalan epitel trakhea dan kerusakan epitel pada trakhea tikus putih (*Rattus norvegicus*).

## 3. Variabel Terkendali

a. Subyek penelitian, meliputi

- 1) Jenis hewan uji sama yaitu dari galur *Wistar*.
- 2) Jenis kelamin hewan uji sama, yaitu jantan.
- 3) Umur hewan uji sama, yaitu 2 bulan.

b. Perawatan : jenis dan kualitas pakan, minum, serta kandang setiap hewan uji sama.

c. Bahan perlakuan : penggunaan obat nyamuk *spray* dan obat nyamuk *one push* dengan aroma jeruk dari produsen yang sama.

## E. Definisi Operasional

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

2. Obat nyamuk *One push* adalah obat nyamuk dengan sediaan berupa botol kecil berukuran 22 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. Diameter trakhea adalah diameter trakhea yang diamati pada potongan melintang trakhea. Pengukuran dilakukan dengan alat bantu “Miconos Sigma” dengan perbesaran 4x10 dan dihitung diameter trakhea dalam satu lapang pandang. Diameter dihitung dari keliling dalam trakhea menggunakan rumus lingkaran menggunakan software “Image J” menggunakan satuan mikrometer.
4. Ketebalan epitel trakhea adalah ketebalan yang diukur dari membrane basalis sampai ujung apikal dari sel epitel trakhea menggunakan software “OptiLab”.
5. Durasi adalah lamanya pemberian inhalasi obat nyamuk per hari yaitu 5 dan 10 menit.
6. Jangka waktu adalah total hari pemberian perlakuan sesuai durasi yang diberikan selama 60 hari.

## G. Jalannya Penelitian

1. Aklimasi atau adaptasi hewan coba selama satu minggu.
2. Pengelompokan hewan coba ke dalam 5 kelompok, yang terdiri dari :
  - a. Kelompok kontrol
  - b. Kelompok *Spray* 5 menit (P1)
  - c. Kelompok *One push* 5 menit (P2)
  - d. Kelompok *Spray* 10 menit (P3)
  - e. Kelompok *One push* 10 menit (P4)

Setiap kelompok terdiri dari 6 tikus.

3. Pemberian tanda pada subyek penelitian dengan menggunakan pikrat.
4. Pemberian perlakuan
  - a. Tikus dipindahkan ke kandang perlakuan.
  - b. Tikus yang telah dipindahkan ke kandang perlakuan diberi semprotan obat nyamuk.
  - c. Tikus kelompok perlakuan kontrol dimasukkan ke dalam kandang dan tetap dibiarkan tanpa diberikan perlakuan.
  - d. Tikus eksperimen 1 (P1) diinhalasi menggunakan obat nyamuk *spray* selama 5 menit, tikus eksperimen 2 (P2) diinhalasi menggunakan obat nyamuk *one push* selama 5 menit, tikus eksperimen 3 (P3) diinhalasi menggunakan obat nyamuk *spray* selama 10 menit, tikus eksperimen 4 (P4) diinhalasi menggunakan obat nyamuk *one push* selama 10 menit.
  - e. Perlakuan diberikan selama 60 hari.

## 5. Pembedahan tikus

- a. Tikus dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam toples yang berisi kapas yang telah diberikan kloroform. Tikus yang sudah tidak sadarkan diri (mati) segera dibedah.
- b. Tikus dibedah dengan menggunakan alat minor set.
- c. Organ yang telah diambil dibersihkan dengan NaCl fisiologis, selanjutna
- d. Organ yang dimasukkan ke dalam pot air yang telah diisi dengan formalin buffer 10%, kemudian tutup dengan rapat.

## 6. Pembuatan preparat

Organ trakhea yang telah dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer 10% dibuat preparat histologi dengan metode paraffin menggunakan teknik pewarnaan Hematoksin 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 paraffin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini bertujuan agar air tidak bercampur dengan cairan paraffin atau zat lain yang digunakan untuk membuat blok preparat.

b. Pembeningan (*Clearing*)

Pembeningan adalah tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan mengganti dengan larutan yang berikatan dengan paraffin.

c. Pembenaman (*Embedding/Impregnasi*)

Pembenaman (*impregnasi*) adalah proses mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan diganti dengan paraffin. Pada tahap ini jaringan harus bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan saat dipotong dengan mikrotom membuat jaringan menjadi mudah robek.

d. Pengecoran (*Blocking*)

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

e. Pemotongan

Pemotongan (*Mounting*) adalah proses pemotongan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom (Jusuf, 2009).

#### 7. Pengamatan preparat:

- a. Ketebalan epitel : Pengamatan ketebalan epitel trakhea menggunakan mikroskop dengan perbesaran lemah 4x10 dalam 1 lapang pandang sebanyak 4 kali.
- b. Diameter trakhea : Pengamatan diameter ketebalan epitel trakhea menggunakan mikroskop dengan perbesaran lemah 4x10 sebanyak 1 lapang pandang.

### H. Analisis Data

Data ditabulasi dan dilanjutkan dengan melakukan uji normalitas terhadap sebaran data yaitu dengan Saphiro Wilk. Data dianalisis dengan uji statistik parametrik perbandingan yaitu *One Way ANOVA* karena sebaran data normal. Untuk mencari letak perbedaan dari 5 kelompok yang dibandingkan digunakan metode *Post Hoc Duncan*.

### I. Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang 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. Etika penelitian diperoleh dari komisi etik FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.