

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan sebagai penelitian eksperimental. Penelitian menggunakan rancangan percobaan *post-test only control group*. Pengambilan sampel dilakukan secara randomisasi. Penelitian ini dilakukan untuk melihat perbandingan pengaruh antara bensin jenis Premium dan Pertamina terhadap gambaran histologi trakhea tikus putih.

B. Subyek Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, galur *Sprague Dawley* (SD), berjumlah 27 ekor yang didapatkan dari laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi sampel adalah sebagai berikut:

a) Kriteria Inklusi :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*), jantan, galur Sprague Dawley.
- 2) Berumur 8 minggu.
- 3) Berat badan 150-250 gram.

b) Kriteria Eksklusi :

- 1) Terdapat abnormalitas anatomi yang nampak oleh mata.
- 2) Tikus tampak sakit, tidak bergerak secara aktif.

3) Tikus yang mati selama penelitian

c) Cara Pengambilan Sampel

Cara pengambilan sampel pada penelitian ini adalah menggunakan cara *Random Sampling*.

d) Cara Penghitungan Sampel

Untuk penelitian eksperimental dengan pengambilan sampel randomisasi dapat menggunakan rumus Federer (Supranto, 2000) yaitu:

$$\text{Rumus Federer} = (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = Jumlah kelompok perlakuan

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok Kontrol (K), kelompok perlakuan Pertamax (P1) dan kelompok perlakuan Premium (P2). Maka menurut rumus penghitungan sampel

Jadi, sampel untuk masing-masing kelompok perlakuan berjumlah minimal 9 ekor.

C. Populasi Dan Sampel Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan jumlah sampel sebanyak dua puluh tujuh ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan 9 ekor diberi perlakuan bensin jenis Premium, 9 ekor diberi perlakuan bensin jenis Pertamina, dan 9 ekor sebagai Kontrol.

D. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Keseluruhan penelitian dilakukan dalam kurun waktu 5 bulan. Pendedahan dilakukan dalam kurun waktu 30 hari untuk mencapai tujuan waktu pajanan toksisitas kronis (ATSDR, 2005). Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi FKIK UMY dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Paparan uap bensin jenis Premium dan Pertamina.
2. Variabel tergantung: Gambaran histologi trakhea *Rattus norvegicus*, yaitu ketebalan epitel, kondisi epitel, jumlah sel goblet, infiltrasi sel leukosit, dan lain-lain.

3. Variabel kontrol: Usia, jenis kelamin, berat badan, tempat penelitian, lama perlakuan, waktu pemeriksaan.

F. Definisi Operasional

1. Kontrol adalah kondisi tidak terdedah yang dilabeli dengan K.
2. Pertamax adalah jenis bensin berwarna biru berangka oktan 92 yang tidak mengandung timbal dan sebagai gantinya mengandung MTBE yang didedahkan menggunakan label P1.
3. Premium adalah jenis bensin berwarna kekuningan jernih berangka oktan 88 yang mengandung timbal dan didedahkan menggunakan label P2.
4. Gambaran histologi trakhea adalah gambaran jaringan mikroskopik trakhea yang diamati pada mikroskop cahaya dengan fokus perbesaran (40x10) dan yang diamati adalah ketebalan epitel dan komponen yang ada di dalamnya.
5. Waktu pajanan kronis adalah waktu risiko terpajan suatu substansi selama lebih dari 21 hari hingga dapat menimbulkan efek toksisitas kronis menurut *Agency for Toxic Substance and Disease Registry* (ATSDR).

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Kandang tempat perlakuan hewan uji.
2. Kotak hewan uji.
3. Perlengkapan bedah.

4. Timbangan digital dengan skala pengukuran 0,1 gram.
5. Tempat penyimpanan organ.
6. Masker dan handscoon.
7. Sduit 3 cc.
8. Dua puluh tujuh ekor tikus putih jantan berumur 8 minggu dengan berat badan 150-250 gram.
9. Bensin Premium dan Pertamina.
10. Wadah untuk menguapkan bensin.
11. Alkohol 70%.
12. Makanan standar tikus dan air minum.
13. Benang tipis.
14. Formalin 10%.
15. Mikroskop cahaya.
16. Software komputer OptiLab.

H. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu *Rattus norvegicus* jantan. Hewan uji ditimbang dan dipilih yang mempunyai berat badan 150-250 gram.

2. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Dua puluh tujuh hewan uji dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok dan ditempatkan di kotak hewan uji yang telah dilabeli jenis perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang terbagi atas

satu kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Masing-masing tikus pada setiap kelompok diberikan tanda pada kepala, kepala punggung, punggung, kepala ekor, punggung ekor, kepala punggung ekor, ekor, kaki dan tanpa tanda untuk memudahkan pengamatan.

Pembagian kelompok secara acak dengan masing perlakuan adalah:

- a) Kelompok Kontrol (K), yaitu kelompok hewan uji yang tidak didedahkan bensin.
- b) Kelompok Pertamax (P1), yaitu kelompok hewan uji yang didedahkan uap bensin Pertamax. Pendedahan dilakukan selama 8 jam/hari selama 30 hari.
- c) Kelompok Premium (P2), yaitu kelompok hewan uji yang didedahkan uap bensin Premium. Pendedahan dilakukan selama 8 jam/hari selama 30 hari.

3. Pendedahan Uap Bensin

Bensin dimasukkan ke dalam wadah yang bisa menguapkan bensin. Wadah diletakkan di box hewan uji berisi tikus agar uap bensin bisa terhirup tikus, kemudian diletakkan di kandang tempat perlakuan hewan uji. Pemaparan dilakukan 8 jam/hari pada setiap kelompok perlakuan.

4. Pemeliharaan

Pakan dan minum diberikan pada semua kelompok percobaan dan setiap dua hari sekali dilakukan penimbangan berat badan. Tujuannya agar kesehatan hewan uji dapat dipantau dan menjaga berat badan tetap dalam batas

5. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya selama 30 hari. Setelah hari ke-31, dilakukan pembedahan pada hewan uji. Sebelum pembedahan, tikus dimatikan dengan cara penarikan tulang belakang. Pembedahan menggunakan alat-alat bedah sederhana dan dilakukan pengambilan organ yang akan diteliti. Organ yang telah diambil akan diinjeksikan dengan formalin dan direndam ke dalam formalin.

6. Pembuatan Preparat

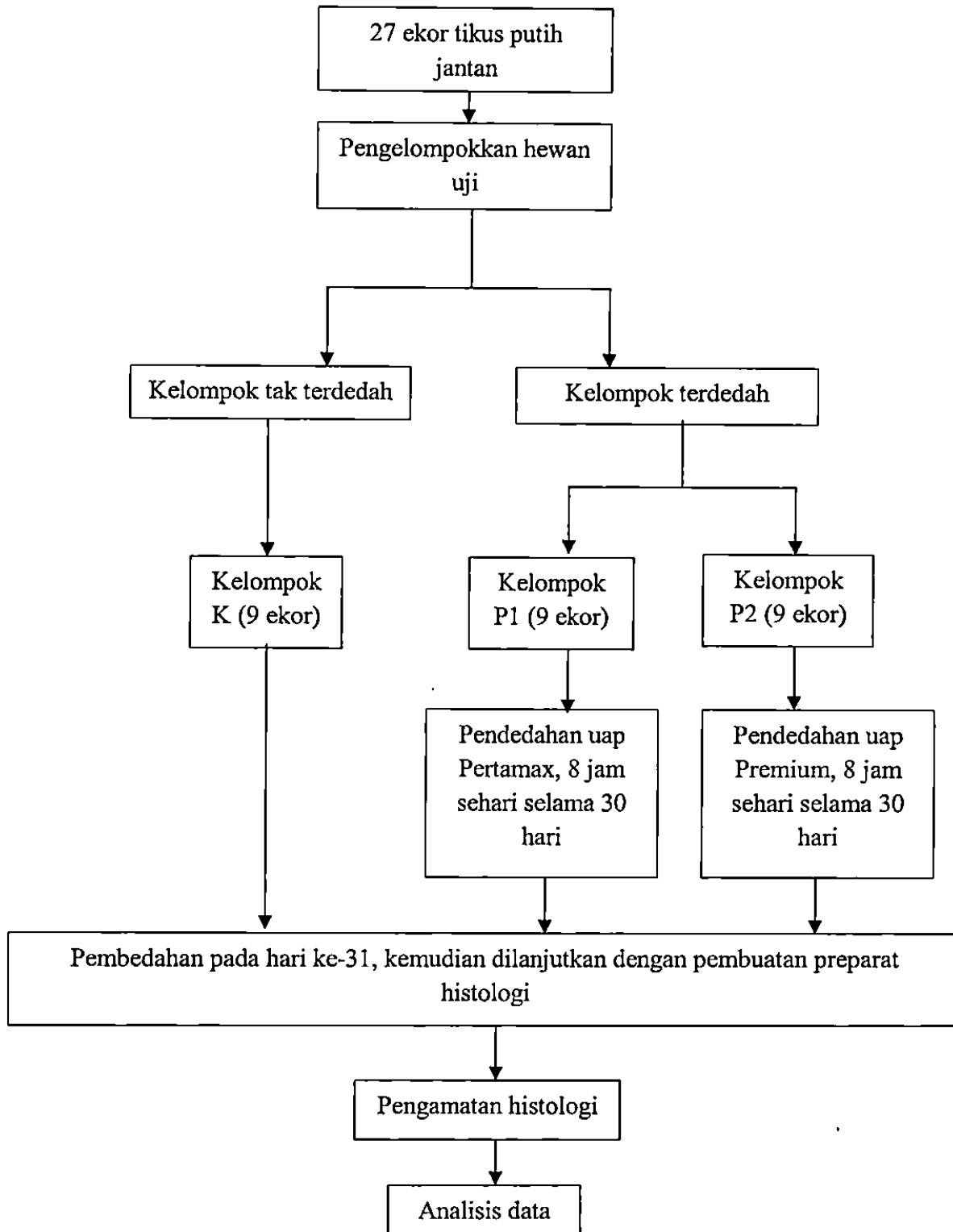
Organ yang sudah diambil dan difiksasi dengan formalin dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dan dengan teknik pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).

7. Uji Histopatologis

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop cahaya. Preparat yang telah siap dipakai diamati di Laboratorium Histologi FKIK UMY menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x10 dan dilihat perubahan yang terjadi pada ketebalan epitel dan jumlah sel goblet trakheanya dan dibandingkan perbedaannya antara hasil pembedahan bensin Premium dengan Pertamina maupun yang tidak didedahkan bensin. Sedangkan untuk pengamatan memastikan ada atau tidaknya perubahan lain seperti infiltrasi sel leukosit dibantu oleh staf Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah

I. Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dilakukan uji normalitas Saphiro Wilk karena sampel kurang dari 50 dan dilakukan uji homogenitas. Uji distribusi data ketebalan epitel tidak normal maka uji analisis selanjutnya menggunakan metode non parametrik Kruskal Wallis dan Mann Whitney. Uji distribusi data sel goblet normal maka uji analisis selanjutnya menggunakan metode parametrik ANOVA dan uji *Post Hoc Tukey*.

J. Kerangka Kerja

Gambar 4: Skema penelitian kelompok Kontrol (K), kelompok perlakuan

pendedahan Pertamax (P1) dan kelompok perlakuan pendedahan Premium (P2)