

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan rancangan percobaan *post-test only control group design*. Pengambilan sampel dilakukan secara randomisasi.

B. Subyek Penelitian

1. Subyek penelitian

Subyek 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 150-220 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

2. Besar Sample

Besar sample dihitung dengan menggunakan rumus *federer*

(Supranto, 2000):

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

Keterangan : n: Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t : Jumlah kelompok perlakuan

$$(n-1)(t-1) \geq 15 \qquad 2n \geq 15+2$$

$$(n-1)(3-1) \geq 15 \qquad n \geq \frac{15+2}{2}$$

$$(n-1)2 \geq 15 \qquad n \geq 8,5$$

$$2n-2 \geq 15 \qquad n = 9$$

jadi, besar sampel dari setiap kelompok terdiri dari 9 ekor tikus.

3. Cara Pengambilan Sampel

Cara pengambilan sampel pada penelitian ini adalah secara *Random Sampling*.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian dilakukan selama 5 bulan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY.
2. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan dibutuhkan waktu selama 30 hari (pendedahan kronik) di ruangan hewan uji Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan UMY.

3. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Umum UGM.
4. Pengamatan dan penilaian preparat serta pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi FKIK UMY.

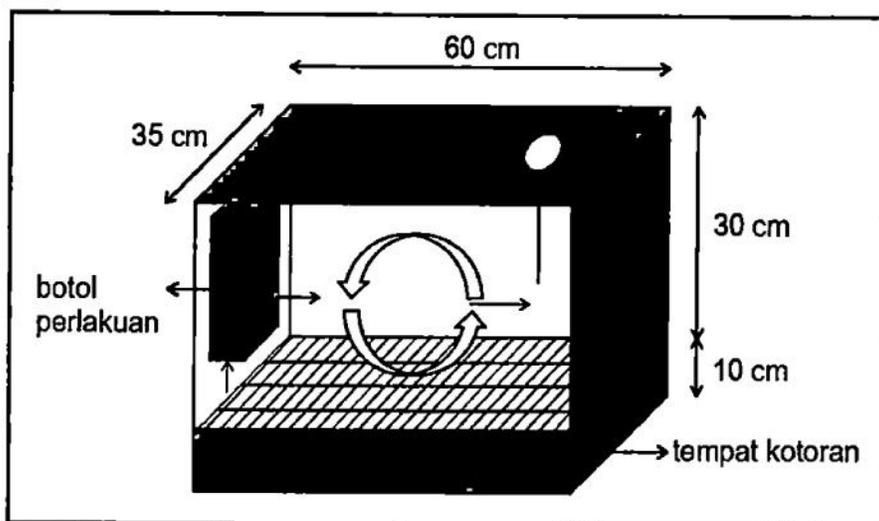
D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : pendedahan uap bensin jenis Premium dan Pertamina
2. Variabel Tergantung : gambaran histologi bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan pada ketebalan epitel, diameter bronkus, sel limfosit, sel goblet dan PMN.
3. Variabel Terkendali : usia, jenis kelamin, berat badan, pola diet, tempat penelitian, lama perlakuan dan jenis bensin.

E. Definisi Operasional

1. Bensin Pertamina adalah bahan bakar tanpa timbal dengan angka oktan 92 sebab penambahan MTBE.
2. Bensin Premium adalah bahan bakar yang berwarna jernih kekuningan yang biasanya digunakan oleh kendaraan umum dan memiliki kandungan timbal dengan angka oktan 88.
3. Bronkus primer adalah bagian dari bronkus cabang pertama dan sebagai jalannya oksigen dan karbon dioksida ke dalam paru-paru yang berdiameter lebih kecil dari bronkus primer.
4. Sel goblet merupakan sel yang berfungsi menghasilkan sekret (mukus) untuk melembabkan dan melindungi mukosa saluran pernapasan.

5. Epitel kolumnar bersilia merupakan epitel yang melapisi trakea, bronkus dan rongga hidung. Epitel ini dalam transpor diperantarai silia untuk partikel yang terperangkap dalam mukus agar dapat keluar dari saluran napas.
6. Gambaran histologi bronkus adalah gambaran mikroskopik yang terlihat pada lensa okuler mikroskopik cahaya dengan perbesaran (40x10) kemudian diamati histologi bronkus, yaitu : ketebalan epitel, jumlah sel Goblet, jumlah sel limfosit dan PMN.
7. Kandang perlakuan penelitian merupakan kandang dengan dinding yang tersusun dari 2 lapis bahan, bagian dalam terbuat dari kawat strimin dan bagian luar terbuat dari plastik tebal agar paparan uap bensin hanya bersirkulasi di dalam kandang. Botol perlakuan diletakkan di dalam kandang pemeliharaan dan kemudian diletakkan di dalam kandang perlakuan.



Gambar 6. Kandang Perlakuan

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

- a. Kandang perlakuan hewan uji
- b. Kandang pemeliharaan
- c. Botol perlakuan volume 80 ml
- d. Perlengkapan bedah
- e. Timbangan digital dengan skala 0,1 gram
- f. Tempat penyimpanan organ
- g. Masker dan handscoon
- h. Spuit injeksi 3 cc
- i. Jerigen 2 liter
- j. Mikroskop cahaya
- k. Software dan Hardware OptiLab
- l. Mikrometer okuler

2. Bahan

- a. 27 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, berumur 8 minggu dengan berat 150-220 gram
- b. Bensin Premium dan Pertamina.
- c. Alkohol 70%
- d. Makanan dan minuman tikus
- e. Benang
- f. Formalin 10%

G. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan, yaitu tikus putih, dipilih sesuai galur, usia dan jenis kelamin yang telah ditentukan. Kemudian, hewan uji ditimbang dan dipilih yang mempunyai berat badan 150-220 gram.

2. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Dua puluh tujuh hewan uji dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok dan dikandangkan sesuai kelompoknya dalam menerima perlakuan sesuai kelompoknya. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang terbagi atas 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Masing-masing tikus pada setiap kelompok diberikan tanda pada kepala, kepala punggung, punggung, punggung ekor, kepala punggung ekor, ekor, kaki dan tanpa tanda untuk memudahkan pengamatan.

Adapun pembagian kelompok secara acak dengan masing perlakuan adalah :

- a. Kelompok Kontrol (K), yaitu kelompok hewan uji yang tidak didedahkan bensin atau tidak mendapat perlakuan.
- b. Kelompok Pertamina (P1), yaitu kelompok hewan uji yang didedahkan dengan uap bensin jenis Pertamina 8 jam/hari selama 30 hari.
- c. Kelompok Premium (P2), yaitu kelompok hewan uji yang didedahkan dengan uap bensin jenis Premium 8 jam/hari selama 30 hari.

3. Pendedahan Uap Bensin

Bensin dimasukkan ke dalam botol perlakuan yang telah dikosongkan. Kemudian tutup bensin dibuka agar uap bensin tersebar di dalam kandang tikus. Pembedahan dilakukan 8 jam/hari pada setiap kelompok perlakuan.

4. Pemeliharaan

Pakan dan minum diberikan dengan porsi yang sama pada semua kelompok percobaan dan setiap 2 hari sekali dilakukan penimbangan berat badan agar kesehatan hewan uji dapat dipantau. Pembersihan kandang dilakukan 3 hari sekali.

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, dilakukan penarikan tulang belakang hingga tikus mati. 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 10%.

6. Pembuatan Preparat

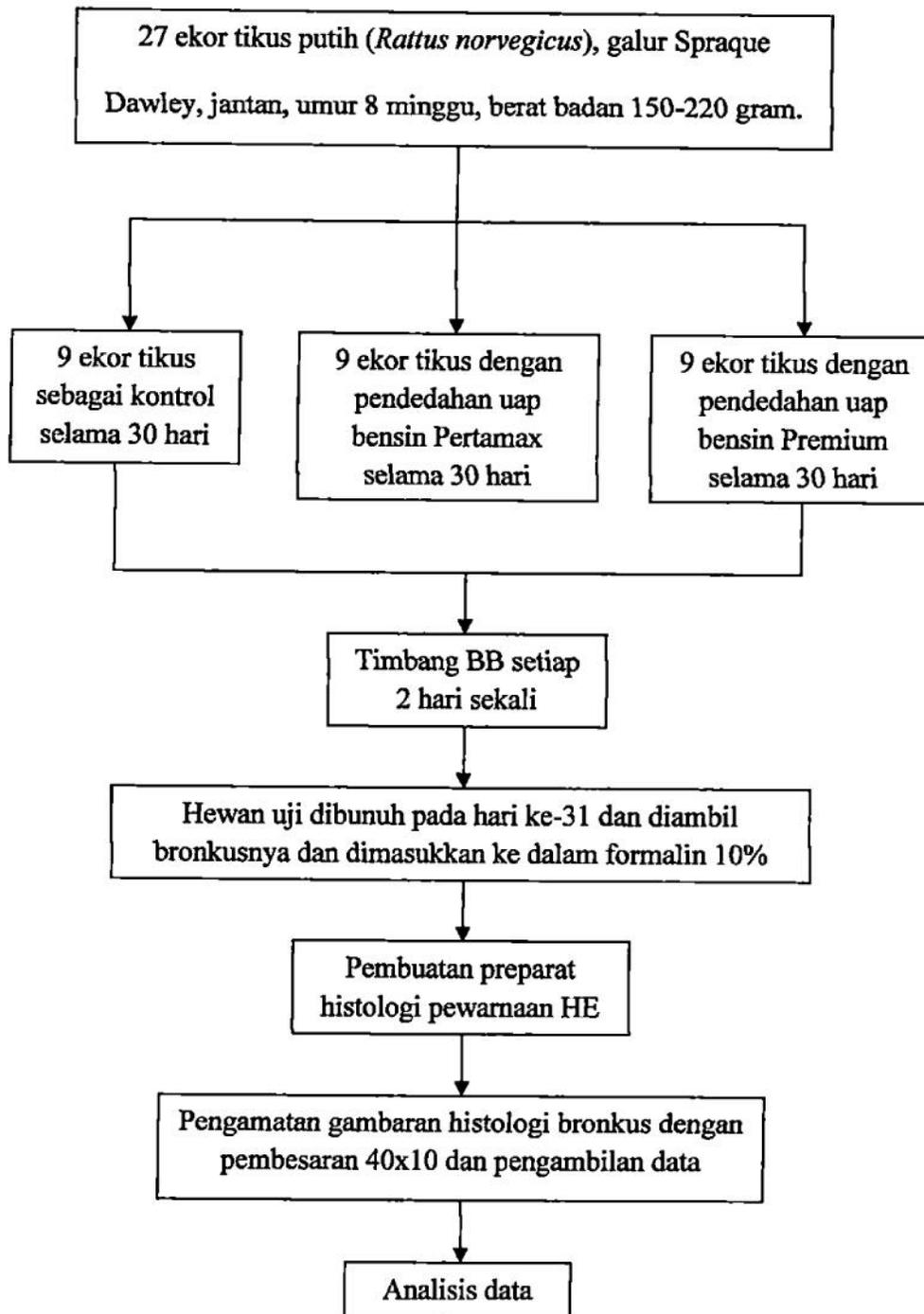
Preparat dibuat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

7. Uji Histopatologis

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop. Preparat yang telah siap dipaki dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x10 untuk melihat ketebalan epitel, menghitung jumlah sel goblet dengan pembesaran 100x10, jumlah sel limfosit dan PMN dengan pembesaran 100x10, serta mengukur besar diameter bronkus dengan mikrometer okuler perbesaran 4x10. Pembacaan sel di lakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro Wilk*. Selanjutnya, dilakukan uji statistik data dengan *One Way Anova* dan *Post-hoc Tukey*.



Gambar 7. Alur penelitian