

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

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

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian dilakukan selama 5 bulan
2. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan dibutuhkan waktu selama 30 hari (paparan kronis (ATSDR,2005)) dan ditambah satu hari untuk masa adaptasi 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.

C. Subyek Penelitian

1. Sampel Penelitian.

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, galur *Sprague Dowley (SD)*, jantan berjumlah 27 ekor yang didapatkan dari

laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi sampel sebagai berikut:

A. Kriteria Inklusi :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*), jantan, galur Spraque 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. Cara Pengambilan Sampel

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

3. Cara Penghitungan Sampel

Cara penghitungan sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer yaitu:

$$\text{Rumus Federer (Supranto, 2000)} = (n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = Jumlah kelompok perlakuan

Dalam penelitian ini menggunakan tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan pertamax (X), kelompok perlakuan premium (Y), dan kelompok kontrol. Maka menurut rumus penghitungan sampel menurut Federer didapatkan:

$$\begin{aligned} (n-1)(t-1) &\geq 15 \\ &= (n-1)(3-1) \geq 15 \\ &= n \geq 8,5 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 9 \end{aligned}$$

Jadi, sampel untuk masing-masing kelompok perlakuan dibulatkan menjadi 9 ekor.

D. Variable Penelitian

1. Variable bebas : Paparan uap bensin jenis premium dan pertamax
2. Variable tergantung : Gambaran histologi pulmo *Rattus norvegicus*, yaitu ketebalan septum interalveolare (μm), jumlah sel PMN, dan sebaran sel limfosit
3. Variabel Terkendali : Usia, Jenis Kelamin, berat badan, pola diet, tempat penelitian, lama perlakuan, waktu pemeriksaan, jenis bensin

E. Definisi Operasional

1. Bensin premium adalah bahan bakar jenis distilat berwarna kekuningan yang jernih, mengandung timbal dan memiliki angka oktan sebesar 88

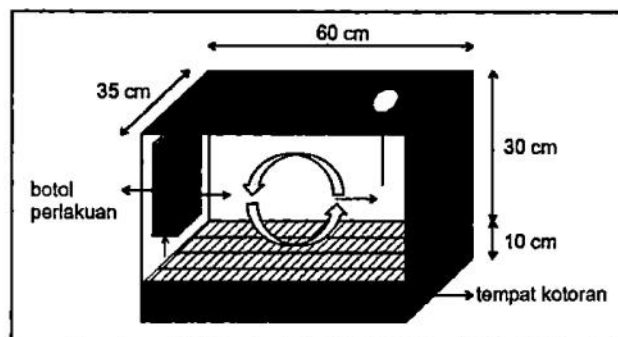
2. Bensin pertamax adalah bahan bakar motor tanpa timbal dengan angka oktan sebesar 92 dikarenakan penambahan MTBE.
3. Gambaran histologi pulmo adalah gambaran mikroskopik yang terlihat pada lensa okuler mikroskopik cahaya dengan perbesaran (40x10).
4. Ketebalan septum interalveolar adalah ketebalan sekat yang memisahkan antara satu alveolus dengan alveolus lainnya, yang diukur dengan software Opti Lab, dengan skala pengukuran μm .
5. Makrofag alveolar adalah fagosit berbentuk bulat dan bergranular, memiliki satu nucleus di dalam alveoli paru yang bertugas untuk memfagosit benda asing yang ikut terhirup ke dalam paru-paru.
6. Kandang perlakuan penelitian adalah kandang penelitian yang khusus dirancang dengan dinding kandang 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.
7. ATSDR adalah Agency for Toxic Substance and Disease Registry, suatu agency yang meneliti tentang toksisitas substansi. Dilihat dari onset pajanan dibedakan menjadi tiga yaitu:
 - a. Akut : Minimal resiko terpajan suatu substansi selama kurang dari 14 hari.
 - b. Sub akut : minimal resiko terpajan suatu substansi selama 15-21 hari.

- c. Kronik : minimal resiko terpajan suatu substansi selama lebih 21 hari.

F. Instrument Penelitian

1. Alat Penelitian

- Perlengkapan pemeliharaan seperti tempat makanan tikus dan botol minuman tikus, kandang pemeliharaan hewan uji, corong, timbangan digital dengan skala 0,1 gram,
- Perlengkapan bedah yaitu pinset, gunting bedah, handscoon, bengkok, Spuit 30cc, benang dan tempat organ.
- Alat pendedahan yaitu , kandang perlakuan, botol perlakuan dengan volume 80, jerigen bervolume 2 Lt.
- Alat pengambilan data yaitu mikroskop cahaya, hand counter, software Optilab beserta perlengkapannya, dan seperangkat komputer.



Gambar 5: Kandang Perlakuan

2. Bahan Penelitian

- Subyek terdiri dari 27 ekor tikus putih jantan dengan umur 8 minggu dan berat badan 150-220gram.
- Bensin jenis premium dan bensin jenis pertamax.

- Pakan standart, sekam, dan air mineral.
- Alkohol 70%, dan formalin 10 %.

G. Cara Kerja

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih yang dipilih dengan kriteria berjenis kelamin jantan, usia sudah mencapai 8 minggu dan memiliki berat badan 150-220 gram. Tikus-tikus ini selanjutnya diadaptasikan pada kandang baru dengan diberi perlakuan inhalasi uap premium dan pertamax selama 8 jam/hari selama 30 hari berturut-turut.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji dikelompokkan secara acak menjadi tiga kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang terbagi atas satu kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Setiap kelompok ditempatkan pada satu kandang pemeliharaan yang diatur penempatannya sehingga pendedahan tidak mempengaruhi satu sama lain. Pemberian makanan dan minuman diatur dalam porsi yang sama pada semua kelompok. Kandang juga selalu dijaga kebersihannya.

3. Pendedahan Uap Bensin Premium dan Pertamax

Bensin diletakkan di dalam botol perlakuan bervolume 80 ml dan diletakkan di dalam kandang. Premium diletakkan dalam botol perlakuan bervolume 80 ml berlabel (Y) dan diletakkan di kandang kelompok (Y). Pertamax diletakkan di dalam botol perlakuan

bervolume 80 ml berlabel (X) dan diletakkan di kandang kelompok (X). Pendedahan uap premium dan pertamax diberikan selama 8 jam /hari selama 30 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan hewan uji disesuaikan berdasarkan pengelompokannya:

a. Kelompok kontrol

Pada kelompok kontrol, hewan uji tidak diberi perlakuan.

b. Kelompok premium

Kelompok premium adalah kelompok hewan uji yang mendapatkan pendedahan uap premium. Perlakuan ini diberikan selama 8 jam.

c. Kelompok pertamax

Kelompok pertamax adalah kelompok hewan uji yang mendapatkan pendedahan uap pertamax. Perlakuan ini diberikan selama 8jam/hari selama 30 hari. Makanan dan minuman diberikan dalam porsi yang sama serta pembersihan kandang dilakukan secara teratur.

5. Pemeliharaan

Pakan dan minuman diberikan dengan porsi yang sama pada masing-masing kelompok. Penimbangan hewan uji dilakukan dua hari sekali agar dapat terpantau berat badan tikus secara efektif. Pembersihan kandang dilakukan dengan teratur agar tidak timbul dan berkembangnya parasit seperti kutu.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya selama 30 hari. Pada hari ke 31 dilakukan pembedahan pada semua hewan uji yang telah dimatikan dengan cara ditarik. Pembedahan menggunakan alat bedah sederhana dan dilakukan pengambilan jaringan yang akan diteliti. Jaringan yang telah diambil kemudian difiksasi dalam larutan formalin 10%.

7. Pembuatan Preparat

Organ yang telah diambil kemudian di fiksasi dengan formalin 10% , selanjutnya dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dengan teknik pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (HE).

8. Uji Histologi

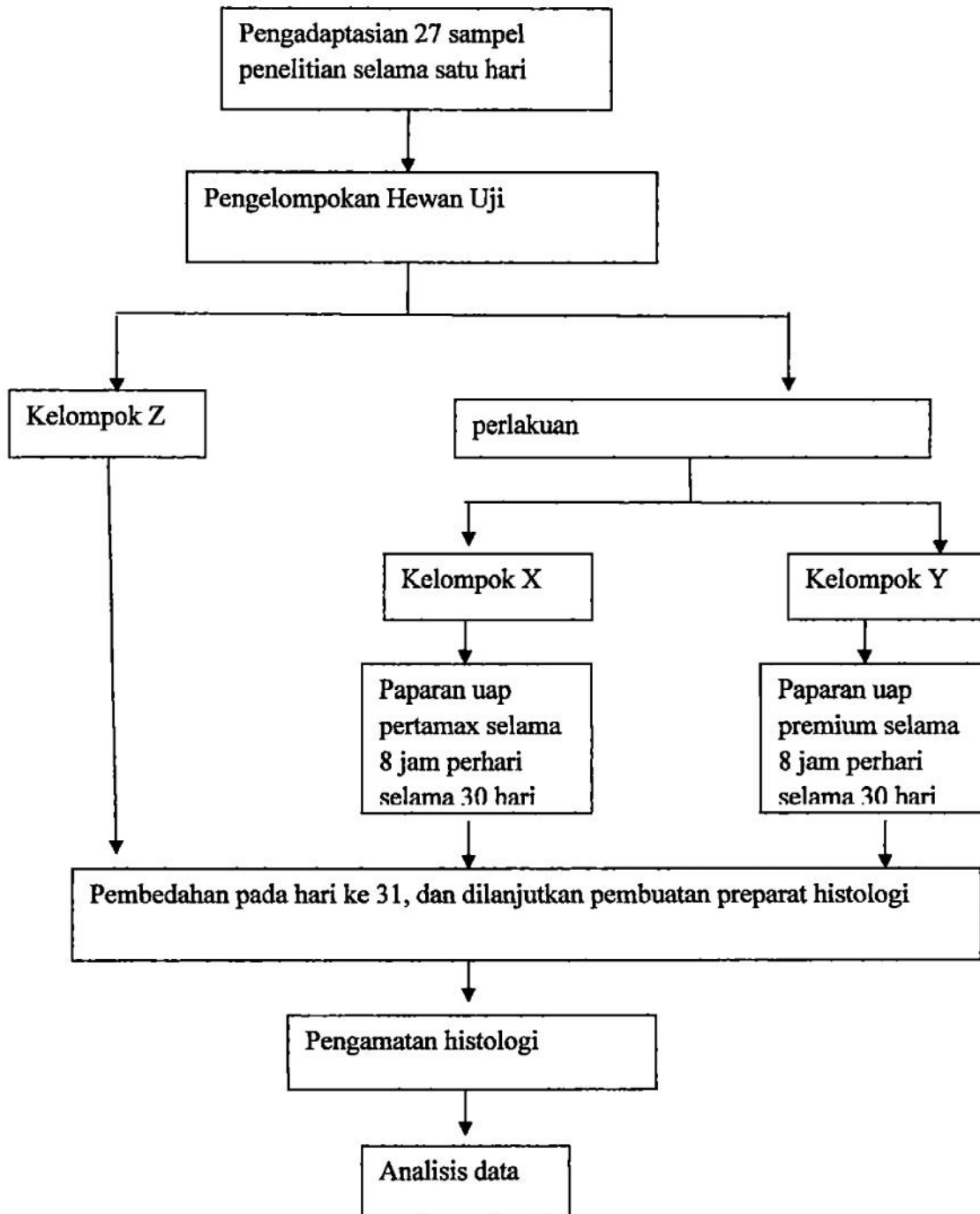
Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop dengan perbesaran 40X10 untuk melihat gambaran histologi pulmo.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dilanjutkan dengan uji statistik dengan menggunakan SPSS dengan cara melakukan uji normalitas. Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk dikarenakan sampel yang digunakan kurang dari 50 sampel. Hasil uji normalitas menunjukkan $p > 0,05$ dan homogenitas data menunjukkan $p = < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa distribusi data tidak normal. Distribusi data dikatakan normal apabila nilai p dari uji normalitas Shapiro-Wilk dan homogenitas data $> 0,05$. Data kemudian

diolah dengan menggunakan uji nonparametri yaitu uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Witney untuk mengetahui perbedaan dari setiap kelompok.

I. Skema Penelitian



Gambar 6: Skema penelitian kelompok perlakuan pendedahan uap pertamax(X), kelompok perlakuan uap premium(Y), dan kelompok kontrol(Z).