

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni, dengan pendekatan *post-test only control group design*. Hewan uji dirandomisasi baik pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol tanpa diadakan *pre-test*.

B. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* yang dipelihara di laboratorium hewan uji biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UMY dan mulai didedahkan pada umur delapan hari. Randomisasi dilakukan baik pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol tanpa diadakan *pre-test*.

1. Perhitungan Jumlah Subjek

Jumlah subjek penelitian didapatkan dari perhitungan dengan :

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

Keterangan :

n= jumlah subjek tiap kelompok penelitian

t= jumlah kelompok dalam penelitian

Sehingga perhitungan subjek penelitian :

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

$$(n-1) (3-1) \geq 15$$

$$(n-1) (2) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah subjek minimal yang dibutuhkan dalam setiap kelompok penelitian adalah sembilan ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley*. Namun sebagai cadangan, maka jumlah total dari sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 30 ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* yang terbagi dalam tiga kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor bayi tikus jantan. Kelompok-kelompok tersebut adalah:

- a. Kelompok kontrol (K) : kelompok hewan uji yang tidak mengalami pendedahan dengan pewangi ruangan.
- b. Kelompok perlakuan gel (P1) : kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan gel.
- c. Kelompok perlakuan spray (P2) : kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan spray.

2. Kriteria Subjek Penelitian

Kriteria subjek penelitian ini adalah :

- a. Bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley*
- b. Pendedahan pada bayi tikus dimulai dari usia delapan hari setelah kelahiran
- c. Bayi tikus dilahirkan dari induk yang sehat.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama delapan bulan, dengan lokasi penelitian :

1. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di laboratorium hewan uji biomedik FKIK UMY.
2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
3. Pengamatan dan penilaian preparat serta pengumpulan data dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FKIK UMY.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

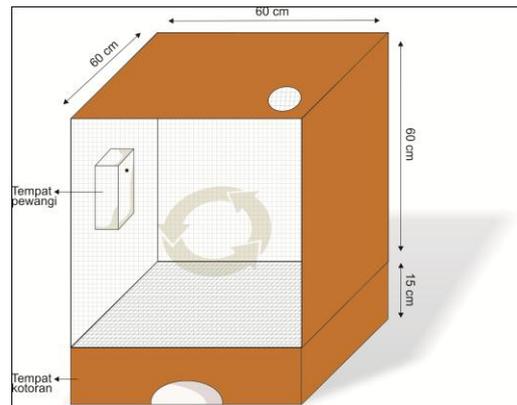
- a. Variabel bebas : pendedahan pewangi ruangan jenis spray dan gel.
- b. Variabel terikat : ketebalan septum interalveolaris, ukuran diameter alveolus, peningkatan jumlah sel radang seperti sel limfosit, sel plasma, histiosit, eosinofil, dan PMN pada alveolus bayi tikus *Rattus norvegicus*.
- c. Variabel terkontrol :
 - 1) Subjek penelitian:
 - a) Jenis kelamin : jantan.
 - b) Usia : bayi tikus mulai didedahkan pada usia delapan hari.
 - c) Jenis tikus : *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley*.

- 2) Perawatan subjek : jenis dan kualitas makanan dan minuman setiap subjek sama.
- 3) Bahan coba : penggunaan pewangi ruangan aroma jeruk dengan merek yang sama baik dalam bentuk spray maupun gel.

2. Definisi Operasional

- a. Pewangi ruangan spray adalah produk berbahan dasar cair beraroma jeruk yang digunakan untuk menghilangkan bau tidak menyenangkan dalam suatu ruangan tertutup.
- b. Pewangi ruangan gel adalah produk dengan aroma jeruk, mudah memuai dan berbahan dasar gelatin yang digunakan untuk menghilangkan bau tidak menyenangkan dalam suatu ruangan tertutup.
- c. Bayi tikus adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* yang didedahkan dengan pewangi ruangan pada umur delapan hari setelah kelahiran.
- d. Gambaran histologi alveolus adalah gambaran mikroskopik dari alveolus organ pulmo yang diamati perubahan struktur histologinya berupa ketebalan septum interalveolaris, ukuran diameter alveolus, peningkatan jumlah sel radang (sel limfosit, sel plasma, histiosit, eosinofil, dan PMN) yang diamati dengan mikroskop binokuler.

- e. Kandang perlakuan penelitian adalah kotak terbuat dari kayu dengan ukuran 60x60x60 cm dan ditambahkan kaki setinggi 15 cm di setiap sisinya. Dinding kandang tersusun atas kawat strimin di bagian dalam, dan bagian luar dilapisi plastik tebal.



Gambar 5. Kandang perlakuan penelitian

- f. Pulmo atau paru-paru adalah organ pernapasan yang memiliki fungsi utama sebagai tempat pertukaran oksigen dan karbondioksida antara udara yang masuk dan darah (Eroschenko, 2010).
- g. Alveolus merupakan bagian terminal cabang bronkus dan bagian yang paling banyak terdapat dalam struktur pulmo yang menyerupai busa (spons) dan sarang lebah yang berfungsi sebagai tempat proses difusi (Junquiera & Carneiro, 2009).
- h. *Formaldehyde* adalah bahan kimia turunan dari *Volatile Organic Compound* (VOC) yang banyak terdapat dalam pewangi ruangan gel dan dapat mempengaruhi penurunan fungsi sistem respirasi (SCHER, 2006).

- i. *Di-(2-ethylhexyl) phthalate* (DEHP) adalah senyawa turunan dari ftalat yang banyak terdapat dalam pewangi ruangan spray dan diduga paling berperan dalam inflamasi alveolus pulmo (Abdel, 2013).
- j. Sel makrofag adalah sel jaringan yang berfungsi untuk fagositosis dan berasal dari monosit dalam sirkulasi darah, dengan ciri-ciri berupa sel yang mirip dengan sel PMN namun berukuran lebih besar dan memiliki sitoplasma jernih.
- k. Sel limfosit merupakan sel darah putih yang ditemukan dalam darah serta jaringan getah bening, dan memiliki ciri-ciri bulat, berinti besar, dengan sitoplasma sedikit dan berwarna biru.
- l. Sel plasma adalah produk akhir dari aktivasi sel B yang mengalami diferensiasi, dan berfungsi sebagai penghasil antibodi spesifik untuk melawan antigen. Sel nampak berinti eksentris dengan sitoplasma berwarna biru.
- m. Sel eosinofil adalah sel darah putih yang secara khusus ditemukan akibat infeksi parasit atau bagian reaksi imun yang berkaitan dengan alergi dan diperantarai oleh IgE. Sel nampak memiliki sitoplasma merah dengan jumlah maksimal inti sebanyak dua lobus.
- n. Sel neutrofil atau PMN (*polymorphonuclear*) adalah sel darah putih yang besar, berbentuk granulosit, sitoplasma jernih, memiliki lobus inti lebih dari dua buah, dengan kantung enzim yang membantu sel

untuk membunuh dan mencerna mikroorganisme setelah ditelan oleh fagositosis.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Kandang perlakuan
- b. Kandang pemeliharaan
- c. Perlengkapan pemeliharaan tikus
- d. Perlengkapan bedah minor
- e. Timbangan badan merek Casbee (kapasitas 1000x0,1 g)
- f. Pot air sebagai tempat organ
- g. Mikroskop binokuler
- h. *Software* optilab
- i. Komputer/laptop
- j. *Bakerglass*, tisu dan kapas
- k. Timbangan organ merek ACIS dengan skala 0, 01 g

2. Bahan-Bahan Penelitian

- a. Tiga puluh ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berjenis kelamin jantan
- b. Air mineral dan pakan tikus
- c. Kloroform 35%
- d. Formalin 10%
- e. Alkohol 70%
- f. Akuades

- g. NaCl 0,9%
- h. Pewangi ruangan jenis gel dan spray beraroma jeruk.

F. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang dipilih sesuai galur, jenis kelamin, dan usia yang telah ditentukan. Hewan uji dipelihara di kandang pemeliharaan hewan uji dengan pemberian minum standar.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam perlakuan sebanyak 30 ekor tikus dan dibagi menjadi kelompok gel (P1), kelompok spray (P2), dan kelompok kontrol (K). Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus. Tiap kelompok hewan uji ditempatkan pada satu kandang khusus yang telah dirancang sehingga pendedahan tidak mempengaruhi satu sama lain.

3. Pendedahan Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan spray disemprotkan sebanyak 10 kali semprotan diawal setiap sesi pendedahan pada kelompok hewan uji spray (P2). Pewangi ruangan gel digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok hewan uji gel (P1). Pendedahan pewangi ruangan dimulai saat hewan uji berumur delapan hari dan dilakukan selama 67 hari. Dosis awal pendedahan selama 15 menit dan dilakukan 2x/hari (pagi dan sore). Dosis pendedahan dinaikkan dengan menambah waktu pendedahan selama 15

menit/sesinya. Penambahan dosis pendedahan dilakukan setiap satu minggu sekali sampai mencapai dosis maksimum selama 4,5 jam/hari.

4. Perlakuan

Perlakuan pada hewan uji dilakukan sesuai dengan pengelompokannya.

- a. Kelompok K adalah kelompok kontrol. Pada kelompok ini hewan uji tidak didedahkan dengan pewangi ruangan.
- b. Kelompok P1 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk gel. Pendedahan dilakukan selama 67 hari.
- c. Kelompok P2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk spray. Pendedahan dilakukan selama 67 hari.

5. Pemeliharaan

Pakan dan minum yang diberikan pada hewan uji diberikan dengan porsi sama setiap harinya. Pembersihan kandang dilakukan secara teratur.

6. Pembedahan dan pengambilan Organ

Pada hari ke-68 dari awal pendedahan, dilakukan pembedahan pada semua hewan uji. Pembedahan diawali dengan penimbangan hewan uji. Hewan uji dianastesi dengan cairan kloroform 35% kemudian dibedah menggunakan alat-alat bedah minor. Selain itu, juga dilakukan pengambilan organ yang akan diteliti yaitu pulmo. Organ difiksasi di

dalam larutan formalin 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi.

7. Pembuatan Preparat

Pulmo yang disimpan dengan formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE).

8. Uji Histopatologi

Sebanyak 30 buah preparat, yang terbagi menjadi 10 buah preparat kelompok kontrol (K), 10 preparat kelompok gel (P1), dan 10 preparat kelompok spray (P2), diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10 pada 10x lapang pandang pengamatan dari masing-masing preparat. Pada perbesaran tersebut, parameter yang diuji adalah ketebalan septum interalveolaris dan diameter alveolus. Dari masing-masing lapang pandang, dipilih lima buah alveolus yang memiliki bentuk dan ukuran yang mendekati normal. Menggunakan bantuan *software* *optilab*, kelima alveolus tersebut masing-masing diukur pada empat sisinya untuk mengetahui ukuran ketebalan septum interalveolaris. Selain itu, dengan bantuan *software optilab*, pada kelima buah alveolus tersebut, dilakukan pula pengukuran untuk mengetahui ukuran diameter alveolus.

Uji histopatologi juga dilakukan untuk mengidentifikasi jumlah dari masing-masing jenis sel radang pada preparat. Sel radang yang diamati berupa sel limfosit, sel PMN (*polymorphonuclear*), sel plasma, sel eosinofil, dan sel histiosit (makrofag). Pengamatan dilakukan dengan

mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x10 pada setiap preparat kelompok kontrol (K), gel (P1), dan spray (P2). Masing-masing kelompok terdiri dari 10 buah preparat pengamatan dan setiap preparat diamati sebanyak 10x lapang pandang.

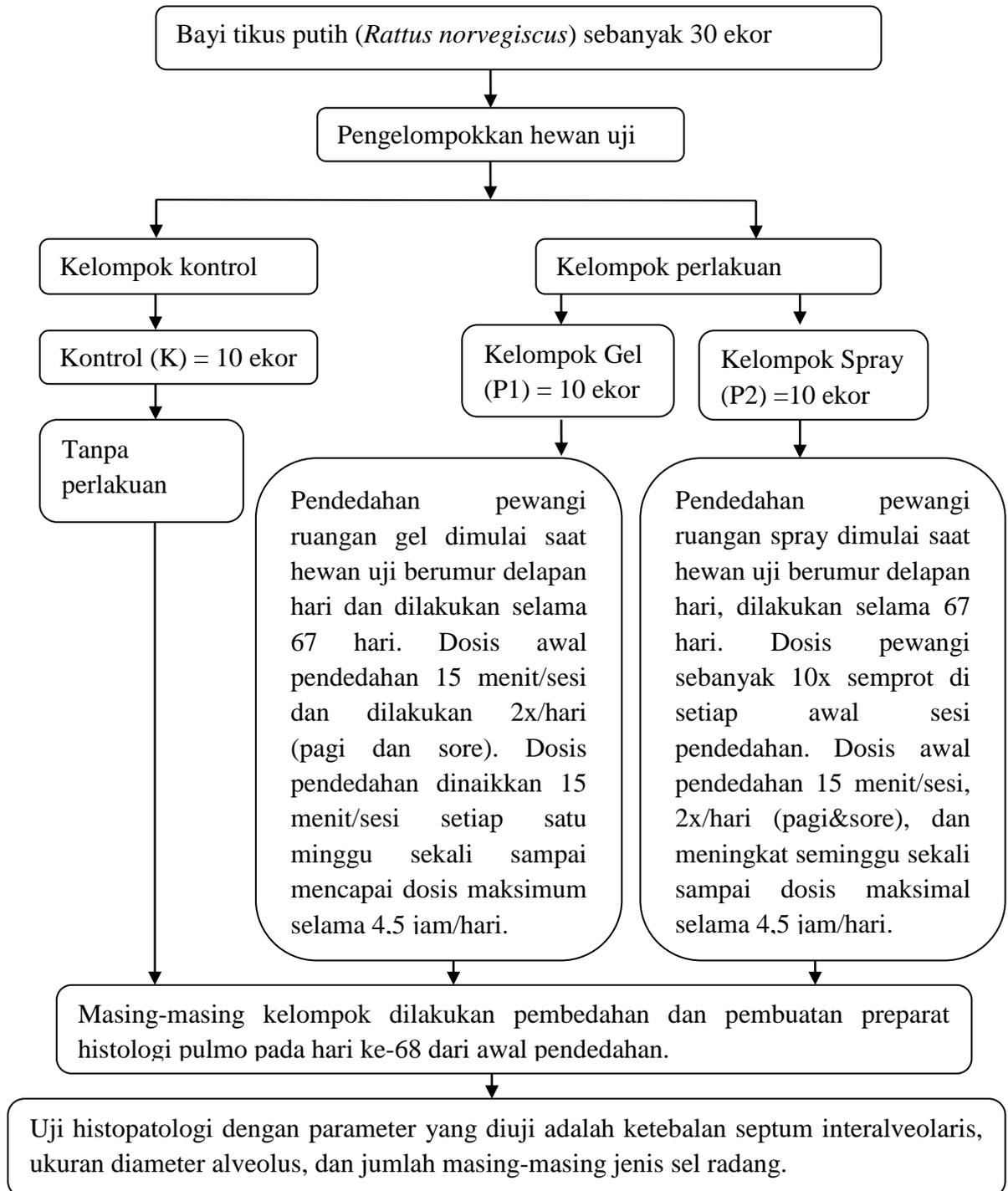
G. Analisis Data

Hasil pengukuran ketebalan septum interalveolaris, diameter alveolus, dan jumlah masing-masing jenis sel radang kemudian diuji normalitas dengan metode *Saphiro-Wilk*. Apabila distribusi datanya normal, maka dilakukan analisis statistik dengan metode *One Way Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey*. Data dianalisis statistik dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna dari perlakuan yang diberikan. Apabila ada perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui letak perbedaan pada masing-masing kelompok. Apabila distribusi datanya tidak normal, maka dilakukan analisis statistik dengan metode *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

H. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian FKIK UMY. Selama penelitian berlangsung hewan uji dirawat sesuai dengan etika penelitian.

I. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema penelitian