

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *post test only controlled group design*. Penelitian ini membandingkan gambaran histopatologi alveolus paru antara kelompok kontrol, yaitu tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberikan paparan asap obat nyamuk bakar, dan kelompok perlakuan, yaitu tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diberikan paparan asap obat nyamuk bakar. Penilaian dilakukan setelah perlakuan selesai tanpa dilakukan pengukuran awal (*pre-test*), sehingga fokus penelitian adalah pada efek perlakuan terhadap perubahan histopatologi alveolus paru.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan selama bulan Februari sampai bulan Maret 2025.

2. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di UPT Lab. Terpadu Universitas Sebelas Maret dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

- a. Populasi target: tikus galur wistar jantan sebagai model hewan uji coba.
- b. Kriteria inklusi: tikus sehat, usia (2-3 bulan), dan berat badan (200-250 gram).
- c. Kriteria eksklusi: tikus dengan penyakit atau kondisi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian seperti cacat fisik.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini digunakan sebanyak 12 ekor tikus jantan.

- a. Teknik pemilihan sampel: purposive sampling, yaitu memilih tikus yang memenuhi kriteria inklusi.
- b. Kelompok perlakuan:
 - 1) Kelompok kontrol : tidak terpapar asap obat nyamuk.
 - 2) Kelompok perlakuan : terpapar asap obat nyamuk bakar dalam waktu 5 jam/hari selama 28 hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini ialah asap obat nyamuk bakar yang diberikan pada hewan uji.

2. Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Gambaran histopatologi alveolus tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang telah diberikan asap obat nyamuk bakar.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dari penelitian ini adalah :

a. Umur

Menyamakan umur serta berat badan tikus putih yaitu 2-3 bulan.

b. Jenis Kelamin

Semua tikus yang digunakan dalam penelitian ini berjenis kelamin Jantan.

c. Makanan dan minuman

Memberi makan pakan standar (BR II PELET COMFEED) dan minuman akuades.

d. Jenis obat nyamuk

Jenis obat nyamuk yang digunakan ialah beberapa obat nyamuk bakar.

E. Definisi Operasional

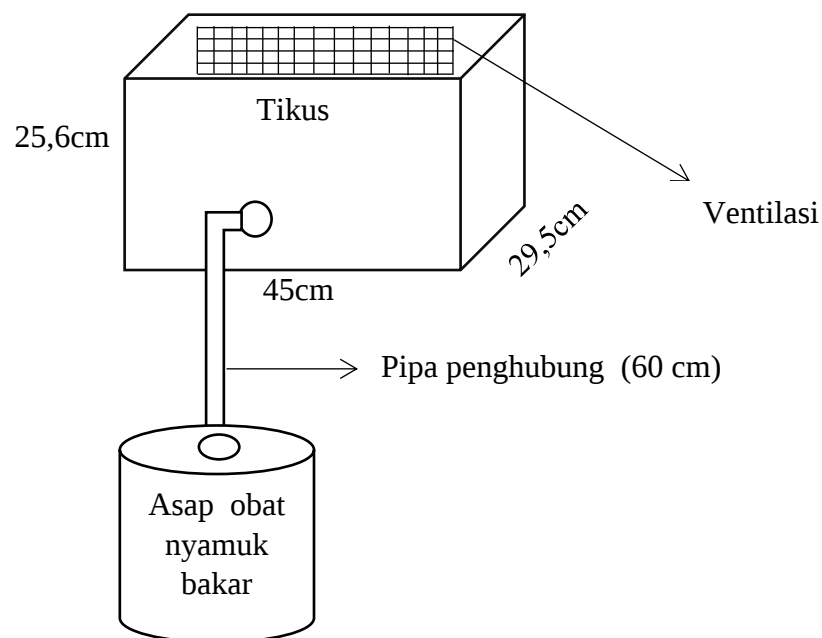
1. Lama paparan asap obat nyamuk bakar

Lama paparan asap obat nyamuk bakar pada penelitian ini ialah 5 jam selama 28 hari pada pagi hari (jam 8.00 -12.00). Penelitian dilakukan pagi hari karena mengontrol pengaruh ritme tubuh, menurunkan tingkat

stres hewan uji, serta menjaga konsistensi dan kestabilan kondisi fisiologis tikus *Rattus norvegicus* selama penelitian.

2. Rangkaian alat paparan asap obat nyamuk bakar pada hewan uji

Desain alat paparan asap obat nyamuk bakar terhadap hewan uji ditunjukkan pada gambar 3.1. Asap dari obat nyamuk bakar dalam wadah tertutup dan dialirkan kedalam kandang tikus menggunakan pipa penghubung sepanjang 60 cm. Kandang tikus berukuran 45 cm × 25,6 cm × 29,5 cm, dilengkapi dengan sistem ventilasi untuk menjaga sirkulasi udara.



Gambar 3. 1 Ilustrasi alat dan proses paparan asap obat nyamuk bakar pada hewan uji

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Handscoon, masker, wadah, objek glass, deck glass, pinset, kandang eksposur tertutup (ruang khusus menampung tikus saat paparan asap), korek api, kandang hewan lab (tempat tinggal tikus sebelum dan sesudah perlakuan), botol minum, pakan standar, tempat pembakaran obat nyamuk (toples), asbak rokok (tatakan pembakaran), pipa ,alat bedah minor (gunting,pinset,bisturi), pensil, timbangan digital, *stopwatch*, *hot plate*, *tissue processor*, *cold plate*, *tissue embedding*, cetakan, *microtome*, *waterbath*, rak pengecetan, dan mikroskop.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain obat nyamuk bakar merek (B= baygon, C=vape, D=NoMos), tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*), *Neutral Buffer Formalin* 10%, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%,100%), xylol, paraffin blok, mounting, formalin 10%, pewarna HE (*Hematoksilin-Eosin*), aquadest, NaCl fisiologis, sampel alveolus.

G. Prosedur penelitian

1. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian dari Balai UPT Laboratorium Terpadu Sub Lab Biologi Universitas Sebelas Maret, Surakarta adalah tikus galur wistar jantan (*Rattus Norvegicus*) berjumlah 12 ekor yang memiliki berat sekitar 200-250 g dan berumur 2-3 bulan.

Sebelum perlakuan, tikus akan diaklimatisasi terlebih dahulu dengan jangka waktu 7 hari dalam laboratorium pada suhu dan pencahayaan yang tepat. Terdapat 4 kandang yang masing-masing berisi 3 tikus. Paparan asap diberikan pada kelompok kedua, ketiga, dan keempat dengan durasi 5 jam selama 28 hari.

2. Pelaksanaan penelitian

Organ yang akan diamati pada penelitian ini adalah organ alveolus dari tikus jantan yang telah dipaparkan dengan asap obat nyamuk bakar dan tikus yang diberi akuabides sebagai kontrol normalnya. Pemberian obat nyamuk bakar dinyalakan atas asbak, dimasukkan dalam ruang pengumpulan asap yang dibuat dari pipa air pvc akan memberikan paparan terhadap kelompok perlakuan

a. Paparan asap obat nyamuk bakar

Tiga jenis obat nyamuk, dibakar satu obat nyamuk sampai habis dalam ruangan tertutup sesuai dengan perlakuan, sambil menjaga konsentrasi asap. Ventilasi ruangan dijaga agar tidak menyebabkan tikus kekurangan oksigen, selama perlakuan amati secara rutin untuk gejala stres dan penyakit. Tikus percobaan ini dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan:

- 1) Pertama (A) adalah kelompok kontrol yaitu tikus yang diberikan pakan dan akuabides tetapi tidak diberikan paparan asap obat nyamuk bakar.

- 2) Kedua diberikan paparan dengan jenis obat anti nyamuk bakar (B)
- 3) Ketiga diberikan paparan dengan jenis obat anti nyamuk bakar (C).
- 4) Keempat diberikan paparan dengan jenis obat anti nyamuk bakar (D).

b. Pembedahan Tikus

- 1) Mengukur berat badan tikus sebelum pembedahan tikus dihentikan denyut jantungnya dengan metode inhalasi menggunakan klorofom.
- 2) Setelah tikus dalam kondisi lemah, diletakkan diatas papan bedah kemudian pegang dengan jarum pentul yang menusuk pada kaki dan tangan tikus.
- 3) Mengangkat kulit tikus kemudian digunting sampai terbuka dengan cara pembedahan.
- 4) Ambil sampel jaringan organ alveolus dan cuci dengan NaCl 0,9%.

c. Pembuatan preparat hitopatologi

Proses jaringan menggunakan *tissue processor* ada empat tahapan yaitu (Sebayang *et al.*, 2023: 47-48).

- 1) *Fiksasi*

Mempertahankan struktur sel agar stabil baik fisik maupun kimiawi, mempertahankan kondisi jaringan sewaktu

hidup dan juga untuk menghambat pembusukan. Organ yang telah diambil dimasukan dalam kap kemudian difiksasi dengan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan ditutup rapat selama 24 jam kemudian dipotong makros dengan ketebalan $\pm 1-3$ mm di masukkan dan selanjutnya dimasukkan dalam *Tissue Cassete*. Kemudian diproses di *tissue processor*.

2) *Dehidrasi*

Menghilangkan/menarik kadar air dalam jaringan. Jaringan yang sudah dirilis (*trimming*) agar dapat dimasukan dalam kotak untuk diproses dalam *tissue processor* dimasukan ke dalam larutan alkohol konsentrasi bertingkat alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol absolut I 100%, absolut II 100%, dan absolut III 100% pada setiap tahap masing-masing membutuhkan waktu 2 jam.

3) *Clearing*

Penarikan kadar alkohol yang ada pada jaringan dan memberikan warna bening pada jaringan. Rendam organ yang sudah didehidrasi ke dalam cairan xylol I, II, III pada wadah kaca di *tissue processor* masing-masing 2 jam.

4) *Infiltrasi Paraffin*

Jaringan dimasukan ke dalam paraffin cair dengan suhu 56-62°C, lakukan sebanyak 2 kali. Proses infiltrasi paraffin sendiri memiliki tujuan untuk mengisi rongga-rongga yang

terdapat pada jaringan karena telah kehilangan cairan sebelumnya (xylol) agar mempermudah pemotongan. Melakukan 4 tahapan *tissue processor* tersebut membutuhkan waktu kurang lebih 24 jam.

d. Proses Pengeblokan/ *Embedding*

Jaringan dengan pinset kemudian dimasukkan ke dalam base mold atau cetakan blok. Jaringan yang sudah berada di dalam cetakan blok (base mold) kemudian dituang dengan paraffin cair. Untuk zat paraffin cair yang memiliki suhu lebur sekitar 56⁰C sampai 59⁰C, hal ini bertujuan agar menutupi seluruh bagian jaringan. Didiamkan beberapa saat hingga paraffin mengeras diatas *cold plate*.

e. Proses Pemotongan Jaringan

Pemotongan jaringan dilakukan dengan alat bernama mikrotom yang sudah diatur kemiringannya $\pm 30^{\circ}$ dengan ketebalan pemotongan 3-5 μ . Setelah proses pemotongan pindahkan ke dalam *waterbath* yang berisi air dengan suhu 37-40⁰C. Pita jaringan kemudian diambil menggunakan objek glass dan beri identitas seperti nomor atau nama untuk menandai sampel. Preparat kemudian dibiarkan kering dalam udara selama 10 menit atau letakan di atas *hotplate*.

f. Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

1) Deparafinisasi

Preparat direndam dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, tepi jaringan dibersihkan

menggunakan kain kasa dengan mengusap menggunakan kain basa.

2) Rehidrasi

Preparat dimasukkan ke dalam alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah (100% - 70%) masing-masing 2 menit.

3) Preparat dialiri dengan air mengalir selama 2 menit.

4) Pengecatan inti selama 10 menit Preparat masuk kedalam *Mayer Hematoxylin*. Kemudian masukkan kedalam bluing selama 1 menit.

5) Preparat dialiri dengan air mengalir selama 2 menit.

6) Preparat masuk ke larutan *Eosin* selama 1 menit. Preparat dimasukkan kedalam wadah yang berisi air sebanyak 2-3 celup.

7) Dehidrasi

Preparat masuk kedalam alkohol konsentrasi rendah ke tinggi (70% ke 100%) masing-masing sebanyak 10 celup, dan xilol 1 menit setelah itu dilap dengan kain kasa sekitar jaringan.

8) *Mounting*

Setelah selesai dilakukan penutupan sediaan dengan kaca penutup yang diberi mounting media, misalnya entelan sebanyak 1 tetes.

H. Teknik Pengambilan Data

Data yang dikumpulkan ini adalah data primer yang diperoleh dari pemeriksaan preparat untuk melihat gambaran histopatologi tikus putih wistar (*Rattus Norvegicus*) yang diberi pakan standar dan aquadest sebagai bahan kontrol negatif dan kelompok perlakuan setelah diberi senyawa toksik yaitu asap obat nyamuk bakar.

I. Teknik Analisis Data

Hasil gambaran histopatologi alveolus tikus putih wistar (*Rattus Novergicus*) yang telah diamati. Kemudian analisis secara deskriptif kualitatif dilakukan terhadap perubahan patologi jaringan alveolus. Data dianalisis menggunakan software SPSS 26.0 dan dibahas pada bagian pembahasan sebagai hasil dari pengaruh paparan asap obat nyamuk bakar terhadap hewan uji tikus putih wistar (*Rattus Novergicus*) pada alveolus.

1. Skorsing dan Penilaian Data

Setiap preparat histopatologi diberi skor berdasarkan tingkat kerusakan alveolus, misalnya:

0 = Tidak ada kerusakan

1 = Kerusakan ringan

2 = Kerusakan sedang

3 = Kerusakan berat

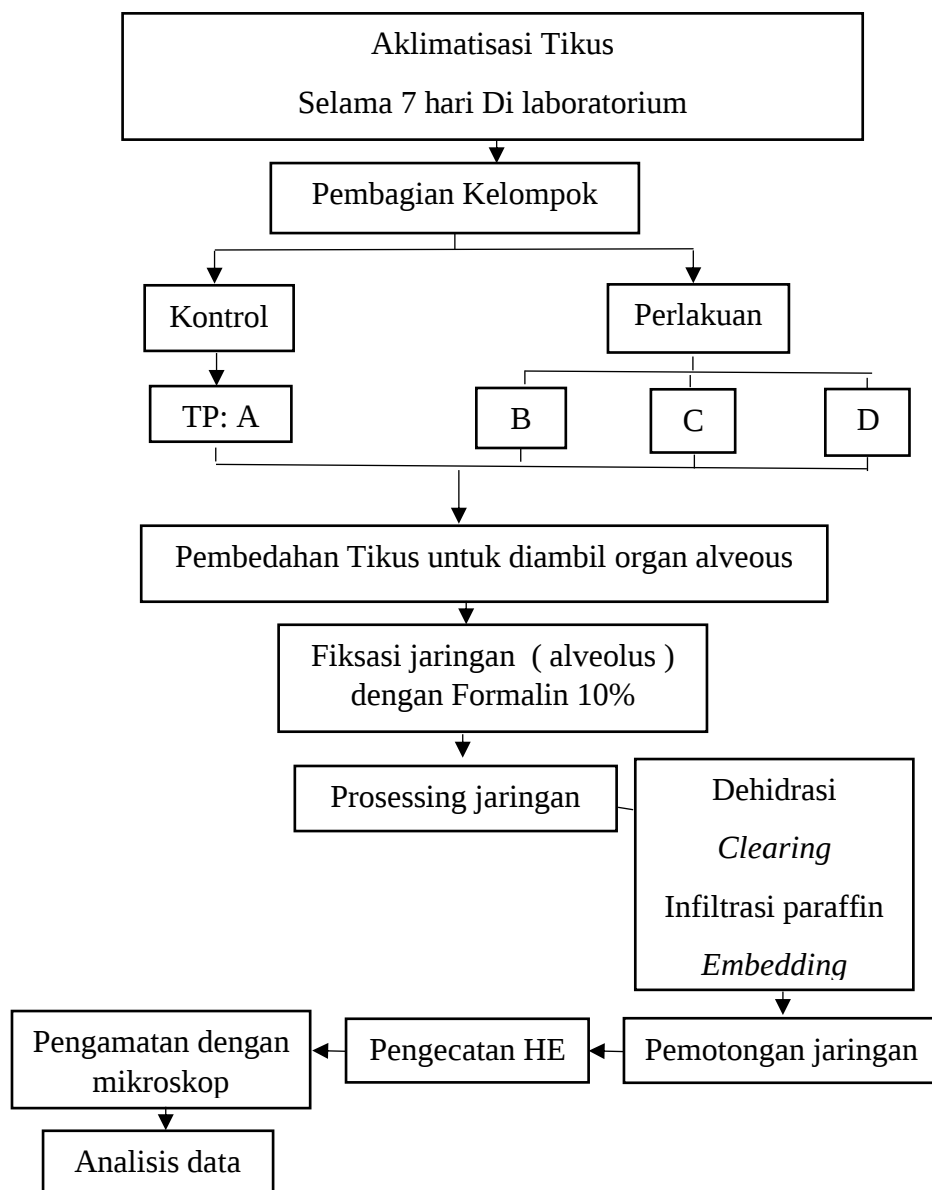
Skor ini mencerminkan tingkat kerusakan sebagai variabel dependen.

2. Analisis Inferensial

Analisis dapat dilakukan menggunakan SPSS dengan uji *Kruskal Walls* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan diantara semua perlakuan kelompok. Untuk nilai signifikan yang digunakan $p = 0,05$ Jika hasil menunjukkan perbedaan signifikan, temuan tersebut mendukung hipotesis bahwa paparan asap obat nyamuk bakar memengaruhi histopatologi alveolus. Analisis akan didiskusikan dengan referensi literatur yang menjelaskan mekanisme toksisitas asap terhadap jaringan paru.

J. Alur penelitian

Prosedur pelaksanaan penelitian ini secara ringkas dapat dilihat pada gambar 3.2 dengan bagan alur penelitian di bawah ini:



Gambar 3. 2 Alur Penelitian

Keterangan :

A: Kelompok kontrol normal (tanpa perlakuan A)

B: kelompok perlakuan 1 (jenis obat nyamuk B)

C: kelompok perlakuan 2 (jenis obat nyamuk C)

D: kelompok perlakuan 3 (jenis obat nyamuk D)