

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini meliputi bidang Farmakologi, Histologi, dan Patologi Anatomi

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang. Pembuatan preparat dan analisis data dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dilakukan setelah mendapatkan *ethical clearance* dimulai dari bulan Maret hingga Mei 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design*.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi target

Populasi target penelitian ini adalah mencit.

3.4.2 Populasi terjangkau

Populasi penelitian ini adalah mencit umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari *Rattus Breeding Center* (RBC) Malang.

3.4.3 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah mencit usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

- 1) Mencit Balb/c
- 2) Jantan
- 3) Umur 2-3 bulan
- 4) Berat badan 20-30 gram
- 5) Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

Kriteria *drop out*:

- 1) Mati selama proses penelitian.

3.4.4 Cara sampling

Sampel penelitian diambil dengan cara acak dengan metode randomisasi sederhana (*simple random sampling*) dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4.5 Besar sample

Penentuan besar sampel penelitian menggunakan ketentuan WHO dengan jumlah minimal sampel 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit yang dibagi dalam kelompok kontrol 1, kontrol 2, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3.⁵⁸

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga putih

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah gambaran mikroskopis paru mencit yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar.

3.6 Definisi operasional

Tabel 3 . Definisi operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Variabel Bebas	Ekstrak kulit buah naga putih	Ekstrak kulit buah naga putih dosisi bertingkat yang diberikan pada kelompok mencit perlakuan 1 (P1) dosis 7,5 mg/mL, perlakuan 2 (P2) dosis 15 mg/mL dan perlakuan 3 (P3) dosis 30 mg/mL dengan bantuan sonde satu kali sehari selama 21 hari	Ordinal

Tabel 3 . Definisi operasional (lanjutan)

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Variabel Terikat	Gambaran mikroskopis paru mencit yang diberi paparan asap nyamuk bakar	Gambaran mikroskopis paru mencit strain Balb/c jantan di bawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan dengan Hematoxylin Eosin. Pengamatan dilakukan terhadap sel limfosit untuk menentukan derajat infiltrasi sel radang, dan destruksi alveoli menggunakan kriteria menurut Hansel dan Barnes dalam 5 lapangan pandang dengan perbesaran 400x	Ordinal

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

- 1) Mencit umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram
- 2) Obat anti nyamuk bakar
- 3) Ekstrak kulit buah naga putih
- 4) Makanan dan minuman mencit
- 5) Bahan-bahan untuk membuat ekstrak kulit buah naga putih : etanol 70%
- 6) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan yaitu :
 - a. Larutan buffer formalin 10%

- b. Parafin
- c. Albumin
- d. Hematoxylin Eosin
- e. Larutan xylol
- f. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96%
- g. Aquadest

3.7.2 Alat

- 1) Kandang mencit beserta alat minum dan tempat makan
- 2) Sonde lambung
- 3) Alat untuk membuat ekstrak kulit buah naga : neraca digital, *water bath*, *rotary evaporator*, bejana perendam.
- 4) Alat untuk mengambil organ : minor set
- 5) Alat untuk membuat preparat histologi : mikrotom, oven, cetakan paraffin, *deck glass*, *object glass*.
- 6) Neraca O'House
- 7) Botol-botol
- 8) Mikroskop cahaya

3.7.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan berupa data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis paru mencit yang diberi paparan obat anti nyamuk bakar pada

kelompok kontrol 1 (K1), kelompok perlakuan (P1), (P2),(P3) dan dibandingkan dengan kelompok kontrol 2 (K2).

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Ekstraksi kulit buah naga putih (*Hylocereus udantus*)

Kulit buah naga putih segar diekstraksi dengan metode maserasi yang menggunakan etanol sebagai pelarut.

3.7.4.2 Cara pemaparan obat nyamuk bakar

- 1) Hewan coba ditempatkan pada kandang hewan sesuai dengan kelompoknya.
- 2) Asap berasal dari pembakaran obat nyamuk bakar yang mempunyai bahan aktif *d-allethrin* 0,3%.
- 3) Saat akan diberi paparan asap obat nyamuk bakar, hewan coba dipindahkan dalam kandang khusus berupa kotak yang didalamnya terdapat jeruji pembatas untuk memisahkan hewan coba dengan obat nyamuk bakar.
- 4) Hewan coba dapat secara langsung terkena paparan asap obat nyamuk bakar.
- 5) Kandang pada hewan coba perlakuan memiliki jalur ventilasi udara yang berfungsi menjaga aliran udara keluar masuk kandang hewan coba perlakuan.

- 6) Pemberian paparan asap obat nyamuk bakar dilakukan selama 8 jam dalam sehari dengan pemberian paparan mulai pukul 09.00 dan berakhir pukul 17.00. Pemberian paparan dilakukan selama 21 hari.

3.7.4.3 Prosedur pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang telah diaklimatisasi dan diberi makan dan minum standar yang sama selama tujuh hari, kemudian dikandangkan per kelompok dengan tiap kelompoknya terdiri dari lima ekor mencit. Kelompok kontrol satu (K1) adalah kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan apapun hanya makanan dan minuman standar. Kelompok kontrol dua (K2) adalah kelompok mencit yang diberi paparan asap obat anti nyamuk bakar 8 jam, makanan dan minuman standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan satu (P1) adalah kelompok mencit yang diberi paparan asap obat anti nyamuk bakar 8 jam dan diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 7,5 mg/mL serta makanan dan minuman standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan dua (P2) adalah kelompok mencit yang diberi paparan asap obat anti nyamuk bakar 8 jam dan diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 15 mg/mL serta makanan dan minuman standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan tiga (P3) adalah kelompok mencit yang diberi paparan asap obat anti nyamuk bakar 8 jam dan diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 30 mg/mL serta makanan dan minuman standar selama 21 hari.

Hari ke- 22 , semua mencit strain *Balb/c* jantan pada penelitian diterminasi dengan eter dan dislokasi kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil

organ paru dan dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan. Derajat kerusakan paru ditentukan dengan adanya infiltrasi sel radang, destruksi alveolus dan oedema alveolus.

1) Infiltrasi sel radang

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi perubahan

1 = infiltrasi sel radang pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = infiltrasi sel radang pada sepertiga hingga dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

3 = infiltrasi sel radang pada lebih dari dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

2) Destruksi alveolus

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi perubahan struktur histologi

1 = destruksi alveolus pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = destruksi alveolus pada sepertiga hingga dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

3 = destruksi alveolus pada lebih dari dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

3) Oedema alveolus

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi perubahan struktur histologi

1 = oedem alveolus pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = oedem alveolus pada sepertiga hingga dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

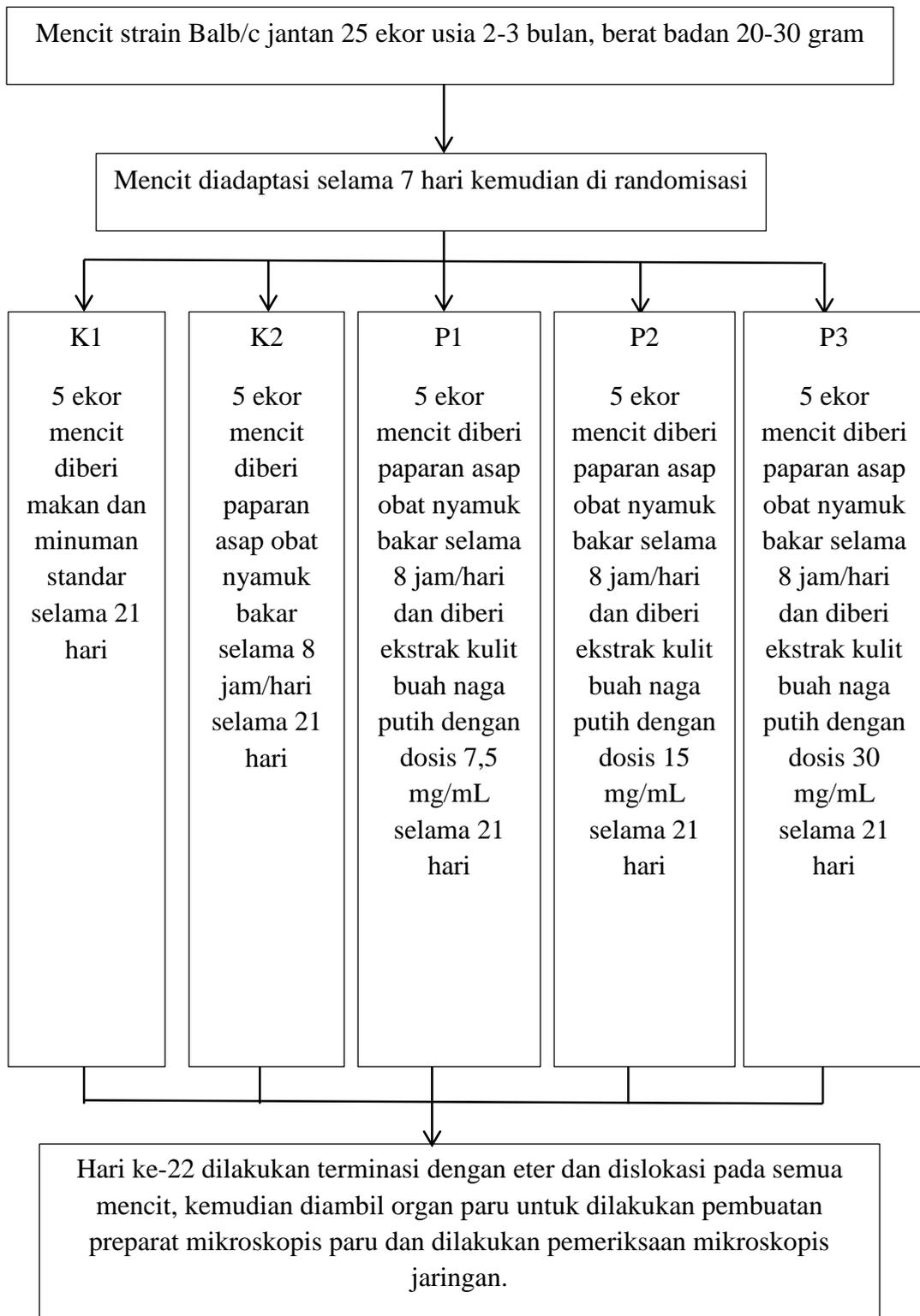
3 = oedem alveolus pada lebih dari dua per tiga dari seluruh lapangan pandang

Kriteria penilaian derajat kerusakan alveolus

Tabel 4 .Kriteria penilaian derajat kerusakan alveolus paru menurut Hansel dan Barnes.⁵⁹

Kriteria	Keterangan	Nilai Variasi
Normal	Tidak ada perubahan patologis pada 5 lapangan pandang dari struktur alveolus (perbesaran 400x)	0
Kerusakan ringan	Kerusakan alveolus paru < 30 % dari kerusakan maksimal	1
Kerusakan sedang	Kerusakan alveolus paru antara 30% - 60% dari kerusakan maksimal	2
Kerusakan berat	Kerusakan alveolus paru >60 % dari kerusakan maksimal	3

3.8 Alur penelitian



Gambar 5 . Alur penelitian

3.9 Pengolahan dan analisis data

3.9.1 Cara pengolahan data

Tahap-tahap pengolahan data, adalah sebagai berikut :

- 1) Tahap *editing*, yaitu dengan memperbaiki data yang tersedia.
- 2) Tahap *cleaning* data, untuk meneliti kembali kesalahan – kesalahan yang terjadi
- 3) Tahap tabulasi data, yaitu dengan menyajikan data dalam table yang telah disediakan.

3.9.2 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan program komputer analisis data statistik. Data dianalisis dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Mann-Whitney*.

3.10 Etika penelitian

Penelitian ini telah mengajukan usulan penelitian kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang sebelum penelitian dilakukan untuk mendapat surat keterangan *ethical clearance*.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 5 . Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan						
	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni
Penyusunan Proposal							
Pengujian Proposal							
Pelaksanaan Penelitian							
Pengolahan Data							
Pengujian Hasil Akhir							