

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan rancangan percobaan *post test only control group design*. Pengambilan hewan uji sebagai sampel dilakukan dengan cara randomisasi pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol.

B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan berusia 1 bulan dengan berat badan awal 40-90 gram.

1. Jumlah Subjek

Penentuan jumlah subyek tiap kelompok ditentukan dengan menggunakan rumus Federer.

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$n \geq 6$, maka jumlah sampel minimal tiap kelompok adalah 6 tikus.

Keterangan:

n = jumlah subjek tiap kelompok perlakuan

k = jumlah kelompok penelitian

2. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar.
2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi perlakuan pada usia 1 bulan.
3. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki berat badan awal 40-90 gram.

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang mati ketika sedang berjalannya penelitian

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan pemberian perlakuan dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama 35 hari dengan rincian waktu aklimatisasi selama 7 hari. Pembuatan preparat histologi kornea dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM). Pengamatan serta penilaian terhadap preparat dilakukan di laboratorium histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : pendedahan karbon aktif dan pewangi ruangan
2. Variabel tergantung : gambaran histologi dan ketebalan kornea masing-masing kelompok perlakuan.
3. Variabel terkendali : jenis kelamin, berat badan, usia, lama perlakuan, jenis pewangi ruangan, jenis karbon aktif, ruangan.

E. Definisi Operasional

1. Pewangi Ruangan Berbentuk Gel

Pewangi ruangan adalah produk rumah tangga yang umum dijual dipasaran, digunakan dengan tujuan untuk menciptakan aroma segar dan menghilangkan bau yang tidak menyenangkan di dalam ruangan. Pewangi ruangan yang digunakan berbentuk gel yang digunakan untuk kabin mobil. Pada perlakuan ini, pewangi ruangan digantungkan pada sudut kanan atas kandang perlakuan. Pewangi ruangan yang digunakan memiliki wangi citrus (jeruk) dengan kandungan formaldehida 0,62 ppm

2. Karbon Aktif Granular

Karbon aktif merupakan material yang memiliki banyak pori-pori di dalamnya. Digunakan untuk menyerap zat kimiawi atau penyerapan air. Pada perlakuan karbon aktif yang digunakan berbentuk granular karena memiliki area penyerapan yang luas. Karbon aktif digantungkan pada sudut kiri atas kandang perlakuan.

3. Kerusakan Kornea

Pada penelitian ini akan diamati pengaruh karbon aktif dan pewangi ruangan terhadap ketebalan total lapisan kornea, ketebalan epitelium anterior kornea dan jumlah sel-sel keratosit.

a. Ketebalan Total Lapisan Kornea

Ketebalan total lapisan kornea adalah ketebalan kornea yang diukur dari bagian terluar epitelium anterior sampai dengan bagian terluar endotelium. Pengukuran ketebalan total lapisan kornea pada penelitian ini dilakukan pada lima lapang pandang. Setiap lapang pandang dilakukan pengukuran lima kali pada bagian yang berbeda, kemudian diambil ketebalan rata-rata dari setiap preparat kornea mata.

b. Ketebalan Epitelium Anterior

Epitelium anterior adalah lapisan terluar dari kornea, merupakan lapisan yang paling rentan terhadap cedera dan paling awal terkena dampak dari cedera tersebut (Willcox *et al.*, 2014). Pengukuran ketebalan epitelium anterior pada penelitian ini dilakukan pada lima lapang pandang. Setiap lapang pandang dilakukan lima kali pengukuran di tempat berbeda, kemudian diambil ketebalan rata-rata dari setiap preparat kornea mata.

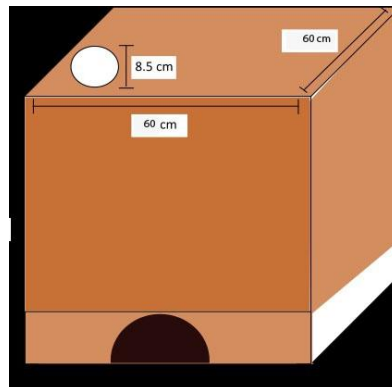
c. Jumlah Sel-Sel Keratosit

Keratosit adalah sel mesenkimal yang berasal dari stroma mata. Sel-sel keratosit umumnya cenderung diam tak bergerak, tetapi dapat

merespon dengan cepat dan merubah fenotifnya ketika terjadi cedera pada kornea (West-Mays & Dwivedi, 2006). Selain itu, Keratosit merupakan sel utama yang menyusun sekitar 10% dari komposisi stroma kornea mata dan menyusun 2-5% dari total volume kornea mata (Kang & Ko, 2005). Penghitungan jumlah sel-sel keratosit pada penelitian ini dilakukan pada lima lapang pandang, kemudian diambil jumlah rata-rata sel keratosit setiap preparat kornea mata.

F. Alat dan Bahan Penelitian

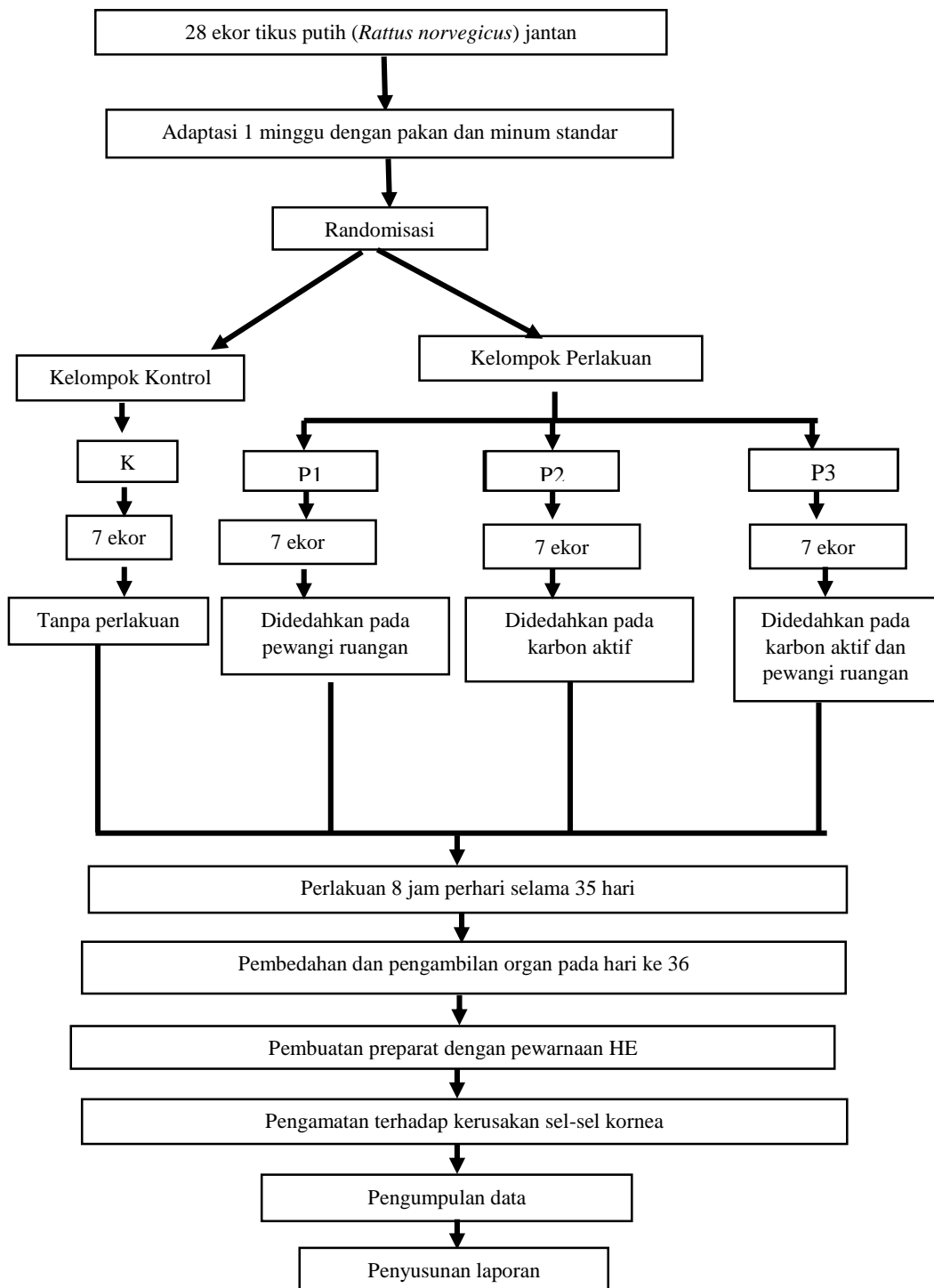
Gambar 3. Bentuk Kandang Perlakuan



Alat-alat yang digunakan pada penelitian yaitu 4 buah kandang tikus, 4 kandang perlakuan, alat gelas, alat perlakuan, toples besar dan kecil, peralatan bedah minor, 4 botol minum.

Bahan-bahan penelitian yaitu pewangi ruangan gel aroma jeruk dengan kandungan formaldehida 0,62 ppm, dua karbon aktif granular, pakan tikus, air minum aqua, sekam padi.

G. Jalannya Penelitian



Bagan 3. Jalannya Penelitian

H. Cara Pengumpulan Data

1) Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jenis kelamin jantan usia 1 bulan. Kemudian ditimbang dan dipilih yang memenuhi syarat berat badan kisaran 40-90 gram. Hewan uji diadaptasi selama 7 hari di kandang perawatan.

2) Pengelompokkan Hewan Uji

Tikus yang telah memenuhi persyaratan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 7 ekor tikus putih. Kelompok kontrol (K), kelompok pewangi ruangan gel (P1), kelompok karbon aktif granular (P2) dan kelompok karbon aktif ditambah pewangi ruangan gel (P3)

3) Pemaparan Pewangi Ruangan dan Karbon Aktif

Pewangi ruangan dan karbon aktif dilakukan selama 8 jam setiap harinya. Karbon aktif dan pewangi ruangan digantungkan pada sudut kanan dan kiri atas kandang perlakuan. Lama waktu perlakuan selama 35 hari.

4) Perlakuan

Hewan uji dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu

d. Kelompok Kontrol

Hewan uji diletakkan dalam kandang tanpa pemberian paparan pada karbon aktif dan atau pewangi ruangan.

e. Kelompok Pewangi

Hewan uji diletakkan di dalam kandang perlakuan selama 8 jam. Dipaparkan pada pewangi ruangan gel beraroma jeruk selama 35 hari.

f. Kelompok Karbon

Hewan uji diletakkan di dalam kandang perlakuan selama 8 jam. Dipaparkan pada karbon aktif granular. Total pemaparan selama 35 hari.

g. Kelompok Karbon Pewangi

Hewan uji dipaparkan pada karbon aktif granular dan pewangi ruangan beraroma jeruk pada waktu bersamaan selama 8 jam perhari selama 35 hari.

5) Pemeliharaan

Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Setiap dua hari sekali dilakukan penimbangan berat badan serta penggantian sekam.

6) Pembedahan dan Pengambilan Organ

Setelah pemberian perlakuan selama 35 hari dilakukan pembedahan dan pengambilan organ. Sebelum dilakukan pembedahan hewan uji dimasukkan ke dalam toples berisi formalin. Kemudian setelah hewan tidak sadarkan diri dilakukan pembedahan dan pengambilan organ dengan peralatan bedah minor

7) Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi UGM dengan teknik Hematoksilin Eosin (HE)

8) Uji histopatologik

Preparat diamati secara histologi dengan menggunakan mikroskop cahaya.

I. Cara Pembuatan Preparat

Sebelum dilakukan pembuatan preparat tahapan yang harus dilakukan adalah. Pengambilan jaringan organ tubuh dari hewan uji. Berikut adalah tahapan pengambilan jaringan organ hewan uji:

a. Pembiusan

Membius hewan yang akan diambil jaringan tubuhnya dapat dilakukan dengan cara pembiusan inhalasi menggunakan kloroform.

b. Pembedahan

Setelah hewan terbius secara sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan tubuh lalu dipotong-potong dalam cairan fisiologis (NaCl) untuk mendapatkan ukuran yang lebih kecil. Hal ini perlu dilakukan agar cairan fiksasi dapat masuk kedalam jaringan dengan mudah dan baik.

c. Isolasi Jaringan Tubuh

Potongan jaringan kemudian dimasukkan kedalam wadah-wadah kecil yang telah diberikan keterangan.

d. Penyimpanan

Wadah untuk penyimpanan berupa wadah berisi cairan fiksasi larutan formalin buffer 10% dan jaringan kemudian disimpan di tempat yang sesuai hingga saat pemrosesan jaringan selanjutnya (Jusuf, 2009).

Organ yang telah dimasukkan dalam larutan formalin buffer 10% dibuat preparat histologi menggunakan metode blok parafin. Berikut ini adalah tahapan pembuatan preparat yaitu:

a. Dehidrasi

Tujuan dari dehidrasi adalah untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan parafin maupun zat lainnya yang dipakai untuk pembuatan preparat.

b. Pembeningan (Clearing)

Merupakan suatu tahapan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan larutan yang dapat berikatan dengan parafin.

c. Pengecoran (Blocking)

Proses pembuatan blok preparat supaya dapat dipotong dengan menggunakan mikrotom. Cairan parafin dituangkan sedikit ke dalam cetakan blok kemudian masukkan potongan organ secara perlahan setelah itu tuang kembali parafin hingga menutupi organ.

d. Pemotongan (Mounting)

Proses pemotongan blok preparat dilakukan menggunakan mikrotom (Jusuf, 2009).

J. Proses Pewarnaan Preparat

Pewarnaan merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali atau diamati dengan mikroskop. Pulasan yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu pulasan Hematoksilin-Eosin (HE). Pulasan HE digunakan 2 macam zat warna yaitu hematoksilin yang berfungsi memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan counterstaining hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda dengan nuansa yang berbeda (Jusuf, 2009).

K. Analisis Data

Data yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan juga dilakukan *Test of Homogeneity of Variance*. Variabel yang memiliki distribusi data normal dan variansi homogen kemudian uji parametrik *One Way ANOVA* dengan uji lanjutannya menggunakan *Post Hoc Tukey*. Variabel dengan distribusi data tidak normal dan atau variansi tidak homogen maka analisa dilakukan menggunakan uji

non-parametrik. Uji non-parametrik yang digunakan adalah uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang merupakan hewan berkelompok dan tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Hewan coba terlebih dahulu diaklimatisasi selama tujuh hari di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus diaklimatisasi dalam kandang pemeliharaan berukuran 45x35x12 cm dengan penutup yang terbuat dari kawat kasa yang diberi botol berisi air minum dan pakan standar secara *ad libitum*. Kandang ditaruh dalam ruangan dengan temperatur suhu kamar. Pemeliharaan dilakukan di bawah pengawasan peneliti, terdiri dari pemberian minum dan makanan standar, penimbangan berat badan, pemberian pewangi ruangan dan karbon aktif, pembedahan dan penyimpanan organ. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus diberikan anestesi terlebih dahulu menggunakan kloroform kemudian dilakukan pembedahan menggunakan alat bedah minor. Kemudian dilakukan pengambilan organ kornea dan dimasukkan ke dalam toples kecil yang telah diisi dengan larutan Formalin Buffer 10%. Kemudian dilakukan pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histologis pemeriksaan jaringan.