

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Desain pada penelitian ini adalah eksperimental 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. SUBJEK PENELITIAN

Penentuan Subyek

Peneliti membagi hewan uji menjadi 3 kelompok. Penentuan jumlah subyek penelitian menggunakan rumus *Federer* yaitu :

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

Keterangan :

n : jumlah sampel tiap kelompok

t : jumlah kelompok

Sehingga dalam penelitian ini,

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

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

$$n \geq 15/2 + 1$$

$$n \geq 7,5 + 1$$

$$n \geq 8,5$$

Jadi, dengan menggunakan rumus federer, dalam penelitian ini dibutuhkan subyek lebih besar atau sama dengan 8,5.

Berdasarkan perhitungan tersebut, peneliti menggunakan 30 hewan uji bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang berumur 8 hari. Hewan uji terbagi menjadi 3 kelompok, setiap kelompok terdiri atas 10 hewan uji. Kelompok-kelompok tersebut terbagi atas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

1. Kelompok Kontrol

- a. Kelompok (K) : kelompok hewan uji yang tidak dilakukan pendedahan.

2. Kelompok Perlakuan

- a. Kelompok (P1) : kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan berbentuk *gel*.
- b. Kelompok (P2) : kelompok hewan uji yang didedahkan dengan pewangi ruangan berbentuk *spray*.

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi kriteria :

- a. Bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* diambil dari induk-induk sehat berumur 8 hari.
- b. Tikus putih diadaptasi dengan lingkungan laboratorium sekitar satu minggu, sebelum perlakuan dilakukan yang nantinya akan mendapatkan perlakuan serta perawatan yang sama.

C. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

1. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan dilakukan di laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY) selama 8 bulan dari bulan Agustus 2013 hingga bulan April 2014.
2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada selama dua minggu.
3. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di laboratorium histologi FKIK UMY.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas : Pendedahan pewangi ruangan jenis cair (*spray*) dan *gel*
2. Variabel Tergantung : Gambaran histologi kornea mata *Rattus norvegicus* yang meliputi ketebalan kornea keseluruhan, ketebalan epitel anterior, dan jumlah keratosit.
3. Variabel Tekendali, terdiri dari :
 - a) Subyek penelitian, meliputi :
 - 1) Jenis sampel semua kelamin sama, yaitu jantan.
 - 2) Umur tikus rata-rata sama, yaitu 8 hari.
 - 3) Jenis tikus sama yaitu berasal dari galur *Sprague dawley*
 - b) Perawatan : jenis dan kualitas makanan, minuman, serta kandang setiap sampel diupayakan sama.

- c) Bahan coba : penggunaan pewangi ruangan dengan merek dagang dan jenis aroma jeruk untuk *spray* maupun *gel*.

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Pewangi Ruangan Berbentuk *Spray*

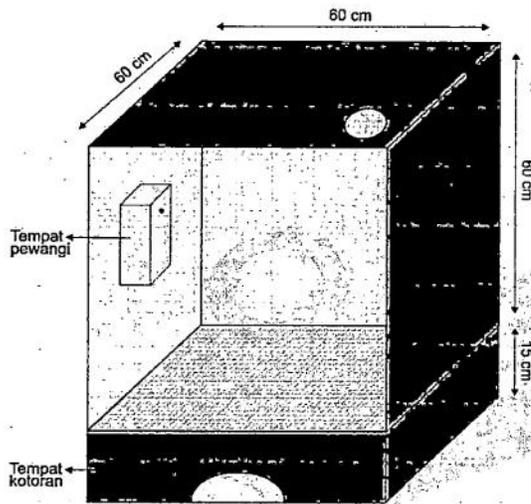
Pewangi ruangan yang digunakan adalah pewangi dalam bentuk cair yang penggunaannya dengan cara disemprot beraroma jeruk. Pendedahan dilakukan dengan cara menyemprotkan pewangi ruangan sebanyak sepuluh kali di awal pendedahan sebelum tikus putih dimasukkan ke dalam kandang pendedahan.

2. Pewangi Ruangan Berbentuk *Gel*

Pewangi ruangan yang digunakan adalah pewangi padat yang berbentuk *gel* beraroma jeruk sejumlah satu buah yang digantungkan di dalam kandang selama pendedahan berlangsung.

3. Kandang perlakuan

Kandang penelitian dirancang seperti pada gambar. Bagian bawah kandang yang digunakan sebagai fondasi sekaligus tempat kotoran hewan uji terbuat dari bahan kayu. Dinding kandang tersusun dari 2 lapis bahan, bahan bagian dalam berupa kawat strimin dan bahan bagian luar berupa plastik tebal agar aktivitas hewan uji bisa diamati dengan mudah. Tempat pewangi diletakkan dalam kandang hewan uji. Pewangi dikaitkan pada dinding strimin bagian atas. Hal ini bertujuan agar pendedahan pewangi ruangan dapat mencapai seluruh ruang kandang tanpa ada gangguan dari hewan uji itu sendiri.



Gambar 3. Kandang Perlakuan Berukuran 60x60x60 cm dengan fondasi kayu dan dua lapis dinding yaitu kain strimin di bagian dalam dan plastic tebal di bagian luar.

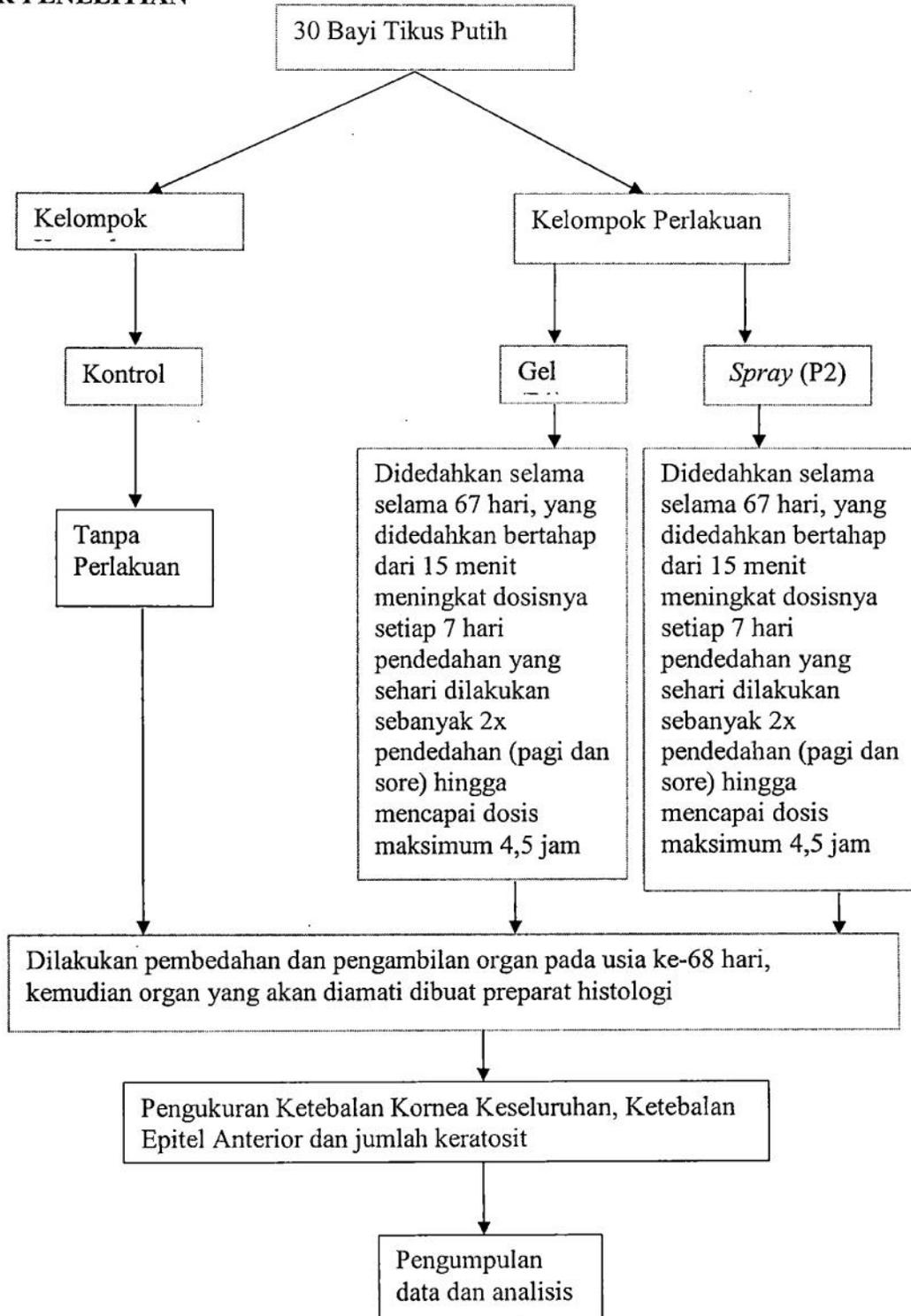
4. Kriteria Penelitian Histologi Kornea Mata

Analisis histologi kornea mata dilakukan menggunakan gambaran mikroskopis preparat kornea *Rattus norvegicus* yang terlihat pada lensa okuler mikroskop cahaya dengan perbesaran (10x10) dengan mengamati ketebalan kornea keseluruhan dan ketebalan epitel anterior pada 5 lapang pandang. Perangkat aplikasi *OptiLab* digunakan untuk membantuk pengukuran ketebalan kornea keseluruhan dan epitel anterior tersebut. Jumlah keratosit diamati pada perbesaran 40x10 pada masing-masing preparat histologi kornea mata *Rattus norvegicus* pada 5 lapang pandang.

F. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Alat-alat penelitian yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah kandang hewan uji, perlengkapan pemeliharaan, perlengkapan bedah minor, timbangan badan hewan uji merek *Casbee* (kapasitas 1000x0,1g), timbangan organ merek ACIS skala 0,01 gr, tempat organ (toples), mikroskop cahaya, software OptiLab, komputer/ laptop, kapas, tisu, spuit, dan gelas baker.
2. Bahan- bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah tiga puluh ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berjenis kelamin jantan dan berusia 8 hari, air mineral dan pakan tikus, alkohol 70 %, formalin 10 %, pewangi ruangan *spray* dan *gel* beraroma jeruk dari satu merek yang biasa dijual di pasaran, Kloroform 35 %, *NaCl* 0,9%, dan akuades.

ALUR PENELITIAN



G. CARA PENGUMPULAN DATA

1. Persiapan Hewan Uji

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

2. Pengelompokkan Hewan Uji

Hewan uji dipilih dan dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 hewan uji yang terbagi atas 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Penempatan kandang dari masing-masing kelompok diatur sedemikian rupa sehingga pendedahan tidak akan memengaruhi satu sama lain.

3. Pendedahan Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan berbentuk *spray* disemprotkan sebanyak 10x di kandang kelompok P2 sebelum hewan uji dimasukkan ke kandang pendedahan. Pewangi ruangan *gel* juga dikaitkan pada dinding bagian atas kandang kelompok P1. Peletakkan pewangi diatur sedemikian rupa sehingga pendedahan pewangi dapat menyebar ke seluruh ruang kandang tanpa adanya gangguan dari tikus itu sendiri. Kandang kelompok kontrol perlu diletakkan di ruang yang terpisah dengan ruang tempat meletakkan kelompok perlakuan agar pendedahan pewangi pada kelompok perlakuan tidak menjadi pencemar pada kelompok kontrol. Durasi pendedahan pewangi ruangan dilakukan secara bertahap, dimulai dari 15 menit

kemudian meningkat dosisnya setiap 7 hari pendedahan yang dilakukan dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Pendedahan ini dilakukan terus menerus selama 67 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan hewan uji disesuaikan dengan pengelompokkannya :

a. Kelompok K

Kelompok ini merupakan kelompok kontrol. Pada kelompok ini, hewan uji tidak didedahkan pewangi ruangan

b. Kelompok P1

Kelompok ini adalah kelompok hewan uji yang diberi pendedahan pewangi ruangan berbentuk *gel*. Pendedahan pewangi ruangan yang berbentuk *gel* ini dilakukan selama 15 menit yang meningkat secara bertahap durasinya tiap 7 hari pendedahan dan dilakukan setiap 2 kali sehari yaitu pagi dan sore. Pendedahan ini dilakukan terus menerus hingga usia paparan 67 hari.

b. Kelompok P2

Kelompok ini adalah kelompok hewan uji yang diberi pendedahan pewangi ruangan berbentuk *spray*. Pendedahan pewangi ruangan yang berbentuk *spray* ini dilakukan selama 15 menit yang meningkat secara bertahap durasinya tiap 7 hari pendedahan dan dilakukan setiap 2 kali sehari yaitu pagi dan sore. Pendedahan ini dilakukan terus menerus hingga usia paparan 67 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman diberikan secara teratur dan dengan porsi yang sama pada ketiga kelompok. Pembersihan kandang dan sekam juga dilakukan secara teratur.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberi perlakuan sesuai kelompoknya sejak bayi hinggalama perlakuan 67 hari. Hewan uji yang telah didedahkan selama 67 hari dilakukan pembedahan yang sebelumnya telah dimatikan dengan *chloroform* pada hari ke-68 sejak dilakukan pendedahan pertama atau pada hari ke-75 dihitung sejak hewan uji lahir. Pembedahan dilakukan menggunakan alat-alat bedah sederhana dan dilakukan penganbilan organ maupun jaringan yang akan diamati. Organ maupun jaringan tersebut direndam pada larutan formalin 10 %.

7. Pembuatan Preparat

Organ mata difiksasi dengan formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi kornea mata dengan blok paraffin menggunakan pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE). Pemotongan organ mata dilakukan secara melintang.

8. Pengamatan Struktur Histologi Kornea Mata

Gambaran histologi kornea merupakan gambaran mikroskopis yang terlihat pada lensa okuler mikroskop cahaya dengan perbesaran (10x10) dengan pengamatan mengukur ketebalan kornea keseluruhan dan ketebalan epitel anterior menggunakan aplikasi *OptiLab* pada 5 lapang

pandang dan setiap lapang pandang dilakukan 5 kali pengukuran. Jumlah keratosit diamati pada perbesaran 40x10 mikroskop cahaya dan diamati pada 5 lapang pandang. Data dianalisis untuk membandingkan signifikansi perbedaan ketebalan kornea keseluruhan, ketebalan epitel anterior, dan jumlah keratosit antar kelompok.

H. ANALISIS DATA

Data yang terkumpul diuji secara statistik, uji normalitas distribusi data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Distribusi data normal dianalisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* kemudian dilanjutkan uji *Tukey*. Distribusi data yang tidak normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan analisis dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

I. ETIKA PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* jantan yang diperlakukan sebagai hewan uji namun tetap memerhatikan hewan uji tersebut sebagai makhluk hidup. Perlakuan pada tikus ini juga sesuai dengan kode etik perlakuan makhluk hidup selama masa perlakuan. Selain itu di akhir penelitian dilakukan pembedahan tikus untuk pengambilan organ mata untuk mengetahui gambaran histologinya dan ketebalan kornea. Pembedahan diawali dengan mematikan tikus di toples tertutup yang berisi kapas kloroform, kemudian setelah tikus mati baru dilakukan pembedahan agar tidak menyakiti tikus.