

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni dengan rancangan percobaan *post test only control group design*. Pengambilan hewan uji sebagai sampel dilakukan dengan cara random pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

B. Subjek penelitian

Menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* Galur Wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi :

Kriteria inklusi:

- a. Usia 2 bulan
- b. Sehat
- c. Berat 200-250 gram
- d. Tidak ada kelainan anatomi

Kriteria eksklusi:

- a. Terdapat kelainan anatomi
- b. Tikus tidak sehat

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang perlakuan hewan uji dan pembedahan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- b. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Centre
- c. Pengamatan, penelitian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan selama bulan Juli – September 2018

D. Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas

Pemberian paparan obat nyamuk jenis *one push* selama 5 menit dan 10 menit serta pemberian paparan obat nyamuk jenis *spray* selama 5 menit dan 10 menit.

B. Variabel Terikat

Perubahan gambaran histologi pada kornea : ketebalan total kornea, ketebalan epithelium anterior kornea, dan jumlah keratosit pada kornea tikus putih (*Rattus norvegicus*).

C. Variabel Terkendali

- a. Subyek penelitian, meliputi
 - 1) Jenis hewan uji sama yaitu dari galur Wistar.
 - 2) Jenis kelamin hewan uji sama, yaitu jantan.
 - 3) Umur hewan uji sama, yaitu 2 bulan.

- b. Perawatan : jenis dan kualitas pakan, minum, serta kandang setiap hewan uji sama.
- c. Bahan perlakuan : penggunaan obat nyamuk *spray* dan obat nyamuk *one push* dengan aroma jeruk dari produsen yang sama.

3. Definisi Operasional

1. Obat nyamuk *Spray* adalah obat nyamuk dengan sediaan cair. Cara penggunaan dari obat nyamuk jenis ini adalah dengan cara disemprotkan pada ruangan. Obat nyamuk *spray* memiliki 3 bahan aktif yaitu *praletrin* (0,1%), *sifultrin* (0,05%) dan *d-aletrin* (0,57%) (Fumakila, 2015)
2. Obat nyamuk *One Push* adalah obat nyamuk dengan sediaan cair. Cara penggunaan dari obat nyamuk *one push* adalah dengan cara disemprotkan sekali tekan pada ruangan. Obat nyamuk *one push* memiliki kandungan aktif *transfultrin* (21, 3%) (Fumakila, 2015).
3. Ketebalan total kornea dihitung dari membran basalis hingga ujung apikal epithelium anterior. Pengukuran ketebalan total kornea dilakukan dengan alat bantu “Miconos Sigma” dengan perbesaran 40x dan diambil 5 lapang pandang.
4. Ketebalan epithelium anterior dihitung dari membran bowman hingga permukaan epithelium anterior. Pengukuran ketebalan epithelium anterior dilakukan dengan alat bantu “Miconos Sigma” dengan perbesaran 40x dan diambil 5 lapang pandang.
5. Jumlah keratosit yang terlihat dihitung pada stroma, yaitu dari membran descement hingga membran bowman. Penghitungan keratosit dilakukan dengan alat bantu “Miconos Sigma” dengan perbesaran 40x dan diambil 5 lapang pandang.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain :

Kandang pemeliharaan, kandang perlakuan, perlengkapan makan, minor set, mikroskop, gelas benda, papan pembedahan, pot air, software “Image J”, hand scoon, masker

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain :

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berjenis kelamin jantan berumur 2 bulan sebanyak 30 ekor, pakan standar tikus, air mineral, formalin buffer, chloroform, NaCl fisiologis, alkohol 70%, kapas, obat nyamuk spray dan obat nyamuk one push aroma jeruk dari produsen yang sama

F. Jalannya Penelitian

1. Adaptasi hewan coba selama satu minggu
2. Pengelompokan hewan coba ke dalam 5 kelompok, yang terdiri dari:
 - a. Kelompok kontrol
 - b. Kelompok perlakuan 1 (P1)
 - c. Kelompok perlakuan 2 (P2)
 - d. Kelompok perlakuan 3 (P3)
 - e. Kelompok perlakuan 4 (P4)Setiap kelompok terdiri dari 6 tikus
3. Pemberian tanda pada subjek penelitian dengan menggunakan pikrat
4. Pemberian perlakuan:
 - a. Tikus dipindahkan ke kandang perlakuan
 - b. Tikus yang telah dipindahkan ke kandang perlakuan di paparkan dengan obat nyamuk
 - c. Tikus kelompok perlakuan kontrol dimasukkan kedalam kandang dan tanpa diberikan perlakuan

- d. Tikus perlakuan 1 dipaparkan dengan obat nyamuk *one push* selama 5 menit, tikus perlakuan 2 dipaparkan dengan obat nyamuk *one push* selama 10 menit, tikus perlakuan 3 dipaparkan dengan obat nyamuk *spray* selama 5 menit, tikus perlakuan 4 dipaparkan dengan obat nyamuk *spray* selama 10 menit, setiap kelompok perlakuan dipaparkan dalam satu ruangan khusus.
 - e. Perlakuan dilakukan selama 120 hari.
5. Pembedahan tikus
- a. Tikus dianastesi dengan cara dimasukkan pada toples lalu kapas yang telah diberi kloroform dimasukkan ke dalam toples yang sama, tikus yang tidak sadarkan diri segera dibunuh lalu dibedah.
 - b. Tikus dibedah dengan menggunakan alat minor set.
 - c. Organ yang diambil adalah bulbus oculi.
 - d. Bulbus oculi yang telah diambil dibersihkan dengan NaCl fisiologis.
 - e. Bulbus oculi telah di ambil dimasukan ke dalam pot air yang telah diisi dengan formalin buffer 10%, kemudian di tutup dengan rapat.
 - f. Pembuatan preparat dengan menggunakan metode blok paraffin, dengan teknik pewarnaan hematoxilyn eosin.
6. Pembuatan preparat kornea

Bulbus oculi yang telah dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer 10% dibuat preparat histologi dengan metode paraffin menggunakan teknik pewarnaan Hematoksin dan Eosin (HE).

Proses pembuatan preparat meliputi:

- a. Dehidrasi

Langkah ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan paraffin atau zat yang lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini bertujuan agar air tidak bercampur dengan cairan paraffin atau zat lain yang digunakan untuk membuat blok preparat.

b. Pembeningan (Clearing)

Pembeningan adalah tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan mengganti dengan larutan yang berikatan dengan paraffin.

c. Pembedaman (Embedding/Impregnasi)

Pembedaman adalah proses mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan diganti dengan paraffin. Pada tahap ini jaringan harus bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan saat dipotong dengan mikrotom membuat jaringan menjadi mudah robek.

d. Pengecoran (Blocking)

Pengecoran adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Cairan paraffin lalu dituangkan ke dalam cetakan blok. Masukkan potongan organ secara perlahan dan kemudian tuangkan kembali paraffin hingga merendam organ.

e. Pemotongan

Pemotongan adalah proses pemotongan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom (Jusuf 2009).

7. Pengamatan preparat kornea

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop miconos sigma dengan perbesaran 40 X 10 dalam 5 lapang pandang dengan melihat epithelium anterior, keseluruhan kornea, dan sel keratosit, lalu di ukur dengan image raster ketebalan epithelium anterior dan ketebalan total kornea, serta dihitung jumlah sel keratosit pada stroma.

G. Analisis data

Data ditabulasi dan dilanjutkan dengan melakukan uji normalitas terhadap sebaran data. Apabila sebaran data normal, maka dilanjutkan dengan analisis statistik uji parametrik perbandingan yaitu uji *One Way Anova*. Apabila sebaran data tidak normal, maka dilanjutkan dengan analisis statistik uji non parametrik perbandingan yaitu uji *Kruskal Wallis*.

H. Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus diaklimatisasi dalam kandang pemeliharaan menggunakan penutup kawat yang diberi botol air minum berisi air mineral dan diberikan pakan standar. Pemeliharaan dilakukan dibawah pengawasan peneliti, meliputi pemberian makanan dan minuman standar, pemberian obat nyamuk *spray* dan *one push*, pembedahan, dan penyimpanan organ. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus diberikan anestesi menggunakan kloroform kemudian dilakukan pembedahan menggunakan alat bedah minor. Kemudian dilakukan pengambilan organ kornea dan dimasukkan pada pot yang berisi larutan formalin buffer 10%. Kemudian dilakukan pembuatan preparat sesuai metode baku histologis pemeriksaan jaringan