

III. METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Menggunakan 25 ekor mencit jantan (*Mus musculus* L.) berumur 2 – 3 bulan yang dipilih secara random dan dibagi menjadi 5 kelompok.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat penelitian

Perlakuan hewan coba dalam penelitian ini di *Pet House* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan preparat kornea akan dilaksanakan di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3-4 bulan

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) berumur 2-3 bulan yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan kriteria sampel WHO yaitu minimal 5 ekor. Pada

penelitian ini digunakan sampel sebanyak 25 ekor dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit (*Mus musculus L.*). Adapun kelima kelompok mencit ini terdiri dari :

- a. Kelompok 1 merupakan kelompok mencit yang tidak dipajankan oleh sinar lampu ultraviolet C. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok kontrol.
- b. Kelompok 2 merupakan kelompok mencit yang dipajankan sinar lampu ultraviolet dengan intensitas 30menit/hari selama 15 hari
- c. Kelompok 3 merupakan kelompok mencit yang dipajankan sinar lampu ultraviolet dengan intensitas 1jam/hari selama 15 hari
- d. Kelompok 4 merupakan kelompok mencit yang dipajankan sinar lampu ultraviolet dengan intensitas 2jam/hari selama 15 hari
- e. Kelompok 5 merupakan kelompok mencit yang dipajankan sinar lampu ultraviolet dengan intensitas 4jam/hari selama 15hari

Adapun mencit yang digunakan pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

- Sehat
- Memiliki berat badan antara 30 gram – 35 gram
- Jenis kelamin jantan
- Berusia sekitar 2 – 3 bulan

Kriteria eksklusi pada penelitian ini diantaranya :

- Penampakan rambut kusam, rontok, botak dan aktivitas kurang/ tidak aktif

- Keluarnya eksudat yang tidak normal dari kornea, mulut, anus, genital setelah masa adaptasi
- Terdapat penurunan berat badan >10 % setelah masa adaptasi selama di laboratorium

Cara pengambilan sampel untuk penelitian eksperimental, dengan menggunakan rumus Federer :

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

Keterangan : t = Jumlah kelompok

n= Jumlah sampel per kelompok

Maka dalam lima perlakuan, jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dapat dihitung :

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Pada penelitian ini jumlah sampel untuk tiap kelompok ditentukan sebanyak 5 ekor mencit, dan jumlah kelompok mencit ada 5 sehingga penelitian ini membutuhkan 25 mencit dari populasi yang ada. Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi dengan $1/(1-f)$ dimana f adalah proporsi unit eksperimen yang hilang atau mengundur diri atau *drop out* 10%.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang kayu standar untuk mencit yang tutup logamnya telah diganti dengan bahan plastik untuk menghindari interferensi gelombang radiasi. Kandang berbentuk kotak persegi panjang berukuran 60 cm x 40 cm sebanyak 5 kandang. Lampu ultraviolet C 15 watt dan isolatornya, alat ukur intensitas sinar UV (*luxmeter*), gelas kimia, termometer, timbangan mencit, kotak mencit, papan fiksasi, makanan mencit, botol minuman mencit, alat bedah minor, kaca penutup (*cover glass*), stopwatch, dan mikroskop cahaya.

3.4.2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu organ tubuh mencit jantan, *aluminium foil*, *xylol*, parafin, akuades, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%, alkohol absolut, eosin, pewarna *Harris*, larutan PBS (*Phospat Buffer Saline*) dengan pH 6,8.

3.5. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yakni variabel dependen (variabel terikat) dan variabel independen (variabel bebas). Adapun variabel pada penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas adalah intensitas paparan sinar UV-C
2. Variabel terikat adalah histopatologi kornea (*Mus musculus L.*)

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Sinar UV-C	Sinar yang berasal dari lampu yang mengandung radiasi ultraviolet-C	Stopwatch	K (-) = tanpa paparan P1 = 30 menit P2 = 1 jam P3 = 2 jam P4 = 4 jam	Kategorik
Ketebalan kornea	Ketebalan lapisan epitel kornea yang dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X	Mikroskop	Dalam μm	Numerik

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Persiapan Lampu Ultraviolet C dan Isolatornya

Daya lampu ultraviolet C 15 watt digunakan untuk memapari mencit dengan luas permukaan yang tetap. Sumber radiasi ditempatkan dengan variasi pemaparan yaitu : 0 jam, 30menit, 1 jam, 2 jam, 4 jam. Untuk mencegah interferensi dari sumber cahaya yang lain, maka digunakan isolator yang berbentuk persegi panjang berukuran 65cm x 45cm x 35cm dan terbuat dari kayu dengan tebal 3 cm

3.6.2. Hewan Percobaan Mencit (*Mus musculus L.*)

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan (*inbred mice*) sebanyak 25 ekor dengan berat rata-rata 30 gram -35 gram dengan usia 2bulan-3 bulan (dewasa normal) yang diperoleh dari pembiakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Diberi makan peletkomersial mencit atau hewan pengerat (makanan asupan sekitar 15g/100gBB/hari; asupan air sekitar 15ml/100gBB/hari) dan ditempatkan dalam lingkungan terkendali (24 jam siklus gelap), suhu kamar dibiarkan secara alamiah berkisar pada $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban dibiarkan pada kisaran alamiah berkisar pada kelembaban udara 60-85%. Pakan (pelet komersial) dan minum (Air PAM) disuplai secara berlebih.

3.6.3. Perlakuan pada hewan percobaan

3.6.3.1. Mencit sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok

3.6.3.2. Selama 1 minggu tiap-tiap kelompok mencit diadaptasi sebelum diberi perlakuan

3.6.3.3. Mengukur berat badan mencit sebelum perlakuan

3.6.3.4. Melakukan perlakuan pada masing-masing kelompok :

- a. Kelompok kontrol : tidak dipajankan oleh sinar Lampu UV-C
- b. Kelompok perlakuan 1 : dipajankan terhadap sinar Lampu UV-C dengan intensitas 30 menit per hari selama 14 hari
- c. Kelompok perlakuan 2 : dipajankan terhadap sinarLampu UV-C dengan intensitas 1 jam per hari selama 14 hari
- d. Kelompok perlakuan 3 : dipajankan terhadap sinar Lampu UV-C dengan intensitas 2 jam per hari selama 14 hari

- e. Kelompok perlakuan 4 : dipajankan terhadap sinarLampu UV-C dengan intensitas 4 jam per hari selama 14 hari

3.6.3.5. Setelah 14 hari, perlakuan dihentikan.

3.6.3.6. Setelah dihentikan, 5 mencit jantan dari tiap kelompok dianastesi dengan *Katamine-xylazine* 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian mencit dieuthanasia berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan di kedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan di dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013).

3.6.3.7. Dilakukan laparotomi, kornea mencit diambil untuk pembuatan sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnan Hematoksilin Eosin.

3.6.3.8. Sampel kornea difiksasi dengan formalin 10%.

3.6.3.9. Metode pembuatan preparat

a. *Fixation*

1. Spsimen berupa potongan organ telah dipotong secara represensitif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
2. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali.

b. *Trimming*

1. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali.
2. Potongan organ tersebut dimasukkan kedalam *tissue cassette*.

c. Dehidrasi

1. Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu
2. Dehidrasi dengan :
 - Alkohol 70% selama 0,5 jam
 - Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - Alkohol 96% selama 0,5 jam
 - Alkohol absolut selama 1 jam
 - Alkohol absolut selama 1 jam
 - Alkohol absolut selama 1 jam
 - Alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam

d. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I dan II masing–masing selama 1 jam.

e. *Impregnansi*

Impregnansi dilakukan dengan menggunakan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C.

f. Embedding

1. Sisa paraffin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
2. Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58⁰C.
3. Paraffin cair dituangkan ke dalam pan.
4. Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
5. Pan dimasukkan ke dalam air.
6. Paraffin yang berisi potongan hepar dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4–6⁰C beberapa saat.
7. Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
8. Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.

g. Cutting

1. Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
2. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.
3. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron.

Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.

4. Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
 5. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
 6. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
 7. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (Suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.
- h. *Straining* (Pewarnaan) dengan Prosedur Pulasan Hematoksin–Eosin:

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut.

1. Dilakukan deparafinisasi dalam:
 - Larutan *xylol* I selama 5 menit
 - Larutan *xylol* II selama 5 menit
 - Ethanol absolut selama 1 jam

2. Hydrasi dalam:
 - Alkohol 96% selama 2 menit
 - Alkohol 70% selama 2 menit
 - Air selama 10 menit
 3. Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:
 - Haris hematoksilin selama 15 menit
 - Air mengalir
 - Eosin selama maksimal 1 menit
 4. Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan
 - Alkohol 70% selama 2 menit
 - Alkohol 96% selama 2 menit
 - Alkohol absolut 2 menit
 5. Penjernihan:
 - *Xylol I* selama 2 menit
 - *Xylol II* selama 2 menit
- i. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting* yaitu entelan dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.
 - j. Membaca *slide* dengan mikroskop

Cara melakukan pengukuran ketebalan kornea yaitu dengan memfoto preparat yang dilengkapi suatu program yang langsung menghubungkan mikroskop dengan komputer.

3.7. Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data akan diubah kedalam bentuk tabel - tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer yang terdiri beberapa langkah :

1. Koding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
2. *Data entry*, memasukkan data kedalam komputer.
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan kedalam komputer.
4. *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

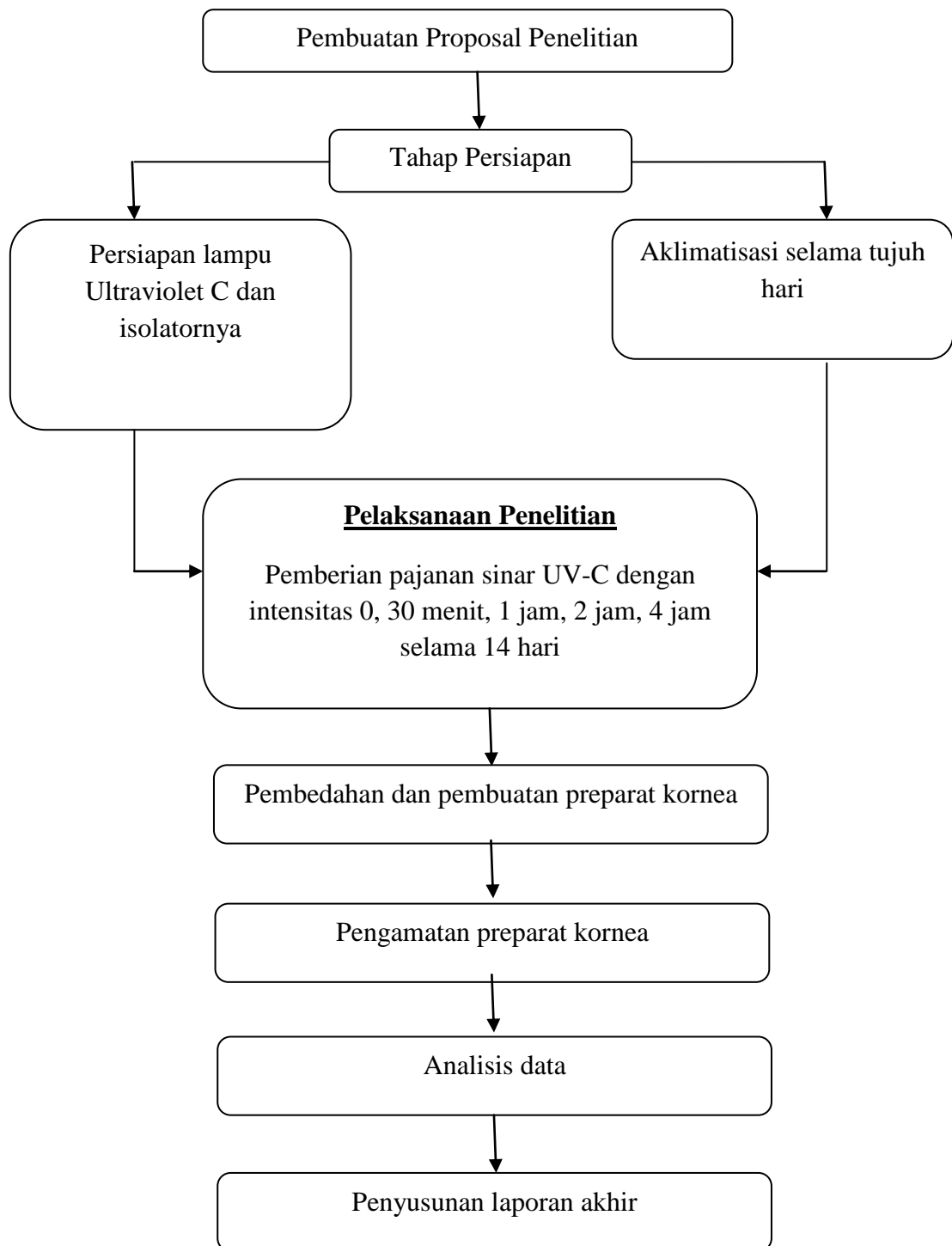
3.7.2. Analisis Statistika

Analisis statistika untuk mengolah data yang diperoleh akan menggunakan program komputerdimana akan dilakukan analisa bivariat. Analisa bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat dengan menggunakan uji statististik:

Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian dilakukan uji *Levene's* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan metode uji parametrik, digunakan uji *One Way ANOVA*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji non parametrik. *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna

bila $p < 0,05$. Jika pada uji *ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-hoc* LSD melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.8. Diagram Alur Penelitian



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian Pengaruh Paparan Sinar Lampu Ultraviolet-C terhadap Kornea Mencit Jantan (*Mus musculus L.*)

3.9. Ethical Clearance

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house*

berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.

- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).