

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. DESAIN PENELITIAN**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan *post-test only control group design*. Pemilihan hewan uji sebagai subjek penelitian dilakukan dengan cara random pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol.

#### **B. SUBYEK PENELITIAN**

Subyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.

##### **1. Kriteria Inklusi**

Subyek penelitian yang dipilih dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki kriteria :

- 1) Sehat (bergerak aktif dan tidak cacat)
- 2) Berumur 1 bulan
- 3) Berat badan rerata 50-100 gram
- 4) Telah diaklimatisasi dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu

##### **2. Kriteria Eksklusi**

- 1) Tikus mati

- 2) Tikus yang tampak sakit (gerakan tidak aktif, cacat, tidak mau makan)

### 3. Besar Sampel

Sampel dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok pewangi, kelompok karbon, kelompok pewangi dan karbon, serta kelompok kontrol. Besarnya sampel yang dipakai dihitung menggunakan :

$$\text{Rumus Federer} = (n-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

$n$  = Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

$r$  = Jumlah Kelompok perlakuan

Besar sampel :

$$\begin{aligned} (n-1)(r-1) &\geq 15 \\ (n-1)(4-1) &\geq 15 \\ (n-1)(3) &\geq 15 \\ n-1 &\geq 15/3 \\ n &\geq 5 + 1 \\ n &\geq 6 \end{aligned}$$

Dari perhitungan dengan menggunakan rumus Federer, diketahui bahwa sampel yang dibutuhkan berjumlah lebih besar atau sama dengan 6.

## C. LOKASI PENELITIAN

1. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang perlakuan hewan uji, sedangkan pembedahan dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas

Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta  
(FKIK UMY)

2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Gigi dan Mulut Asri Medical Center (RSGM AMC).
3. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY).

#### D. WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam waktu 7 bulan yang dimulai dengan tahap persiapan, yaitu penyusunan proposal penelitian. Alokasi waktu dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

**Tabel 3.1** Alokasi waktu penelitian

No.	Kegiatan	Bulan I	Bulan II	Bulan III	Bulan IV	Bulan V	Bulan VI	Bulan VII
1.	Persiapan							
2.	Pelaksanaan							
3.	Pengumpulan dan analisis data							
4.	Penulisan laporan penelitian							
5.	Pemaparan hasil penelitian							

## E. VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL

### 4. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas : pendedahan karbon aktif dan pewangi ruangan
- b. Variabel Tergantung : Ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sperma *Rattus norvegicus*
- c. Variabel pengganggu terkendali :
  - 1) Subyek penelitian, meliputi :
    - a) Jenis kelamin : jantan
    - b) Umur : 1 bulan
    - c) Jenis tikus : *Rattus norvegicus* galur Wistar
  - 2) Perawatan subjek : Jenis dan kualitas makanan, minuman, serta kandang setiap sampel sama.
  - 3) Bahan coba :
    - a) Penggunaan pewangi ruangan berbentuk gel dengan aroma citrus (jeruk) dengan kadar formaldehid 0,62 ppm
    - b) Penggunaan karbon aktif berbentuk granuler.

### 5. Definisi Operasional

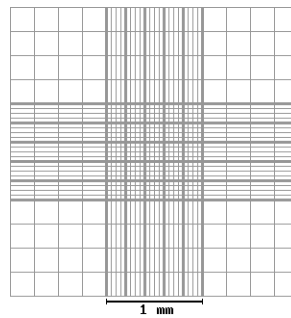
- a. **Pewangi ruangan** adalah produk-produk konsumen yang berfungsi untuk mengurangi bau yang tidak menyenangkan di dalam ruangan. Pewangi ruangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pewangi berbentuk gel yang biasanya digunakan pada kabin mobil dan dapat memuai. Aroma pewangi yang digunakan adalah aroma

citrus (jeruk) dari merk tertentu dengan kandungan formaldehid sebesar 0,62 ppm.

- b. **Karbon aktif** adalah produk-produk konsumen yang berfungsi untuk menetralkan udara yang terpolusi, biasanya digunakan dalam kabin mobil untuk menghilangkan bau di dalam mobil. Karbon aktif dikemas dalam kemasan berbentuk kotak yang mempunyai rongga udara di sekitarnya.
- c. **Ukuran diameter tubulus seminiferus** adalah ukuran diameter dari tubulus seminiferus yang akan diamati pada potongan melintang tubulus seminiferus. Untuk mengamati perubahan ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sperma, dibuat preparat histologis dengan pengecatan hematoxylin-eosin. Diameter tubulus seminiferus yang diukur adalah tubulus seminiferus yang bulat dan diukur dari tepi tubulus ke tepi tubulus yang lain yang mempunyai jarak terjauh. Pengamatan dilakukan dengan alat bantu *software Optilab* dengan perbesaran 4x10 dan diukur menggunakan *software Image Raster*. Tubulus seminiferus diamati dalam 5 lapang pandang dan setiap lapang pandang diukur 5 tubulus, kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan mikrometer ( $\mu\text{m}$ ).
- d. **Jumlah sperma** adalah menghitung jumlah total sperma di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x10. Sperma yang dihitung adalah seluruh sel yang motil maupun nonmotil dalam bilik hitung dan yang bagian kepalanya terlihat jelas. Pengamatan jumlah sperma diawali dengan memotong saluran sperma pada bagian kauda epididimis

kemudian dicacah halus dan diencerkan dengan NaCl 0,9% sebanyak 180 $\mu$ l. Jumlah sperma di hitung dalam 5 lapang pandang, kemudian dirata-ratakan dalam satuan “sperma/mL”.

- e. **Bilik hitung** yang digunakan untuk penghitungan jumlah sperma adalah bilik hitung *Improve Neubauer*. Pengamatan dilakukan pada bagian tengah bilik hitung dan 4 kotak di bagian sudut kotak besar dengan menggunakan 5 lapang pandang pengamatan.

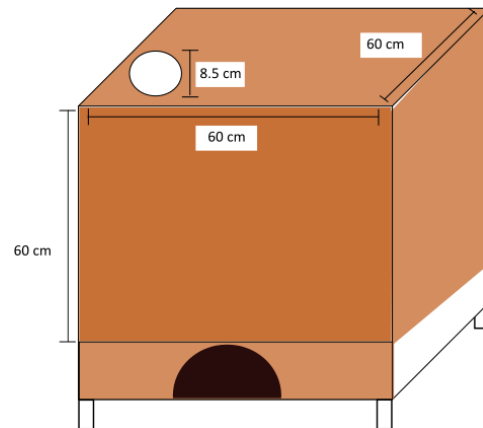


**Gambar 3.1** Bilik hitung *Improve Neubauer*

## F. INSTRUMEN PENELITIAN

### 6. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kandang perawatan, kandang perlakuan, perlengkapan perawatan tikus (botol minum, gelas ukur makanan), timbangan badan tikus kapasitas 1000 gram, perlengkapan bedah minor, tempat organ (pot organ), mikroskop binokuler, komputer/laptop, *software Optilab*, bilik hitung *Improve Neubauer*, kapas, tisu, spuit mikropipet, dan gelas beker.

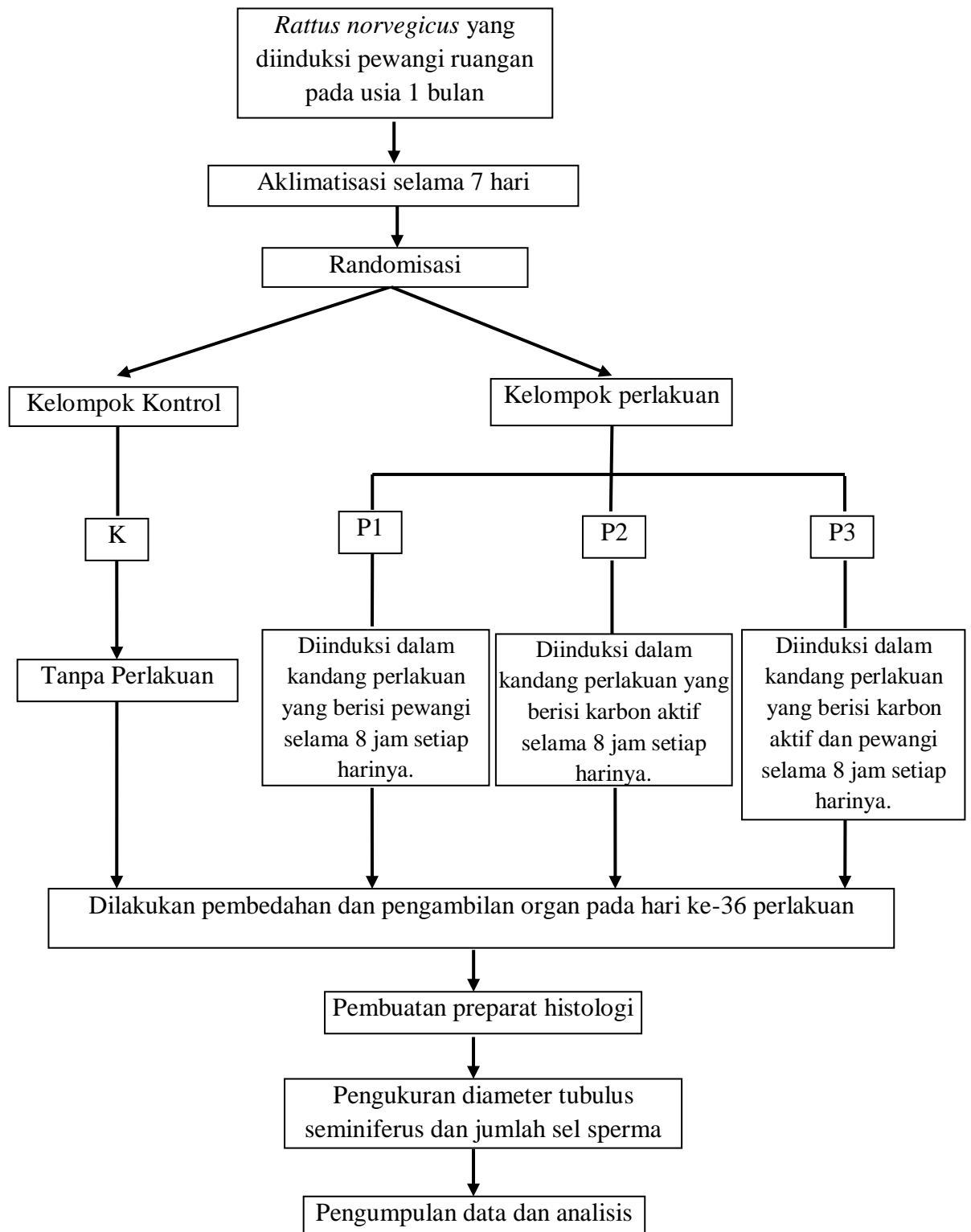


**Gambar 3.2** Desain kandang perlakuan

## 7. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah : 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berjenis kelamin jantan dengan umur 1 bulan, akuades, air mineral, pakan tikus, sekam, alkohol 70%, formalin 10%, pewangi ruangan gel beraroma jeruk, karbon aktif granular, kloroform 35% dan NaCl 0,9%.

## G. JALANNYA PENELITIAN/ALUR PENELITIAN



**Gambar 3.3** Alur jalannya penelitian



## **H. CARA PENGUMPULAN DATA**

### **1. Persiapan Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih dewasa (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 1 bulan, dipilih sesuai galur yaitu galur Wistar. Hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari dan dipelihara di kandang pemeliharaan hewan uji dengan suplai pakan dan minum standar.

### **2. Pengelompokan Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam eksperimen ini berjumlah 28 ekor tikus dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok pewangi (P1), kelompok karbon (P2), kelompok karbon dan pewangi (P3), dan kelompok kontrol (K). Setiap kelompok terdiri atas 7 ekor tikus. Kelompok P1, P2, serta P3 diletakkan dalam kandang khusus selama perlakuan berlangsung. Kandang ini sudah dirancang agar penginduksian tidak mempengaruhi kelompok yang lain.

### **3. Penginduksian Pewangi Ruangan dan Karbon Aktif Hewan Uji**

Pewangi ruangan berbentuk gel digantung pada tepi kandang perlakuan hewan uji pewangi (P1). Sedangkan pada kelompok P2, karbon aktif digantung di tepi kandang perlakuan kelompok tersebut. Pewangi ruangan gel dan karbon aktif digantung bersamaan di tepi kandang perlakuan kelompok P3. Penginduksian dilakukan setiap hari selama 8 jam.

### **4. Perlakuan**

Perlakuan pada hewan uji dilakukan sesuai dengan pengelompokannya.

- a. Kelompok kontrol (K) adalah kelompok hewan uji yang tidak diberikan perlakuan. Pada kelompok ini tidak diinduksi pewangi ruangan maupun karbon aktif.
- b. Kelompok pewangi (P1) adalah kelompok hewan uji yang diinduksi oleh pewangi ruangan selama 35 hari
- c. Kelompok karbon (P2) adalah kelompok hewan uji yang diinduksi oleh karbon aktif selama 35 hari
- d. Kelompok karbon dan pewangi (P3) adalah kelompok hewan uji yang diinduksi oleh karbon aktif dan pewangi selama 35 hari.

## **5. Pemeliharaan**

Makanan dan minuman yang diberikan kepada hewan uji berupa makanan dan minuman yang standar dengan porsi yang sama. Pembersihan kandang dan penggantian sekam dilakukan secara rutin setiap 2 hari sekali. Hewan uji juga ditimbang berat badannya setiap 2 hari sekali untuk mengontrol pertumbuhannya.

## **6. Pembedahan dan Pengambilan Organ**

Hewan uji diberikan perlakuan sesuai dengan pengelompokkannya selama 35 hari. Pada hari ke 36, dilakukan pembedahan pada hewan uji, dihitung sejak awal perlakuan tikus berumur 2 bulan. Pembedahan diawali pemberian anastesi pada hewan uji menggunakan kloroform 35%. Hewan uji yang telah dianastesi kemudian dibedah menggunakan peralatan bedah minor dan diambil organ yang akan diamati, yaitu testis. Organ disimpan dalam larutan formaldehid 10% sebelum dilakukan

pembuatan preparat histologi. Sedangkan kauda epididimis dicacah untuk mengamati dan menghitung jumlah sperma

### **7. Pembuatan Preparat**

Testis yang disimpan dalam formaldehid tadi kemudian dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin (HE)*.

### **8. Uji Histologi Ukuran Diameter Tubulus Seminiferus**

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 4x10 dan ukuran diameter tubulus seminiferus dihitung menggunakan mikroskop dengan bantuan *software Optilab*. Diukur diameter sel tubulus seminiferus dalam 5 lapang pandang dan kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan micrometer ( $\mu\text{m}$ ).

### **9. Uji Perhitungan Jumlah Sel Sperma**

Perhitungan sperma diawali dengan pemotongan saluran sperma yaitu di kauda epididimis, kemudian dicacah kecil-kecil. Setelah itu ditambahkan 180 $\mu\text{l}$  NaCl 0,9% pada cawan petri yang berisi cacahan saluran sperma, kemudian diaduk rata. Larutan campuran sperma dimasukkan ke dalam bilik hitung *Improved Neubauer*. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sperma di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10 pada 5 lapang pandang. Pengamatan dilakukan pada kotak kecil bilik hitung. Kotak kecil yang dipilih adalah satu kotak kecil yang terletak di bagian tengah dan 4 kotak di bagian sudut kotak besar. Sedangkan sperma yang diamati adalah sperma yang bagian kepalanya

terlihat jelas. Kemudian dilakukan pencatatan hasil perhitungan sperma, dan dirata-ratakan dalam satuan “sperma/mL”.

## **I. ANALISIS DATA**

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan terhadap pemeriksaan ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sel sperma menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk*. Jika analisis distribusi data menunjukkan hasil normal, maka data dianalisis menggunakan metode statistik *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan bermakna dari setiap kelompok. Namun jika distribusi data menunjukkan hasil yang tidak normal, maka data dianalisis menggunakan metode statistik *Kruskal Wallis*.

## **J. KESULITAN PENELITIAN**

Kesulitan yang dialami dalam penelitian ini adalah saat proses penghitungan jumlah sperma, di mana sperma yang dihitung sangat banyak dan selalu bergerak-gerak, sehingga sedikit sulit untuk menghitungnya.

## **K. ETIK PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Selama penelitian, hewan uji dirawat dan diperlakukan sesuai etika penelitian. Saat akhir penelitian, diperlukan pembedahan untuk mengambil organ testis dari hewan uji tersebut, yang terlebih dahulu dilakukan anastesi dengan memaparkan kloroform.