

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium, 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. Subyek Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih jantan sebagai hewan uji yang memenuhi kriteria:

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar*
2. Tikus putih dengan usia 30 hari dengan berat badan 40-90 gram

Besarnya sampel yang dipakai dapat dihitung dengan rumus Federer :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

r = jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq (15+3)/3$$

$$n \geq 6$$

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

Tikus tersebut kemudian dibagi dalam empat kelompok perlakuan (pewangi ruangan, pewangi ruangan dan karbon, karbon, dan kelompok terakhir sebagai kontrol).

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 selama dua bulan.
- b. Pembuatan preparat histologi dilakukan di laboratorium Asri Medical Centre.
- c. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama kurang lebih 40 hari dengan pengadaptasian selama tujuh hari, kemudian perlakuan dilakukan selama 35 hari, dan pembedahan dilakukan pada hari pertama setelah hari perlakuan terakhir.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Pemberian karbon aktif kepada tujuh ekor tikus putih, pemberian pewangi terhadap tujuh ekor tikus putih, pemberian karbon dan pewangi terhadap tujuh ekor tikus putih, dan tujuh ekor tikus yang tidak diberikan karbon dan pewangi.

2. Variabel Tergantung

Gambaran histologi ketebalan epitel pada tubulus seminiferus dan jumlah sel Leydig pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

3. Variabel Terkendali

- a. Subyek penelitian, meliputi
 - 1) Jenis hewan uji sama yaitu berasal dari galur *Wistar*.
 - 2) Jenis kelamin hewan uji sama, yaitu jantan.
 - 3) Umur hewan uji sama, yaitu dua bulan.
- b. Perawatan : jenis dan kualitas pakan, minum, serta kandang setiap hewan uji sama.
- c. Bahan perlakuan : penggunaan pewangi ruangan *gel* dengan kadar formalin 0,62 ppm dengan aroma jeruk dan karbon aktif bentuk granula.

E. Definisi Operasional

1. Pewangi ruangan *gel* adalah produk yang berbentuk *gel* padat yang dapat memuai yang digunakan untuk memberikan bau harum pada ruangan.

Pewangi ruangan yang digunakan adalah pewangi ruangan *gel* beraroma jeruk dengan kadar formalin 0,62 ppm.

2. Karbon aktif adalah produk yang mempunyai pori-pori yang banyak dan luas permukaan yang sangat luas sehingga mempunyai daya serap yang tinggi. Kemampuan adsorpsi tersebut menyebabkan karbon aktif sering digunakan untuk menyerap senyawa yang ada di udara dan menghilangkan bau tidak sedap pada ruangan. Karbon aktif yang digunakan adalah karbon berbentuk granula.
3. Pendedahan pewangi ruangan dan karbon aktif adalah pemaparan pewangi ruangan dan karbon aktif yang diberikan sesuai dengan kelompok perlakuan. Pendedahan dilakukan dengan cara memasukkan pewangi ruangan dan karbon aktif ke dalam kandang perlakuan tikus. Perlakuan dilakukan selama delapan jam/hari dalam 35 hari.
4. Pembedahan hewan adalah proses pengorbanan hewan dengan cara dipaparkan dengan kloroform kemudian hewan dibedah dengan menggunakan alat-alat bedah minor untuk diambil organnya. Organ yang diambil pada penelitian ini adalah testisnya.
5. Pembuatan preparat histologi dan pengecatan *Hematoxylin Eosin* (HE) adalah serangkaian proses untuk membuat preparat histologi dan pengecatan dengan teknik pewarnaan HE pada jaringan agar dapat diamati dengan menggunakan mikroskop.
6. Ketebalan lapisan epitel tubulus seminiferus adalah ketebalan lapisan epitel tubulus seminiferus yang diamati pada potongan melintang tubulus

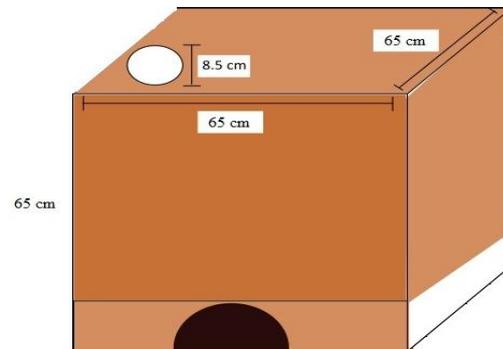
seminiferous dengan satuan mikrometer (μm). Tebal lapisan epitel tubulus seminiferus dihitung dari bagian spermatogonium hingga sebelum mencapai lumen yaitu pada spermatid. Pengukuran dilakukan dengan alat bantu software “Optilab” dengan perbesaran 10x10 kemudian dihitung empat ketebalan lapisan epitel tubulus seminiferus pada lima tubulus seminiferus dalam tiga lapang pandang dan di rata-rata.

7. Sel Leydig adalah sel yang terletak interstitial diantara tubulus seminiferus. Selnya berbentuk ovoid atau poligonal dengan sitoplasma eosinofilik. Sel Leydig berfungsi sebagai penghasil hormon testosteron. Jumlah sel Leydig dihitung dengan mengamati sel Leydig di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x10 dalam 15 lapang pandang kemudian dijumlah dan di rata-rata.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. 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, kapas, tisu, spuit mikropipet, dan gelas beker.

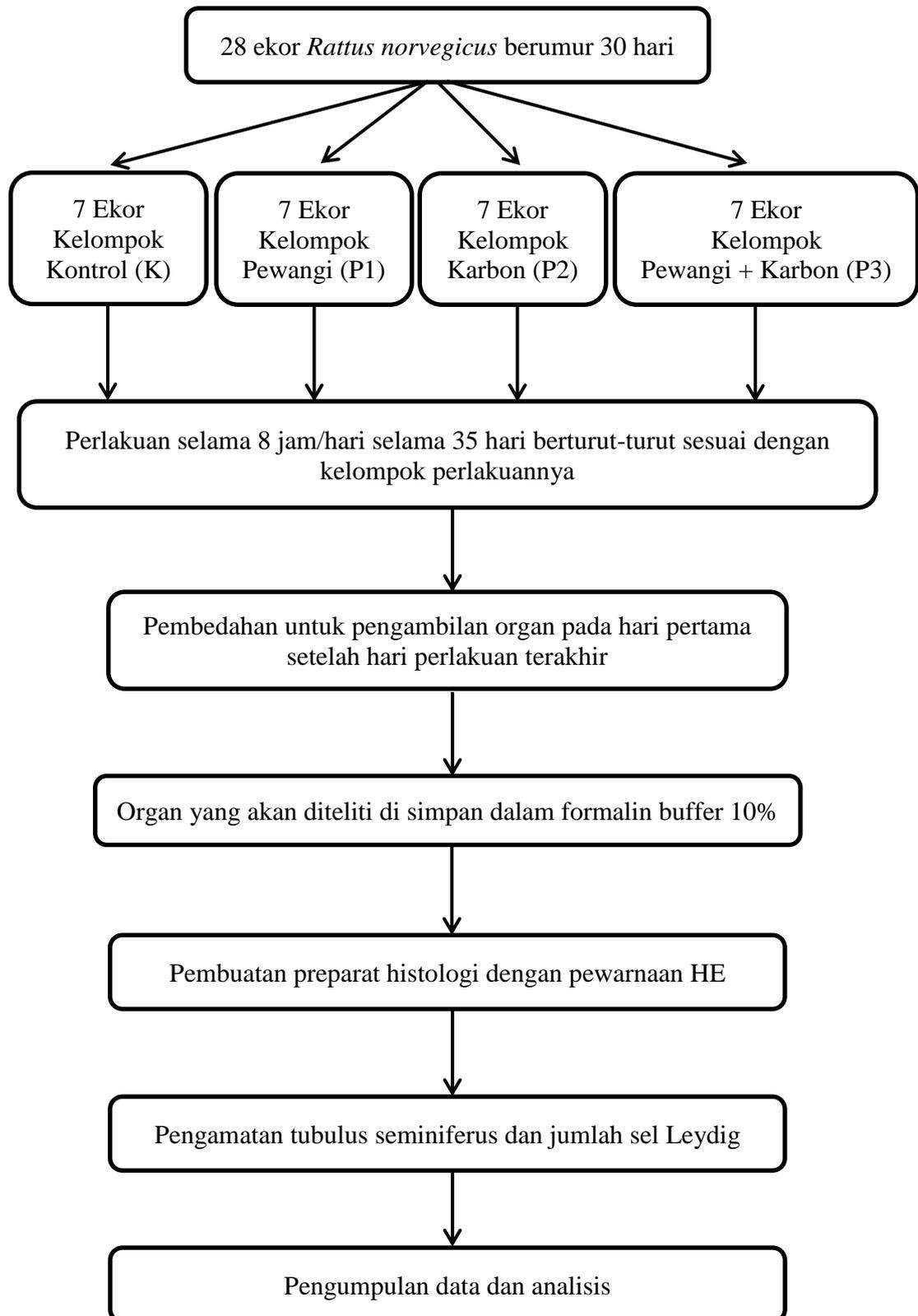


Gambar 7. Desain kandang perlakuan

2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah : 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* berjenis kelamin jantan dengan umur 30 hari, aquades, 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



H. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

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

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam perlakuan sejumlah 28 ekor tikus dan dibagi menjadi kelompok kontrol (K) dan tiga kelompok perlakuan yaitu, kelompok pewangi (P1), kelompok karbon (P2), kelompok pewangi dan karbon (P3). Setiap kelompok terdiri dari tujuh ekor tikus. Tiap kelompok tikus uji ditempatkan pada satu kandang khusus yang sudah dirancang sehingga pendedahan tidak mempengaruhi satu sama lain.

3. Pendedahan Karbon dan Pewangi Ruangan

Karbon digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok P2 dan kelompok P3, sedangkan pewangi ruangan *gel* digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok pewangi P1 dan kelompok karbon dan pewangi P3 berhadapan dengan karbon, sehingga baik karbon dan pewangi tidak dapat dijangkau oleh tikus. Dosis pendedahan adalah 8 jam setiap harinya selama 35 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan pada hewan uji dilakukan sesuai dengan pengelompokannya

- a. Kelompok K adalah kelompok hewan uji tanpa perlakuan. Pada kelompok ini hewan uji tidak didedahkan dengan karbon maupun pewangi ruangan.
- b. Kelompok P1 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk gel. Pendedahan dilakukan selama 35 hari.
- c. Kelompok P2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan karbon aktif berbentuk granula. Pendedahan dilakukan selama 35 hari.
- d. Kelompok P3 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk gel dan karbon aktif berbentuk granula. Pendedahan dilakukan selama 35 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman yang diberikan pada tikus secara ad libitum setiap pagi hari. Pembersihan kandang pemeliharaan dan penggantian sekam dilakukan secara rutin dua hari sekali.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberikan perlakuan sesuai dengan pengelompokannya selama 35 hari. Pembedahan dilakukan pada hari pertama setelah hari pendedahan terakhir. Pembedahan dilakukan dengan menganastesi tikus terlebih dahulu dengan menggunakan kloroform. Tikus kemudian dibedah dengan menggunakan alat-alat bedah minor untuk mengambil organ yang akan diteliti yaitu testis. Organ yang sudah terambil tersebut kemudian disimpan pada larutan formalin buffer 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi.

7. Pembuatan Preparat

Testis disimpan dengan formalin buffer 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin menggunakan teknik pewarnaan Hematoksin Eosin (HE)

8. Pemeriksaan Histologi

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop cahaya. Ketebalan lapisan epitel tubulus seminiferus diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x10 dan ketebalan epitel dihitung dengan bantuan *software* Optilab. Dihitung empat ketebalan lapisan epitel tubulus seminiferus dalam tiga lapang pandang dan dihitung rata-ratanya. Masing-masing lapang pandang terdapat lima tubulus yang diamati. Sel Leydig diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x10 dan jumlah sel Leydig dihitung dengan bantuan *software* Optilab. Jumlah sel Leydig didapat dengan mengamati 15 lapang pandang kemudian dijumlah dan dihitung rata-ratanya

I. Analisis Data

Data ditabulasi dan dilanjutkan dengan melakukan uji normalitas terhadap sebaran data. Dari uji normalitas data *Shapiro Wilk* didapatkan sebaran data tidak normal. Uji analisis dilanjutkan dengan analisis statistik uji non parametrik perbandingan *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna.

J. Kesulitan Penelitian

Kesulitan yang dialami pada penelitian ini adalah pada proses penghitungan tebal epitel tubulus seminiferus, dimana gambar preparat tidak semuanya memiliki hasil yang bagus, sehingga perlu melakukan pencarian terlebih dahulu tubulus seminiferus yang mempunyai bentuk mendekati lingkaran.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Selama penelitian hewan uji dirawat dan diperlakukan sesuai etika penelitian. Tikus diaklimatisasi dan dipelihara dalam kandang pemeliharaan berukuran 45x35x12 cm dengan penutup yang terbuat dari kawat kasa yang diberi botol minum berisi air mineral dan diberikan pakan standar secara ad libitum. Kandang ditaruh dalam ruangan dengan temperatur suhu kamar. Tikus diberikan anestesi dengan menggunakan kloroform terlebih dahulu sebelum dilakukan pembedahan dengan menggunakan alat bedah minor. Organ testis kemudian diambil dan di masukkan ke dalam toples yang berisi larutan formalin buffer 10%. Organ testis tersebut kemudian dibuat preparat histologi dengan metode pengecatan Hematoksilin Eosin (HE).