

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 random pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol tanpa diadakannya *pre-test*.

B. SUBYEK PENELITIAN

Jumlah sampel terbagi dalam 3 kelompok perlakuan (*gel, spray, kontrol*).

Besarnya sampel yang dipakai dapat dihitung dengan rumus Federer :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

r = jumlah kelompok perlakuan

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

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

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

$$n \geq 8,5$$

Dari perhitungan dengan menggunakan rumus Federer diketahui bahwa sampel yang dibutuhkan lebih besar atau sama dengan 8,5.

Tikus yang digunakan dalam penelitian memenuhi kriteria:

1. Bayi tikus dengan usia 8 hari dengan berat yang tidak ditentukan.
2. Tikus yang dipilih adalah bayi tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* dan diambil dari induk-induk sehat.
3. Tikus putih diadaptasi dengan lingkungan laboratorium sekitar satu minggu sebelum perlakuan.

C. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

1. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang perlakuan hewan uji dan pembedahan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY) selama 8 bulan sejak September 2013 hingga April 2014.
2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
3. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY).

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas : Pendedahan pewangi ruangan jenis *spray* dan *gel*.
2. Variabel Tergantung : Ketebalan lapisan sel spermatogenik dan jumlah sperma bayi tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).
3. Variabel pengganggu terkendali, terdiri dari :

- a. Variabel sampel penelitian, meliputi:
 - 1) Jenis kelamin hewan uji sama, yaitu jantan.
 - 2) Umur hewan uji sama, yaitu 8 hari.
 - 3) Jenis hewan uji sama yaitu berasal dari galur *Sprague Dawley*.
- b. Variabel perawatan : jenis dan kualitas makanan, minuman, serta kandang setiap sampel sama.
- c. Variabel bahan coba : penggunaan pewangi ruangan dengan merek dagang dan jenis aroma jeruk baik *spray* maupun *gel*.

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Pendedahan pewangi ruangan *spray* adalah produk yang digunakan untuk menghilangkan bau tidak sedap dalam suatu ruangan tertutup berbentuk cair. Pewangi ruangan yang digunakan adalah pewangi ruangan *spray* beraroma jeruk dari merk tertentu. Pendedahan dilakukan dengan cara memberikan paparan pewangi ruangan *spray* terhadap hewan uji selama 15 menit pagi dan sore setiap harinya. Dosis dinaikkan selama 15 menit pagi dan sore pada setiap minggunya, sehingga di akhir perlakuan lama pendedahan menjadi 4,5 jam.
2. Pendedahan ruangan *gel* adalah produk yang digunakan untuk menghilangkan bau tidak sedap dalam suatu ruangan tertutup yang berbentuk *gel* padat yang dapat memuai. Pewangi ruangan yang digunakan adalah pewangi ruangan *gel* beraroma jeruk dari merk tertentu. Pendedahan dilakukan dengan cara memberikan paparan pewangi ruangan *gel* terhadap hewan uji selama 15 menit pagi dan sore setiap harinya. Dosis

dinaikkan selama 15 menit pagi dan sore pada setiap minggunya, sehingga di akhir perlakuan lama pendedahan menjadi 4,5 jam.

3. Ketebalan lapisan sel spermatogenik adalah ketebalan susunan lapisan sel spermatogenik yang terdapat pada tubulus seminiferus yang diamati pada potongan melintang tubulus seminiferus. Pengukuran dengan alat bantu software “Optilab” dengan perbesaran 10x10, dihitung 4 ketebalan lapisan sel spermatogenik dalam 5 lapang pandang dan kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan mikron.
4. Jumlah sperma adalah menghitung jumlah total sperma di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x10. Sperma yang dihitung adalah seluruh sperma motil maupun non motil di dalam bilik hitung. Cara pengencerannya adalah memotong saluran sperma pada kauda epididimis kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9% sebanyak 800µl.
5. Bilik hitung yang digunakan untuk penghitungan jumlah sperma adalah bilik hitung *Improve Neubauer*. Pengamatan dilakukan pada bagian tengah bilik hitung dan menggunakan 5 lapang pandang pengamatan.

F. INSTRUMEN PENELITIAN

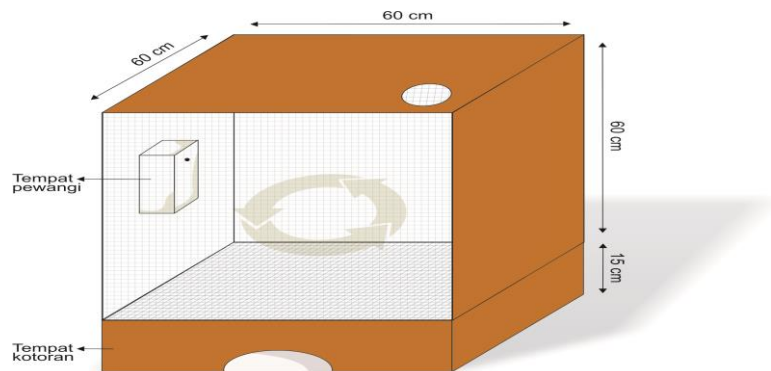
1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Kandang perawatan, kandang perlakuan, perlengkapan pemeliharaan tikus (botol minum tikus, tempat makan, *gelas* ukur makan, dan sebagainya), perlengkapan bedah minor, timbangan badan tikus merek *Casbee* (kapasitas 1000x0,1g), tempat organ (pot organ), mikroskop binokuler, komputer/laptop, software

optilab, bilik hitung *Improve Neubauer*, kapas, tisu, spuit, mikro pipet, dan *gelas baker*.

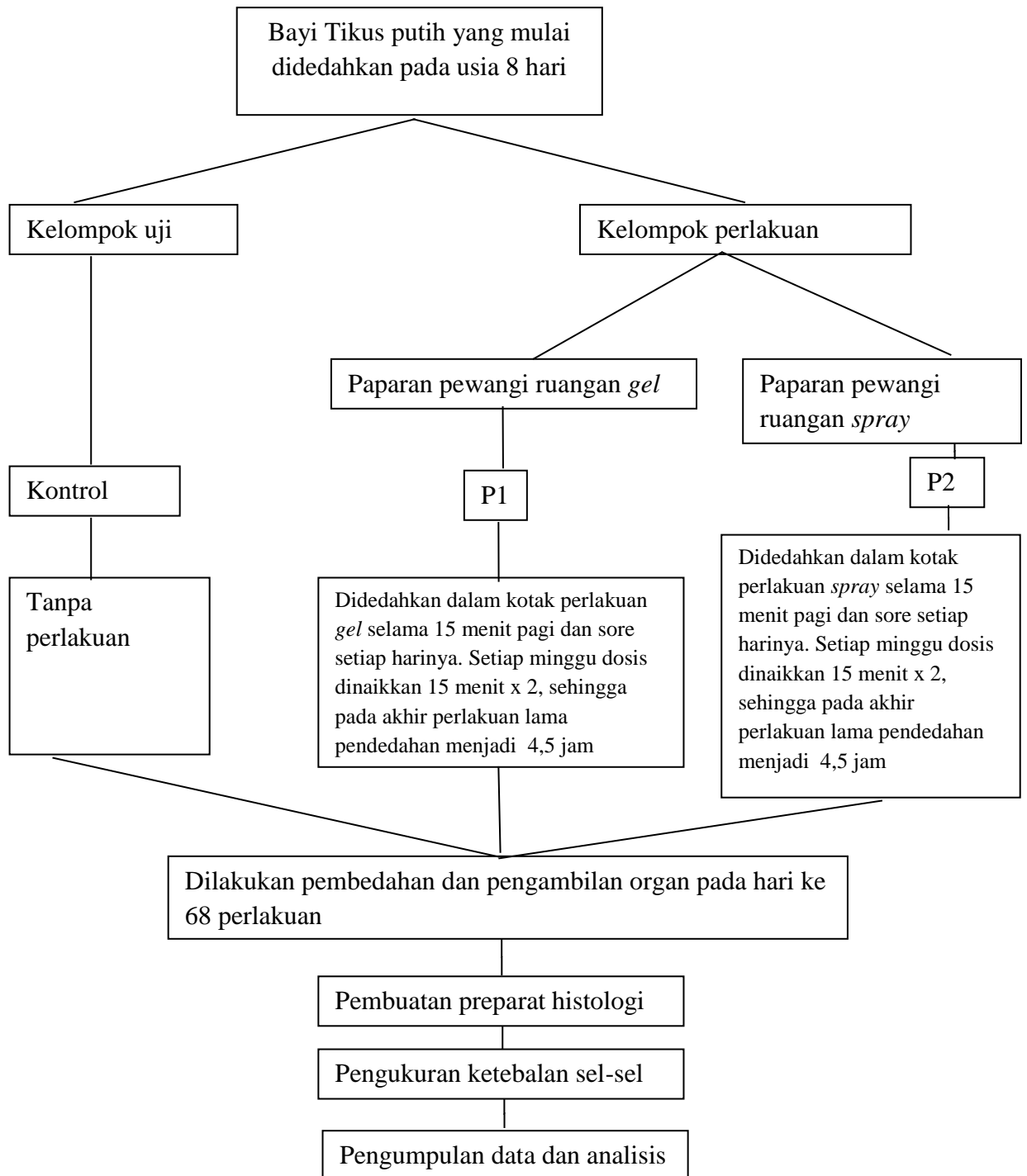
2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan antara lain: Akuades, tiga puluh ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berjenis kelamin jantan berumur 8 hari, air mineral dan pakan tikus, alkohol 70%, formalin 10%, pewangi ruangan *spray* dan *gel* beraroma jeruk dari satu merek, kloroform 35%, dan NaCl 0.9 %.



Gambar 4. Desain Kandang Perlakuan

G. JALANNYA PENELITIAN/ALUR PENELITIAN



H. CARA PENGUMPULAN DATA

1. Persiapan Hewan Uji

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

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yg digunakan dalam perlakuan sejumlah 30 ekor tikus dan dibagi menjadi 3 kelompok uji kelompok *gel* (P1), (kelompok *spray* (P2), dan kelompok kontrol (Kontrol)).Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus. Tiap kelompok tikus uji ditempatkan pada satu kandang khusus yang sudah dirancang sehingga pendedahan tidak mempengaruhi satu sama lain.

3. Pendedahan Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan *spray* disemprotkan 10 kali semprot diawal pendedahan pada kelompok tikus uji *spray* (P2). Pewangi ruangan *gel* digantung pada tepi kandang perlakuan kelompok tikus uji *gel* (P1), sehingga tidak dapat dijangkau oleh tikus. Pendedahan pewangi ruangan dilakukan selama 67 hari. Dosis awal pendedahan adalah 15 menit yang dilakukan 2 kali setiap harinya yaitu pagi dan sore. Dosis dinaikkan 15 menit pagi dan sore setiap satu minggu sekali, sehingga didapat hasil akhir paparan yaitu 4,5 jam di usia paparan 67 hari.

4. Perlakuan

Perlakuan pada hewan uji dilakukan sesuai dengan pengelompokannya.

- a. Kelompok Kontrol adalah kelompok hewan uji tanpa perlakuan. Pada kelompok ini hewan uji tidak didedahkan pewangi ruangan.
- b. Kelompok P1 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk *gel*. Pendedahan dilakukan selama 67 hari.
- c. Kelompok P2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan pewangi ruangan berbentuk *spray*. Pendedahan dilakukan selama 67 hari.

5. Pemeliharaan

Makanan dan minuman yang diberikan pada tikus uji merupakan makanan dan minuman standar dengan porsi yang sama. Pembersihan kandang pemeliharaan dan penggantian sekam dilakukan secara rutin setiap satu minggu sekali.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan uji diberikan perlakuan sesuai dengan pengelompokannya selama 67 hari. Kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke 68 dihitung sejak awal pendedahan atau pada saat tikus berusia 75 hari. Pembedahan diawali dengan penimbangan berat badan hewan uji, kemudian hewan uji dianestesi menggunakan kloroform. Tikus dibedah menggunakan alat-alat bedah minor. Selain itu juga dilakukan pengambilan organ yang akan diteliti yaitu testis. Organ disimpan pada larutan formalin 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi.

7. Pembuatan Preparat

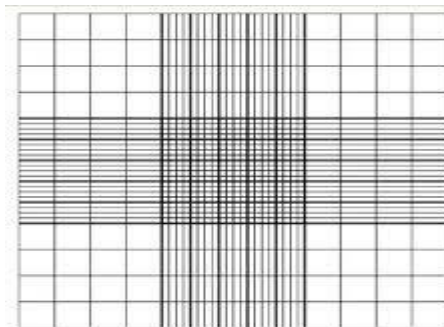
Testis disimpan dengan formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

8. Uji Histologi Ketebalan Lapisan Sel Spermatogenik

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x10 dan ketebalan lapisan sel spermatogenik dihitung menggunakan mikroskop dengan bantuan *software* Optilab. Dihitung 4 ketebalan lapisan sel spermatogenik dalam 5 lapang pandang dan kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan mikron.

9. Uji Perhitungan Jumlah Sperma

Perhitungan sperma diawali dengan pemotongan saluran sperma yaitu di kauda epididimis, kemudian dipotong keci-kecil. NaCl 0,9% ditambahkan sebanyak 800 μ l pada *gelas* baker yang berisi potongan saluran sperma, lalu diaduk. Larutan campuran spermatozoa dimasukkan ke dalam bilik hitung *Improved Neubauer*. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sperma di bawah mikroskop elektron dengan perbesaran 10x10 pada lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan pada kotak kecil bilik hitung. Kotak kecil yang dipilih adalah satu kotak yang terletak di bagian tengah dan empat kotak di bagian sudut kotak besar. Kemudian dilakukan pencatatan hasil perhitungan jumlah sperma.



Gambar 5. Bilik hitung Improved Neubauer

I. ANALISIS DATA

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan terhadap pemeriksaan ketebalan lapisan sel spermatogenik dan jumlah sperma menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Jika analisis distribusi data menunjukkan hasil normal, maka data dianalisis menggunakan metode statistik *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey*. Namun jika distribusi data menunjukkan hasil yang tidak normal, maka data dianalisis menggunakan metode statistik *Kruskal Wallis*.

J. ETIKA PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan yang diperlakukan sebagai hewan uji dengan tetap memperhatikan hak tikus tersebut sebagai makhluk hidup. Perlakuan yang diberikan pada tikus ini juga sesuai dengan kode etik perlakuan makhluk hidup selama masa perlakuan. Saat akhir penelitian dilakukan *euthanasia* pada hewan uji menggunakan kloroform dengan hati-hati agar tidak menyiksa hewan uji. Prosedur *euthanasia* dilakukan sesuai dengan etika perlakuan hewan uji untuk kepentingan pembedahan. Pembedahan hewan uji

bertujuan untuk pengambilan tubulus seminiferus untuk mengetahui ketebalan lapisan sel spermatogenik dan jumlah sperma.