

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini adalah ekperimental laboratorium dengan rancangan percobaan *post-test only control group design*. Hewan uji akan dirandomisasi baik pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol tanpa diadakan pre-test.

B. Subjek Penelitian

Sampel menggunakan bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sparague Dawley* jantan sejumlah 30 ekor. Sampel dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok *gel* (P1), *spray* (P2), kontrol (K), yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor tikus.

Perhitungan besar sampel tiap kelompok yang digunakan dapat dihitung dengan rumus Federer :

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

Tikus yang digunakan dalam penelitian memenuhi kriteria:

1. Umur dan berat tikus harus sama, yaitu bayi dan mulai didedahkan di umur ke 8 hari dengan berat yang tidak ditentukan.
2. Bayi tikus yang dipilih adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur galur *Spraque Dawley* dan diambil dari induk-induk sehat.
3. Tikus putih diadaptasi dengan lingkungan laboratorium sekitar 1 minggu, sebelum perlakuan dilakukan yang nantinya akan mendapat perlakuan perawatan yang sama.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 8 bulan dengan lokasi penelitian:

1. Pemeliharaan dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY) masing-masing tikus sampai mencapai usia perlakuan 67 hari atau mencapai usia 74 hari dari kelahiran selama 8 bulan.
2. Pembuatan preparat histologi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada selama satu bulan.
3. Pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di laboratorium histologi FKIK UMY.

D. Variabel Penelitian

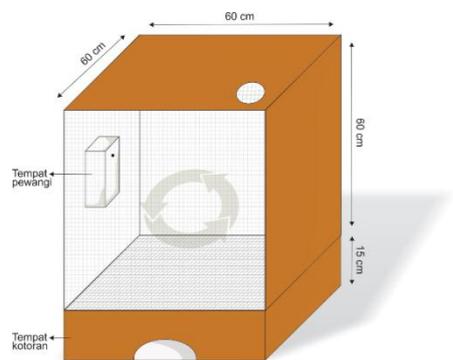
1. Variabel Bebas :Pendedahan pewangi ruangan jenis spray dan gel.
2. Variabel Tergantung :Gambaran histologi diameter tubulus semeniferus dan persentase spermatozoa motil Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*).
3. Variabel terkontrol, terdiri dari :
 - a. Subjek penelitian:
 - 1) Jenis kelamin semua sampel jantan.
 - 2) Umur tikus mulai pendedahan rata-rata sama, yaitu pada umur hari ke-8 hari(bayi)
 - 3) Jenis tikus sama, yaitu galur *Sprague Dawley*.
 - b. Subjek perawatan : Jenis dan kualitas makanan dan minuman setiap sampel diupayakan sama.

- c. Bahan coba : Penggunaan pewangi ruangan dengan merek yang sama serta aroma jeruk baik spray maupun gel.

E. Definisi Operasional

1. Diameter tubulus semeniferus adalah diameter penampang melintang tubulus semeniferus testis hewan uji yang diukur dengan satuan mikrometer. Pengukuran dengan alat bantu software “Optilab” dengan perbesaran 4x10, dihitung 5 tubulus semeniferus bulat dalam 5 lapang pandang dan kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan mikron. Pemilihan diameter tubulus seminiferus diambil pada sisi terpendek dari lingkaran tubulus seminiferus.
2. Spermatozoa motil dihitung dari menghitung jumlah total sperma dan menghitung jumlah sperma motil hewan uji di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x10. Cara pengenceran larutan sperma adalah memotong cauda epididimis yang kemudian dicacah lalu diencerkan dengan NaCl 0,9% sebanyak 800µl dalam juta/10µl. Persentase didapat dari membagi jumlah spermatozoa motil dengan total spermatozoa lalu dikalikan 100%.
3. Pewangi ruangan *spray* (cair) adalah produk beraroma jeruk yang digunakan untuk menghilangkan bau menyengat dalam suatu ruangan tertutup berbentuk cair.
4. Pewangi ruangan *gel* adalah produk beraroma jeruk yang digunakan untuk menghilangkan bau menyengat dalam suatu ruangan tertutup berbentuk gel padat berbahan dasar gelatin.

5. Bayi tikus adalah bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spraque Dawley jantan yang didedahkan pada usia 8 hari selama 67 hari.
6. Kandang perlakuan adalah kayu berukuran 60x60x60 cm yang ditambah kaki setinggi 15cm. Kandang bagian dalam tersusun atas 2 bahan. Bahan bagian dalam tersusun dari strimin sedangkan bagian luar dilapisi plastik tebal.



Gambar 3. Kotak Perlakuan

F. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat-alat yang terdiri atas : kandang perlakuan, perlengkapan bedah minor, timbangan badan merek Casbee (kapasitas 1000x0,1 g), timbangan organ merek ACIS (skala 0,01gr), tempat organ (pot air), mikroskop binokuler, software optilab, komputer/laptop, bilik hitung *improved neubar*, micropipet ukuran 400 μ l, dan bakerglass.

2. Bahan-Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan berpua: tiga puluh ekor bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spraque Dawley* berjenis kelamin jantan

yang didedahkan pada umur ke-8 hari, air mineral dan pakan tikus (AD), kloroform 35%, formalin 10%, alkohol 70%, NaCl 0,9%, pewangi ruangan jenis *gel* dan *spray* dari suatu merek beraroma jeruk.

G. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu bayi tikus putih yang dipilih yang dipilih sesuai galur, usia dan jenis kelamin yang telah ditentukan. Hewan uji dipelihara dalam kandang pemeliharaan dengan diberikan suplai pakan dan minum standard secara teratur.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Bayi tikus putih diambil sejumlah 30 ekor lalu dibagi menjadi 3 kelompok (kelompok *Gel*(P1), kelompok *Spray*(P2), kelompok kontrol(K). Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus. Setiap kelompok ditempatkan pada kotak/kandang masing-masing, sehingga pendedahan tidak mempengaruhi satu sama lain.

3. Pendedahan Pewangi Ruangan

Setiap kelompok tikus dimasukkan ke kotak paparan masing-masing kelompok. Paparan pewangi ruangan cair diberikan dengan disemprotkan 10 kali pertama, paparan pewangi ruangan *gel* diberikan dengan melatakan satu pewangi *gel* untuk satu kotak paparan dengan cara digantung pada tepi kotak agar tidak mudah dijangkau oleh tikus. Perlakuan dilakukan bertahap dari 15 menit pada pagi dan sore hari selama minggu pertama. Setiap seminggu pendedahan naik dosis 15 menit pada

pagi dan sore. Pendedahan dilakukan selama 67 hari atau tikus mencapai usia 74 hari, sehingga didapat hasil akhirnya paparan selama 4,5 jam di usia pendedahan 67 hari. Perlakuan dengan dosis bertahap diberikan atas dosis yang terlalu tinggi (dosis sehari = 8 jam) dapat membunuh tikus.

4. Pemeliharaan

Setiap harinya tikus diberi pakan standar tikus dengan porsi yang sama di awal dan meningkat seiring bertambahnya usia tikus, lalu diberi air minum berupa air mineral. Penggantian sekam dilakukan secara teratur satu minggu sekali.

5. Pembedahan dan Pengambilan organ

Pembedahan diawali dengan penimbangan berat badan hewan uji. Pembedahan dilakukan pada hari ke 68 pendedahan atau pada usia tikus mencapai 75 hari dengan menggunakan anastesi kloroform. Tikus dibedah dengan menggunakan alat-alat bedah minor dan dilakukan pengambilan organ yang akan diteliti, yaitu testis. Organ direndam dalam larutan formalin 10%.

6. Pembuatan Preparat

Organ testis difiksasi dengan formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan metode parafin menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE).

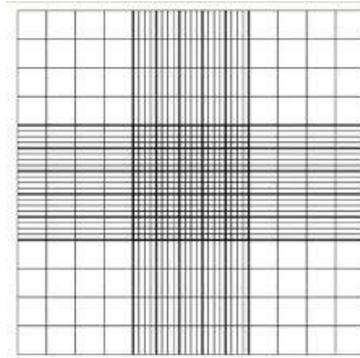
7. Uji Histopatologi

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop binokuler. Pengamatan diameter tubulus seminiferus pada preparat menggunakan

perbesaran 4x10 dan diukur menggunakan software optilab. Jumlah tubulus seminiferus yang diukur lebar diameternya dalam satu preparat sebanyak 5 buah. Masing-masing tubulus seminiferus diukur satu kali diameternya yang diambil dari jarak terpendeknya. Hasil pengukuran dicatat dan di rata-rata dalam satuan mikrometer.

8. Uji Persentase Spermatozoa Motil

Persentase spermatozoa motil diukur dengan cara memotong kecil-kecil dan mencacah *cauda* epididimis tikus dalam gelas beker. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan NaCl 0,9% sebanyak 800 μ l pada gelas beker yang berisi *cauda* epididimis yang telah dicacah, kemudian aduk-aduk campuran tersebut. Setelah diperoleh larutan campuran spermatozoa maka, masukkan larutan campuran spermatozoa ke dalam bilik hitung Improved Neubauer. Perhitungan dengan cara menghitung jumlah sperma yang motil di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10 pada lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan pada kotak kecil pada bilik hitung, Kotak kecil yang dipilih adalah satu kotak kecil yang di tengah dan empat di setiap sudut kotak besar. Catat jumlah, lalu diambil rerata pada lima lapang pandang lalu kalikan 100% untuk menentukan persentase motil dalam persen.



Gambar 4. Bilik Hitung

H. Analisis Data

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan terhadap pemeriksaan diameter tubulus seminiferus dan persentase spermatozoa motil menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk. Jika analisis distribusi data menunjukkan hasil normal maka data dilanjutkan menggunakan metode statistik One Way Anova dengan Post-Hoc Tuckey karena penelitian menggunakan lebih dari tiga variabel yang tidak saling berpasangan. Bila analisis distribusi menunjukkan distribusi abnormal maka analisis data dilanjutkan dengan menggunakan metode statistik Kruskal Wallis.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan uji bayi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* 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 pengambilan tubulus seminiferus dan sperma testis tikus jantan, maka tikus dibunuh dengan cara pemberian kloroform.

J. Jalannya Penelitian

