

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian Eksperimental Murni 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

Subyek pada penelitian ini adalah menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* Galur *Wistar* dengan usia dewasa 2 bulan sebanyak 30 ekor.

Subyek yang diambil dalam penelitian ini mempunyai kriteria yaitu :

1. Inklusi :
 - a. Usia 2 bulan
 - b. Sehat
 - c. Berat 100-150 gram
 - d. Tidak ada kelainan anatomi

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.
- b. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Center,

- 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 125 hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

- a. Paparan obat nyamuk *spray*
- b. Paparan obat nyamuk *one push*

2. Variabel Terikat

Ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sperma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

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 2 bulan.
- b. Perawatan : jenis dan kualitas pakan, minum, serta kandang setiap hewan uji sama.
- c. Bahan perlakuan : penggunaan obat nyamuk *spray* dan obat nyamuk *one push* dengan aroma jeruk.

E. Definisi Operasional

1. Obat Nyamuk *Spray* adalah obat nyamuk dalam bentuk cairan. Cara penggunaan dari obat nyamuk jenis ini adalah dengan cara disemprotkan pada ruangan. Obat nyamuk *spray* memiliki 3 bahan aktif yaitu *pralethrin* (0,1%), *siflutrin* (0,05%) dan *d-allethrin* (0,57%) (Fumakila, 2015).
2. Obat Nyamuk *One Push* adalah obat nyamuk dengan sediaan berupa botol kecil. Obat nyamuk ini cara penggunaannya dengan menyemprotkan satu kali saja pada ruangan. Obat nyamuk *one push* memiliki kandungan aktif *transflutrin* (21,3%) (Fumakila, 2015)
3. Diameter tubulus seminiferus adalah diameter tubulus seminiferus yang diamati pada potongan melintang tubulus seminiferus. Pengukuran dilakukan dengan alat bantu *software* “Optilab” dengan pembesaran 10x10 dan dihitung diameter tubulus seminiferus dalam lima lapang pandang per preparat.
4. Jumlah sperma adalah menghitung jumlah sperma yang dilakukan dengan memotong 1 cm epididimis bagian kauda, kemudian dicacah. Setelah itu diencerkan dengan NaCl Fisiologis 0,9% dan dihitung pada Bilik Hitung.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : Kandang pemeliharaan, kandang perlakuan, perlengkapan makan, perlengkapan bedah minor set, papan pembedahan, mikroskop, gelas benda, pot air,

software optilab, *hand scoon*, masker, *hand counter*, komputer dan *software* Miconos Sigma.

2. Bahan

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari: Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* berjenis kelamin jantan berumur dua bulan sebanyak 30 ekor, obat nyamuk spray, obat nyamuk onepush, pakan standar tikus, air mineral, formalin buffer, kloroform, dan NaCl fisiologis

G. Jalannya penelitian

1. Aklimasi atau adaptasi hewan coba selama satu minggu
2. Pengelompokan hewan coba ke dalam 5 kelompok, yang terdiri dari :
 - a. Kelompok kontrol (K)
 - b. Kelompok *one push* 5 menit (P1)
 - c. Kelompok *onpush* 10 menit (P2)
 - d. Kelompok *spray* 5 menit (P3)
 - e. Kelompok *spray* 10 menit (P4)Setiap kelompok terdiri dari 6 tikus
3. Pemberian tanda pada subyek penelitian dengan menggunakan pikrat
4. Pemberian perlakuan
 - a. Tikus dipindahkan ke kandang perlakuan
 - b. Tikus yang telah dipindahkan ke kandang perlakuan di dedahkan dengan obat nyamuk
 - c. Kandang kelompok perlakuan sebagai kontrol dimasukkan ke dalam kandang dan tetap dibiarkan tanpa perlakuan

- d. Kandang kelompok P1 menggunakan obat nyamuk *onpush* selama 5 menit, kandang kelompok P2 menggunakan obat nyamuk *onpush* selama 10 menit, kandang kelompok P3 menggunakan obat nyamuk *spray* selama 5 menit, kandang kelompok P4 menggunakan obat nyamuk *spray* selama 10 menit. Perlakuan dilakukan selama 60 hari.

5. Pembedahan tikus

- a. Tikus dikorbankan dengan cara kapas diberi dengan larutan kloroform. Kapas yang telah diberi larutan kloroform diletakkan pada kandang tikus. Tikus yang sudah tidak sadarkan diri segera dibedah.
- b. Tikus dibedah dengan menggunakan alat minor set
- c. Organ yang diambil adalah testis, dibersihkan dengan NaCl
- d. Organ yang telah diambil dimasukkan ke dalam pot air yang telah diisi dengan formalin, kemudian ditutup dengan rapat
- e. Pembuatan preparat dengan menggunakan metode blok paraffin dengan teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

6. Pengamatan preparat testis

H. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan Uji

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

2. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam perlakuan sejumlah 30 ekor tikus dan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), kelompok *one push* 5 menit (P1), kelompok *one push* 10 menit (P2), kelompok *spray* 5 menit (P3), dan kelompok *spray* 10 menit (P4).

3. Pendedahan obat nyamuk *spray* dan *one push*

Obat nyamuk *spray* disemprotkan 1 kali semprot dalam kandang perlakuan pada kelompok hewan uji *spray* 5 menit (P3) dan *spray* 10 menit (P4). Kemudian setelah disemprotkan pada kelompok *spray* 5 menit (P3) didiamkan selama 5 menit dan kelompok *spray* 10 menit (P4) didiamkan selama 10 menit. Sedangkan pada obat nyamuk *one push* disemprotkan 1 kali semprot dalam kandang perlakuan pada kelompok hewan uji *one push* 5 menit (P1) dan *one push* 10 menit (P2). Kemudian setelah disemprotkan pada kelompok *one push* 5 menit (P1) didiamkan selama 5 menit dan kelompok *spray* 10 menit (P4) didiamkan selama 10 menit. Pendedahan dilakukan setiap hari.

4. Perlakuan

- a. Kelompok 1 adalah kelompok hewan uji tanpa perlakuan. Pada kelompok ini hewan uji tidak didedahkan dengan obat nyamuk *spray* maupun obat nyamuk *one push*.
- b. Kelompok 2 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan obat nyamuk *one push* selama 5 menit/hari. Pendedahan dilakukan selama 60 hari

- c. Kelompok 3 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan obat nyamuk *one push* selama 10 menit/hari. Pendedahan dilakukan selama 60 hari.
- d. Kelompok 4 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan obat nyamuk *spray* selama 5 menit/hari. Pendedahan dilakukan selama 60 hari.
- e. Kelompok 5 adalah kelompok hewan uji yang didedahkan obat nyamuk *spray* selama 10 menit/hari. Pendedaha dilakukan selama 60 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 tiga hari sekali.

6. Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pembedahan dilakukan dengan menganastesi tikus terlebih dahulu dengan kloroform. Tikus kemudian dibedah dengan menggunakan alat-alat bedah minor untuk mengambil organ yang akan diteliti yaitu testis dan kauda epididimis. Testis difiksasi di dalam larutan formalin buffer 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi, sementara kauda epididymis diambil dan dicacah untuk mengamati dan menghitung jumlah sperma.

7. Pembuatan Preparat

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

Proses pembuatan meliputi:

a. Dehidrasi

Langkah ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan paraffin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan paraffin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat.

b. Pembeningan (*Clearing*)

Pembeningan adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan paraffin.

c. Pembenaman (*Embedding/Impregnasi*)

Pembenaman adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan paraffin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek

d. Pengecoran (*Blocking*)

Pengecoran adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Cairan paraffin lalu dituangkan sedikit ke dalam cetakan blok. Masukkan potongan organ secara perlahan dan kemudian tuangkan kembali paraffin hingga merendam organ

e. Pemotongan (*Mounting*)

Pemotongan adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom (Jusuf, 2009).

8. Pewarnaan Preparat

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali/diamati dengan mikroskop. Pulasan (pewarna) yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu pulasan *Hematoxylin Eosin* (HE). Pada pulasan HE digunakan 2 macam zat warna yaitu hematoxylin yang berfungsi untuk memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan counterstaining hematoxylin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda dengan nuansa yang berbeda (Jusuf, 2009).

9. Uji Histologi Ukuran Diameter Tubulus Seminiferus

Preparat diamati secara histologi di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10 dan ukuran diameter tubulus seminiferus dihitung menggunakan mikroskop dengan bantuan *Software* Optilab. Diukur diameter tubulus seminiferus dalam 5 lapang pandang per preparat dan kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan mikron.

10. Uji perhitungan Jumlah Sperma

Perhitungan sperma diawali dengan pemotongan saluran sperma yaitu di kauda epididymis, kemudian dicacah kecil-kecil. Setelah itu diencerkan 50 kali NaCl 0,9% pada cawan petri yang berisi cacahan kauda epididymis, kemudian diaduk rata. Setelah itu dimasukkan ke dalam bilik hitung *Improved Neubauer*. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sperma di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x40 pada 5 lapang pandang. Kemudian dilakukan pencatatan hasil perhitungan sperma.

I. Analisis Data

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan terhadap pemeriksaan ukuran diameter tubulus seminiferus dan jumlah sperma menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk*. Didapatkan sebaran data yang normal pada diameter tubulus seminiferus, maka dilanjutkan dengan analisis statistik uji parametrik perbandingan yaitu *One Way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan bermakna dari setiap kelompok. Dan didapatkan sebaran data yang tidak normal pada jumlah sperma, maka

dilanjutkan dengan analisis statistik uji non parametric perbandingan yaitu *Kruskal-Wallis*.

J. Kesulitan Penelitian

Kesulitan yang dialami dalam penelitian ini adalah pada proses penghitungan jumlah sperma, di mana sperma yang dihitung sangat banyak.