

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Bidang ilmu yang tercakup dalam penelitian ini adalah Biologi, Farmakologi, dan Kimia.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.

3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini berlangsung pada bulan Maret hingga Juni 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai, jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental, dengan jenis desain penelitian “*post test only control group design*”.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan mencit *strain Balb/c* jantan yang berusia 6-8 minggu dari Universitas Negeri Semarang.

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria inklusi

- 1) Mencit *strain Balb/c* jantan

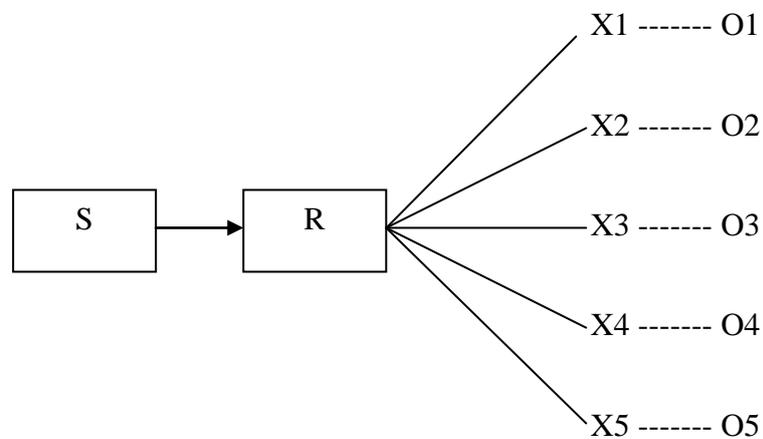
- 2) Mencit aktif
- 3) Tidak ada kelainan anatomi
- 4) Berat badan 25-30 gram
- 5) Umur 6-8 minggu

b. Kriteria eksklusi

- 1) Mencit tidak aktif
- 2) Terdapat abnormalitas anatomi yang tampak

3.4.3 Cara Sampling

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak atau randomisasi dengan perlakuan sebagai berikut :



Gambar 5. Cara Sampling

Keterangan :

S = Sampel

R = Randomisasi

X = *Treatment*

- O = *Observation*
- X1 = Kontrol negatif, sebagai pembanding, mencit yang mendapat diet standar, tanpa pemberian *dark chocolate* dan paparan asap rokok
- X2 = Kontrol positif, mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, tanpa pemberian *dark chocolate*
- X3 = Mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,05 gram
- X4 = Mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,1 gram
- X5 = Mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,2 gram
- O1 = Jumlah spermatozoa dari kelompok kontrol negatif
- O2 = Jumlah spermatozoa dari kelompok kontrol positif, mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, tanpa pemberian *dark chocolate*
- O3 = Jumlah spermatozoa kelompok mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,05 gram
- O4 = Jumlah spermatozoa kelompok mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,1 gram
- O5 = Jumlah spermatozoa kelompok mencit dengan diet standar diberi paparan asap rokok, dengan pemberian *dark chocolate* 0,2 gram

3.4.4 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan sesuai dengan *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines* dari WHO yaitu minimal lima ekor tiap satu kelompok. Dalam penelitian ini digunakan empat puluh ekor mencit *Balb/c* jantan yang dibagi dalam lima kelompok.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- a. *Dark chocolate* dosis bertingkat
- b. Paparan Asap Rokok

3.5.2 Variabel Terikat

Jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* jantan

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1	<i>Dark chocolate</i> Sediaan <i>dark chocolate</i> dengan kadar 100% yang dilelehkan kemudian diencerkan dan diberikan melalui sonde lambung dengan dosis bertingkat setiap hari selama 4 minggu	Gram	Rasio
2	Asap Rokok Pemaparan asap rokok dengan 1 batang rokok perhari pada mencit dengan menggunakan rokok kretek filter setiap hari selama 4 minggu	Batang rokok	Nominal
3	Jumlah Spermatozoa Jumlah spermatozoa diperoleh dengan menghitung secara sistematis rerata jumlah spermatozoa mencit <i>Balb/c</i> dalam lapangan pandang mikroskopis, dengan perbesaran 100x.	Sel	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- a. *Dark chocolate* 100%
- b. Makanan mencit
- c. Rokok kretek filter
- d. NaHCO_3
- e. Larutan 30% formalin
- f. Larutan akuades
- g. Larutan gentian violet

3.7.2 Alat

- a. Kandang mencit
- b. Sonde lambung
- c. Mikroskop cahaya
- d. Seperangkat alat bedah
- e. *Object glass*
- f. *Deck glass*
- g. Hemositometer *Neubauer Improved*

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer hasil penelitian eksperimental laboratorik yaitu berupa jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* jantan.

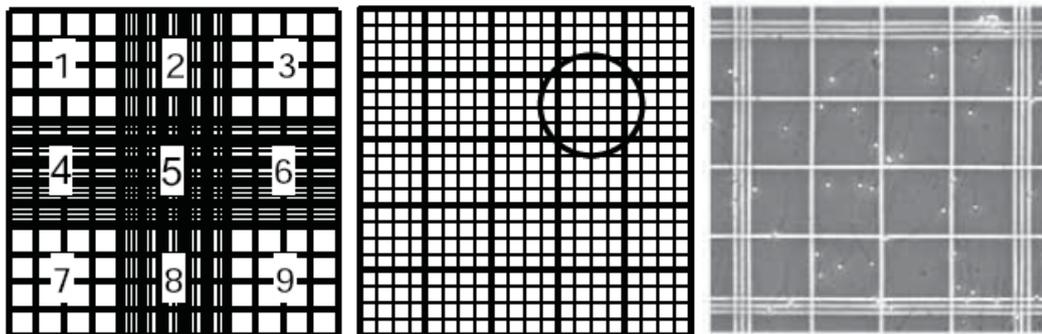
3.7.4 Cara Kerja

Sebelum diberi perlakuan, 40 ekor mencit *Balb/c* diadaptasi dengan dikandangkan dan diberi ransum pakan dan minuman standar secara *ad libitum* selama satu minggu. 40 ekor mencit dibagi lima kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari delapan ekor mencit yang dipilih secara acak atau randomisasi.

Kemudian mencit diberi perlakuan berupa pemaparan asap rokok dengan menggunakan spuit tanpa jarum dan pemberian *dark chocolate* dengan menggunakan sonde lambung selama empat minggu sesuai dengan pembagian kelompok di atas.

Setelah empat minggu perlakuan, kemudian dilakukan pengambilan sperma mencit dengan metode terminasi epididimis mencit. Penentuan jumlah spermatozoa meliputi tahap-tahap berikut ini

- 1) Cairan semen homogen yang telah disiapkan diamati pada objek glass dibawah deck glass untuk menentukan metode pengenceran dan lokasi yang tepat yang akan dinilai pada bilik hitung *Neubauer Improved*. Hemositometer *Neubauer Improved* memiliki dua bilik hitung yang masing-masing secara mikroskopis tergores pola dengan garis 3mm x 3mm pada permukaan kacanya yang membaginya menjadi sembilan area yang lalu dapat terbagi lagi menjadi 16 kotak sedang dan 25 kotak kecil.



Gambar 6. Hemositometer *Neubauer Improved*¹⁴ (WHO, 2010)

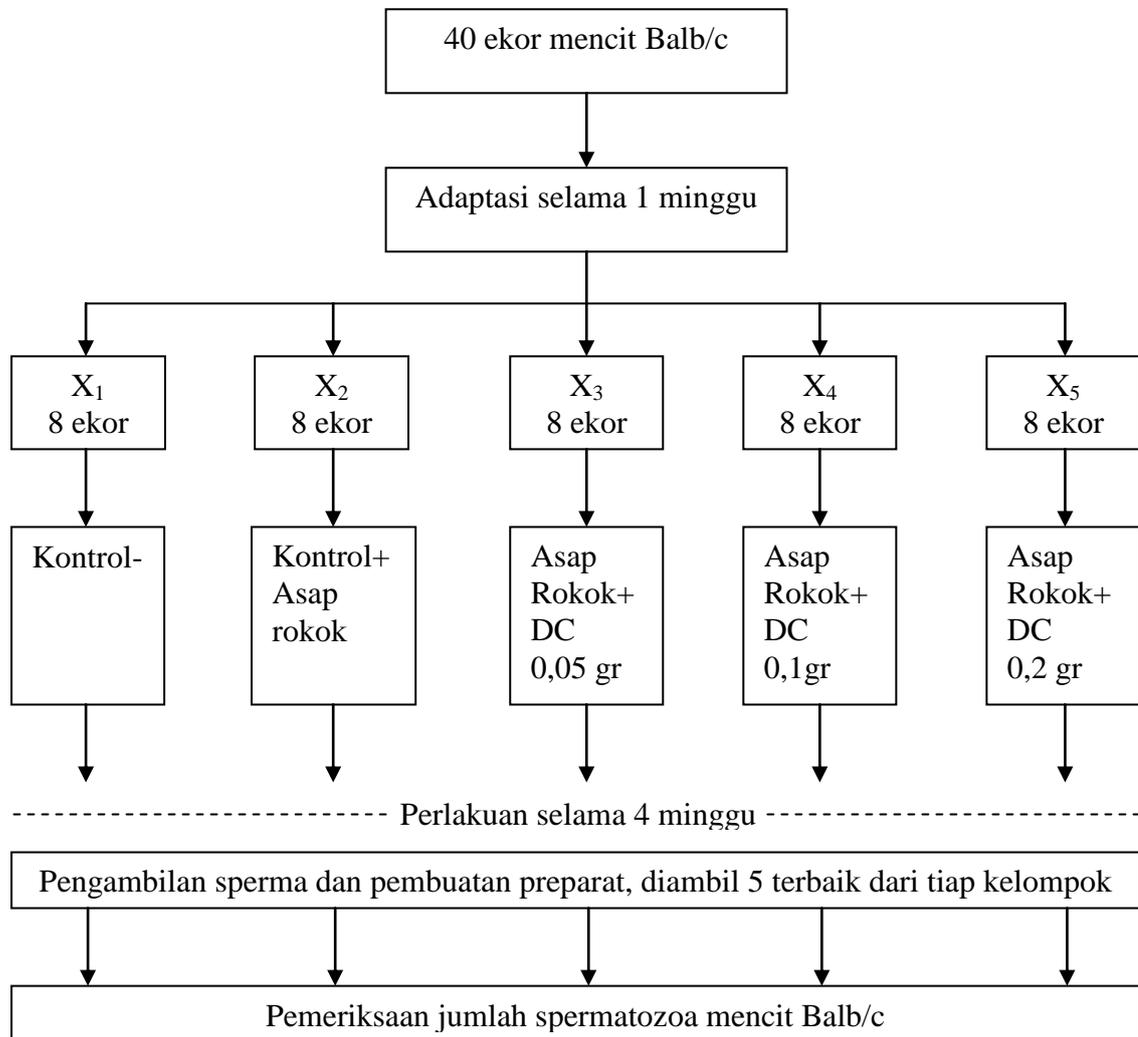
Tabel 3. Pengenceran semen yang diperlukan dan area bilik yang akan dinilai

Jumlah spermatozoa per lapangan pandang perbesaran 400x	Pengenceran	Lokasi kotak yang dinilai
>101	1:20 (1+19)	Kotak 5,4,6
16-100	1:5 (1+4)	Kotak 5,4,6
2-15	1:2 (1+1)	Kotak 5,4,6
<2	1:2 (1+1)	Seluruh 9 kotak

- 2) Semen dicampurkan dengan cairan fiksatif dan disiapkan untuk diencerkan. Cairan fiksatif yang digunakan sebagai pengencer adalah 50 gram NaHCO₃ dan 10 ml 35% formalin yang dilarutkan dengan 1000 ml akuades. Dapat ditambahkan 5 ml gentian violet untuk memperjelas kepala spermatozoa.
- 3) Bilik hitung dihitung dan sperma dibiarkan mengendap pada bilik. Sampel dinilai selama 10-15 menit, setelah evaporasi memberikan efek yang dapat diamati pada posisi spermatozoa dalam bilik.

- 4) Pada setiap kali hitungan, setidaknya dihitung 200 spermatozoa untuk meminimalisir *sampling error*. Hitungan dimulai dari bilik kelima (Gambar 6) dari baris ke baris, mencakup keseluruhan baris. Perhitungan pada bilik selanjutnya mencakup jumlah baris yang sama (volume yang sama) dengan bilik sebelumnya yang dinilai untuk mendapatkan 200 spermatozoa, meskipun kali ini didapatkan hasil yang berbeda. Jumlah dan selisih dari kedua angka tersebut dihitung dan disesuaikan dengan angka perbedaan yang dapat diterima sesuai tabel ketentuan. Bila sesuai, hitung konsentrasi dan bila tidak, persiapkan dua dilusi baru.
- 5) Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan nilai jumlah spermatozoa yang telah didapatkan pada tahapan sebelumnya dibagi dengan total volume yang disesuaikan dengan jumlah baris yang telah diperiksa dikalikan dengan faktor dilusi. Nilai rujukan untuk konsentrasi spermatozoa adalah 15×10^6 spermatozoa per ml.
- 6) Jumlah spermatozoa dihitung dengan mengalikan konsentrasi spermatozoa terhadap volume ejakulat total. Batas nilai rujukan terendah untuk total jumlah spermatozoa adalah 39×10^6 spermatozoa per ejakulat.¹⁴

3.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari lima kelompok sampel diolah dan dianalisa oleh komputer. Kemudian dilakukan analisa statistik dengan urutan sebagai berikut.

a. Analisa deskriptif

1. Dilakukan analisa univarian dan disajikan dalam bentuk tabel.
2. Dibuat grafik menurut kelompok perlakuan dan ulangnya.

b. Analisa analitik

1. Dilakukan uji beda perlakuan dan kelompok control dengan analisa data non parametik yang akan menyesuaikan dengan data yang didapat dan dilakukan uji beda antar variable pengukuran.
2. Dilakukan uji korelasi untuk melihat hubungan antar variabel, arah hubungan dan seberapa besar hubungan tersebut.

Variabel dependen diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Jika distribusi data normal, uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan statistic parametik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan *Uji Post Hoc*. Jika distribusi data tidak nomal, uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan statistik non parametrik, yaitu uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Man Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok.

Ketentuan yang digunakan adalah :

- a. Jika $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna.
- b. Jika $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna.

3.10 Etika Penelitian

Protokol penelitian akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Kariadi Semarang.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan (tahun 2015-2016)						
	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun
Studi literature							
Penyusunan proposal							
Seminar proposal							
Persiapan Alat Bahan							
Ethical clearance							
Pelaksanaan penelitian							
Analisis data dan penyusunan hasil							
Seminar hasil							