

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini meliputi bidang Farmakologi, Histologi, dan Patologi Anatomi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba akan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembuatan preparat, pemeriksaan mikroskopis, dan analisa data dilaksanakan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design*. Perlakuan pada penelitian ini adalah dengan memberikan ekstrak kulit buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dengan dosis bertingkat yaitu 7,5 mg/ml; 15 mg/ml; dan 30 mg/ml per hari pada mencit galur Balb/C jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar selama 8 jam per hari selama 21 hari. *Output* yang dinilai adalah gambaran mikroskopis testis mencit tersebut.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Polulasi target

Populasi target penelitian ini adalah mencit Balb/C.

3.4.2 Populasi terjangkau

Populasi penelitian adalah mencit galur Balb/C yang diperoleh dari peternakan hewan coba *Rattus Breeding Center (RBC)* Malang.

3.4.3 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah mencit galur Balb/C yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut:

3.4.3.1 Kriteria inklusi

Kriteria inklusi:

- 1) Mencit galur Balb/C
- 2) Jantan
- 3) Umur 2-3 bulan dengan berat
- 4) Badan 20-30 gr
- 5) Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

3.4.3.2 Kriteria drop out

Kriteria drop out: mati selama proses aklimatisasi

3.4.4 Cara sampling

Sampel penelitian diambil dengan cara acak dengan metode randomisasi sederhana (*simple random sampling*) dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4.5 Besar sampel

Penentuan besar sampel penelitian menggunakan ketentuan WHO dengan jumlah minimal sampel 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol dengan jumlah sampel 5 tiap kelompok.⁴¹

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga putih.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah gambaran mikroskopis testis mencit yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar.

3.6 Definisi operasional

Tabel 1. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Skala
1	Variabel Bebas Ekstrak kulit buah naga putih	Ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok mencit perlakuan 1 (P1) dosis 7,5 mg/mL, perlakuan 2 (P2) dosis 15 mg/mL, dan perlakuan 3 (P3) dosis 30 mg/mL dengan sonde sebanyak satu kali sehari selama 21 hari.	Rasio
2	Variabel Terikat Gambaran mikroskopis testis mencit yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar	Gambaran mikroskopis testis mencit di bawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan dengan <i>Hematoxyllin</i> dan <i>Eosin</i> dan dilihat kelainan yang terjadi pada tubulus seminiferus dengan menghitung jumlah sel spermatogenik (spermatogonia, spermatosit primer, spermatid) pada tubulus seminiferus di tiga lapangan pandang yang berbeda, kemudian diambil rata-rata jumlah sel spermatogenik (spermatogonia, spermatosit primer, spermatid) tiap kelompok perlakuan.	Numerik

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

- 1) Mencit galur Balb/C jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gr
- 2) Obat nyamuk bakar
- 3) Ekstrak kulit buah naga putih
- 4) Pakan dan minuman mencit
- 5) Bahan-bahan untuk membuat ekstrak kulit buah naga putih yaitu: Alkohol 70%
- 6) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan yaitu:
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Parafin
 - c. Albumin
 - d. *Hematoxyllin Eosin*
 - e. Larutan xylol
 - f. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96%
 - g. Aquadest

3.7.2 Alat

- 1) Kandang mencit beserta alat minum dan tempat makan
- 2) Sonde lambung
- 3) Alat untuk membuat ekstrak kulit buah naga putih:
 - a. Neraca digital
 - b. *Water bath*
 - c. *Rotary evaporator*
 - d. Penyangga

- e. Tabung erlemeyer
 - f. Baker glass
 - g. Kain flanel
 - h. Etanol
- 4) Alat untuk mengambil organ: minor set
 - 5) Alat untuk membuat preparat histologi: mikrotom, oven, cetakan paraffin, *deck glass, object glass*
 - 6) Botol-botol

3.7.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan berupa data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis testis mencit yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar dari kelompok perlakuan (P1), (P2), (P3) dan dibandingkan dengan kelompok kontrol (K1), (K2).

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Ekstraksi kulit buah naga putih

Kulit buah naga putih segar diekstraksi dengan alkohol 70% dengan cara maserasi.

3.7.4.2 Cara pemaparan obat nyamuk bakar

- 1) Hewan coba ditempatkan pada kandang hewan sesuai dengan kelompoknya.
- 2) Asap berasal dari pembakaran obat nyamuk bakar dengan bahan aktif *d-allethrin* 0,3%.
- 3) Saat akan diberi paparan asap obat nyamuk bakar, hewan coba dipindahkan dalam kandang khusus berupa kotak yang didalamnya

terdapat jeruji pembatas untuk memisahkan hewan coba dengan obat nyamuk bakar.

- 4) Hewan coba dapat secara langsung terkena paparan asap obat nyamuk bakar.
- 5) Kandang pada hewan coba perlakuan memiliki jalur ventilasi udara yang berfungsi menjaga aliran udara keluar masuk kandang hewan coba perlakuan.
- 6) Pemberian paparan asap obat nyamuk bakar dilakukan selama 8 jam dalam sehari dengan pemberian paparan mulai pukul 9.00 dan berakhir pada pukul 17.00. Pemaparan dilakukan selama 21 hari.

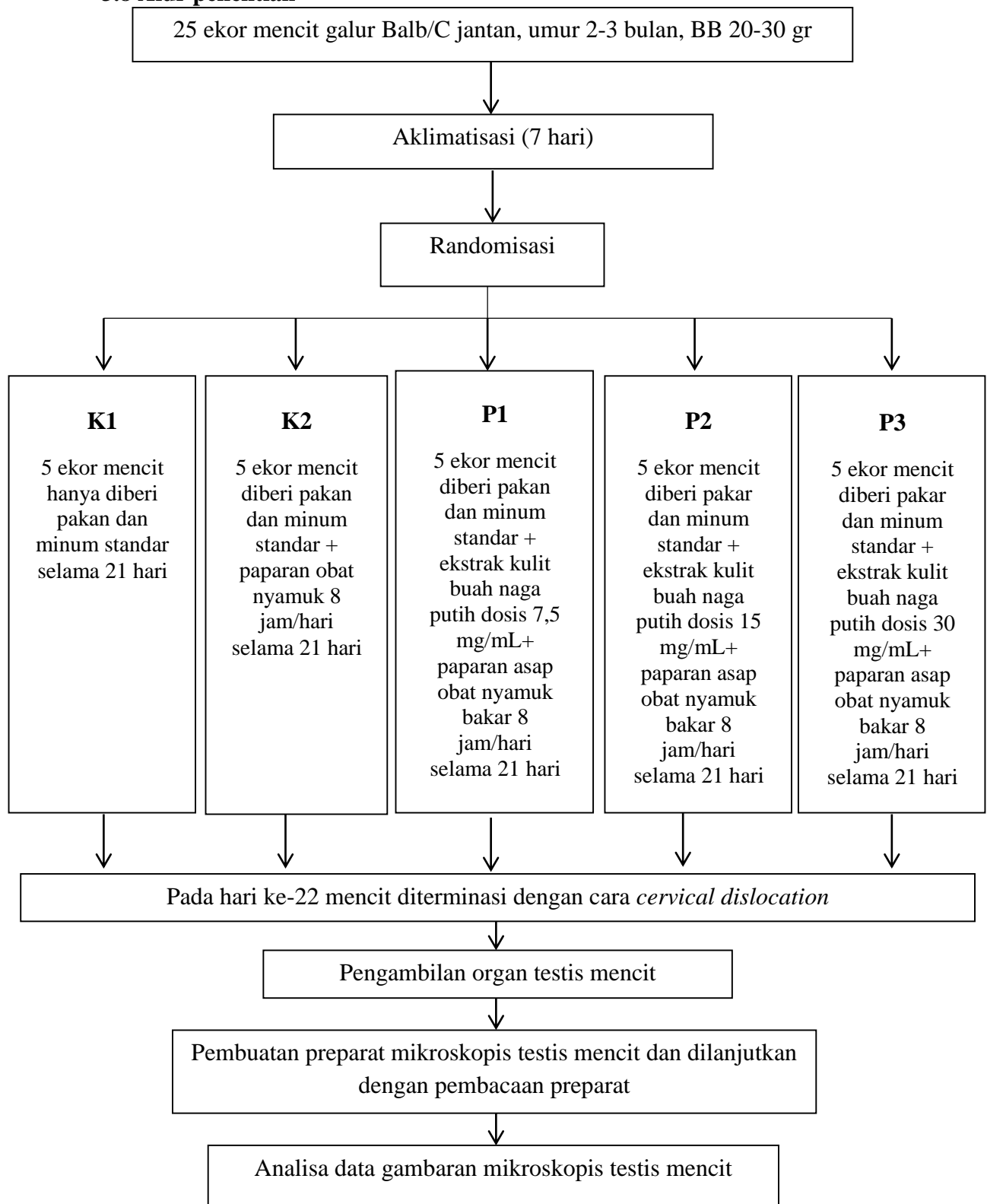
3.7.4.3 Prosedur pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang telah diaklimatisasi dan diberi makan dan minum standar yang sama selama tujuh hari kemudian dikandangkan per kelompok tiap kelompoknya terdiri dari lima ekor mencit. Kelompok kontrol satu (K1) adalah kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan apapun hanya pakan standar selama 21 hari dan diletakkan di kandang yang berbeda dengan kelompok lainnya. Kelompok kontrol dua (K2) adalah kelompok mencit yang diberi paparan asap obat nyamuk bakar 8 jam/hari dan pakan standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan satu (P1) adalah kelompok mencit yang diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 7,5 mg/mL diberikan 1x/hari dan diberi paparan asap obat nyamuk bakar 8 jam/hari serta pakan standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan dua (P2) adalah kelompok mencit yang diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 15 mg/mL diberikan 1x/hari dan diberi paparan asap obat nyamuk bakar 8 jam/hari serta pakan

standar selama 21 hari. Kelompok perlakuan tiga (P3) adalah kelompok mencit yang diberi ekstrak kulit buah naga putih dengan dosis 30 mg/mL diberikan 1x/hari dan diberi paparan asap obat nyamuk bakar 8 jam/hari serta pakan standar selama 21 hari. Pemberian ekstrak kulit buah naga putih dilakukan pada pukul 8.00, sedangkan pemberian paparan asap obat nyamuk bakar dilakukan pada pukul 9.00 hingga 17.00.

Hari ke-22 mencit dianastesi dengan *ether* kemudian diterminasi dengan cara *cervical dislocation* dan dilakukan bedah minor untuk mengambil organ testis mencit. Testis mencit yang telah diambil diproses secara mikroteknik kemudian dicat menggunakan *Hematoxyllin Eosin*. Testis kanan dan kiri dibuat preparat, kemudian masing-masing preparat diamati dan dibaca pada tiga lapangan pandang secara acak dari kiri ke kanan dan tengah. Pengamatan dan pembacaan preparat dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Pengamatan pada tubulus seminiferus dengan menghitung jumlah sel spermatogenik (sel spermatogonia, spermatosit primer, dan spermatid). Kemudian dihitung rerata jumlah sel spermatogonia, rerata jumlah sel spermatosit primer, dan rerata jumlah sel spermatid dalam satu tubulus seminiferus untuk setiap kelompok perlakuan.

3.8 Alur penelitian



Gambar 1. Alur penelitian

3.9 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program pengolah data SPSS *for Windows*. Data gambaran mikroskopis testis yang memiliki skala ordinal diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Jika data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* apabila didapatkan data yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Jika data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*, apabila didapatkan data yang signifikan kemudian dilakukan uji *Mann Whitney*.

3.10 Etika penelitian

Ethical clearance didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.11 Jadwal penelitian

Tabel 2. Jadwal penelitian

No	Kegiatan	Bulan ke-						
		12	1	2	3	4	5	6
1	Penyusunan proposal							
2	Seminar proposal							
3	Pelaksanaan penelitian							
4	Pengolahan data & penyusunan laporan							
5	Seminar hasil							