

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Ruang lingkup penelitian**

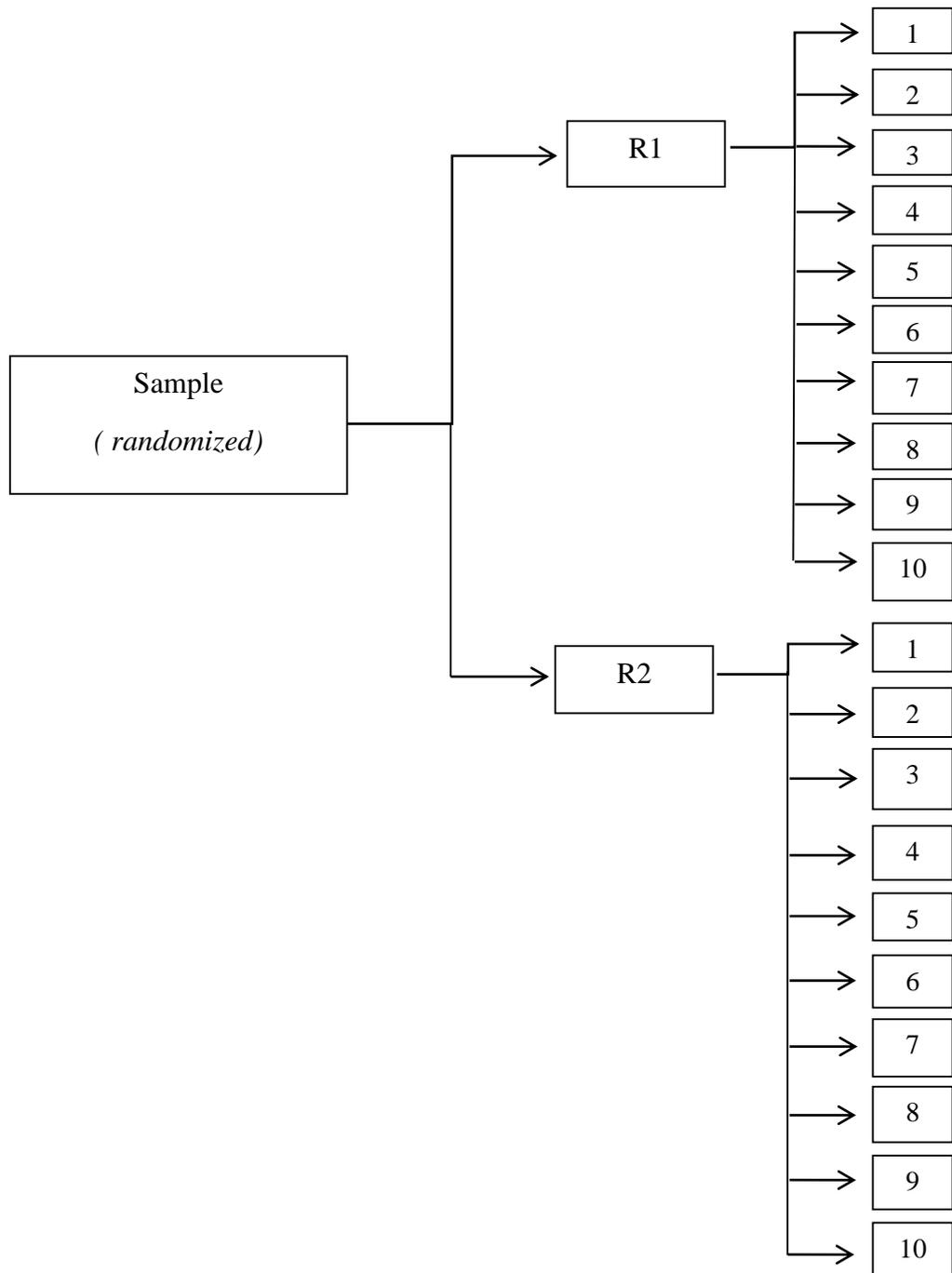
Ruang lingkup keilmuan penelitian ini meliputi bidang biologi, andrologi dan patologi anatomi.

#### **3.2. Tempat dan waktu penelitian**

1. Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap terhadap hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
2. Pemeriksaan histopatologi testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang.
3. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – April 2016.

#### **3.3. Jenis Penelitian dan rancangan penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Terdapat 2 kelompok, kelompok pertama adalah kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diberi perlakuan dan kelompok kedua adalah kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diinduksi aloksan secara intraperitoneal untuk mencapai kondisi diabetes melitus, dengan parameter pengukuran variabel terikat yaitu gambaran mikroskopis spermatogenesis pada testis dengan dinilai menggunakan kriteria *Johnsen score*.



**Gambar 11.** Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

R1 : Kelompok 1 / Kelompok Kontrol (Kelompok tikus yang telah dipilih secara random dari sampel berjumlah 16 ekor tikus, yang hanya diberikan pakan standar selama penelitian )

R2 : Kelompok 2 / Kelompok Perlakuan (Kelompok tikus yang telah dipilih secara random dari sampel berjumlah 16 ekor tikus, kemudian dibuat kondisi diabetes melitus ( kadar gula darah > 200mg/dl ) dengan diinduksi aloksan.

1. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu tidak terdapat germ cell dan sel sertoli.
2. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu tidak terdapat germ cell.
3. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu hanya terdapat spermatogonia.
4. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu hanya terdapat beberapa spermatosit.
5. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu tidak terdapat spermatozoa dan spermatid tetapi banyak terdapat spermatosit.
6. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu hanya terdapat beberapa spermatid.

7. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu tidak terdapat spermatozoa tetapi terdapat banyak spermatid.
8. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu hanya terdapat beberapa spermatozoa.
9. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu terdapat banyak terdapat spermatozoa tetapi tidak terdapat spermatogenesis yang lengkap.
10. Penilaian tahapan spermatogenesis dengan kriteria *Johnsen score* yaitu terdapat spermatogenesis yang lengkap serta tubulus seminiferus yang sempurna.

### **3.4. Populasi dan sampel**

#### **3.4.1. Populasi**

Populasi penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan yang diperoleh dari Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

#### **3.4.2. Sampel**

Sampel penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan yang memenuhi kriteria penelitian sebagai berikut ini:

#### 3.4.2.1. Kriteria inklusi

1. Tikus *Wistar* jantan
2. Umur sekitar 8 – 10 minggu
3. Berat badan 150 – 200 gram

#### 3.4.2.2. Kriteria eksklusi

1. Tikus tampak sakit, tidak bergerak secara aktif
2. Tikus mati dalam penelitian

#### 3.4.2.3. Besar sampel

Besar sampel yang akan digunakan ditentukan dengan rumus eksperimental<sup>39</sup> :

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

Keterangan :

t: jumlah kelompok

n: jumlah ulangan/ jumlah subjek yang dicari

Dalam penelitian ini tikus *Wistar* jantan dibagi menjadi 2 kelompok sehingga didapatkan besar sampel tiap kelompok sebanyak 16 ekor.

#### 3.4.2.4. Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias penelitian karena faktor variasi umur dan berat badan, maka dilakukan

pengelompokan sample secara acak sederhana *Simple Random Sampling*.

### **3.5. Variabel penelitian**

#### **3.5.1. Variabel bebas**

Sebagai variabel bebas adalah induksi aloksan.

#### **3.5.2. Variabel tergantung**

Sebagai variabel tergantung adalah gambaran histopatologi spermatogenesis pada testis tikus *Wistar* jantan dengan kriteria *Johnsen score*.

### **3.6. Bahan dan alat**

#### **3.6.1. Bahan**

1. Tikus *Wistar* jantan
2. Aloksan
3. Larutan Na fisiologis
4. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi testis
5. Bahan makanan dan minuman tikus

#### **3.6.2. Alat**

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan
3. Mikroskop cahaya dengan sumber arus listrik

4. Alat untuk pemeriksaan histopatologi testis
5. Tempat pakan
6. Glukometer
7. Spuit

### **3.7. Data yang dikumpulkan**

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer, yaitu berupa gambaran histopatologi spermatogenesis pada testis tikus *Wistar* jantan yang dinilai menggunakan kriteria *Johnsen score*.

### **3.8. Cara pengumpulan data**

1. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 38 ekor tikus *Wistar* jantan untuk menghindari kriteria eksklusi. Tikus diadaptasi dengan pakan standart ad libitum selama 7 hari.
2. Pada hari ke 8 sebelum tikus dikelompokkan di ukur terlebih dahulu kadar gula darah pertama dengan menggunakan glukometer dengan didapatkan hasil kadar gula darah normal yaitu  $< 200\text{mg/dl}$ . Darah diambil dengan cara memotong sedikit ekor tikus.
3. Setelah dilakukan pemeriksaan darah, tikus dikelompokkan menjadi 2 kelompok dengan jumlah 19 ekor tikus sebagai pengulangan.
4. Sejumlah 19 ekor tikus pertama dikelompokkan sebagai kontrol dengan hanya diberi pakan standar secara ad libitum selama 21 hari dari hari ke 8 sampai hari ke 28.

5. Lalu 19 ekor lainnya sebagai kelompok perlakuan diberi injeksi aloksan 150 mg/kgBB yang dilarutkan dalam larutan Na fisiologis 0,5ml sebanyak 1 kali pada hari ke 8 dan selama 21 hari dari hari ke 8 sampai hari ke 28 diberikan pakan standar secara ad libitum.
6. Dilakukan pengukuran kembali kadar gula darah kedua pada hari ke 14 untuk mengetahui kondisi diabetes melitus yaitu kadar gula darah mencapai  $>200\text{mg/dl}$ . Darah diambil dengan cara melukai ekor bekas luka potongan saat pengambilan darah pertama.
7. Setelah mencapai kondisi diabetes melitus pada hari ke 14 agar nampak kelainan proses spermatogenesis pada testis ditunggu selama 14 hari berikutnya sampai hari ke 28.
8. Pada hari ke 28 dilakukan pemeriksaan kadar gula darah terakhir untuk memastikan bahwa tikus masih dalam kondisi diabetes melitus. Pengambilan darah sama dengan cara pengambilan darah kedua.
9. Setelah didapatkan kondisi diabetes melitus tikus *Wistar* jantan kemudian diterminasi pada hari ke 29 dengan menggunakan ether, tikus dimasukkan dalam wadah tertutup lalu dimasukkan beberapa kapas yang telah dibasahi ether lalu tunggu beberapa menit sampai tikus benar-benar sudah mati.
10. Setelah itu dilakukan pengambilan testis dengan cara pembedahan kemudian testis direndam dalam buffer formalin 10%.

11. Testis dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan proses pembuatan blok paraffin. Blok paraffin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan Haematoxylin Eosin (HE).  
( Cara pembuatan preparat terlampir ).
12. Pemeriksaan dan penilaian dilakukan dengan cara preparat testis diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x untuk diperiksa dan dinilai skor spermatogenesisnya menggunakan kriteria *Johnsen score*. Pengamatan preparat menggunakan teknik *double blinding* yaitu pengamat tidak mengetahui objek yang diamati termasuk dalam kelompok mana. Sehingga didapatkan pengamatan yang akurat tanpa adanya subjektifitas dari pengamat. Setiap preparat pengamatan dan pemberian skor dilakukan pada lima lapangan pandang, tiap lapang pandang terdapat 1 tubulus seminiferus.
13. Skor dari masing masing lapangan pandang dijumlah, sehingga didapatkan skor untuk masing-masing tikus. Skor masing masing tikus kemudian diurutkan dari skor terkecil hingga terbesar untuk mencari nilai median sebagai skor kelompok. Nilai median yang didapatkan dari masing masing kelompok kemudian dibandingkan.

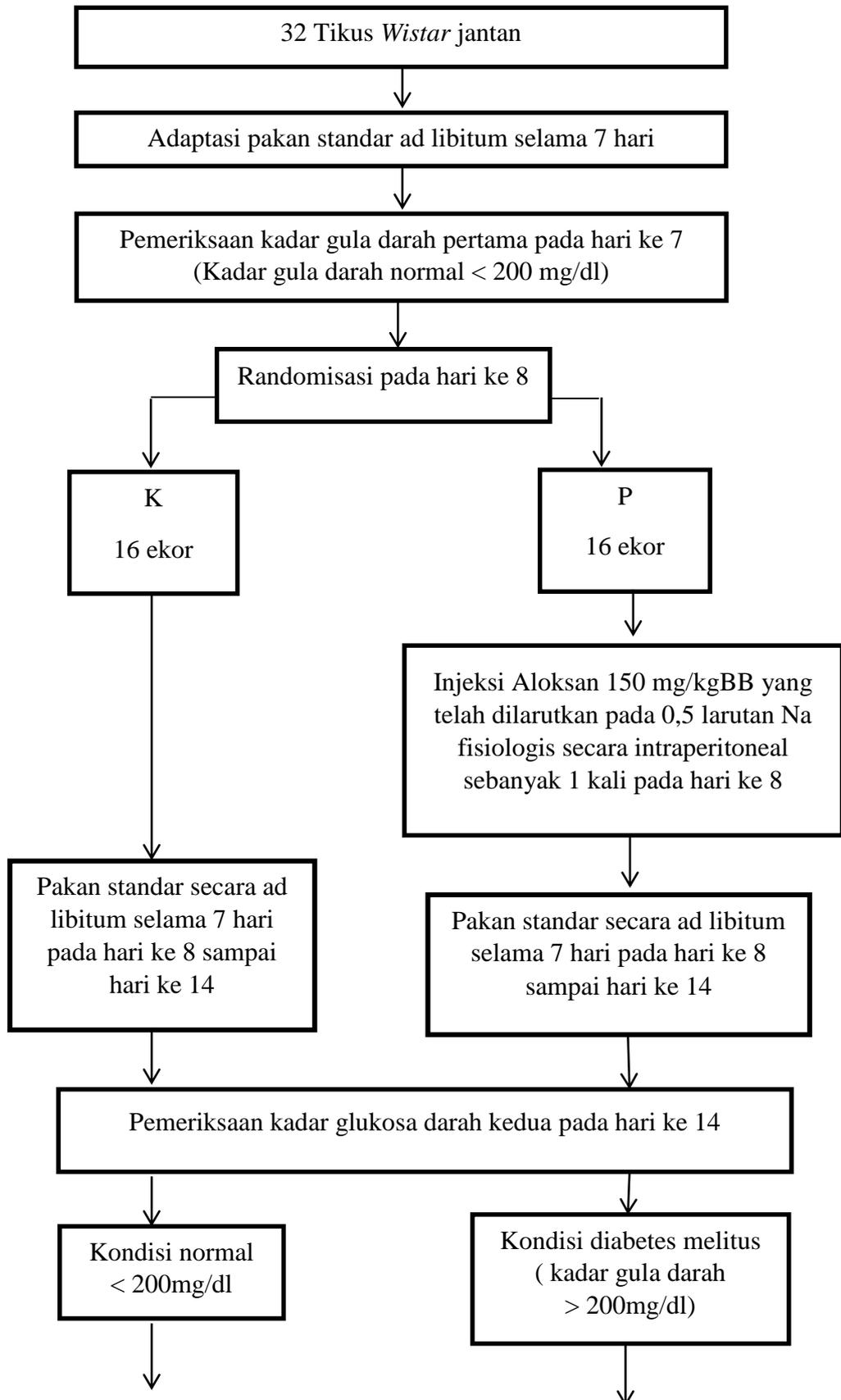
Sebelum penelitian ini dilakukan penulis telah mendapat training dan selama penelitian berlangsung berada di bawah pengawasan staf ahli Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

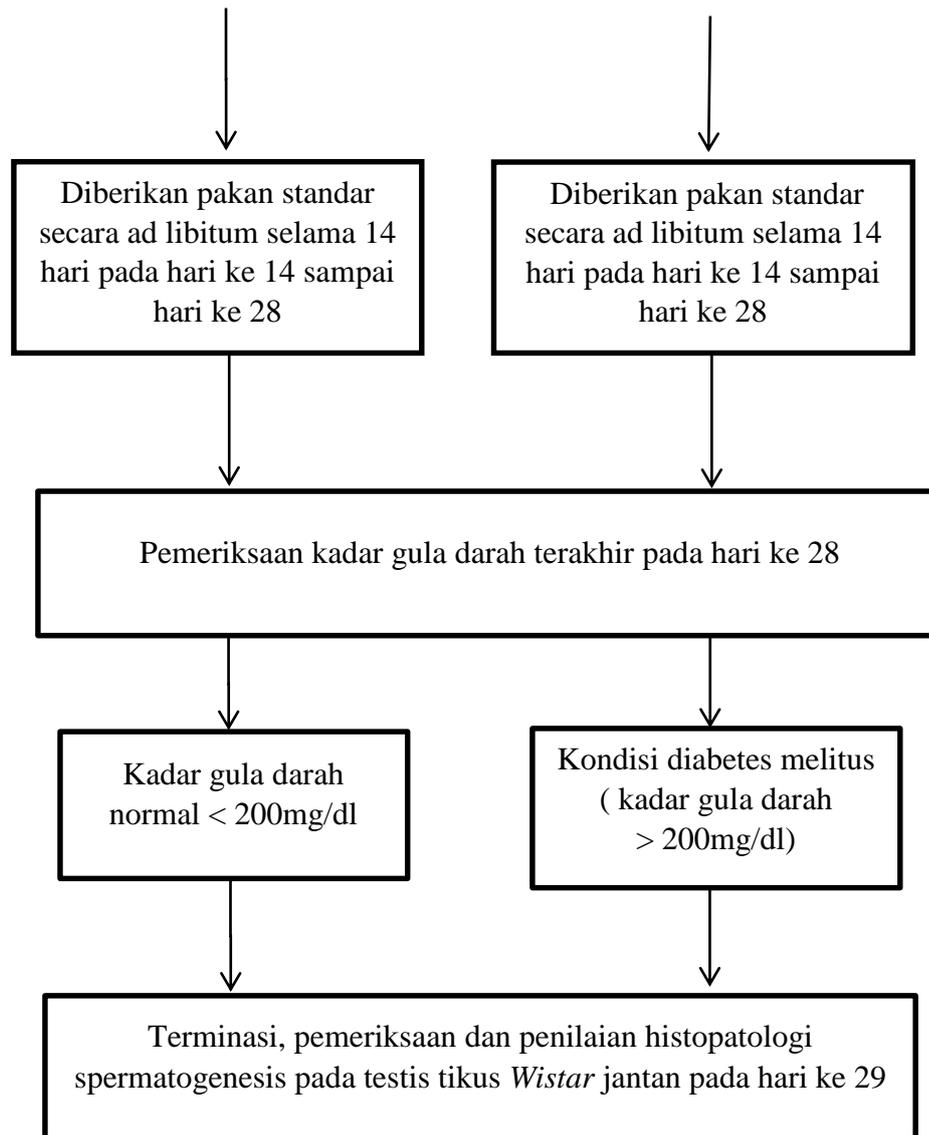
### 3.9. Definisi operasional

**Tabel 3.** Definisi Operasional

NO.	Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Histopatologi spermatogenesis akibat diabetes melitus	Menilai seberapa besar tingkat kerusakan yang ditimbulkan diabetes melitus terhadap proses spermatogenesis di tubulus seminiferus pada testis dengan menggunakan kriteria <i>Johnsen score</i> . Pemeriksaan dan penilaian dilakukan dengan pengamatan mikroskopis pada pembesaran 400x. Setiap preparat pengamatan dan pemberian skor dilakukan pada lima lapangan dengan setiap lapang pandang terdapat 1 tubulus seminiferus. Skor dari masing masing lapangan pandang direrata, sehingga didapatkan skor untuk masing-masing tikus. Skor masing-masing tikus kemudian diurutkan dari yang terkecil hingga tersbesar untuk mencari nilai median sebagai skor kelompok. Nilai median masing masing kelompok kemudian dibandingkan.	Rasio
2.	Aloksan	Aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes. <sup>33</sup> Aloksan memiliki bentuk molekul yang mirip dengan glukosa (glukomimetik). Sehingga pada saat aloksan diinduksikan ke tubuh tikus, maka glukosa transpoter GLUT 2 yang ada di dalam sel beta pankreas akan mengenali aloksan sebagai glukosa, dan aloksan akan dibawa menuju sitosol. Di dalam sitosol, aloksan akan mengalami reaksi redoks yang menghasilkan	Nominal

NO.	Variabel	Definisi Operasional	Skala
		<p>Reactive Oxygen Species (ROS). Terbentuknya ROS akan menyebabkan depolarisasi membran sel beta dan peningkatan <math>Ca^{2+}</math>, sehingga sitosol akan mengaktifasi berbagai enzim yang menyebabkan peroksidasi lipid, fragmentasi DNA, dan fragmentasi protein. Akibatnya sel beta pankreas menjadi nekrosis, sehingga fungsinya untuk sintesis dan sekresi insulin menurun.</p> <p>Sebelumnya dikatakan bahwa aloksan dapat menyebabkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) dengan cepat pada binatang coba dengan dosis 120-150mg/kgBB.<sup>40</sup></p>	

**3.10. Alur kerja penelitian**



**Gambar 12.** Alur Penelitian

### 3.11. Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS for Windows. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Jika didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik parametrik Independent T Test. Sedangkan jika didapatkan distribusi data yang tidak normal, maka dilakukan uji statistik non parametrik *Mann-Whitney*.

### 3.12. Etika penelitian

*Ethical Clearance* didapat dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi dengan keterangan No. 421/EC/FK-RSDK/2016.

### 3.13. Jadwal penelitian

**Tabel 4.** Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan					
	Des	Jan	Feb	Mar	April	Mei
Penyusunan proposal	■	■				
Pengujian proposal		■				
Pelaksanaan penelitian			■	■	■	
Pengolahan data					■	■
Pengujian hasil akhir						■