

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1. Lingkup Tempat

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang, Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.1.2. Lingkup Waktu

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei-Juni 2016.

3.1.3. Lingkup Ilmu

Ilmu Anatomi, Ilmu Patologi Anatomi, Ilmu Farmakologi.

3.2. Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini, maka jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Menggunakan 3 (tiga) kelompok, yaitu 1 (satu) kelompok perlakuan, 1 (satu) kelompok kontrol positif, dan 1 (satu) kelompok kontrol negatif. Penelitian hanya dilakukan pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah ranitidin.

3.3.2. Variabel Tergantung

Variable tergantung dalam penelitian ini adalah spermatogenesis yang dilihat secara gambaran histopatologis.

3.4. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi operasional variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Skala	Nilai
1.	Metanol	Dosis yang digunakan adalah 3g/kg berat badan dan diukur dengan menggunakan timbangan.	Nominal	Ditetapkan berdasarkan dosis pada penelitian sebelumnya yaitu 3g/kg berat badan. ⁸
2.	Ranitidin	Dosis ranitidin yang diberikan adalah 30 mg/kg intraperitoneal, diberikan 1 jam setelah pemberian metanol.	Nominal	Ditetapkan berdasarkan penelitian sebelumnya. ^{8,9}

3.	Spermatogenesis	Spermatogenesis	Ordinal	Tergantung
	Tikus secara	proses pembentukan		pengaruh
	Histopatologis	sel sperma yang dimulai dari proliferasi sel germinal sampai menjadi spermatozoa dalam tubulus seminiferous testis yang dinilai secara semikuantitatif menggunakan skor Johnsen dengan melihat 5 lapangan pandang.		variabel bebas yang kemudian dikelompokkan menjadi 10 kelompok. ⁵³

3.5. Populasi dan Sampel

3.5.1. Populasi Penelitian

a. Populasi Target

Populasi yang diteliti adalah tikus *Wistar*.

b. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang.

3.5.2. Sampel Penelitian

3.5.2.1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Wistar* jantan
- b. Usia 2-3 bulan
- c. Berat badan 150-250 gram
- d. Dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan anatomi

3.5.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus *Wistar* mati selama perlakuan

3.5.2.3. Besar Sampel

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan ketentuan WHO yaitu minimal 5 (lima) ekor tikus pada masing-masing kelompok. Pada penelitian ini digunakan 15 ekor tikus *Wistar* yang dibagi 3 kelompok, masing-masing dalam 1 (satu) kelompok perlakuan, 1 (satu) kelompok kontrol positif, serta 1 (satu) kelompok kontrol negatif yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus *Wistar*. Pembacaan masing-masing preparat dilakukan pada 5 lapang pandang sehingga didapatkan 75 lapang pandang sebagai sampel penelitian.

3.5.2.4. Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan dengan *allocation random sampling*. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus *Wistar* yang sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat untuk perlakuan

- a. Kandang tikus *Wistar*
- b. Sonde

3.6.2. Alat untuk bedah minor

- a. Pisau skapel
- b. Pinset bedah
- c. Gunting

3.6.3. Alat untuk pemeriksaan histopatologis

- a. Mikroskop
- b. *Object glass*
- c. Botol-botol
- d. Kamera digital

3.6.4. Bahan

Bahan untuk percobaan ini :

- a. Tikus *Wistar* sebagai subjek penelitian
- b. Ranitidin dosis 30mg/kgBB
- c. Metanol 3g/kgBB
- d. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan
yaitu:
 - Larutan Bouin
 - Larutan buffer formalin 10%, parafin

- Albumin
- Hematoksilin eosin
- Larutan xylol
- Alkohol 30%, alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 60%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%
- Aquades

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Jenis data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian berupa gambaran histopatologi spermatogenesis pada testis tikus *Wistar* dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.2 Alur penelitian

Sejumlah 15 ekor tikus *Wistar* jantan dilakukan adaptasi selama 2 hari di laboratorium dengan kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minuman yang sama (*ad libitum*).

Pada hari ke-3, tikus *Wistar* dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang diberi tanda pada daerah yang berbeda yaitu kepala, punggung, bokong, kaki, dan tanpa tanda. Selanjutnya masing-masing tikus ditimbang dan diperiksa fisiknya untuk menilai adanya abnormalitas anatomis.

Ke-3 kelompok tersebut adalah :

Kontrol negatif (K0) : tidak diberikan metanol maupun ranitidine

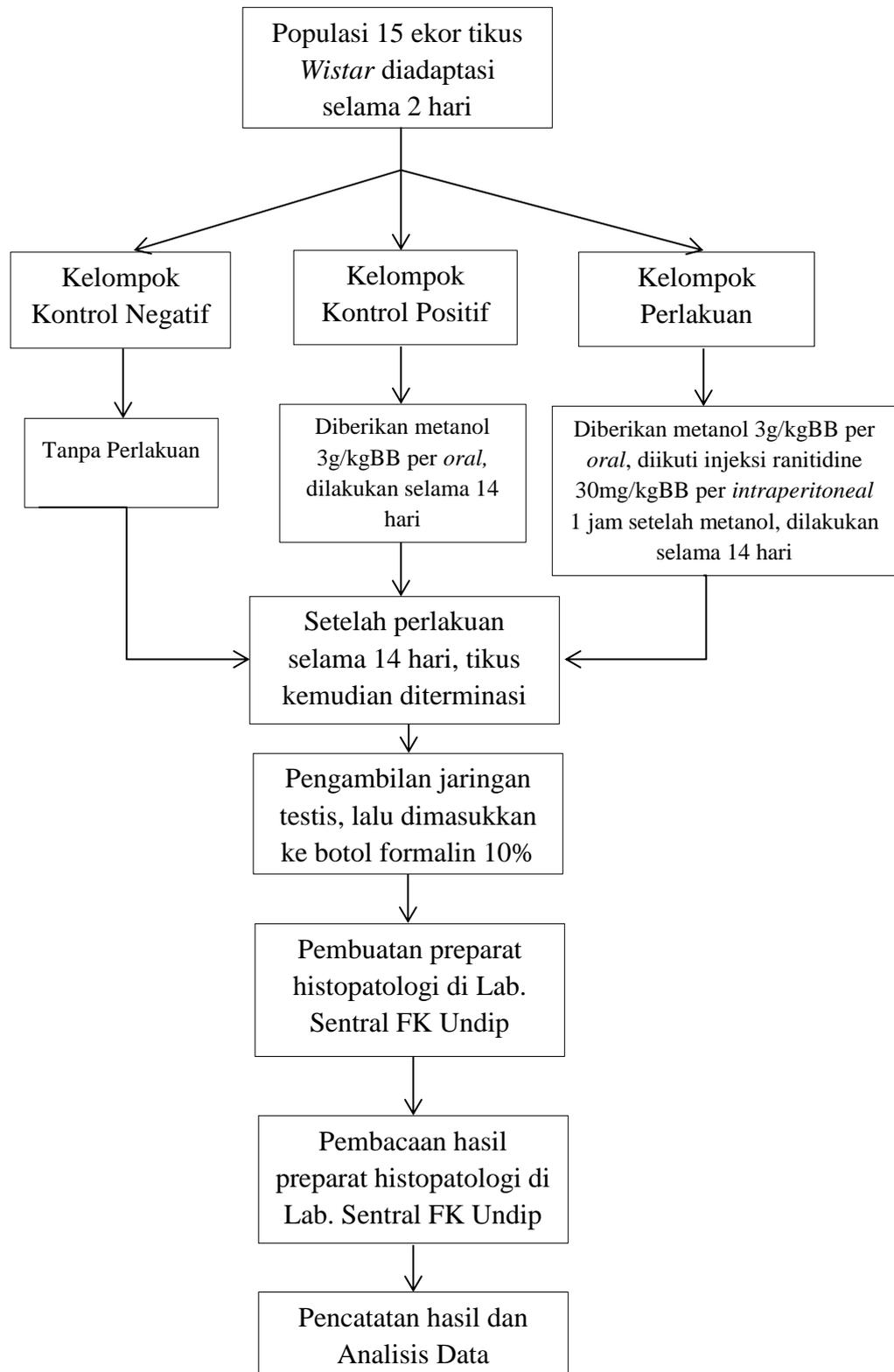
Kontrol positif (K1) : diberi metanol 3g/kgBB

Perlakuan (P1) : diberi metanol 3g/kgBB dan ranitidin 30 mg/kgBB

Kelompok kontrol negatif tidak dikenakan perlakuan apapun. Kelompok kontrol positif diberikan larutan metanol dengan menggunakan sonde sampai habis. Kelompok perlakuan diberi larutan metanol, lalu satu jam setelahnya, diinjeksikan ranitidin. Pemberian metanol dan ranitidine dilakukan setiap hari selama 14 hari. Setelah 14 hari pemberian perlakuan, ketiga kelompok tikus diterminasi dengan cara didekapitasi oleh ahli hewan dari laboratorium.

Setelah tikus diterminasi, selanjutnya dilakukan pengambilan testis dan dipotong kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10%. Testis kemudian dikirim ke Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk dilakukan proses pembuatan blok parafin. Blok parafin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan Hematoksilin dan Eosin (HE).

Setelah pembuatan preparat itu selesai, lalu diamati dalam preparat histopatologi dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 100x dan 400x. Cara kerja pembuatan preparat histopatologi terlampir. Data pemeriksaan ditulis dalam formulir untuk kemudian dianalisa.



Gambar 9. Alur Penelitian

3.8 Pengolahan dan Analisa Data

Data yang terkumpul dianalisis secara statistik dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Sebelum dilakukan uji hipotesis, dilakukan uji reliabilitas data dengan uji *Cronbach's Alpha*. Kemudian dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat distribusi data nya. Lalu untuk menguji hipotesis yaitu dengan uji *Kruskall-wallis*. Hasil uji *Kruskall-wallis* didapatkan bermakna maka dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Nilai p dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

3.9 Metode Penelitian

3.9.1 Penentuan kerusakan sel reproduksi

Untuk menilai kerusakan sel reproduksi (tubulus seminiferous, dan sel spermatogenesis) menggunakan kriteria Johnsen skor yang berdasarkan perhitungan kuantitas dengan penilaian 1-10, yaitu:

- Nilai 10 : Kriteria spermatogenesis lengkap dan teratur dengan spermatozoa lebih dari sepuluh dan epitel tubulus seminiferous normal, lumen tubulus seminiferous terbuka
- Nilai 9 : Spermatozoa lebih dari sepuluh, tetapi epitel tubulus seminiferous tidak teratur, tampak epitel tubulus seminiferous yang lepas, dan lumen tubulus tertutup
- Nilai 8 : Jumlah spermatozoa dalam tubulus seminiferous, kurang dari sepuluh.
- Nilai 7 : Tidak tampak spermatozoa dalam tubulus seminiferous, tapi jumlah spermatid lebih dari sepuluh.

- Nilai 6 : Tidak terdapat spermatozoa, dan jumlah spermatid dalam tubulus seminiferous kurang dari sepuluh.
- Nilai 5 : Tidak terdapat spermatozoa dan spermatid dalam tubulus seminiferous, tetapi jumlah spermatosit lebih dari lima.
- Nilai 4 : Tidak ada spermatozoa dalam tubulus seminiferous dan jumlah spermatosit kurang dari lima
- Nilai 3 : Sel kelamin dalam tubulus hanya terdiri dari spermatogonia.
- Nilai 2 : Dalam tubulus seminiferous tidak terdapat sel reproduksi, hanya sel sertoli.
- Nilai 1 : Dalam tubulus seminiferous tidak ada sel sama sekali.

3.9.2 Penilaian Jumlah sel spermatogenesis

Penilaian jumlah sel spermatogenesis dilakukan dengan cara menghitung sel spermatogenesis dalam tubulus seminiferous per lapang pandang. Pada penelitian ini dilihat 5 (lima) lapang pandang.

3.10 Etika Penelitian

Etika penelitian telah diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran UNDIP / RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 523/EC/FK-RSDK/2016.