

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Ruang lingkup penelitian ini adalah ilmu Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

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

##### **3.2.1 Tempat penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat antara lain:

1. Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
2. Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan preparat histopatologi.
3. Interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan Testis dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

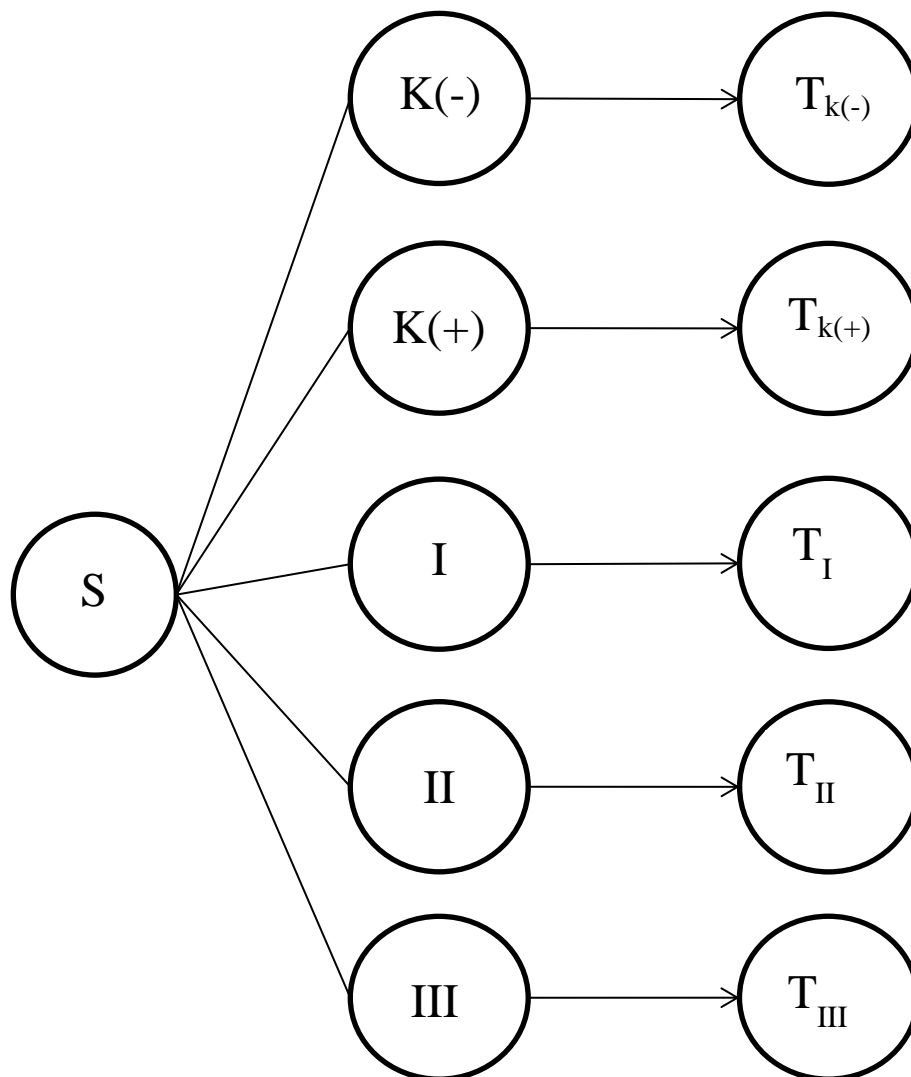
##### **3.2.2 Waktu penelitian**

Penelitian, pengumpulan, dan analisa data dilakukan pada Maret-Juni 2018.

### 3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian True Experimental Laboratorik dengan rancangan *Post test only control group design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit Balb/c jantan sebagai objek penelitian.

Skema Rancangan Penelitian adalah sebagai berikut:



**Gambar 14.** Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Kelompok Sampel

K(-) = Kelompok Kontrol Negatif (Tidak diberikan perlakuan)

K(+) = Kelompok Kontrol Positif (Rifampisin per oral 7 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest)

I = Kelompok Perlakuan I (Rifampisin per oral 7 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest, setelah 5 jam diberikan Ekstrak Temulawak Per Oral 2 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest)

II = Kelompok Perlakuan II (Rifampisin per oral 7 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest, setelah 5 jam diberikan Ekstrak Temulawak Per Oral 4 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest)

III = Kelompok Perlakuan III (Rifampisin per oral 7 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest, setelah 5 jam diberikan Ekstrak Temulawak Per Oral 8 mg/20grBB/hari dalam 0,3 ml aquadest)

T<sub>k(-)</sub> = Tes Kelompok Kontrol Negatif

T<sub>k(+)</sub> = Tes Kelompok Kontrol Positif

T<sub>I</sub> = Tes Kelompok Perlakuan I

T<sub>II</sub> = Tes Kelompok Perlakuan II

T<sub>III</sub> = Tes Kelompok Perlakuan III

### **3.4 Populasi**

#### **3.4.1 Populasi target**

Populasi target penelitian ini adalah mencit balb/c jantan.

#### **3.4.2 Populasi terjangkau**

Populasi terjangkau penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan yang diperoleh dari LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### **3.4.3 Sampel**

##### **3.4.3.1 Kriteria Inklusi**

- a) Mencit strain Balb/c
- b) Jantan
- c) Berat badan 20-25 gram
- d) Usia 2-3 bulan
- e) Mencit dalam keadaan sehat dan lincah

##### **3.4.3.2 Kriteria drop out**

- a) Mati pada saat penelitian berlangsung.
- b) Perilaku berubah (lemah dan tidak aktif bergerak).

#### **3.4.4 Cara pengambilan sampel**

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat

badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari mencit balb/c sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semua diambil secara acak dari kelompok mencit balb/c yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu

### 3.4.5 Besar sampel

Perhitungan jumlah sampel berdasarkan rumus Federer (1977) adalah sebagai berikut:

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

Dimana:

n = jumlah pengulangan / besar sampel dalam kelompok

t = jumlah perlakuan / banyaknya kelompok (5 kelompok)

Maka jumlah sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah:

$$[(5 - 1)(n - 1)] \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor mencit Balb/c jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing-masing berjumlah 5 ekor.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak temulawak dosis bertingkat.

#### 3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis testis Mencit balb/c

### 3.6 Definisi Operasional Penelitian

**Tabel 3.** Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala Pengukuran
1	Pemberian ekstrak temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) per oral dosis bertingkat dan pemberian rifampisin per oral	Ekstrak temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) yang digunakan dalam bentuk kapsul. Serbuk dari dalam kapsul dikeluarkan kemudian serbuk ditimbang sesuai dosis dan dilarutkan dalam aquadest. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 1 (PI) dosis 2mg/ 20grBB / hari, perlakuan 2 (PII) dosis 4mg/ 20grBB / hari, dan perlakuan 3 (PIII) dosis 8mg/ 20grBB / hari dengan sonde sebanyak satu kali sehari selama 14 hari. PI, PII, dan PIII	mg/kgBB	Nominal

		diberikan perlakuan preventif dengan diberikan ekstrak temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) per oral dosis bertingkat yang sesuai dengan dosis tiap kelompok perlakuan		
2	Gambaran mikroskopis testis mencit balb/c	Gambaran mikroskopis testis mencit balb/c dapat dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali dalam 5 lapangan pandang	-	Ordinal

**Tabel 4.** Kriteria pembacaan derajat histopatologi testis berdasarkan derajat histopatologi testis berdasarkan kerusakan tubulus seminiferus, diambil berdasarkan *Johnsen Score*<sup>64</sup>, yaitu:

Skor	Keadaan tubulus seminiferus
10	Epitel tubulus normal, spermatogenesis lengkap, lumen tubulus terbuka, spermatozoa $\geq 10$
9	Epitel tubulus rusak, lumen tubulus tertutup, sel spermatozoa $\geq 10$
8	Sel spermatozoa $< 10$
7	Sel spermatozoa 0, Sel spermatid $\geq 10$
6	Sel spermatozoa 0, Sel spermatid $< 10$

5	Sel spermatozoa dan Sel spermatid 0, sel spermatosit $\geq 5$
4	Sel spermatozoa dan Sel spermatid 0, sel spermatosit $< 5$
3	Sel spermatogenik hanya terdiri atas sel spermatogonium
2	Sel spermatogenik 0, hanya ada sel sertoli
1	Tidak ada sel sama sekali dalam tubulus

Berdasarkan Johnsen Skor diatas maka preparat histologis tubulus seminiferus testis mencit *Balb/c* dinilai menjadi :

Tubulus normal : Skor Johnsen 10

Tubulus abnormal : Skor Johnsen 9-1

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1. Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan duduk dan timbangan neraca
3. Sonde lambung
4. Alat bedah hewan coba: scalpel, gunting, jarum, dan meja lilin.
5. Alat pembuatan prepaat histologi: mikrotom, oven, cetakan paraffin
6. Alat lihat histopatogik testis: deck glass, object glass, mikroskop cahaya
7. Gelas ukur dan pengaduk
8. Pemanas dan pemotong
9. Sduit 3 ml



### 3.7.2. Bahan

1. Mencit balb/c jantan
2. Makanan dan minuman standar hewan coba
3. Bahan pengecatan HE:
  - a. Larutan buffer formalin 10%
  - b. Paraffin
  - c. Albumin
  - d. Larutan xyol
  - e. Alkohol bertingkat: 70%, 80%, 90%, 96%.
4. *Carboxymethicellulosa* (CMC)
5. Kapsul ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)
6. Rifampisin

### 3.7.3. Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari pemeriksaan mikroskopis terhadap organ testis mencit balb/c jantan.

### 3.7.4. Cara Kerja

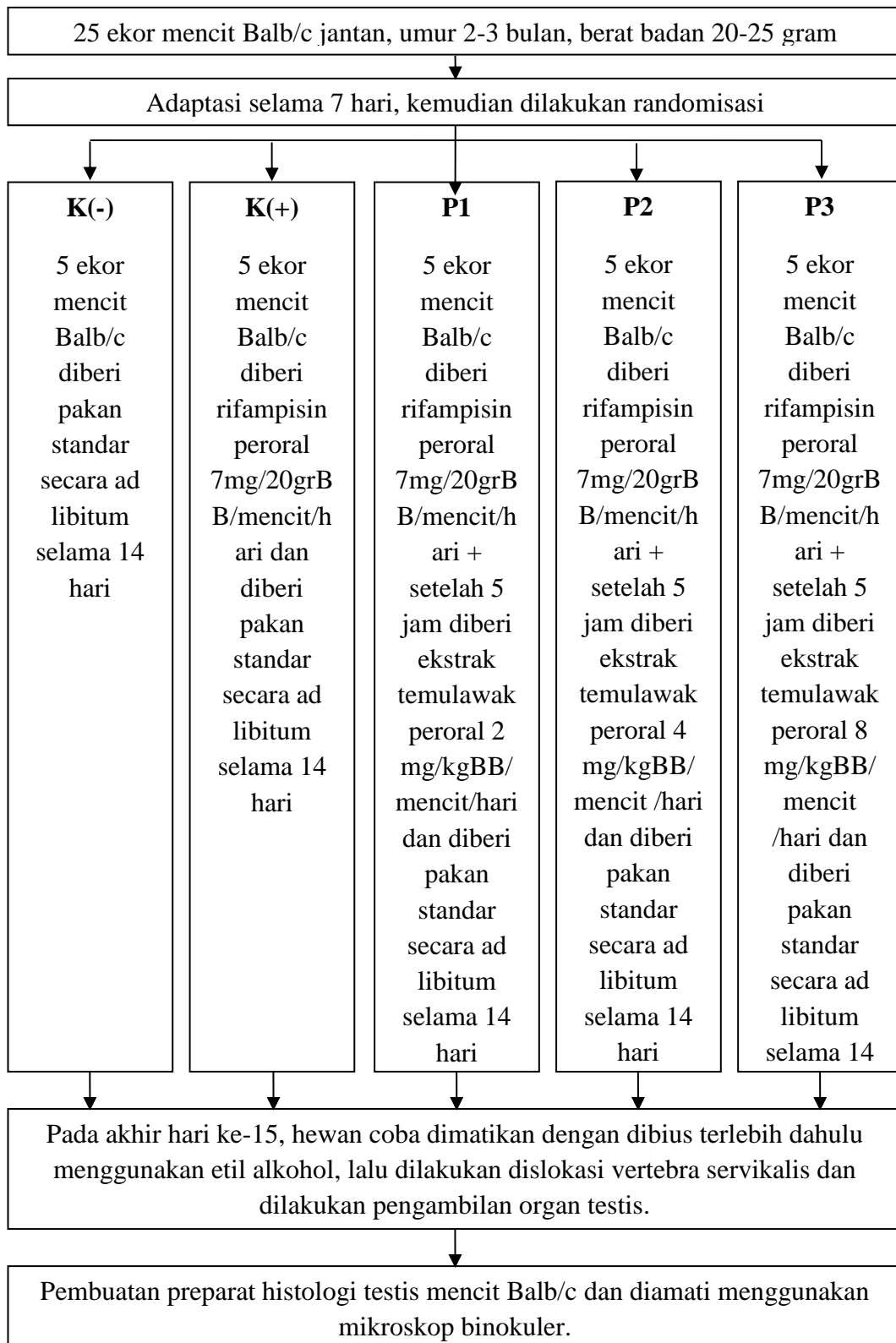
Cara kerja dalam penelitian ini meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

1. Melakukan aklimatisasi hewan sampel di laboratorium selama 1 minggu.

2. Memilih sampel dengan metode *simple random sampling*, 25 ekor mencit balb/c jantan dibagi dalam 5 kelompok. Masing-masing kelompok mencit balb/c jantan dikandangkan secara individual.
3. Mempersiapkan rifampisin dengan dosis 7 mg/20grBB/mencit/hari dan kapsul ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan dosis bertingkat (2, 4, dan 8 mg/20grBB/hari).
4. Memberi perlakuan selama 14 hari pada tiap kelompok, yaitu:
  - a. Kelompok K(-), berupa pemberian pakan standar selama 14 hari berturut-turut.
  - b. Kelompok K(+), berupa pemberian rifampisin dengan dosis 7 mg/20grBB/mencit/hari selama 14 hari berturut-turut.
  - c. Kelompok P1, berupa pemberian rifampisin dengan dosis 7 mg/20grBB/mencit/hari lalu setelah 5 jam diberikan ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan dosis 2 mg/20grBB/hari selama 14 hari berturut-turut.
  - d. Kelompok P2, berupa pemberian rifampisin dengan dosis 7 mg/20grBB/mencit/hari lalu setelah 5 jam diberikan ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan dosis 4 mg/20grBB/hari selama 14 hari berturut-turut.
  - e. Kelompok P3, berupa pemberian rifampisin dengan dosis 7 mg/20grBB/mencit/hari lalu setelah 5 jam diberikan ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan dosis 8 mg/20grBB/hari selama 14 hari berturut-turut.

5. Melakukan terminasi semua hewan coba pada hari ke-15 penelitian dengan melakukan dislokasi vertebra servikalis, kemudian membedah dan mengambil organ testis. Organ testis hewan percobaan diiris memanjang hingga terbelah dua, kemudian difiksasi menggunakan larutan buffer formalin 10%. Setelah itu dibuat preparat histologi dengan metode blok paraffin dan diberi pengecatan HE.
6. Mengamati struktur mikroskopis testis dengan mikroskop.

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 15.** Alur Penelitian

### **3.9 Analisis Data**

Analisa data dengan menggunakan SPSS for windows. Data gambaran mikroskopis testis yang memiliki skala ordinal diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Jika data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Jika nilai  $p \leq 0,05$  maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Mann-Whitney*

### **3.10 Etika Penelitian**

*Ethical Clearence* didapat dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi dengan keterangan No. 58/EC/H/FK-RSDK/V/2018

### 3.11 Jadwal Penelitian

**Tabel 5.** Jadwal Penelitian

No.	Jenis Kegiatan	Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5				Bulan 6			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Studi literatur																				
2	Penyusunan proposal																				
3	Seminar proposal																				
4	Ethical clearance																				
5	Perizinan instansi terkait																				
6	Persiapan Alat Bahan																				
7	Perlakuan																				
8	Pengambilan data post test																				
9	Analisis data dan penyusunan																				
10	Seminar hasil																				