

BAB IV

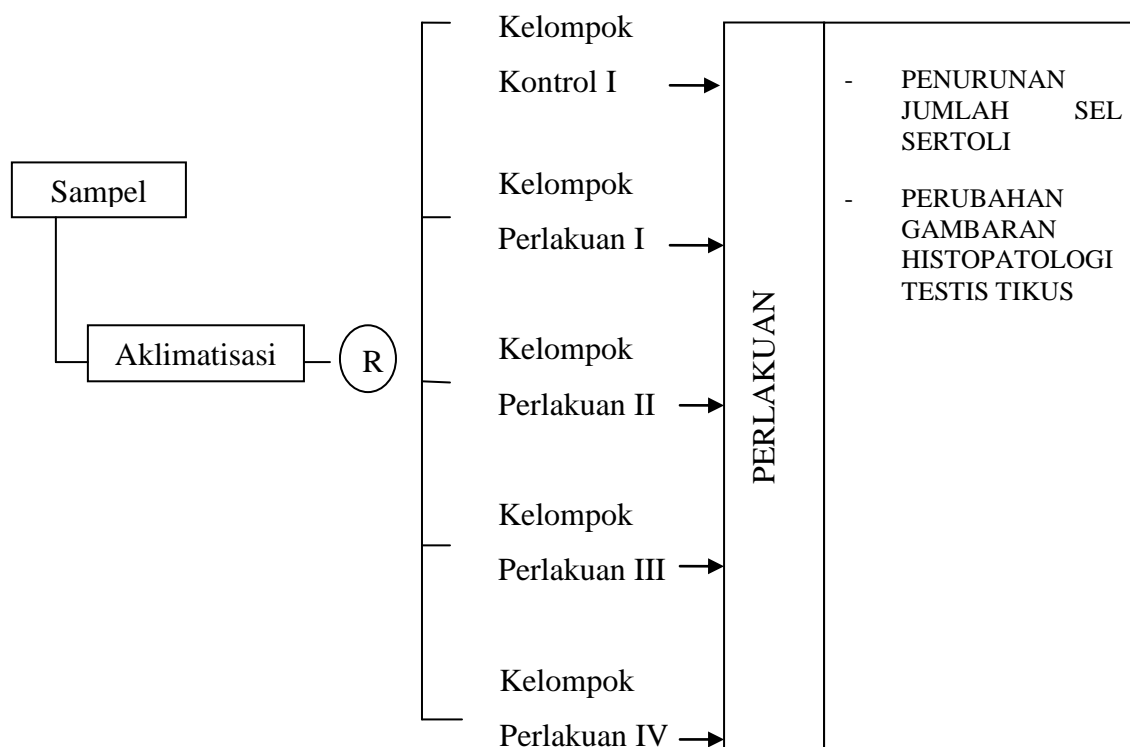
METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Universitas Diponegoro Semarang.

4.2 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain *Posttest Only Control Group* pada tikus Sprague Dawley.



Keterangan:

Kelompok Kontrol I = kelompok kontrol negatif

Kelompok perlakuan I = injeksi 25 μg β estradiol 3-benzoat yang dicairkan dalam 0.02 ml minyak wijen

Kelompok perlakuan II = dipaparkan asap obat nyamuk bakar 8 jam sehari selama 20 hari

Kelompok perlakuan III = dipaparkan 3 ml obat nyamuk cair yang disemprotkan ke kandang dengan nebulizer satu kali sehari selama 20 hari

Kelompok perlakuan IV = dipaparkan 4 ml obat nyamuk yang disemprotkan ke dalam kandang dengan nebulizer satu kali sehari selama 20 hari

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Tikus jantan Sprague Dawley yang diperoleh dari Balai POM, Jakarta.

4.3.2. Sampel

Sampel testis di dalam blok parafin didapatkan dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Dr. dr. Tri Indah Winarni, PA, M.Si, Med. PAK. Dengan sampel adalah tikus jantan Sprague Dawley, umur 3 hari setelah kelahiran, berat 6-8 gram.

Semua tikus dikelompokkan dan dikandangkan di UPHP (Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan) Universitas Gadjah Mada di Yogyakarta.

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

- a) Umur tikus: 3 hari setelah kelahiran
- b) Jenis kelamin jantan
- c) Berat 6-8 gram

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus memiliki kelainan anatomi

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus mati selama penelitian

4.3.3. Metode Pengambilan Sampel

Semua tikus dibagi menjadi 5 kelompok dengan metode *Simple Random Sampling* diikuti dengan *Consecutive Random Sampling*.

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan *formula Freeder experimental sample*

$$size: t(n-1) > 15$$

Ada 4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, maka $t = 6 \rightarrow$

$$6(n-1) > 15 \quad n \rightarrow 4 \text{ untuk masing-masing kelompok}$$

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel bebas

- a. 25 μg β estradiol 3-benzoat yang diencerkan dalam 0.02 ml minyak wijen dosis tunggal s.c
- b. Obat nyamuk bakar lingkak
- c. Obat nyamuk cair

4.4.2. Variabel terikat

- a. Perubahan gambaran histopatologi sel Sertoli
- b. Penurunan jumlah sel Sertoli

4.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
EDC	EDC adalah senyawa yang dapat bekerja seperti hormon endokrin		Nominal
β estradiol 3- benzoate	Estrogen poten yang diinjeksikan s.c pada tikus SD	μg	Numerik
Obat nyamuk	Obat nyamuk bakar bentuk lengkung yang mengandung	jam	Numerik

bakar	transfultrin 0.03 %		
Obat nyamuk cair 1	3 ml obat nyamuk bentuk cair yang mengandung transfultrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg, yang disemprotkan menggunakan nebulizer setiap menit sekali	ml	Numerik
Obat nyamuk cair 2	4 ml obat nyamuk bentuk cair yang mengandung transfultrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg, yang disemprotkan menggunakan nebulizer setiap menit sekali	ml	Numerik
Jumlah Sel Sertoli	Sel ini berbentuk agak lonjong dan iregular. Dimana basisnya menempel pada membran basalis tubulus seminiferus. Memiliki inti satu di tengah. Sel ini diamati per preparat dengan membagi masing-masing preparat menjadi 5 area lapang pandang, dan kemudian dicari 5 tubulus per lapang pandang yang bentuk dan ukurannya hampir sama	Sel per lapangan pandang	Numerik

4.6 Materi/Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1. Materi/bahan

- testis tikus yang diperoleh setelah tikus diterminasi dengan cara dislokasi servikal/leher
- β estradiol 3-benzoat
- Minyak wijen
- Obat nyamuk bakar lingkar (mengandung transflutrin 0.03%)
- Obat nyamuk cair (mengandung transflutrin 0.162 g/L dan propoxur 4.05 g/L)
- Pelet makan hewan: 521 (PAU Yogyakarta)
- Larutan formaldehyde netral 10%
- ethanol 70%
- Larutan Xylol

- Paraffin wax
- Aquades
- Haematoxyllin dan Eosin
- Asam Asetat 1%
- Minyak emersi

4.6.2. Alat

- Kandang tikus
- BD[®] syringe dengan jarum non-traumatik
- Nebulizer (Bremmed[®])
- Penjepit
- Gunting
- Skalpel
- Stopper glass jar
- Gelas beker kimia dengan ketelitian ± 0.1 ml
- Jangka lengkung GMP
- Gelas Beker
- Oven/pemanas
- Alat perekat paraffin
- Microtome
- Object glass
- Mikroskop

4.7. Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1. Persiapan dan pembagian tikus

Seluruh tikus jantan Sparque Dawley dengan umur 1 hari setelah kelahiran yang disesuaikan lingkungannya di UPHP selama 2 hari dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok dengan cara simple random sampling. Selama perlakuan, tikus-tikus diberikan air susu dari induknya sampai mencapai usia 22 hari setelah kelahiran. Sampai mencapai usia tersebut tikus-tikus dipantau dalam kondisi standar. Selama kondisi standar semua tikus diberikan pakan tikus dan air secukupnya.

4.7.2. Intervensi Kelompok

4.7.2.1. Kelompok I: Kelompok kontrol I (n=15). Tikus-tikus dalam kelompok kontrol mendapatkan susu dari induknya sampai hari ke-22 kemudian dilanjutkan dengan pemberian pakan dan air secukupnya sampai tikus berumur 100 hari.

4.7.2.2. Kelompok II: Kelompok perlakuan I (n=15). Pada hari ke-3 postnatal semua tikus di kelompok ini diberikan 25 µg β estradiol 3-benzoat yang diencerkan dalam 0.02 ml minyak wijen dosis tunggal s.c dengan BD non-traumatik needle dalam selang 1 hari pemberian selama 20 hari dan dipelihara dibawah kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

4.7.2.3 Kelompok III: Kelompok perlakuan II (n=18). Semua tikus di kelompok ini dipaparkan asap dari obat nyamuk bakar lingkak (transflutrin 0.03%) 8 jam

dalam 1 hari selama 20 hari dan dipelihara dibawah kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

4.7.2.4. Kelompok IV: Kelompok perlakuan III (n=20). Semua tikus di kelompok ini dipaparkan 3 ml obat nyamuk cair (transflutrin 0.468 mg dan propoxur 12.15 mg) yang disemprotkan ke dalam kandang melalui nebulizer sebanyak 1 kali sehari selama 20 hari dan dipelihara dibawah kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

4.7.2.5. Kelompok V: Kelompok perlakuan IV (n=9). Semua tikus di kelompok ini dipaparkan dengan 4 ml obat nyamuk cair (transflutrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg) yang di semprotkan ke dalam kandang dengan nebulizer sebanyak 1 kali sehari selama 20 hari dan dipelihara dibawah kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

Setelah perlakuan, ketika berumur 100 hari semua tikus diberikan anestesi dengan menggunakan ether dan dibunuh dengan cara dislokasi servikal. Kemudian testis tikus akan diteliti setelahnya.

4.7.3 Jenis data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang di peroleh dari gambaran mikroskopik.

4.7.4 Cara Kerja

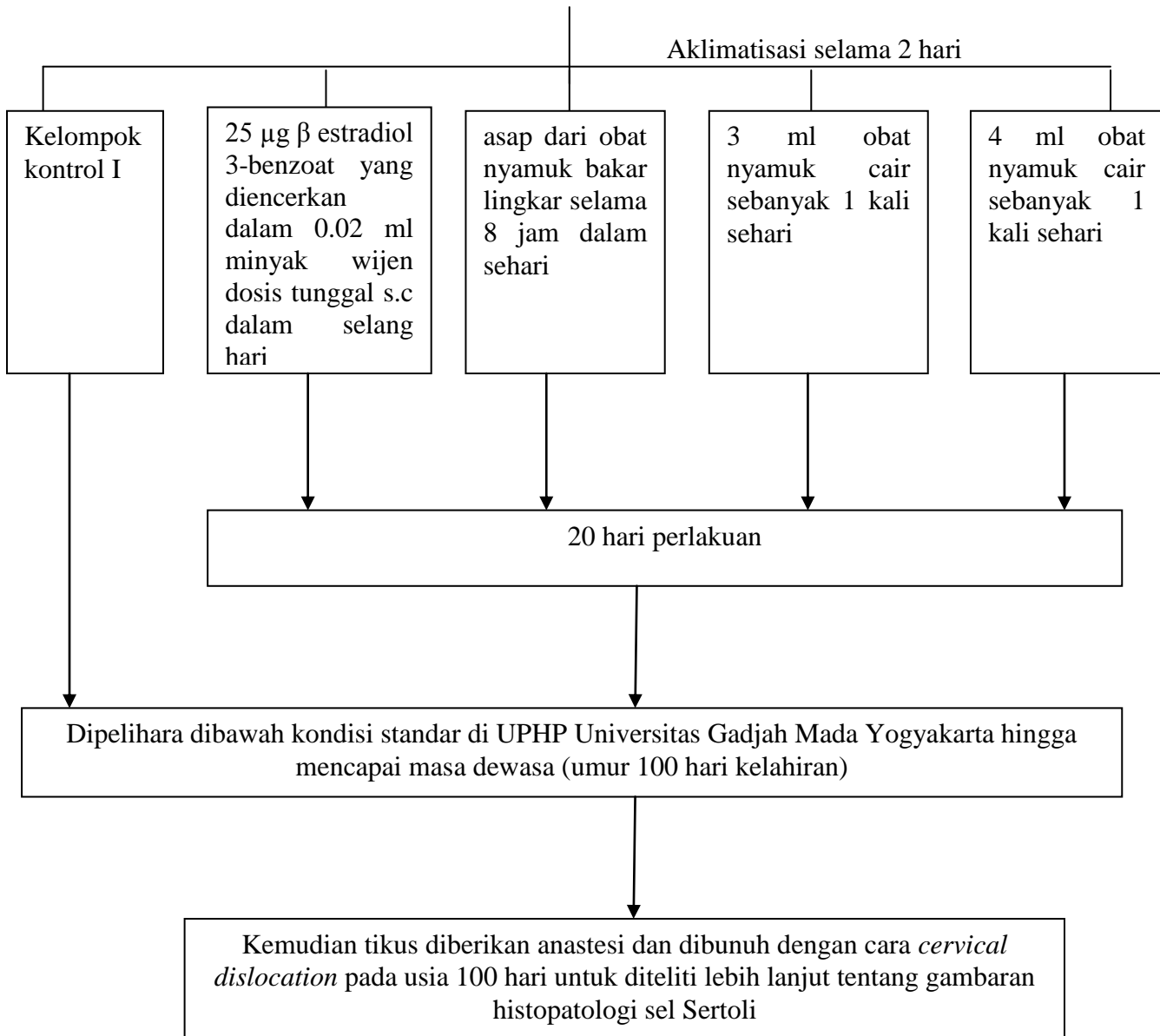
Penelitian ini menggunakan preparat parafin blok testis tikus Sprague Dawley yang merupakan hasil penelitian sebelumnya oleh Dr. dr. Tri Indah Winarni, PA, M.Si, Med. PAK dengan judul Alteration of Rat Reproductive Organ in Adulthood caused by The Exposure of Foreign Estrogenic Compounds (mosquito insecticide) During Early Life.

Paparan obat nyamuk yang diberikan selama 20 hari pada tikus merupakan hasil konversi dari perhitungan dan apabila dipaparkan pada manusia setara dengan paparan sejak bayi sampai anak dapat berjalan atau selama 2 tahun. Paparan obat nyamuk cair merupakan hasil konversi dari dosis penggunaan rata-rata pada manusia.

Persiapan yang dilakukan adalah memilih Tikus Sparuge Dawley jantan postnatal berumur 1 hari yang berjumlah 50 ekor, kemudian di aklimatisasi dalam kondisi standard di UPHP selama 2 hari dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok dengan metode siple random sampling. Selama perlakuan, tikus mendapat breast-feeding dari induk tikus sampai hari ke 22 postnatal.

4.8. Alur Penelitian

Tikus jantan Spraque Dawley 1 hari kelahiran



Gambar 7. Gambar Alur Penelitian

4.9. Metode Pengukuran

4.9.1. Pengukuran jumlah sel Sertoli

Penilaian jumlah sel Sertoli pada potongan jaringan tikus Sprague Dawley selama perlakuan dengan membagi menjadi 5 lapang pandang, dan masing-masing lapang pandang dihitung 5 tubulus yang bentuk dan ukurannya hampir sama. Sel Sertoli yang terletak di dalam tubulus seminiferus dihitung seluruhnya, sehingga didapatkan perbedaan jumlah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.10. Analisis data

Data yang didapatkan akan dituliskan dalam bentuk jumlah dan kemudian akan diolah dengan komputer. Jumlah sel Sertoli yang didapatkan, pertama akan dilakukan agreement statistik agar didapatkan data yang kuat dan valid. Kemudian dilakukan uji Shapiro Wilk untuk melihat normalitas sebaran data. Apabila sebaran data normal maka akan dilanjutkan menggunakan uji parametrik One Way Anova untuk melihat perbandingan antar beberapa kelompok. Selanjutnya dilakukan uji Post – Hoc untuk melihat 2 kelompok mana yang paling berbeda. Bila sebaran distribusi tidak normal akan dilakukan transformasi data terlebih dahulu, apabila tetap tidak normal maka dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis. Kemudian apabila bermakna dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Dikatakan signifikan bila nilai $P \leq 0,05$. Kekuatan penelitian ini adalah 80% dengan interval kepercayaan 90%. Analisis data dilakukan menggunakan SPSS for windows v.20.

4.11 Etika penelitian

Ijin Penelitian dilakukan dengan meminta ethical clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr.

