

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini mencakup bidang ilmu Anatomi, Patologi Anatomi dan Andrologi.

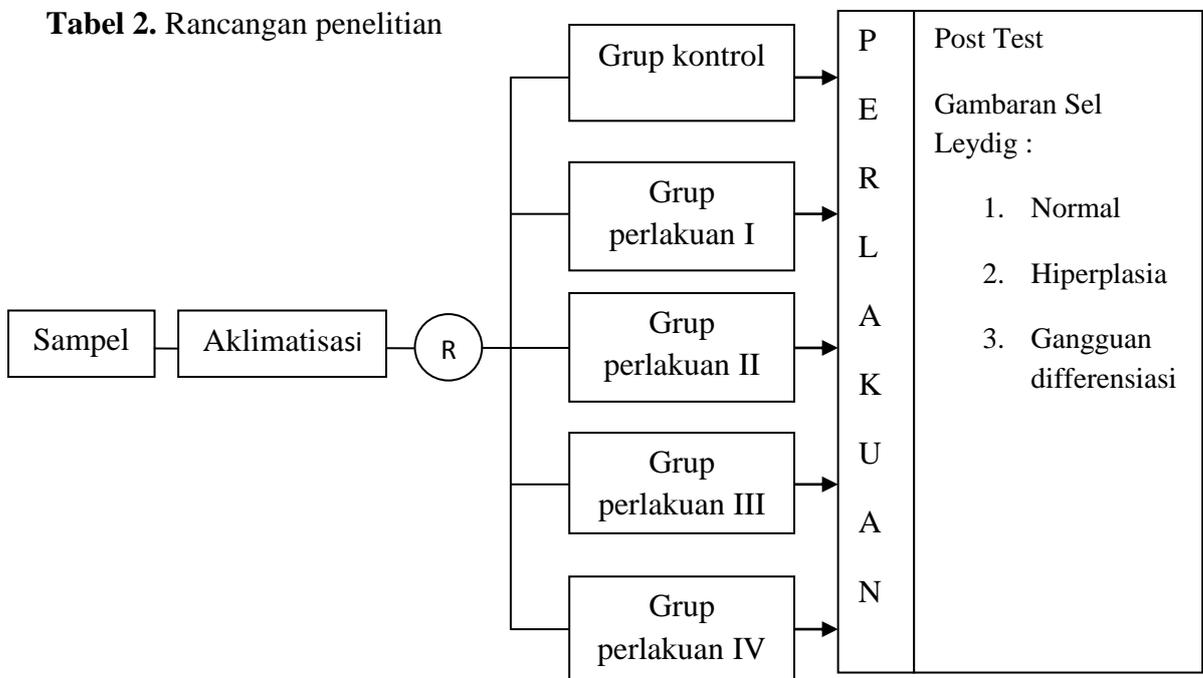
#### 4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei – Juli 2014 di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang dan Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

#### 4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *post test only control group design*.

**Tabel 2.** Rancangan penelitian



Grup kontrol	= kontrol Negatif
Grup perlakuan I	= injeksi 25 $\mu\text{g}$ $\beta$ estradiol 3-benzoat dilarutkan dalam 0.02 ml minyak wijen secara subkutan dengan dosis tunggal selama 20 hari disuntikkan 2 hari sekali
Grup perlakuan II	= dipaparkan obat nyamuk bakar selama 8 jam sehari selama 20 hari
Grup perlakuan III	= dipaparkan 3 ml obat nyamuk cair yang di uapkan dengan nebulizer setiap hari diatur menggunakan <i>timer</i> setiap 1 menit selama 20 hari
Grup perlakuan IV	= dipaparkan 4 ml obat nyamuk cair yang di uapkan dengan nebulizer setiap hari diatur menggunakan <i>timer</i> setiap 1 menit selama 20 hari

#### **4.4 Populasi dan sampel**

##### **4.4.1 Populasi**

Tikus jantan Sprague Dawley (SD) yang didapat dari Balai POM Jakarta.

##### **4.4.2 Sampel**

Penelitian ini menggunakan sampel blok parafin testis tikus Sprague Dawley yang merupakan penelitian sebelumnya oleh Dr. dr. Tri Indah Winarni, PAK, Msi.Med dengan judul *Alteration of Rat Reproductive Organ in Adulthood caused by the Exposure of foreign Estrogenic Compunds (Mosquito Insecticides) during*

*Early Life* dan dilakukan pemeliharaan hewan coba di Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada di Yogyakarta.

#### **4.4.2.1 Kriteria Inklusi**

- 1) Tikus jantan
- 2) Usia 3 hari post natal
- 3) Berat 6-8 gram

#### **4.4.2.2 Kriteria Eksklusi**

- 1) Tikus dengan kelainan anatomi

#### **4.4.2.3 Dropout**

- 1) Tikus mati sebelum 100 hari

#### **4.4.3 Cara sampling**

Semua tikus dibagi dalam 5 grup dengan teknik *simple random sampling* dengan metode *consecutive random sampling*.

#### **4.4.4 Besar sampel**

Jumlah sampel minimal yang digunakan dalam penelitian dihitung menggunakan rumus besar sampel dari Freeder :

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

t = jumlah kelompok

n = jumlah tikus pada setiap kelompok

penelitian ini terdapat 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan, maka

$t=5 \rightarrow 5(n-1) > 15 \rightarrow n > 4$  untuk setiap kelompok.

## 4.5 Variabel penelitian

### 4.5.1 Variabel bebas

- 1)  $\beta$  estradiol 3-benzoat 25  $\mu\text{g}$  dilarutkan dalam 0,02 ml *sesame oil s.c* *single dose*
- 2) Obat nyamuk bakar yang mengandung transfluhtrin 0.03 %
- 3) Obat nyamuk cair yang mengandung transfluthrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg
- 4) Obat nyamuk cair yang mengandung transfluthrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg

### 4.5.2 Variabel terikat

- 1) Jumlah sel Leydig

## 4.6 Definisi operasional

**Tabel 3.** Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
$\beta$ estradiol 3 – benzoat	Estrogen poten	$\mu\text{g}$	Nominal
Obat nyamuk bakar bentuk lingkaran	Obat nyamuk dipaparkan 8 jam perhari selama 20 hari	MI	Nominal
Obat nyamuk cair 3 ml	Obat nyamuk yang di uapkan dengan nebulizer setiap hari yang diatur dengan <i>timer</i> setiap selang 1 menit selama 20 hari	MI	Nominal

Obat nyamuk cair 4 ml	Obat nyamuk yang diuapkan dengan nebulizer setiap hari yang diatur dengan <i>timer</i> setiap selang 1 menit selama 20 hari	MI	Nominal
Jumlah Sel Leydig	Menghitung sel Leydig pada 5 lapang pandang, pada masing-masing lapang pandang dicari 10 kompartemen intersisial yang terletak diantara 3 tubulus yang hampir bulat dan hampir sama ukurannya, dengan perbesaran 1000X dan minyak emersi		Numerik

---

#### 4.7 Cara pengumpulan data

##### 4.7.1 Bahan

- 1) Testis tikus tikus Sprague Dawley
- 2)  $\beta$  estradiol 3- benzoate
- 3) Obat bakar bentuk lingkaran
- 4) Obat nyamuk cair (mengandung transfluthrin 0.162 g/L dan Propoxur 4.05 g/L)
- 5) Makanan tikus
- 6) Larutan Buffer formaldehide 10 %

- 7) Ethanol 70%
- 8) Blok paraffin
- 9) Aquadest
- 10) Larutan albumin
- 11) Haematoxyllin dan Eosin
- 12) Minyak emersi

#### **4.7.2 Alat**

- 1) Kandang tikus yang didesain khusus
- 2) Pinset
- 3) Alat tulis
- 4) Nebulizer
- 5) Scalpel
- 6) Wadah berukuran sedang
- 7) Gunting
- 8) Beaker glass
- 9) Autoclave
- 10) Mikrotom
- 11) Objek glass
- 12) Mikroskop Olympus CX.21

#### **4.7.3 Jenis data**

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang di peroleh dari penghitungan pada 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, Msi.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 penghitungan 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 Sprague 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 *simple random sampling*. Selama perlakuan, tikus mendapat *breast-feeding* dari induk tikus sampai hari ke 22 postnatal.

Intervensi pada setiap kelompok perlakuan :

a. Grup I

Grup kontrol. Tikus pada grup kontrol mendapatkan *breast-feeding* sampai hari ke 22 kemudian diikuti dengan pemberian makanan dan air *ad libitum* sampai usia 100 hari.

b. Grup II

Grup perlakuan I. Perlakuan diberikan mulai hari ketiga postnatal, semua tikus pada grup ini mendapat suntikan dosis tunggal subkutis 25  $\mu\text{g}$   $\beta$  estradiol 3-benzoat yang dilarutkan dalam 0.02 ml minyak wijen dengan BD *non-traumatic needle* 2 hari sekali selama 20 hari dan dijaga dalam kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai usia 100 hari.

c. Grup III

Grup perlakuan II. Semua tikus dipapar obat nyamuk bakar bentuk lingkaran (mengandung transfluthrin 0.03%) 8 jam sehari selama 20 hari dan dijaga dalam kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai usia 100 hari.

d. Grup IV

Grup perlakuan III. Semua tikus dipaparkan pada 3 ml obat nyamuk cair yang diuapkan dengan nebulizer setiap selang waktu 1 menit setiap hari selama 20 hari (mengandung transfultrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg) dan dijaga dalam kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai usia 100 hari.

e. Grup V

Grup perlakuan IV. Semua tikus dipaparkan pada 4 ml obat nyamuk cair yang diuapkan dengan nebulizer setiap selang waktu 1 menit setiap hari selama 20 hari (mengandung transfluthrin 0.648 mg

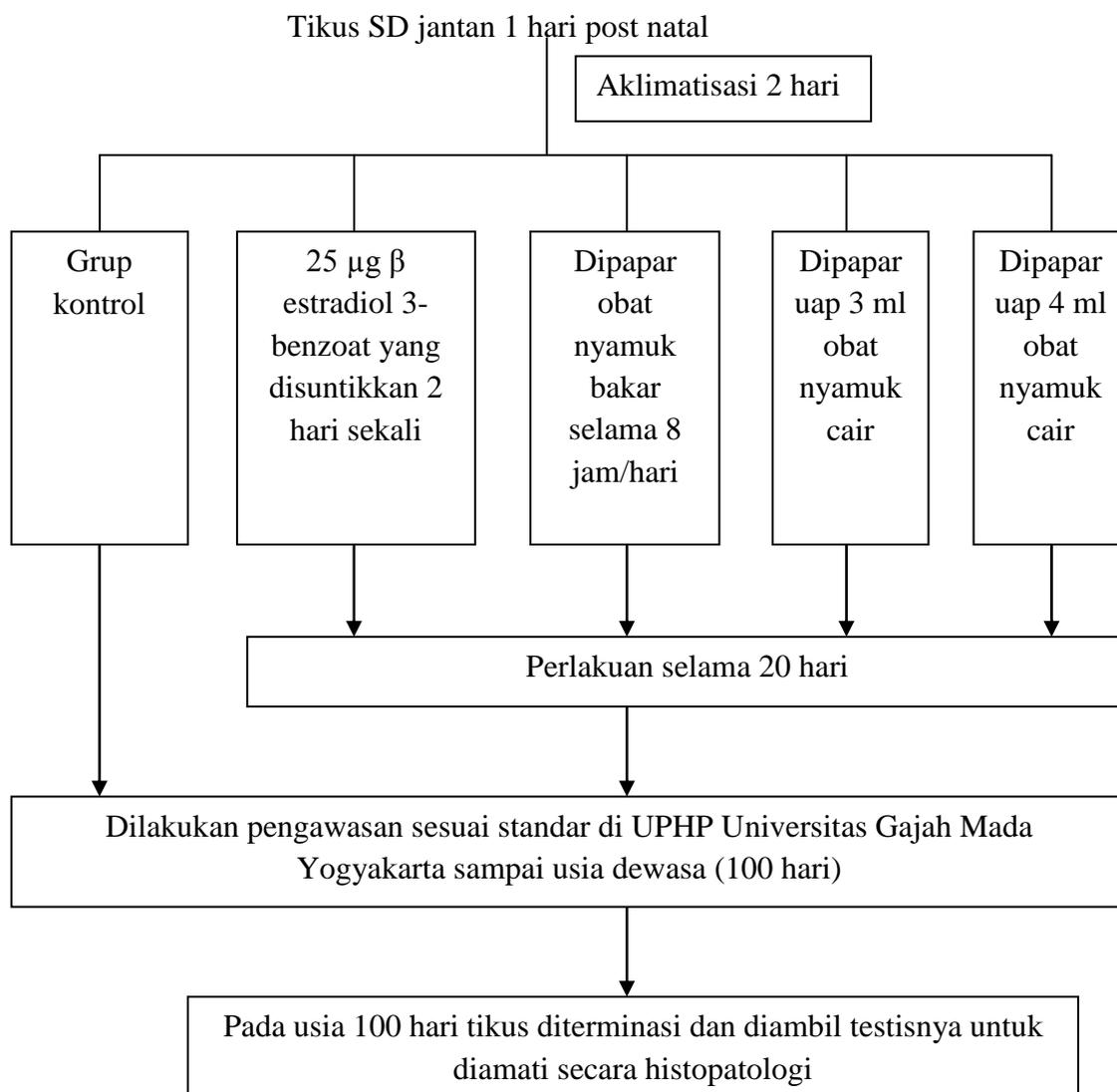
dan propoxur 16.20 mg) dan dijaga dalam kondisi standar di UPHP Yogyakarta sampai usia 100 hari.

Setelah diberikan semua perlakuan, pada umur 100 hari semua tikus dianastesi dengan ether kemudian diterminasi dengan *cervical dislocation*. Testis tikus diambil dan dipotong kemudian di rendam dalam formalin 10%. Testis dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan proses pembuatan blok paraffin. Blok paraffin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan Haematoxylin Eosin (HE). Cara kerja pembuatan preparat histopatologi terlampir.

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *Olympus CX21* dengan perbesaran 1000X dan ditambahkan minyak emersi. Jumlah sel Leydig dihitung pada 5 lapang pandang, masing-masing lapang pandang dicari 10 kompartemen intersisial yang terletak diantara 3 tubulus yang hampir bulat dan hampir sama ukurannya.

## 4.7 Alur penelitian

**Tabel 4.** Alur penelitian



## 4.8 Metode pengukuran

### 4.9.1 Pengukuran jumlah sel Leydig

Penilaian jumlah sel Leydig pada sediaan testis tikus Sprague Dawley, dengan menghitung sel Leydig pada 5 lapang pandang, masing-masing lapang pandang dicari 10 kompartemen intersisial yang terletak diantara 3 tubulus yang

hampir bulat dan hampir sama ukurannya. Akan diamati menggunakan perbesaran objektif 100X dan ditambahkan minyak emersi.

#### **4.9 Analisis data**

Data yang didapatkan diolah dengan komputer. Sebelum penelitian dimulai Peneliti (Pengamat A) melakukan penghitungan sel Leydig bersama dengan dr. Ika Pawitra Miranti Sp.PA (Pengamat B) sebagai acuan dalam penelitian. Hasil penghitungan pengamat A dan Pengamat B kemudian dilakukan uji reabilitas dengan menggunakan metode *Intraclass Correlation Coefficient* dan apabila didapatkan hasil  $> 0,80$  dapat dikatakan pengamat A setara dengan pengamat B.

Jumlah sel Leydig yang didapatkan, dilakukan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA*. Dilakukan Uji normalitas distribusi menggunakan Shapiro Wilk, kemudian dilakukan uji *Homogeneity of Variances* dengan *Lavene test* untuk mengetahui homogenitas data. Setelah uji ANOVA bermakna dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan. 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.21.

#### **4.10 Etika penelitian**

Ijin Penelitian didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi Semarang.

