

BAB IV

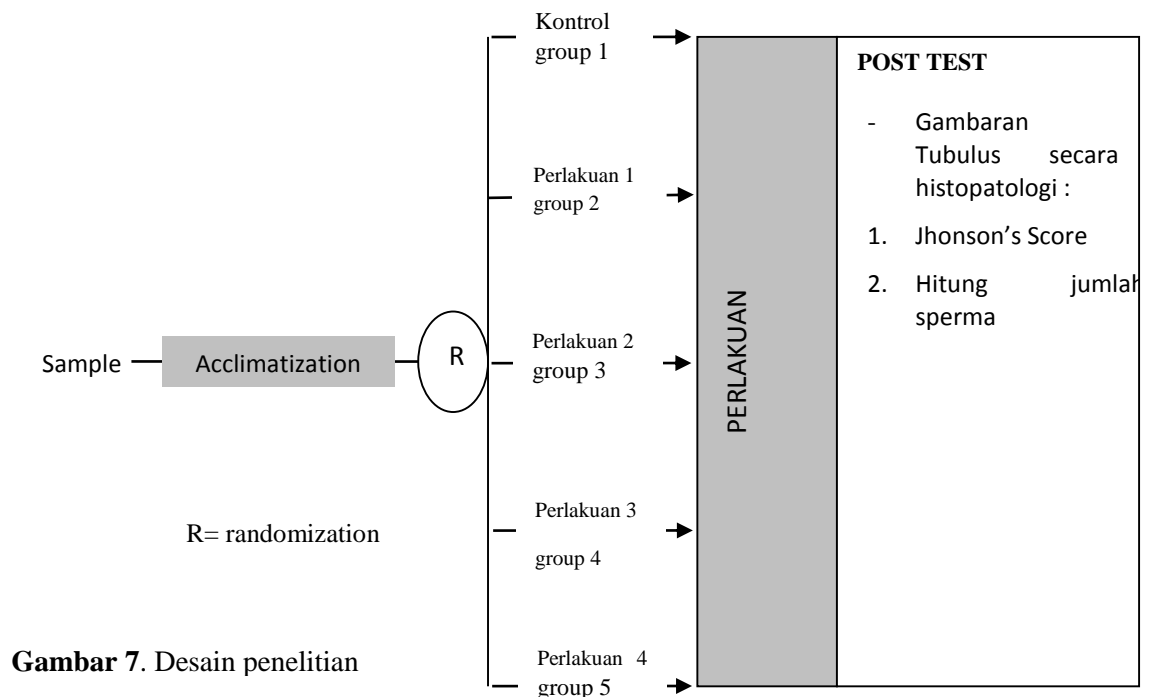
METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup penelitian ini mencakup bidang anatomi dan patologi anatomi.

4.2. Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan true experimental dengan desain post test only control group.



Gambar 7. Desain penelitian

Kontrol (grup 1) = Negatif kontrol

Perlakuan 1 (grup 2) = Injeksi 25 µg β estradiol 3-benzoat dilarutkan dalam 0.02 ml minyak wijen secara subcutan dosis tunggal diberikan 2 hari sekali selama 20 hari.

Perlakuan 2 (grup 3) = Dipaparkan insektisidan bakar tiap 8 jam perhari selama 20 hari.

Perlakuan 3 (grup 4) = Dipaparkan 3 ml insektisida liquid yang disemprotkan dalam kandang dengan nebulizer sekali sehari selama 20 hari.

Perlakuan 4 (grup 5) = Dipaparkan 4 ml insektisida liquid yang disemprotkan dalam kandang dengan nebulizer sekali sehari selama 20 hari.

4.3. Populasi dan Sampel

4.3.1. Populasi

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

4.3.2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel blok paraffin testis tikus *Sprague dawley* yang merupakan penelitian sebelumnya oleh DR.dr. Tri Indah Winarni, PAK, M.sc. Med. Dengan judul *Alteration of Rats Reproductive Organ in Adulthood Caused by the Exposure of Foreign Esterogenic Compounds (mosquito insecticide during early life)*. Hewan coba dipelihara di Unit Pemeliharaan Hewan coba (UPHP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

4.3.2.1.Kriteria Inklusi

- a. Tikus jantan
- b. Umur 3 hari post natal
- c. Berat 6-8 gram

4.3.2.2.Kriteria Eksklusi

- a. Tikus dengan kelainan anatomi
- b. Tikus mati sebelum umur 3 hari post natal

4.3.2.3. Metode pengumpulan sampel

Semua tikus dibagi dalam 6 kelompok dengan *simple random sampling* dengan metode *consecutive random sampling*.

4.3.2.4. Besar sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus

besar sampel dari Freeder : $t(n-1) > 15$

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah tikus pada setiap kelompok

ada 4 grup perlakuan dan 1 grup control, jadi $t = 5$

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

perlakuan

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel independent

- a. β estradiol 3- benzoate 25 μ g dalam 0.02 ml
- b. Insektisida bakar bentuk lingkaran
- c. Insektisida cair dalam bentuk aerosol.

4.4.2. Variabel dependen

- a. Spermatogenesis yang dilihat secara gambaran histopatologis

4.4.3. Variabel control

- a. Umur tikus : 3 hari postnatal
- b. Tikus jantan
- c. Berat 6-8 gram

4.5. Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
β estradiol 3-benzoate	Poten estrogen	μg	25
Insektisida bakar	Obat nyamuk bakar bentuk lingkaran yang mengandung transfultrin 0.03 %	jam	8
Insektisida cair	Obat nyamuk bentuk cair yang mengandung transfultrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg dibuat dalam bentuk aerosol menggunakan nebulizer yang telah diatur dengan timer sehingga dosis 3 ml akan habis dalam 1 hari.	ml	3
Insektisida cair 2	Obat nyamuk bentuk cair yang mengandung transfultrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg dibuat dalam bentuk aerosol menggunakan nebulizer yang telah diatur dengan timer sehingga dosis 4 ml akan habis dalam 1 hari.	ml	4
Spermatogenesis tikus secara Histopatologis	Spermatogenesis proses pembentukan sel sperma yang dimulai dari proliferasi sel germinal sampai menjadi spermatozoa dalam tubulus seminiferous testis yang dinilai secara semikuantitatif dengan johnson score yang selanjutnya dibagi menjadi kategori <i>obstructive cases</i> , <i>late maturity arrest</i> , <i>early maturity arrest</i> , dan <i>absence of germ cell</i>		

Tabel 2. Definisi operasional

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

- Kandang tikus yang didesain khusus untuk memberikan perlakuan pemberian insektisida
- Nebulizer
- Pinset
- Gunting
- Scalpel
- Beaker glass
- Autoclave
- Microtome
- Object glass
- Mikroskop

4.6.2. Bahan

- Testis tikus Sprague Dawley yang didapat setelah tikus dibunuh dengan
- β estradiol 3- benzoate
- Insektisida bakar bentuk lingkak
- Insektisida cair (mengandung transfultrin 0.162 g/L dan Propoxur 4.05 g/L)
- Makanan tikus
- Larutan Buffer Formaldhide 10%
- Ethanol 96%, 80%, 70%, 60,%, 50%, 40%, 30%
- Larutan Xylol
- Blok paraffin
- Aquadest
- Larutan albumin
- Haematoxyllin dan Eosin
- Larutan Van Gieson A dan B

- Asem asetat 1%
- Larutan masson goldner II dan III

4.7. Cara Pengumpulan Data

4.7.1. Persiapan yang dilakukan pada tikus

50 ekor tikus Sprague Dawley jantan postnatal berumur 1 hari di akimatisasi dalam kondisi standard di UPHP selama 2 hari dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan dengan simple random sampling. Selama perlakuan, tikus mendapat *breasts-feeding* dari induk tikus sampai hari ke 22 postnatal. Selama waktu penyapihan ini tikus di ikuti perkembangannya di bawah kondisi standard. Selama kondisi standard semua tikus mendapat makanan dan air *ad libitum*.

4.7.2. Intervensi pada tiap kelompok perlakuan

Penelitian ini menggunakan sampel blok paraffin testis tikus *Sprague dawley* yang merupakan penelitian sebelumnya oleh DR.dr. Tri Indah Winarni, PAK, M.sc. Med. Dengan judul *Alteration of Rats Reproductive Organ in Adulthood Caused by the Exposure of Foreign Esterogenic Compounds (mosquito insecticide during early life)*.

Paparan insektisida bakar dan cair dilakukan selama 20 hari, dimana lama paparan ini setara dengan 2 tahun paparan pada manusia atau sejak bayi sampai anak bisa berjalan. Dosis insektisida cair didapatkan dari konversi dosis yang biasa dipaparkan pada manusia dalam 1 hari.

4.7.2.1. Grup I: Grup control. Tikus pada grup control ini mendapatkan *breast-feeding* sampai hari ke 22 lalu diikuti dengan pemberian makanan dan air *ad libitum* sampai umur ke 100

4.7.2.2. Grup II: Perlakuan Grup I. Pada hari ke 3 postnatal, semua tikus di grup ini mendapat suntikan dosis tunggal secara subcutan 25 µg β estradiol 3-benzoat yang dilarutkan dalam 0.02 ml minyak wijen dengan BD *non-traumatic needle* pada hari ke 20 dan dijaga kondisinya dalam kondisi standard di UPHP Yogyakarta sampai hari ke 100.

4.7.2.3. Grup III: Grup perlakuan II. Semua tikus dalam grup ini dipapar insektisida bakar bentuk lingkaran (mengandung transfultrin 0.03%) selama 8 jam sehari selama 20 hari dan dijaga kondisinya dalam kondisi standard di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

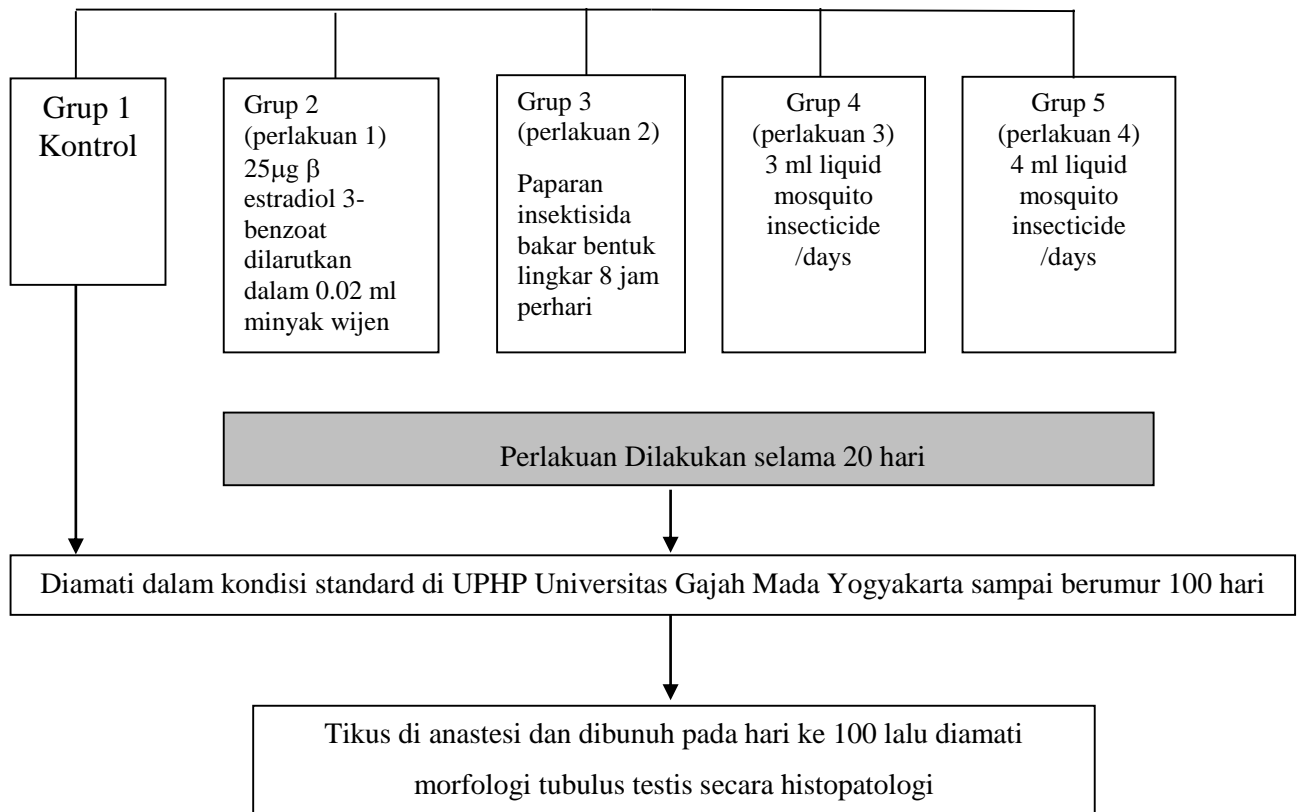
4.7.2.4. Grup IV: Grup perlakuan III. Semua tikus dalam grup ini dipaparkan 3 ml insektisida cair dalam bentuk aerosol (mengandung transfultrin 0.486 mg dan propoxur 12.15 mg) yang disemprotkan ke dalam kandang dengan nebulizer yang diatur menggunakan timer sehingga dosis habis dalam 1 hari dan dipaparkan 1 kali sehari selama 20 hari serta dijaga kondisinya dalam kondisi standard di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

4.7.2.5. Grup V: Grup perlakuan IV. Semua tikus dalam grup ini dipaparkan 4 ml insektisida cair dalam bentuk aerosol (mengandung transfultrin 0.648 mg dan propoxur 16.20 mg) yang disemprotkan ke dalam kandang dengan nebulizer yang diatur menggunakan timer sehingga dosis habis dalam 1 hari dan dipaparkan 1 kali sehari selama 20 hari serta dijaga kondisinya dalam kondisi standard di UPHP Yogyakarta sampai umur 100 hari.

Setelah diberikan perlakuan ini, pada umur 100 hari semua tikus dianastesi dengan ether dan dibunuh dengan *cervical dislocation*. Lalu testis tikus diambil dan dipotong dalam blok paraffin, setelah itu diamati dalam preparat histopatologi dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 1000X.

4.8. Alur penelitian

Gambar 8. Alur Penelitian



4.9. Metode Penelitian

4.9.1. Penentuan kerusakan sel reproduksi

Untuk menilai kerusakan sel reproduksi (tubulus seminiferous, dan sel spermatogenesis) menggunakan kriteria Johnson 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 atas spermatogonia.
- Nilai 2 : Dalam tubulus seminiferous tidak terdapat sel reproduksi, hanya sel Sertoli.
- Nilai 1 : Dalam tubulus seminiferous tidak ada sel sama sekali.

Selanjutnya score ini akan di kategorikan menjadi 4 kategori. Dimana score 10,9,8 termasuk dalam kategori *Obstructive cases* (kategori 1); score 7,6 termasuk dalam kategori *late maturity arrest* (kategori 2); score 5,4,3 masuk dalam kategori *early maturity arrest* (kategori 3); dan score 2,1 termasuk dalam kategori *absence of germ cell* (kategori 4).²²

4.10. Analisis data

Data yang didapatkan akan dituliskan dalam bentuk data numeric berupa jumlah tubulus yang masuk dalam kategori *obstructive cases*, *late maturity arrest*, *early maturity arrest*, dan *absence of germ cell* dan dibandingkan frekuensi distribusi, dan perbandingan jumlah kategori tiap perlakuan. Sebelum dilakukan uji statistik untuk analisis data, data yang dikumpulkan dilakukan uji reliability analysis dengan menggunakan *inter coefficient class test* untuk mengkonfirmasi gambaran histopatologi yang dilihat oleh 2 pengamat.

Jumlah tubulus perkategori pada tiap perlakuan, akan diuji untuk melihat normalitas distribusi dengan menggunakan uji Shapiro Wilk dan variansi homogenitas dengan uji Levene statistic. Bila sebaran distribusi normal akan dilanjutkan dengan uji *One way Anova* untuk melihat perbedaan kemaknaan secara keseluruhan dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc untuk melihat perbedaan pada tiap grup perlakuan. Apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, akan dilakukan transformasi data 1 kali dengan menggunakan Ln (log natural) dan prosedur uji statistic diulangi dari awal. Jika hasil masih berdistribusi tidak normal dan tidak homogen akan dilakukan

uji Kruskal-Wallis untuk membandingkan jumlah tubulus untuk tiap kategori pada seluruh grup perlakuan. Uji lanjutan untuk perbandingan antar kelompok dilakukan dengan uji Mann-Whitney. Uji χ^2 digunakan untuk menentukan perbedaan frekuensi distribusi jumlah kategori tubulus antar grup. 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.

4.11. Etika penelitian

Ijin Penelitian dilakukan dengan meminta ethical clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi Semarang dan kepada UPHP (Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta setelah proposal ini disetujui.

4.12. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Waktu (bulan)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Penyusunan proposal penelitian	■	■						
Seminar proposal penelitian		■						
Revisi proposal penelitian			■					
Pelaksanaan penelitian				■	■	■	■	
Pengumpulan dan pengolahan data						■	■	■
Penyusunan laporan							■	■
Seminar hasil penelitian								■

Tabel 3 Jadwal penelitian