BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini meliputi bidang Ilmu Gizi, Farmakologi, Histologi dan Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang sebagai tempat pemeliharaan hewan coba. SPBU Tugu Suharto Sampangan - Semarang sebagai tempat perlakuan terhadap hewan. Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi sebagai tempat pembuatan preparat dan pemeriksaan mikroskopis testis hewan coba. Bagian Histologi sebagai tempat analisis data penelitian. Laboratorium Gangguan Akibat Kekuarangan Iodium (GAKI) Fakutas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, sebagai tempat pemeriksaan timbal darah hewan coba. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2015.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *true eksperimental* dengan desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design.* Perlakuan pada penelitian ini adalah dengan memberikan susu kambing pada tikus wistar usia 2 - 3 bulan dengan

berat badan 100 – 200 gram yang terpapar asap kendaran bermotor. Output yang dinilai adalah gambaran mikroskopis testis dan kadar Pb dalam darah tikus wistar tersebut.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi Target

Populasi target penelitian ini adalah tikus wistar.

4.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi penelitian adalah tikus wistar umur 2 - 3 bulan dengan berat badan 100-200 gram yang diperoleh dari peternakan hewan coba *Rattus Breading Center* (RBC), Malang.

4.4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus wistar umur 2 - 3 bulan dengan berat badan 100-200 gram yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut :

4.4.3.1 Kriteria Inklusi

1) Tikus wistar
2) Usia 2-3 bulan
3) Jantan
4) Berat badan 100 - 200 gram
5) Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

4.4.3.2 Kriteria Eksklusi

1) Mati selama proses aklimatisasi

4.4.4 Cara Sampling

Sampel penelitian diambil dengan cara acak dengan metode randomisasi sederhana *(simple random sampling)* dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.4.5 Besar Sampling

Penentuan besar sampel penelitian menggunakan ketentuan WHO dengan jumlah minimal sampel 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus wistar yang dibagi dalam dua kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol dengan jumlah sample 5 ekor tiap kelompok.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas panelitian ini adalah susu kambing.

4.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah gambaran mikroskopis testis dan kadar Pb darah tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 6. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Opersional	Skala	Satuan
A.	**Variabel**			
1.	**bebas** Susu Kambing	Susu kambing bubuk dengan dosis 473,2 mg/kgBB [68] yang dilarutkan dalam 1 ml air kemudian diberikan pada kelompok tikus wistar perlakuan 2 (P2) dengan bantuan sonde satu kali dalam sehari selama 30 hari.	Nominal	miligram (mg)

Tabel 6. Definisi operasional (lanjutan)

No	Variabel	Definisi Opersional	Skala	Satuan
B.	**Variabel Terikat**			
1	Gambaran mikroskopis testis tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor.	Gambaran mikroskopis testis tikus wistar di bawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan dengan *Hematoxyllin dan Eosin* dan dilihat kelainan yang terjadi pada tubulus seminiferous yang terdapat pada preparat tersebut di 5 lapangan pandang yang berbeda yang kemudian dinilai dengan kriteria *score Johnsen* yang telah dimodifikasi.	Ordinal	Kategori I, Kategori II, Kategori III, Kategori IV
B.	**Variabel Terikat**			
2	Kadar timbal (Pb) darah tikus wistar jantan yang terpapar asap kendaraan bermotor.	Kadar timbal darah tikus wistar jantan yang diukur dengan menggunakan *Atomic Absorbtion Spectrofotometer*.	Rasio	Microgra m per desiliter (µg/dl)

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

1) Tikus wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 100 – 200 gram
2) Asap kendaraan bermotor
3) Susu kambing bubuk

4) Makanan dan minuman tikus wistar
5) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan yaitu :
   a. Larutan buffer formalin 10 %
   b. Parafin
   c. Albumin
   d. *Hematoxyllin Eosin*
   e. Larutan Xylol
   f. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
   g. Aquadest

4.7.2 Alat

1) Kandang tikus wistar beserta alat minum dan tempat makan
2) Sonde lambung
3) Alat untuk mengambil organ : minor set
4) Alat untuk membuat preparat histologi : mikrotom, oven, cetakan paraffin, *deck glass, object glass*
5) Alat untuk melihat preparat histologi testis : mikroskop cahaya
6) Alat untuk mengambil darah mencit : gunting, tabung EDTA, pipet
7) Alat untuk mengukur kadar Pb darah
8) Neraca O'Housse
9) Botol-botol

4.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan berupa data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis testis tikus wistar dan kadar Pb darah tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor dari kelompok perlakuan dua (P2) yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan satu (P1) dan kelompok kontrol (K).

4.7.4 Cara Kerja

Penelitian ini mengguanakan 15 tikus wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 100 – 200 gram yang telah diaklimatisasi dan diberi makan dan minum standar yang sama secara *ad libitum* selama 7 hari kemudian dikandangkan perkelompok. Kelompok kontrol (K) adalah kelompok tikus wistar yang tidak diberi perlakuan apa-apa, hanya diberi makanan dan minuman standar. Kelompok perlakuan satu (P1) adalah kelompok tikus wistar yang dipapar asap kendaraan bermotor selama 8 jam/hari serta diberi makanan dan minuman standar selama 30 hari. Kelompok perlakuan dua (P2) adalah kelompok tikus wistar yang diberi susu kambing sebanyak 473,2 mg/kgBB yang dilarutkan ke dalam 1 ml air kemudian dipapar asap kendaraan bermotor selama 8 jam/hari serta diberi makanan dan minuman standar selama 30 hari. Paparan asap kendaraan bermotor dilakukan di SPBU Tugu Sampangan dan pemberian susu kambing dilakukan peroral dengan menggunakan sonde lambung.

Hari ke-31 dilakukan pengambilan *whole blood* tikus wistar dari vena retroorbital, diterminasi dan dilakukan bedah minor untuk mengambil organ testis tikus wistar. *Whole blood* tikus wistar yang telah diambil kemudian diberi EDTA dan

dilakukan pengukuran kadar timbal (Pb) dalam darah mencit dengan menggunakan alat *Atomic Absorbtion Spectrofotometer.* (Skala : Rasio)

Testis tikus wistar yang telah diambil pun diproses secara mikroteknik kemudian dicat menggunakan *Hematoxyllin Eosin.* Masing-masing preparat testis kemudian diamati dan dibaca pada 5 lapangan pandang secara acak dari kiri ke kanan. Pengamatan dan pembacaan preparat ini dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Pengamatan ini dilakukan untuk menilai tingkat kerusakan tubulus seminiferus dari tubulus seminiferus yang diamati di setiap lapangan pandang.

Kriteria yang digunakan untuk menilai tingkat kerusakan tubulus seminiferus adalah kriteria Skor Johnsen yang telah dimodifikasi berdasarkan perhitungan kuantitas dengan penilaian 1 – 10. Adapun yang diamati di tubulus seminiferus adalah epitel tubulus seminiferus, gambaran spermatogenesis tubulus, lumen tubulus, sel spermatogonium, spermatosit primer, sel spermatid, sel spermatozoa dan sel sertoli. Ciri utama sel spermatogonia yaitu berukuran relatif besar, berbentuk bulat, sitoplasma sel pucat, inti sel besar dengan kromatin ireguler, inti yang sangat rapat, warna inti yang sangat gelap dan terletak di dekat membran basal epitel tubulus. Sel spermatosit primer sangat khas karena sel ini merupakan sel yang paling besar dibandingkan dengan sel spermatogenik lainnya, dan memiliki inti yang lebih jarang/sedikit jika dibandingkan dengan sel spermatogonia. Sel spermatid pada tubulus seminiferus berada disekitar lumen yaitu pada lapisan setelah spermatosit primer, berukuran paling kecil, berbentuk bulat, memiliki sitoplasma yang sedikit dan

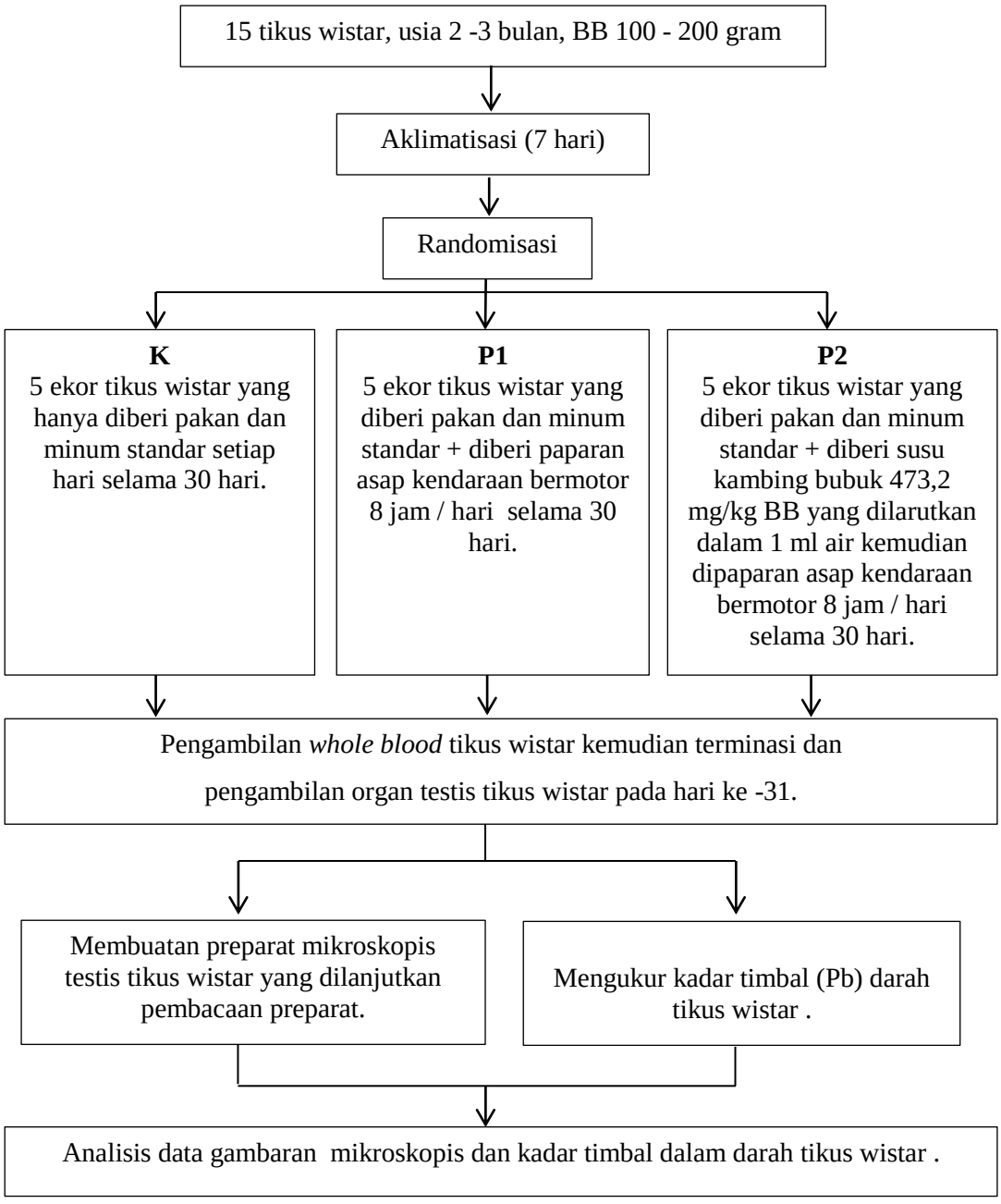
kromatin pada inti selnya padat. Sel sertoli memiliki ciri khas berbentuk piramidal dengan dasar sel melekat pada lamina basalis dan ujung apikalnya menjorok ke lumen tubulus, sel sertoli ini terletak di antara sel sel spermatogenik.

Tabel 7. Skoring kerusakan tubulus seminiferus berdasarkan modifikasi Skor Johnsen dengan perhitungan kuantitas [69]

Nilai	Keterangan
10	Epitel tubulus normal, spermatogenesis lengkap, lumen tubulus terbuka, sel spermatozoa ≥ 10
9	Epitel tubulus rusak, lumen tubulus tertutup, sel spermatozoa ≥ 10
8	Sel spermatozoa < 10
7	Sel spermatozoa 0, Sel spermatid ≥ 10
6	Sel spermatozoa 0, Sel spermatid < 10
5	Sel spermatozoa dan Sel spermatid 0, sel spermatosit ≥ 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

Metode pengamatan dilakukan dengan cara menghitung nilai kerusakan tubulus seminiferus pada lima bidang pandang setiap preparat, yang kemudian dirata – rata dan dinyatakan sebagai nilai kerusakan tubulus seminiferus testis tiap sampelnya. Selanjutnya skor ini akan di kategorikan menjadi 4 kategori. Dimana skor 10,9,8 termasuk dalam kategori *Obstructive cases/normal* (kategori1); skor 7,6 termasuk dalam kategori *late maturity arrest* (kategori 2); skor 5,4,3 masuk dalam kategori *early maturity arrest* (kategori 3)*;* dan skor 2,1 termasuk dalam kategori *absence of germ cell* (kategori 4) [69] (Skala : Ordinal)

4.8 Alur Penelitian



Gambar 11. Alur penelitian

4.9 Pengeolahan dan Analisis Data

Analisa data dengan menggunakan *SPSS for Windows*. Pertama, data kadar Pb dalam darah tikus wistar yang memiliki skala rasio dengan data numerik diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* dengan kriteria normal p<0,05, untuk melihat distribusi normalitas dan homogenitasnya. Jika data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Annova*. Jika data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis.* Apabila didapatkan data yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan uji *Pos Hock.*

Data gambaran mikroskopis testis yang berskala ordinal langsung diuji signifikansinya dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*. Apabila didpatkan data yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney.*

4.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh *etical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Undip/RSUP. Dr. Kariadi Semarang.

4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 8. Jadwal penelitian

No	Kegiatan	Bulan ke-							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Survey awal dan penentuan lokasi penelitian	■	■						
2.	Penyusunan proposal		■	■					
3.	Seminar proposal			■					
4.	Pelaksanaan penelitian				■	■			
5.	Pengolahan data, analisis dan penyusunan laporan						■	■	
6.	Seminar hasil								■