

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Mikroplastik merupakan partikel plastik berukuran kurang dari 5 mm yang saat ini menjadi salah satu pencemar lingkungan utama dan telah terdeteksi secara luas di berbagai kompartemen lingkungan, termasuk perairan laut, air tawar, tanah, dan rantai makanan. Keberadaan mikroplastik menjadi perhatian global karena sifatnya yang persisten dan kemampuannya bertindak sebagai vektor pembawa berbagai bahan kimia berbahaya, seperti ftalat, bisfenol, dan logam berat (Campanale et al., 2020). Ftalat merupakan senyawa aditif yang umum digunakan dalam industri plastik untuk meningkatkan fleksibilitas dan ketahanan material. Seiring degradasi plastik di lingkungan, ftalat dapat terlepas dari matriks plastik dan berpotensi masuk ke dalam tubuh organisme hidup melalui ingestasi, inhalasi, maupun kontak langsung (Wang et al., 2018).

Menurut Hliseníková et al. (2020), ftalat diklasifikasikan sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), yaitu senyawa yang mampu mengganggu sistem endokrin dengan memodifikasi sintesis, sekresi, transport, atau kerja hormon endogen. Paparan ftalat telah dilaporkan dapat mengganggu keseimbangan hormon reproduksi, memengaruhi regulasi sumbu hipotalamus hipofisis gonad (HPG axis), dan menginduksi stres oksidatif dan apoptosis pada jaringan target. Sehingga, hal ini berkesinambungan dengan paparan dari La Merrill et al. (2020) bahwa dampak tersebut menjadikan ftalat sebagai perhatian utama dalam kajian toksikologi reproduksi, karena sistem reproduksi sangat sensitif terhadap perubahan hormonal, baik pada fase perkembangan maupun pada individu dewasa.

Ovarium merupakan organ reproduksi betina yang memiliki peran sentral dalam proses folikulogenesis, ovulasi, produksi hormon steroid seperti estrogen dan progesteron. Struktur ovarium tersusun atas folikel pada berbagai tahap perkembangan yang melibatkan interaksi kompleks antara sel granulosa, sel teka, dan jaringan stroma. Gangguan pada salah satu komponen tersebut dapat menyebabkan peningkatan atresia folikel, penurunan cadangan folikel fungsional, dan gangguan fungsi endokrin ovarium yang berpotensi menurunkan fertilitas. Penelitian oleh Li et al. (2020) menunjukkan bahwa paparan ftalat, khususnya di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dapat memicu kerusakan struktural ovarium dan mengganggu proses folikulogenesis. Hal ini melalui mekanisme gangguan hormonal dan stres oksidatif (Zhang et al., 2024).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan efek ftalat terhadap sistem reproduksi, kajian yang secara khusus mengaitkan paparan ftalat yang berasal dari mikroplastik dengan perubahan makroanatomi dan mikroanatomi ovarium masih terbatas, terutama pada model hewan percobaan. Sebagian besar penelitian masih berfokus pada paparan ftalat dalam bentuk senyawa tunggal tanpa mempertimbangkan peran mikroplastik sebagai media pembawa dan sumber paparan kronis. Oleh karena itu, penelitian mengenai pengaruh toksisitas ftalat terhadap ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) menjadi penting untuk mengisi celah pengetahuan tersebut dan memberikan

dasar ilmiah mengenai risiko mikroplastik terhadap kesehatan reproduksi.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh paparan ftalat terhadap perubahan makroanatomi dan mikroanatomi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh toksisitas ftalat terhadap aspek makroanatomi dan mikroanatomi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah sebagai sumber informasi dan wawasan baru mengenai dampak toksisitas tersebut, sekaligus menjadi sarana melatih kemampuan riset dan referensi bagi penelitian-penelitian selanjutnya.

1.4 Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, dapat dibuat dua hipotesis untuk penelitian tentang bagaimana toksisitas ftalat mempengaruhi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pertama, diduga bahwa pajanan ftalat dapat mengubah mikroanatomi dan struktur anatomi ovarium tikus putih. Perubahan ini dapat termasuk peradangan, degenerasi sel, atau disfungsi kelenjar yang disebabkan oleh paparan zat toksik. Kedua, diduga bahwa tingkat keparahan perubahan patologis dipengaruhi oleh dosis ftalat yang digunakan, dengan pola respons yang tidak selalu bersifat linier, mengingat ftalat merupakan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) yang dapat menunjukkan respons non-monotonik.

1.5 Keaslian Penelitian

Sejauh penelusuran pustaka penulis, publikasi penelitian mengenai “pengaruh toksisitas ftalat terhadap makroanatomi dan mikroanatomi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*)”. Belum pernah dilakukan sebelumnya, penelitian yang pernah dilakukan berkaitan dengan penelitian ini adalah penelitian oleh Zhou et al. (2017), dengan judul “*Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice*”. Namun, pada penelitian ini dibahas mengenai efek paparan prenatal terhadap campuran ftalat pada hasil reproduksi dan perkembangan pubertas pada tikus betina (F1) pada hewan lab. Sedangkan pada penelitian kali ini akan melihat efek potensi ftalat terhadap struktur makroanatomi dan mikroanatomi dari ovarium.

1.6 Kajian Pustaka

1.6.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan yang paling umum digunakan dalam penelitian laboratorium dan biomedis, baik sebagai hewan model penelitian maupun dalam industri pemeliharaan hewan kecil. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini banyak digunakan karena kemudahan pemeliharaan, kemampuan adaptasi yang baik terhadap lingkungan laboratorium, dan kemiripan respons fisiologis dan perilaku dengan mamalia lain. Selain itu, tikus putih (*Rattus norvegicus*) sering

digunakan dalam berbagai kondisi penelitian, termasuk penelitian kesehatan, toksikologi, dan kesejahteraan hewan, sehingga pemahaman terhadap kondisi fisiologis dan kesejahteraan tikus sangat penting untuk menghasilkan data penelitian yang valid dan dapat direproduksi (Cohen & Ho, 2023).

Menurut Cohen & Ho (2023), tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki berbagai indikator fisiologis, perilaku, dan kondisi fisik yang dapat digunakan untuk penelitian. Indikator fisiologis meliputi perubahan denyut jantung, frekuensi respirasi, suhu tubuh, dan kadar hormon stres seperti kortikosteron. Indikator fisik meliputi perubahan berat badan, kondisi bulu, postur tubuh, dan adanya lesi atau perubahan integumen, sedangkan indikator perilaku mencakup aktivitas eksplorasi, perilaku sosial, grooming, dan ekspresi nyeri seperti *grimace scale*. Penilaian indikator-indikator tersebut penting dalam penelitian eksperimental karena perubahan fisiologis atau struktural organ, termasuk organ reproduksi, dapat berkaitan erat dengan stres, gangguan kesejahteraan, dan paparan faktor lingkungan maupun zat toksik

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Wati et al., 2024).

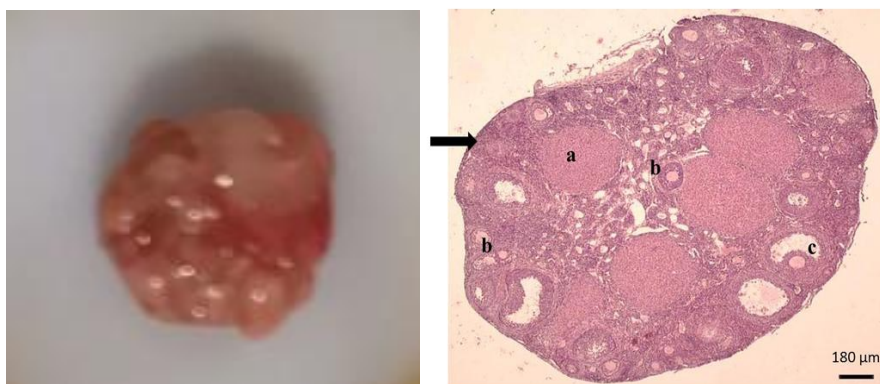
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diklasifikasikan sebagai mamalia kecil karena beratnya kurang dari 5 kilogram. Hewan ini sangat bergerak dan memiliki metabolisme yang cepat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki keuntungan dari predator dengan lebih baik karena ukurannya yang kecil. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki berat rata-rata sekitar 400 gram dan dapat berkisar antara 140 dan 500 gram. Jantan tikus biasanya lebih besar daripada betinanya. Moncong yang tumpul, mata dan telinga yang relatif kecil, dan kotoran berbentuk kapsul dengan ukuran sekitar 2 cm adalah ciri morfologis tikus ini. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) bertahan hidup lima hingga dua belas bulan, dan terkadang hingga tiga tahun. Hewan ini mencapai kematangan seksual antara usia dua dan dua tahun.

1.6.2 Hipotalamus Pituitari Gonad (HPG) Axis

Berdasarkan pemaparan oleh Hliseníková et al. (2020), di nukleus arkuata dan daerah periventrikular, neuron hipotalamus menghasilkan neurohormon seperti leptin dan

kisspeptin, dan sinyal saraf lainnya. Mereka mengontrol sintesis *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). GnRH dilepaskan dari area preoptik hipotalamus dan merangsang reseptor GnRH kelenjar pituitari anterior (GnRHRs). Reseptor-reseptor ini mendorong sekresi gonadotropin kelenjar pituitari anterior hormon luteinizing (LH) dan hormon perangsang folikel (FSH) melalui jalur signaling siklik adenosin monofosfat (cAMP) dan mitogen-activated protein kinase (MAPK). FSH merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium di ovarium dan produksi sperma di testis. Sekresi steroid seks dan hormon protein diinduksi oleh FSH dan LH juga. Hormon anti-Müllerian bertanggung jawab atas penghentian perkembangan saluran Müllerian pada pria dan penghentian perkembangan beberapa folikel ovarium.

1.6.3 Ovarium



Gambar 2. Makroanatomi dan mikroskop anatomi ovarium (Liu et al., 2025; Ramadhani et al., 2017).

Ovarium memainkan peran penting dalam produksi gamet betina dan pelepasan hormon seks (Li et al., 2020). Berbagai jenis folikel, oosit, korpus luteum, dan jaringan interstisial membentuk ovarium, yang merupakan organ yang heterogen. Jika seseorang terpapar bahan kimia yang mengganggu perkembangan dan fungsi indung telur, itu dapat menyebabkan kelainan reproduksi yang serius. Secara khusus, bahan kimia yang menargetkan pembentukan kolam folikel primordial menyebabkan infertilitas karena mereka menghabiskan sedikit cadangan folikel yang digunakan untuk membuat folikel ovulasi. Bahan kimia ini dapat menyebabkan infertilitas sementara atau permanen. Ketika racun tidak dihilangkan dan terus-menerus menargetkan pertumbuhan dan fungsi folikel ovarium, ini dapat menyebabkan infertilitas permanen. Bahan kimia yang menargetkan folikel antral juga dapat mengganggu produksi hormon seks steroid, yang dapat menyebabkan infertilitas dan masalah reproduksi lainnya (Rattan et al., 2018)

1.6.4 Struktur, Sumber, dan Toksisitas Ftalat

Ftalat merupakan kelompok senyawa kimia sintetis yang banyak digunakan sebagai *plasticizer* untuk meningkatkan fleksibilitas, elastisitas, dan daya tahan berbagai produk plastik dan barang konsumsi. Secara struktur kimia, ftalat merupakan ester dari asam ftalat yang tersusun atas cincin aromatik benzena dengan dua gugus ester, sehingga bersifat lipofilik dan mudah terlepas dari matriks plastik ke lingkungan. Menurut

Hlisníková et al. (2020), berdasarkan berat molekulnya, ftalat diklasifikasikan menjadi ftalat berat molekul rendah (*low molecular weight phthalates*, LMWP) dan berat molekul tinggi. Kelompok LMWP meliputi dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP), di-*n*-butil ftalat (DnBP), di-iso-butil ftalat (DiBP), dan benzilbutil ftalat (BBzP), yang banyak digunakan dalam produk berbahan polivinil klorida (PVC), kosmetik, serta produk rumah tangga lainnya.

Penggunaan ftalat yang luas menyebabkan senyawa ini mudah ditemukan sebagai pencemar lingkungan. Hlisníková et al. (2020) melaporkan bahwa ftalat tidak terikat secara kovalen pada matriks plastik, sehingga dapat terlepas dan mencemari udara, tanah, air, serta rantai makanan. Paparan ftalat pada manusia dan hewan dapat terjadi melalui berbagai jalur, termasuk inhalasi, ingestasi, kontak dermal, serta transmisi transplasenta. Bahkan, keberadaan ftalat telah terdeteksi dalam air minum dengan konsentrasi yang bervariasi, menunjukkan potensi paparan kronis yang luas pada organisme hidup.

Dalam tubuh, ftalat mengalami proses biotransformasi melalui dua fase utama, yaitu hidrolisis dan konjugasi. Hlisníková et al. (2020) menjelaskan bahwa dialkil ftalat dihidrolisis oleh enzim lipase dan esterase menjadi monoester yang lebih bioaktif, seperti mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) dari di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Metabolit monoester ini memiliki waktu paruh relatif singkat, namun berperan penting dalam menimbulkan efek toksik ftalat. Selanjutnya, metabolit tersebut dapat mengalami konjugasi untuk mempermudah ekskresi, meskipun paparan kronis tetap memungkinkan terjadinya efek biologis kumulatif.

Ftalat diklasifikasikan sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) karena kemampuannya mengganggu keseimbangan hormon melalui berbagai mekanisme. Menurut Alam et al. (2025), paparan ftalat dapat memengaruhi sistem umpan balik hipotalamus hipofisis gonad (HHG) yang berperan sebagai pengatur utama fungsi reproduksi. Pada tingkat kelenjar hipofisis, ftalat diketahui dapat mengganggu sekresi hormon luteinizing hormone (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH), sehingga berdampak pada regulasi hormon reproduksi. Selain itu, Charlier (2024) melaporkan bahwa paparan ftalat dapat menurunkan kadar hormon tiroid triiodotironin (T3) dan tiroksin (T4) melalui inhibisi enzim deiodinase yang berperan dalam konversi T4 menjadi T3. Pada kelenjar adrenal, gangguan produksi hormon steroid seperti kortisol dan aldosteron juga dilaporkan terjadi akibat paparan ftalat.

Dampak toksisitas ftalat terhadap sistem reproduksi telah banyak dilaporkan. Pada individu jantan, La Merrill et al. (2020) menunjukkan bahwa ftalat seperti DEHP dapat menghambat pertumbuhan dan fungsi sel Sertoli dan sel Leydig di testis, yang berakibat pada penurunan produksi testosteron dan gangguan spermatogenesis. Mekanisme ini berkaitan dengan penurunan ekspresi gen yang mengatur perkembangan dan pematangan sperma. Sementara itu, pada individu betina, Radke et al. (2019) melaporkan bahwa paparan ftalat dapat menyebabkan gangguan siklus estrus, penurunan kualitas oosit, serta masalah implantasi embrio. Paparan prenatal terhadap ftalat bahkan dapat memicu gangguan perkembangan sistem reproduksi, termasuk feminisasi janin jantan dan perubahan fungsi reproduksi yang bersifat jangka panjang.

Selain efek langsung terhadap sistem endokrin dan reproduksi, ftalat juga dilaporkan memiliki potensi efek epigenetik. Charlier (2024) menyebutkan bahwa

paparan ftalat dapat menyebabkan perubahan metilasi DNA dan modifikasi histon pada gen-gen yang mengatur fungsi kelenjar endokrin dan gonad. Perubahan epigenetik tersebut berpotensi diwariskan ke generasi berikutnya, sehingga meningkatkan risiko gangguan reproduksi lintas generasi.

Efek toksik ftalat tidak selalu menunjukkan hubungan dosis-respons yang linier. Hliseníková et al. (2020) menjelaskan bahwa ftalat sering memperlihatkan pola respons non-monotonik, di mana efek biologis pada dosis rendah dapat sebanding atau bahkan lebih besar dibandingkan dosis tinggi. Hal ini merupakan karakteristik khas bahan kimia pengganggu endokrin dan berkaitan dengan interaksi kompleks antara ftalat, reseptor hormon, serta mekanisme kompensasi biologis. Selain itu, paparan ftalat di lingkungan umumnya terjadi dalam bentuk campuran berbagai senyawa EDC, yang dapat menimbulkan efek sinergis, aditif, atau antagonis terhadap kesehatan organisme.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga Desember 2025. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan dilakukan di Laboratorium Hewan, Rumah Sakit Hewan Pendidikan, Universitas Hasanuddin. Pembuatan mikroanatomi dilakukan di Balai Besar Veteriner Maros. Pengamatan mikroanatomi ovarium dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik (*true experimental*) menggunakan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*, CRD) untuk mengevaluasi pengaruh paparan ftalat terhadap perubahan makroanatomi dan mikroanatomi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*).

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Populasi dan Sampel Penelitian

Peneliti mengalokasikan sampel menggunakan metode *Simple Random Sampling*. Sampel diambil dari populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*), dan jumlah sampel ditentukan diawali dengan perhitungan menggunakan rumus Federer sebagai landasan teoritis awal untuk menentukan kecukupan jumlah sampel dalam penelitian eksperimental.

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

Keterangan:

n: jumlah sampel per kelompok

t: jumlah kelompok/perlakuan

Dengan jumlah kelompok perlakuan sebanyak 5 kelompok, maka :

$$\begin{array}{rcl} (5-1)(n-1) & \geq & 15 \\ 4(n-1) & \geq & 15 \\ 4n-4 & \geq & 15 \\ 4n & \geq & 19 \\ n & \geq & 4,75 \end{array}$$

$$n \times t = 5 \times 5 = 25 \text{ ekor tikus}$$

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa jumlah sampel minimal per kelompok berada pada 5 ekor tikus. Namun, dalam penelitian eksperimental hewan, penentuan jumlah sampel akhir tidak hanya didasarkan pada perhitungan matematis semata, tetapi juga mempertimbangkan prinsip etika penggunaan hewan coba dan sumber daya. Oleh karena itu, penentuan jumlah hewan uji selanjutnya disesuaikan menggunakan metode

Equation Resource (RE). Hal ini sejalan dengan teori Arifin & Zahiruddin (2017), sampel yang terlalu kecil dapat menghilangkan nilai nyata dari percobaan, sedangkan ukuran sampel yang lebih besar dari yang diperlukan dapat menyebabkan pemborosan sumber daya dan masalah etika dengan hewan yang dikorbankan. Sehingga, dalam menentukan berapa banyak hewan yang harus digunakan untuk mempertimbangkan keselamatan hewan tersebut dipakailah metode *Equation Resource* (RE). Rumus ini biasanya digunakan untuk hewan lab atau hewan model.

$$\begin{aligned} \text{RE} &= \text{Jumlah sampel} - \text{Jumlah kelompok} \\ &= 25 - 5 \\ &= 20 \end{aligned}$$

Berdasarkan pertimbangan etika penggunaan hewan coba dan metode *Equation Resource* (RE), jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan 5 kelompok perlakuan, sehingga setiap kelompok terdiri atas 4 ekor tikus. Jumlah tersebut masih memenuhi prinsip kecukupan sampel untuk analisis statistik non-parametrik dan kaidah kesejahteraan hewan.

Berdasarkan perhitungan rumus Federer dan *Equation Resource* (RE) yang dilakukan, total hewan uji yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan total kelompok perlakuan yaitu 5 kelompok. Jadi, setiap kelompok mendapatkan 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dalam 1 kelompok. Pembagian kelompok terdiri kelompok 1 menggunakan minyak jagung, kelompok 2 menggunakan ftalat 125 mg/kg/hari, kelompok 3 menggunakan ftalat 250 mg/kg/hari, kelompok 4 menggunakan 500 mg/kg/ hari, dan kelompok 5 menggunakan 750 mg/kg/hari.

Dosis ftalat dalam penelitian ini dinyatakan dalam satuan mg/kg berat badan/hari yang disesuaikan dengan kisaran dosis rendah hingga tinggi berdasarkan literatur toksikologi reproduksi. Perbedaan satuan digunakan untuk menggambarkan rentang paparan ftalat dari dosis lingkungan hingga dosis toksik eksperimental. Campanale et al. (2020) menemukan bahwa ftalat dalam penelitian ini merujuk pada campuran senyawa ftalat yang secara umum terdapat sebagai aditif pada bahan plastik dan mikroplastik di lingkungan. Campuran tersebut tidak merepresentasikan satu jenis ftalat tunggal, melainkan mencerminkan kondisi paparan lingkungan yang bersifat kompleks dan multikomponen. Hlisníková et al. (2020) mendeskripsikan bahwa ftalat yang paling sering teridentifikasi pada plastik dan mikroplastik meliputi di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), dan benzyl butyl phthalate (BBP), yang diketahui memiliki aktivitas sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs).

2.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: kandang tikus standar, tempat pakan dan minum, timbangan digital (untuk menimbang berat badan dan organ), sonde lambung (untuk pemberian perlakuan oral), seperangkat alat bedah minor set (gunting, pinset, skalpel), peralatan eutanasia, wadah sampel, kaset jaringan, mikrotom, *water bath*, *hot plate*, gelas objek, gelas penutup (*cover glass*), mikroskop cahaya, kamera mikroskop, dan perangkat lunak SPSS untuk analisis data.

2.3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan meliputi: hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*), Ftalat,

tocopherol-stripped corn oil (sebagai pelarut/*vehicle*), pakan standar pelet, air minum (*ad libitum*), larutan Neutral Buffered Formalin (NBF) 10% untuk fiksasi, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) untuk dehidrasi, Xylol untuk clearing, parafin untuk embedding, pewarna *Hematoxylin-Eosin* (H&E), dan bahan-bahan lain untuk pemrosesan jaringan.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Persiapan dan Aklimatisasi

Sebelum perlakuan dimulai, hewan uji (tikus putih) (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi di fasilitas kandang selama minimal 1 minggu (7 hari). Selama periode ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara dalam kondisi lingkungan yang terkontrol (suhu kamar, siklus cahaya/gelap 12 jam) dan mendapatkan akses pakan dan air secara *ad libitum*. Hal ini bertujuan untuk meminimalkan stres dan menyeragamkan kondisi fisiologis hewan sebelum intervensi.

2.4.2 Perlakuan Hewan Coba

Setelah masa aklimatisasi, tikus putih (*Rattus norvegicus*) dikelompokkan secara acak ke dalam 5 kelompok perlakuan. Perlakuan diberikan secara oral (*gavage*) menggunakan *sonde* lambung setiap hari pada waktu yang sama. Paparan ftalat dilarutkan dalam minyak jagung (*corn oil*) sesuai dosis masing-masing kelompok, sedangkan kelompok perlakuan 1 hanya menerima minyak jagung. Perlakuan dilakukan selama durasi waktu yang ditentukan (28 hari sesuai alur penelitian) untuk mengevaluasi toksisitas sub-kronis hingga kronis.

2.4.3 Koleksi Sampel dan Nekropsi

Setelah masa perlakuan berakhir pada hari ke-28, dilakukan terminasi terhadap seluruh hewan coba yang diawali dengan prosedur anestesi menggunakan *ketaxyla* atau eutanasia menggunakan dislokasi servikal sesuai dengan protokol kesejahteraan hewan. Tahapan selanjutnya meliputi pengukuran morfometri tubuh dan pembedahan untuk mengisolasi organ target, yaitu ovarium. Organ-organ yang telah diambil kemudian ditimbang untuk mendapatkan data berat basah, dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologis untuk membersihkan sisa darah, dan segera dimasukkan ke dalam larutan fiksatif *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% guna persiapan analisis mikroskop anatomi.

2.4.4 Pembuatan Preparat Histologi dan Pewarnaan Histologi

Menurut Yalcin et al. (2024), tahap awal preparasi adalah fiksasi jaringan, yang berfungsi mengawetkan jaringan dan mencegah autolisis (degradasi jaringan) dengan cara menghubungkan protein secara silang (*cross-linking*). Formalin (khususnya 10% *neutral buffered formalin*) merupakan fiksatif kimia yang paling umum digunakan pada histologi cahaya karena kemampuannya menciptakan ikatan silang yang stabil untuk mengunci struktur jaringan di tempatnya. Untuk studi ultrastruktur menggunakan mikroskop elektron, diperlukan teknik preparasi yang mampu mempertahankan detail struktur seluler hingga tingkat molekuler.

Menurut Yalcin et al. (2024), setelah fiksasi, jaringan mengalami proses inklusi

dan pemotongan. Pada preparasi mikroskop cahaya, jaringan melalui tahap dehidrasi dan *clearing* sebelum diinfiltrasi dan ditanam (*embedding*) dalam parafin cair untuk memberikan dukungan struktural. Blok parafin yang mengeras kemudian dipotong menggunakan mikrotom menjadi sayatan yang sangat tipis agar dapat dipasang pada kaca objek untuk persiapan pewarnaan.

Menurut Yalcin et al. (2024), tahap akhir adalah pewarnaan histologi, yang bertujuan meningkatkan kontras jaringan karena jaringan biologis pada dasarnya transparan dan tidak berwarna. Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (H&E) merupakan metode dasar yang paling umum digunakan; *Hematoxylin* mewarnai inti sel menjadi biru atau ungu karena ikatannya dengan asam nukleat, sedangkan Eosin mewarnai sitoplasma dan matriks ekstraseluler menjadi merah muda atau merah.

2.5 Pengamatan dan Pengukuran

2.5.1 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dan diukur dalam penelitian ini mencakup aspek makroanatomi dan mikroanatomi. Pengamatan makroanatomi meliputi penimbangan, pengukuran organ ovarium. Sementara itu, pengamatan mikroanatomi difokuskan pada evaluasi mikroanatomi untuk mengidentifikasi perubahan ukuran sel teka dan granulosa. Seluruh analisis mikroanatomi tersebut dilakukan secara deskriptif kualitatif dan pengamatan di bawah mikroskop cahaya.

2.5.2 Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dan dianalisis menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Analisis data dilakukan sesuai dengan jenis dan skala data yang diperoleh dalam penelitian ini. Data kuantitatif yang meliputi berat badan hewan uji, berat basah organ, analisis secara statistik. Analisis diawali dengan uji prasyarat berupa uji normalitas menggunakan metode Shapiro–Wilk dan uji homogenitas menggunakan *Levene's Test*. Apabila data terbukti terdistribusi normal dan homogen, pengujian dilanjutkan menggunakan *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mendeteksi perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji lanjut (*post-hoc*) menggunakan *Tukey HSD* atau *Duncan*. Namun, jika data terbukti tidak terdistribusi normal dan homogen, pengujian dilanjutkan menggunakan statistik non-parametrik yaitu *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney U*.

Sementara itu, data mikroanatomi ovarium dianalisis dengan dua pendekatan, yaitu deskriptif kualitatif dan statistik non-parametrik. Gambaran mikroanatomi ovarium, dianalisis secara deskriptif komparatif dengan mengamati perubahan struktur jaringan ovarium pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan K1. Selain itu, data mikroanatomi ovarium dianalisis menggunakan uji non-parametrik *Kruskal–Wallis* untuk mengetahui perbedaan mikroanatomi ovarium antar kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *Kruskal–Wallis* menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji *Mann–Whitney U* sebagai uji lanjut (*post-hoc*) untuk mengetahui perbedaan antar pasangan kelompok perlakuan. Seluruh hasil analisis statistik dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$ dan disajikan dalam bentuk grafik dan narasi

deskriptif pada bab hasil dan pembahasan.

2.6 Alur Penelitian

