

1396

SKRIPSI

GAMBARAN HISTOLOGIS TESTES MENCIT (*Mus musculus*)  
SETELAH PEMBERIAN KETOKONAZOL

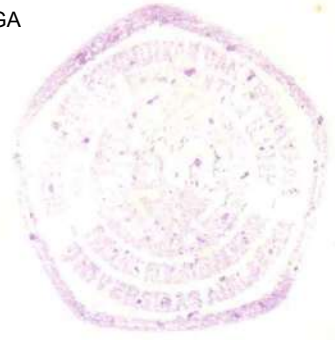


OLEH :

Wahyu Durwaningsih

TRENGGALEK - JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1996



**SKRIPSI**

**GAMBARAN HISTOLOGIS TESTES MENCIT (*Mus musculus*)  
SETELAH PEMBERIAN KETOKONAZOL**



OLEH :

*Wahyu Durwaningsih*

TRENGGALEK - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
1 9 9 6**

GAMBARAN HISTOLOGIS TESTES MENCIT (*Mus musculus*)  
SETELAH PEMBERIAN KETOKONAZOL

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
pada  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

OLEH :

WAHYU PURWANINGSIH

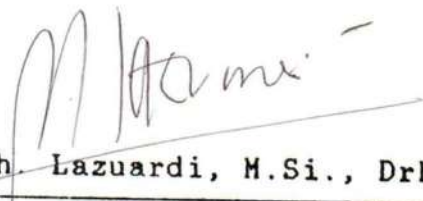
069111769

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing,



Dr. Diah Kusumawati, S.U., Drh.

Pembimbing Pertama



Moch. Lazuardi, M.Si., Drh.

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN

Menyetujui,  
Panitia Penguji



Hana Ellyani, M.Kes., Drh.

Ketua



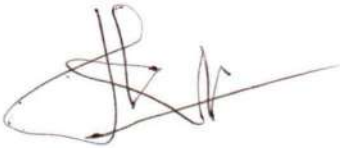
Ajik Azmijah, S.U., Drh.

Anggota



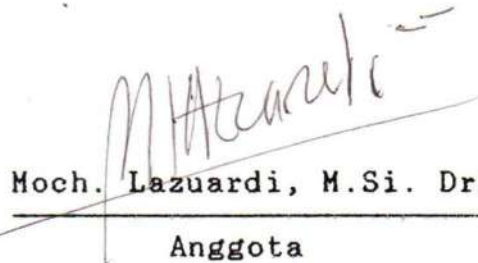
Choirul Anwar, M.S., Drh

Anggota



Dr. Diah Kusumawati, S.U., Drh

Anggota



Moch. Lazuardi, M.Si. Drh.

Anggota

Surabaya, 8 Oktober 1996

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga



Dekan

Prof. Dr. Rochiman Sasmita, M.S., Drh

NIP : 130350739

## GAMBARAN HISTOLOGIS TESTES MENCIT (*Mus musculus*)

### SETELAH PEMBERIAN KETOKONAZOL

Wahyu Purwaningsih

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ketokonazol pada penggunaan jangka waktu lama terhadap proses spermatogenesis dengan melihat perubahan gambaran histologis testes mencit.

Penelitian ini menggunakan 35 ekor mencit jantan jenis Albino Jerman berumur delapan minggu dengan berat badan sekitar 25 gram. Disain percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap yang terbagi menjadi lima kelompok. Setiap kelompok terdiri tujuh ulangan dan mendapat satu perlakuan. Data dianalisis menggunakan sidik ragam, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

Ketokonazol diberikan secara oral sebanyak 26 mg/kg BB setiap hari sesuai perlakuan. Kelompok Po tidak diberi ketokonazol sebagai kelompok kontrol, kelompok P<sub>1</sub> diberi ketokonazol selama lima hari, kelompok P<sub>2</sub> diberi ketokonazol selama 15 hari, kelompok P<sub>3</sub> diberi ketokonazol selama 25 hari dan kelompok P<sub>4</sub> diberi ketokonazol selama 35 hari. Setelah perlakuan, semua mencit dibunuh untuk pengambilan testes dan dibuat sediaan histologi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ketokonazol memberikan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap jumlah sel spermatogonia, sel spermatis primer dan sel spermatozoa. Rataan jumlah tertinggi ditunjukkan oleh kelompok kontrol dan terendah pada kelompok P<sub>4</sub>.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan makalah ini yang berjudul "GAMBARAN HISTOLOGI TESTIS MENCIT (*Mus musculus*) SETELAH PEMBERIAN KETOKONAZOL".

Penulis menyadari bahwa keberhasilan penelitian hingga penulisan makalah ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Dengan rasa hormat, penulis pada kesempatan ini menyampaikan terimakasih yang tak terhingga kepada Ibu Dr. Diah Kusumawati, S.U., Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak Moch. Lazuardi, MSi., Drh. selaku pembimbing kedua yang senantiasa bersedia memberikan bimbingan, saran dan nasehat yang berguna dalam penyusunan makalah ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terimakasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuan moral maupun material serta kesempatan yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi.

Kepada ayah, ibu tercinta dan adikku serta segenap pihak yang telah membantu dalam penelitian hingga penulisan makalah ini, penulis sampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya kepada mereka. Amin.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Meskipun demikian, penulis berharap semoga hasil-hasil yang dituangkan dalam makalah ini bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Juli 1986

Penulis



## DAFTAR ISI

	halaman
DAFTAR TABEL.....	vi <sup>vi</sup>
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I : PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Landasan Teori.....	2
1.4. Hipotesis Penelitian.....	3
1.5. Tujuan Penelitian.....	3
1.6. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Tinjauan Tentang Ketokonazol.....	4
2.1.1. Nama, Turunan dan Rumus Kimia...	4
2.1.2. Mekanisme Kerja dan Farmakokinetik.....	4
2.1.3. Penggunaan Klinik.....	6
2.1.4. Efek Samping.....	6
2.1.5. Dosis.....	6
2.2. Tinjauan tentang Testes.....	7
2.2.1. Anatomi Testes.....	7
2.2.2. Histologi Testes.....	8
2.3. Spermatogenesis.....	9
2.4. Fisiologi Reproduksi Mencit Jantan	11
2.5. Pengendalian Spermatogenesisi oleh Kelenjar Endokrin.....	13

BAB III : MATERI DAN METODE

3.1.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	14	
3.2.	Materi Penelitian.....	14	
3.2.1.	Hewan Percobaan.....	14	
3.2.2.	Bahan Penelitian.....	14	
3.2.3.	Alat Penelitian.....	14	
3.3.	Metode Penelitian.....	15	
3.3.1.	Persiapan Hewan Percobaan.....	15	
3.3.2.	Perlakuan Hewan Percobaan.....	15	
3.3.3.	Pemeriksaan Mikroskop.....	17	
3.4.	Peubah yang Diamati.....	17	
3.5.	Analisis Data.....	18	
BAB IV :	HASIL PENELITIAN.....	19	13
BAB V :	PEMBAHASAN.....	25	15
BAB VI :	KESIMPULAN DAN SARAN.....	31	18
	RINGKASAN.....	32	19
	DAFTAR PUSTAKA.....	34	21
	LAMPIRAN.....	37	

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Rata-rata Jumlah Sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan.....	19 <sup>13</sup>
2. Rata-rata Jumlah Sel Spermatisit Primer dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan.....	20 <sup>13</sup>
3. Rata-rata Jumlah Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan.....	21 <sup>9</sup>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur Bangun Ketokonazol.....	4 16
2. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Testes Mencit Kelompok Po, Pewarnaan HE, Pembesaran 400 x.....	22 17
3. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Testes Mencit Kelompok P <sub>1</sub> , Pewarnaan HE, Pembesaran 400 x.....	22
4. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Testes Mencit Kelompok P <sub>2</sub> , Pewarnaan HE, Pembesaran 400 x.....	23
5. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Testes Mencit Kelompok P <sub>3</sub> , Pewarnaan HE, Pembesaran 400 x.....	23
6. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Testes Mencit Kelompok P <sub>4</sub> , Pewarnaan HE, Pembesaran 400 x.....	24
7. Proses Spermatogenesis.....	28

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Evaluasi Statistik Sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketonazol .....	37
2. Evaluasi Statistik Sel Spermatisit Primer dalam Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketokonazol.....	39
3. Evaluasi Statistik Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketokonazol.....	41
4. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatogonia pada 10 Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketokonazol.....	43
5. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatisit Primer pada 10 Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketonazol.....	44
6. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatid pada 10 Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Pemberian Ketokonazol.....	45
7. Pembuatan Sediaan Histologis Testes.....	46

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Timbulnya penyakit dalam suatu peternakan akan menimbulkan kerugian yang tidak diinginkan, misalnya penyakit jamur. Penyakit jamur secara ekonomi cukup merugikan di bidang peternakan. Kerugian tersebut berupa biaya pengobatan yang cukup tinggi karena bersifat kronis.

Selain itu penyakit jamur dapat menurunkan kualitas hasil ternak, misalnya kulit dan daging. Salah satu cara mencegah dan mengendalikan penyakit jamur dapat digunakan obat ketokonazol.

Ketokonazol diperkenalkan pertama kali pada tahun 1981, yang dinyatakan mampu memecahkan penanganan penyakit jamur khususnya yang berbentuk mikosis. Ketokonazol merupakan turunan imidazol yang umumnya bekerja dengan spektrum luas. Ketokonazol memiliki keistimewaan tersendiri yaitu dapat diberikan secara oral, sedangkan obat jamur lainnya hanya dapat diberikan secara topikal atau sistemik (Setiabudi dan Bahri, 1987).

Ketokonazol dilaporkan Widiyanto (1991) sebagai fungisida dengan menghambat biosintesis ergosterol dalam membran sel jamur. Kemampuan kerja lebih lanjut menghambat biosintesis hormon steroid mamalia, terutama dalam penggunaan jangka waktu lama. Ketokonazol akan

menekan produksi testosteron. Produksi testosteron yang ditekan akan menyebabkan proses spermatogenesis dalam testis terganggu dan diikuti oleh penurunan daya reproduksi jantan.

Mencit (*Mus musculus*) adalah hewan percobaan terkecil yang digunakan di laboratorium dibandingkan hewan percobaan lainnya. Mencit merupakan salah satu hewan percobaan yang sering digunakan untuk penelitian zat yang ingin diketahui efeknya pada manusia maupun hewan (Smith dan Mangkoewidjojo, 1989).

## 1.2. Perumusan Masalah

Penggunaan ketokonazol yang berlangsung lama akan mempengaruhi fungsi reproduksi jantan. Hal ini merupakan efek samping yang serius terutama dalam penanganan penyakit jamur. Berdasarkan hal-hal tersebut di atas dirumuskan masalah : Bagaimana pengaruh ketokonazol terhadap proses spermatogenesis dengan melihat perubahan gambaran histologis testes mencit.

## 1.3. Landasan Teori

Penggunaan ketokonazol setelah dua jam pada manusia dengan dosis 200 mg dapat menyebabkan penurunan kadar testosteron. Apabila ketokonazol diberikan dengan dosis tinggi atau secara berulang-ulang dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan penurunan jumlah sperma, azospermia, hilangnya libido, impotensi dan ginekomasti.

#### 1.4. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang dapat diajukan dalam penelitian ini adalah pemberian ketokonazol dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik yaitu sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid mencit.

#### 1.5. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ketokonazol dalam jangka waktu yang berbeda terhadap proses spermatogenesis dengan melihat perubahan gambaran histologis testes mencit.

#### 1.6. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran proses spermatogenesis akibat penggunaan ketokonazol dalam jangka waktu yang lama pada hewan jantan.
2. Mengetahui efek samping yang merugikan dari penggunaan ketokonazol sebagai anti jamur pada hewan.



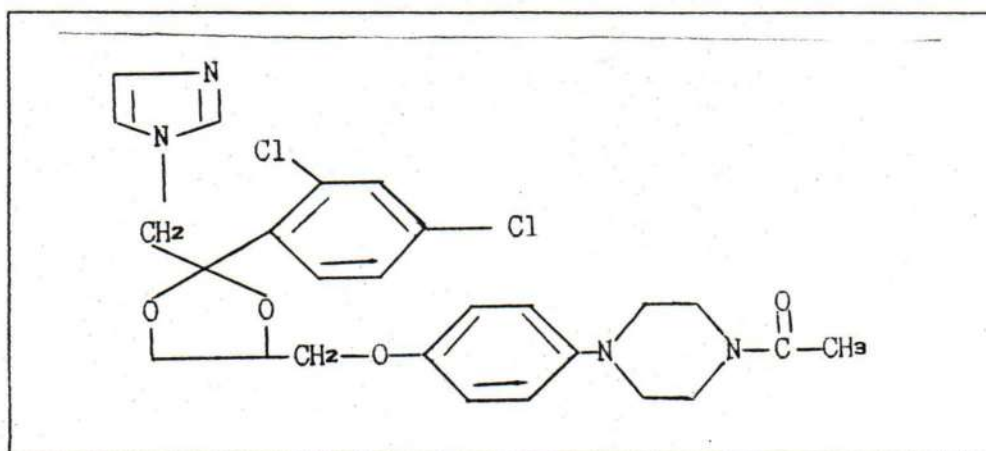
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tentang Ketokonazol

##### 2.1.1. Nama, Turunan dan Rumus Kimia

Ketokonazol dibuat dalam sediaan farmasi dengan nama dagang antara lain : Nizoral, Mycoral dan Zoralin (Anonimous, 1992). Ketokonazol merupakan turunan imidazol sintetis yang memiliki rumus kimia : 1-Acetyl-4-{4[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidasol-1-ylmethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethoxy]phenyl}piperazine (Anonimous, 1989).



Gambar 1. Struktur Bangun Ketokonazol  
Sumber : Katzung, 1989

##### 2.1.2. Mekanisme Kerja dan Farmakokinetik

Ketokonazol merupakan satu-satunya anti jamur turunan imidazol yang dipergunakan secara oral. Ketokonazol diserap melalui saluran pencernaan dan

kadarnya dalam plasma cukup tinggi, sehingga dapat menekan aktivitas berbagai jenis jamur (Setiabudi dan Bahri, 1987; Muscler, 1991). Menurut Wattimena dkk. (1991) ketokonazol menghambat biosintesis ergosterol yang terdapat pada bagian membran sel jamur dengan cara bereaksi pada bagian lipofilnya. Bagian jamur yang bersifat hidrofil membentuk suatu saluran. Akibatnya permeabilitas membran sel jamur meningkat, sehingga komponen-komponen intrasel seperti gula, asam amino, asam nukleat, kalium dan ion-ion lain keluar dan terjadi kerusakan sel jamur.

Ketokonazol larut dalam air dan dapat diabsorpsi oleh saluran pencernaan. Ketokonazol dapat ditemukan dalam urin, kelenjar lemak, air ludah, kulit, tendon, cairan sinovial, pleural, perineal dan airmata (Katzung, 1989)

Ketokonazol di dalam plasma berikatan dengan protein plasma sebanyak 84 persen, dengan sel darah 15 persen dan dalam bentuk bebas satu persen. Ketokonazol mengalami metabolisme dalam hati, selanjutnya didistribusikan dan diekskresikan sebagian bersama feses dan sebagian bersama urin. Semuanya dalam bentuk metabolit yang tidak aktif (Setiabudi dan Bahri, 1987; Smith dan Reynard, 1982).

### 2.1.3. Penggunaan Klinik

Ketokonazol efektif untuk penderita histoplasmosis paru, tulang, sendi dan jaringan lemak. Ketokonazol digunakan bagi penderita dermatomikosis, parakoksidiomikosis, beberapa bentuk koksidiomikosis dan kandidiasis vaginalis (Setiabudi dan Bahri, 1987; Katzung, 1989).

### 2.1.4. Efek Samping

Efek samping ketokonazol yang sering timbul adalah mual dan gatal-gatal, sakit kepala, rambut rontok, nyeri, berkunang-kunang, *parestesis*, gusi berdarah, kulit mengelupas dan trombositopenia. Obat ini dapat meningkatkan aktifitas enzim hati untuk sementara waktu dan dapat menyebabkan kerusakan hati (Setiabudi dan Bahri, 1987). Goodman and Gilman (1992) melaporkan bahwa ketokonazol yang diberikan pada penderita wanita dapat menyebabkan menstruasi yang tidak teratur. Ketokonazol dengan dosis 400 mg atau lebih per hari dapat menekan produksi testoteron pada pria dan dapat menyebabkan *ginekomasti*, hilangnya libido, *oligospermia* dan kerontokan rambut (Smith and Reynard, 1992).

### 2.1.4. Dosis

Dosis harian ketokonazol pada manusia dewasa sebesar 200 mg secara oral (Mutschler, 1991).

Ketokonazol diberikan pada penderita kandidiasis vaginalis sebesar 400 mg setiap hari selama lima hari secara oral (Anonimus, 1992). Katzung (1989) menyatakan bahwa ketokonazol diberikan pada penderita dermatomikosis sebesar 200 - 400 mg setiap hari selama tiga sampai delapan minggu secara oral.

## 2.2. Tinjauan tentang Testes

### 2.2.1. Anatomi Testes

Testes dari berbagai macam spesies hewan berbeda dalam hal bentuk, ukuran dan lokasinya. Sebagian besar hewan mamalia ada sepasang, berbentuk bulat telur atau lonjong dan berada dalam rongga skrotum. Khusus golongan rodensia dapat berpindah-pindah dari dalam skrotum ke dalam rongga perut. Hal ini terjadi saat musim kawin dengan testes berada dalam rongga skrotum, sedangkan diluar musim kawin berada dalam rongga perut (Hardjopranjoto, 1980).

Testes berada dalam kantong skrotum, skrotum berisi dua lobi yang masing-masing lobus mengandung satu testes. Fungsi skrotum adalah melindungi dan mempertahankan testes agar suhunya lebih rendah daripada suhu tubuh agar proses spermatogenesis dapat berlangsung. Hal ini dilakukan oleh tunika dartos, yaitu suatu selaput yang melapisi skrotum. Tunika dartos akan menarik testes mendekati tubuh pada keadaan dingin dan mengendur pada keadaan panas.

Fungsi ini bekerja setelah mencapai dewasa kelamin (Salisbury, 1985).

### 2.2.2. Histologi Testes ✓

Testes terselubungi oleh selaput yang terdiri dari tiga lapisan yaitu : lapisan luar atau tunika vaginalis, lapisan tengah atau tunika albugenia dan lapisan dalam atau tunika vaskulosa. Tunika vaginalis terdiri dari lapisan sel mesotelium yang sering mengalami kerusakan saat dibuat sediaan. Tunika albugenea adalah lapisan yang tersusun atas jaringan fibroelastis padat dan sel-sel otot polos. Tunika vaskulosa terdiri dari jaringan yang sangat kompak, serta pembuluh darah yang tertanam dalam jaringan ikat (Lesson dan Lesson, 1981).

Tubulus seminiferus tergulung melilit dan tertutup lapisan epitel germinal. Epitel ini tersusun dari sel-sel spermatogenik dan sel Sertoli atau sel penunjang (Beverlander dan Ramaley, 1988).

Tubulus seminiferus membentuk gulungan-gulungan yang tiap gulungan berujung buntu atau bercabang. Ujung apikal tiap tubulus mengalami penyempitan lumen dan membentuk segmen yang pendek dan disebut tubulus rektus. Tubulus rektus menghubungkan tubulus seminiferus dengan rete testis di mediastinum (Junquiera dan Carneiro, 1980).

Tubulus seminiferus memiliki selaput dasar (membrana basalis) yang ditempati dua macam sel yaitu sel-sel spermatogonia dan sel Sertoli. Sel spermatogonia ialah sel bakal kelamin jantan yang belum terdiferensi, sedangkan sel Sertoli berfungsi sebagai penunjang nutrisi bagi sel-sel spermatogenik. Sel spermatid akan berada pada ujung sel Sertoli untuk nutrisi dalam perubahannya menjadi spermatozoa (Toelihere, 1981).

### 2.3. Spermatogenesis ✓

Spermatogenesis adalah suatu proses pembentukan spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap spermatositogenesis dan tahap spermiogenesis. Tahap spermatositogenesis merupakan suatu rangkaian pembelahan spermatogonia menjadi spermatid. Tahap spermiogenesis merupakan tahap perubahan spermatid yang mengalami proses metamorfosis menjadi spermatozoa (Fuquay and Bearden, 1980).

Pada proses spermatogenesis, sel-sel germinal menjadi spermatozoa akan mengalami tahapan-tahapan pembelahan sel sebagai berikut : spermatogonia menjadi spermatosit primer secara mitotik, spermatosit primer menjadi spermatosit sekunder secara meiotik, spermatosit

sekunder menjadi spermatid secara meiotik dan perubahan morfologi dari spermatid menjadi spermatozoa (Hafez, 1970).

Sel-sel germinal yang terletak di membrana basalis tubulus seminiferus akan mengalami pembelahan berurutan menjadi dua macam sel spermatogonia, yaitu spermatogonia A dan spermatogonia B. Spermatogonia A membelah secara perlahan dan berfungsi sebagai induk. Spermatogonia B berasal dari spermatogonia A yang mengalami pembelahan mitotik dan berkembang menjadi besar. Selanjutnya menjadi sel spermatosit primer. Sel spermatosit primer mempunyai ukuran paling besar diantara sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus (Lesson dan Lesson, 1981).

Sel spermatosit primer membelah secara meiotik berubah menjadi sel spermatosit sekunder. Kromosom sel spermatosit primer bergabung kemudian memisah menuju ke masing-masing pasangan sel spermatosit sekunder, sehingga jumlah kromosomnya menjadi setengahnya (Lesson dan Lesson, 1981).

Sel spermatosit sekunder jarang ditemukan dalam potongan testis karena akan cepat mengalami pembelahan meiotik kedua menjadi sel spermatid. Sel spermatid berukuran kecil dan memiliki inti dengan kromatin padat, terletak dekat bagian tengah tubulus seminiferus. Terbentuknya spermatid menandakan bahwa spermatositoge-

nesis telah berakhir. Selanjutnya spermatid mengalami proses metamorfosis yang disebut spermiogenesis (Junquiera dan Carniero, 1980).

Menurut Salisbury (1985), istilah spermiogenesis dipergunakan untuk peristiwa metamorfosis dan perubahan spermatid menjadi spermatozoa. Inti sel spermatid menuju bagian anterior sel, badan golgi mengumpul di bagian depan nukleus kemudian memipih. Terbentuk pula vakuola yang berisi granula kromosom. Selanjutnya badan golgi berpindah ke posterior dan terbentuk *acesory body* yang akhirnya menjadi bagian dari leher spermatozoa. Terbentuk pula sentriol pada saat yang bersamaan. Mitokondria berkumpul pada bagian posterior kepala spermatozoa.

Terbentuknya spermatozoa menunjukkan bahwa spermatogenesis telah berakhir dan spermatazoa yang semula melekat pada sel Sertoli melepaskan diri masuk ke lumen tubulus seminiferus (Hardjopranjoto, 1980).

#### 2.4. Fisiologi Reproduksi Mencit Jantan ✓

Testes mencit terletak dalam kantong skrotum, ujung anteriornya sebagian atau seluruhnya tanpa rambut. Suatu badan lemak menonjol memanjang dari testes sepanjang korda spermatik. Pada tikus, mencit dan gerbil badan lemaknya sangat panjang dan ujung anteriornya bebas dari korda dan memanjang jauh ke dalam *coelum* (Hafez, 1970).



Masa pubertas (dewasa kelamin) mencit jantan berumur sekitar 35 hari dan dapat dikawinkan setelah berumur delapan minggu (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Partodiharjo (1982) menyatakan bahwa organ reproduksi jantan berfungsi atau proses reproduksi terjadi mulai ditandai pertama kali menghasilkan benih, timbulnya bersamaan dengan masa pubertas. Masa pubertas mencit jantan ditandai dengan timbulnya tanda-tanda kelamin sekunder dan libido mulai tampak, seperti mengejar dan menggigit kepala atau badan mencit betina atau mencium kelamin luar. Tingkah laku kopulasi dimulai ketika mencit jantan mulai menaiki mencit betina dari bagian belakang dan menjepit dengan kaki depannya pada bagian latero lumbal (Hafez, 1970).

Tubulus seminiferus memproduksi spermatozoa hasil dari pembelahan sel yang berurutan berasal dari deretan sel spermatogonia (Salisbury, 1985). Sel spermatogonia muncul pertama kali sekitar empat hari setelah lahir. Waktu siklus spermatogenik adalah tetap dengan melalui empat pembelahan yang dimulai dari spermatogonia, spermatosit, spermatid sampai spermatozoa. Waktu untuk menyelesaikan siklus ini pada mencit adalah 34,5 hari (Hafez, 1970). Pada mencit jantan yang telah mencapai dewasa kelamin, proses spermatogenesis akan berlangsung terus menerus selama hidupnya (Fuquay and Bearden, 1980).

## 2.5. Pengendalian Spermatogenesis oleh Kelenjar Endokrin ✓

Proses spermatogenesis dikendalikan oleh kelenjar endokrin, terutama kelenjar hipofisa dan testes. Kelenjar hipofisa memproduksi gonadotropin yang terdiri dari *Follicel Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormon* (LH) atau lebih dikenal *Interstitial Cel Stimulating Hormon* (ICSH) pada jantan. Testes memproduksi androgen terutama testosteron. Spermatogenesis yang optimal memerlukan FSH dan LH untuk memulai sekresi testosteron. Testosteron diperlukan untuk proses spermatogenesis dalam kadar yang tinggi.

Pada waktu pubertas, LH mempengaruhi sel Leydig untuk menghasilkan testosteron yang membuat epitel germinal tubulus seminiferus bereaksi dengan FSH. sehingga terjadi pembelahan sel spermatogonia. Spermatogenesis yang terus menerus memerlukan keseimbangan yang timbal balik antara hormon-hormon FSH, LH dan testosteron (Salisbury, 1985).

### BAB III

#### MATERI DAN METODE

##### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang dimulai tanggal 27 Pebruari 1996 sampai dengan 18 April 1996.

##### 3.2. Materi Penelitian

###### 3.2.1. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan strain Albino Jerman berumur delapan minggu yang diperoleh dari PUSVETMA. Jumlah mencit yang digunakan sebanyak 35 ekor dengan berat badan sekitar 25 gram.

###### 3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan ialah : Nizoral<sup>R</sup> bentuk tablet produksi Jansen, aquadest, CMC 5%, pakan ayam jenis CP 511, air, kloroform, dan bahan bahan untuk pembuatan sediaan histologi.

###### 3.2.3. Alat Penelitian

Alat-alat penelitian yang digunakan ialah : kandang mencit, gelas baker, pengaduk, *syringe disposable tuberculine* beserta jarum khusus,

timbangan, peralatan bedah, pot-pot obat, alat-alat untuk pembuatan sediaan histologi dan mikroskop.

### 3.3. Metode Penelitian

#### 3.3.1. Persiapan Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap dengan menggunakan 35 ekor mencit yang dibagi secara acak dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari tujuh ulangan. Semua mencit dimasukkan dalam kandang. Mencit-mencit tersebut diadaptasikan selama dua minggu. Setelah itu dilakukan pemberian nomor.

#### 3.3.2. Perlakuan Hewan Percobaan

Sebelum dilakukan perlakuan, tiap ekor mencit ditimbang berat badannya untuk menentukan dosis ketokonazol yang diberikan. Mencit-mencit tersebut mendapat perlakuan sebagai berikut :

- P<sub>0</sub> : Tujuh ekor mencit tidak diberi ketokonazol sebagai kontrol.
- P<sub>1</sub> : Tujuh ekor mencit diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama lima hari.
- P<sub>2</sub> : Tujuh ekor mencit diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama 15 hari.
- P<sub>3</sub> : Tujuh ekor mencit diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama 25 hari.

- P<sub>4</sub> : Tujuh ekor mencit diberi ketokonazol 28 mg/kgBB setiap hari selama 35 hari.

Dosis ketokonazol 28 mg/kgBB mencit merupakan hasil konversi dosis lazim ketokonazol berdasarkan luas permukaan tubuh pada manusia (Gosh, 1971).

Cara memberikan ketokonazol secara oral sebagai berikut : mencit diletakkan di atas kandang supaya tidak bergerak, dipegang diantara ibu jari dan jari tengah tangan kiri pada lipatan tengkuk. Ekornya dipegang dengan jari kelingking tangan yang sama. Kemudian tangan kanan memberikan ketokonazol lewat mulut menggunakan *syringe disposable tuberculine* satu mililiter yang dilengkapi jarum khusus (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Selama masa adaptasi dan masa perlakuan mencit-mencit tersebut diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

Setelah setiap perlakuan diberikan, mencit-mencit tiap kelompok dibunuh dengan cara memasukkan mencit ke dalam toples berisi kapas yang telah dibasahi kloroform. Setelah mencit terbunuh segera dilakukan pembedahan untuk mengambil testesnya, yaitu dengan membuat sayatan memanjang pada kulit daerah abdominal, membuka kulit perut dan menyisihkan organ-organ lainnya. Kedua testesnya dipisahkan diambil kemudian dibersihkan dari jaringan sekitarnya dan dimasukkan kedalam pot-pot obat yang berisi larutan Bouin.

Kemudian dilakukan pembuatan sediaan histologi seperti dalam lampiran 7 setelah disimpan minimal 24 jam (Tedja, 1993).

### 3.3.3. Pemeriksaan Mikroskop

Pemeriksaan dibawah mikroskop dilakukan dengan pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan pada pengamatan 10 tubulus seminiferus pada irisan testes yang berbeda untuk setiap ulangan pada masing-masing perlakuan.

### 3.4. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati terhadap gambaran histologis testes mencit dalam penelitian ini meliputi :

#### a. Sel spermatogonia

Letaknya paling dekat dengan membrana basalis tubulus seminiferus dan merupakan sel asal dari rantai spermatogenesis. Inti bulat dan banyak mengandung kromatin.

#### b. Sel spermatosit primer

Sel spermatosit primer merupakan sel yang paling besar dan lokasinya lebih ke tengah tubulus seminiferus dibandingkan dengan letak sel spermatogonia.

#### c. Sel spermatid

Sel spermatid berukuran kecil dan memiliki inti dengan kromatin padat, terletak dekat bagian tengah tubulus seminiferus (Dellman, 1971).

### 3.5. Analisis Data

Hasil yang diperoleh dari penghitungan sel-sel spermatogenik ditransformasikan dalam bentuk  $\sqrt{y}$ , kemudian rata-ratanya dikuadratkan dan disajikan dalam bentuk tabel (Steel dan Torrie, 1993).

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan  $F_{hitung}$  dan dibandingkan dengan  $F_{tabel}$  dari Sidik Ragam. Kriteria Sidik Ragam adalah bila  $F_{hitung}$  lebih besar daripada  $F_{tabel}$  lima persen berarti ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Sebaliknya bila  $F_{hitung}$  lebih kecil daripada  $F_{tabel}$  lima persen berarti tidak ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan.

Adanya perbedaan yang nyata diantara perlakuan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perlakuan mana yang menyebabkan perubahan pada gambaran histologis testes mencit (Kusriningrum, 1989).

BAB IV  
HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian tentang gambaran histologis testes mencit setelah pemberian ketokonazol yang telah dilakukan, diperoleh hasil seperti yang terdapat pada tabel 1, 2, dan 3

Tabel 1. Rata-rata Jumlah Sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Sel Spermatogonia
P <sub>0</sub>	25 + 1,272 <sup>a</sup>
P <sub>1</sub>	23 + 0,816 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub>	22 + 1,069 <sup>c</sup>
P <sub>3</sub>	21 + 0,577 <sup>d</sup>
P <sub>4</sub>	20 + 1,496 <sup>e</sup>

Keterangan : Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) berdasarkan uji BNT 5%

Tabel 1 menunjukkan rata-rata jumlah sel spermatogonia dalam tubulus seminiferus mencit yang telah diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama 5, 15, 25, 35 hari, serta kontrol. Hasil perhitungan statistik menunjukkan adanya perbedaan yang nyata diantara perlakuan, yang mana  $F_{hitung}$  lebih besar daripada  $F_{tabel,0,05}$  dari sidik ragam. Selanjutnya dengan Uji BNT lima persen diketahui bahwa jumlah sel spermatogonia tertinggi dimiliki kelompok kontrol. Diikuti secara berturut-turut oleh kelompok perlakuan selama 5, 15, 25 dan 35 hari yang masing-masing saling berbeda nyata (lihat lampiran 1).



Tabel 2. Rata-rata Jumlah Spermatisit Primer dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Sel Spermatisit Primer
P <sub>0</sub>	45 ± 2,768 <sup>a</sup>
P <sub>1</sub>	41 ± 1,676 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub>	38 ± 1,623 <sup>c</sup>
P <sub>3</sub>	37 ± 0,899 <sup>d</sup>
P <sub>4</sub>	34 ± 0,756 <sup>e</sup>

Keterangan : Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ) berdasarkan Uji BNT 5%.

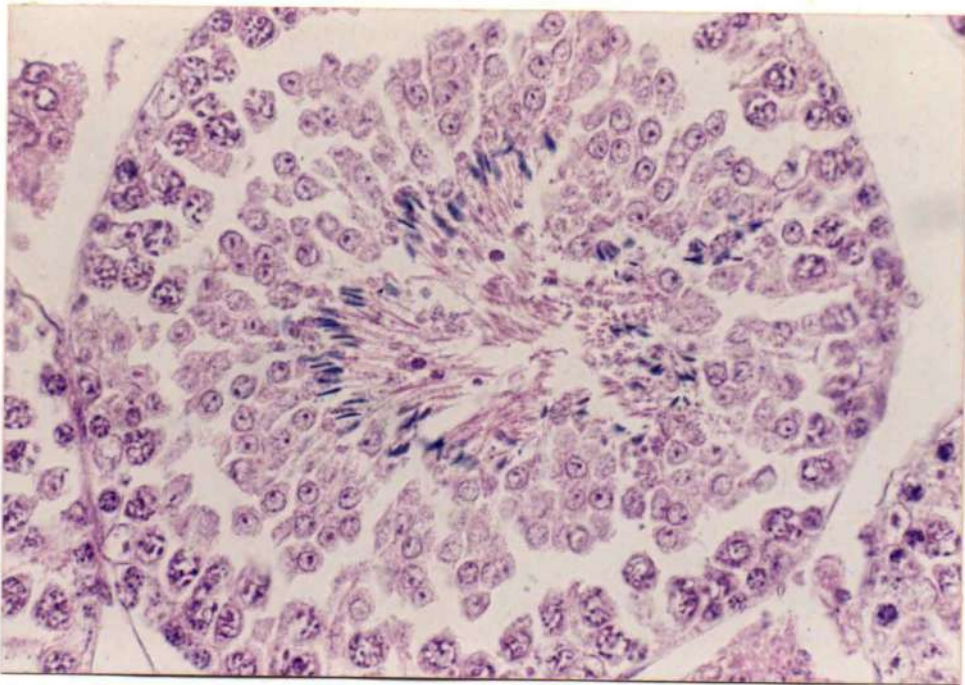
Tabel 2 menunjukkan rata-rata jumlah sel spermatisit primer dalam tubulus seminiferus mencit yang telah diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama 5, 15, 25, 35 hari dan kontrol. Setelah dianalisis dalam sidik ragam terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan. Hasil uji BNT lima persen menunjukkan bahwa jumlah sel spermatisit primer tertinggi dimiliki kelompok kontrol, kemudian diikuti keompok perlakuan selama 5 hari, 15 hari, 25 hari dan yang terendah kelompok perlakuan selama 35 hari (lihat lampiran 2).

Tabel 3. Rata-rata Jumlah Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan

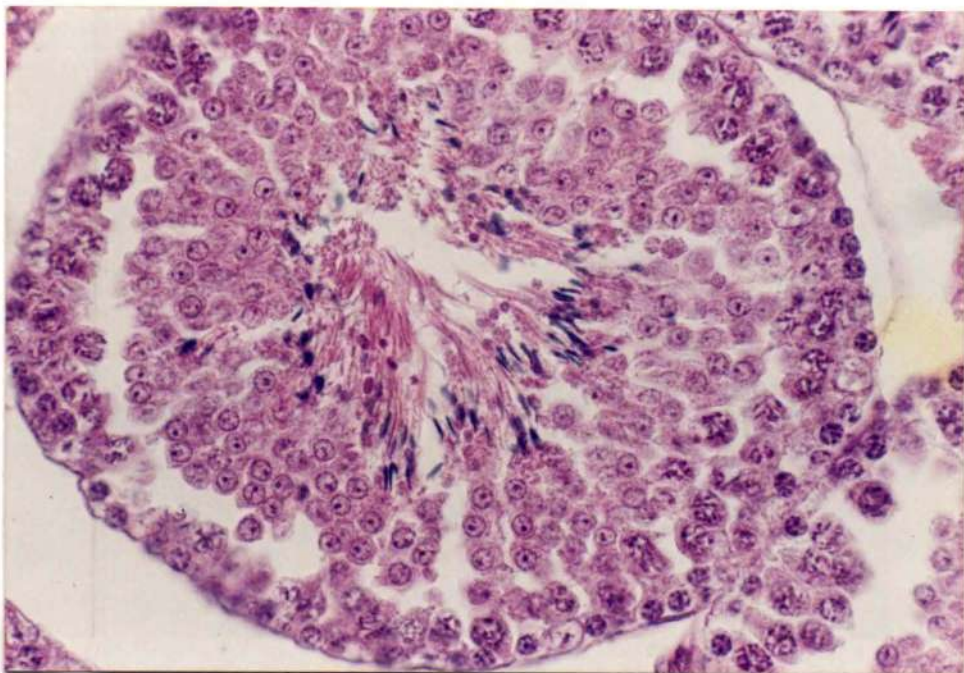
Perlakuan	Rata-rata Jumlah Sel Spermatid
P <sub>0</sub>	155 + 3,047 <sup>a</sup>
P <sub>1</sub>	141 + 2,992 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub>	129 + 1,573 <sup>c</sup>
P <sub>3</sub>	125 + 1,380 <sup>d</sup>
P <sub>4</sub>	115 + 1,676 <sup>e</sup>

Keterangan : Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) berdasarkan Uji BNT 5%.

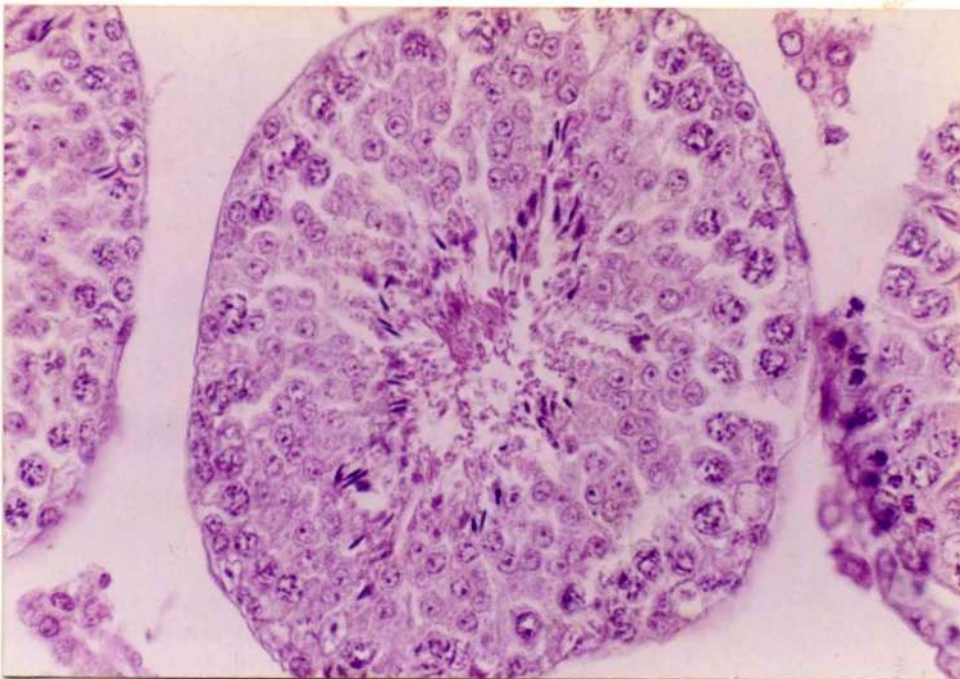
Tabel 3 menunjukkan jumlah sel spermatid dalam tubulus seminiferus mencit yang telah diberi ketokonazol 26 mg/kgBB setiap hari selama 5, 15, 25, 35 hari dan kontrol. Setelah dianalisis dalam sidik ragam terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan. Hasil uji BNT lima persen menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki jumlah sel spermatid tertinggi. Kelompok perlakuan selama 35 hari memiliki jumlah sel spermatid terendah. Secara keseluruhan masing-masing kelompok perlakuan berbeda nyata antara satu dengan yang lain (lihat lampiran 3).



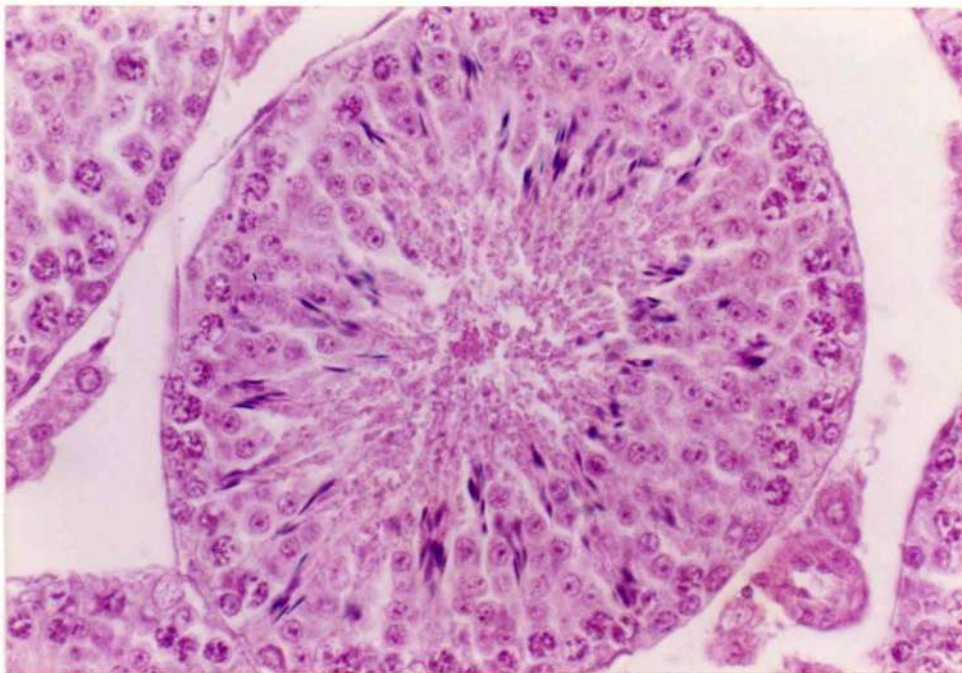
Gambar 2. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus  
Mencit P<sub>0</sub>, Pewarnaan HE, Pembesaran 400x.



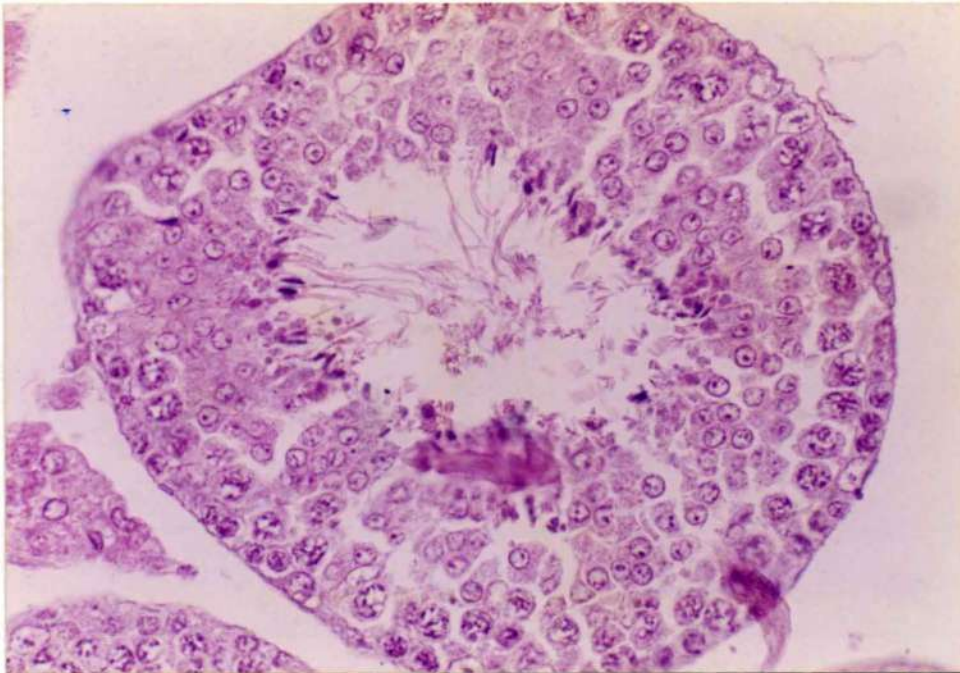
Gambar 3. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus  
Mencit P<sub>1</sub>, Pewarnaan HE, Pembesaran 400x.



Gambar 4. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Mencit Pz, Pewarnaan HE, Pembesaran 400x.



Gambar 5. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus Mencit Ps, Pewarnaan HE, Pembesaran 400x.



Gambar 6. Irisan Melintang Tubulus Seminiferus  
Mencit P<sub>4</sub>, Pewarnaan HE, Pembesaran 400x.

Keterangan : A = Sel Spermatogonia

B = Sel Spermatisit primer

C = Sel Spermatisid

## BAB V PEMBAHASAN

### V.1.1

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ketokonazol pada mencit jantan mengakibatkan penurunan rata-rata jumlah sel-sel spermatogenik, yaitu sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid.

Tampak pada tabel 1, 2 dan 3 rata-rata jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid dalam tubulus seminiferus menunjukkan penurunan secara bertahap diantara kelompok perlakuan setelah pemberian ketokonazol. Melalui sidik ragam dapat ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid yang nyata diantara kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya dengan uji BNT 5% dapat diketahui bahwa  $P_0$  memiliki rata-rata jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer dan sel spermatid tertinggi lalu diikuti berturut-turut  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , dan  $P_4$  yang saling berbeda nyata antara satu dengan lainnya. Sejalan dengan pernyataan Widiyanto (1991) bahwa pemberian ketokonazol dalam jangka waktu lama dan berulang-ulang dapat menyebabkan penurunan kadar testosteron.

Proses spermatogenesis yang optimal sangat memerlukan testosteron dalam kadar yang tinggi. Pemberian ketokonazol yang dapat menurunkan kadar testosteron secara tidak langsung menghambat pula proses spermatogenesis (Katzung, 1989).

Rodrigues-Rigau (1982) menyatakan bahwa spermatogenesis dikontrol oleh hormon ICSH (LH) dan FSH. Kerja ICSH

yaitu merangsang sel-sel Leydig yang berada di luar tubulus seminiferus untuk memproduksi testosteron. Selanjutnya hormon testosteron berdifusii menuju tubulus seminiferus untuk kelangsungan spermatogenesis. Testosteron bertanggung jawab terhadap pembelahan sel kecambah menjadi sel spermatogonia yang merupakan proses awal spermatogenesis. Telah dibuktikan seperti tampak pada tabel 1 bahwa jumlah sel spermatogonia mengalami penurunan setelah pemberian ketokonazol.

FSH adalah hormon yang bertanggung jawab merangsang aktifitas tubulus seminiferus dalam proses spermatogenesis. Testosteron merangsang epitel germinal untuk bereaksi dengan FSH. FSH menyebabkan spermatogenesis dimulai pada pembelahan sel spermatogonia (Rodrigues-Rigau, 1982; Salisbury dan Van Demark, 1984). Penurunan kadar testosteron setelah pemberian ketokonazol dalam penelitian ini mengakibatkan pembelahan sel spermatogonia menjadi sel spermatis primer terhambat. Sejalan dengan penelitian Shuginina *et al.* (1989) yang melaporkan bahwa kadar testosteron yang rendah akibat pemberian ketokonazol menyebabkan epitel germinal tanggapannya kurang peka terhadap FSH, sehingga pembelahan sel spermatogonia dihambat.

Menurut Turner dan Bagnara (1988) pembelahan spermatogonia merupakan kejadian yang tidak serentak pada semua tubulus seminiferus dimana kelompok-kelompok sel dengan fase perkembangan yang sama akan membelah secara bersama-sama. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan kadar testosteron yang diakibatkan pemberian

ketokonazol dalam jangka waktu lama dan berulang-ulang menyebabkan penurunan rata-rata jumlah sel spermatogonia dan terhambatnya sel spermatogonia membelah diri secara mitotik. Hal ini berakibat rata-rata jumlah sel spermatosit primer menurun, seperti telah ditunjukkan pada tabel 2.

Demikian pula, rata-rata jumlah sel spermatid mengalami penurunan setelah pemberian ketokonazol, seperti tampak pada tabel 3. Spermatid merupakan hasil pembelahan mitosis spermatogonia yang berlanjut pembelahan meiosis spermatosit pada tahap proliferasi dari proses spermatogenesis. Jadi kemungkinan turunnya sel spermatid dapat dikarenakan telah terjadi hambatan proses mitosis dan meiosis.

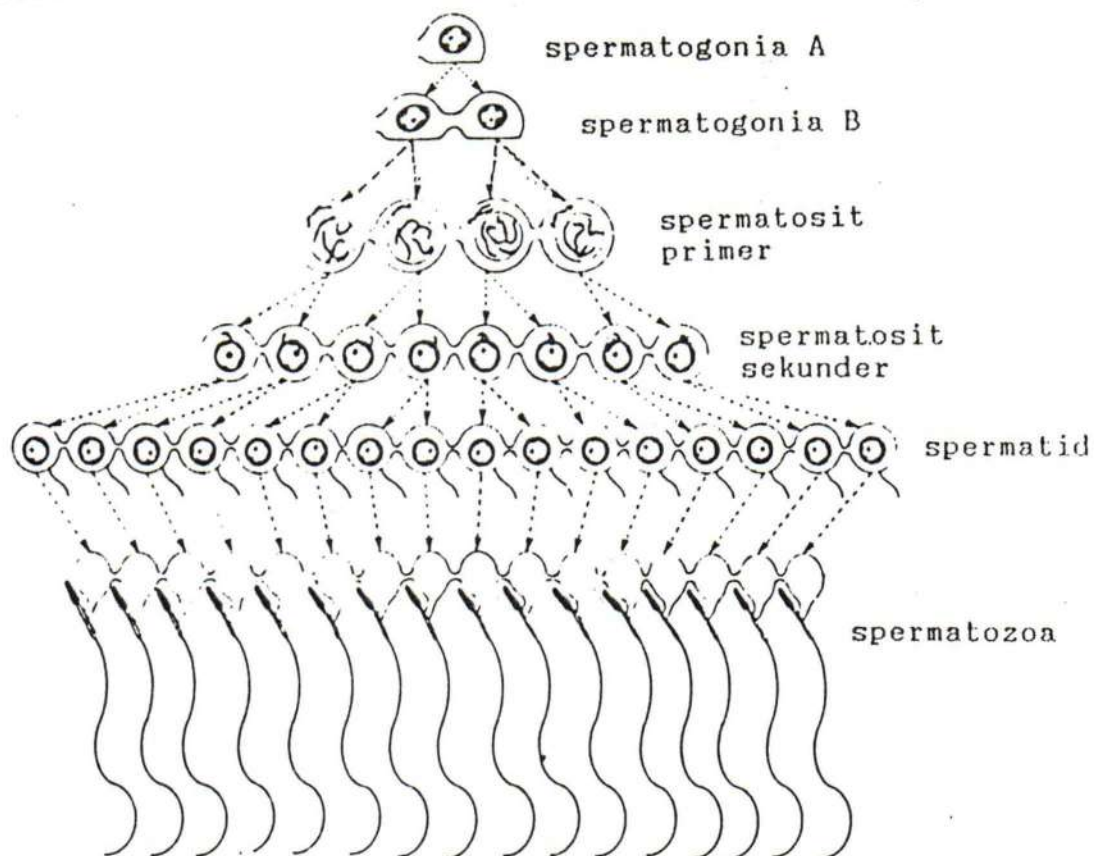
Untuk mendapatkan hasil yang lebih jelas, maka dihitung angka perbandingan antara jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid, diperoleh perbandingan angka sebagai berikut :

Kelompok	=	spermatogonia	:	spermatosit I	:	spermatid
P0	=	1	:	1,79	:	6,12
P1	=	1	:	1,77	:	6,10
P2	=	1	:	1,75	:	5,94
P3	=	1	:	1,72	:	5,87
P4	=	1	:	1,67	:	5,58

Skema gambar 7 terlihat bahwa dari 1 sel spermatogonia akan terbentuk 2 sel spermatosit primer dan selanjutnya menjadi 8 sel spermatid. Dari hasil perhitungan tersebut dapat dikatakan bahwa telah terjadi perubahan angka perbandingan antara jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid. Menurut Delman (1976) hal ini



dapat terjadi karena antara 20 - 60% perkembangan sel-sel spermatogenik mengalami degenerasi selama proses spermatogenesis.



Gambar 7. Proses Spermatogenesis

Sumber : Hafez, 1980

Penelitian ini tidak menghitung jumlah sel spermatosit sekunder dan sel spermatozoa. Hal ini dikarenakan sel spermatosit sekunder sulit ditemukan dalam potongan tubulus seminiferus, sebab sel spermatosit sekunder berada dalam interfase sangat singkat dan cepat membelah menjadi sel spermatid. Sel spermatozoa sendiri merupakan hasil dari proses penyempurnaan sel spermatid dan di dalam potongan tubulus seminiferus sulit dihitung, karena menggerombol dan

lengket antara satu dengan lainnya (Junquiera dan Carneiro, 1980).

Secara keseluruhan rata-rata jumlah sel-sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus mencit setelah pemberian ketokonazol mengalami penurunan. Seperti kita ketahui penurunan tersebut terjadi secara bertahap diantara kelompok-kelompok perlakuan dibandingkan kontrol. Perlakuan yang paling menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik adalah perlakuan selama 35 hari. Hal ini mungkin disebabkan kadar testosteron yang dibutuhkan untuk proses spermatogenesis secara normal tidak mencukupi. Dapat dikatakan bahwa pemberian ketokonazol dalam waktu lama menghambat proses spermatogenesis pada fase mitotik maupun meiotik.

Turunnya kadar testosteron yang menyebabkan terhambatnya proses spermatogenesis dengan melihat gambaran histologis testes mencit dalam penelitian ini terjadi setelah pemberian ketokonazol selama lima hari. Menurut Widiyanto (1991), selain bekerja menghambat biosintesis ergosterol di dalam membran sel jamur, ketokonazol pada organisme mamalia juga menghambat biosintesis kolesterol yang merupakan bahan dasar testosteron.

Biosintesis kolesterol merupakan awal dari rangkaian proses produksi testosteron. Kolesterol akan mengalami pemecahan ikatan untuk menjadi pregnenolon. Pregnenolon akan mengalami proses lebih lanjut menjadi testosteron (Smith *et al.*, 1988).

Kerja ketokonazol dalam hal ini adalah menghambat pemecahan kolesterol menjadi pregnenolon pada enzim P-450. Demikian pula ketokonazol menghambat secara langsung pembentukan androstenedion dari  $17\alpha$ -hidroksi progesteron melalui kerja enzim liase  $C_{17-20}$  (Smith and Reynard, 1992). Sehingga biosintesis testosteron terganggu yang mengakibatkan sekresi testosteron menurun.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang gambaran histologis testes mencit setelah pemberian ketokonazol dapat disimpulkan bahwa pemberian ketokonazol menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik, yaitu sel spermatogonia, sel spermatosit primer dan sel spermatid.

#### 6.2. Saran

Penggunaan ketokonazol dalam waktu lebih dari 35 hari sebaiknya dihindari, karena hambatan spermatogenesis terberat ditunjukkan pada penggunaan ketokonazol selama 35 hari.

## RINGKASAN

Ketokonazol merupakan satu-satunya obat anti jamur yang dapat digunakan secara oral saat ini. Ketokonazol memiliki aksi anti jamur yang berspektrum luas.

Ketokonazol sebagai obat anti jamur bekerja dengan menghambat biosintesis ergosterol di membran sel jamur. Disamping itu ketokonazol bila diberikan pada mamalia jantan dalam waktu yang lama dan berulang-ulang mampu menghambat biosintesis hormon steroid yaitu testosteron.

Testosteron sangat diperlukan dalam proses spermatogenesis. Bila produksi testosteron terganggu akan mempengaruhi sistem keseimbangan hormonal dan proses spermatogenesis.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ketokonazol dalam jangka waktu yang berbeda terhadap proses spermatogenesis dengan melihat perubahan gambaran histologis testes mencit.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 35 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) strain Albino Jerman yang terdiri tujuh ulangan. Ketokonazol yang diberikan sebanyak 26 mg/kgBB setiap hari secara oral sesuai perlakuan. P<sub>0</sub> tanpa perlakuan sebagai kontrol, P<sub>1</sub> diberi ketokonazol selama lima hari, P<sub>2</sub> diberi ketokonazol selama 15 hari, P<sub>3</sub> diberi ketokonazol selama 25 hari dan P<sub>4</sub> diberi ketokonazol selama 35 hari. Setelah perlakuan, semua mencit dibunuh untuk pengambilan testes dan dibuat sediaan histologis.

Penelitian ini menggunakan disain Rancangan Acak Lengkap. Data dianalisis dalam sidik ragam yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ketokonazol memberikan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit sekunder dan sel spermatid. Rataan jumlah tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan kontrol dan terendah adalah perlakuan selama 35 hari. Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk memperhatikan waktu lama pemberian ketokonazol dalam pengobatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, 1992. Data Obat di Indonesia, Keterangan Lengkap dari obat-obat yang Beredar di Indonesia. Edisi 8. Grafidian. Jaya.
- Anonimus, 1993. Martindale " The Extra Pharmacopoeia ". 30<sup>th</sup> edition. London.
- Beverlander, G. and J.A. Ramaley, 1988. Dasar-dasar Histologi. Terjemahan : Gunarso, W. Erlangga. Jakarta.
- Delman, H. D. 1971. Veterinary Histology An Outline Text Atlas. Lea and Fabiger. Philadelphia.
- Fuquay, J.W. and H.J. Bearden, 1980. Applied Animal Reproduction. A Prentice -Hall Company. Reston. Virginia.
- Goodman and Gilman. 1992. The Pharmacological Basis of The Therapeutic. Eight Edition. Vol II. Maxwell Macmillan International Ed. Pergamon Press.
- Gosh, M.N. 1971. Fundamentals of Experimental Pharmacology Scientific Book. Agency Calcuta.
- Hafez, E.S.E. 1970. Reproduction ana Breeding Tehniques for Laboratory Animals. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hardjopranjoto, S. 1980. Fisiologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Junquiera, L. C. and J. Carneiro. 1980. Histologi Dasar. Edisi 3. Terjemahan Adji Dharma. ECG Penerbit BUKU Kedokteran. Jakarta.
- Katzung, B.C.. 1989. Basic and Clinical Pharmacology. 4<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall International Inc.
- Kusriningrum Rochiman, 1989. Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga.
- Lesson, T.S. and C.R. Lesson. 1981. Histology. W.B. Saunder Company. Philadelphia.
- Mutscler, E. 1991. Dinamika Obat. Terjemahan : Widiyanto, M.B. dan A.S. Ranti. Edisi 5. ITB. Bandung.

- Partodiharjo, S. 1982. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Veteriner. IPB. Mutiara. Jakarta.
- Rodrigues-Rigau, L,J and E. Steinberger, 1982. The Testis and Spermatogenesis. In : Zaneveld, L. J. D and R. T. Chartterton. ed. Biochemistry of Mamalian Reproduction. A Wiley-Interscience publication John Wiley and son. Canada.
- Salisbury, G.W. and M.L. Vandenmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan : Djanuar, R. Gadjah Mada University Press.
- Setiabudi. R dan B. Bahri. 1987. Obat Jamur. In.: Farmakologi dan Terapi. Edisi 3. Bagian Farmakologi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Shuginina, E. A, O. G. Krivosheev, N. S. Potekaev and N. A. Nabatchikova, 1989. The Effect of Nizoral on Hypophyseal Gonadotrophine Function and The Production of Sex Steroid Hormon by The testes and Ovaries in Human Subjects and Experimental Animal. Abstract. Venerol.
- Smith, C. M. and A.M. Reynard. 1992. Textbook of Pharmacology. W.B. Saunder Company.
- Smith, E. L., R. L. Hill, I. R. Lehman, R. J. Lefkowitz, H. Philip and A. White, 1988. Principle of Biochemistry : Mamalian Biochemistry. McGraw-Hill Book Company.
- Smith, J.B. dan Mangkoewidjojo. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Penerbit Universitas Indonesia.
- Stell, R. G. D. and J. H. Torrie, 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biomedik. Edisi. Kedua. Penerbit PT. Gramedia. Pustaka Umum Jakarta.
- Tedja, H. 1993. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Manggis Terhadap Berat dan Gambaran Histologi Testes Mencit. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Toelihere, M. R. 1991. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor. Angkasa. Bandung.
- Turner, C. D and J. T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum. Edisi Keenam. Airlangga University Press.



Wattimena, J. R, N. C. Sugiarto, M. B. Widiarto, E. Y. Sukadi, A. S. Soemadji dan R. Setiadi, 1991. Farmakodinami dan Terapi Antibiotika. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. ITB. Gadjah Mada Press.

Widiarto, M.B. 1991. Antimikotika Ketokonazol. Pharos Buletin. No, 1.

# LAMPIRAN

Lampiran 1. Evaluasi Statistik Sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Mencit Perlakuan

Nomor Mencit	Sel Spermatogonia				
	Po	P1	P2	P3	P4
1	25	23	22	20	21
2	25	22	23	21	21
3	26	23	23	21	21
4	24	24	20	21	20
5	25	24	22	22	21
6	25	22	22	21	21
7	28	23	21	21	17
$\bar{x}$	25	23	22	21	20
SD	1,272	0,816	1,069	0,577	1,496

$$FK = \frac{(5,002 + 4,983 + \dots + 4,172)^2}{5 \times 7} = 780,112$$

$$JKT = 5,002^2 + 4,953^2 + \dots + 4,172^2 - 780,112$$

$$= 1,185$$

$$JKP = \frac{35,151^2 + 33,762^2 + \dots + 31,413^2}{7} - 780,112$$

$$= 1,175$$

$$JKS = 1,185 - 1,175 = 0,01$$

$$KTP = 1,185 : 4 = 0,294$$

$$KTS = 0,01 : 30 = 0,00033$$

$$F_{hitung} = 0,294 : 0,00033 = 890,809$$

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftabel (0,005)
Perlakuan	4	1,175	0,294	890,909*	2,69
Sisa	30	0,01	0,00033		
Total	34	1,185			

Fhitung (890,909) > Ftabel 0,05 (2,69), berarti terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan.

UJI BNT

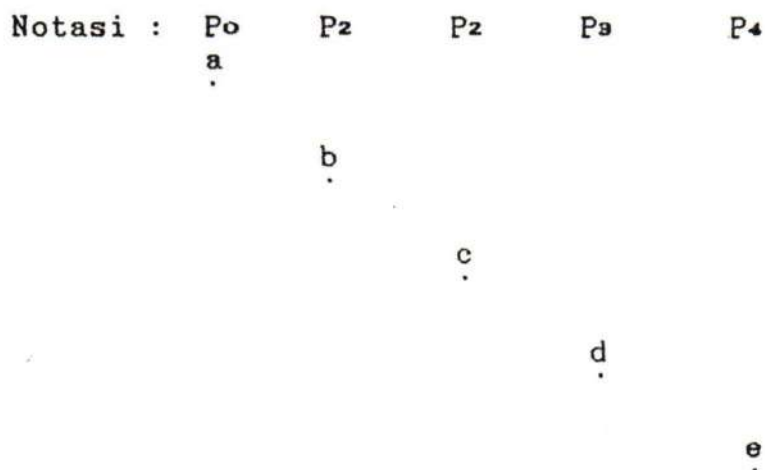
$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t (5\%)_{30} \times \sqrt{\frac{2 \times 0,00033}{7}} \\ &= 0,00014 \end{aligned}$$

Selisih Rata-rata Perlakuan untuk Uji BNT

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Selisih				BNT 5%
		$\bar{x}-P_4$	$\bar{x}-P_3$	$\bar{x}-P_2$	$\bar{x}-P_1$	
P <sub>0</sub>	5,022 <sup>a</sup>	0,535*	0,304*	0,372*	0,204*	0,00014
P <sub>1</sub>	4,818 <sup>b</sup>	0,331*	0,190*	0,168*		
P <sub>2</sub>	4,650 <sup>c</sup>	0,163*	0,022*			
P <sub>3</sub>	4,628 <sup>d</sup>	0,141*				
P <sub>4</sub>	4,487 <sup>e</sup>					

\* berbeda nyata (p < 0,05)

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (p < 0,05)



Lampiran 2 Evaluasi Statistik Sel Spermatoosit Primer dalam Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Perlakuan

Nomor Mencit	Sel spermatoosit Primer				
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
1	44	41	37	36	36
2	43	39	39	38	35
3	44	40	41	37	34
4	51	43	36	38	35
5	45	43	38	38	35
6	45	39	38	36	34
7	43	41	37	37	34
$\bar{x}$	45	41	38	37	34
SD	2,768	1,676	1,623	0,899	0,756

$$FK = \frac{(6,628 + 6,564 + \dots + 5,792)^2}{5 \times 7} = 1365,925$$

$$\begin{aligned} JKT &= 6,628^2 + 6,564^2 + \dots + 5,792^2 - 1365,925 \\ &= 3,206 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{46,908 + 44,741^2 + \dots + 41,180^2}{7} - 1365,925 \\ &= 2,732 \end{aligned}$$

$$JKS = 3,206 - 2,732 = 0,474$$

$$KTP = 2,732 : 4 = 0,683$$

$$KTS = 0,474 : 30 = 0,0158$$

$$F_{hitung} = 0,683 : 0,0158 = 43,228$$

## Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F Hit	F tabel (0,05)
Perlakuan	4	2,732	0,683	43,228*	2,69
Sisa	30	0,474	0,0158		
Total	34	3,206			

Fhitung (43,228) > Ftabel 0,05 (2,69), berarti terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan

## Uji BNT

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t (5\%)_{30} \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0158}{7}} \\ &= 0,0065 \end{aligned}$$

## Selisih Rata-rata Perlakuan Untuk Uji BNT

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Selisih				BNT 5%
		$\bar{X}-P_4$	$\bar{X}-P_3$	$\bar{X}-P_2$	$\bar{X}-P_1$	
P	6,701 <sup>a</sup>	0,818*	0,609*	0,533*	0,309*	0,0065
P	6,392 <sup>b</sup>	0,509*	0,300*	0,221*		
P	6,168 <sup>c</sup>	0,285*	0,076*			
P	6,092 <sup>d</sup>	0,209*				
P	5,883 <sup>e</sup>					

\* berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Notasi :  $P_0$      $P_1$      $P_2$      $P_3$      $P_4$   
           a  
           .  
           b  
           .  
           c  
           .  
           d  
           .  
           e  
           .

Lampiran 3 Evaluasi Statistik Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Perlakuan

Nomor Mencit	Sel Spermatid				
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
1	156	139	130	125	116
2	153	139	130	126	115
3	162	137	130	123	115
4	156	142	126	127	118
5	154	146	128	124	116
6	154	133	130	126	114
7	154	142	130	126	114
$\bar{x}$	155	141	129	125	115
SD	3,047	2,992	1,573	1,380	1,676

$$FK = \frac{(12,480 + 12,389 + \dots + 10,700)^2}{5 \times 7} = 4650,511$$

$$JKT = 12,480^2 + 12,389^2 + \dots + 10,700^2 - 4650,511$$

$$= 12,002$$

$$JKP = \frac{(87,147)^2 + (83,061)^2 + \dots + (75,367)^2}{7} - 4650,511$$

$$= 11,796$$

$$JKS = 12,002 - 11,796$$

$$= 0,206$$

$$KTP = 11,796 : 4 = 2,949$$

$$KTS = 0,206 : 30 = 0,0068$$

$$F_{hitung} = 2,949 : 0,0068 = 433,67$$

## Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F Hit	F tab (0,05)
Perlakuan	4	11,706	2,949	433,67*	2,69
Sisa	30	0,206	0,0068		
Total	34	12,002			

$F_{hit} (433,67) > F_{tab 0,05} (2,69)$ , berarti terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan

## Uji BNT

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t (5\%)_{30} \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0068}{7}} \\ &= 0,00272 \end{aligned}$$

## Selisih Rata-Rata Perlakuan Untuk Uji BNT

Perlakuan	Rata-rata perlakuan	Selisih				BNT 5%
		$\bar{x}-P_4$	$\bar{x}-P_3$	$\bar{x}-P_2$	$\bar{x}-P_1$	
$P_0$	12,448 <sup>a</sup>	1,682*	1,261*	1,084*	0,583*	0,0027
$P_1$	11,866 <sup>b</sup>	1,099*	0,678*	0,501*		
$P_2$	11,365 <sup>c</sup>	0,598*	0,177*			
$P_3$	11,188 <sup>d</sup>	0,421*				
$P_4$	10,767 <sup>e</sup>					

\* berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Notasi :  $P_0$      $P_1$      $P_2$      $P_3$      $P_4$

a

b

c

d

e



Lampiran 4. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatogonia pada 10 Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Perlakuan

Perlakuan dan Nomor Mencit	Tubulus Seminiferus									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Po-1	22	25	27	24	23	26	21	31	24	28
Po-2	31	26	19	33	24	25	20	23	23	26
Po-3	32	20	23	26	21	21	24	32	24	26
Po-4	29	26	27	27	30	25	26	30	29	28
Po-5	25	24	33	31	18	21	21	25	26	29
Po-6	26	26	22	20	32	26	18	30	29	23
Po-7	24	26	28	31	26	17	25	27	28	18
P1-1	21	30	26	19	21	20	21	22	23	25
P1-2	20	23	24	23	22	21	25	23	21	18
P1-3	28	22	19	24	25	27	21	24	20	22
P1-4	27	24	20	20	29	29	19	21	24	28
P1-5	24	21	26	25	29	27	28	22	19	20
P1-6	24	28	23	19	18	21	20	18	23	26
P1-7	23	21	27	21	24	25	19	27	27	22
P2-1	17	25	28	21	22	17	20	23	24	21
P2-2	22	24	21	21	22	24	20	22	23	23
P2-3	20	21	23	20	21	20	27	26	25	28
P2-4	16	17	20	22	20	21	19	25	21	23
P2-5	21	19	24	28	21	22	24	18	20	21
P2-6	21	21	22	20	23	19	22	23	23	25
P2-7	21	23	23	19	19	21	20	24	21	20
P3-1	26	18	22	20	23	17	22	24	21	24
P3-2	22	23	18	19	24	26	20	22	25	21
P3-3	24	23	21	15	20	24	21	22	21	23
P3-4	25	20	17	26	21	25	22	20	22	23
P3-5	21	26	20	22	19	20	24	20	24	23
P3-6	21	20	17	26	21	25	22	20	22	23
P3-7	20	19	20	20	22	21	25	24	19	23
P4-1	23	21	24	19	18	21	20	19	21	24
P4-2	21	20	22	17	20	19	22	25	20	21
P4-3	25	22	20	19	21	29	22	18	20	20
P4-4	20	21	19	19	18	20	17	24	19	22
P4-5	24	27	23	21	21	20	16	20	19	18
P4-6	20	16	19	26	19	21	22	22	20	19
P4-7	19	20	20	17	21	19	27	26	21	21

Lampiran 5. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatisit Primer dalam 10 Seminiferus Tubulus Mencit Setelah Perlakuan

Perlakuan dan Nomor Mencit	Tubulus Seminiferus									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Po-1	40	46	51	45	42	45	35	53	37	47
Po-2	54	47	32	57	43	41	37	38	39	46
Po-3	57	36	40	45	38	43	42	52	46	41
Po-4	50	49	48	53	53	57	43	54	47	56
Po-5	47	43	51	54	34	36	45	45	46	53
Po-6	47	49	40	37	57	46	32	53	52	41
Po-7	43	46	47	53	49	32	48	46	36	35
P1-1	38	51	46	36	35	37	34	42	39	49
P1-2	35	41	42	44	39	38	41	44	33	37
P1-3	49	37	34	42	41	48	35	40	36	39
P1-4	48	41	36	37	52	35	38	42	51	49
P1-5	43	37	45	46	51	49	52	40	36	37
P1-6	45	41	39	36	35	37	36	37	40	45
P1-7	40	38	47	42	43	33	46	37	48	39
P2-1	26	43	48	36	35	32	37	40	40	38
P2-2	38	42	36	37	39	45	35	38	40	41
P2-3	35	38	41	36	37	36	47	45	44	49
P2-4	29	30	35	37	39	36	34	43	36	42
P2-5	35	34	43	49	36	39	41	34	35	37
P2-6	38	37	37	36	40	34	39	41	36	43
P2-7	37	42	41	35	34	37	34	40	36	35
P3-1	45	34	36	37	41	27	39	42	34	25
P3-2	38	39	31	35	42	45	35	40	42	36
P3-3	43	41	37	25	34	45	38	34	35	29
P3-4	42	35	39	34	29	46	36	38	42	39
P3-5	37	45	34	38	34	32	35	42	40	39
P3-6	34	34	29	44	36	41	38	32	37	38
P3-7	35	33	38	35	39	37	43	42	40	33
P4-1	39	36	40	33	35	29	36	33	37	38
P4-2	37	35	36	29	34	38	32	30	43	36
P4-3	43	38	32	31	36	30	37	29	36	34
P4-4	34	37	34	31	36	30	37	29	36	39
P4-5	39	45	32	36	38	34	29	35	31	29
P4-6	34	29	34	44	33	36	34	37	36	28
P4-7	33	35	35	35	28	34	34	45	31	27

Lampiran 6. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Spermatid dalam 10 Tubulus Seminiferus Mencit Setelah Perlakuan

Perlakuan dan Nomor Mencit	Tubulus Seminiferus									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Po-1	147	163	171	159	154	160	125	174	140	167
Po-2	171	168	126	177	142	162	151	136	157	149
Po-3	178	168	149	168	156	138	165	172	154	169
Po-4	152	158	164	172	159	146	167	164	144	136
Po-5	164	159	161	174	121	132	142	162	153	175
Po-6	148	164	144	135	176	143	147	165	169	149
Po-7	156	143	145	159	169	132	149	162	170	158
P1-1	134	160	145	129	135	126	127	137	145	152
P1-2	130	144	146	139	137	149	145	135	122	145
P1-3	151	135	127	144	143	145	129	136	133	132
P1-4	147	136	129	139	154	142	135	144	150	149
P1-5	152	132	151	156	154	157	161	149	132	128
P1-6	151	146	142	129	126	139	134	136	143	147
P1-7	142	136	153	127	138	135	142	147	152	149
P2-1	119	136	144	136	133	117	129	125	130	132
P2-2	129	132	125	127	135	141	122	126	134	131
P2-3	119	121	126	129	128	131	139	130	135	145
P2-4	109	110	131	132	136	126	119	136	122	144
P2-5	130	123	136	141	129	126	136	121	119	120
P2-6	132	127	133	124	126	121	135	138	125	130
P2-7	135	140	134	119	127	131	121	135	126	132
P3-1	132	115	129	123	134	116	125	130	128	114
P3-2	126	130	115	120	129	135	122	127	132	123
P3-3	133	127	121	110	120	134	125	119	116	126
P3-4	131	122	132	124	118	134	127	123	135	121
P3-5	125	135	118	127	120	118	121	133	126	129
P3-6	129	124	117	135	126	131	127	119	132	117
P3-7	119	118	126	124	129	123	133	134	130	120
P4-1	127	121	129	114	112	93	120	112	123	116
P4-2	123	120	123	96	121	127	109	108	128	123
P4-3	129	121	102	117	124	105	122	101	126	107
P4-4	115	125	118	106	114	124	110	131	118	117
P4-5	118	131	113	120	117	121	101	124	116	98
P4-6	113	97	114	133	110	120	120	125	119	93
P4-7	113	118	116	119	96	126	117	130	105	107

## Lampiran 7. Pembuatan Sediaan Histologis Testes

Pembuatan sediaan histologis testes dilaksanakan di Laboratorium Klinik Diagnostik "SUMBAWA" Jalan Biliton no 75 Surabaya, dengan cara sebagai berikut :

### a. Fiksasi dan Pencucian

Tujuan : Mencegah terjadinya degenerasi pasca mati.  
Mematikan kuman atau bakteri.  
Meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna.  
Menjadikan jaringan lebih keras sehingga mudah dipotong.  
Meningkatkan indek refraksi berbagai komponen jaringan.

Reagen : Larutan Bouin

Cara Kerja : Setelah diadakan seksi kedua testes dimasukkan ke dalam larutan Bouin selama 24 jam kemudian dicuci dengan air kran yang mengalir selama 30 menit.

### b. Dehidrasi dan Clearing

Tujuan : Untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Reagen : Alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II.

Cara Kerja : Testes dimasukkan dalam reagen dengan urutan : alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II masing-masing selama 30 menit.

c. Impregnation (penanaman)

Tujuan : Untuk menginfiltrasi jaringan

Reagen : Parafin I dan II

Cara Kerja : Jaringan dimasukkan dalam parafin I yang mencair kemudian dioven 30 menit selanjutnya dimasukkan ke dalam parafin II dan dimasukkan lagi ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 58-60 derajat Celcius.

d. Pembuatan balok parafin

Tujuan : Untuk memudahkan pemotongan jaringan

Reagen : Parafin cair

Cara Kerja : Menyediakan cetakan besi yang sebelumnya diolesi gliserin untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan. Setelah parafin dituang pada cetakan, testis dimasukkan dengan pinset dan ditunggu sampai parafin membeku.

e. Pengirisan tipis

Tujuan : Memotong jaringan sehingga mudah dilihat di bawah mikroskop

Alat : Mikrotom

Cara Kerja : Pemotongan diambil secara random, tiap kali pemotongan diambil satu dengan tebal lima sampai tujuh mikron kemudian dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu 20-30 derajat Celcius sampai jaringan berkembang dengan baik dan mekar kemudian diletakkan pada gelas obyek yang telah di-

olesi dengan putih telur kemudian dikeringkan di atas hot plate.

#### f. Pewarnaan

**Tujuan** : Memudahkan melihat perubahan jaringan, disini digunakan pewarna Haematoxylin Eosin. Dengan pewarnaan HE dapat dilihat dengan jelas bentuk masing-masing selnya, dimana sitoplasma berwarna merah, sedangkan intinya berwarna biru.

**Cara Kerja** : Pewarnaan HE dilakukan dengan metode Harris, dengan cara sebagai berikut : testis yang telah kering dimasukkan ke dalam xylol I selama tiga menit dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xylol II, kemudian alkohol absolut I dan II, alkohol 96%, 80%, 70% dan air kran masing-masing satu menit. Selanjutnya testis dimasukkan ke dalam zat warna haematoxylin selama 5-10 menit, air kran 2-5 menit, asam alkohol 3-10 celupan, air kran 4-7 celupan, amoniak enam celupan, air kran 10 menit, aquadeest secukupnya, zat warna eosin selama seperempat menit, kemudian dimasukkan lagi ke dalam aquades secukupnya. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alkohol 70%, alkohol 80% masing-masing selama setengah menit, alkohol 96%, alkohol absolut I dan II

selama satu menit. Terakhir dimasukkan ke dalam xylol I dan II masing-masing selama 1-2 menit selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa pewarnaan.

g. Penutupan dengan gelas penutup

Obyek glass ditutup dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi dengan canada balsem yang dicampur dengan sodium karbonat.