

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental* dengan *post test group* untuk melihat efek pemberian susu kedelai terhadap jumlah sel epitel prostat pada tikus jantan strain wistar (*Rattus novergicus*), dari umur enam minggu sampai empat setengah bulan.

#### 4.2 Obyek dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Obyek

Obyek yang dipakai adalah tikus jantan strain wistar (*Rattus novergicus*) dengan kriteria sehat, berumur enam minggu dan berat sekitar 100 gram, setiap tikus diberi tempat yang cukup untuk menghindari ketidaknyamanan maupun sakit.

##### 4.2.2 Sampel

Pengambilan sampel akan dilakukan dengan teknik randomisasi, sehingga setiap tikus akan mempunyai kesempatan yang sama dalam mendapatkan dosis susu kedelai.

##### 4.2.3 Perkiraan Jumlah Sampel

Total jumlah sampel yang dipakai dihitung dengan rumus :

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

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

$$3 (r-1) \geq 15$$

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 18/3$$

$$r \geq 6 \text{ (Supranto J, 2000)}$$

dimana,  $t$  = banyaknya intervensi, dan  $n$  = banyaknya sampel yang dipakai. Eksperimen ini memiliki empat kelompok, jadi sampel yang diperlukan berjumlah dua puluh empat. Berarti setiap kelompoknya memerlukan sedikitnya enam tikus.

#### 4.2.4 Karakteristik Sampel

Karakteristik sampel berupa tikus (*Rattus novergicus*) jantan, berumur 6 minggu, berat tubuh sekitar 100 gram, sehat dengan indikasi bergerak aktif, bulu bersih dan mata jernih, tidak cacat.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada studi ini adalah jumlah sel epitel prostat tikus jantan (*Rattus novergicus*) strain wistar yang diberi diet susu kedelai.

#### 4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada studi ini adalah susu kedelai dalam berbagai konsentrasi.

### 4.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1 Lokasi

Penelitian ini dikerjakan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.4.2 Waktu

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2013 sampai Januari 2014.

## 4.5 Alat Dan Bahan Penelitian

### 4.5.1 Persiapan Pemberian Susu Kedelai

Alat yang dibutuhkan yaitu alat timbangan, tabung erlenmeyer, corong, dan batang pengaduk. Dan bahan yang dibutuhkan yaitu bubuk susu kedelai, dan air aquades. Pemberian susu kedelai menggunakan alat sonde.

### 4.5.2 Persiapan Diet Normal

Alat yang dibutuhkan yaitu alat timbangan, wadah/tempat makanan. Bahan yang dibutuhkan yaitu makanan ternak PAR-S, tepung terigu, dan air secukupnya.

### 4.5.3 Pembedahan dan Persiapan Slide Histopatologis

Alat yang dibutuhkan yaitu wadah plastik dengan penutupnya, pisau operasi, kapas, gunting, pinset, mikroskop, mikrotom, dan kamera. Dan bahan yang diperlukan yaitu kloroform, blok parafin, formalin 10%.

### 4.5.4 Pemeliharaan Tikus

Alat pengukur berat badan (sartorius), kandang tikus, penutup kandang, sekam/serbuk kayu, botol minuman.

## 4.6 Definisi Operational

1. Isoflavon adalah salah satu jenis *phytoestrogen* yang terdapat pada susu kedelai.
2. *Phytoestrogen* adalah senyawa yang memiliki sifat yang mirip dengan estrogen, dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen di dalam tubuh.
3. *Endocrine disruptors* adalah suatu unsur eksogen yang dapat menimbulkan efek yang kurang menguntungkan bagi kesehatan karena dapat mengganggu fungsi dari endokrin.
4. Hiperplasia adalah bertambahnya jumlah sel dari jumlah normal.

5. Susu kedelai adalah salah satu hasil olahan kacang kedelai yang berupa susu, diberikan pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar selama 90 hari.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Aklimatisasi Tikus**

Tikus dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama tujuh hari pada temperatur ruangan konstan (20-25°C) dengan siklus terang-gelap. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik, masing-masing untuk empat sampai lima ekor tikus, ditutup dengan kawat kassa dan diberi alas sekam yang diganti setiap tiga hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 45 gr/hari/ekor. Diet normal terdiri 67% Comfeed PAR-S, 33% terigu dan air yang diberikan secara *ad libitum*.

##### **4.7.2 Pembagian Kelompok Tikus**

Tikus (*Rattus novergicus*) jantan dibagi menjadi empat kelompok. Dengan satu kelompok sebagai kontrol (tanpa perlakuan) dan ketiga lainnya diberi susu kedelai dengan dosis yang berbeda. Rincian pembagian kelompok sebagai berikut:

Kelompok Kontrol – Diberikan diet normal.

Kelompok P1 – Diberikan diet normal dan susu bubuk kedelai dengan dosis 7,1 gr/kgBb/hari.

Kelompok P2 – Diberikan diet normal dan susu bubuk kedelai dengan dosis 14,2 gr/kgBb/hari.

Kelompok P3 – Diberikan diet normal dan susu bubuk kedelai dengan dosis 21,3 gr/kgBb/hari.

#### 4.7.3 Persiapan Susu Kedelai

Susu kedelai dibuat dengan mencampur susu kedelai bubuk yang memiliki kandungan isoflavon dengan air secukupnya. Kandungan isoflavon yaitu 0,353 mg per 1 gram susu kedelai. Dosis susu kedelai yang diberikan kepada masing-masing kelompok (P1, P2, dan P3) didasarkan atas modifikasi metode *Lee et al.*, (2004). Dengan perhitungan sebagai berikut,

$$1 \text{ gr susu} / x \text{ gr susu} = 0,353 \text{ mg isoflavon} / 2,5 \text{ mg isoflavon}$$

$$x \text{ gr susu} = 2,5 \text{ mg} / 0,353 \text{ mg}$$

$$x \text{ gr susu} = 7,1$$

dimana,  $x$  = dosis susu kedelai yang dipakai. Didapatkan dosis susu kedelai kelompok P1 yaitu 7,1 gr/kgBb/hari. Dengan menggunakan kelipatan 7,1, didapatkan dosis susu kedelai untuk kelompok P2 dan P3, masing – masing 14,2 gr/kgBb/hari dan 21,3 gr/kgBb/hari. Susu kedelai dilarutkan dalam air aquades dengan perbandingan 2:1. Setiap dua gram susu kedelai dilarutkan dalam satu mililiter air aquades.

#### 4.7.4 Pemberian Susu Kedelai

Awalnya semua kelompok tikus diberi diet standar selama masa adaptasi yang dilakukan selama satu minggu. Pemberian susu kedelai dilakukan per oral. Tiga dosis berbeda diberikan kepada tiga kelompok tikus. Susu kedelai diberikan dengan menggunakan sonde, dan diberikan mengikuti kemampuan lambung tikus.

#### 4.7.5 Pembedahan Tikus Wistar

Pembedahan dilakukan 3 bulan dari dimuali diberikan dosis, hal ini berdasarkan penelitian *Lee et al* tahun 2011. Prosedur pembedahan ini memberikan rasa yang tidak nyaman pada tikus, oleh karena itu prosedur ini dilakukan di bawah pengaruh anestesi. Obat anastesi yang digunakan adalah eter. Pemberian eter dilakukan secara inhalasi pada tangki tertutup. Tikus yang telah di anestesi kemudian ditempatkan pada meja bedah dan difiksasi. Sebelum

pembedahan, dilakukan pemeriksaan bagian luar terlebih dahulu. Setelah itu mengidentifikasi bagian skrotum. Prostat berada pada kantung skrotum. Kantung skrotum kemudian di insisi secara hati-hati hingga terlihat prostat. Kemudian bagian prostat diambil dan dipisahkan dengan epididimis dan vas deferens. Setelah itu prostat ditimbang beratnya dan disimpan pada tabung yang berisi formalin 10%.

#### 4.7.6 Pembuatan Slide Histopatologis Prostat

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin blok. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan prostat tikus dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted paraffin* : *xylol* = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. *Melted paraffin* dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk kubus lalu ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam paraffin tersebut kemudian disiram lagi dengan *melted paraffin* secukupnya.

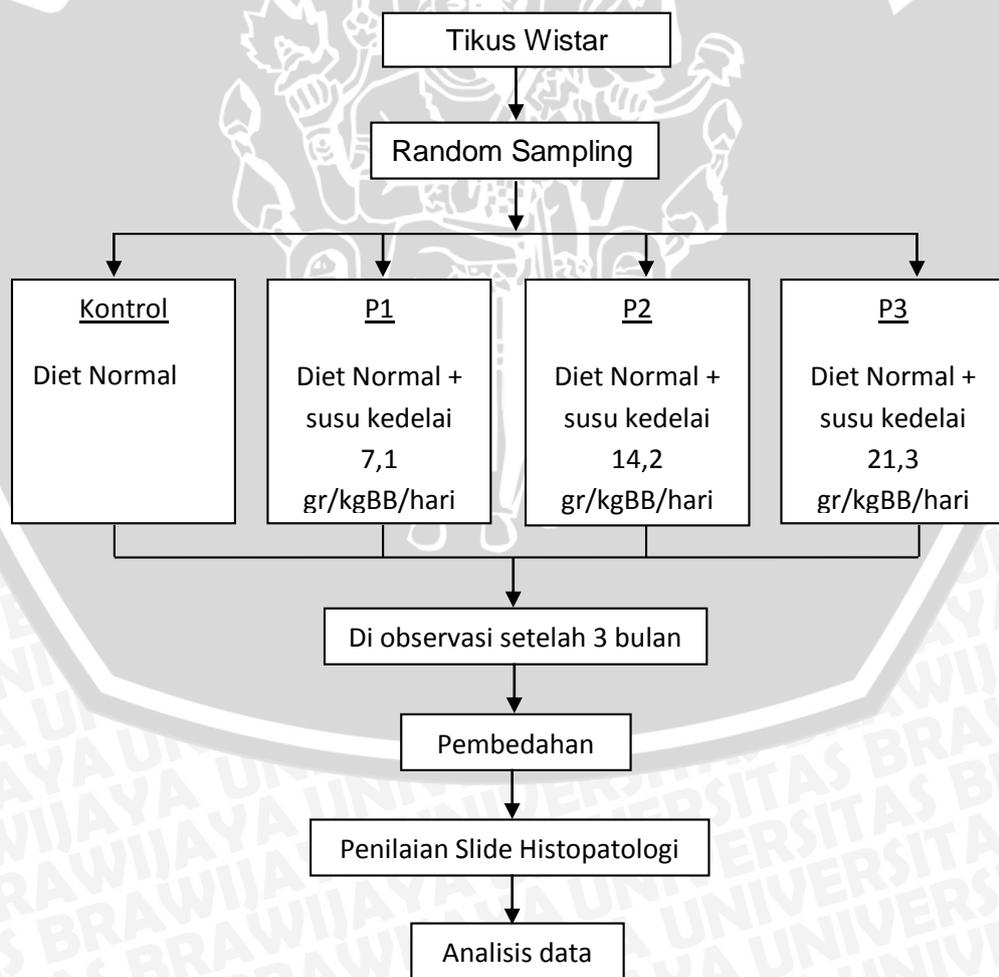
Blok paraffin dibiarkan sampai dingin dan dikeluarkan dari cetakannya. Bagian blok yang dibelakang dilekatkan pada kayu pemegang blok pada mikrotom kemudian posisi indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan (6-8 mikrometer) diatur. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita, ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan diatas permukaan air hangat (30-40°C) secara lembut dan tanpa lipatan. Gelas objek dilapisi dengan lapisan putih telur : gliserol = 1:1 sebagai lapisan tipis dan biarkan kering (untuk merekatkan sediaan). Pita paraffin dan pita tersebut diangkat dengan gelas objek. Gelas objek diletakkan di atas *steamer* hangat (agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan) kemudian dibiarkan kering dan sediaan melekat erat (1 hari).

Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan ke dalam xylol selama 3 x 5 menit lalu dikeringkan. Hasil diamati pada mikroskop untuk mengetahui progresivitas kelainan prostat.

#### 4.7.7 Penilaian Slide Histopatologis Prostat

Slide histopatologis diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. setiap slide histopatologis diamati sebanyak 10 lapang pandang. Diharapkan dengan menghitung epitel yang terdapat dalam 10 lapang pandang, data yang diperoleh akan lebih representatif

#### 4.8 Alur Penelitian



**Gambar 4.1** Alur Operasional Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Data yang diharapkan adalah jumlah sel epitel prostat. Pengamatan jumlah sel epitel prostat dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya. Kemudian jumlah sel epitel prostat dianalisa menggunakan program komputer dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p=0,05$ ) dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Yang dilakukan pertama adalah Uji Asumsi Data, Uji Normalitas dan Homogenitas Data. Jika sebaran data normal dan varian data homogen, maka dilanjutkan dengan uji hipotesis komparatif dan korelatif Parametrik, uji *One-way ANOVA*, *Post Hoc test* (*uji Least Significant Difference*) dan uji korelasi *Pearson*. Jika sebaran data tidak normal dan atau varian data tidak homogen, maka digunakan uji Non Parametrik, *Kruskal Wallis*, *Mann Whitney*, dan *Korelasi Spearman*.