

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental study* dengan *post test only group design*. Hewan coba terbagi menjadi 4 kelompok, yakni kelompok kontrol negatif/tanpa perlakuan (KN), kelompok perlakuan 1 (KP1), kelompok perlakuan 2 (KP2), dan kelompok perlakuan 3 (KP3). Rinciannya adalah sebagai berikut :

KN : hewan coba tanpa diberi perlakuan apa pun

KP1 : hewan coba diberi larutan Cadmium Acetate Dihydrate dengan dosis harian 0,03 ppm

KP2 : hewan coba diberi larutan Cadmium Acetate Dihydrate dengan dosis harian 0,06 ppm

KP3 : hewan coba diberi larutan Cadmium Acetate Dihydrate dengan dosis harian 0,09 ppm

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina yang dipelihara di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

Kriteria inklusi hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah usia 10-12 minggu dengan berat badan 180-250 gram, kondisi yang sehat ditandai gerakan aktif. Pengambilan sampel menggunakan metode Pengambilan Acak Sederhana/ *Simple Random Sampling*.

### 4.2.3 Jumlah Sampel

Penentuan jumlah sampel menggunakan rumus Pengambilan Acak Sederhana/*Simple Random Sampling*  $n(p-1) \geq 15$  dengan  $n$ =jumlah pengulangan dan  $p$ =jumlah perlakuan. Jumlah perlakuan adalah 4 dimana 1 kelompok kontrol negatif dan 3 kelompok diberikan Cadmium dengan dosis yang berbeda.

Didapatkan hasil perhitungan sebagai berikut :

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

$$n \geq 15/3$$

$n \geq 5$ , jadi perlu dilakukan 5 kali pengulangan

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah pemberian cadmium dengan dosis harian 0,03 ppM, 0,06 ppM, 0,09 ppM.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian adalah ekspresi IL-1 $\beta$  pada uterus dengan menggunakan metode imunohistokimia.

#### 4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali penelitian adalah kandungan logam lain maupun zat kimia tertentu yang bisa berinteraksi dengan Cadmium dan ikut terbawa dalam makanan maupun minuman hewan coba. Oleh karena itu, pemberian air minum menggunakan air mineral *Aqua* dan makanan menggunakan jenis makanan yang sama. Pemberian air minum dan makanan yang sama tersebut dilakukan pada semua kelompok baik kontrol maupun perlakuan.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan pembedahan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang. Pembuatan slide preparat organ untuk imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi (PA) FKUB. Pengukuran ekspresi IL-1 $\beta$  dilakukan di Laboratorium Biokimia FKUB. Penelitian dilaksanakan antara bulan Agustus sampai Februari 2013.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 4.5.1.1 Bahan Perlakuan

Cadmium Acetate Dihydrate (rumus kimia= $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) bermerk dagang Merck KGaA. Massa senyawa relatif (Mr) adalah 266,52 g/mol dengan kandungan aktif 100%. Bahan diproduksi oleh E-Merck Germany. Bahan berbentuk kristal dalam kemasan botol plastik 500 g.

##### 4.5.1.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) bergalur wistar yang didapat dari Lab. Fisiologi FKUB.

##### 4.5.1.3 Pakan Hewan Coba

Bahan pakan hewan coba adalah pellet standar yang terdiri dari campuran antara pakan ayam 66,6% dan tepung terigu 33,4%. Berat pakan yang diberikan per hari adalah 50 g. Air minum menggunakan *Aqua* dalam kemasan galon.

#### 4.5.1.4 Pemeriksaan Imunohistokimia Uterus

##### 4.5.1.4.1 Pemrosesan Jaringan

Formalin 10% sebanyak 1 liter

##### 4.5.1.4.2 Pembuatan Blok Parafin

Alkohol 80% 1 liter, alkohol 95% 1 liter, alkohol 100% 1 liter, xylol 2 liter, paraffin sebanyak 500 mg.

##### 4.5.1.4.3 Pengukuran Ekspresi IL-1 $\beta$

Xylol, ethanol 100%, 90%, 80%, 70%, 30%, aquades steril, *Posphate Buffer Saline* (PBS, pH 7,4), *Fetal Bovine Serum* (FBS), antibodi primer *Interleukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), antibodi sekunder (*gout-anti rabbit IgG biotin labeled*), antigen retriviral, *buffer sitrat* pH 6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Triton* 0,25%, *Strep avidin-Horse Radin Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino Benezidine* (DAB), *Mayer*, parafin, formalin

#### 4.5.2 Alat Penelitian

##### 4.5.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang berukuran 20cm×30cm×15cm, terbuat dari bahan plastic dengan tutup kawat. Tempat minum dari plastik berukuran 50 ml dilengkapi dengan saluran dan bola dari besi di ujungnya untuk tempat keluarnya air. Tempat penyimpanan air minum dengan galon yang diproduksi oleh produsen Aqua dilengkapi juga dengan pemompa air

##### 4.5.2.2 Pembuatan Larutan Cadmium Acetate

Timbangan analitik, botol timbang 10 ml, spatula, botol semprot 250 ml, corong penyaring, labu ukur 100 ml, pipet mikro dan autoklaf

#### 4.5.2.3 Pemberian perlakuan

Pemberian kadmium secara per oral menggunakan sonde dengan *container* ukuran 5 ml, sarung tangan

#### 4.5.2.4 Pembedahan Hewan Coba

Pisau bedah, gunting organ, papan bedah

#### 4.5.2.5 Pembuatan Slide Preparat dan Pengukuran Ekspresi IL-1 $\beta$

Botol organ 28 buah, *chamber*, *water bath*, mikroskop, *block holder*, *object glass*, *hot plate*, kuas, pisau mikrotom, inkubator, kamera

### 4.6 Prosedur Penelitian

#### 4.6.1 Pemeliharaan

Hewan coba diletakkan di masing-masing kandang (satu kandang untuk satu hewan). Semua kandang diletakkan di tempat hewan di sebelah barat daya dari Laboratorium Fisiologi FKUB. Pakan dan minum diletakkan di atas tutup yang terbuat dari kawat. Suhu ruangan adalah 26-27°C (suhu kamar) dengan pencahayaan dinyalakan hanya jika peneliti maupun peneliti lain akan menggunakan kandang laboratorium. Pemberian pakan dan minum dilakukan harian dengan membuang sisa makan dan minum pada hari sebelumnya. Sekam diganti seminggu 2 kali.

#### 4.6.2 Aklimatisasi

Aklimatisasi/pengadaptasian terhadap hewan coba dilakukan selama 5 hari. Selama proses adaptasi dilakukan observasi terhadap hewan coba dan pemberian pakan serta air minum.

#### 4.6.3 Pemberian Perlakuan

Kadmium asetat diberikan per oral selama 45 hari. Pemberian dilakukan tiap pagi jam 09.00 WIB. Pemberian dibantu oleh laboran dari Laboratorium Fisiologi FKUB.

#### 4.6.4 Euthanasia dan Pembedahan Hewan Coba

##### 4.6.4.1 Persiapan Alat, Bahan, dan Hewan Coba

Peralatan pembedahan dipersiapkan dan botol organ diisi dengan formalin 10% sampai tigaperempat botol organ. Kandang-kandang hewan coba dimasukkan ke laboratorium

##### 4.6.4.2 Euthanasia Hewan Coba

Hewan coba dibius dengan ketamin *intramuscular* dengan jumlah pemberian dosis per hewan coba 5 mg. Pembedahan dilakukan apabila dari observasi didapati hewan coba tidak bergerak

##### 4.6.4.3 Proses Pembedahan Hewan Coba

Hewan yang sudah tidak bergerak diletakkan di atas papan bedah dengan perut menghadap ke atas. Hewan coba difiksasi dengan menancapkan *needle* pada telapak keempat kakinya. Perut dibuka dengan hati-hati dengan insisi sagital menggunakan pisau bedah, lalu rongga peritoneum dibuka. Uterus dapat diambil dengan menggeser usus halus dan membuka lapang pandang. Jaringan yang mengikat uterus dapat dipotong dengan gunting jaringan. Organ lalu dimasukkan ke botol organ yang telah diisi formalin untuk difiksasi.

##### 4.6.4.4 Pembuatan Slide Preparat Uterus

Pembuatan slide preparat uterus dilakukan oleh laboran dari Laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Adapun langkah-langkah yang dilakukan

antara lain: dehidrasi, *claring*, parafinasi, pembuatan blok, dan pemasangan ke *object glass*.

#### 4.6.4.5 Pengecatan Imunohistokimia

Metode pengukuran ekspresi IL-1 $\beta$  dilakukan dengan pengecatan imunohistokimia berdasarkan metode yang dilakukan Suryani dkk. (2013) dengan modifikasi. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4
2. Slide ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit
3. Slide dicuci lagi dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali
4. Preparat diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam
5. Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali
6. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibody primer anti rat IL-1 $\beta$  bermerek Santa Cruz selama semalam pada suhu 4 °C
7. Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali
8. Slide ditetesi dengan SA-HRP (*Strep avidin-Horse Radin Peroxidase*) kemudian preparat diinkubasi selama 40 menit
9. Slide dicuci dengan PBS 7,4 selama 5 menit tiga kali ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzedine*)
10. Preparat diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali
11. Counterstaining dilakukan dengan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit, dicuci dan dikeringkan.
12. Preparat di-*mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*
13. Preparat positif mengekspresikan IL-1 $\beta$  apabila terdapat warna coklat pada preparat.

14. Slide preparat yang telah dicat difoto dengan menggunakan kamera mikroskop Olympus dengan perbesaran 400X. Foto disimpan dalam format jpeg.

#### 4.6.4.6 Pengukuran Intensitas Resiprokal IL-1 $\beta$

Penghitungan reciprocal intensity dilakukan dengan metode yang dilakukan Nguyen *et al.* (2013). Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut :

1. Setiap slide yang telah dicat imunohistokimia (IHK) dari masing-masing kelompok difoto sebanyak 5 lapang.
2. Foto dibuka dengan program *Adobe Photoshop CS3* dalam setting *RGB*.
3. Pada masing-masing lapang foto, 3 sel representatif dipilih. Sitoplasma sel tersebut dibuatkan kotak dengan *rectangular marquee tool* berukuran 100 *pixels* berdasarkan metode yang dilakukan Matkowskyj *et al.* (2000). Sehingga pada satu slide akan didapati 15 sampel analisis (3 sel x 5 lapang per slide).
4. Intensitas warna (*mean intensity*) pada sampel diketahui dengan melihat histogram.
5. Intensitas resiprokal dihitung dengan rumus  $IR=255-mean\ intensity$  merupakan data kuantitatif yang dianalisis secara statistika.

#### 4.7 Definisi Operasional

1. Cadmium Acetate Dihydrate berbentuk kristal dan berumus kimia  $(CH_3COO)_2Cd \cdot 2H_2O$ . Kristal diproduksi oleh E-Merck Germany dengan merk dagang Merck KGaA dan dikemas dalam bentuk serbuk di botol plastik 500 g
2. Dosis Cadmium Acetate Dihydrate yang terdiri dari KP1=0,03ppM, P.2=0,06ppM, dan P.3=0,09ppM mengacu pada hasil analisis parameter

kualitas air secara fisik terhadap air Sungai Mahakam dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Dalam Negeri tahun 2010

3. Pembuatan larutan Cadmium Acetate dengan melarutkan kristal Cadmium Acetate Dihydrate ke dalam aquades. Karena menggunakan dosis yang relatif kecil maka dibutuhkan pengukuran yang teliti terhadap jumlah Kristal Cadmium Acetate Dihydrate yang dibuat sehingga pembuatan larutan dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang
4. Pembuatan slide preparat organ uterus dilakukan dengan kaca preparat yang diperkaya dengan poly-L-elisin. Kaca preparat bermerek *Thermo Inc.* Pembuatan slide dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
5. Pengecatan IHK IL-1 $\beta$  dengan dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
6. Pengukuran intensitas IHK dilakukan terhadap warna coklat pada sitoplasma sel-sel stroma endometrium. Slide setelah dilakukan pengecatan IHK kemudian difoto dengan kamera mikroskop *Olympus* di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dianalisis dengan program *Adobe Photoshop CS3* untuk diukur *mean intensity*. *Reciprocal intensity* kemudian didapatkan dengan melalui penghitungan dengan *mean intensity* dan menggambarkan ukuran intensitas IL-1 $\beta$ .

#### 4.8 Analisis Data

Data hasil pengukuran diuji homogenitasnya dengan *homogeneity of variance Levene's test* dan normalitas dengan uji Kolmogorov Smirnov. Data memenuhi syarat analisis statistik parametrik apabila signifikansi  $p > 0,05$ . Analisis statistik parametrik dilakukan dengan uji komparatif parametrik *One-Way ANOVA*

dan apabila signifikansi  $p < 0,05$  analisis statistik dapat dilanjutkan dengan *Post Hoc test* dengan LSD. Signifikansi  $p < 0,05$  pada uji homogenitas dan normalitas menunjukkan data tidak memenuhi syarat analisis statistik parametrik, maka analisis data yang dapat dilakukan adalah analisis statistik nonparametrik. Analisis data yang digunakan adalah uji komparatif nonparametrik *Kruskall Wallis* ranked test. Uji dilanjutkan dengan *post hoc tes Mann Whitney ranked test* apabila didapatkan signifikansi  $p < 0,05$ . Baik uji analisis komparatif parametrik maupun nonparametrik digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan pada variabel terikat minimal antara dua kelompok. Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui antara kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan tersebut. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0.

