BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental menggunakan desain *post test group* untuk melihat efek susu kedelai terhadap peningkatan apoptosis sel epitel histopatologi vesika seminalis pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar yang diberikan dari umur enam minggu sampai empat setengah bulan.

4.2 Subyek dan Sampel Penelitian

4.2.1 Subyek

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

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 :

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

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

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

$3r-3 \geq 15$

$3r \geq 15+3$

$r \geq 18/3$

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

$r \geq 6$ (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 apoptosis sel epitel dari vesika seminalis tikus (*Rattus novergicus*) jantan 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 lab. Farmakologi dan lab. Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2013 sampai Januari 2014.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

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 bentuk *phytoestrogen* yang terdapat pada susu kedelai.
2. *Phytoestrogen* adalah zat yang bersifat 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. Susu kedelai adalah salah satu olahan dari kacang kedelai. Susu kedelai diberikan pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar selama 90 hari.
5. Ciri-ciri gambaran struktur histopatologi sel epitel yang mengalami apoptosis adalah warna sel lebih gelap, ukuran sel lebih kecil/mengkerut, dapat juga sel tersebut warnanya lebih gelap dan mengkerut di selubungi oleh vakuola dan sel mengalami perubahan struktur dengan posisi sel terpisah-pisah.

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 – Akan diberikan diet normal.

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

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

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

4.7.3 Persiapan Susu Kedelai

Susu kedelai dibuat dengan menggunakan 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 gr susu / x gr susu = 0,353 gr isoflavon / 2,5 gr isoflavon

x gr susu = 2,5 gr / 0,353 gr

x gr susu = 7,1 gr

dimana, x = dosis susu kedelai yang dipakai. Didapatkan dosis susu kedelai kelompok P1 yaitu 7,1 gr/kgBb/hari. Dengan menggunakan kelipatan 7,1 gr/KgBb/hari 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 akan 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 paling banyak dua kali dalam satu hari (pagi dan sore).

4.7.5 Pembedahan Tikus Wistar

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 di fiksasi. Sebelum pembedahan, dilakukan pemeriksaan bagian luar terlebih dahulu. Setelah itu mengidentifikasi bagian vesika seminalis. Vesika seminalis berada dikanan dan dikiri dari prostat. Vesika seminalis kemudian di insisi secara hati-hati hingga terlihat testis. Kemudian bagian vesika seminalis diambil dan dipisahkan dengan prostat dan vas deferen menggunakan pinset dan gunting bedah. Setelah itu vesika seminalis ditimbang beratnya dan disimpan pada tabung yang berisi formalin 10%.

4.7.6 Pembuatan Slide Histopatologis Vesika Seminalis

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan vesika seminalis 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 : xylen* = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. *Melted parrafin* 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 (30-400C) 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 vesika seminalis.

4.7.7 Penilaian Slide Histopatologi Vesika Seminalis

Slide histopatologis vesika seminalis diamati menggunakan miksroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Setiap slide histopatologis vesika seminalis diamati sebanyak 10 lapang pandang yang kemudian dinilai dengan cara menghitung secara manual sel pada epitel yang normal dan sel epitel yang apoptosis yang terdapat pada slide. Dan setelah di hitung semua (10 lapang pandang per tikus dalam setiap kandang) kemudian data di masukan ke dalam tabel dan di bedakan antara jumlah sel epitel yang normal dan sel epitel yang mengalami apoptosis. Dimana sel epitel yang mengalami apoptosis memiliki ciri-ciri dengan gambaran histopatologi warna sel epitel lebih gelap daripada yang normal, ukuran sel lebih kecil/mengkerut, sel dapat juga berwarna gelap dan mengkerut di selubungi oleh vakuola dan sel mangalami perubahan struktur dengan posisi terpisah-pisah. Setelah itu langsung memulai perhitungan analisis data.

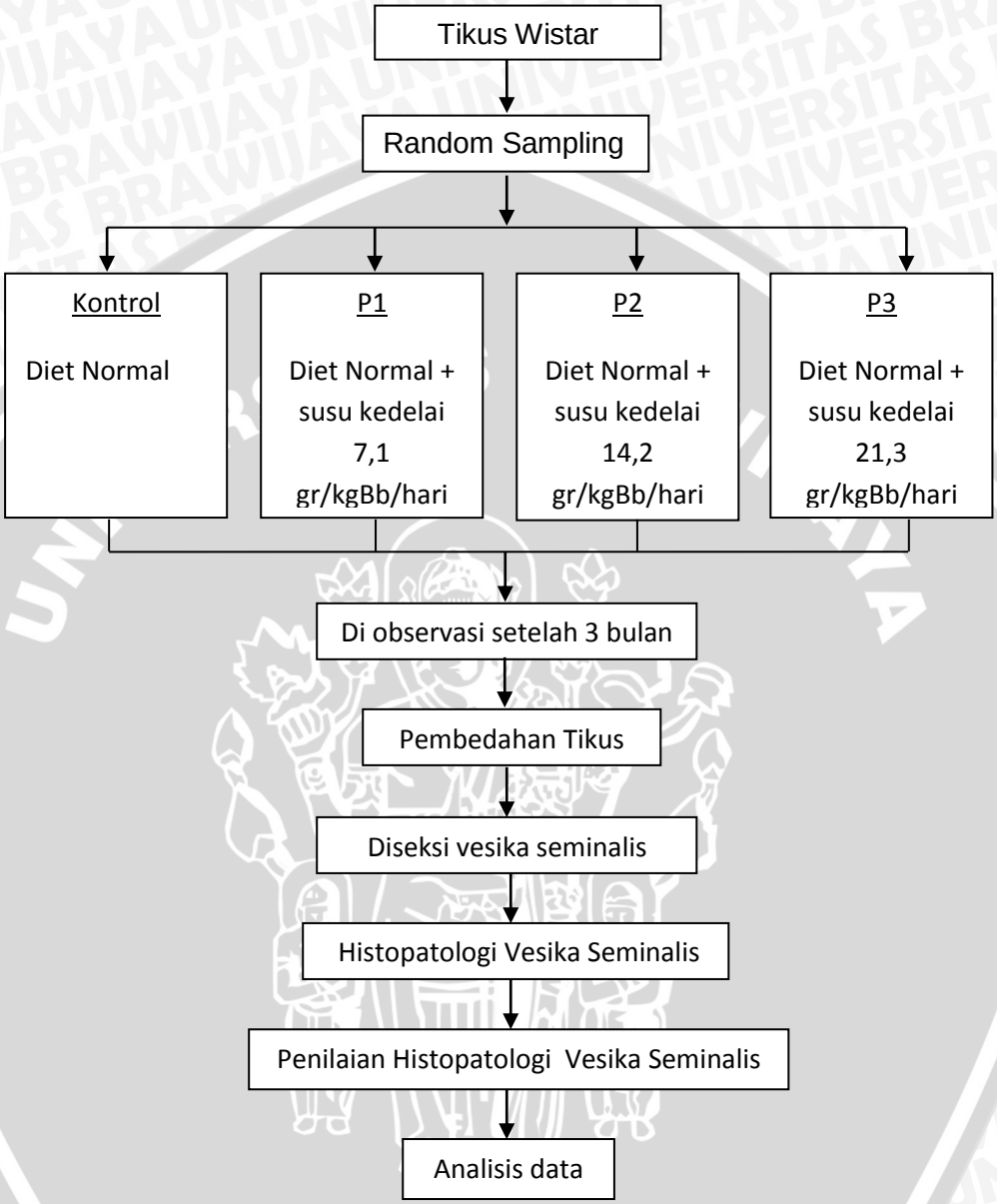
4.8 Pengolahan Dan Analisis Data

Spesimen dibuat dalam bentuk sediaan histo – PA dari vesika seminalis, yang dilakukan pengecatan HE, dan dilakukan pemeriksaan abnormalitas kelenjar vesika seminalis, sel Leydig, *germ cell* dan sperma. Data yang didapatkan pada penelitian akan dianalisis dengan berbagai cara/tes. Pertama, tes homogenitas varian dilakukan untuk mengetahui apakah data ini homogen atau tidak. Kedua, untuk mengetahui perbedaan di setiap intervensi, dilakukan tes *one way* ANOVA digunakan dengan menggunakan software SPSS (Statistical Product and Service Solution). Uji analisis ANOVA adalah uji parametrik, yang digunakan untuk menilai pengaruh dari variable independen terhadap variable dependen secara bersama-sama. H0 (variable independen secara bersama-sama tidak berpengaruh bermakna (signifikan) dan H1 (variable independen secara bersama-sama berpengaruh bermakna (signifikan). H0 diterima dan H1 ditolak jika, nilai signifikansi >0.005, dan sebaliknya H0 ditolak dan H1 diterima jika, nilai signifikansi <0.005. Sebelum dilakukan analisis data dengan uji ANOVA maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan Uji One Way ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji One-way ANOVA adalah populasi yang akan diuji terdistribusi normal, varian dari populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan yang terjadi antar kelompok maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan analisa post hoc multiple comparison test. Metode Post Hoc merupakan uji parametrik yang membandingkan antara 2 kelompok perlakuan. Uji ini menunjukkan nilai perbandingan antar kelompok, untuk menentukan kelompok perlakuan yang memberikan perbedaan yang signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan secara signifikan. Perbedaan yang bermakna, ditunjukkan dengan nilai signifikansi < 0.05. Langkah ketiga menggunakan uji korelasi dengan

menggunakan metode korelasi pearson untuk mengetahui apakah ada kekuatan yang signifikan dari hubungan antara peningkatan dosis susu kedelai dengan peningkatan apoptosis sel epitel pada vesika seminalis tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar. Dan yang terakhir *simple linear regression* dihitung untuk memprediksi nilai variabel tergantung dari variabel bebas.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Operasional Penelitian

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA