

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental menggunakan desain *post test group* untuk melihat efek susu kedelai terhadap spermatogenesis pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan ras wistar yang diberikan dari umur enam minggu sampai empat setengah bulan.

4.2 Obyek dan Sampel Penelitian**4.2.1 Obyek**

Obyek yang dipakai adalah tikus (*Rattus novergicus*) jantan ras wistar 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 :

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

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

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

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

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 spermatogenesis dari tikus (*Rattus novergicus*) jantan ras 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 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 bentuk *phytoestrogen* yang terdapat pada susu kedelai.
2. *Phytoestrogen* adalah senyawa yang memiliki sifat 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. Spermatogenesis adalah proses perkembangan spermatogonium menjadi spermatozoa.
5. Susu kedelai adalah salah satu olahan dari kacang kedelai. Susu kedelai diberikan pada tikus (*Rattus novergicus*) jantan ras wistar.

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,

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

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

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

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 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 selama tiga bulan (Nagao *et al.*, 2001). Pemberian susu kedelai dilakukan dengan alat berupa 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 anestesi 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 skrotum. Testis berada pada kantung skrotum. Kantung skrotum kemudian di insisi secara hati-hati hingga terlihat testis. Kemudian bagian testis diambil dan dipisahkan dengan epididimis dan vas deferens. Setelah itu testis ditimbang beratnya dan disimpan pada tabung yang berisi formalin 10%.

4.7.6 Pembuatan Slide Histopatologis Testis

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan testis 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* : *xylene* = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam.

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 obyek 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 obyek. Gelas obyek 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 obyek dimasukkan ke dalam xylol selama 3 x 5 menit lalu dikeringkan. Hasil diamati pada mikroskop untuk mengetahui progresivitas kelainan testis.

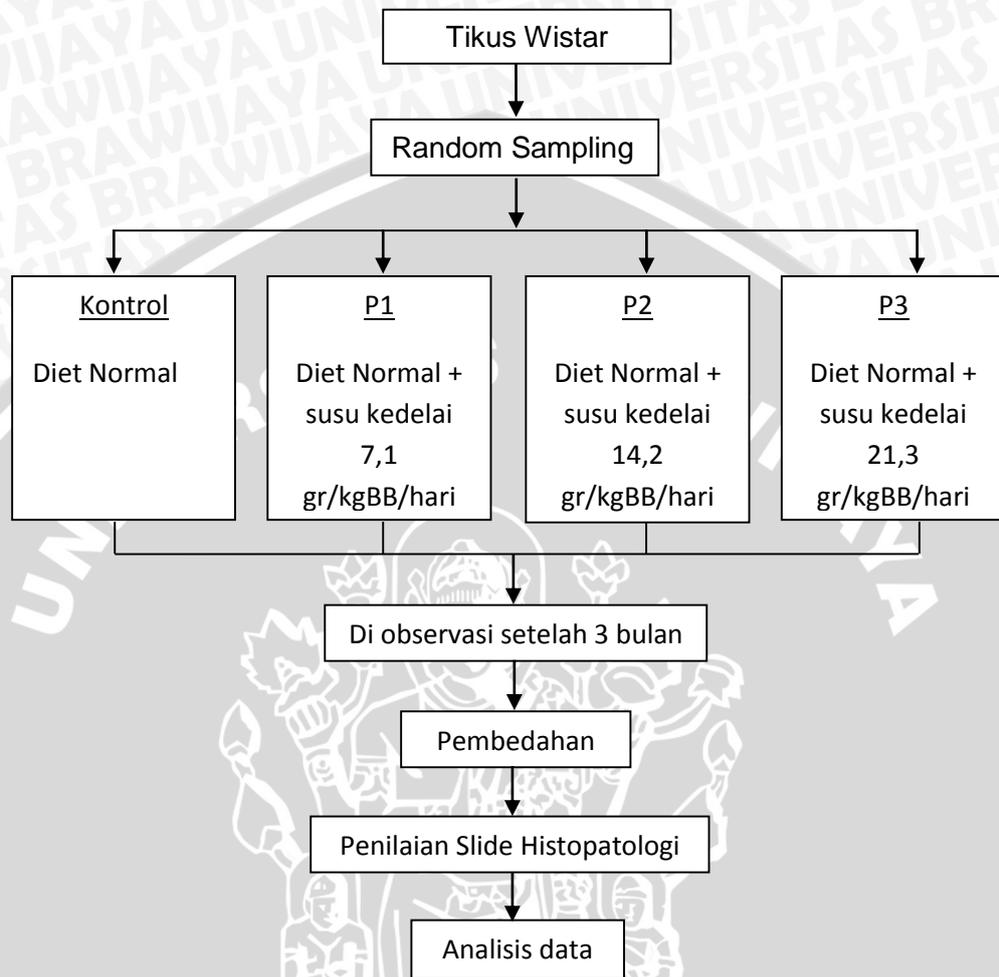
4.7.7 Penilaian Slide Histopatologis Testis

Slide histopatologis diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. setiap slide histopatologis diamati sebanyak 10 lapang pandang yang kemudian dinilai menggunakan kriteria Johnsen's (Koksal *et al.*, 2012). Sistem penilaian kriteria Johnsen's diambil berdasarkan *guidelines* yang di publikasi oleh *European Association of Urology*. Skor diberikan dari 1 – 10 untuk setiap tubulus yang diamati berdasarkan kematangan germ cells. Skor dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kriteria Johnsen's (Johnsen, 1970).

Skor	Kriteria Histologis
10	Full spermatogenesis
9	Spermatogenesis sedikit terganggu, banyak late spermatids, epithelium yang terganggu
8	Kurang dari 5 spermatozoa per tubulus, sedikit late spermatid
7	Tidak ada spermatozoa, tidak ada late spermatids, banyak early spermatid
6	Tidak ada spermatozoa, tidak ada late spermatids, sedikit early spermatid
5	Tidak ada spermatozoa atau spermatids, banyak spermatosit
4	Tidak ada spermatozoa atau spermatids, sedikit spermatosit
3	hanya spermatogonia
2	Tidak ada germ cells, hanya sel sertoli
1	Tidak ada epithelium seminiferus

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Operasional Penelitian

4.9 Pengolahan Dan Analisis Data

Spesimen dibuat dalam bentuk sediaan histo – PA dari testis, yang dilakukan pengecatan HE, dan dilakukan pemeriksaan sel Leydig, *germ cell*, sperma dan lumen tubulus. 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 bantuan program komputer. 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 yang digunakan adalah uji HSD. Pada uji Post Hoc Tukey HSD, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Langkah ketiga menggunakan uji korelasi untuk mengetahui apakah ada kekuatan yang signifikan dari hubungan antara peningkatan dosis susu kedelai dengan spermatogenesis tikus (*Rattus novergicus*) jantan ras wistar. Dan yang terakhir *simple linear regression* dihitung untuk memprediksi nilai variabel tergantung dari variabel bebas.