

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni Rancangan Acak Lengkap dengan pendekatan *post test only-control group* untuk mengetahui skor spermatogenesis *Mus musculus* Balb/c terinduksi D-galaktosa.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2015-November 2016, bertempat di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Riset Fakultas kedokteran Universitas Islam Indonesia serta Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia.

#### **3.3. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.3.1. Populasi Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang mendapatkan sampel bahan biologi tersimpan dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) dengan judul Aktivitas Antipenuaan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura*): Studi Eksperimental pada *Mus musculus* Balb/c terinduksi D-galaktosa. Penelitian sebelumnya menggunakan populasi mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c jantan dengan usia 12 minggu yang dikembangkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

##### **3.3.2. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian yang akan digunakan merupakan bahan biologi tersimpan berupa organ testis kanan *Mus musculus* Balb/C yang telah mendapatkan perlakuan dan didapatkan dari penelitian Sulistyoningrum *et al.*, 2015.

Sampel berupa organ testis yang didapatkan dari penelitian sebelumnya, yaitu penelitian Sulistyoningrum *et al.*, 2015, berjumlah 20 dan terbagi dalam 5 kelompok masing-masing terdapat 4 sampel. Pengelompokan sampel serta

penentuan kriteria inklusi dan eksklusi sesuai dengan perlakuan yang diberikan pada penelitian sebelumnya, dan mendapat 5 macam perlakuan, yaitu:

- a. Kelompok perlakuan K1, kelompok sehat yaitu kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan induksi penuaan maupun induksi vitamin C maupun ekstrak *Muntingia calabura*.
- b. Kelompok perlakuan K2, kontrol negatif yaitu kelompok mencit model penuaan dengan induksi D-galaktosa selama 6 minggu melalui sonde per-oral.
- c. Kelompok perlakuan P1, kontrol positif yaitu kelompok mencit yang diberikan D-galaktosa selama 6 minggu, kemudian diberikan terapi dengan ekstrak air daun kersen sebanyak 35 mg/kgBB selama 4 minggu melalui sonde per-oral.
- d. Kelompok perlakuan P2, yaitu kelompok kelompok yang D-galaktosa selama 6 minggu, kemudian diberikan terapi dengan ekstrak air daun kersen sebanyak 70 mg/kgBB selama 4 minggu melalui sonde peroral.
- e. Kelompok perlakuan P3, yaitu kelompok kelompok yang diinduksi D-galaktosa selama 6 minggu kemudian diberikan terapi vitamin C dengan dosis 28 mg/kgBB melalui sonde per-oral, sebagai pembandingan terapi antioksidan ekstrak air daun kersen untuk menghambat penuaan (Muhamadirad *et al.*, 2013).

Metode induksi penuaan dilakukan dengan pemberian D-galaktosa selama 6 minggu melalui sonde per-oral. Pengukuran keberhasilan induksi penuaan diukur melalui penghitungan kadar Malondealdehyde (MDA).

### **3.4. Variabel Penelitian**

#### **3.4.1. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah skor spermatogenesis mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c.

#### **3.4.2. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian perlakuan, yang dibagi atas:

- a. Ekstrak air daun kersen dosis 35 mg/kgBB

- b. Ekstrak air daun kersen dosis 70 mg/kgBB
- c. Vitamin C 28 mg/kgBB.

### 3.5. Definisi Operasional

#### 3.5.1. Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura*)

Ekstrak air daun kersen merupakan ekstrak daun *Muntingia calabura*, dalam penelitian sebelumnya digunakan dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB yang digunakan pada uji in vivo Mahmood *et al.*, (2011), Zakaria *et al.*, 2012 dan Ibrahim *et al.*, (2012) pada *Rattus norvegicus*. Subyek penelitian sebelumnya adalah mencit, maka perlu dilakukan konversi penghitungan dosis dengan pengalihan dengan faktor konversi dosis tikus ke mencit 0,14 (Paget dan Barnes, 1964) sehingga dosis yang digunakan adalah  $250 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 35 \text{ mg/kgBB}$  dan  $500 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 70 \text{ mg/kgBB}$  (lampiran 2).

Ekstrak air daun kersen 35 mg/kgBB adalah hasil ekstraksi daun kersen dengan air, diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 35 mg/kgBB, satu kali sehari per sonde selama 4 minggu. Ekstrak air daun kersen 70 mg/kgBB adalah hasil ekstraksi daun kersen dengan air, diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 70 mg/kgBB satu kali sehari per sonde selama 4 minggu. Simplisia daun kersen yang digunakan dalam penelitian sebelumnya didapatkan dari pohon yang tumbuh di lingkungan kampus Universitas Islam Indonesia (dekat Asrama mahasiswa Rusunawa) dengan ketinggian yang sama. Tanaman kersen yang digunakan dalam penelitian sebelumnya dideterminasi di Laboratorium Farmakognisi Fakultas MIPA UII (lampiran 3). Pembuatan ekstrak daun kersen dilakukan di Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran UII.

#### 3.5.2. Vitamin C

Vitamin C diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 28 mg/kgBB, satu kali sehari per sonde selama 4 minggu (Sulistyoningrum *et al.*, 2014). Dosis yang digunakan 200 mg/kgBB (Djeffal *et al.*, 2015) adalah dosis vitamin C untuk antioksidan pada *Rattus norvegicus* strain Wistar. Dosis yang digunakan pada penelitian sebelumnya adalah dosis tersebut dikalikan faktor konversi =  $200 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 28 \text{ mg/kgBB}$ .

### 3.5.3. Pengamatan Penghitungan skor spermatogenesis

Pengambilan sampel diamati (dengan perbesaran 400 kali) dari preparat dengan mengambil lima lapang pandang pada setiap preparat. Masing-masing lapang pandang diambil lima tubulus seminiferus secara random yang akan diamati skor spermatogenesisnya. Tubulus yang diamati, yaitu yang memiliki bentuk bulat, utuh, dan tidak terpotong. Pengamatan juga dilakukan antara peneliti dan *inter-observer* secara *single blind* untuk menghindari terjadinya bias. Hasil dari pengamatan tersebut kemudian dirata-rata, dan didapatkan nilai untuk masing-masing preparat, serta dilakukan uji *paired sample t test*. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan antara peneliti dengan pengamat *inter-observer*, maka akan dilakukan pengamatan ulang. Berdasarkan uji *paired sample t test* didapatkan hasil  $p=0,123$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara peneliti dan *inter-observer*. Skor spermatogenesis dihitung berdasarkan kriteria penghitungan *Johnsen's score spermatogenesis*.

## 3.6. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

### 3.6.1. Alat Penelitian

- a. Tempat penampung hewan coba dan organ yang diawetkan
- b. Seperangkat alat untuk preparasi dan pewarnaan HE
- c. Mikroskop
- d. Optilab

### 3.6.2. Bahan Penelitian

- a. Bahan biologi tersimpan organ testis mencit
- b. Bahan-bahan untuk prosesing jaringan dengan metode parafin
- c. Bahan-bahan untuk pewarnaan *Hematoksin Eosin*.

## 3.7. Alur Penelitian

### 3.7.1. Pembuatan dan Pengamatan Preparat Mikroskopis

Adapun proses pembuatan preparat yang akan dilakukan adalah:

- a. Fiksasi

Tujuan dari fiksasi adalah untuk mempertahankan struktur sel sehingga menjadi stabil, baik secara fisik maupun kimiawi. Fiksasi juga mencegah terjadinya dialisis atau pembengkakan sel. Proses fiksasi

dapat dilakukan dengan denaturasi dan presipitasi protein. Selanjutnya membentuk gambaran seperti jala atau spon, yang bertujuan untuk menjaga keutuhan bentuk dan isi sel. Larutan yang biasanya digunakan untuk proses fiksatif adalah buffer 10%.

b. Dehidrasi

Bertujuan untuk mengeluarkan cairan di dalam jaringan setelah proses fiksasi sehingga nantinya jaringan dapat diisi dengan parafin atau zat lain yang akan digunakan dalam pembuatan blok preparat. Proses dehidrasi ini dimulai dengan konsentrasi rendah hingga konsentrasi tinggi. Larutan yang biasa digunakan dalam proses dehidrasi ini adalah alkohol 70% hingga 100%.

c. Pembeningan/ *clearing*

Bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dalam jaringan serta memberikan warna yang bening pada jaringan dan sebagai zat perantara masuknya ke dalam parafin ataupun zat padat. Proses ini biasanya menggunakan zat xylol, tetapi dapat juga dipakai zat-zat lainnya seperti benzol, bensin, kloroform, dll.

d. Infiltrasi parafin

Proses infiltrasi parafin yaitu dengan mengisikan parafin cair dengan suhu 57-59°C ke dalam pori-pori atau rongga-rongga yang ada pada jaringan, setelah ditinggalkan oleh zat pengisi sebelumnya (xylol). Waktu yang digunakan ketika proses infiltrasi parafin ini sebaiknya tidak lebih dari empat jam, dan suhu parafin cair tidak lebih dari 60°C, supaya jaringan yang didapatkan tidak keras dan kering serta ketika dipotong dengan mikrotom tidak pecah-pecah atau bergelombang-gelombang (tebal tipis). Zat lain yang bisa digunakan pada proses infiltrasi

e. Pengeblokan/ *embedding*

Merupakan proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong menggunakan mikrotom. Jaringan yang sudah selesai diproses

kemudian dikeluarkan dan dimasukkan segera ke dalam cetakan blok yang sebelumnya telah diisi dengan parafin cair/ parafin blok.

f. Pemotongan jaringan (*section*)

Blok yang sudah terbentuk didinginkan dahulu sebelum dipotong dengan mikrotom. Blok dimasukkan ke dalam batu es atau dimasukkan dalam *frezer* selama  $\pm 15$  menit. Tahap selanjutnya, blok dijepitkan dalam mikrotom dan dipotong dengan kemiringan  $\pm 30^\circ$  terhadap blok parafin, dengan ketebalan  $\pm 2-5$  mikron. Hasil potongan-potongan tersebut berupa pita-pita, dimasukkan ke dalam *waterbath* yang telah diisi air dengan suhu  $50^\circ\text{C}$  (bisa juga ditambah dengan alkohol 50% untuk menurunkan tegangan permukaan dan membantu merentangkan potongan pita), selanjutnya diambil dengan obyek *glass* dan diberikan nomor dengan pensil sesuai nomor registrasi blok, dibiarkan 5 menit, kemudian diinkubasi.

g. Inkubasi

Inkubasi bertujuan untuk menguapkan air yang terbawa oleh hasil potongan atau pita supaya menempel kuat pada obyek *glass*. Inkubasi dilakukan dengan hot plate, suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$  (dibawah titik cair parafin) selama  $\pm 15$  menit. Preparat yang akan diinkubasi sebaiknya dialasi dengan kertas merang. Obyek *glass* yang sudah terbentuk kemudian diolesi dengan Albumin-gliserin untuk menghindari supaya tidak lepas ketika proses pengecatan berlangsung.

h. Pewarnaan (*staining*)

Merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong supaya memudahkan dalam pengamatan. Pewarnaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Hematoxylin-Eosin (HE). Proses pengecatan tersebut adalah:

- Deparafinisasi

Preparat dimasukkan ke dalam larutan xylol I, II, III (masing-masing 3 menit)

- Rehidrasi

Preparat dimasukkan ke dalam Alkohol 100%, 95%, 80%, 70% (masing-masing 2 menit)

- Preparat dimasukkan dalam air yang mengalir (3 menit)
- Pengecatan inti

Preparat dimasukkan ke dalam larutan Mayer Hemotoksi selama 7 menit

- Kemudian dialirkan dengan air mengalir kembali selama 7 menit
- *Counter stain*

Preparat masuk dalam larutan Eosin selama  $\pm 0,5$  menit

- Preparat dimasukkan ke dalam air wadah I, II, III (masing-masing 3 celup)
- Dehidrasi

Preparat masuk dalam larutan Alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing 3 celup

- *Clearing*

Preparat dimasukkan dalam xylol I, II masing-masing selama 2 menit

- *Mounting*

Preparat diberikan satu tetes Entelan dan *de glass*

Setelah pembuatan preparat, dilakukan pengamatan populasi sel spermatogenik untuk menghitung skor spermatogenesis melalui mikroskop dengan perbesaran 400 kali, pada lima tubulus seminiferus untuk setiap ulangan perlakuan.

### 3.8. Analisis Data

Analisis dilakukan dengan bantuan piranti lunak SPSS<sup>®</sup> 15.00 untuk Windows. Karakteristik hewan coba ditampilkan dalam tabel yang mencantumkan rerata  $\pm$  Standar Deviasi. Uji normalitas dilakukan dengan Uji *Saphiro Wilk*. Data yang diperoleh tidak terdistribusi normal, sehingga dilakukan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui apakah hasil yang diperoleh signifikan, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan

pada masing-masing elompok. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### **3.9. Etika Penelitian**

Pada penelitian akan diusahakan untuk dilakukan langkah-langkah etika penelitian yaitu:

- a. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, maupun kegagalan dan keberhasilan penelitian.
- b. Protokol perlakuan hewan coba telah disetujui oleh komisi etik dengan persetujuan etik nomor 32/Ka.Kom.Et/70/KE/I/2016 (lampiran 2).

