

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba berupa tikus putih betina galur *Sprague dawley*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan Balai Penyelidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III selama 4 (empat) minggu.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi adalah tikus putih betina *Sprague Dawley*. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 tikus putih betina galur *Sprague Dawley* berusia 2 bulan dengan berat antara 100-200 gram yang telah diinduksi DMBA dengan dosis dan kurun waktu tertentu. Tikus-tikus ini diperoleh dari Fakultas Peternakan Institute Pertanian Bogor. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

3.3.2. Sampel

a. Kriteria Sampel

Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih betina *Sprague dawley*
- b. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam dan rontok)
- c. Berat badan antara 100-200 gram
- d. Berusia sekitar 5-7 minggu

Kriteria Eksklusi

Tikus sakit atau mati sebelum waktu terminasi

b. Besar Sampel

Sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental rancangan acak lengkap, yaitu:

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

dimana (t) adalah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan.

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Dalam penelitian ini digunakan 20 ekor tikus putih *Sprague Dawley* betina yang terbagi dalam 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus), yaitu :

Kelompok I : tikus tidak diinduksi DMBA, hanya diberi akuades 1 ml per hari selama 4 minggu

Kelompok II : tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu

Kelompok III : tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu

Kelompok IV : tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu

3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas (*Independent variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.).

b. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi jaringan paru tikus putih betina yang diinduksi karsinogen DMBA.

3.4.2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak daun sirsak	<p>Ada 4 kelompok dengan perlakuan yang berbeda :</p> <p>Kelompok I (kontrol negatif) = akuades 1 ml/hari selama 4 minggu</p> <p>Kelompok II (kontrol positif) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu</p> <p>Kelompok III (perlakuan coba) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu + ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB/hari selama 4 minggu</p> <p>Kelompok IV (perlakuan coba) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu + ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB/hari selama 4 minggu</p>	Kategorik (nominal)
Gambaran histopatologi paru	<p>Melihat gambaran mikroskopis jaringan paru tikus dengan menggunakan skala kategorik pada 5 lapang pandang dengan skoring 0-3 untuk melihat derajat kerusakan alveolus paru (Kirana, 2009).</p> <p>: Tidak terjadi perubahan struktur histologis (normal)</p> <p>: Kerusakan alveolus paru >0% - 30% (kerusakan ringan)</p> <p>: Kerusakan alveolus paru 31% - 60% (kerusakan sedang)</p> <p>: Kerusakan alveolus paru >60% (kerusakan berat)</p>	Kategorik (ordinal)

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk ekstrak adalah alat-alat gelas, *blender*, *rotary evaporator*, dan kertas saring. Alat yang dibutuhkan dalam pemeliharaan tikus berupa kandang, tempat minum dan makan, timbangan digital, sonde lambung berupa *Nasogastric tube* (NGT). Untuk pengambilan jaringan, digunakan alat-alat bedah minor. Sedangkan alat untuk pembuatan serta pengamatan preparat histopatologi adalah wadah untuk jaringan paru, *object glass*, *cover glass*, spidol, label, *tissue cassette*, *automatic tissue processor*, *tissue embedding console*, inkubator, mikrotom, mikroskop cahaya dan *digital electronic eyepiece camera* serta satu unit komputer untuk pengambilan foto preparat histopatologi.

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.). Hewan percobaan yang digunakan untuk pengujian efek kemopreventif kanker payudara adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague dawley*. Tikus tersebut diperoleh dari Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Bahan yang digunakan pada ekstrak daun sirsak adalah etanol 70%. Bahan kimia yang digunakan untuk penginduksian tikus ialah *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) dan minyak jagung. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pemeriksaan mikroskopis jaringan paru adalah kertas tisu, Ketamine-xylazine, *buffered neutral formaline* (BNF) 10%, xylol, alkohol, alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 70%, parafin, *Mayer's Hematoxyllin*, lithium karbonat, eosin, larutan albumin, air hangat, larutan *periodic acid* 1%, *schiff reagent*, sodium bisulfit 10%, 1 N HCl dan akuades.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Persiapan Hewan Percobaan

Tikus betina ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam, pakan berupa pelet dan air minum diberikan *ad libitum*. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, ventilasi yang cukup serta penyinaran yang cukup dimana lamanya terang 14 jam dan lama gelap 10 jam. Sebelum melakukan percobaan tikus diadaptasi dalam kandang selama 7 hari untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya. Kesehatan tikus dipantau setiap hari dan berat tikus ditimbang setiap minggu.

3.6.2. Ekstraksi Daun Sirsak Dalam Etanol 70%

Pembuatan ekstrak daun sirsak menggunakan bahan berupa daun sirsak yang telah di keringkan sebanyak 500 gram. Kemudian daun sirsak di giling dan di ayak dengan ayakan yang sesuai. Setelah di giling dan di ayak, daun sirsak di rendam dalam larutan etanol 70%. Setiap hari rendaman diaduk-aduk dan disaring sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat di kentalkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak daun sirsak.

Dosis ekstrak daun sirsak yang akan di berikan adalah 20mg/kgBB pada kelompok III dan 40mg/kgBB pada kelompok IV setiap hari selama 4 minggu. Berat tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gram, sehingga perhitungan dosis ekstrak daun sirsak pada penelitian ini adalah :

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok III

$$\frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} = \frac{d}{200\text{g}}$$

$$d = \frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} \times 200\text{g}$$

$$d = 4\text{mg}$$

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok IV

$$\frac{40\text{mg}}{1000\text{g}} = \frac{d}{200\text{g}}$$

$$d = \frac{40\text{mg}}{1000\text{g}} \times 200\text{g}$$

$$d = 8\text{mg}$$

kemudian dari masing-masing dosis ini dilarutkan dalam 1 ml akuades untuk diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung.

3.6.3. Pembuatan Larutan DMBA

Pelarut yang digunakan untuk senyawa DMBA adalah minyak jagung karena DMBA larut dalam pelarut ini. Minyak jagung merupakan senyawa *inert* yang digunakan untuk melarutkan DMBA dan tidak memiliki sifat karsinogenik (Singletary *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian oleh Meiyanto (2007) telah ditetapkan dosis serta frekuensi DMBA yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 20 mg/kg BB, dua kali seminggu selama 4 minggu. Selain itu disebutkan pula bahwa pemberian DMBA dengan dosis 20 mg/kg BB sebanyak 10 kali dalam 4 minggu telah dapat mengakibatkan perubahan secara mikroskopis.

Berat tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gram, sehingga perhitungan dosis pada penelitian ini adalah :

$$\frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} = \frac{d}{200\text{g}}$$
$$d = \frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} \times 200\text{g}$$
$$d = 4\text{mg}$$

kemudian 4 mg DMBA ini dilarutkan dalam 1 ml minyak jagung untuk diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung.

3.6.4. Induksi Kanker Dengan DMBA, Ekstrak Daun Sirsak, dan Pengambilan Sampel

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA dan ekstrak daun sirsak yang akan diberikan. Bahan yang akan digunakan untuk larutan DMBA adalah serbuk DMBA yang dilarutkan dalam minyak jagung. Induksi menggunakan sonde oral, seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kgBB yang dilarutkan dalam minyak jagung dan diberikan selama 4 minggu. Setiap tikus pada kelompok II, III, dan IV dengan berat \pm 200gr mendapatkan 1ml larutan DMBA dengan konsentrasi 4 mg/ml.

Bahan yang akan digunakan untuk larutan ekstrak daun sirsak adalah ekstrak daun sirsak yang dilarutkan dalam akuades. Ekstrak daun sirsak diberikan dengan dosis 20 mg/kgBB pada kelompok III dan 40 mg/kgBB pada kelompok IV, dengan menggunakan sonde lambung. Setiap tikus dengan berat \pm 200gr mendapatkan 1ml larutan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 4mg/ml untuk kelompok III dan konsentrasi 8mg/ml untuk kelompok IV.

Selama penginduksian senyawa DMBA, tikus setiap hari diinduksi ekstrak daun sirsak. Penginduksian DMBA dan ekstrak daun sirsak dilakukan selama 4 minggu. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi. Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama, dan setelah intervensi.

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan anestesi terlebih dahulu menggunakan ketamine-xylazine dosis 75-100mg/kg + 5-10mg/kg secara IP, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation*. Setelah itu jaringan paru tikus di ambil melalui pembedahan.

3.6.5. Pembuatan Preparat Dari Jaringan Paru Tikus

a. Fiksasi

Jaringan yang akan dibuat sediaan histopatologi difiksasi dalam larutan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10% minimal 48 jam hingga mengeras (matang). Sampel organ yang terfiksasi dengan sempurna ditrimming setebal $\pm 0,5$ cm. Potongan kemudian dimasukkan dalam *tissue cassette* untuk dimasukkan dalam *tissue processor automatic*.

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi dimaksudkan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan sampel yang diuji. Dehidrasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (75%, 95%, dan alkohol absolut). Proses perendaman pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 2 jam. Proses dehidrasi dilakukan dengan menggunakan mesin otomatis yaitu *automatic tissue processor*.

c. *Clearing*

Proses *clearing* atau penjernihan dilakukan 2 tahap dengan menggunakan xylol I dan xylol II. Penggunaan xylol dimaksudkan untuk melarutkan alkohol dan parafin.

d. Infiltrasi

Infiltrasi atau impregnasi adalah proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian pori-pori ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom. Parafin yang digunakan adalah parafin histoplast.

e. *Embedding* dan *Blocking*

Embedding atau *blocking* adalah proses penanaman jaringan dalam blok parafin. Parafin yang digunakan parafin histoplast. Proses *embedding* dilakukan dengan menggunakan alat *tissue embedding console*.

f. *Sectioning*

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 – 5 μm . Pemotongan dilakukan dengan alat *rotary microtome spencer*. Sediaan kemudian di letakan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

g. Pewarnaan *Hematoxyllin-Eosin*

Sebelum melakukan pewarnaan, preparat histopatologi dideparafinisasi dengan larutan xylol (I dan II) selama dua menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan cara mencelupkan sediaan ke dalam alkohol bertingkat (Alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%). Perendaman dalam alkohol 95% dan 80% dilakukan selama 1 menit. Kemudian sediaan dicuci dengan air yang mengalir (air kran)

selama 1 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna *Mayer's Hematoxyllin* dengan tahapan sebagai berikut :

- a) Preparat direndam dalam larutan *Mayer's Hematoxyllin* selama 8 menit;
- b) Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 30 detik;
- c) Dichelupkan ke dalam larutan larutan lithium karbonat selama 15 – 30 detik;
- d) Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 2 menit;
- e) Preparat direndam dalam larutan Eosin selama 2 - 3 menit;
- f) Cuci dengan air mengalir (air kran) selama 30 – 60 detik;
- g) Preparat dicelupkan ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut sebanyak 10 kali celupan, absolut II selama dua menit, xylol I selama satu menit dan xylol II selama dua menit.

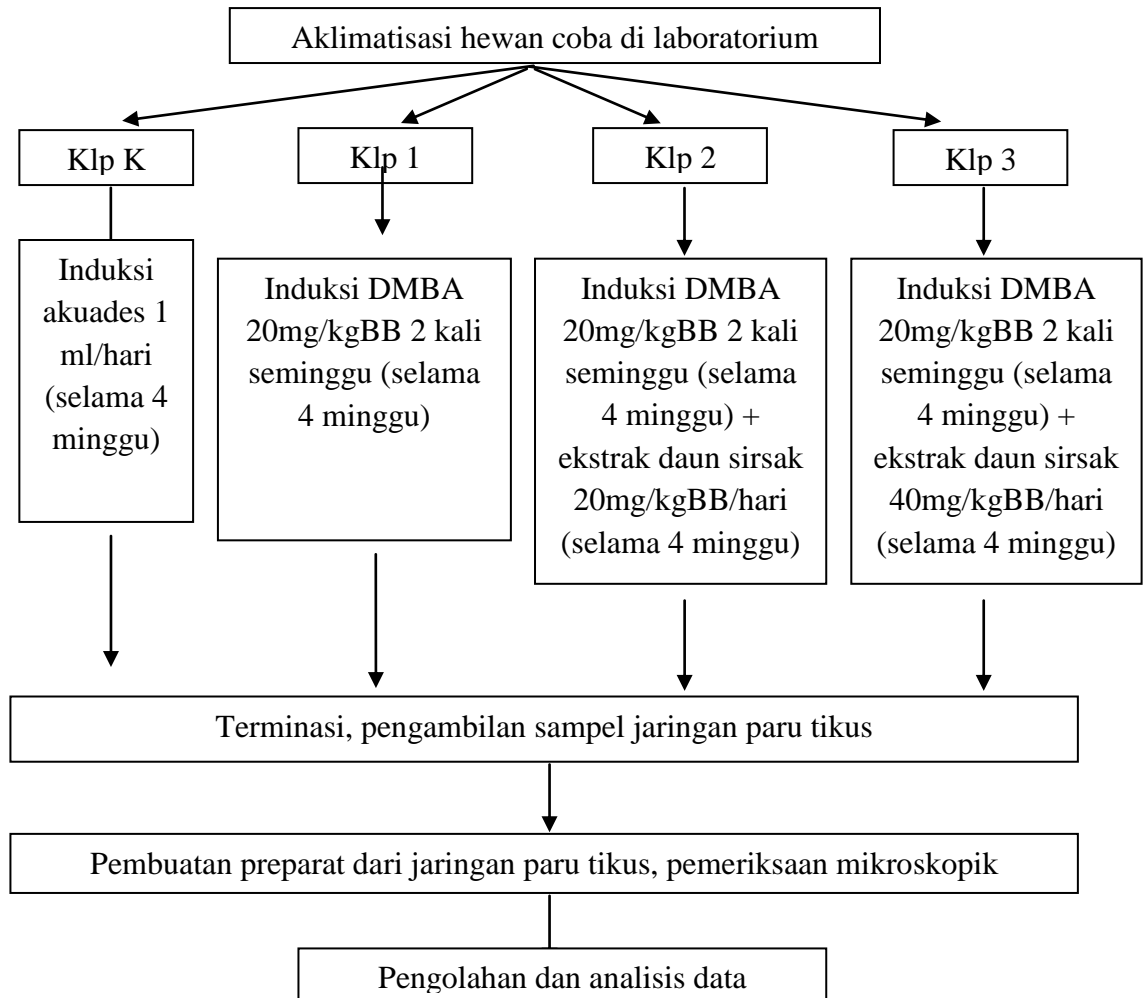
h. *Mounting*

Setelah tahapan pewarnaan, sediaan ditetesi perekat *permount* dan ditutup dengan *cover glass*.

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan yang bermakna di antara semua kelompok perlakuan, kemudian untuk mengetahui perbedaan di antara dua kelompok perlakuan digunakan uji statistik Mann Whitney. Derajat kemaknaan yang digunakan $\alpha = 0,05$ (Dahlan, 2010).

3.8. Diagram Alir



Gambar 6. Alur Penelitian

3.9. Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, peneliti akan mengajukan *etical approval* ke Unit Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.