

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan akan dilakukan selama 1 (satu) bulan. Dari bulan September awal sampai Oktober 2013

## C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional variabel

### 1. Identifikasi variable

Terdapat dua variable dalam penelitian ini, yaitu :

#### 1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

- Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak.

#### 2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

- Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar hemoglobin darah tikus putih yang diinduksi karsinogen DMBA.

### 2. Definisi Operasional Variabel

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

**Tabel 3.** Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
	Kelompok K(-) (kontrol negatif) = pemberian aquades	
	Kelompok K(+) (kontrol positif) = pemberian DMBA 2x20mg /kgBB seminggu (selama 4 minggu)	
Dosis ekstrak etanol daun sirsak	Kelompok P1 (perlakuan coba) = pemberian ekstrak daun sirsak 20mg/kgBB/hari (selama 4 minggu) + pemberian DMBA 2x20mg /kgBB seminggu (selama 4 minggu)	Numerik

---

Kelompok P2 (perlakuan coba) = pemberian ekstrak daun sirsak 40mg/kgBB/hari (selama 4 minggu) + pemberian DMBA 2x20mg /kgBB seminggu (selama 4 minggu).

Kadar hemoglobin tikus	Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kadar hemoglobin antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol DMBA dan kadar hemoglobin normal.	Kategorik
------------------------	--	-----------

---

#### D. Bahan dan Cara Kerja

##### 1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sonde, spuit, toples kaca, pipet hemoglobin, alat pengukur hemoglobin otomatis, pipet pastur, pengaduk, *handschoen*.

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun sirsak, aquabidest, DMBA (7,12 dimethylbenz[ ]anthracene), HCL 0,1 N, alcohol 70%.

##### 2. Ekstraksi Daun Sirsak Dalam Etanol 70%

Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan etanol. Simplisia kering daun sirsak di giling dan di ayak dengan ayakan yang sesuai. Sebanyak 500 gram daun sirsak di rendam dalam larutan etanol Setiap hari rendaman diaduk-aduk dan disaring sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat di kentalkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kering. Larutan terapi diberikan kepada tikus dengan dosis yang telah ditentukan.

### 3. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih betina galur *Sprague Dawley* yang berusia 5 minggu dengan berat antara 100-200 gram selama 1 pekan untuk adaptasi di tempat pemeliharaan. Makanan tikus yang diberikan berupa pelet. Pemberian makanan dan minuman kepada binatang percobaan dilakukan secara *ad libitum*, suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setiap kali akan diinduksi dan setiap pekan setelah induksi terakhir berat badan tikus ditimbang sampai tikus diterminasi.

### 4. Induksi Kanker Dengan DMBA dan Pengambilan Sampel

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang akan digunakan 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, diberikan selama 4 minggu. Setiap tikus dengan berat  $\pm$  200gr mendapatkan  $\pm$  1ml larutan dengan konsentrasi 4 mg/mL. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi. Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama, dan setelah induksi.

### 5. Induksi ekstrak daun sirsak

Mula mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan ekstrak yang akan diberikan. Bahan yang akan digunakan adalah daun sirsak yang di buat menjadi ekstrak dengan 2 dosis, 20mg/kgbb dan 40mg/ kgbb. Induksi menggunakan sonde oral dan akan dilakukan setiap hari dalam 4 minggu. Setiap tikus akan mendapatkan 1 ml. pemberian dosis 20mg/kgbb hanya untuk kelompok P1 dan pemberian 40mg/kgbb untuk kelompok P2.

#### 6. Terminasi tikus

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus dimatikan/diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan ketamine-xylazine dosis 75-100mg/kgbb + 5-10mg/kgbb secara ip, kemudian di euthanasia dengan metode cervical dislocation setelah itu pengambilan darah dilakukan.

#### 7. Menghitung Kadar Hemoglobin tikus

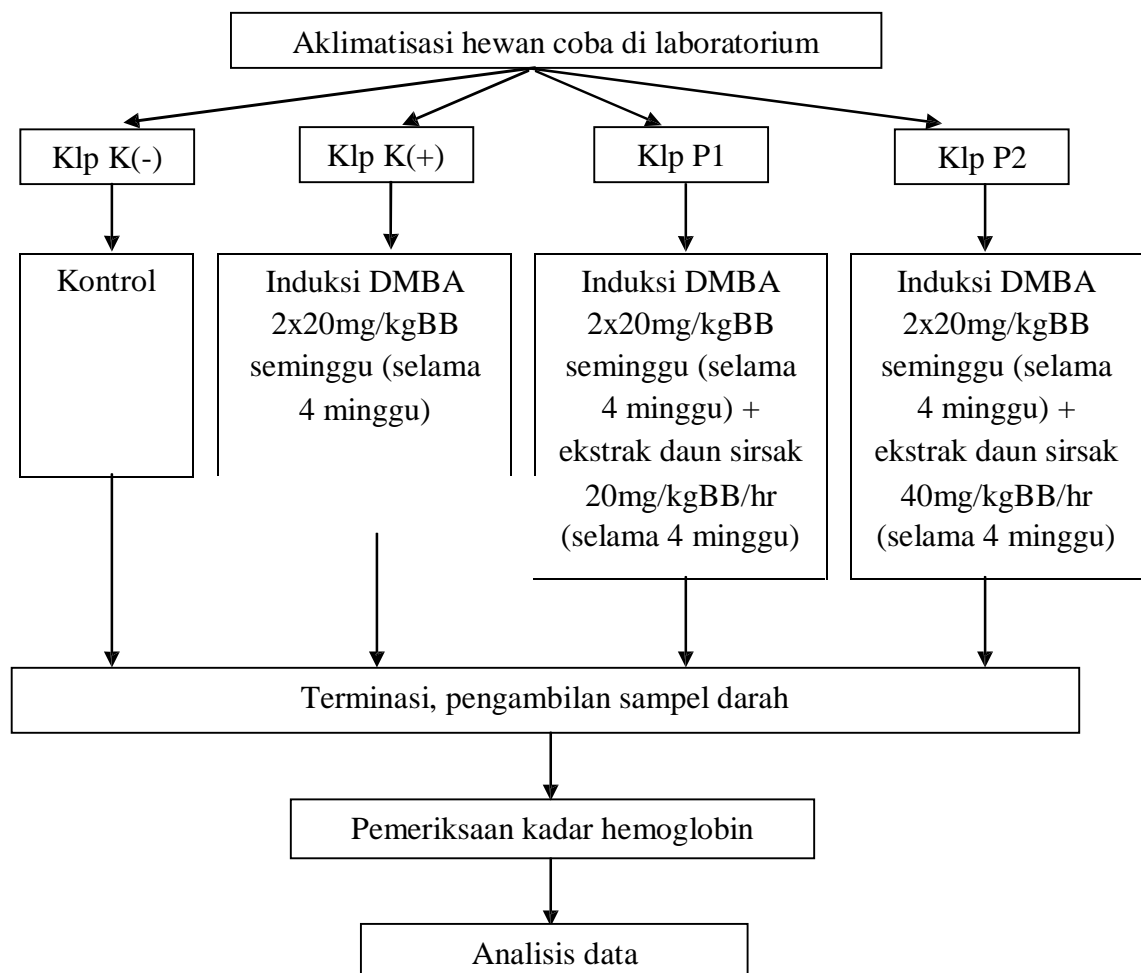
Menghitung kadar hemoglobin tikus menggunakan alat pengukur hemoglobin ( merek *easy touch* hemoglobin meter) dengan cara periksa alat yang akan di pakai, yaitu hemoglobin meter yang sudah di pasang stripnya lalu ambil darah tikus yang akan diambil dari setiap kelompok. Masukkan darah ke dalam strip hemoglobin meter lalu tunggu selama 6 detik dan akhirnya hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dapat dilihat alat

### **E. Metode Pengambilan Data**

Proses pengumpulan data dalam penelitian ini adalah dengan cara menghitung kadar hemoglobin darah tikus dari kelompok K(-), kelompok K(+), kelompok P1, hingga kelompok P2. Setelah itu dilakukan penilaian dari masing-masing kelompok.

### Alur Penelitian

Pada penelitian ini akan menggunakan tikus sebanyak 24 ekor yang di bagi dalam 4 kelompok sebagai sampel untuk di ambil darahnya lalu di biarkan dulu selama 1 minggu dan lalu di akan diberi perlakuan selama 4 minggu lalu di ambil darahnya lalu di ukur hemoglobin, berikut kerangka penelitiannya:



**Gambar 3.** Alur Penelitian

## F. Populasi dan Sampel

Populasi adalah tikus putih *Sprague Dawley* berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB). Sampel adalah darah tikus putih populasi yang telah diinduksi dengan DMBA dengan dosis dan kurun waktu tertentu. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

### 1. Kriteria Inklusi

- 1) tikus putih *Sprague Dawley* berusia 5-7 minggu
- 2) Berusia 5-7 minggu
- 3) Berat badan antara 100-200 gram

### 2. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus mati sebelum penelitian selesai
- 2) Tikus mati selama perlakuan
- 3) Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital).

### 3. Besar Sampel

Untuk penelitian kali ini, besar sampel yang digunakan ditentukan menggunakan rumus Federer 1963 (Supranto, 2000).

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

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah:

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 5$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor tikus untuk tiap kelompok.

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 :

1. Kelompok kontrol 1 (K(-)) : tikus yang hanya diberi minyak jagung 2x1 ml seminggu selama 4 minggu
2. Kelompok kontrol 2 (K(+)) : diinduksi DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu selama 4 minggu
3. Kelompok perlakuan 1 (P1) : diinduksi DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kgBB sekali sehari selama 4 minggu
4. Kelompok perlakuan 2 (P2) : diinduksi DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kgBB sekali sehari selama 4 minggu

Rincian besar sampel yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.** besar sample

Kelompok	Besar Sampel
Kontrol positif	5 ekor
Kontrol negatif	5 ekor
Perlakuan 1	5 ekor



---

Perlakuan 2	5 ekor
-------------	--------

---

### **G. Pengolahan dan Analisis Data**

Analisis data penelitian diproses dengan program pengolahan data dengan tingkat signifikansi  $p=0.05$ . Langkah pertama adalah dengan melakukan uji normalitas data yaitu dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitas dengan *Levene*. Selanjutnya, jika didapatkan hasil  $p>0.05$  maka distribusi data normal. Setelah itu dapat digunakan uji parametrik *one-way ANOVA*. Tetapi, jika distribusi data tidak normal (hasilnya  $p<0.05$ ) maka digunakan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Jika didapatkan perbedaan signifikan pada *one-way ANOVA* ( $p<0.05$ ), maka dapat dilanjutkan uji lanjutan *Post Hoc Test* dengan *Least Signifikan Difference (LSD)* antar kelompok untuk mengetahui secara spesifik perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol serta antar kelompok perlakuan. Sehingga didapatkan kelompok perlakuan mana yang mempunyai efek terhadap kadar HB paling baik. Untuk alternatif digunakan uji *Mann-Whitney*.

### **H. Ethical Clearance**

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
  
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu  $(n-1) (t-1) = 15$ , dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
  
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
  - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.
  - c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba

diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).