

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test– only control group design*. Sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 10– 16 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mengetahui gambaran mikroskopis hepar. Waktu penelitian selama bulan Agustus– September 2013.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor.

Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali ($n=5$), sesuai dengan rumus Frederer. Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

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

$$(n-1) \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi sampel yang akan digunakan adalah berdasarkan perhitungan, yaitu sejumlah 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok percobaan dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok, sehingga untuk satu tanaman herbal menggunakan 25 ekor tikus putih.

Kriteria inklusi:

1. Tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
2. Memiliki berat badan sekitar 100– 200 gram
3. Berusia sekitar 10– 16 minggu (dewasa)

4. *Drop out* pada penelitian adalah 10% tiap kelompok

Kriteria eksklusi:

1. Tampak sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital)
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi dilaboratorium
3. Mati selama masa pemberian perlakuan

3.4. Bahan dan Alat Penelitian

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB, kemudian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB.

3.4.2 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin meliputi: larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, *xylol*, pewarna Hematoksilin dan Eosin dan entelan.

3.4.3 Alat Penelitian

1) Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus
- 2) Sduit oral 1 cc, 3 cc dan 5 cc
- 3) Minor set, membedah tikus untuk mengidentifikasi hepar
- 4) Kapas dan alkohol.

2) Alat pembuat preparat histologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, tissue cassette, rotarymicrotome, oven, water bath, platening table, autochnicom processor, staining jar, staining rak, kertas saring, histoplast, dan parafin dispenser.*

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*)

3.5.1.1 Metode Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Daun sirsak yang telah dipetik, dicuci terlebih dahulu dengan bilasan air dan dikeringkan selama 10 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering. Daun sirsak yang telah kering kemudian diblender sampai halus. Kemudian daun sirsak yang telah diblender halus ditimbang sebanyak 20 gram. Daun yang telah ditimbang, kemudian dimaserasi atau direndam dalam larutan alkohol 95% sebanyak 450 mL selama 24 jam. Hasil ekstraksi/maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring Whattman hingga tidak tersisa residu atau padatan. Setelah itu hasil filtrasi diuapkan pelarutnya hingga didapatkan fraksi yang kental menggunakan *rotary evaporator* (Hermawan & Laksono, 2012).

3.5.1.2 Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Dosis pertengahan yang akan digunakan dalam penelitian ini berdasar pada penelitian yang dilakukan oleh Vianandra (2011) adalah 200 mg/kg BB yang merupakan dosis efektif sebagai antiproliferasi. Dosis pertama ekstrak etanol daun

sirsak (*Annona muricata* Linn) diambil dari setengah dosis pertengahan tikus, sedangkan dosis kedua diambil dari hasil pengalihan 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4x dari dosis pertama atau 2x dari dosis kedua.

a. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 3

$100 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 20 \text{ mg}$

b. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 4

$200 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 40 \text{ mg}$

c. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 5

$400 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 80 \text{ mg}$

Volume ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3– 5 ml. Jika volume ekstrak melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang kemudian akan dapat menyebabkan robeknya saluran cerna pada tikus (Ngatidjan, 2006).

3.5.2 Prosedur Pemberian Dosis DMBA

Dosis DMBA yang diberikan adalah 75 mg/kgBB selama 2 kali pemberian dengan jangka waktu 1 minggu secara intraperitoneal. Cara menghitung dosis DMBA adalah sebagai berikut: misalkan berat badan

tikus adalah 200 g, dosis DMBA yang akan diberikan adalah 75 mg/kg BB dan volume maksimal DMBA yang dapat dipajankan pada tikus adalah 1 ml, maka jumlah DMBA yang dibutuhkan adalah: Konsentrasi DMBA=Dosis x Berat Badan / volume pajanan= $0,075 \text{ mg/gr BB} \times 200 \text{ g/1 ml}=15 \text{ mg/ml}$. Maka DMBA yang dibutuhkan untuk membuat 1 ml larutan DMBA dengan dosis 75 mg/kgBB adalah 15 mg.

3.5.2.1 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

a. Pemeliharaan hewan coba sebelum intervensi

Pada pemeliharaan hewan sebelum intervensi dilakukan adaptasi terlebih dahulu selama 3 hari dan diberikan diet standar ad libitum dan akuades. Di dalam ruangan pemeliharaan diatur sirkulasi udara dengan memberikan kipas angin, pembersihan kandang dan juga cahaya yang cukup.

b. Pemeliharaan hewan selama intervensi

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dengan 5 ekor/kelompok. Dalam 1 kandang terdapat 5 ekor tikus yang dibagi sebagai berikut:

- Kelompok I (kontrol negatif)=pemberian aquades + diet standar ad libitum
- Kelompok II (kontrol positif)=pemberian DMBA 20 mg/200gBB dan perawatan standar ad libitum

- Kelompok III (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 20mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB
- Kelompok IV (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 40mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB.
- Kelompok V (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 80mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB.

c. Pemeliharaan hewan coba setelah intervensi

Hewan coba setelah perlakuan selama 4 minggu akan dilakukan terminasi dengan cara dianastesi terlebih dahulu menggunakan eter dan juga dilakukan *servical dislocation*.

3.5.2.2 Prosedur Penelitian

Tikus yang akan dijadikan sampel, dibagi ke dalam 5 kelompok, dimana setiap kelompok berisi 5 ekor tikus. Setiap kelompok kemudian diberi perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif dengan perlakuan pemberian aquadest dan makanan pelet, satu kali sehari selama 8 minggu.
- b. Kelompok 2 merupakan kelompok kontrol positif dengan perlakuan DMBA, yang dibuat model kanker hepar dengan pemberian DMBA dalam minyak zaitun dosis 75 mg/kgBB secara intraperitoneal sebanyak dua kali dengan jarak 1 minggu.

- c. Kelompok 3 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 100 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.
- d. Kelompok 4 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 200 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.
- e. Kelompok 5 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak dan sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 400 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.

Setelah pemberian DMBA yang terakhir, semua tikus diberi pakan kontrol saja hingga akhir pengamatan atau selama 4 minggu. Setelah itu, tikus pada kelompok 3, 4 dan 5 diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) sesuai dosis yang dilarutkan dengan aquadest setiap pagi selama 4 minggu. Sementara kelompok kontrol negatif (kelompok 1) maupun kontrol positif (kelompok 2) hanya diberi pakan kontrol dan akuades.

Setelah minggu ke-9, pengamatan dihentikan kemudian tikus dibius dengan kloroform dan dilakukan pembedahan.

Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi hepar dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).

Cara pembuatan sediaan histopatologi yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Lampung adalah sebagai berikut :

1) *Fixation*

Spesimen berupa potongan organ hepar yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam, kemudian potongan dicuci dengan air mengalir sebanyak 3– 5 kali.

2) *Trimming*

Potongan kelenjar yang telah terfiksasi dikecilkan hingga ukuran ± 3 mm.

3) Dehidrasi

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air yang terdapat di dalam jaringan. Potongan organ hepar berturut– turut direndam dalam alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam (2 kali), alkohol absolut selama 1 jam (3 kali).

4) *Clearing*

Clearing bertujuan untuk membersihkan sisa alkohol yang terdapat dalam jaringan. *Clearing* dilakukan dengan memasukan jaringan kedalam larutan *xylol* I dan II, masing– masing selama 1 jam.

5) Impregnasi

Impregnasi dilakukan menggunakan paraffin selama 1 jam dalam oven suhu 65⁰ C.

6) *Embedding*

Sisa paraffin yang ada pada base mole dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas. Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58⁰C. Kemudian Paraffin cair dituangkan ke dalam base mole. Jaringan yang telah diimpreg dipindahkan satu persatu dari *tissue cassette* ke dasar base mole dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya. Biarkan membeku kemudian lepaskan *tissue cassette* dari base mole. Blok parafin telah siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

Sebelum dipotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4– 5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*. Kemudian dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yan lain ditarik menggunakan kuas runcing.

Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60⁰C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

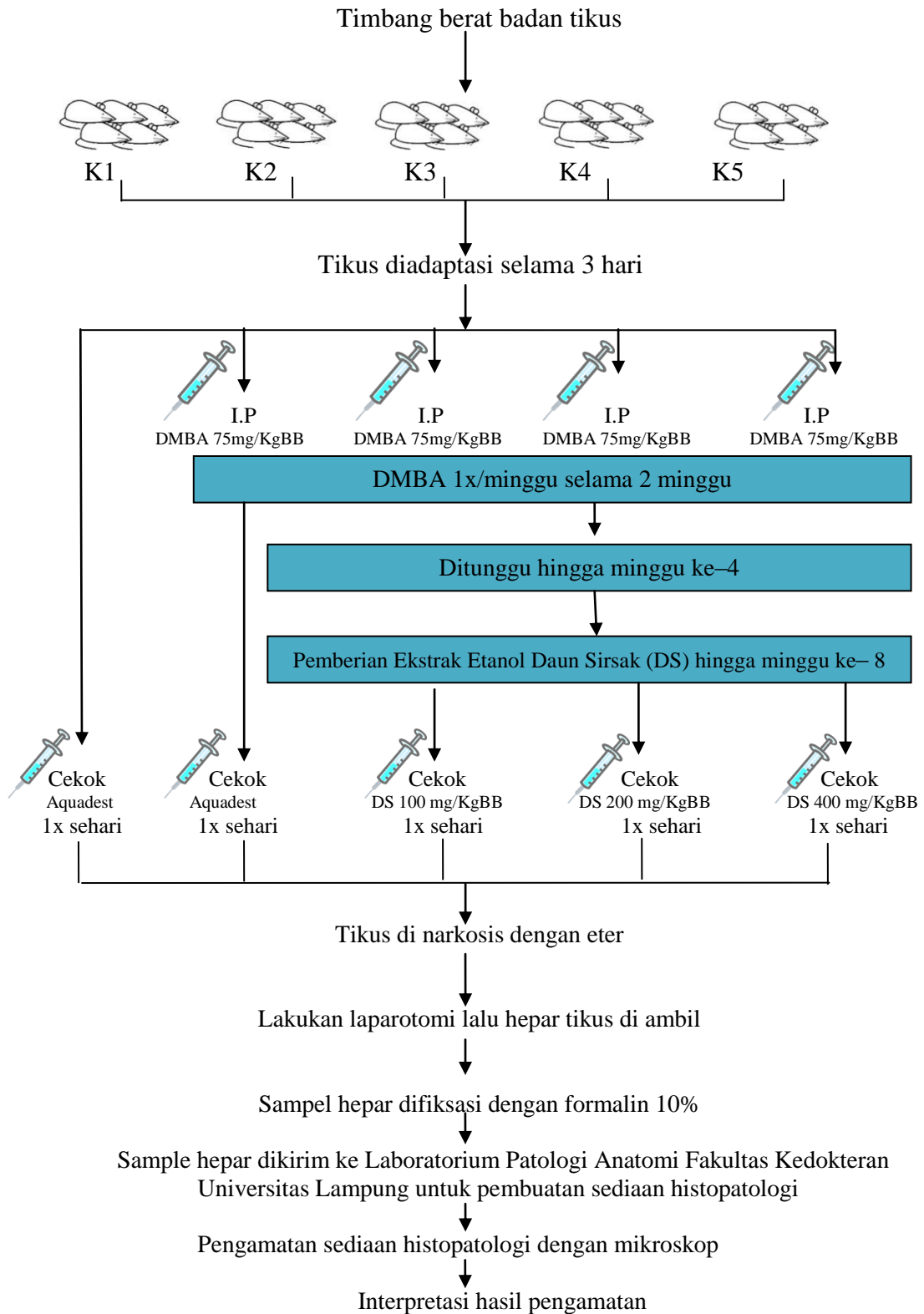
8) *Staining* (pewarnaan)

9) *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

Pemeriksaan mikroskopis pada pewarnaan Hematoksilin– Eosin dilakukan dengan mengamati degenerasi bengkak keruh yang merupakan hasil efek kemopreventif ekstrak pada slide pada hepar. Degenarasi bengkak keruh pada organ hepar tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

10) Pembacaan *Slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa dengan 5 lapang pandang dibawah mikroskop.



Gambar 11. Diagram Alur Penelitian.

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Identifikasi Variabel

Terdapat dua variabel dalam penelitian ini, yaitu:

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah dosis ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) 20 mg, 40 mg , dan 80 mg.

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah gambaran histopatologi hepar (degenerasi bengkak keruh).

3.6.2 Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 2. Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak etanol daun sirsak.	<p>Dosis efektif daun sirsak adalah 200 mg/kg BB (Vianandra, 2011).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades • Kelompok II (kontrol positif) = pemberian DMBA 20 mg/200gBB • Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol daun sirsak 20mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB • Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol daun sirsak 40mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB. • Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol daun sirsak 80mg/200gBB + DMBA 20mg/200gBB. 	Numerik
Gambaran histopatologi sel hepar tikus	<p>Gambaran kerusakan hepatosit tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 5 lapangan pandang dimana setiap lapangan pandang diamati berupa degenerasi bengkak keruh yang terjadi pada hepatosit. Skala degenerasi bengkak keruh kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda. Skala penilaian Kawasaki (2009) dengan modifikasi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Skor 0 = tidak ada hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh • Skor 1 = <10% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • Skor 2 = 10–33% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • Skor 3 = 34–66% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • Skor 4 = >66–100% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh 	Numerik

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan software statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian, dilakukan uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,050$. Jika pada uji ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < 0,050$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.8 Etika Penelitian

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain mengikuti prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu: *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Ridwan, 2013). *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. Dalam hal ini, peneliti tetap menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spargue Dawley* dan tidak digantikan dengan hewan coba lainnya. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini, peneliti menghitung jumlah minimum menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Yang pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya.