

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 yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 4 bulan, yaitu dari bulan September sampai bulan Desember 2014.

C. Populasi dan Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap jaringan hati tikus putih

yang diinduksi DMBA, agar lebih efisien dari segi waktu dan biaya karena membutuhkan banyak sampel sementara jaringan masih bisa digunakan untuk penelitian lanjutan. Populasi adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gr yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB). Hewan ini memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia, dapat ditemukan dan ditangani dengan mudah, serta diharapkan pengambilan data dapat lebih akurat dibandingkan jika menggunakan mencit sebagai hewan coba, karena tubuh mencit yang relatif lebih kecil (Vanessa, 2014). Sampel adalah jaringan hati tikus populasi yang telah diinduksi dengan DMBA dengan dosis dan kurun.

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih betina galur *Sprague dawley*
- b. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam, rontok, atau botak)
- c. Memiliki berat badan 100-200 gr
- d. Berusia sekitar 6-7 minggu

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan

3. Kriteria Drop Out

- a. Tikus mati
- b. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, penampakan rambut kusam, rontok, atau botak)

4. Besar sampel

Pada uji eksperimental rancangan acak lengkap, besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer :

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

dengan (t) adalah jumlah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

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

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

- a. Kelompok kontrol negatif (K) : tikus yang hanya diberi aquades 1 ml per hari selama 4 minggu
- b. Kelompok kontrol positif (A) : diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu dan diberi aquades 1 ml per hari selama 4 minggu

- c. Kelompok perlakuan 1 (B) : diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kg BB sekali sehari selama 4 minggu
- d. Kelompok perlakuan 2 (C) : diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kg BB sekali sehari selama 4 minggu

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel terikat: kadar malondialdehid jaringan hati tikus putih
- b. Variabel bebas: dosis ekstrak daun sirsak

2. Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak daun sirsak	<p>Ada 4 kelompok dengan perlakuan yang berbeda, yaitu:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok K (kontrol negatif) = pemberian aquades 1 ml setiap hari selama 4 minggu 2. Kelompok A (kontrol positif) = pemberian DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu (selama 4 minggu) + aquades 1 ml setiap hari selama 4 minggu 3. Kelompok B (perlakuan) = pemberian DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu (selama 4 minggu) + ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB/hari selama 4 minggu 4. Kelompok C (perlakuan) = pemberian DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu (selama 4 minggu) + ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB/hari selama 4 minggu 	Kategorik
Kadar malondialdehid tikus	Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kadar malondialdehid antara kelompok perlakuan coba dengan kelompok positif dan kelompok negatif	Numerik

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan adalah gelas ukur 500 ml, *blender*, *rotary evaporator*, kertas saring, kandang, tempat minum dan makan, timbangan digital, sonde lambung berujung *Nasogastric tube* (NGT), alat bedah minor, pH meter, timbangan digital, tabung erlenmeyer 500 ml,

tabung penyimpanan, *upright freezer* – 80⁰C Kaltis, gelas ukur 100 ml, *micropestle*, *sentrifuge* Eppendorf 5417R, tabung eppendorf ukuran 2 ml, *waterbath* Memmert, spektrofotometer S-30 Boeco, mikropipet ukuran 1000 μ l, vortex Biosan, lemari es $\pm 4^0$ C, dan *magnetic stirrer*.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun sirsak 500 mg, tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*, etanol 70%, *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA), minyak jagung, akuades, ketamine-xylazine, larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) 0,05 M (5,4376 gr Na₂HPO₄, 2,6469 gr KH₂PO₄, dan 2,250 gr NaCl), akuabides, Tetra Etoksi Propan (TEP), TCA (asam trikloro asetat), dan TBA (asam tiobarbiturat).

F. Prosedur Penelitian

1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gr selama 1 minggu untuk adaptasi di tempat pemeliharaan dalam menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum dilakukan percobaan. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam, makanan tikus berupa pelet. Pemberian makanan dan minuman diberikan *ad libitum*. Lingkungan kandang dibuat agar tidak

lembab, suhu kandang dijaga sekitar 25⁰C, 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. Kesehatan tikus dipantau setiap hari. Berat badan tikus ditimbang setiap minggu sampai tikus diterminasi.

2. Ekstraksi Daun Sirsak dalam Etanol 70%

Pembuatan ekstrak daun sirsak menggunakan bahan berupa daun sirsak pada bagian ke-5 setelah pucuk daun, daunnya tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, yaitu yang berwarna hijau segar. Hal tersebut dikarenakan tanaman sirsak tumbuh di dataran rendah maka akan mendapatkan intensitas cahaya matahari yang lebih tinggi dan proses fotosintesis terpacu lebih tinggi, sehingga lebih banyak zat aktif terbentuk (Redaksi Trubus, 2012).

Daun sirsak yang telah dikeringkan sebanyak 500 gr, kemudian digiling dan diayak dengan ayakan yang sesuai. Setelah itu, daun sirsak direndam dalam larutan etanol 70%. Larutan etanol 70% digunakan untuk mengurangi toksisitas pada ekstrak daun sirsak terhadap hewan coba. Setiap hari rendaman diaduk dan disaring sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat dikentalkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kering. Dari 500 gr simplisia daun sirsak didapatkan ekstrak daun sirsak seberat 118,7 gr.

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). Dosis serta frekuensi DMBA yang digunakan yaitu 20 mg/kgBB, dua kali seminggu selama 4 minggu, selain itu disebutkan pula bahwa pemberian DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB sebanyak 10 kali dalam 4 minggu telah dapat mengakibatkan perubahan secara mikroskopis (Meiyanto, 2007). Hasil uji pendahuluan dengan menggunakan tikus yang diberi DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB menunjukkan adanya benjolan pada paru-paru, hasil histopatologi dari benjolan tersebut menunjukkan bahwa kanker telah terbentuk (Hanafi, 2009).

4. Induksi Kanker dengan DMBA

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. Berat tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gr, sehingga perhitungan dosis yang diberikan pada tikus adalah:

$$\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{d}{20 \text{ gr}}$$

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

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

Kemudian 4 mg DMBA ini dilarutkan dalam 1 ml minyak jagung untuk diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Setiap tikus pada kelompok A, B, dan C dengan berat \pm 200 gr mendapatkan 1 ml larutan DMBA dengan konsentrasi 4mg/ml.

5. Induksi Ekstrak Daun Sirsak

Ekstrak daun sirsak diberikan dengan dosis 20 mg/kgBB pada kelompok B dan 40 mg/kgBB pada kelompok C dengan menggunakan sonde lambung selama 4 minggu setiap harinya. Berat tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gr, sehingga perhitungan dosis ekstrak daun sirsak yang akan diberikan pada tikus adalah :

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok B

$$\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{d}{20 \text{ gr}}$$

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

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

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok C

$$\frac{40 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} = \frac{d}{20 \text{ gr}}$$

$$d = \frac{40 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 20 \text{ gr}$$

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

Kemudian dari masing-masing dosis ini dilarutkan dalam 1 ml akuades untuk diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Setiap tikus dengan berat \pm 200 gr mendapatkan 1 ml larutan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 4mg/ml untuk kelompok B dan konsentrasi 8 mg/ml untuk kelompok C.

Dosis tersebut diberikan untuk mengurangi toksisitas pada ginjal hewan coba dengan penggunaan jangka panjang (Dayeef *et al.*, 2013). 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.

6. Pengambilan dan Penyimpanan Hati

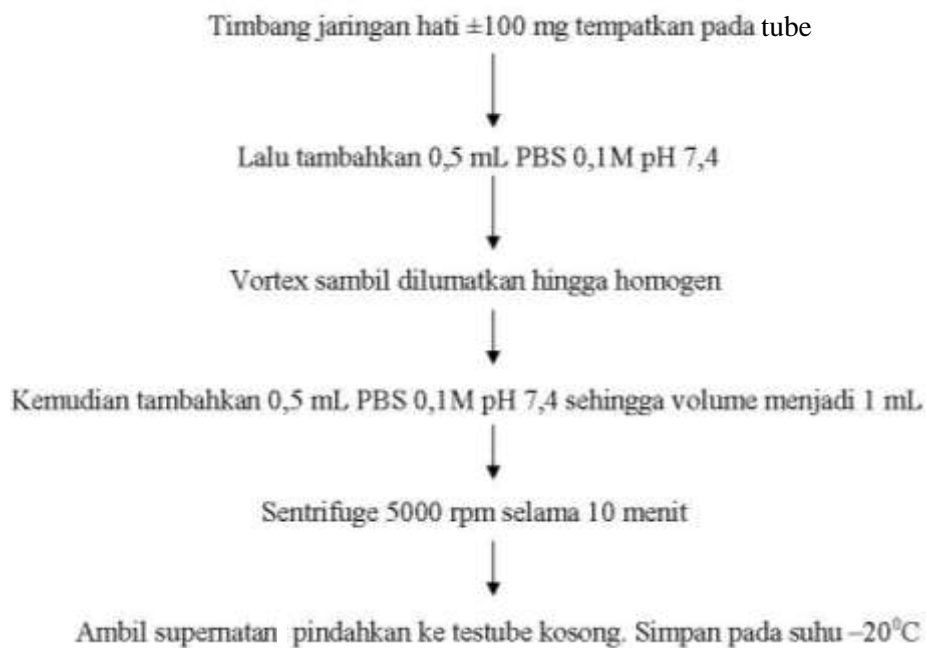
Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75-100mg/kg : 5-10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara IP, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation* (AVMA, 2013).

Pemberian *ketamine:xylazine* merupakan euthanasia metode noninhalasi dan biasa digunakan sebagai langkah pertama dari metode euthanasia dua langkah yang dapat menghilangkan kesadaran dengan cepat, yaitu sekitar tiga sampai lima detik setelah injeksi. Sementara *cervical dislocation* merupakan euthanasia metode fisik yang dapat digunakan pada tikus dengan berat badan ≤ 200 gr, karena jika berat badan tikus lebih berat maka akan terdapat massa otot yang besar di area servikal sehingga menyulitkan dislokasi servikal. Cara melakukan dislokasi servikal pada tikus yaitu dengan meletakkan ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher pada dasar tengkorak untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor lalu ditarik dengan cepat sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak. *Cervical dislocation* hanya bisa dilakukan oleh tenaga ahli (AVMA, 2013).

Setelah itu jaringan hati tikus diambil lalu dimasukkan dalam tabung penyimpanan organ lalu masukkan dalam lemari es -4°C selama 1 hari, setelah itu masukkan dalam *upright freezer* suhu -80°C . Jaringan yang disimpan pada *freezer* suhu -80°C akan tahan sampai 5 tahun (Stacey & Day, 2007; Tindall, 2007; Watt *et al.*, 2007).

7. Persiapan dan Pembuatan Homogenat Hati

Sampel jaringan hati diambil dari *upright freezer* suhu -80°C dan dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu -20°C selama 1 hari, lalu dipindahkan ke lemari es dengan suhu -4°C .



Gambar 10. Skema Pembuatan Homogenat Hati

8. Pengukuran Kadar Malondialdehid

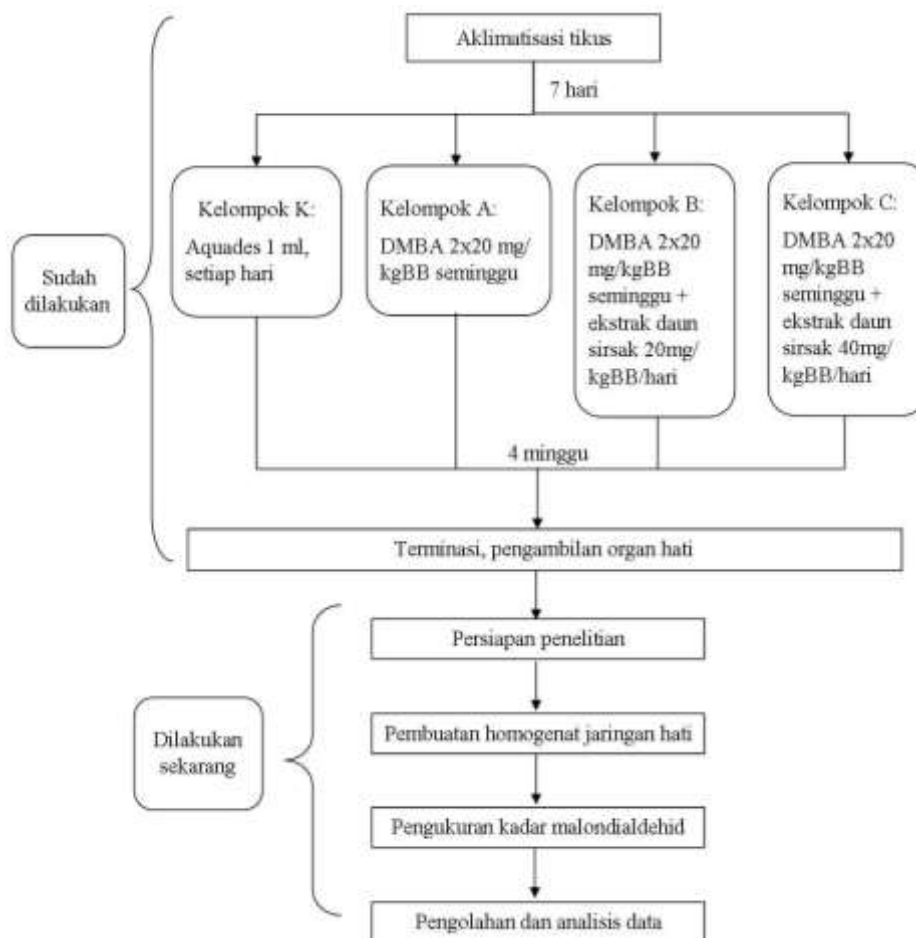
Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills (1987). Prinsipnya adalah mereaksikan MDA dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk senyawa berwarna yang memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 530 nm.

Tabel 3. Metode Pengukuran Kadar MDA

Bahan	Blanko	Standar (Duplo) (nmol/mg)				Uji (Duplo)
		0,625	1,25	2,5	5	
Akuabides	400 μ L	395 μ L	390 μ L	380 μ L	360 μ L	200 μ L
Standar TEP (1:80.000)	-	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L	-
Supernatan	-	-	-	-	-	200 μ L
TCA 20%	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Vortex						
						Sentrifuge 3500 rpm selama 10 menit, ambil supernatan
TBA 0,67%	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L
Inkubasi pada penangas air 95 ⁰ C selama 10 menit, lalu dinginkan hingga suhu ruang selama 5 menit. Baca pada serapan panjang gelombang 530 nm						

G. Diagram Alir

Pada penelitian ini akan menggunakan tikus putih sebanyak 20 ekor yang dibagi dalam 4 kelompok sebagai sampel untuk diambil jaringan hatinya. Tikus putih diaklimatisasi selama 1 minggu lalu diberi perlakuan selama 4 minggu, setelah itu diterminasi dan diambil jaringan hatinya. Setelah itu diukur kadar malondialdehidnya, berikut kerangka penelitiannya:



Gambar 11. Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak terhadap Kadar Malondialdehid pada Jaringan Hati Tikus Putih yang Diinduksi DMBA

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Uji Normalitas Data

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik. Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Jika distribusi data normal, maka didapatkan hasil

$p > 0,05$. Jika tidak normal maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu (Dahlan, 2013).

2. Uji Varians

Uji varians (*Levene's test*) digunakan untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama atau tidak. Jika didapatkan hasil $p > 0,05$ maka varians data yang diuji adalah sama. Jika tidak sama maka dilakukan transformasi data (Dahlan, 2013).

3. Uji Parametrik

Syarat uji parametrik, yaitu:

- a. Masalah skala pengukuran variabel : skala pengukuran variabel harus variabel numerik.
- b. Distribusi data harus normal
- c. Varians data :
 1. Kesamaan varians tidak menjadi syarat untuk uji kelompok yang berpasangan.
 2. Kesamaan varians adalah syarat tidak mutlak untuk kelompok tidak berpasangan, artinya varians data boleh sama boleh juga berbeda.
 3. Kesamaan varians adalah syarat mutlak untuk >2 kelompok tidak berpasangan, artinya varians data harus sama.

Pada penelitian ini, terdapat masalah dengan skala variabel numerik dan terdapat >2 kelompok tidak berpasangan. Jika distribusi data normal dan varians data homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way ANOVA*. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians

data tidak homogen, maka alternatifnya dipilih uji *Kruskal-Wallis* (Dahlan, 2013).

4. Uji *Post Hoc* LSD (*Least Significant Difference*)

Jika pada uji *one way* ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna), maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post-hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci sehingga didapatkan kelompok perlakuan mana yang mempunyai efek lebih baik terhadap kadar MDA. Untuk alternatif digunakan uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2013).

I. Etika Penelitian

Peneliti telah mengajukan *etical approval* ke Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan menerapkan prinsip 3R dan 5F dalam protokol penelitian menggunakan hewan coba agar terjamin kesejahteraannya. Prinsip 3R yaitu:

1. *Replacement* (menggantikan), ialah keperluan untuk membuktikan suatu hipotesis, bila diperlukan penggunaan hewan coba maka menggunakan hewan yang paling rendah tingkatannya dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction* (pengurangan), ialah mengembangkan strategi penggunaan hewan dalam jumlah yang lebih sedikit untuk menghasilkan data yang optimal yang diharapkan dari penelitian. Prinsip ini juga meliputi

memaksimalkan informasi yang diperoleh dari suatu percobaan tanpa menambah jumlah hewan atau jumlah perlakuan (rasa kesakitan yang ditimbulkan oleh tindakan penelitian) sehingga manfaat yang diperoleh dapat dimaksimalkan tanpa menambah penderitaan dan jumlah hewan coba. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Federer, yaitu $t(n-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

3. *Refinement* (memperhalus), ialah upaya melakukan modifikasi di dalam manajemen pemeliharaan atau prosedur tindakan penelitian sedemikian rupa sehingga dapat meningkatkan kesejahteraan hewan atau mengurangi atau menghilangkan rasa sakit dan stress pada hewan coba (Sajuthi, 2012).

Ketiga prinsip etika ini haruslah dikombinasikan dengan 5 prinsip *freedom* dalam kesejahteraan hewan, yakni:

1. *Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus), dapat dilakukan dengan pemberian pakan minum yang *ad libitum* dan kemudahan hewan dalam mengakses pakan dan minum kapanpun mereka kehendaki.
2. *Freedom from discomfort* (bebas dari rasa tidak nyaman), dapat dilakukan dengan memperhatikan kebutuhan hewan terhadap tempat tinggal yang sesuai atau pemberian naungan atau sarang yang sesuai. Selain itu faktor lingkungan yang harus diperhatikan meliputi temperatur, kelembaban, ventilasi dan pencahayaan yang harus sesuai dengan kondisi alamiah hewan yang bersangkutan.

3. *Freedom from pain, injury and diseases* (bebas dari rasa sakit, luka dan penyakit), dimana selama penelitian haruslah menjalankan program kesehatan yang telah ditetapkan, menggunakan sebisa mungkin teknik non-invasif, serta jika dibutuhkan haruslah menggunakan obat pengurang rasa sakit atau pematasi rasa dan selalu menggunakan metode euthanasia yang dianjurkan dan telah disetujui oleh komisi etik
4. *Freedom from fear and distress* (bebas dari rasa takut dan stres), dapat dilakukan dengan menghindari prosedur atau teknik yang menyebabkan rasa takut dan stres pada hewan dan memberikan masa transisi dan adaptasi sebelum penelitian berlangsung.
5. *Freedom to express natural behaviour* (bebas untuk mengekspresikan tingkah-laku alamiah), dapat diupayakan melalui penyediaan luasan kandang yang cukup, kualitas kandang yang baik, dan teman dari hewan yang sejenis dengan memperhatikan sosialisasi, dan tingkah-laku spesifik. (Sajuthi, 2012).