

III. METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba berupa tikus putih galur *Sprague dawley* dengan *Post Test Only Control Group Design* dilakukan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif (tidak diberi perlakuan) dan kontrol positif (diberi perlakuan). Serta dilakukan rancangan acak lengkap. Dan merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya tentang pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap tumorigenesis hati tikus putih yang diinduksi DMBA.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama bulan Oktober-November 2014.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram sebanyak 20 ekor tikus yang diperoleh dari kampus IPB (Insitut Pertanian Bogor) Fakultas Peternakan, Bogor. Sampel adalah jaringan hati tikus putih populasi yang telah diinduksi DMBA dengan dosis dan kurun waktu tertentu. Tikus telah diterminasi kemudian diambil hatinya untuk disimpan dalam freezer -80°C di laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Adapun dalam pemilihan populasi ini mempunyai 3 kriteria yaitu :

1. Kriteria inklusi:

- a. Tikus putih betina galur *Sprague dawley*
- b. Sehat (tidak ada penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan bergerak aktif)
- c. Berusia 5-7 minggu
- d. Memiliki berat badan 100-200 gram

2. Kriteria eksklusi:

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

3. Kriteria drop out :

a. Tikus mati

2. Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus yang dipilih secara acak yang dibuat menjadi 4 kelompok. Berdasarkan jumlah perlakuan yang dilakukan. Setiap perlakuan akan menggunakan pengulangan dengan rumus Federer untuk rancangan acak lengkap yaitu :

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

keterangan:

(t) = kelompok perlakuan

(n) = jumlah sampel perkelompok perlakuan

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Penelitian dengan 3 (tiga) kelompok perlakuan dan 1 (satu) kelompok kontrol. Jumlah sampel perkelompok perlakuan adalah 5 (lima) sampel sehingga sampel keseluruhan yang dibutuhkan adalah 20 (dua puluh) sampel tikus. Seluruh sampel secara acak dibagi ke dalam 4 kelompok (Tabel 1), yaitu:

Tabel 1. Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
A	Sampel diberi perlakuan negatif sebagai kelompok kontrol. Tidak diinduksi DMBA, hanya diberi aquadest 1 mL per hari selama 4 minggu
B	Sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu dan diberi aquadest 1 mL per hari
C	Sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu
D	Sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu

D. Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah ekstrak daun sirsak

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah Aktivitas enzim enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi DMBA

2. Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Kelompok	Skala
Ekstrak daun sirsak	<p>Terdapat 4 kelompok dengan perlakuan berbeda</p> <ul style="list-style-type: none"> Kelompok A sampel diberi perlakuan negatif sebagai kelompok kontrol. Tidak diinduksi DMBA, hanya diberi aquadest 1 mL per hari selama 4 minggu Kelompok B sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu dan diberikan 1 mL per hari selama 4 minggu Kelompok C sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu Kelompok D sampel diberi perlakuan positif dengan diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40mg/kgBB 1 kali sehari selama 4 minggu 	Kategorik (nominal)
Aktivitas katalase	<p>enzim Uji aktivitas enzim katalase menggunakan metode Mates dkk. (1999), yang sudah dimodifikasi oleh Febrianti (2009). Aktivitas enzim katalase dinilai dengan mengamati adanya perubahan yang signifikan antarkelompok perlakuan (Zainuri dan Wanandi, 2012). Semakin tinggi aktivitas enzim katalase antarkelompok perlakuan, maka semakin baik efek antioksidan ekstrak daun sirsak terhadap zat karsinogen (Anatriera, 2009). Aktivitas katalase yang diambil adalah aktivitas spesifik katalase (Putri, 2009)</p>	Numerik (Rasio) U/mg

E. Alat dan Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini dalam penelitian ini adalah sampel hati, H₂O₂ 30%, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, bovine serum

albumine (BSA), aquadest, dan lain-lain. Serta alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, mikropipet volume 0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL , tip mikropipet 10 μL , 100 μL , 1000 μL , mikrotube 1.5 mL dan 2 mL, alat sentrifugasi, micropestle, freezer -80°C , spektrofotometer UV, kuvet kaca, aluminium foil, sarung tangan karet, alat tulis, dan alat-alat laboratorium (gelas kimia, pipet, pinset, sindok, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi).

F. Cara Kerja

Adapun cara kerja penelitian diatas adalah:

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 dan pencahayaan yang cukup (14 jam lamanya terang dan 10 jam lamanya gelap). Sebelum melakukan percobaan tikus diadaptasi dalam kandang selama 7 hari guna menyeragamkan cara hidup dan pakannya. Kesehatan tikus dipantau setiap hari dan berat badan tikus ditimbang setiap pekan.

2. Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Pembuatan ekstrak daun sirsak menggunakan bahan berupa daun sirrsak yang sudah dikeringkan sebanyak 500 gram. Daun sirsak kering digiling dan diayak untuk kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

Metode maserasi yang dilakukan adalah dengan cara merendam daun sirsak dalam larutan ethanol 70% dalam suhu 28°C. Selama proses perendaman dilakukan pengadukan dan penyaringan setiap harinya sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak daun sirsak. Dari 500 gram simplisia dau sirsak didapatkan ekstrak daun sirsak seberat 118,7 gram.

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

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok C

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

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

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

Dosis ekstrak daun sirsak untuk kelompok D

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

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

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

Kemudian dilarutkan dalam 1 mL aquadest untuk diberikan melalui mulut dengan menggunakan sonde lambung.

3. Pembuatan Larutan DMBA

Menurut Iswahyudi dan Wongso (2013) DMBA bisa menginduksi kanker dengan cepat pada dosis 20 mg/kgBB. Berat badan tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gram, sehingga perhitungan dosis untuk DMBA pada penelitian ini adalah:

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

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

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

kemudian dilarutkan dalam 1 ml minyak jagung untuk diberikan melalui mulut menggunakan sonde lambung. Minyak jagung merupakan senyawa *inert* yang digunakan untuk melarutkan DMBA dan tidak memiliki sifat karsinogenik (Meiyanto dkk., 2007).

4. Penginduksian DMBA dan Ekstrak Daun Sirsak

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang akan digunakan adalah serbuk DMBA yang dilarutkan dengan menggunakan minyak jagung. DMBA yang sudah dilarutkan kemudian diinduksikan dengan menggunakan sonde

lambung. Jadwal penginduksian dilakukan 2 (dua) kali dalam seminggu selama 4 minggu perlakuan. Dosis yang diberikan adalah 20 mg/kgBB dengan pelarut minyak jagung. Pada setiap perlakuan, tikus dengan berat badan \pm 200 gram mendapatkan \pm 1 mL larutan DMBA konsentrasi 4 mg/ml.

Larutan kental ekstrak daun sirsak yang telah siap mula-mula dilarutkan dengan aquadest. Ekstrak daun sirsak diberikan dengan dosis 20 mg/kgBB untuk kelompok C dan 40 mg/kgBB untuk kelompok D dengan menggunakan sonde lambung. Pada setiap perlakuan, tikus dengan berat badan \pm 200 gram mendapatkan \pm 1 mL larutan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 4 mg/mL untuk kelompok C dan konsentrasi 8 mg/ml untuk kelompok D. Larutan ekstrak daun sirsak diberikan setiap hari selama 4 minggu perlakuan.

Hal hal yang sangat diperhatikan dalam prosedur ini adalah penggunaan sonde lambung yang dibedakan antara tikus kontrol dan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi. Selain itu, berat badan tikus juga ditimbang saat sebelum, selama, dan setelah dilakukan intervensi untuk menghindari adanya bias dalam penelitian.

5. Terminasi dan Penyimpanan

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir dengan terlebih dahulu dilakukan anestesi. Anestesi yang diberikan adalah *ketamine-xylazine* dengan dosis 75-100 mg/kgBB + 5-10 mg/kgBB secara intraperitoneal. Tikus kemudian didekapitasi dengan menggunakan

metode *cervical dislocation*. Selanjutnya dilakukan proses pembedahan dan pengambilan jaringan hati. Kemudian dimasukkan ke dalam lemari es -4°C selama 1 hari. Kemudian disimpan di pendingin (*upright freezer*) pada suhu -80°C sampai siap digunakan.

6. Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.05 M dengan PH 7 dan 7.4 . Sebanyak 5.4376 g Na_2HPO_4 ditambah dengan 2.6469 g KH_2PO_4 dan 2.250 g NaCl, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga volumenya mencapai 500 mL. Selanjutnya diukur pH larutan dengan menggunakan pH meter hingga pH 7,4.

7. Pembuatan Homogenat Sampel

Sampel jaringan hati diambil dari *upright freezer* lalu dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu -4°C selama 1 hari. Sampel jaringan yang telah diambil kemudian dipotong dan ditimbang sebanyak 100 gram. Dibuat homogenat dengan ditambahkan PBS 0,05 M dengan PH 7.4 pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan micropleste. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Lalu supernatan dipisahkan dari pelet.

8. Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh blanko setiap menit selama 2 menit. Dilakukan juga pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh sampel setiap menit selama 2 menit. Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan memipetkan ke dalam kuvet 950 μl larutan H_2O_2 dengan pengenceran optimal adalah 1:4000 (Febrianti, 2009). Kemudian ditambahkan dengan 50 μl PBS 0.05 M dengan pH 7, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokkan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm. Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 μL sampel ditambahkan pada 950 μL H_2O_2 dengan pengenceran 1:4000, untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko. Selanjutnya penguraian H_2O_2 , baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangkan absorbansi di awal (t_1) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi setiap menit sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Kemudian hasil pengamatan dicatat.

9. Penentuan Kurva Standar Protein

Untuk menentukan kurva standar protein, ditimbang 50 mg BSA untuk kemudian dilarutkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:1. Larutan BSA kemudian diencerkan dengan perbandingan 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, dan 0,8. Untuk selanjutnya diukur serapannya pada panjang

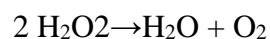
gelombang 280 nm. Hasil aktivitas spesifik pengukuran dicatat dalam tabel dan dibuat kurvanya. Dari kurva tersebut dicari rumus untuk menghitung konsentrasi protein jaringan.

10. Penentuan Konsentrasi Protein Hati

Untuk menentukan konsentrasi protein pada hati, dilakukan pengukuran absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada pengenceran optimal pada 1:100 (Putri, 2009). Dengan panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel. Konsentrasi protein (mg/ml) hati kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel.

11. Penentuan Aktivitas Katalase

Katalase adalah antioksidan enzimatik yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan molekul O_2 .



Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase. Perhitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Katalase (U/ml)} = \frac{(\Delta\text{Absorbansi Uji} - \Delta\text{Absorbansi Blanko}) / \text{menit} \times \text{faktor pengencer}}{(\text{molaritas H}_2\text{O}_2) \times (\text{volume sampel yang diukur})}$$

$$\text{Aktivitas spesifik katalase (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Katalase (U/mL)}}{\text{Kadar Protein dalam Sampel (mg/mL)}}$$

Hasil perhitungan tersebut kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase (U/mg). Semua hasil dicatat dalam tabel.

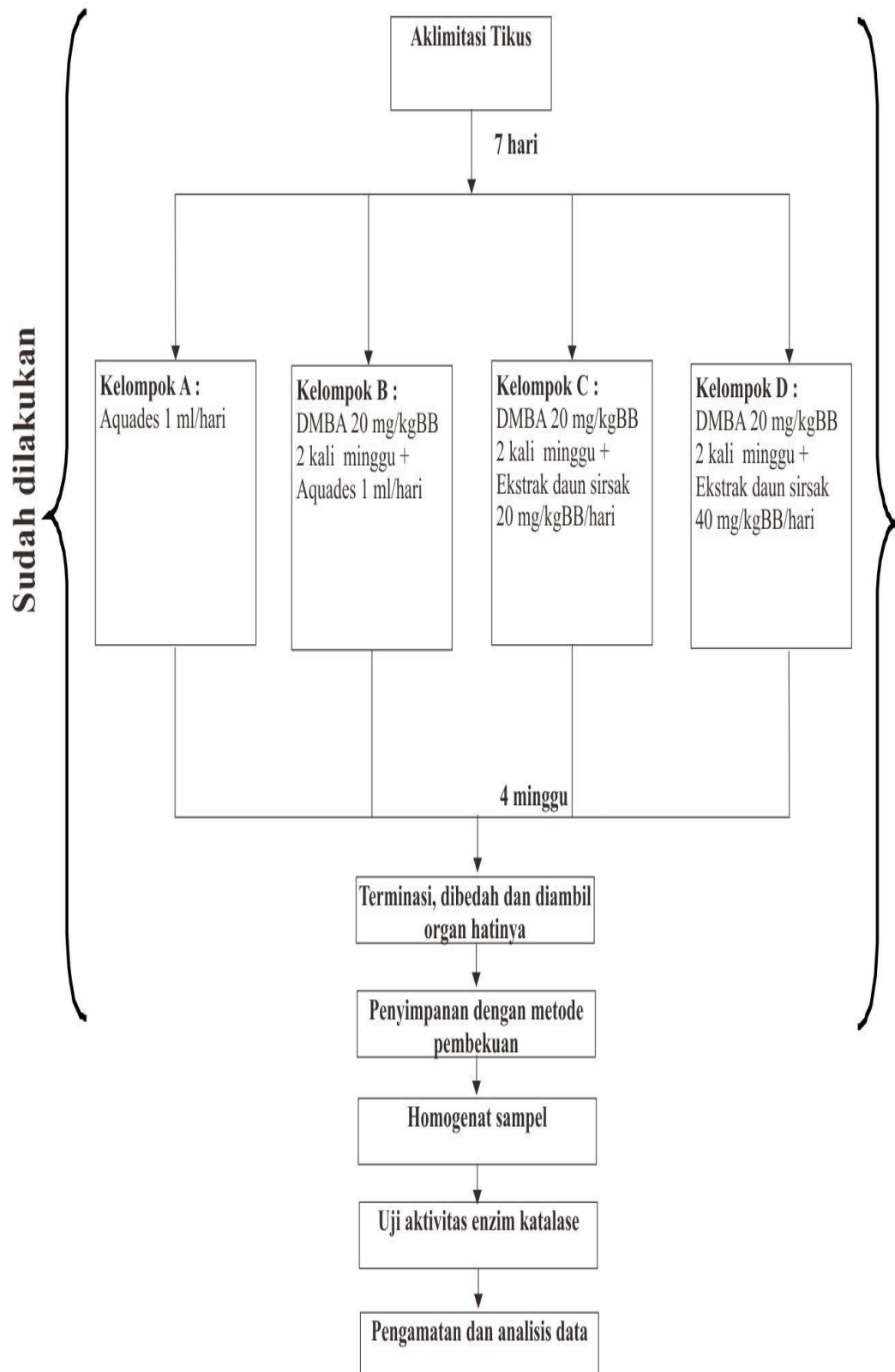
G. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis data bivariat. Digunakan untuk mengetahui hubungan variabel independent dengan variabel dependent. Antara pemberian ekstrak daun sirsak dengan aktivitas enzim katalase. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara semua data hasil pengukuran aktivitas enzim katalase. Kemudian dianalisis menggunakan program uji statistik. Setelah menentukan variabel yang dihubungkan, dengan hipotesis komparatif tidak berpasangan dengan lebih dari 2 (dua) kelompok yaitu kategorik (nominal) dengan numerik. Dengan menggunakan uji *one way ANNOVA*. Sebelum itu dilakukan uji normalisasi uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 untuk melihat apakah data berdistribusi normal dan homogen. 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 *one way ANNOVA*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *one way ANNOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan

dengan melakukan analisis *Post-Hoc Test* dengan *Least Significance Difference* (LSD) untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika pada uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis uji *Mann-whitney* aka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc Test* dengan uji *Mann-whitney*.

H. Alur Penelitian

Sebelum dilakukan pemberian ekstrak dan DMBA, tikus terlebih dahulu ditimbang berat badan awalnya, kemudian dikelompokkan menjadi 4 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 tikus. Kemudian tikus-tikus tersebut diadaptasi selama 7 minggu, kemudian diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya, yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, positif, kelompok ekstrak 20 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak 40 mg/kgBB. Perlakuan dilakukan selama 4 minggu, sebelum diambil jaringan hatinya untuk dilakukan homogenat. Setelah dilakukan homogenat didapatkan pelet dari sampel. Kemudian dilakukan pemeriksaan enzim katalase.



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian

I. Etika Penelitian

Penelitian kesehatan umumnya menggunakan percobaan pada hewan coba yang merupakan makhluk ciptaan Allah SWT yang memiliki hak untuk hidup juga. Oleh karena itu, ilmuwan atau para peneliti dibidang kesehatan bersepakat bahwa hewan coba yang menderita dan mati demi kepentingan pengetahuan manusia perlu dijamin kesejahteraan dan memperlakukannya secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitiannya yaitu : *replacement*, *reduction*, dan *refinement*. Oleh sebab itu, sebuah penelitian dilakukan harus memiliki *ethical clearance* atau izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) dimanapun peneliti itu berada. Untuk itu penelitian ini diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, karena penelitian ini memanfaatkan hewan percobaan dalam pelaksanaannya.