

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian lanjutan ini dilakukan di laboratorium biokimia dan biologi molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 4 bulan dari bulan September sampai Desember.

C. Populasi dan Sampel

Penelitian ini adalah penelitian lanjutan dari penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap tumorigenesis hati tikus putih yang diinduksi senyawa *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA).

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Dalam penelitian ini populasi adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA sebagai model onkogenesis hati. *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* umumnya digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian karena memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan manusia, yakni termasuk ke dalam kelas mamalia. Oleh karena itu, tikus sering dijadikan model penelitian aplikasi kesehatan manusia karena terdapat persamaan fisiologis. Sifat *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* telah diketahui dengan jelas, antara lain: mudah dipelihara dalam jumlah besar, cepat berkembang biak dan tidak rentan terhadap infeksi bakteri dan virus, serta cukup agresif dibandingkan dengan galur lainnya (Permana, 2010).

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil, ekor lebih panjang daripada badan, dan berumur 6-7 minggu dengan berat rata-rata berkisar antara 100-200 gram, yang diinduksi DMBA.

Jumlah sampel pada penelitian ini didapatkan berdasarkan jumlah perlakuan yang dilakukan. Setiap perlakuan akan menggunakan pengulangan dengan rumus Federer (1977) untuk rancangan acak lengkap yaitu:

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

dengan t = jumlah kelompok dan n = jumlah ulangan

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

$$n \geq 5$$

Dalam penelitian ini digunakan 20 ekor tikus putih Sprague Dawley yang terbagi dalam 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus).

Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih galur *Sprague Dawley* sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- b. Memiliki berat 100-200 gram
- c. Berusia sekitar 6-7 minggu
- d. Tikus putih betina

Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan.

Kriteria Drop Out

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

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel terikat : Kadar asam sialat pada jaringan hati tikus yang diinduksi senyawa DMBA
- b. Variabel bebas : Dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*)

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</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kelompok I (kontrol negatif) + terapi aquades 1ml selama 4 minggu - Kelompok II (kontrol positif) = induksi DMBA 2x20 mg/kgBB/minggu selama 4 minggu + aquadest 1ml/hari - Kelompok P1 (perlakuan)= induksi DMBA 2x20 mg/kgBB/minggu selama 4 minggu + pemberian ekstrak daun sirsak 20mg/kgBB/hari selama 4 minggu - Kelompok P2 (perlakuan) = induksi DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu selama 4 minggu + pemberian ekstrak daun sirsak 40mg/kgBB/hari selama 4 minggu 	Kategorik
Kadar asam sialat hati tikus	<p>Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kadar asam sialat antara kelompok perlakuan kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2.</p>	Numerik

E. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan berupa kandang, tempat minum dan makan, timbangan digital, sonde lambung berujung *Nasogastric tube* (NGT), alat-alat bedah minor, blender, rotary evaporator, kertas saring, tips pH meter, tabung erlenmeyer 500 ml, tabung penyimpanan, *upright freezer* -80°C Kaltis, gelas ukur 100 ml, *micropestle*, *sentrifuge* Eppendorf 5417R, tabung eppendorf ukuran 1,5 ml, *waterbath* Memmert, spektrofotometer S-30 Boeco, mikropipet ukuran 100-1000 μl , 10-100 μl , 0-10 μl , vortex Biosan dan lemari es $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Bahan utama yang digunakan untuk penelitian lanjutan ini adalah hati tikus putih galur sprague dawley sebanyak 100gr yang diletakkan di freezer Kaltis suhu -80°C , larutan Phosphate Buffer saline (PBS) 0,1M dengan pH 7,4, TCA (asam trikloro asetat) 10% dan 5%, H_2SO_4 0,1 N, larutan natrium periodat, larutan natrium arsenit 10%, larutan TBA (asam tiobarbiturat) 0,6% dalam Na_2SO_4 0,5M, dan larutan sikloheksanon dan es batu.

F. Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Percobaan

Tikus 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 gelap 10 jam. Sebelum melakukan percobaan tikus diadaptasi dalam kandang selama 7 hari untuk menyeragamkan cara hidup dan makannya. Kesehatan tikus dipantau setiap hari dan berat tikus ditimbang setiap minggu.

2. Ekstraksi Daun sirsak dalam Etanol 70%

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

Dosis ekstrak daun sirsak yang akan diberikan 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

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

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

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

3. Pembuatan Larutan DMBA

Pelarut yang digunakan untuk senyawa DMBA adalah *corn oil* atau minyak jagung, karena DMBA larut dalam pelarut ini. Minyak jagung merupakan senyawa *inert* yang digunakan untuk melarutkan DMBA, tidak memiliki sifat karsinogenik.

Berdasarkan penelitian oleh Meiyanto (2007) telah ditetapkan dosis serta frekuensi DMBA yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 20 mg/kgBB,

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.

4. Penginduksian DMBA, Ekstrak Daun Sirsak dan Pengambilan Sampel.

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. Induksi menggunakan sonde oral, dengan jadwal pemberian seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kgBB dengan pelarut minyak jagung. Setiap tikus pada kelompok II, III, IV dengan berat sekitar 200 gram mendapatkan kurang lebih 1 ml

larutan dengan konsentrasi 4mg/ml.

Bahan yang akan digunakan untuk larutan ekstrak daun sirsak adalah ekstrak daun sirsak yang dilarutkan dalam aquades. Ekstrak daun sirsak diberikan dengan dosis 20mg/kgBB pada kelompok III dan 40mg/kgBB pada kelompok IV, dengan menggunakan sonde lambung. Setiap tikus dengan berat \pm 200g 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 4 minggu. Sonde untuk tikus control 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 anastesi terlebih dahulu menggunakan ketamine-xylazine dosis 75-100mg/kg + 5-10mg/kgBB secara IP, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation*. Setelah itu jaringan hati diambil melalui

pembedahan.

5. Penyimpanan Organ.

Setelah dilakukan pembedahan jaringan hati diambil dan dimasukkan ke dalam tabung penyimpanan organ setelah itu diletakkan di freezer kaltis dengan suhu -4°C selama 1 hari dan kemudian diletakkan di freezer kaltis dengan suhu -80°C sampai organ siap digunakan kembali.

6. Pembuatan Homogenat Hati.

Potong organ hati dan timbang $\pm 100\text{mg}$, tempatkan pada Testube $1\frac{1}{2}\text{mL}$.

↓
Lalu tambahkan $0,5\text{mL}$ PBS $0,1\text{M}$ pH $7,4$

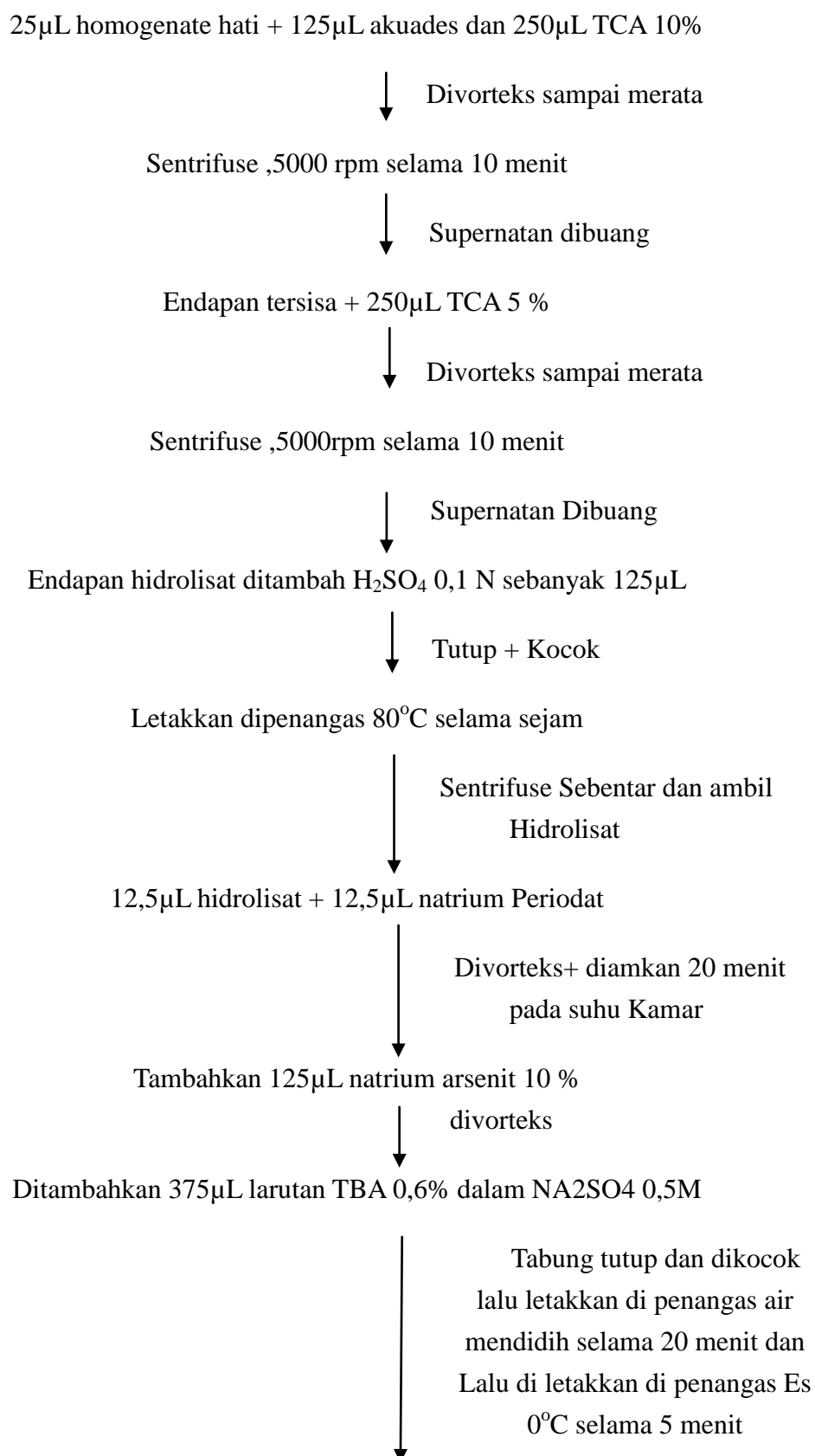
↓
Vorteks dan lumatkan menggunakan micropastle

↓
Kemudian tambahkan $500\ \mu\text{L}$ PBS $0,1$ pH $7,4$ lalu divorteks dan tambahkan $500\ \mu\text{L}$ PBS $0,1$ pH $7,4$

↓
Sentrifuse 500rpm selama 10 menit

↓
Ambil supernatan pindahkan ke microtube kosong $n\ 1,5\text{ml}$ simpan pada suhu -20°C

7. Pemeriksaan Kadar Asam Sialat



Ditambahkan 540 μ L larutan Sikloheksanon (Sigma).



Sentrifuse selama 3 menit
,5000rpm.

Fasa sikloheksanon yang terbentuk pada bagian atas larutan diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 549 nm.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Uji Normalitas Data dan Homogenitas 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, Setelah itu dilanjutkan Uji homogenitas / levene.

2. Uji Parametrik

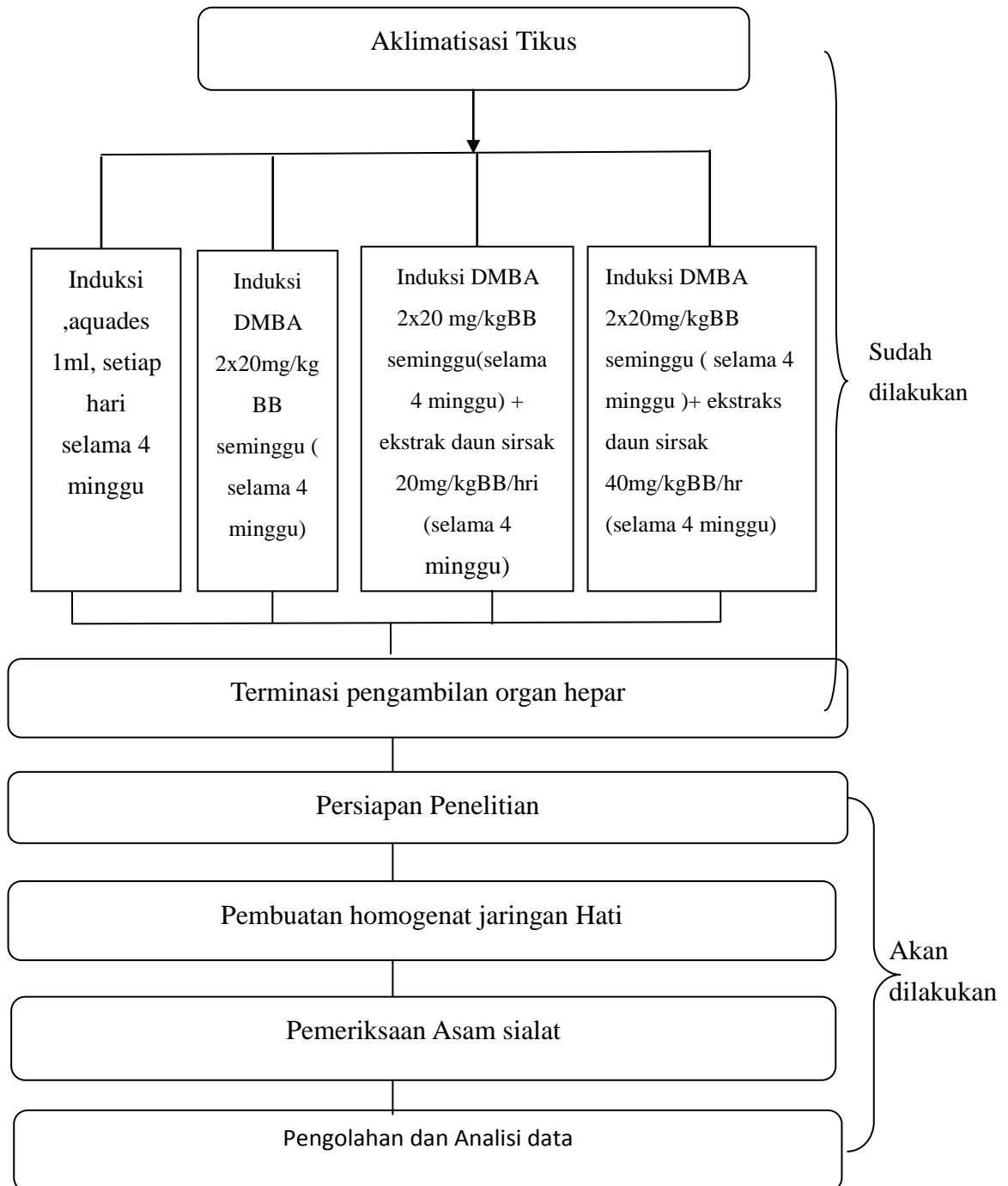
Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametric *one way* ANOVA. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, akan diuji dengan uji Kruskal-Wallis.

3. Uji *Post Hoc*

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. Sedangkan Alat untuk melakukan analisis *post-hoc* untuk uji Kruskal–Wallis adalah dengan uji Mann–Whitney.

H. Diagram Alur

Sebelum penelitian, dilakukan aklimatisasi tikus untuk membuat tikus beradaptasi. Aklimatisasi tikus dilakukan selama 7 hari. Kemudian tikus dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, dan perlakuan 2. Tikus diberi perlakuan selama 4 (empat) minggu. Setelah itu, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan hati tikus. Kemudian, dilakukan pembuatan homogenat jaringan hati tikus lalu lakukan hidrolisis ringan untuk melihat kadar asam sialat pada masing-masing kelompok. Diagram alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 9. Diagram Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak terhadap Kadar Malondialdehid pada Jaringan Hati Tikus Putih yang Diinduksi DMBA

I. Etika Penelitian

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 Supranto yaitu $(t-1) (n-1) \geq 15$ 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 maka pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

b. Bebas dari ketidaknyamanan maka pada penelitian hewan coba ditempatkan di *pet house* dengan suhu terjaga 20–25⁰C 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 coba 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 literature 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).