

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

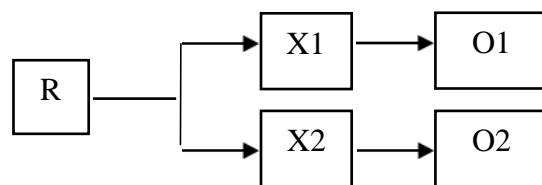
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Onkologi, Farmakologi dan Biokimia.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada untuk pengandangan, pemberian pakan, perlakuan hewan coba, dan pengujian sampel. Penelitian dan pengumpulan data pada penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Maret-Juni tahun 2018.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true* eksperimental dengan *randomized post-test only with control group design*, menggunakan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian ekstrak etanol daun *Annona muricata*, sedangkan luaranya (*outcome*) adalah kadar MDA darah tikus *Sprague Dawley* betina diinduksi DMBA



Gambar 6. Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Alokasi random tikus ke dalam 2 kelompok secara acak.

X1 : Kelompok perlakuan. Kelompok ini diberi pakan standar, air minum, dan diberi ekstrak etanol daun *Annona muricata* dengan dosis 200 mg/kgBB/hari selama 12 hari.

X2 : Kelompok kontrol. Kelompok ini diberi pakan standar dan air minum selama 12 hari

O1 : Hasil pemeriksaan kadar MDA darah tikus kelompok perlakuan (P).

O2 : Hasil pemeriksaan kadar MDA darah tikus kelompok kontrol (K).

3.4 Populasi dan sampel penelitian

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi hewan coba yaitu tikus betina galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada

3.4.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus *Sprague Dawley* dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme mirip dengan manusia. Seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, dengan pemberian pakan dan air minum standar. Tikus *Sprague Dawley* yang memenuhi kriteria inklusi kemudian diinduksi DMBA dengan dosis 20 mg/KgBB, 2 kali seminggu selama 5 minggu melalui sonde lambung.

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Jenis kelamin betina
- 2) Usia tikus 5 minggu
- 3) Tikus terlihat sehat (bergerak aktif) dan tidak cacat fisik

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Tikus cacat dan mati selama penelitian
- 2) Tikus tidak mau makan dan minum yang telah disediakan

3.4.3 Cara sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

3.4.4 Besar sampel

Jumlah sampel minimal menurut kriteria WHO adalah 5 tikus perkelompok. Pada penelitian ini digunakan 7 ekor tikus per kelompok. Dalam penelitian ini terdapat 1 kelompok kontrol dan 1 kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 14 ekor tikus betina *Sprague Dawley* yang terbagi dalam 2 kelompok.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Ekstrak etanol daun *Annona muricata*

3.5.2 Variabel terikat

Kadar MDA darah

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	Ekstrak etanol daun <i>Annona muricata</i>	Ekstrak etanol daun sirsak diperoleh dalam bentuk ekstrak kental dari PT. Industri Jamu dan Farmasi Sido Muncul, Tbk. Dosis pemberian 200 mg/KgBB/hari diberikan melalui sonde lambung.	Ya / Tidak	Nominal
2.	Kadar darah MDA	Parameter peroksidase lipd yang dapat diukur dalam darah. Kadar MDA diukur dengan teknik <i>Enzym-linked immunosorbent assay</i> (ELISA), dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm	ng/ml	Rasio

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

- 1) Ekstrak etanol daun *Annona muricata* diperoleh dalam bentuk ekstrak kental dari PT. Industri Jamu dan Farmasi Sido Muncul, Tbk.
- 2) Pakan standar dan air minum
- 3) Aquades
- 4) DMBA (Sigma Aldrich)

- 5) KIT Elisa MDA (Finetest, China)

3.7.2 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Timbangan
- 3) Spuit
- 4) Sonde lambung
- 5) Tabung reaksi
- 6) Spektrofotometer
- 7) Kuvet
- 8) Vortex
- 9) Mikropipet
- 10) *Waterbath*

3.7.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian pengaruh ekstrak etanol daun *Annona muricata* terhadap kadar MDA darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Pembuatan ekstrak etanol daun *Annona muricata*

Daun tanaman *Annona muricata* segar disortasi terlebih dahulu untuk memisahkan zat pengotornya seperti daun busuk, tanah, biji-bijian dan lain-lain. Daun yang telah disortasi kemudian dicuci hingga bersih dan dikeringkan dalam oven suhu 60°C. Daun yang telah betul-betul kering

(mudah dipatahkan) digiling kasar. Daun yang telah digiling dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 2 lt yang berisi alkohol 96%, untuk kemudian dilakukan proses refluks selama 5 jam pada suhu 90°C. Hasil refluks di saring menggunakan kain saring bersih. Filtrat kemudian dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental (kadar air \pm 30-40%). Ekstrak Kental Daun Sirsak kemudian dilarutkan dengan *aquadest* dan diberikan dengan menggunakan sonde pada kelompok perlakuan.

3.7.4.2 Penentuan dosis terapi

Meiyanto melaporkan pemberian DMBA dengan dosis 20mg/kgBB yang dilakukan 2 kali seminggu selama 5 minggu terbukti dapat menginduksi terjadinya kanker payudara. kanker payudara timbul pada minggu ke 12.⁴¹ Oleh karena itu, peneliti menggunakan DMBA dengan dosis 20 mg/KgBB dan pemberian dua kali seminggu selama 5 minggu.

Adelina melaporkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak sebanyak 200 mg/kgBB/hari menunjukkan efek sebagai antiproliferasi sel hepar tikus terinduksi DMBA.⁵² Penelitian yang dilakukan Wulandari, ekstrak etanol daun sirsak sebanyak 200 mg/kgBB/hari menurunkan kadar LDL tikus.⁵³ Rahman melaporkan pemberian ekstrak etanol daun sirsak selama 12 hari menurunkan kadar MDA darah tikus diabetes melitus.⁶⁶ Berdasarkan hal-hal tersebut, peneliti memutuskan untuk memberikan ekstrak daun *Annona muricata* dengan dosis 200 mg/kgBB/hari selama 12 hari.

3.7.4.3 Intervensi terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada. Tikus *Sprague Dawley* dibagi secara acak kedalam 2 kelompok sebagai berikut.

1) Kelompok perlakuan (P1)

Kelompok ini diberi pakan standar, air minum, dan diberi ekstrak etanol daun *Annona muricata* dengan dosis 200 mg/kgBB/hari selama 12 hari.

2) Kelompok kontrol (P2)

Kelompok ini diberi pakan standar dan air minum selama 12 hari

Setelah perlakuan selama 12 hari, diukur kadar MDA darah.

3.7.4.4 Pemeriksaan kadar MDA darah

Pengambilan darah untuk pemeriksaan MDA pada tikus *Sprague dawley* diambil melalui *pleksus vena retro-orbita*. Pemeriksaan kadar MDA serum dengan metode *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) diukur menggunakan alat spektrofotometer.

- a. *Plate* dicuci 2 kali sebelum menambahkan larutan standar, sampel dan kontrol kedalam *well*
- b. Sebanyak 50 μ L standar atau sampel ditambahkan ke masing-masing *well*

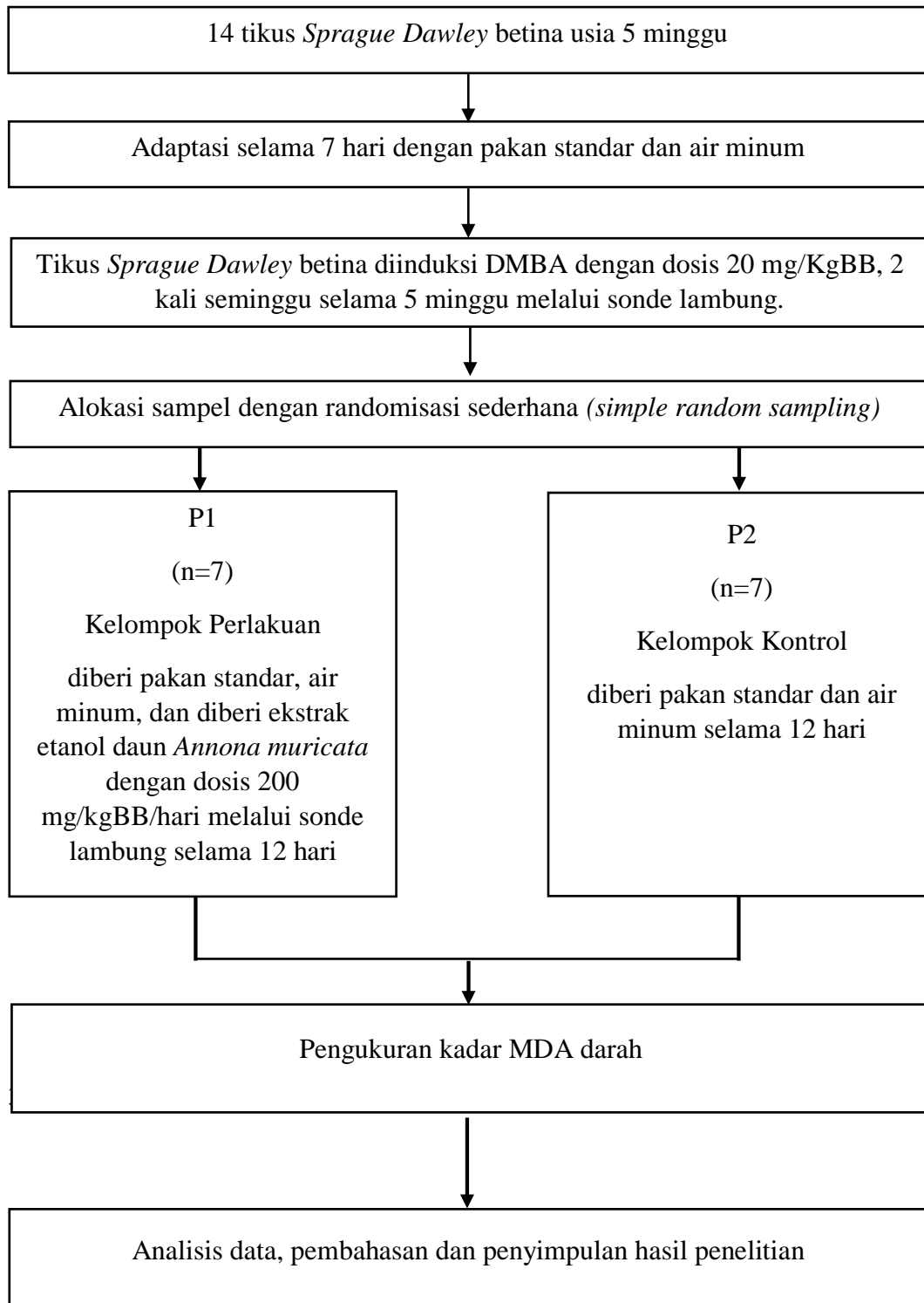
- c. Sebanyak 50 μ L Antibodi *biotin-detection* segera ditambahkan ke masing-masing *well*.
- d. *Well* ditutup dengan *plate sealer* kemudian dinkubasi selama 45 menit pada suhu 37° C.
- e. Setiap *well* dilakukan aspirasi cairan dan kemudian diisi *wash buffer* untuk mencuci. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali
- f. 100 μ L *streptavidin conjugate* ditambahkan untuk masing-masing *well*.
- g. *Well* ditutup dengan *plate sealer* kemudian dinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- h. Setiap *well* dilakukan pencucian kembali sebanyak lima kali
- i. 90 μ L *tetramethylbenzidine* ditambahkan ke dalam setiap *well* kemudian diinkubasi selama 15-20 menit pada suhu 37°C.
- j. 50 μ L *stop solution* ditambahkan ke masing-masing *well*. Kemudian warna larutan akan berubah menjadi kuning.
- k. Dilakukan pembacaan *optical density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm
- l. kurva standar dibuat dengan nilai *optical density* rata-rata untuk setiap standar pada sumbu y atau sumbu x terhadap konsentrasi pada sumbu x atau sumbu y.
- m. Konsentrasi sampel diketahui setelah memasukkan Nilai *optical density* dari sampel.

3.7.4.5 Pengambilan data

Pemeriksaan kadar MDA darah diawali dengan pengambilan darah dari pleksus retroorbitalis pada hari ke-13 setelah pemberian ekstrak daun *Annona muricata*, tikus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk diambil darahnya pada vena retroorbitalis untuk pemeriksaan

Setelah perlakuan pada hewan coba selesai, selanjutnya tikus akan diterminasi dengan mendislokasi sendi atlantooccipital dan dikubur oleh ahli dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada.

3.8 Alur penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

3.9 Analisis data

Analisis data diolah dengan program komputer. Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *t-test* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika penelitian

Ethical Clearance didapat dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor No. 18/EC/H/FK-RSDK/IV/2018