

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah fisiologi, onkologi dan pengobatan tradisional

3.2. Tempat Dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

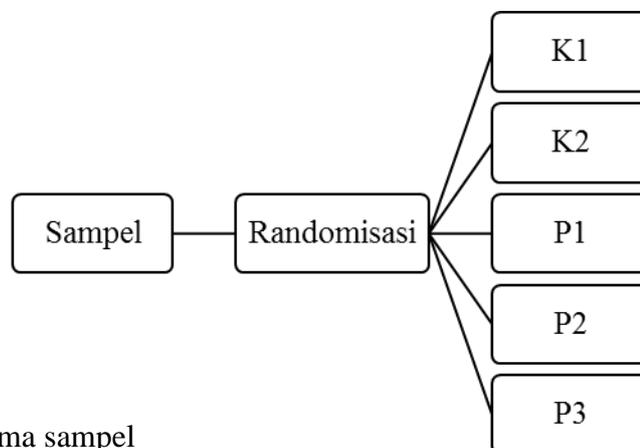
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 2 dan 4 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 sampai dengan bulan September 2018.

3.3. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan desain penelitian *randomized post test only control group design*. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan seperti pada skema:



Gambar 5. Skema sampel

Keterangan

K1 : Diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal NaCl fisiologis 0,9%
seminggu sekali selama 2 minggu

K2 : Diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB
seminggu sekali selama 2 minggu

P1 : Diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 100
mg/kg BB selama 14 hari

P2 : Diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 200
mg/kg BB selama 14 hari

P3 : Diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 400
mg/kg BB selama 14 hari

3.4. Populasi Dan Sampel

3.4.1. Populasi Target

Populasi target dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley*

3.4.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* yang diperoleh dari LPPT 4 UGM

3.4.3. Sampel

3.4.3.1. Besar Sampel

Sampel penelitian didapatkan dari rumus Federer (1967) untuk uji eksperimental adalah:

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

Di mana 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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$N \geq 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor. Apabila ada kemungkinan terjadi *drop out* yang besarnya 10% maka besar sampel dengan koreksi *drop out* adalah:

$$n_{do} = \frac{n}{1 - do} = \frac{5}{1 - 0,1} = 5,55 \approx 6$$

Berdasarkan perhitungan di atas besar sampel yang dibutuhkan untuk sampel penelitian ini adalah 6 ekor tikus untuk setiap kelompok. Sehingga besar sampel total untuk 5 kelompok adalah 30 ekor tikus.

3.4.3.2. Cara Penentuan Sampel

Sampel ditentukan dengan metode randomisasi sederhana dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.3.3. Kriteria Inklusi

- Tikus *Sprague dawley* jantan
- Usia 5-7 minggu
- Berat badan 120-150 gram
- Kondisi fisik sehat, gerakan aktif
- Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

3.4.3.4. Kriteria Eksklusi

- Tikus mati atau sakit ketika diaklimatisasi

3.4.3.5. Kriteria *Drop Out*

- Tikus mati saat penelitian

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

- Ekstrak daun *Carica pubescens* pada beberapa tingkatan dosis (100 mg, 200 mg dan 400 mg)

3.5.2. Variabel Terikat

- Jumlah leukosit

3.6. Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No	Jenis Variabel	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	Bebas	Ekstrak daun <i>Carica pubescens</i>	Daun <i>Carica pubescens</i> segar yang diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut ethanol 70% dengan 3 dosis yaitu 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB	-	Ordinal
2.	Terikat	Jumlah leukosit	Perhitungan jumlah leukosit dengan <i>Hematology Analyzer</i>	sel/ μ L	Rasio

3.7. Alat Dan Bahan Penelitian

3.7.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Kandang tikus
2. Sonde lambung
3. Timbangan
4. Gelas ukur
5. Sduit *disposable*
6. Maserator
7. Hemositometer
8. Tabung EDTA

3.7.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah:

1. Ransum pakan standar
2. Ekstrak daun *Carica pubescens*
3. *Azoxymethane* (AOM)
4. Larutan NaCl 0,9%
5. Darah tikus
6. Ketamin 10%

3.8. Cara kerja

3.8.1. Adaptasi Tikus *Sparague dawley* Jantan

Tikus *Sprague dawley* diaklimatisasi selama 1 minggu dalam kandang yang cukup luas agar tikus dapat bergerak bebas dan tidak stress. Tikus diberi pakan standar setiap hari selama 1 minggu

3.8.2. Pengelompokan

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dikelompokkan dengan metode sederhana menjadi lima kelompok dengan 5 ekor tikus pada tiap kelompok. Lima kelompok tersebut yaitu kelompok K1, K2, P1, P2 dan P3.

3.8.3. Ekstraksi Daun *Carica pubescens*

Ekstraksi daun *Carica pubescens* dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut ethanol 70% pada suhu 50°C dan disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.

3.8.4. Penentuan Dosis Ekstrak Daun *Carica pubescens*

Dosis yang dipakai pada penelitian sebelumnya dengan ekstrak daun *Carica papaya* adalah 200 mg/kg BB.¹⁹ Dosis sebelumnya dibagi 2. Dosis selanjutnya dicari dengan menggunakan rumus:

$$Y_n = Y_1 \cdot R^{N-1}$$

Dengan Y_n = dosis ke n ; Y_1 = dosis ke 1; R = faktor pemacu (lebih besar dari 1); N = deret dosis

Berdasarkan perhitungan tersebut didapatkan dosis ekstrak daun *Carica pubescens* yang dipakai:

- Dosis 1 = $200 \times \frac{1}{2} = 100$ mg/kg BB
- Dosis 2 = 200 mg/kg BB
- Dosis 3 = $Y_2 = Y_1 \times 2^{2-1}$
 $= 200 \times 2$
 $= 400$ mg/kg BB

3.8.5. Injeksi *Azoxymethane* (AOM)

Tikus dalam kelompok K1 diberi 1 ml suntikan intra peritoneal NaCl fisiologis 0,9% seminggu sekali selama 2 minggu dan tikus di kelompok K2, P1, P2, P3 diberi suntikan intra peritoneal AOM yang dilarutkan dalam larutan salin fisiologis seminggu sekali (10 mg/kgBB) selama 2 minggu.

3.8.6. Pemberian Perlakuan

Setelah adaptasi dan pengelompokan, tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya. Tikus dalam kelompok K1 diberi 1 ml suntikan intra

peritoneal NaCl fisiologis 0,9% seminggu sekali selama 2 minggu dan tikus di kelompok K2, P1, P2, P3 diberi suntikan intra peritoneal AOM yang dilarutkan dalam larutan salin fisiologis seminggu sekali (10 mg / kg berat badan) selama 2 minggu untuk menginduksi kanker kolorektal. Setelah itu kelompok tikus P1, P2, P3 diberi ekstrak daun *Carica pubescens* dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB selama 2 minggu.

Iktisar perlakuan tiap kelompok adalah sebagai berikut :

- Kelompok K1: diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal NaCl fisiologis 0,9% seminggu sekali selama 2 minggu
- Kelompok K2: diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB seminggu sekali selama 2 minggu
- Kelompok P1: diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB seminggu sekali selama 2 minggu + ekstrak daun *Carica pubescens* 100 mg/kg BB
- Kelompok P2: diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 200 mg/kg BB
- Kelompok P3: diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB seminggu sekali selama 2 minggu + ekstrak daun *Carica pubescens* 400 mg/kg BB

3.8.7. Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-15 di daerah retroorbital hewan coba sebanyak 2 cc. Sebelum sampel darah diambil, hewan coba terlebih dahulu diinjeksi dengan 0,2 cc ketamin yang diencerkan dengan aquadest dengan perbandingan 2:10. Kemudian darah yang telah diambil ditampung dalam botol tempat penampung darah yang diberi bahan antikoagulan (EDTA) dengan perbandingan 2 ml darah dan 1 mg EDTA lalu segera dicampur pelan dengan gerakan melingkar di atas meja supaya darah dan bahan antikoagulan tercampur merata.

3.8.8. Pengukuran Jumlah Leukosit

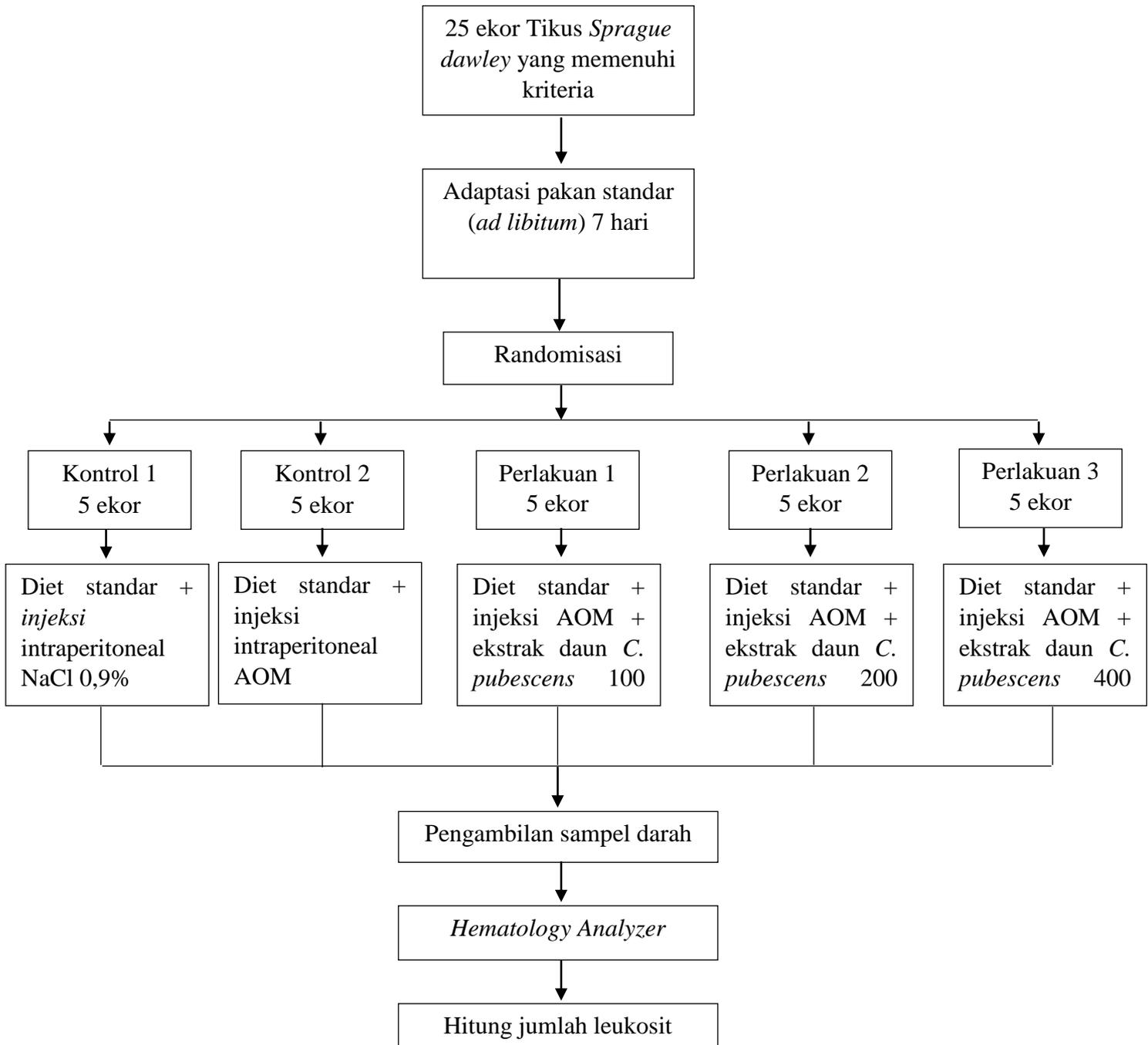
Pengukuran jumlah leukosit dilakukan dengan pemeriksaan darah rutin dengan *hematology analyzer* Sysmex KX-21. Prinsip kerja dari adalah dengan mengalirkan darah dalam suatu celah kapiler yang berada diantara 2 elektroda (internal dan eksternal elektroda). Kemudian sinar laser dilewatkan pada celah kapiler tersebut maka akan dihasilkan impuls listrik yang selanjutnya akan diterima oleh detektor dan perangkat penghitung.

Cara kerja dari kerja *hematology analyzer* Sysmex KX-21:

1. Hidupkan alat, tunggu sampai siap digunakan
2. Homogenkan sampel yang akan diperiksa dengan cara diputar pelan dan dibolak-balik sampai tak ada gumpalan dan endapan sel darah
3. Kemudian diletakkan di bawah *Aspiration Probe* hingga ujung *Probe* menyentuh dasar tabung
4. Tekan *Start Switch*

5. Tarik tabung sampel dari bawah *Probe* setelah terdengar bunyi *Beep*

3.9. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

3.10. Analisis Data

Data yang diperoleh dari semua kelompok sampel diolah dengan program komputer *SPSS for Windows*.

Data dengan skala numerik dilakukan uji normalitas dengan uji *Saphiro Wilk*. Apabila didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *One-Way Anova* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$ dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*. Apabila didapatkan distribusi data yang tidak normal maka dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3.11. Etika Penelitian

Ethical clearance telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 99/EC/H/FK-RSDK/VII/2018. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan akan dilaksanakan sesuai dengan Perjanjian Helsinki.