

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 1.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah fisiologi, onkologi, ilmu penyakit dalam dan *tradisional medicine*.

#### 1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

##### 1.2.1 Tempat Penelitian

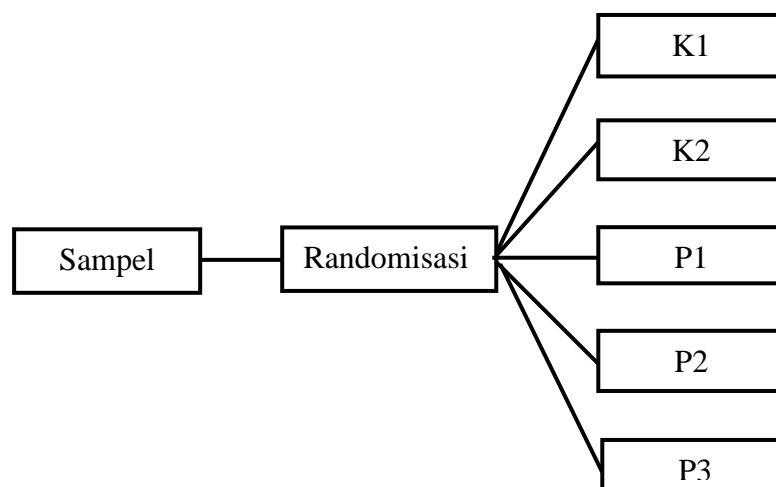
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) 2 dan 4 UGM.

##### 1.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus sampai September 2018.

#### 1.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu:



**Gambar 4.** Skema sampel

Keterangan:

K1: diberi pakan standar + 1 ml injeksi intraperitoneal NaCl 0,9%  
seminggu sekali

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

P1: diberi pakan standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB  
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens*  
100 mg/kg BB

P2: diberi pakan standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB  
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens*  
200 mg/kg BB

P3: diberi pakan standar + injeksi intraperitoneal AOM 10 mg/kg BB  
seminggu sekali selama 2 minggu + ekstrak daun *Carica pubescens*  
400 mg/kg BB

## **1.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

### **1.4.1 Populasi**

#### **1.4.1.1 Populasi Target**

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley*.

#### **1.4.1.2 Populasi Terjangkau**

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* yang didapatkan dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) 4 UGM.

## 1.4.2 Sampel

### 1.4.2.1 Besar Sampel

Sampel penelitian didapatkan dari rumus Federer untuk uji eksperimental sebagai berikut:

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

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 :

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$N \geq 4,75 \approx 5$$

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 diatas 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.

### 1.4.2.2 Cara Penentuan Sampel

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

#### **1.4.2.3 Kriteria Inklusi**

- Tikus *Sprague dawley* jantan
- Umur 5-7 minggu
- Berat 120-150 g
- Kondisi fisik sehat, tikus aktif
- Tidak memiliki kelainan anatomi

#### **1.4.2.4 Kriteria Eksklusi**

- Tikus mati atau sakit ketika diaklimatisasi

#### **1.4.2.5 Kriteria *Drop Out***

- Tikus mati saat penelitian

### **1.5 Variabel Penelitian**

Dalam penelitian ini terdapat variabel:

- Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun *Carica pubescens* dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/KgBB.

- Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah limfosit darah tikus *Sprague dawley*.

## 1.6 Definisi Operasional

Tabel 2. 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 cara maserasi menggunakan pelarut ethanol dengan 3 dosis yaitu 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB	Mg/KgBB	Ordinal
2.	Tergantung	Jumlah limfosit	Perhitungan jumlah limfosit yang tampak pada hapusan darah per100 sel leukosit dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x	$10^3/\mu\text{l}$	Ratio

## 1.7 Alat dan Bahan

### 1.7.1 Alat

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

### **1.7.2 Bahan**

Bahan yang digunakan adalah:

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

## **1.8 Cara Kerja**

### **1.8.1 Adaptasi Tikus *Sparague dawley* Jantan**

Tikus *Sparague 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.

### **1.8.2 Pengelompokan**

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dikelompokkan dengan metode sederhana menjadi lima kelompok dengan 6 ekor tikus pada tiap kelompok. Lima kelompok tersebut yaitu kelompok K1, K2, P1, P2 dan P3.

### **1.8.3 Ekstraksi Daun *Carica pubescens***

Daun *Carica pubescens* yang dipanen, dikeringkan kemudian dihaluskan menjadi bubuk dengan menggunakan mortar dan alu. Sampel bubuk diekstraksi dengan maserasi dingin menggunakan etanol. Hasil maserasi disaring dan diuapkan dalam rendaman air yang diatur dengan hati-hati (dipertahankan pada suhu 50°C) untuk menghasilkan ekstrak semi solid

hijau tua. Ekstrak itu disimpan di kulkas pada suhu 4°C dan disiapkan untuk pemberian oral menggunakan tween 80 (2,5%).

#### **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.<sup>15</sup>

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:

$$\text{Dosis 1} = 200 \times \frac{1}{2} = 100 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis 2} = 200 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis 3} = Y_2 = Y_1 \times 2^{2-1}$$

$$= 200 \times 2$$

$$= 400 \text{ mg/kg BB}$$

#### **3.8.5 Pemberian Perlakuan**

Setelah adaptasi dan pengelompokan, tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya. Tikus dalam kelompok K1 diberi 1 ml suntikan intra peritoneal akuades pro injeksi seminggu sekali selama 2 minggu dan tikus di kelompok K2, P1, P2, P3 diberi suntikan intraperitoneal AOM yang dilarutkan dalam akuades seminggu sekali (10 mg/kgBB) 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

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

### **3.8.6 Pengambilan Sampel Darah**

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-15 secara retroorbita 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 tersebut ditampung dalam botol tempat penampung darah yang diberi bahan antikoagulan (EDTA) dengan



perbandingan 1 ml darah membutuhkan 1 mg EDTA lalu segera dicampur pelan dengan gerakan melingkar di atas meja supaya darah dan bahan antikoagulan tercampur merata.

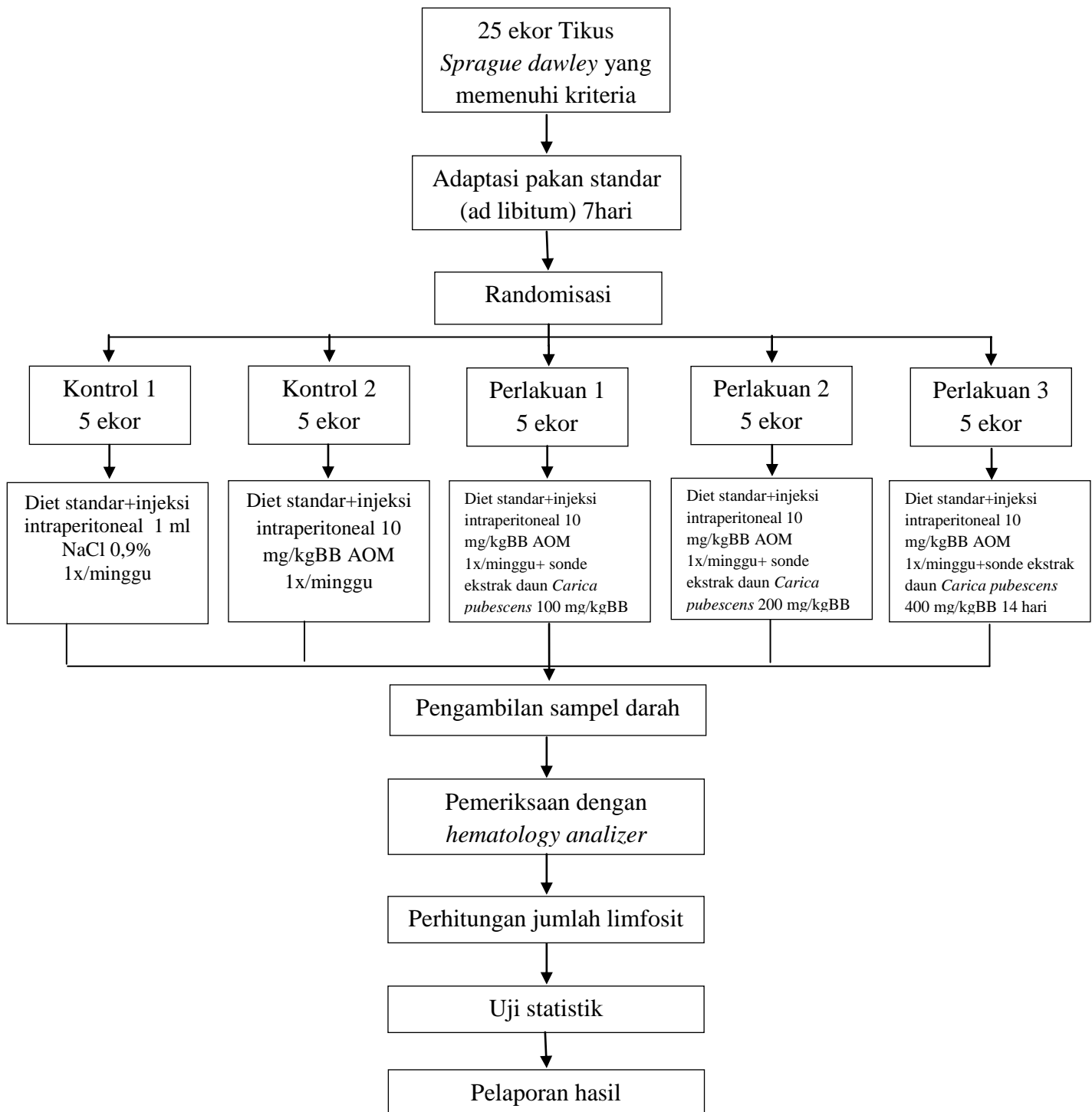
### **3.8.7 Pengukuran Jumlah Limfosit**

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 5.** Alur Penelitian

### **3.10 Pengolahan dan Analisis Data**

Data yang diperoleh setelah diteliti, dikoding, dan dientry dalam file komputer dengan menggunakan *SPSS for Windows*. Selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan uji *ShapiroWilk*. Karena didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *One Way Anova* dan didapatkan nilai  $p < 0,05$ . Setelah itu dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*.

### **3.11 Etika Penelitian**

*Ethical clearance* telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 96/EC/H/FK-RSDK/VII/2018. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan akan dilaksanakan sesuai dengan Perjanjian Helsinki.