

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah Fisiologi dan Onkologi

3.2. Tempat dan waktu penelitian

3.1.1. Tempat penelitian

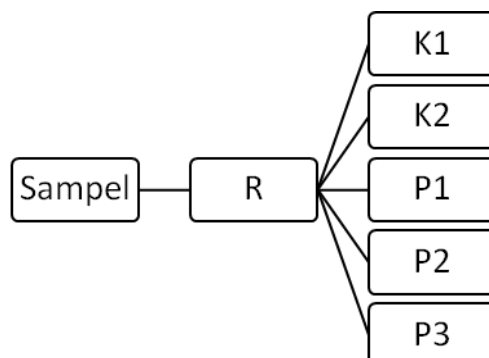
Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 dan 2 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

3.1.2. Waktu penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Agustus 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 perlakuan seperti pada skema.



Gambar 6. Skema Penelitian

Keterangan

R : Randomisasi

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

K2 : Diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal AOM (10 mg/kgBB)
seminggu sekali selama 2 minggu

P1 : Diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal AOM (10 mg/kgBB)
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 100
mg/kgBB per oral setiap hari selama 2 minggu.

P2 : Diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal AOM (10 mg/kgBB)
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 200
mg/kgBB per oral setiap hari selama 2 minggu.

P3 : Diberi diet standar + 1 ml injeksi intraperitoneal AOM (10 mg/kgBB)
seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 400
mg/kgBB per oral setiap hari selama 2 minggu.

3.4. Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah tikus *Sprague dawley* (SD) yang diperoleh dari
LPPT 4 FK UGM yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

3.4.1 Kriteria Inklusi

- Tikus *SD* jantan
- Usia 5-7 minggu
- Berat badan 120-150 gram

- Kondisi fisik sehat, gerakan aktif
- Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

3.4.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus mati atau sakit ketika diaklimatisasi

3.4.3 Kriteria Drop Out

- Tikus mati saat penelitian

3.4.4 Cara sampling

Tikus SD akan dikelompokkan 5 penelitian dengan cara randomisasi sederhana.

3.4.5 Besar Sampel

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

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

Dimana 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.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

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

3.5.2. Variabel tergantung

- Jumlah neutrofil darah

3.6 Definisi operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	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 100mg/KgBB,	-	Ordinal

		200mg/KgBB dan 400mg/KgBB		
2.	Jumlah neutrofil	Perhitungan jumlah neutrofil dengan sampel darah tikus yang diukur dengan alat <i>Hematology analyzer</i>	/ μL	Ratio

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. Spuit disposable
6. Maserator
7. *Haematology analyzer*
8. Tabung EDTA

3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah:

1. Ransum pakan standar
2. Ekstrak daun *Carica pubescens*
3. *Azoxymethane* (AOM)
4. Ketamin 10%
5. Larutan aquadest pro injeksi

6. Larutan NaCl 0,9%
7. Darah tikus

3.8 Cara kerja

3.8.1 Adaptasi tikus *Sprague dawley* jantan

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

3.8.2 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

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/kgBB.⁴⁵ 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 = $200 \times \frac{1}{2} = 100\text{mg/kg BB}$
- Dosis 2 = 200mg/kg BB
- Dosis 3 = $Y_2 = Y_1 \times 2^{2-1}$
 $= 200 \times 2$
 $= 400 \text{ mg/kg BB}$

3.8.5 Injeksi *Azoxymethane* (AOM)

Tikus dalam kelompok K1 diberi 1 ml suntikan intra peritoneal NaCl fisiologis seminggu sekali selama 2 minggu dan tikus di kelompok K2, P1, P2, P3 diberi 2 suntikan intra peritoneal AOM yang dilarutkan dalam 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 seminggu sekali selama 2 minggu dan tikus di kelompok K2, P1, P2, P3 diberi 2 suntikan intra peritoneal AOM yang dilarutkan dalam salin fisiologis 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 seminggu sekali selama 2 minggu
- Kelompok K2 : diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu
- Kelompok P1 : diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 100mg/kgBB
- Kelompok P2 : diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu+ ekstrak daun *Carica pubescens* 200mg/kgBB
- Kelompok P3 : diberi diet standar + injeksi intraperitoneal AOM 10mg/kg BB seminggu sekali selama 2 minggu + ekstrak daun *Carica pubescens* 400mg/kgBB

3.8.7 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 15 di daerah retroorbital tikus sebanyak 2 cc. Sebelum sampel darah diambil, tikus terlebih dahulu diinjeksi dengan Ketamin 10% yang diencerkan dengan perbandingan 0,5:1,5. Kemudian darah tersebut ditampung dalam botol tempat penampung darah yang diberi bahan antikoagulan (EDTA) dengan perbandingan 2 ml darah membutuhkan 1 mg EDTA lalu segera dicampur pelan dengan

gerakan melingkar di atas meja supaya darah dan bahan antikoagulan tercampur merata.

3.8.8 Pengukuran Jumlah Neutrofil

Pengukuran jumlah neutrophil dilakukan dengan pemeriksaan darah rutin dengan *hematology analyzer* Sysmex KX-21. Prinsip kerja 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.

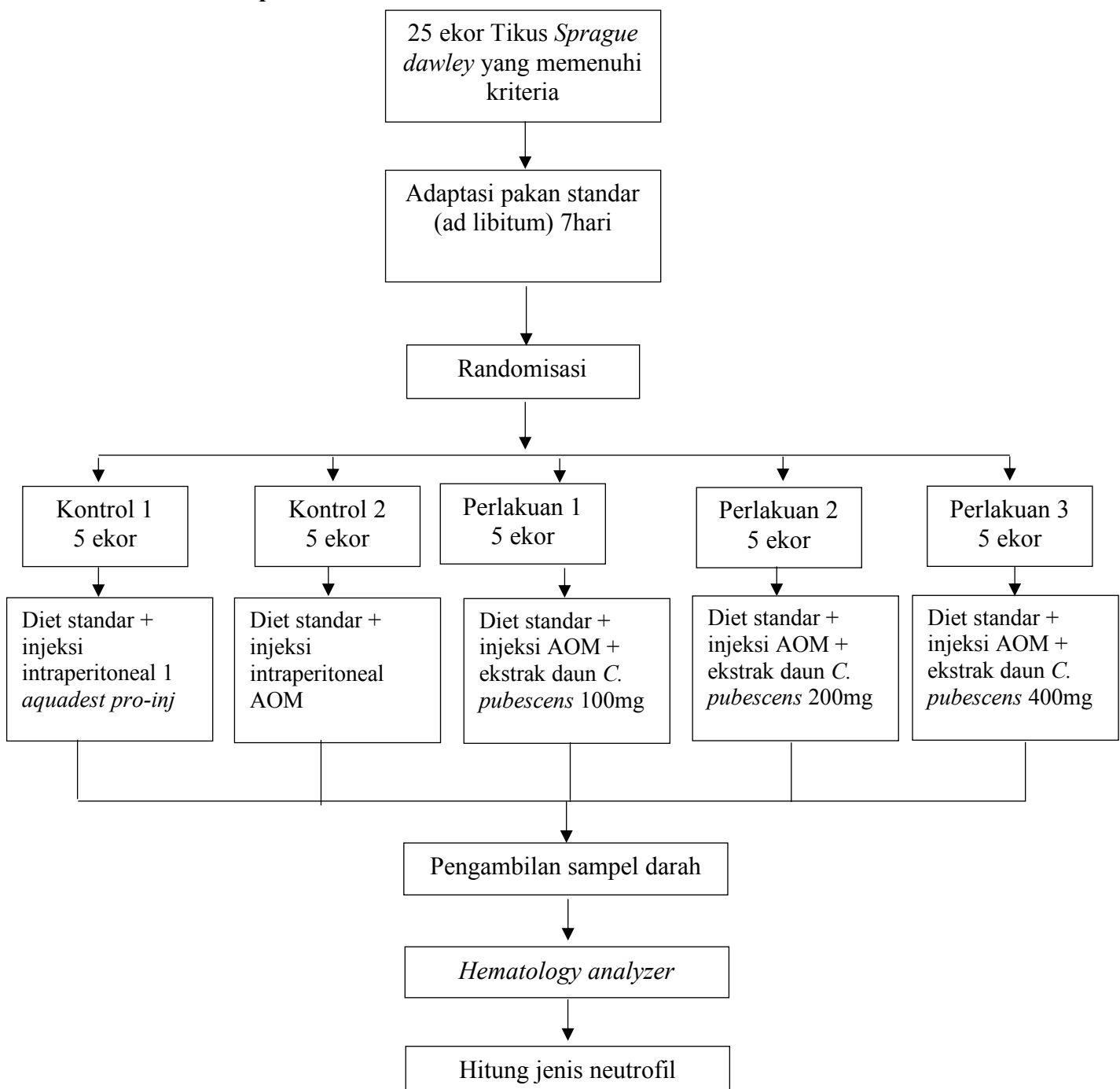
Cara kerja dari *hematoly analyzer* Sysmex KX-21:

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

3.8.9 Menghitung jumlah sel neutrofil

Jumlah neutrofil adalah persentase jumlah neutrofil yang terdapat pada sampel darah yang dihitung dengan cara *diff count* kemudian dikalikan dengan jumlah total leukosit dan dinyatakan dalam ($\times 10^3$ / μL).

3.9 Alur penelitian



Gambar 7. 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 *Shapiro Wilk*. Apabila didapatkan distribusi data yang normal, maka uji hipotesis menggunakan uji *One- Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji post *Hoc* untuk menilai perbedaan antar kelompok penelitian. Apabila data berdistribusi tidak normal maka analisis data menggunakan uji *Kruskal-wallis*. Perbedaan antar kelompok dilakukan dengan uji *Mann -whitney*. Nilai p dianggap bermakna apabila $p < 0,05$. Analisis data dilakukan dengan program komputer.

3.11 Etika Penelitian

Ethical clearance telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi dengan No. 97/EC/H/FK-RSDK/VII/2018 Semarang. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan akan dilaksanakan sesuai dengan Perjanjian Helsinki.