

BAB III

SUBJEK, BAHAN, DAN METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Subjek dan Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss Webster*.

3.1.2 Populasi Penelitian

Kriteria subjek penelitian yang digunakan untuk penelitian harus memenuhi kriteria berikut :

a. kriteria inklusi

1. Mencit jantan (*Mus musculus*).
2. Berat badan 20 – 30 gram.
3. Berusia 8 – 10 minggu.
4. Mencit dalam kondisi sehat: bergerak aktif, refleks baik, tidak ada luka dan berbulu bersih.

b. kriteria eksklusi

1. Mencit dengan berat badan turun lebih dari 10% selama masa adaptasi.
2. Mencit yang pernah dijadikan hewan eksperimen sebelumnya. ³³

3.1.3 Sampel Penelitian

Jumlah sampel minimal yang akan digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan persamaan Mead

$$E = (N-T) \text{ dan } 10 < E < 25 \quad 34$$

Keterangan

N = Total dari jumlah hewan dalam penelitian (dikurangi 1)

T = Kelompok uji coba, termasuk kelompok kontrol (dikurangi 1)

E = Derajat kebebasan dari kelompok *error*, nilainya diantara 10-20

$$10 \leq E \leq 25$$

E	= N-T	E = N-T
≥ 10	= (N-1) – (5-1)	≤ 25 = (N-1) – (5-1)
≥ 10	= N-1-4	≤ 25 = N-1-4
≥ 10	= N-5	≤ 25 = N-5
N ≥ 15		N ≤ 30

Jadi jumlah sampel pada penelitian, yaitu $15 \leq N \leq 30$, artinya minimal jumlah sampel yang diperlukan pada penelitian ini yaitu 15 mencit untuk 5 kelompok, atau minimal 3 mencit per-kelompoknya dan jumlah maksimal sampel yang dibolehkan pada penelitian ini yaitu 30 mencit untuk 5 kelompok, atau minimal 6 mencit per-kelompoknya. Maka, rentang jumlah sampel per kelompok berdasarkan rumus ini adalah 3-6.

Dari hasil perhitungan menggunakan persamaan Mead diatas, dapat disimpulkan bahwa jumlah sampel hewan coba yang digunakan antara rentang 3-6 hewan coba per kelompoknya. Peneliti mengambil 6 ekor hewan coba untuk setiap kelompok perlakuan. Namun, untuk menghindari terjadinya *drop out*, maka

pada setiap kelompok perlakuan ditambahkan lagi sampel sebanyak 10%,
didapatkan dari

$$N = \frac{n}{(1-f)}$$

Keterangan:

N = besar sampel koreksi
n = besar sampel awal
f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%
sehingga

$$N = \frac{6}{1-0,1}$$

$$N = \frac{6}{0,99}$$

$$N = 6,06$$

$$N = 7$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak tujuh ekor. Oleh karena itu dalam penelitian kali ini menggunakan total 35 ekor mencit yang terbagi dalam lima kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol positif. Kelompok kedua adalah kontrol negatif. Kelompok tiga adalah kelompok perlakuan satu. Kelompok empat adalah kelompok perlakuan dua dan kelompok lima adalah kelompok perlakuan tiga.

3.1.4 Bahan Penelitian

1. Ekstrak etanol buah delima merah (*Punica granatum*).
2. Ibuprofen
3. Rokok

Rokok yang digunakan adalah jenis rokok kretek.

4. Bahan pakan normal

Bahan pakan normal merupakan pelet standar.

5. Akuades

Akuades digunakan sebagai bahan pelarut ekstrak buah delima merah.

6. Na-CMC

Digunakan sebagai bahan pelarut ekstrak buah delima.

7. Pewarna *Giemsa*

Digunakan untuk mewarnai apusan sediaan apusan darah mencit.

8. Metanol

Digunakan untuk fiksasi pewarnaan apusan darah tepi.

9. Buffer fosfat pH 7,2

Digunakan untuk mewarnai apusan darah tepi.

10. Minyak Imersi

Digunakan pada saat akan melihat sediaan apusan darah dibawah mikroskop.

3.1.5 Alat Penelitian

1. Kandang mencit disertai tempat makan dan botol minum mencit.

Kandang mencit yang digunakan berukuran panjang 33,5 cm dengan tinggi 11,5 cm dan lebar 25,5 cm.

2. Spuit 0,1cc.

3. Sarung tangan.

4. Masker.

5. Spidol.

6. Sonde oral.

7. Label nama.
8. Timbangan mencit merk tanita .
9. Tabung mikropipiler berukuran 1,5ml.
10. Tabung reaksi untuk menampung darah.
11. Rak tabung reaksi.
12. Tabung EDTA.
13. Mikroskop.
14. *Object glass* dan *cover slip*.



3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium *in vivo*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only with randomized control group design*. Pengukuran dilakukan sesudah mencit diberi perlakuan.³⁵ Desain penelitian menggunakan *random allocation*.

Pada penelitian ini menggunakan dua kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Serta tiga kelompok perlakuan. Setelah mencit masuk kriteria inklusi, maka selanjutnya lihat kriteria eksklusi, untuk selanjutnya akan mengalami adaptasi terlebih dahulu selama tujuh hari, setelahnya akan dikelompokkan menjadi lima kelompok yaitu kelompok 1 (kontrol positif), kelompok 2 (kontrol negatif), kelompok 3 (perlakuan 1), kelompok 4 (perlakuan 2), dan kelompok 5 (perlakuan 3). Fokus penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh ekstrak buah delima terhadap jumlah limfosit dan neutrofil darah mencit yang dipapar asap rokok secara tersier maupun sekunder.

3.2.2 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

3.2.2.1 Definisi Konsep Variabel

a. Variabel bebas

Ekstrak etanol buah delima merah (*Punica granatum*) dan paparan asap rokok.

b. Variabel terikat

Jumlah limfosit dan neutrofil.

c. Variabel terkendali

1. Mencit jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss webster*
2. Jenis kelamin
3. Umur
4. Bobot badan
5. Makanan dan minuman
6. Temperatur
7. Pencahayaan
8. Ventilasi kandang



3.2.2.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala Ukur	Hasil ukur
Ekstrak etanol buah delima merah (<i>Punica granatum</i>)	Sediaan yang digunakan dari hasil penyaringan buah delima dan ditambah etanol sebagai pelarut.	Timbangan tanita	Numerik Rasio	25mg /kg BB × 0,14 = 3,5 mg/kgBB 50mg/kgBB = 7mg/kgBB
Paparan asap rokok	Asap rokok yang tersisa setelah seorang perokok primer merokok, sehingga yang tersisa hanya residunya yang menempel pada permukaan dalam ruangan.		Nominal	0 yang tidak dipapar asap rokok. 1 yang diberi paparan asap rokok tersier. 2 yang diberi paparan asap rokok tersier dan sekunder.
Jumlah Limfosit	Jumlah sel darah limfosit mencit yang didapatkan dari melalui ekor mencit	Mikroskop	Numerik Rasio	Persen
Jumlah Neutrofil	Jumlah sel darah neutrofil mencit yang didapatkan melalui ekor mencit.	Mikroskop	Numerik Rasio	Persen

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Penentuan Dosis Ekstrak Buah Delima (*Punica granatum*)

Penentuan dosis perlakuan ekstrak buah delima (*Punica granatum*) didapatkan dari hasil konversi dosis ekstrak buah delima untuk tikus ke dalam dosis untuk mencit. Didapatkan dosis aman untuk tikus adalah 25mg/kg BB untuk tikus berbobot 200 gram sehingga untuk mencit berbobot 20 – 30 gram adalah

$$25\text{mg /kg BB} \times 0,14 = 3,5 \text{ mg/grBB}$$

$$50\text{mg/kgBB} \times 0,14 = 7\text{mg/grBB}$$

3.2.3.2 Pembuatan Ekstrak Buah Delima

Proses pembuatannya adalah dengan menggunakan ekstrak etanol dengan teknik maserasi. Pertama, buah delima dipisahkan terlebih dahulu dengan kulitnya, selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan air bersih. Setelah selesai dicuci, maka buah delima ditiriskan, hal ini bertujuan untuk mengurangi jumlah air bilasan yang masih menempel, lalu dilanjutkan pada proses pemotongan menjadi bagian yang lebih kecil dan tipis, untuk pemotongan dapat secara manual maupun dengan mesin, fungsinya untuk mempermudah proses ekstraksi.

Selanjutnya dilakukan metode maserasi, yaitu dengan menambahkan satu bagian simplisia ke dalam maserator, lalu menambahkan sepuluh bagian penyari, dan merendamnya selama 6 jam sambil diaduk, selanjutnya di diamkan selama 24 jam. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi buah delima adalah menggunakan pelarut etanol 70%.

3.2.3.3 Perlakuan Hewan Coba

Sebelum diberikan perlakuan, semua hewan coba dilakukan penyesuaian terlebih dahulu sebagai adaptasi di lingkungan Laboratorium Universitas Islam Bandung selama tujuh hari. Pada hari pertama adaptasi semua mencit ditimbang bobot badannya, kemudian selama adaptasi, mencit diberi makan pakan normal pelet dan minum serta pencahayaan yang cukup, yaitu dua belas jam pada cahaya terang dan dua belas jam pada cahaya gelap. Selain itu, sekam padi pada kandang juga diganti minimal tiga hari sekali.

Mencit yang mengalami penurunan berat badan dan mati selama masa adaptasi tidak akan diikuti sertakan dalam penelitian. Setelah proses adaptasi selesai, selanjutnya mencit dibagi menjadi 5 kelompok secara acak menggunakan *random allocation* sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : Paparan asap rokok tersier + Ibuprofen 1,04 mg/20mgBB (Kontrol positif)
2. Kelompok 2 : Tidak diberi paparan asap rokok tersier (kontrol negatif)
3. Kelompok 3 : Paparan asap rokok tersier + ekstrak etanol buah delima merah 3,5gram/20gramBB (perlakuan 1)
4. Kelompok 4 : Paparan asap rokok tersier + ekstrak etanol buah delima merah 7 gram/20gramBB (perlakuan 2)
5. Kelompok 5: Paparan asap rokok sekunder+ paparan asap rokok tersier +ekstrak etanol buah delima merah 7 gram/20gramBB (perlakuan 3)

3.2.3.4 Paparan Asap Rokok pada Mencit

Paparan asap rokok pada mencit dilakukan secara sekunder dan tersier. Untuk asap rokok tersier, pada saat pengasapan, mencit dipindahkan terlebih dahulu ke kandang yang lain, sehingga peneliti hanya mengasap kandangnya saja dengan menggunakan enam batang rokok dalam sehari. Setelah enam batang rokok habis terbakar, maka ditunggu terlebih dahulu selama tiga menit sampai tidak ada asap yang tersisa, selanjutnya setelah itu mencit dimasukkan kembali dalam kandang.

Paparan asap rokok kelompok perlakuan 3 yaitu setelah mencit dimasukkan kedalam kandang, nantinya akan diasap kembali menggunakan enam batang rokok. Ventilasi udara bagian atas kandang ditutup, dibuka tiap lima menit sekali, dimaksudkan agar mencit dalam kandang tetap hidup. Saat pengasapan kedua, maka mencit kelompok lainnya tidak berada dekat dengan kandang perlakuan 3, sehingga tidak terkena asap rokok kembali. Pengasapan dilakukan selama 14 hari.^{36,37}

3.2.3.5 Penetapan Jumlah Limfosit dan Neutrofil

a. Pengambilan Darah Mencit

Pengambilan darah mencit untuk pengukuran kadar limfosit dan neutrofil dilakukan setelah adanya perlakuan yaitu pada hari ke lima belas, pada saat mencit sudah terpapar asap rokok selama empat belas hari dan pada kelompok perlakuan sudah diberikan ekstrak buah delima merah. Pengambilan sampel darah sekitar 0,2 ml yang akan diambil melalui ekor mencit, sebelumnya dilakukan pemanasan terlebih dahulu menggunakan alat pemanas, sehingga darah pada ekor mencit mudah untuk keluar. Setelah itu pastikan tekan terlebih dahulu ekor mencit selama 30 detik sebelum mencit dikembalikan kedalam kandang.³⁸

b. Proses Pengukuran

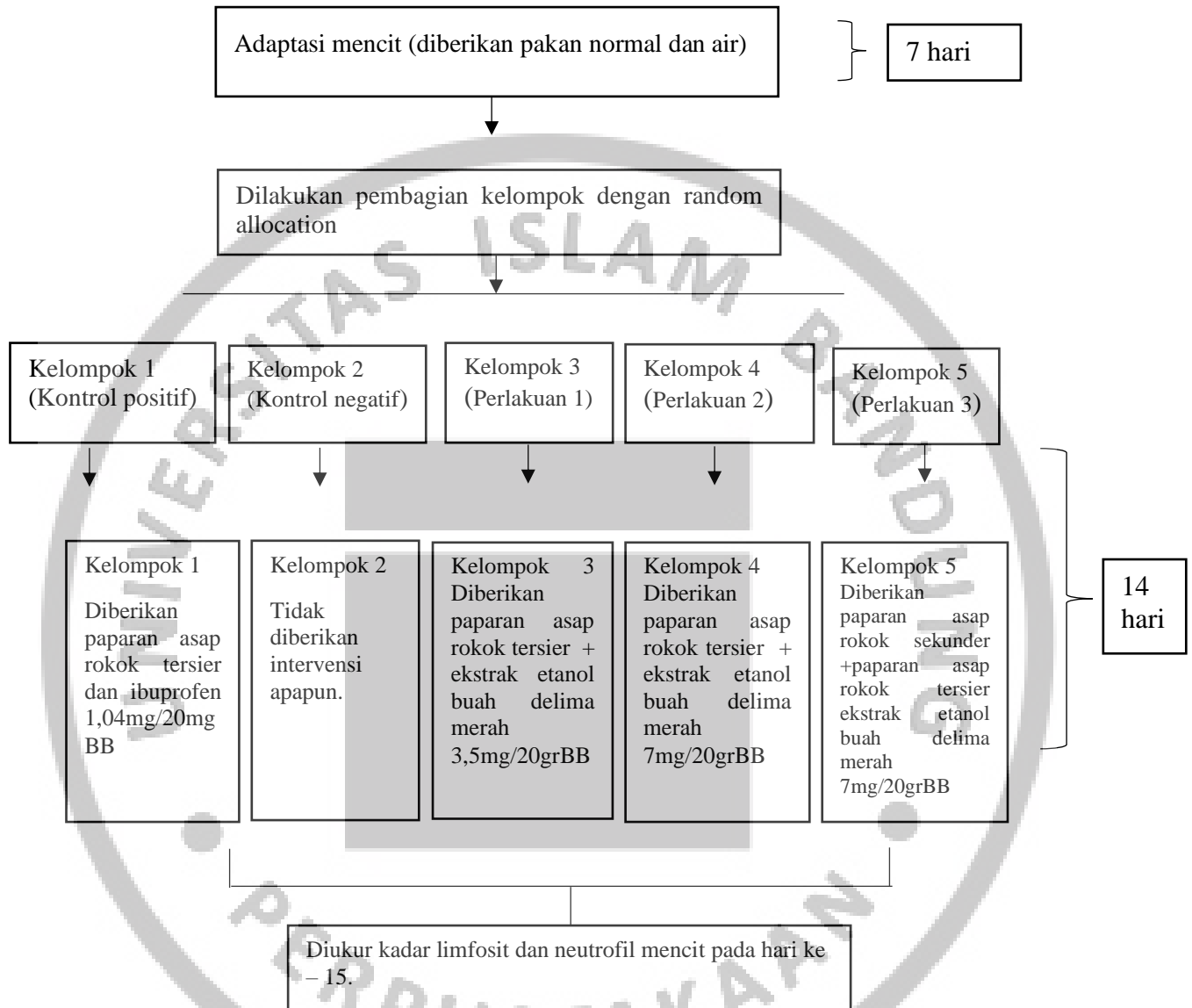
Sampel darah 0,2 ml diambil melalui ekor tikus kemudian setelah itu disimpan dalam tabung dan diberi label. Lalu selanjutnya teteskan darah secukupnya menggunakan mikropipet 10ul diatas objek glass yang sudah disediakan. Lalu apus menggunakan objek glass lain dengan kemiringan 30-45 derajat. Setelah itu, keringkan pada suhu ruangan. Apabila sudah kering, maka

selanjutnya di fiksasi dengan metanol selama 5 menit, bila terdapat kelebihan metanol maka dibuang. Biarkan hingga kering kembali pada suhu ruangan. Setelah itu, pulas dengan larutan giemsa yang telah diencerkan menggunakan buffer fosfat dengan perbandingan (1 giemsa : 4 buffer fosfat). Biarkan di suhu ruangan selama 20-30 menit. Setelah itu, cuci dengan air mengalir, dan keringkan pada suhu ruangan. Apus darah tepi sudah dapat dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak imersi.

3.2.4 Analisis Data

Data hasil penelitian ditampilkan berupa tabel data jumlah limfosit dan neutrofil pada mencit dengan satuan persen.. Uji parametrik menggunakan *one way ANOVA post design* , untuk menguji perbedaan rata-rata antara kelompok perlakuan. Uji normalitas data numerik karena sampel dibawah 50 maka menggunakan *Saphiro-Wilk test* . Apabila hasil uji statistik menunjukkan hasil bermakna, maka dilakukan uji statistik lanjutan dengan menggunakan *Post Hoc Test Least Significant Difference* untuk mengetahui pada kelompok perlakuan mana yang menunjukkan hasil paling bermakna, hal ini dilihat dari nilai p apabila kurang dari 0,05 yang artinya menunjukkan hasil yang signifikan secara statistik.

3.2.5 Alur Penelitian



3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Aspek etik penelitian meliputi 3R dan 5F berikut :

1. *Replacement*, mengganti hewan percobaan dengan alternatif lain yang sudah diperhitungkan dengan baik dari pengalaman maupun literatur sebelumnya. Penggantian ini terbagi menjadi:
2. *Reduction*, Pemanfaatan hewan coba dalam penelitian diusahakan dalam jumlah yang sedikit, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Peneliti menggunakan Persamaan Mead yang didapatkan besar sampel menjadi lebih sedikit namun masih bisa dihitung secara statistik.
3. *Refinement*, meminimalisir penderitaan hewan coba selama penelitian dengan cara memelihara dan memperlakukan hewan secara manusiawi seperti bebas dari rasa lapar dan haus (*free from hunger and thirst*), dengan memberikan makanan dan minuman sesuai dengan jumlah dan komposisi yang sesuai untuk kesehatannya, disediakan kandang serta lingkungan dengan kebersihan, cahaya, suhu dan kelembapan ruangan yang sudah disesuaikan, sehingga memberikan rasa nyaman pada hewan (*freedom from discomfort*) Selama masa penelitian hewan coba bebas dari ketakutan dan stress yaitu dengan memberi hewan coba adaptasi sebelum diberi perlakuan (*freedom from fear and distress*). Hewan coba juga dipantau oleh laboran yang berpengalaman, sehingga mencegah dari rasa sakit, trauma, dan juga penyakit lainnya (*freedom from pain, injury and diseases*).

Hewan coba juga diberi kebebasan selama masa perlakuan (*freedom to express natural behavior*).³⁹

