

BAB III

SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/Objek/Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus *Wistar* betina berusia 3-4 minggu sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan.

Kriteria inklusi:

- Tikus *Wistar* betina sehat (tidak tampak rambut kusam, rontok atau botak, dan bergerak aktif).
- Tikus belum pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
- Berat badan 80-90 gram.

Kriteria eksklusi:

Mengalami penurunan berat badan pada masa adaptasi.

3.1.1.1 Jumlah Sampel dan teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok didasarkan pada formulasi Federer dengan rancangan acak lengkap.⁴⁴ Banyaknya perlakuan (t) adalah lima, sehingga jumlah sampel tiap kelompok (r) adalah

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

Keterangan:

r: jumlah sample pada tiap perlakuan

t: jumlah perlakuan

Maka didapatkan,

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

$$(r-1)4 \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan dibutuhkan, $5 \times 5 = 25$ sampel. Lalu sampel ditambah sebanyak 10% setiap kelompoknya untuk sampel yang mengalami *dropout*, sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 28.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Daun sirsak
2. 7,12-Dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA) dari Sigma Aldrich St. Louis
3. Pakan standar tikus
4. NaCl 96%
5. *Aquadest*
6. PBS-Formalin 10%
7. Larutan normal saline
8. *Xylol*
9. Alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96%
10. *Hematoxylin & Eosin (H&E)*
11. Alat perekat (entelan)

3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Kandang terbuat dari bak semi plastik dengan ukuran p.l.t = 30x45x20 cm, dengan bagian atas tertutup oleh kawat strumun
2. Sonde oral
3. Timbangan analitik
4. Sduit
5. Mikroskop cahaya binokuler
6. Peralatan pembuat ekstrak
 - Alat pengiris
 - Alat grinding
 - Maserator
 - Kertas saring
 - *Rotari Evaporator*
7. Peralatan pembuat preparat
 - Medium transpor hati
 - *Tissue Processor*
 - Mikrotom
 - *Object glass*
 - *Hot plate*

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vivo* dengan rancangan acak lengkap. Metode uji yang digunakan adalah pemberian ekstrak

daun sirsak terhadap tikus wistar betina yang diinduksi DMBA. Selanjutnya akan diobservasi jumlah vena sentral dan degenerasi hidropik hepatosit sebagai parameter kerusakan sel hati.

3.2.2 Penentuan Kadar Ekstrak Daun Sirsak

Kadar ekstrak pelarut air daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu. Pada penelitian terdahulu konservasi efektif sebagai antioksidan adalah sebesar 100 mg/kg BB⁸. Selanjutnya pada penelitian ini digunakan: konsentrasi 1 adalah $\frac{1}{2} \times 200 \text{ mg/kgbb} = 100 \text{ mg/kg BB}$, konsentrasi 2 adalah 200 mg/kgBB, konsentrasi 3 adalah $2 \times 200 \text{ mg/kg BB} = 400 \text{ mg/KgBB}$.

3.3 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

3.3.1 Definisi Konsep Variabel

- a. Variabel bebas:
 - Konsentrasi ekstrak daun sirsak
- b. Variabel terikat
 - Jumlah vena sentral yang utuh
 - Jumlah degenerasi hidrofik hepatosit
- c. Variabel terkendali
 - Jenis mencit
 - Pakanan mencit
 - Lingkungan pemeliharaan mencit
 - Konsentrasi DMBA
 - Usia dan berat badan mencit

3.3.2 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur (mg/kg BB)	Skala ukur
1.	Konsentrasi ekstrak daun sirsak	Ekstrak daun sirsak adalah ekstrak yang diperoleh dari daun sirsak yang diolah dengan metode maserasi menggunakan pelarut air. Konsentrasi ekstrak daun sirsak ditentukan dari penelitian terdahulu. ³¹ yakni (n), ($\frac{1}{2}n$), (2n)	Timbangan	Konsentrasi 1: 100 mg/kg BB Konsentrasi 2: 200 mg/kg BB Konsentrasi 3: 400 mg/kg BB	Data Kategorik
2.	Jumlah vena sentral yang utuh	Dihitung pada wilayah/zona yang dipilih secara random pada zona 1,5,9	Image Raster	Hasil ukur sesuai dengan perhitungan	Data numerik rasio
3.	Jumlah degenerasi hepatosit	Dihitung pada wilayah/zona yang dipilih secara random pada zona 1,5,9	Image Raster	Hasil ukur sesuai dengan perhitungan	Data numerik rasio

3.4 Kelompok Perlakuan

1. Kelompok I (kontrol positif): Tikus Wistar betina yang diberi pakan normal.
2. Kelompok II (kontrol negatif): Tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal.
3. Kelompok III (perlakuan 1): Tikus Wistar yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 100mg/kg BB.

4. Kelompok IV (perlakuan 2): Tikus Wistar yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 200 mg/kg BB.
5. Kelompok V (perlakuan 5): Tikus Wistar yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 400 mg/kg BB

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Pelarut Air Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Daun sirsak yang digunakan adalah dari kebun Manako Lembang. Kemudian bahan uji ini diekstrak menggunakan pelarut air, pengekstrakan dilakukan di Laboratorium program studi Farmasi UNISBA. Metode dasar ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Maserasi dipilih karena memiliki keunggulan, yakni pengerjaan yang cepat dan cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, relatif mudah dan murah.

Pertama Bahan baku lembaran daun sirsak terlebih dahulu dibersihkan, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C hingga kadar air kurang dari 10%. Lalu daun sirsak dihaluskan dengan cara digiling hingga menjadi serbuk kering. Setelah terbentuk serbuk dari daun sirsak lalu serbuknya direndam dalam pelarut air (H₂O) selama 24 jam. Lalu disaring dengan kertas saringan sampai terpisah dari ampasnya, kemudian larutan tersebut didestilasi. Larutan yang terbentuk disebut dengan maserat.

Maserat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan menggunakan rotavapor dengan suhu 40 °C selama 6-8 jam, hingga diperoleh ekstrak daun sirsak. Ekstrak encer kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat rotari evaporator sampai pekat.

3.5.2 Penghitungan Dosis DMBA

Tikus Wistar betina usia 3-4 minggu yang telah diadaptasi selama 2 minggu di induksi DMBA dengan konsentrasi 20mg/kg BB selama 4 minggu dengan pemberian 2 kali setiap minggu.

3.5.3 Perlakuan Percobaan

Penelitian ini diawali dengan masa adaptasi pada hewan coba agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan di ruangan Laboratorium Biomedik lantai 4 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung selama 2 minggu. Selama proses adaptasi tersebut, bobot tubuh dan kondisi mencit dipantau setiap harinya untuk menghindari adanya *drop out*. Untuk memenuhi kriteria inklusi, mencit yang sakit dan mengalami penurunan berat badan minimal 10% setelah masa adaptasi akan dikeluarkan dari kelompok uji.

Setelah masa adaptasi, tikus diberikan DMBA 20 mg/kg BB selama 4 minggu, dengan dua kali dalam seminggu. Pada minggu ke-2 induksi DMBA, masing-masing mencit diberikan perlakuan pemberian ekstrak pelarut air daun sirih dengan konsentrasi yang diberikan adalah 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB dengan cara transesofageal menggunakan sonde oral. Tikus dikorbankan pada minggu ke-6.

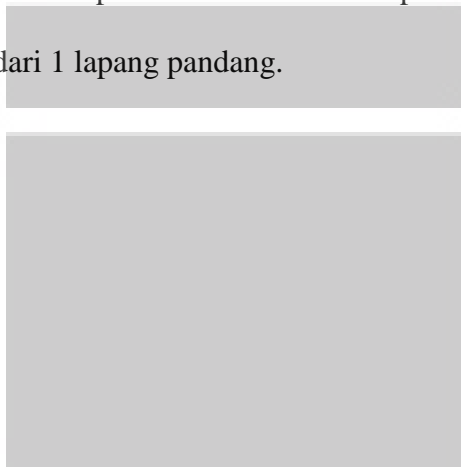
3.5.4 Pembuatan Preparat

Pada minggu ke-6, tikus dikorbankan kemudian nekropsi dengan terlebih dahulu dianestesi menggunakan ketamine HCL dengan dosis 0,2 cc/100g BB secara intramuscular. Selanjutnya jaringan hepar diambil. Preparat histologi jaringan hepar tikus dibersihkan dengan menggunakan larutan normal saline. Lalu

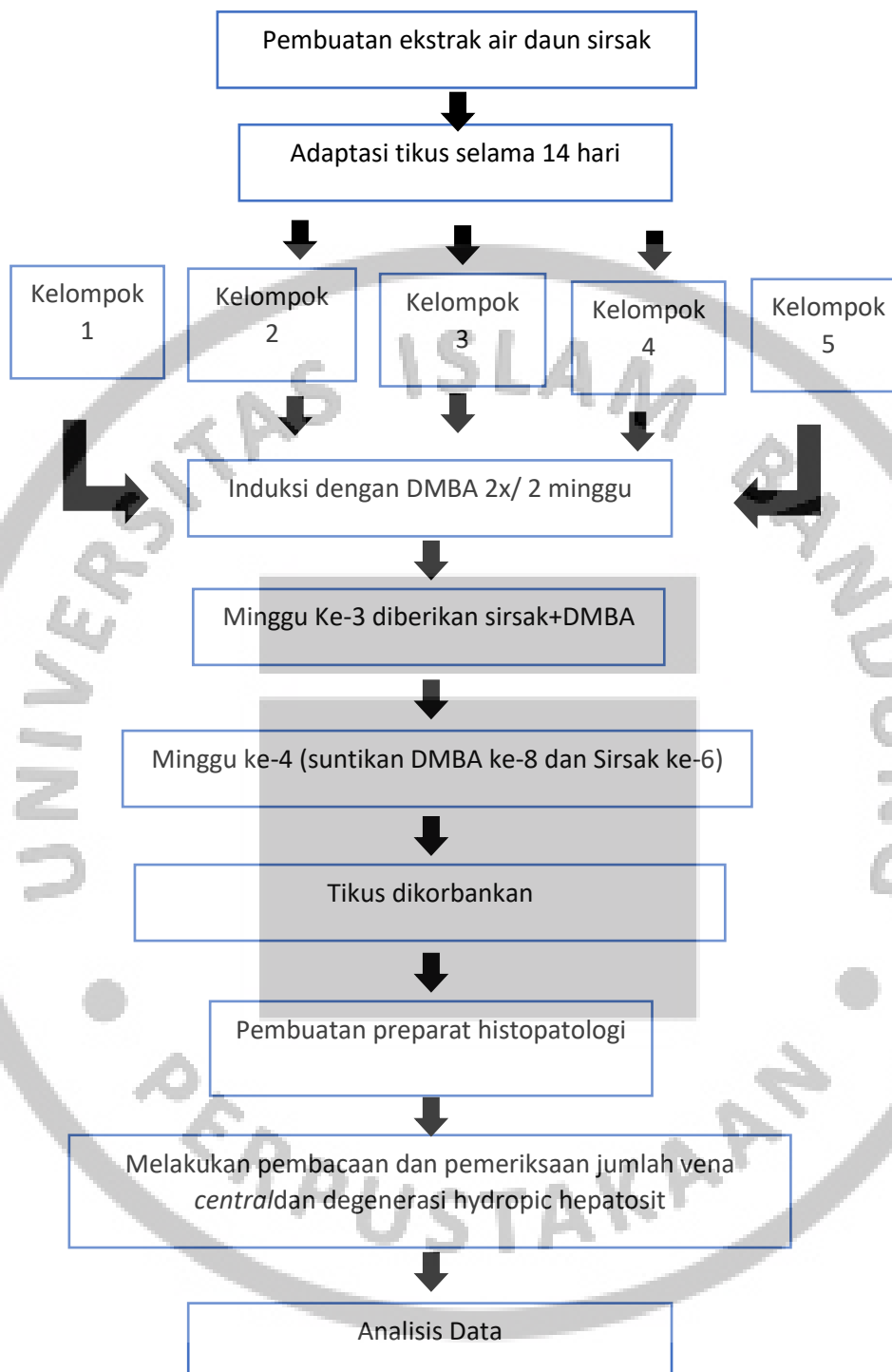
difiksasi di dalam formalin 10% selama 24 jam. Jaringan hepar terlebih dahulu diproses dengan menggunakan *Tissue Processor* sebelum kemudianditanam di dalam parafin. Parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 sampai 5 μ m lalu ditempelkan pada *object glass* dan dipanaskan dengan *hot plate*. Deparafinisasi dengan *xylol* selama 6 menit lalu secara berturut-turut dicuci dengan alkohol 90%, 80%, dan 70%. *Object glass* dicuci dengan air mengalir dan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan Hematoxylin dan Eosin (H&E). Prinsip pewarnaan yang bersifat asam akan menarik zat/larutan yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat/larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah. Tahapan pewarnaan yaitu: pertama, deparafinasi: untuk menghilangkan/melarutkan *paraffin* yang terdapat pada jaringan dengan menggunakan *xylol*, kemudian rehidrasi untuk memasukkan air ke dalam jaringan, selanjutnya pewarnaan pertama dengan menggunakan hematoxylin untuk memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan, dilakukan differensiasi yang bertujuan mengurangi warna biru pada inti dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma dengan menggunakan HCL 0,6% . lalu dilakukan *blueing* untuk memperjelas warna biru pada inti sel. Pewarnaan kedua untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel dengan menggunakan zat *eosin*. Terakhir dehidrasi untuk menghilangkan air dari jaringan. Kemudian, teteskan entelan pada *object glass* dan tutup dengan *cover glass* kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.

3.5.5 Pengukuran Jumlah Vena Central dan Degenerasi Hidropik Hepatosit

Jumlah vena central dan degenerasi hidropik hepatosit dalam suatu jaringan dapat dilakukan dengan cara menghitung dalam 10 *High Power Field* (HPF) atau lapang pandang besar. *High Power Field* (HPF) adalah area lapangan yang terlihat dengan objektif 40x dan tergantung pada diameter lapangan mikroskop. Luas HPF yang diukur dalam mm² dapat sangat bervariasi dari mikroskop ke mikroskop. Preparat dibaca berdasarkan setiap lapang pandang yang terlebih dahulu telah dibagi menjadi 9 kotak, kemudian seluruh preparat tersebut diberi tanda 1 sampai 9 kotak dan dibaca pada kotak ke 1, 5, dan 9 yang setiap kotak terdiri dari 1 lapang pandang.



3.6 Alur Penelitian



Gambar 3 1Diagram Alur Penelitian

3.7 Analisa Data

Karena data berskala numerik maka harus dilakukan uji normalitas. Jika hasil uji normalitas berdistribusi normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji parametrik *one way Analysis of Varians* (ANOVA), untuk menguji perbedaan rerata antar seluruh kelompok. Jika hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan, maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* untuk menganalisis perbedaan paling signifikan antar seluruh kelompok. Jika uji normalitas tidak normal dan tidak homogeny maka menggunakan uji non parametrik yaitu Kruskal Wallis. Uji lanjut untuk menguji kelompok yang paling optimal digunakan *Mann Whitney Test*.

3.8 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung dan pengestrakan dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi UNISBA.

No.	Waktu	Kegiatan
1.	Januari-Februari 2019	Pencarian jurnal Penyusunan proposal penelitian Sidang usulan penelitian
2.	Maret 2019	Mempersiapkan daun sirsak Mempersiapkan DMBA
3.	April 2019	Mengekstrak daun sirsak dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi Unisba Induksi kanker payudara di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung
4.	Mei-Juli 2019	Pemberian perlakuan pada hewan coba Perlakuan nekropsi dan pembuatan preparat histopatologi Pengamatan hasil penelitian
5.	September-Desember 2019	Analisis statistic hasil yang didapat dan membuat pembahasan
6.	Januari 2020	Pengumpulan artikel Sidang skripsi

3.9 Aspek Etik Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan tikus *Wistar* betina berusia 3-4 minggu yang sebelumnya telah dikembangkan oleh Biofarma. Penggunaan tikus *Sparague dawley* ini dilakukan dengan memperhatikan prinsip 3R yaitu:

- *Replacement*, penelitian dilakukan dengan menggunakan hewan coba golongan yang paling rendah yang sesuai dengan penelitian ini yaitu tikus.
- *Reduce*, digunakan penghitungan jumlah sampel untuk optimalisasi hewan coba yang digunakan sehingga tidak melebihi jumlah minimal yang diperbolehkan.
- *Refinement*, peneliti menggunakan metode yang tepat untuk uji kepada kepada hewan coba sehingga kesejahteraan dapat tetap terjaga.

Selain 3R peneliti juga memperhatikan aspek 5F (*5 freedoms*) yaitu

- *Freedom from hungry and thirsty*: memberikan pakan secara adlibitum.
- *Freedom from discomfort*: di dalam satu kandang tidak boleh terlalu sedikit dan terlalu banyak minimal 3 dan maksimal 5, kandang selalu dibersihkan, kandang diletakkan diruangan dengan pecahayaannya yang cukup.
- *Freedom from pain*: pemberian perlakuan salah satunya adalah dilakukan oleh teknisi laboran yang kompeten.
- *Freedom from injury and disease*, kebersihan dijaga, jika ada yang sakit dipisahkan, dan dihindari kemungkinan saling melukai.
- *Freedom from fear and distress*, dan

- *Freedom to expres natural behavior*: tidak dibiarkan sendirian karena makhluk sosial, siang mendapatkan cukup cahaya, dan pemberian serbuk kayu sebagai alas kandang.

