

## BAB III

### SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek dan Bahan Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY. Terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi terhadap hewan uji selama tujuh hari didalam laboratorium, sehingga hewan uji tersebut dapat beradaptasi dengan lingkungannya. Subjek diberi makan pelet dan air (*ad libitum*), setelah itu diberikan perlakuan berupa pemberian ekstrak *ethanol* akar alang-alang selama dua minggu terhadap hewan uji tersebut. Setelah itu mencit diinduksi LPS. Kriteria inklusi dan eksklusi subjek pada penelitian ini yaitu:

##### **Kriteria inklusi:**

- Mencit sehat dengan ciri-ciri bulu bersih, tidak ada luka dan bergerak aktif, usia 8 – 12 minggu
- Jenis kelamin jantan
- Berat badan sekitar 20 – 35 gram

##### **Kriteria eksklusi:**

- Terdapat penurunan berat badan mencit >10% dari berat awal selama masa adaptasi.
- Mencit yang telah digunakan dalam penelitian sebelumnya

### 3.1.2 Jumlah Sampel

Penentuan banyaknya jumlah sampel tiap kelompok perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus *Frederer*, yaitu:

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

dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok percobaan dan  $n$  merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan empat kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak enam ekor, sebagai cadangan ditambahkan satu ekor tiap kelompok. dan jumlah kelompok yang digunakan adalah empat kelompok, sehingga penelitian ini menggunakan 28 ekor mencit.

## 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

### 3.2.1 Bahan Penelitian

Alang-alang (*Imperata Cylindrica L.*), mencit jantan galur DDY, pakan standar mencit dalam bentuk pelet (55% tepung jagung, 15% dedak padi, 15% bungkil kedelai, 10% tepung ikan, 4% minyak sayur dan 1% premix) dan air yang diberikan *ad-libitum*, CMC 0.5% (pelarut ekstrak *ethanol* akar alang-alang), Lipopolisakarida (LPS), *ethanol*, kit pemeriksaan aktivitas SOD, kit ekstraksi RNA, *Real time PCR* kit.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Seperangkat alat pembuat ekstrak *ethanol* alang-alang (*Imperata Cylindrica* L.) (kertas saring, *Rotary Evaporator*, gelas kimia, dan gelas ukur), *disposable syringe*, seperangkat alat pemeriksa GPx dan NO (spektrofotometer, *microplate*), mikropipet, tabung *eppendorf* dan mikrotip

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang dilakukan pada mencit jantan (*mus musculus*) galur DDY yang diinduksi LPS untuk membuat mencit dalam keadaan sepsis. Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *randomized post test only controlled group* yaitu dengan melakukan observasi setelah perlakuan selesai diberikan pada jangka waktu yang telah di tentukan. Penelitian ini untuk menguji efek ekstrak *ethanol* akar alang-alang (*Imperata Cylindrica*) pada mencit dalam keadaan sepsis.

#### 3.3.2 Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak *ethanol* akar alang alang

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah gambaran ekspresi gen G6Pase pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY

### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah usia, jenis kelamin, berat badan dan perawatan mencit.

#### 3.3.3 Definisi Operasional

Definisi operasional menjelaskan mengenai variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak *ethanol* akar alang-alang (*Imperata Cylindrica*), sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran ekspresi gen G6Pase pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY. Keterangan terkait variabel bebas dan variabel terikat terangkum pada tabel

3.1

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Gen G6Pase	Ekspresi gen G6Pase yang diperiksa pada jaringan Hepar	RT-PCR	Ekspresi gen G6Pase	Numerik

#### 3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian dimulai dengan melakukan aklimatisasi terlebih dahulu terhadap hewan uji dalam lingkungan laboratorium selama tujuh hari pada temperatur ruangan yang terkontrol dengan pengaturan 12 jam cahaya dan 12 jam gelap. Pakan dan air diberikan secara ad libitum. Kelompok mencit dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu:

- Kelompok 1 (Kontrol Normal)

Mencit diberi CMC 0,5% saja, tidak di induksi LPS maupun diberi ekstrak alang-alang).

- Kelompok 2 (Kontrol Negatif)

Mencit diberi CMC 0,5% saja dan diinduksi LPS.

- Kelompok 3 (Kelompok Perlakuan 1)

Mencit diberi ekstrak alang-alang 90 mg/Kg BB dan diinduksi LPS.<sup>10</sup>

- Kelompok 4 (Kelompok Perlakuan 2)

Mencit diberi ekstrak alang-alang 115 mg/Kg BB dan diinduksi LPS.<sup>10</sup>

Perlakuan dilakukan selama dua minggu dengan pengecekan kembali berat badan mencit setiap tiga hari sekali untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh ekstrak *ethanol* alang-alang terhadap berat badan mencit. Pemberian ekstrak *ethanol* alang-alang dilakukan sehari sekali selama dua minggu setiap pukul 3 – 5 sore. Setelah 2 minggu, mencit di kelompok 2, 3, dan 4 disuntikkan LPS 10 mg/kg BB secara intraperitoneal berdasarkan penelitian sebelumnya.<sup>10</sup> Delapan jam paska penyuntikan, mencit di *euthanasia* dan pengambilan sampel hepar dilakukan.<sup>10</sup> Sampel lalu disimpan dalam *freezer* -80 °C sampai pemeriksaan dilakukan. Pada penelitian ini sampel yang digunakan merupakan Bahan Biologis Tersimpan (BBT) berupa jaringan hepar.

### 3.5 Pembuatan Ekstrak *ethanol* akar alang-alang

Alang-alang (*Imperata Cylindrica L.*) dimaserasi dengan *ethanol* 95% selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Setelah itu disaring dengan kertas saring dan

dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali. Ekstrak kasar yang didapat disimpan dalam botol tertutup pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Sandjaja, 2008; Thiantongin, 2014).

### 3.6 Penetapan Dosis Ekstrak *Ethanol* Akar Alang-alang dan LPS

Penetapan dosis ekstrak *ethanol* akar alang-alang dan lipopolisakarida pada penelitian ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Widyastuti et al mengenai efek pemberian ekstrak *ethanol* akar alang-alang terhadap perubahan berat badan dan organ reproduksi mencit jantan karena penelitian ini bersifat lanjutan.<sup>12</sup>

### 3.7 Pemeriksaan Gen *G6Pase* pada Hepar Hewan Uji

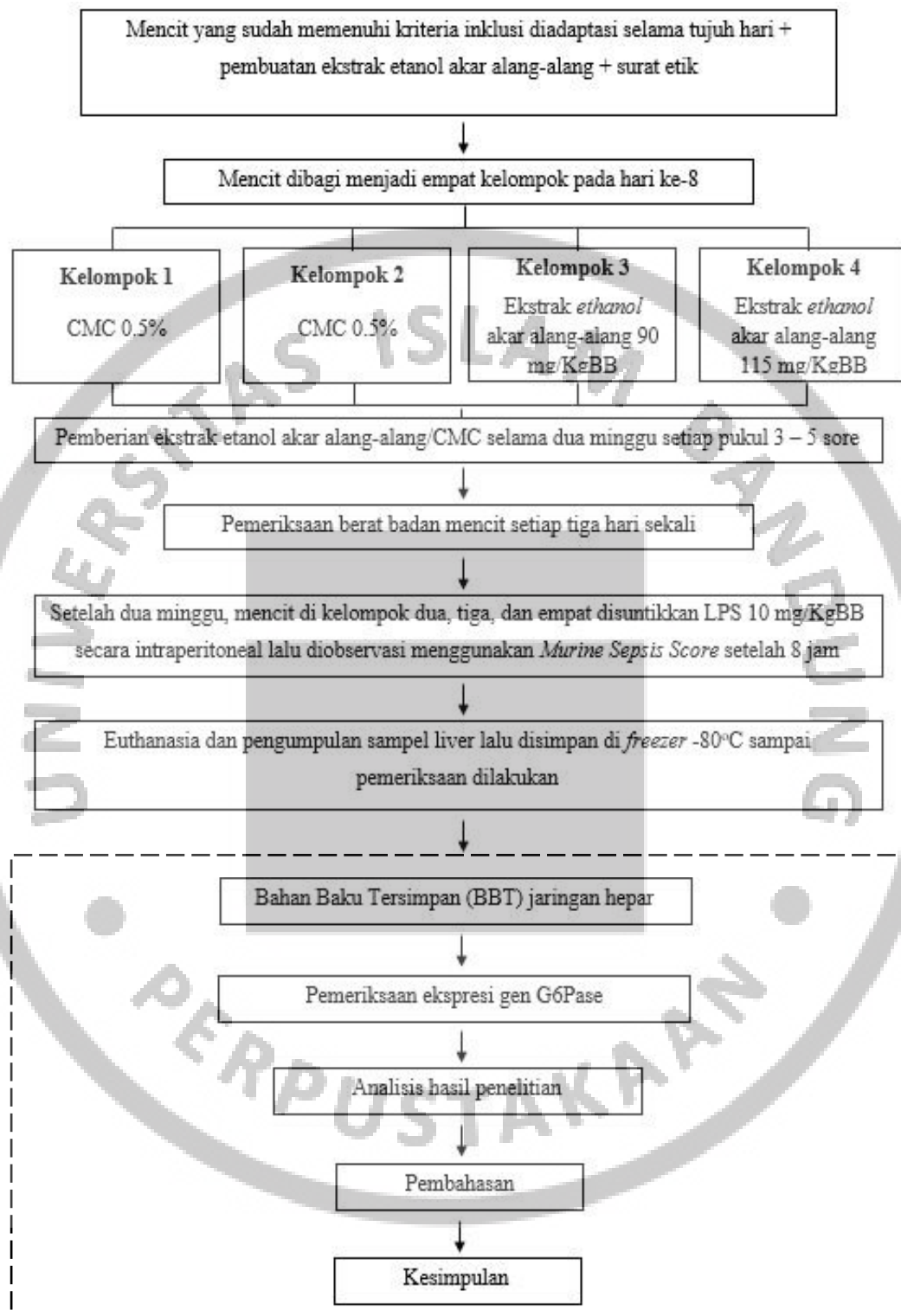
Total RNA diisolasi dari Hepar menggunakan kit ekstraksi. Semi-kuantitatif RT-PCR dilakukan dengan kit RT-PCR sesuai dengan protokol kit. RNA disiapkan dengan re-transkripsi menggunakan oligo-dT dan dNTP, dan setiap sampel diproses dengan kit RT-PCR (TAKARA, Jepang). Realtime-PCR dilakukan dengan menggunakan kit SYBR (*Applied Biosystems*, CA, USA) sesuai dengan instruksi kit, dan kemudian dievaluasi menggunakan *Light Cycler 480 Real-Time PCR* (Roche, CA, USA). Tingkat ekspresi gen target dinormalisasi dengan level mRNA *glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase* (GAPDH). Urutan primer untuk kuantitatif PCR real-time yang digunakan dalam penelitian ini tercantum dalam tabel 3.3.

**Tabel 3.3 Primers for Quantitative Real-Time PCR**

	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>
G6Pase	5'-AGGAAGGATGGAGGAAGGAA-3'	5'-TGGAACCAGATGGGAAAGAG-3'



### 3.8 Alur Penelitian



#### Keterangan:

Penelitian yang dilakukan hanya yang berada di dalam garis putus-putus.



### 3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan metode *one-way* ANOVA. Bila hasil analisis varians menunjukkan perbedaan yang signifikan maka analisis dilanjutkan menggunakan uji Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%. Hipotesis diterima bila nilai  $p \leq 0,05$ .

### 3.10 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung dan Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung Sumedang KM. 21 Jatinangor, pada bulan Januari – Agustus 2019

### 3.11 Aspek Etik

Dalam penelitian yang menggunakan binatang coba terdapat beberapa aspek penting yang perlu diperhatikan dalam etika penggunaan binatang coba

#### a. *Refinement*

Perlakuan manusiawi peneliti terhadap hewan percobaan dengan meminimalisasi perlakuan yang menyakiti hewan percobaan dengan memberikan masa adaptasi, kemudian pemberian makanan dan minuman yang bernutrisi untuk menjaga kesehatannya, dan menjaga kebersihan kandang hewan percobaan.

#### b. *Replacement*

Prinsip ini tidak memungkinkan untuk dilakukan dalam penelitian ini, karena mencit diperlukan untuk memperoleh tujuan penelitian.

### **c. Reduction**

Meminimalisasikan jumlah subjek penelitian untuk mendapatkan hasil penelitian seoptimal mungkin. Rumus Federer merupakan perhitungan yang umumnya digunakan pada penelitian eksperimental. Namun kelemahan dari rumus ini adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan *resource equation method* yang mempertimbangkan jumlah penggunaan binatang coba.

