

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test kontrol group design*) dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok (I sampai V) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 5 tikus, yaitu kelompok kontrol negatif adalah tikus yang diberi diet normal tanpa DMBA, kelompok kontrol positif adalah tikus yang diberi diet normal dan injeksi DMBA secara subkutan, sedangkan kelompok perlakuan (kelompok III-V) diberi diet normal, injeksi DMBA secara subkutan dan terapi Elektro-Akupuntur selama 3, 5 dan 10 hari.

4.2 Hewan Coba

4.2.1 Hewan Coba, Objek dan Teknik Randomisasi

Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang dijaga kebersihannya.

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin betina dewasa dengan umur 12-13 minggu. Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan

ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel, baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel diambil secara acak (*simple random sampling*) yang selanjutnya dikelompokkan dalam masing-masing kelompok kontrol atau kelompok perlakuan. Besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku dalam penetapan jumlah sampel yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus menurut Hidayat (2009):

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

Keterangan:

t = banyak perlakuan

r = banyak sampel pada tiap kelompok

jadi, untuk mengetahui besar sampel pada kelompok:

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

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

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

$$r-1 \geq \frac{15}{4}$$

$$r-1 \geq 3,75$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

4.2.3 Kriteria Inklusi

- Strain wistar
- Berusia 12-13 minggu

- c. Berat badan 150-250 gr
- d. Jenis kelamin betina
- e. Mendapatkan nutrisi yang sama
- f. Kondisi sehat ditandai dengan : pergerakan aktif, jinak, berbulu licin, mengkilat dan bersih, rambut tebal dan tidak kasar, badan tegap dan tidak kerempeng, tidak ada luka, mata jernih dan baik, tidak mengeluarkan lendir/nanah/darah dari mata atau telinga, tidak terlalu banyak ludah, tidak mencret, dan pernafasan tenang
- g. Tikus tidak mendapat pengobatan/perlakuan sebelumnya
- h. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi FKUB

4.2.4 Kriteria eksklusi

Tikus yang selama penelitian kondisinya menurun, sakit dalam masa persiapan atau adaptasi

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 2 bulan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian Elektro-Akupuntur dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit per hari. Penusukan dilakukan pada titik ST36 (Zusanli) yaitu berada pada 5mm dibawah fibula sendi lutut dan 2mm lateralis ke

tuberkulum anterior tibia selama 3; 5; dan 10 hari berturut-turut pasca induksi DMBA (Han, 2003)

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar IL-2 pada darah tikus wistar dan perbedaan hari dalam pemberian terapi Elektro-Akupuntur.

4.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi sebagai berikut :

- a. Jenis tikus
- b. Umur tikus
- c. Jenis kelamin tikus
- d. Berat badan awal
- e. Pemberian induksi DMBA secara subcutan
- f. Kondisi lingkungan kandang
- g. Pemberian Elektro-Akupuntur dititik ST 36

4.5 Definisi operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas:				
Induksi DMBA secara Subkutan	Penginduksian dilakukan dengan 3 kali induksi setiap minggu yang dilakukan setiap hari senin, kamis dan sabtu. Induksi dilakukan dengan dosis 10 mg/bb dengan	Jumlah	Mililiter (ml)	Rasio

	<p>pelarut 1 ml minyak jagung. Injeksi dilakukan di antara payudara abdominal. Dosis satu kali pemberian yaitu 1 ml diinjeksikan 0,5 ml di bagian kanan dan 0,5 ml dibagian kiri.</p> <p>(Kirubha, 2012 dengan modifikasi)</p>			
<p>Variabel bebas:</p> <p>Terapi EA pada titik ST 36</p>	<p>Dilakukan terapi EA pada titik ST 36/Zusanli (5mm dibawah fibula sendi lutut dan 2mm lateralis ke tuberkulum anterior tibia) dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit setiap hari selama 3, 5 dan 10 hari yang bertujuan untuk meningkatkan imunomodulator tubuh melawan kanker payudara</p> <p>(Johnston et al., 2009; Han, 2004)</p>	Jumlah	Hz	Rasio
<p>Variable tergantung:</p> <p>Kadar interleukin-2</p>	<p>Interleukin-2 dalam serum darah tikus diukur dengan Elabscience <i>Rat IL-2 (Interleukin 2) ELISA Kit</i> dengan metode sandwich.</p> <p>- Tambahkan 100µL standard atau sampel kedalam wells pada <i>micro ELISA Plate</i>, kemudian lakukan inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.</p>	Kadar	pg/ml	Rasio

	<ul style="list-style-type: none">- setelah itu tambahkan 100μL <i>Biotinylated Detection Ab</i>, kemudian inkubasi kembali selama 1 jam dengan suhu 37$^{\circ}$C.- setelah 1 jam, lakukan aspirasi dan cuci <i>micro ELISA Plate</i> dengan menambahkan cairan buffer (<i>Buffer</i>) \pm 350μL, kemudia lakukan aspirasi kembali. Pencucian dilakukan selama 3 kali, pada pencucian terakhir hilangkan cairan <i>Buffer</i> dengan melakukan aspirasi atau decanting (penuangan), kemudian balikkan <i>micro ELISA Plate</i> pada kertas absorbent (kertas penyerap/tissue).- Setelah bersih, tambahkan 100μL HRP Conjugate, kemudian inkubasi kembali selama 30 menit dalam suhu 37$^{\circ}$C- Setelah 30 menit, lakukan pencucian kembali <i>micro ELISA Plate</i> dengan cara yang sama seperti sebelumnya sebanyak 5 kali- Tambahkan 90μL reagen substrat, kemudian lakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37$^{\circ}$C- Setelah 15 menit, tambahkan 50μL Stop		
--	---	--	--

	<p>Solution pada masing-masing weels.</p> <p>Kemudian lakukan pembacaan menggunakan <i>Biorad</i> model 550 <i>micro plate reader</i> pada gelombang $\lambda=450$</p>			
--	---	--	--	--

4.6 Instrument penelitian

4.6.1 Alat

a. Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang

b. Alat Pembuat Makanan Hewan Coba

Baskom plastic, timbangan, sarung tangan disposibel, gelas ukur

c. Alat Pengambilan Sampel

Sprit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas

d. Alat Elektro-Akupuntur

Jarum akupuntur, akupoin detector, stimulator

e. Alat Pemeriksaan IL-2

Elabscience *Rat IL-2 (Interleukin 2) ELISA Kit* , *Biorad* model 550 *micro plate reader*, tabung, pipet 500ul, Centrifuge, spuit disposibel 3 ml, cairan *Buffer*, tisuue

4.6.2 Bahan penelitian

a. Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor perhari adalah 40 gr. Dalam penelitian ini terdapat satu macam pakan tikus yaitu diet normal untuk semua kelompok

perlakuan. Adapun komposisi pakan normal terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7% abu 8%, Ca 1,1%, fosfor 0,9%, antibiotika, coccidiostt 53%) dan tepung terigu 23,5% dan air 23,5%.

b. Bahan Pemeriksaan IL-2

Elabscience *Rat IL-2 (Interleukin 2) ELISA Kit (micro ELISA Plate, Standart, sample diluent, Biotinylated Detection Ab, HRP konjugat, cairan Buffer, reagen substrat, Stop solution, plate sealer)* dan *Biorad model 550 micro plate reader*.

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan comfee, alcohol 70%, hewan uji tikus galur wistar, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi Selama tujuh hari.

4.7.2 Pembuatan Larutan DMBA

Larutan DMBA yang akan di injeksikan secara subcutaneous dengan dosis MLD (multiple Low Dose) 10 mg/kg BB yang dilarutkan dalam 1 ml pelarut yaitu minyak jagung (Kirubha, 2012 dengan modifikasi).

4.7.3 Pembuatan Tikus Model Kanker Payudara

Tindakan yang akan dilakukan dalam menginduksi tikus galur wistar menjadi tikus model kanker payudara yaitu menginjeksikan satu dosis subkutan pada bagian antara payudara 2 dan 3 bagian abdomen tikus (*frank region*) kanan

dan kiri, dosis dibagi menjadi dua yaitu 0,5 ml untuk bagian kanan dan 0,5 ml untuk bagian kiri. Penginduksian dilakukan 3 kali dalam 1 minggu, yaitu pada hari senin, Kamis dan Sabtu selama 14 kali induksi (Kirubha, 2012 dengan modifikasi).

4.7.4 Prosedur Terapi Elektro-Akupunktur

Terapi Elektro-Akupunktur dilakukan setiap hari selama 30 menit pada titik ST 36 (Zusanli) yaitu pada 5mm dibawah fibula sendi lutut dan 2mm lateralis ke tuberkulum anterior tibia. Dengan menggunakan jarum akupunktur yang dialiri listrik dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit dalam 3, 5 dan 10 hari setelah tikus diinduksi DMBA (Johnston et al., 2009; Han, 2004 dengan modifikasi).

4.7.5 Prosedur Pengambilan Serum Darah Tikus

Pengambilan darah dilakukan dengan teknik aseptik, darah diambil dari jantung tikus. Tikus dimasukkan dalam toples yang berisi kapas ber kloroform yang bertujuan untuk dilakukan anestesi pada tikus, setelah anestesi tikus berhasil, tikus di ambil dan diletakkan di atas papan. Kemudian daerah dada tikus di cukur dan dibedah menggunakan pisau steril untuk membuka tulang dada. Setelah dada terbuka darah diambil menggunakan spuit 3 cc dari jantung tikus. Kemudian darah ditampung pada tabung reaksi, dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum selama 10 menit dengan putaran 600 rpm. Setelah mendapatkan serum, serum disimpan di refrigerator pada suhu -20°C.

4.8 Prosedur pengumpulan data

4.8.1 Teknik Pengumpulan Data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol, negatif dan positif, kelompok negatif yaitu kelompok tanpa

induksi DMBA dan tanpa terapi elektro-akupuntur, dan kelompok kontrol positif kelompok dengan induksi DMBA tanpa terapi elektro-akupuntur, serta 3 kelompok perlakuan dengan induksi DMBA dan terapi elektro-akupuntur dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit dalam 3, 5 dan 10 hari berturut-turut. Pengumpulan data dilakukan selama dilakukannya penelitian yaitu sejak dilakukannya induksi sampai dilakukannya terapi (3, 5 dan 10 hari setelah selesai induksi).

4.8.2 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dengan mengukur kadar IL-2 menggunakan metode Elisa dan dihitung pada plate Elisa dan Plate Layout yang memiliki lapang pandang 96 area dan kemudian dirata-rata.

4.8.3 Penghitungan Kadar IL-2

Interleukin-2 dalam serum darah tikus diukur dengan Elabscience *Rat IL-2 (Interleukin 2) ELISA Kit* dengan metode sandwich.

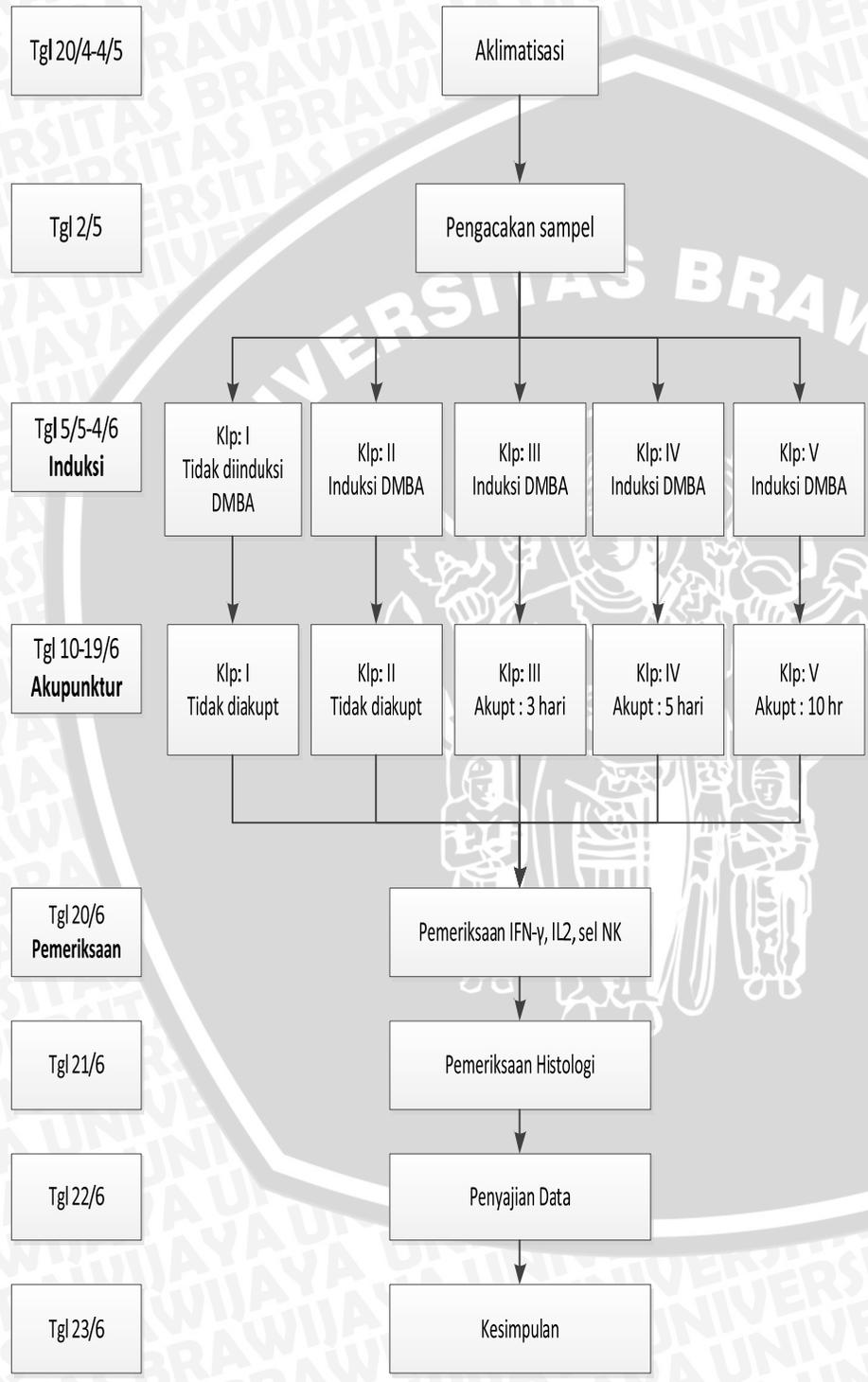
- Tambahkan 100 μ L standard atau sampel kedalam wells pada *micro ELISA Plate*, kemudian lakukan inkubasi selama 90 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C.
- setelah itu tambahkan 100 μ L *Biotinylated Detection Ab*, kemudian inkubasi kembali selama 1 jam dengan suhu 37 $^{\circ}$ C.
- setelah 1 jam, lakukan aspirasi dan cuci *micro ELISA Plate* dengan menambahkan cairan buffer (*Buffer*) \pm 350 μ L, kemudia lakukan aspirasi kembali. Pencucian dilakukan selama 3 kali, pada pencucian terakhir hilangkan cairan *Buffer* dengan melakukan aspirasi atau decanting (penuangan), kemudian balikkan *micro ELISA Plate* pada kertas absorbent (kertas penyerap/tissue).

- Setelah bersih, tambahkan 100 μ L HRP Conjugate, kemudian inkubasi kembali selama 30 menit dalam suhu 37°C
- Setelah 30 menit, lakukan pencucian kembali micro ELISA Plate dengan cara yang sama seperti sebelumnya sebanyak 5 kali
- Tambahkan 90 μ L reagen substrat, kemudian lakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C
- Setelah 15 menit, tambahkan 50 μ L Stop Solution pada masing-masing wells. Kemudian lakukan pembacaan menggunakan Biorad model 550 *micro plate reader* pada gelombang $\lambda=450$

Data yang terkumpul disajikan dalam bentuk tabel dan atau grafik yang disertai dengan penjelasannya (Elebscience, 2014).

4.8.4 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek pemberian Elektro-Akupuntur terhadap perbedaan kadar IL-2 pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur wistar yang diberikan induksi dengan DMBA secara subcutan selama 14 kali. Alur penelitian dijelaskan melalui bagan berikut:



Ket:

1. Prosedur induksi DMBA

Induksi DMBA 3 kali setiap minggu (senin, rabu, jumat) total 14 kali induksi. Dosis 10 mg/kg bb dengan pelarut 1 ml minyak bunga matahari. Injeksi di antara payudara abdominal. Dosis satu kali pemberian yaitu 1 ml diinjeksikan 0,5 ml di antara payudara bagian kanan dan 0,5 ml diantara payudara kiri.

2. Prosedur Akupunktur

Akupunktur pada titik zusanli (5mm dibawah fibula sendi lutut dan 2mm lateralis ke tuberkulum anterior tibia) tikus coba sedalam 4mm dengan arah tegak lurus terhadap bidang tusukkan. Jarum lain ditusukkan pada titik akupunktur dengan kedalaman dan arah sama sejauh 10mm dibagian bawah jarum pertama. Kedua jarum melalui elektroda dihubungkan dengan elektrostimulator. Elektrostimulator kemudian diaktifkan pada pilihan gelombang ajeg, 15 Hz selama 30 menit setiap hari selama 3 hari, 5 hari, & 10 hari

4.9 Analisis data

4.9.1 Uji Homogenitas dan Normalitas

Hasil analisa terhadap kadar IL-2 pada tikus model kanker payudara pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan dilakukan uji statistik *SPSS version 20* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk* dengan $\alpha=0,05$. Jika didapatkan data menunjukkan $p \text{ value} > 0,05$, maka data terdistribusi normal. Kemudian pada uji homogenitas / keragaman data menggunakan uji *test of homogeneity of variances*, jika nilai $F \text{ hasil} < \text{nilai } F \text{ tabel}$, maka data adalah homogeny, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA*.

4.9.2 Uji One Way Anova

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan *One Way Anova SPSS version 20* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok uji dan kelompok kontrol. Jika signifikansi $< \alpha (0,05)$, maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah kadar IL-2 pada tikus model kanker payudara.