

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true eksperimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan beberapa kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan mencit balb/c dewasa yang dibuat model colitis associated colon cancer dengan induksi AOM(Azoxymethane) dan DSS(Dekstran Sodium Sulfat).

4.2 Populasi dan Sampel

Sebagai sampel penelitian digunakan 20 ekor mencit balb/c betina berusia 8-10 minggu, berat antara 20-25 gram yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya yang diadaptasikan selama satu minggu di Laboratorium Parasit FKUB sebelum diberi perlakuan. Selanjutnya dilakukan screening dengan kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- a) Mencit Balb/c dewasa dan sehat
- b) Betina, umur 8-10 minggu
- c) Berat antara 20-25 gram

Kriteria eksklusi:

- a) Mencit Balb/c yang tidak aktif
- b) Mencit Balb/c terdapat cacat anatomis

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, yang terdiri dari kelompok yang diberi 10mg/kgBB AOM dan 5% DSS (kontrol positif). Kelompok yang diberi 10mg/kgBB AOM dan 5% DSS dan diberi ekstrak daun benalu mangga 125mg/kgBB. Kelompok yang diberi 10mg/kgBB AOM dan 5% DSS dan diberi ekstrak daun benalu mangga 250mg/kgBB. Kelompok yang diberi 10mg/kgBB AOM dan 5% DSS dan diberi ekstrak daun benalu mangga 500mg/kgBB. Dan kelompok normal (kontrol negatif). Maka pengulangannya adalah:

$$P(n-1) \geq 16$$

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4$$

Maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap kelompok perlakuan adalah minimal 4.

4.3 Identifikasi Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe petandra*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah persentase sel limfosit T CD4 dan CD8 pada mencit balb/c model *colitis-associated colon cancer*.

4.3.3 Definisi Operasional Variabel

1. Model *colitis-associated colon cancer* dibuat dengan cara induksi AOM (Sigma) dan DSS (MW 40.000, ICN Biomedicals inc,CA,USA) menurut Papivanova (2008).
2. Daun benalu mangga diambil dari perkebunan di Probolinggo, daun benalu mangga dipilih yang segar diekstraksi dengan menggunakan ethanol 90%.
3. Pembedahan mencit dilakukan pada minggu ke-15 menurut Damara (2013) dengan modifikasi.
4. Isolasi organ limpa mencit di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dilabel CD4(anti CD4FITC) (Biolegend) dan CD8(anti CD8PerCP) (Biolegend) diukur dengan cara flow cytometry (Siying,2004)

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli sampai November 2013.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Ekstrak Daun Benalu Mangga

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun benalu mangga yang didapat dari perkebunan di Probolinggo yang kemudian diekstraksi di materia medika kota Batu. Kemudian dibuat 3 macam konsentrasi yang akan digunakan sebagai variabel bebas.

Proses ekstraksi Daun Benalu Mangga:

- A. Proses Maserasi

1. Serbuk halus daun benalu mangga ditimbang sebanyak 100 gram (sampel kering)
 2. Serbuk halus daun mangga dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L
 3. Kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000 ml
 4. Rendaman serbuk halus daun benalu mangga dan etanol dikocok hingga benar-benar tercampur (± 30 menit)
 5. Campuran tadi didiamkan selama satu malam sampai mengendap
 6. Lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur diambil (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring)
 7. Proses perendaman ini dilakukan sampai tiga kali
- B. Proses Evaporasi
1. Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L
 2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator dan water bath diisi dengan air
 3. Semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (diatur sesuai titik didih pelarut) dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik.
 4. Larutan etanol didiamkan agar memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
 5. Aliran etanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 ml
 6. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik/kaca
 7. Kemudian botol berisi hasil ekstraksi disimpan di dalam freezer

4.5.2 Instrumen Penelitian

1. Timbangan untuk menimbang mencit balb/c
2. Persiapan mencit balb/c model *colitis-associated colon cancer* dengan induksi AOM dan DSS.
3. Pemberian ekstrak etanol daun benalu mangga
4. Instrumen pembedahan mencit balb/c yang telah dibuat model colitis-associated colon cancer guna pengambilan limpa.
5. Instrumen untuk pemeriksaan flowcytometri untuk melihat persentase sel T CD4 dan CD8.



4.6 Pengelompokan subjek penelitian

Minggu ke-		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
K E L O M P O K	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	◇
	B	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	◇
	C	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	◇
	D	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	◇
	E	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	◇

Keterangan gambar :



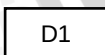
: Air minum



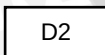
: AOM 10mg/kgBB intraperitoneal



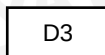
: DSS 5% dengan air minum



: Dosis benalu mangga 125mg/kgBB



: Dosis benalu mangga 250mg/kgBB



: Dosis benalu mangga 500mg/kgBB



: Pembedahan

Keterangan:

Kelompok A: kontrol negatif

Kelompok B: kontrol positif

Kelompok C: diberi dosis benalu mangga 125mg/kgBB

Kelompok D: diberi dosis benalu mangga 250mg/kgBB

Kelompok E: diberi Dosis benalu mangga 500mg/kgBB

Kelompok B,C,D,E diberi 10mg/kgBB AOM (Azoxymethane) secara intra-peritoneal pada hari ke-1(minggu ke-0). Kelompok B diberi 5% DSS (Dekstran Sodium Sulfat) secara peroral di dalam air minum pada minggu ke 1,3,5,7,9,11,13 dan air minum pada minggu ke 2,4,6,8,10,12,14. Kelompok C, D, E diberi 5% DSS (Dekstran Sodium Sulfat) secara peroral di dalam air minum pada minggu ke 1,3,5,7,9,11,13. Sedangkan kelompok A hanya diberi aquades. Kemudian pada kelompok C, D, E diberikan ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe petandra*) dengan sonde mulai minggu ke-6 dengan dosis sesuai dengan penelitian Wicaksono *et al* (2013) yaitu 125mg/kgBB, 250mg/kgBB, 500mg/kgBB. Pada kelompok C diberi dosis 125mg/kgBB, pada kelompok D 250mg/kgBB, dan pada kelompok E 500mg/kgBB. Pada minggu ke-15 dilakukan pembedahan.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Preparasi Hewan Coba

Preparasi hewan coba dilakukan selama 1 minggu untuk aklimatisasi di laboratorium. Untuk melakukan penelitian ini, telah disiapkan 20 mencit balb/c. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 mencit.

4.7.2 Ekstrak Daun Benalu Mangga

Daun benalu mangga (*Dendrophthoe petandra*) didapat dari perkebunan di Probolinggo. Diambil yang segar kemudian dikeringkan dan dilakukan proses ekstraksi di materia medika Batu dengan metode maserasi dan evaporasi dengan pelarut alkohol 90%.

4.7.3 Pembuatan Model *Colitis-associated colon cancer* menurut Thaker, 2012

Mencit balb/c diberi 10mg/kgBB AOM secara intraperitoneal pada hari pertama, kemudian mencit diberi DSS 5% selama 3 siklus (1 siklus selama 7 hari) melalui air minum bergantian dengan air minum. Kemudian dilanjutkan pemberian DSS nya sampai total 7 siklus. Berat mencit diukur setiap minggu. Pada akhir percobaan, mencit dikorbankan pada minggu ke-15 dengan menggunakan eter.

4.7.4 Isolasi Jaringan Limpa Mencit

4.7.4.1 Alat

Gunting kecil, pinset, mikro pipet, blue tape, yellow tape, Eppendorf, cell strainer, falcon, tabung flowcytometri, syringe, timbangan analitik, petridis, spidol, sarung tangan, masker, flowcytometri.

4.7.4.2 Bahan

Mencit yang sudah diinduksi colitis-associated colon cancer, Eter, RBC lysis, PBS, Antibodi CD4 & CD8.

4.7.4.3 Cara kerja

- a. Mencit yang sudah diinduksi kolitis dikorbankan dengan menggunakan eter pada minggu ke-15.
- b. Mencit dibaringkan pada stereofoam yang dilapisi aluminium dan disemprot dengan alkohol.
- c. Mencit dibedah menggunakan gunting dimulai dengan menggunting bagian abdomennya.
- d. Organ limpa mencit diambil
- e. Petridis yang telah diisi dengan PBS 1 ml disiapkan
- f. Limpa diletakkan pada masing-masing petridis yang sudah dilabeli

4.7.5 Sel T CD4 dan CD8

Untuk mendapatkan data persentase sel T CD4 dan CD8 digunakan flow cytometry. Preparasi sel splenocyte sebelum dimasukkan ke dalam flow cytometry dengan metode Mishell(1974) adalah sebagai berikut(dengan sedikit modifikasi) :

1. Limpa mencit balb/c diambil
2. Limpa dimasukkan ke dalam petridis yang telah diberi PBS 1 ml yang mengandung 2% FCS.
3. Limpa digerus dengan menggunakan bagian datar dari syringe hingga halus atau rata.

4. 1 ml PBS yang mengandung 2% FCS ditambahkan ke dalam petridis yang berisi hasil gerusan limpa tadi.
5. Hasil gerusan limpa dipindahkan ke dalam falcon 50 ml yang diatasnya telah terpasang cell strainer lalu didiamkan agar tersaring.
6. Hasil saringan dipindahkan ke dalam falcon 15 ml.
7. Falcon 15 ml yang berisi hasil saringan tadi dimasukkan ke dalam mesin sentrifuge dan ditunggu beberapa menit.
8. Setelah disentrifuge, cairan dibuang hingga menyisakan hanya bagian yang mengendap di dalam falcon.
9. RBC lysis 2 ml ditambahkan dan dicampur dengan menggunakan mikropipet.
10. Falcon yang sudah ditambahi dengan rbc lysis dimasukkan lagi ke dalam mesin sentrifuge dan ditunggu selama beberapa menit.
11. Cairan dibuang hingga menyisakan hanya bagian yang mengendap di dalam falcon.
12. PBS 2ml ditambahkan lagi ke dalam falcon. Dicampur dengan menggunakan mikropipet lalu dimasukkan ke mesin sentrifuge lagi.
13. Setelah disentrifuge, cairan dibuang hingga menyisakan partikel-partikel di dasar falcon.
14. Partikel tadi dipindahkan ke dalam ependorf kemudian diberi antibodi CD4 dan CD8.
15. Selanjutnya dihitung dengan menggunakan flowcytometri.

4.8 Pengolahan dan Analisa Data

Dilakukan uji normalitas data, homogenitas varian, uji anova, post hoc test, dan uji korelasi dengan menggunakan aplikasi SPSS Statistics 17.0

