

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Sampel Penelitian

Sebagai sampel penelitian digunakan 20 ekor mencit Balb/c betina umur 8-10 minggu, berat antara 20-25 gram yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya yang diadaptasikan selama 1 minggu di Laboratorium Parasitologi FKUB sebelum 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 Eklusi :

- a) Mencit Balb/c terdapat cacat anatomis atau bulu rontok
- b) Mencit yang tidak aktif bergerak

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, yang terdiri dari :

1. Kelompok yang diberi 10mg/KgBB Azoxymethane (AOM) dan 5% Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) (kontrol positif).
2. Kelompok yang diberi 10mg/KgBB Azoxymethane (AOM) dan 5% Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) dan diberi ekstrak etanol daun benalu mangga 125mg/KgBB (D1) (Permana, 2013).
3. Kelompok yang diberi 10mg/KgBB Azoxymethane (AOM) dan 5% Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) dan diberi ekstrak etanol daun benalu mangga 250mg/KgBB (D2) (Permana, 2013).
4. Kelompok yang diberi 10mg/KgBB Azoxymethane (AOM) dan 5% Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) dan diberi ekstrak etanol daun benalu mangga 500mg/KgBB (D3) (Permana, 2013).
5. Kelompok normal (kontrol negatif)

Untuk tujuan mendapat kejadian *colitis-associated colon cancer* dilakukan perhitungan jumlah pengulangan yang harus dilakukan dengan rumus :

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

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

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4, \dots$$

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

4.3 Identifikasi Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

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

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependent)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gen TNF- α pada limpa mencit Balb/c model *colitis-associated colon cancer*.

4.3.3 Definisi Operasional Variabel

1. Model colitis-associated colon cancer dibuat dengan cara induksi DSS (MW=40.000, ICN Biomedicals Inc, CA, USA) dan AOM (Sigma, USA). (Popivanova, 2008)
2. Daun Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) diambil dari perkebunan di Probolinggo
3. Gen TNF- α adalah hasil amplifikasi PCR menggunakan primer TNF- α (Primer Premier, Life Science) dan β -actin (Primer Premier, Life Science) yang divisualisasikan pada 1,5% agarose (Endharti, 2011) dan dianalisis dengan *NIH image*.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun mangga (*Dendrophthoe pentandra*) yang didapat dari perkebunan di Probolinggo yang kemudian diekstraksi di Polinema FKUB. Kemudian dibuat 3 macam konsentrasi yang akan digunakan sebagai variabel bebas. Proses ekstraksi daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

A. Proses Maserasi

1. Serbuk halus daun benalu mangga ditimbang sebanyak 100 gram (sampel kering).
2. Serbuk dimasukkan ke dalam gelas *Erlenmeyer* ukuran \pm 1L.
3. Kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000 mL.
4. Lalu dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
5. Didiamkan 1 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 selama 3 kali.

B. Proses Evaporasi

1. Hasil penyaringan dimasukkan dalam labu evaporasi 1L.
2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator dan water bath diisi dengan air.
3. Rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 78°C atau sesuai dengan titik didih pelarut) dipasang, lalu disambungkan dengan aliran listrik.
4. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
5. Aliran etanol dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu) \pm 900 mL.
6. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik/kaca.
7. Kemudian disimpan dalam freezer.

4.4.2 Instrumen Penelitian

1. Timbangan untuk menimbang mencit Balb/c.
2. Persiapan mencit Balb/c model colitis-associated colon cancer dengan induksi AOM (azoxymethane) dan DSS (dextran sodium sulfat salt).
3. Pemberian ekstrak etanol daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*).
4. Instrumen pembedahan mencit Balb/c guna pengambilan limpa yang telah dibuat model *colitis-associated colon cancer*.
5. Instrumen untuk memeriksa gen TNF- α pada limpa model *colitis-associated colon cancer*.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.6 Pengelompokan Subyek Penelitian

Minggu ke-

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Kelompok Perlakuan	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	◇	
	B	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	◇
	C	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	◇
								D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	
	D	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	◇
							D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	
E	●	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	◇	
							D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	

Gambar 4.1 Pengelompokan Subyek Penelitian

Keterangan :

○ : H₂O

● : AOM intraperitoneal

▲ : DSS 5% per oral

D1 : Dosis ekstrak benalu mangga 125 mg/kgBB

D2 : Dosis ekstrak benalu mangga 250 mg/kgBB

D3 : Dosis ekstrak benalu mangga 500 mg/kgBB

◇ : Pembedahan

Keterangan :

Kelompok A, B, C, dan D diberi 10mg/Kg BB AOM (Azoxymethane) secara intra-peritoneal pada hari ke 1 (minggu ke-0) dan 5% DSS (Dextran Sulfate Sodium Salt) diberikan per oral di dalam air minum pada minggu ke 1, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13 masing-masing selama seminggu. Sedangkan kelompok E hanya diberi aquades. Kemudian pada kelompok B, C, dan D diberikan ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) per sonde selama penelitian dengan dosis 125 mg/KgBB pada kelompok B, 250 mg/KgBB pada kelompok C, dan 500 mg/KgBB pada kelompok D dimulai pada minggu ke-6. Pada minggu ke-15 dilakukan pembedahan menurut Damara (2013) dengan modifikasi

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

Daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) didapat di perkebunan Probolinggo, dikeringkan dan dilakukan proses ekstraksi di Polinema FKUB dengan metode maserasi dan evaporasi dengan pelarut alkohol 90%.

4.7.2 Preparasi Hewan Coba

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

4.7.3 Pembuatan Model *Colitis-Associated colon cancer* menurut Papivanova, 2008

Mencit Balb/c diberi Azoxymethane (AOM) (Sigma, USA) secara intra-peritoneal pada hari pertama kemudian mencit diberikan Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) 5% (MW=40.000, ICN Biomedicals Inc, CA, USA) pada minggu ke 1,3,5,7,9,11, dan 13 melalui air minum masing-masing dalam 1 minggu. Berat mencit diukur setiap minggu. Pada minggu ke-6 dilakukan pemeriksaan *Serum Amyloid A* (SAA) dan Fecal Occult Blood Test untuk melihat kejadian *colitis* pada mencit. Pada akhir percobaan mencit dikorbankan dengan eter secara cepat sehingga tidak menimbulkan rasa sakit yang berkepanjangan.

4.7.4 Isolasi Jaringan Limpa Mencit

1. Alat

Gunting kecil, Pinset, Mikro pipet, Blue tape, Yellow tape, Eppendorf, Penggaris, Timbangan analitik, Culture plate, Spidol, Sarung tangan, Masker.

2. Bahan

Mencit yang sudah diinduksi colitis-associated colon cancer, Eter, *Tri Reagent* (MP Bio), PBS.

3. Cara Kerja

- a. Pada minggu ke-15, mencit yang sudah diinduksi kolitis dibunuh menggunakan eter.
- b. Mencit dibaringkan pada stereoform yang dilapisi aluminium dan disemprot dengan alkohol.
- c. Mencit dibedah menggunakan gunting mulai dengan menggunting bagian abdomennya.
- d. Bagian limpa diambil.
- e. Limpa dipotong sepanjang 1cm sebagai sampel dan meletakkan pada masing-masing culture plate yang sudah dilabeli.
- f. Organ limpa ditetesi PBS menggunakan mikro pipet untuk membersihkan organ tersebut dari darah.
- g. Limpa digunting tipis.

4.7.5 Isolasi RNA menurut Persaud (2006)

1. Homogenisasi

Sampel jaringan limpa dihomogenasi pada 400 μ l TRI REAGENT

2. Fase separasi (homogenate + chloroform)

Jaringan sampel yang sudah dicampur TRI REAGENT dipindah ke cawan petri kemudian dihaluskan. Dipindah lagi ke dalam tube kemudian ditambahkan 80 μ l chloroform dalam 400 μ l TRI REAGENT, sampel ditutup rapat-rapat dan dikocok secara dinamis selama 15 detik. Hasil pencampuran disimpan pada temperatur ruangan selama 2-15 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g selama 15 menit dengan suhu 4° C. Hasil sentrifugasi didapatkan bagian bawah eppendorf yaitu fase phenol-chloroform, interphase, dan bagian atas adalah fase aqueous, kemudian bagian aqueous dipindahkan pada tabung eppendorf baru.

3. Presipitasi RNA (fase aqueous + isopropanol)

Isopropanol 200 μ l ditambahkan kemudian disimpan pada temperatur ruangan selama 5-10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 g pada temperatur 4-25°C. RNA presipitasi (sering tak terlihat sebelum sentrifugasi) berbentuk seperti gel atau pellet putih pada bagian bawah dan samping tabung eppendorf.

4. Pencucian RNA

Supernatant dibuang dan RNA-pellet dibilas dengan 400 μ l ethanol 75% dan disentrifugasi pada kecepatan 7.500 g pada temperatur 4-25°C.

5. Solubilisasi RNA (DEPC water)

Ethanol dibuang dan RNA pellet diangin-anginkan selama 3-5 menit kemudian ditambahkan 200 μ l *free water*.

4.7.6 Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (RTP-CR) dengan

Promega

Protokol :

1. 0,5-1 μg total RNA dicampur dengan 100pmol primer (5 μl)(dN)₉
2. Campuran didenaturasi di suhu 70°C, dan diinkubasi dalam es, lalu ditambahkan campuran berikut (beserta volumenya) :
 - RT Reaction Buffer (5X) : 2 μl
 - dNTPs (10mM each) : 0,5 μl
 - Ribonuclease inhibitor (40U/ μl) : 0,125 μl
 - DTT (100mM) : 1 μl
 - M-MLV Reverse Transcriptase (200U/ μl) : 0,25 μl
 - DEPC-treated water : up to 10 μl
3. Larutan dicampur dan disentrifugasi secara singkat, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu yang sesuai.
4. Reaksi dihentikan dengan inkubasi pada 94°C selama 5 menit dan didinginkan tabung di atas es.
5. Sintesis cDNA menggunakan sistem ini dapat digunakan secara langsung pada amplifikasi PCR.

4.7.7 Prosedur kerja PCR menurut Elliot, *et al.* (2003)

1. Tempat kerja dibersihkan dengan ethanol 70%
2. Sarung tangan, pipet tips, tabung eppendorf steril disiapkan pada tempat bersih
3. Alat amplifikasi Promega dari -20 disiapkan kemudian dicairkan pada RT
4. 200 μl tabung PCR dilabeli sesuai sampel
5. Persiapan reaksi campuran reagen PCR

Prosedur pada tabel ini diikuti

Prosedur reaksi PCR

Tabel 4.1 Mix Reaksi (Promega Kit)

No.	Reaksi Campuran PCR	Reaksi
1.	Go taq master mix 2x	4,2 μ l
2.	Primer forward 0,25-2,5 μ l	0,2 μ l
3.	Primer reversa 0,25-2,5 μ l	0,2 μ l
4.	Kontrol DNA/ sampel DNA 1-5 μ l	1 μ l
5.	Nuclease free water	2,4 μ l
	Total	8 μ l

6. a. 6,943 μ l mix reaksi PCR dimasukkan untuk promega kit tanpa sampel DNA kedalam masing-masing tabung eppendorf (v 200 μ l) sampel yang telah disiapkan (no. 5)
 - b. 6,6 μ l mix reaksi PCR untuk promega kit dimasukkan tanpa sampel DNA dan primer kedalam masing-masing tabung eppendorf (v 200 μ l) sampel yang telah disiapkan (no. 5)
7. a. 0,2 μ l DNA template atau DNA sampel diambil melalui pipet untuk promega kit
 - b. 1 μ l DNA template atau DNA sampel dan 0,2 μ l primer baik forward dan reverse diambil melalui pipet untuk promega kit.
8. Campurlah dengan mix reaksi PCR yang sudah siap dalam tabung eppendorf dengan cara *pipeting* (jangan divortex) kemudian spin down.
9. Tube dibawa pada mesin PCR dan digunakan mengikuti kondisi siklus seperti ini

10. Tabel 4.2 Cycling condition PCR

PCR cycle step	Temperature	Time (minutes)	Number of cycle
Initial denaturation	95°C	2	1
Denaturation	95°C	30 sec	40
Anneling	60°C	60 sec	
Extention	74°C	60 sec	
Final extention	74°C	5	1
Hold	12°C	Indefinitely	1

11. Setelah proses PCR sampel bisa disimpan dalam 4°C

4.7.8 Prosedur Elektroforesis Horisontal

1. Disiapkan 10 x TAE stok (4,84 g Tris base; 1,14 mL asam 57omogen; 0,37224 g EDTA; add dH₂O~100mL; adjust pH 8)
2. 1 x TAE diambil (disiapkan dari 10x stok)
3. 0,6 g agarose gel ditambahkan sampai volume akhir 40 mL (untuk membuat agarose dengan konsentrasi 1,5%)
4. Larutan dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan agarose atau dalam microwave
5. 1 µL etidium bromide ditambahkan dalam campuran agarose, lalu dikocok
6. Ditunggu sampai hangat, agarose dituangkan pada plate sampai dingin kira-kira 20 menit

Penyiapan plate untuk membuat agarose :

- Dipasang sumuran
 - Baru dituang agarose
7. Setelah agarose jadi, sumuran diambil dengan hati-hati baru dipasangkan agarose pada alat running
 8. TAE ditambahkan sampai menggenangi gel

9. Sumuran diletakkan pada gel agarose dekat anoda (-) biasanya warna hitam, karena arus listriknya mengalir dari anoda (negatif) ke katoda (positif)
10. Marker VC 100vb plus dan loading dye harus segera di aliquot, 10 μ L untuk marker VC 100vb plus dan 20 μ L loading dye untuk pada beberapa eppendorf, dilabeli dan segera disimpan dalam -20°C
11. 3 μ L marker / sampel hasil PCR diambil lalu ditambah 2 μ L loading buffer.

Proses penambahannya :

- Loading dye diletakkan pada parafilm (disiapkan sejumlah sampel ditambah 1 untuk marker)
 - Sampel hasil PCR ditambahkan pada loading dye diatas parafil tersebut
 - Dihomogenkan dengan cara dipipeting
12. Dengan hati-hati sampel ditempatkan ke dalam sumuran menggunakan pipet
 13. Sampel dielektroforesis pada 50V untuk 60 menit
 14. Dengan menggunakan sarung tangan, gel diambil dari box, diletakkan ke dalam box UV dan diambil gambarnya.

4.7.8 Gen TNF- α

Total RNA diekstraksi dari jaringan limpa menggunakan trizol (Gibcol, USA.). Reaksi cDNA dilakukan dengan superscript reverse transcriptase-II (invitrogen). Aplikasi PCR dilakukan pada 25-40 siklus menggunakan kondisi sebagai berikut : denaturasi 30 detik di 95°C , anneling 1 menit di 60°C , ekstesi 1 menit pada 74°C . Produk PCR dielektroforesis 1,5% gel agarose yang mengandung 0,5 $\mu\text{g/mL}$ dan ethidium bromida. Selanjutnya gel agarose divisualisasikan di bawah sinar UV. Primer yang akan digunakan sebagai berikut :

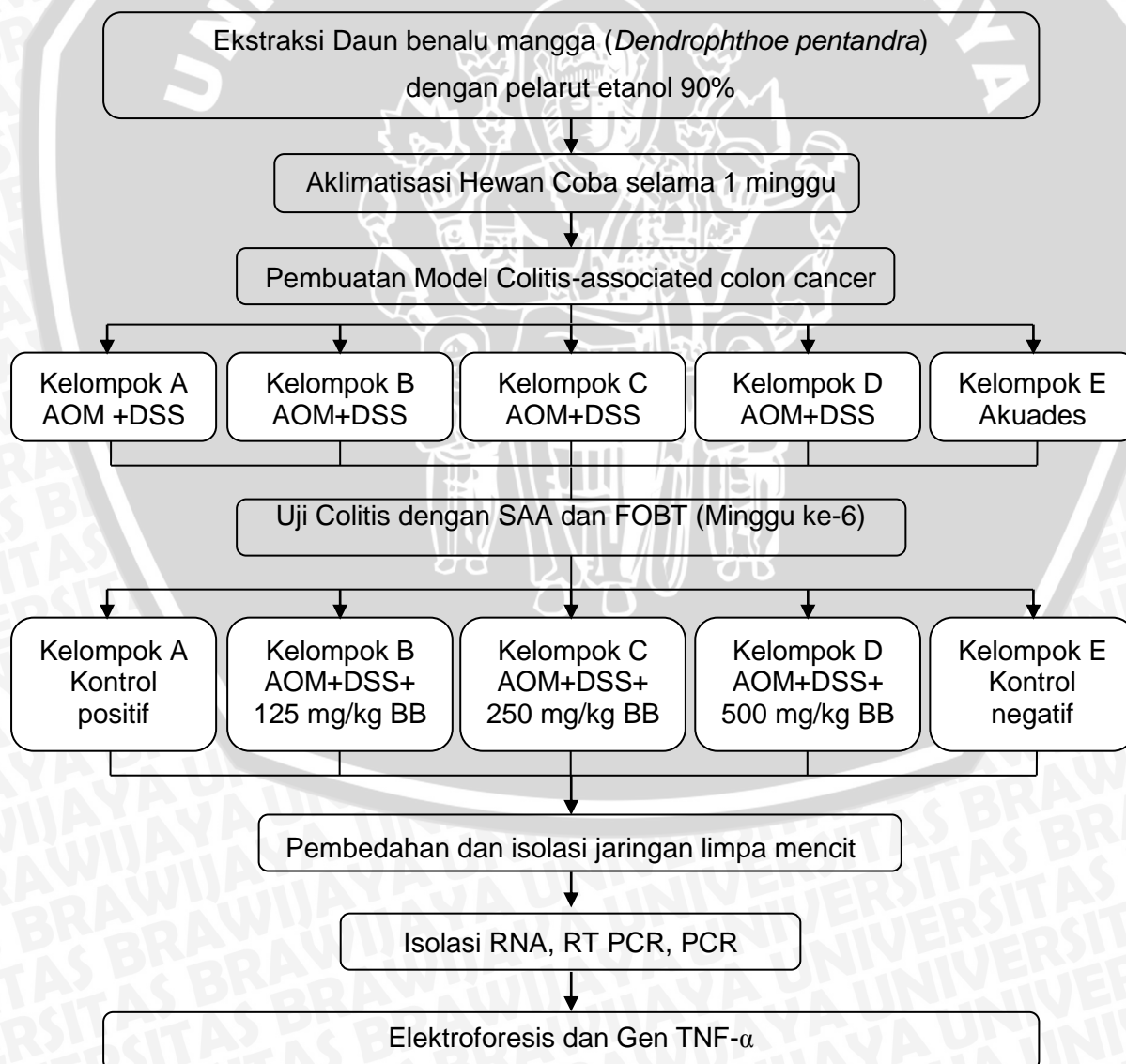
Tabel 4.3 Gen TNF- α

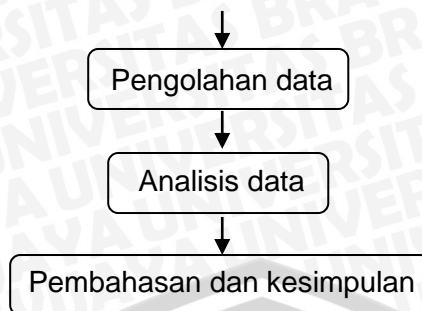
Gene	Forward Primer	Reverse Primer
TNF- α	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	TGCCACAAGCAGGAATGAGA
β -actin	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA

4.8 Pengolahan dan analisa data

Dilakukan uji normalitas data dan homogenitas varian, uji one-way anova dan post hoc test serta uji korelasi Pearson menggunakan aplikasi SPSS Statistics 22.0

4.9 Alur Penelitian





4.10 Jadwal Kegiatan

Tabel 4.4 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2-5				Bulan 6				Bulan 7	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Penulisan Proposal Penelitian														
Aklimatisasi & Induksi mencit														
Perlakuan & Pembedahan														
Gen TNF- α & Statistik														
Penulisan Laporan														

