

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen sejati (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan perlakuan dengan kelompok kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*). Jenis kelamin tikus yang digunakan untuk percobaan adalah tikus betina yang sehat dan sebelum diberi perlakuan akan dikawinkan terlebih dahulu dengan tikus jantan agar terjadi kehamilan. Penelitian ini membagi sampel dalam lima kelompok perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (n=5) : sampel tanpa diberikan kafein dan ekstrak brokoli
2. Kelompok kontrol positif (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kg intraperitoneal tanpa diberikan ekstrak brokoli pada hari ke 9-11 kehamilan
3. Kelompok I (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 1 (200 mg/kgBB) dengan penyondean pada hari ke 9-11 kehamilan

4. Kelompok II (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 2 (400 mg/kgBB) dengan penyondean pada hari ke 9-11 kehamilan

5. Kelompok III (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 3 (800 mg/kgBB) dengan penyondean pada hari ke 9-11 kehamilan

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\{(np - 1) - (p - 1)\} \geq 16 \text{ (Sastroasmoro, 1995)}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Jumlah sampel tiap perlakuan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$\{(np - 1) - (p - 1)\} \geq 16$$

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

Dengan demikian dapat diambil sampel ≥ 4 untuk tiap perlakuan. Agar diperoleh data yang lebih teliti, masing-masing perlakuan digunakan sampel sebanyak 5 ekor tikus, sehingga total keseluruhan sebesar 25 ekor tikus.

4.2.1 Kriteria Inklusi dan Kriteria *Drop Out*

a. Kriteria inklusi

Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar betina yang sehat, berbulu putih dan tampak aktif, berusia 2-2.5 bulan dengan berat badan 130-150 gram.

b. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang selama penelitian tidak mau makan, memiliki penyakit, dan tikus yang sulit hamil akan dikeluarkan dari penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pengaruh kafein dengan dosis tetap yaitu 80 mg/kgBB serta pengaruh ekstrak brokoli (*Brassica oleracea L.*) dengan dosis yang berbeda, yaitu dosis 1 (200 mg/kgBB), dosis 2 (400 mg/kgBB), dan dosis 3 (800 mg/kgBB) terhadap malformasi berupa celah palatum pada janin tikus.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah malformasi berupa celah palatum pada janin tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang disebabkan oleh kafein.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian serta lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan pewarnaan hewan janin tikus dilakukan di Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2016.

4.5 Alat dan Bahan

a. Perawatan Tikus

Alat : bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm untuk kandang tikus, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air, sekam, timbangan berat badan.

b. Pembuatan Ransum Makanan Tikus

Alat : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggilingan pakan, nampan.

c. Ekstraksi Brokoli (*Brassica oleracea L.*)

Alat : Pipet, pisau, batang pengaduk, gelas ukur, tabung reaksi, neraca analitik, blender, mesh untuk maserasi brokoli, *overhead stirer* untuk mengaduk simplisia dengan etanol, batang pengaduk, *rotary evaporator* dan *vacum drying* untuk menghilangkan pelarut pada maserat, filter berukuran 0,2-0,4 μ untuk filtrasi sediaan ekstrak.

Bahan : simplisia brokoli, etanol 70%, aquades, botol hasil ekstrak

d. Pelarutan Kafein Murni

Alat : air

Bahan : wadah, pengaduk

e. Pemberian Ekstrak Brokoli dan Kafein

Alat : spuit

Bahan : larutan kafein murni, ekstrak brokoli

f. Pewarnaan Janin Tikus

Alat : gelas arloji, tempat spesimen berupa botol jernih bermulut lebar, dan pipet tetes.

Bahan : pewarna *alizarin red*, larutan alkohol 96%, larutan penjernih (A, B, dan C), Larutan KOH 1%, larutan gliserin murni, dan akuades.

g. Pengamatan Malformasi Kraniofasial

Alat : mikroskop stereo SZ61 Olympus

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* betina berusia 2-2.5 bulan, dengan berat badan 130-150 gram yang akan dikawinkan dengan tikus jantan agar terjadi kehamilan, kemudian diberi perlakuan pada hari ke 9-11 kehamilan.

2. Kafein

Kafein yang digunakan dalam penelitian ini adalah kafein murni dalam bentuk bubuk yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dosis kafein yang diberikan pada setiap tikus adalah 80 mg/kgBB, sehingga jumlah kafein yang diperlukan dalam penelitian ini sebanyak 1,2 gram. Dengan menyesuaikan kapasitas maksimal lambung tikus (5ml), maka dosis kafein 80 mg/kgBB dilarutkan dalam air hingga volumenya tidak melebihi kapasitas lambung tikus.

Diberikan secara intraperitoneal menggunakan spuit.

3. Ekstrak Brokoli (*Brassica oleracea L.*)

Brokoli dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Sumberejo, Kota Batu, Malang, proses pengeringan serta penyerbukan dilakukan di Balai Materia Medika, Kota Batu, Malang, serta proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Jumlah brokoli yang akan diekstrak yaitu 2.4 kg, sehingga

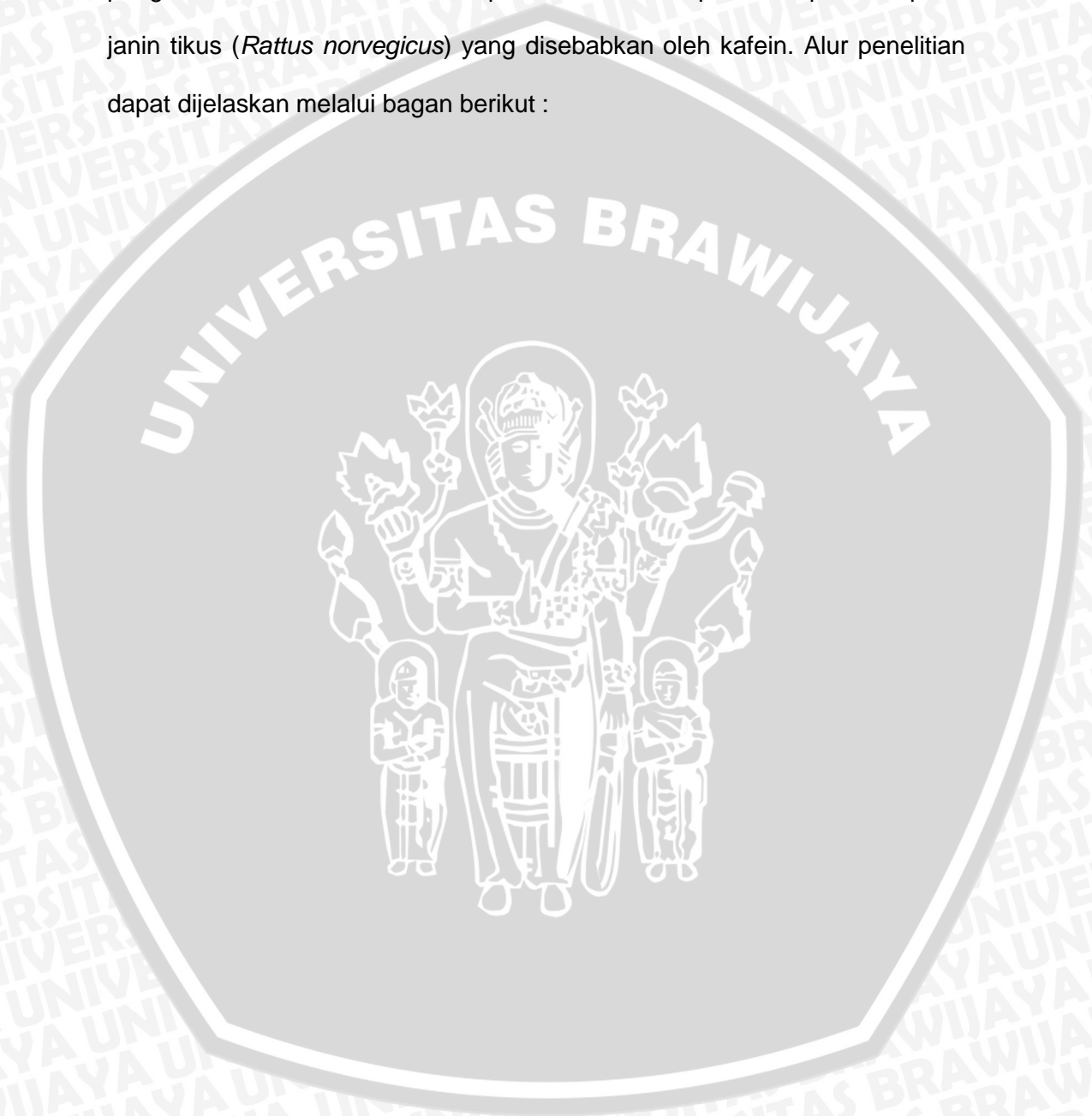
diharapkan menghasilkan jumlah ekstrak kental sebanyak 8 gram sesuai kebutuhan dalam penelitian. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian ekstrak yang diperoleh diuapkan dan dipekatkan, hingga didapat ekstrak kental. Besar dosis untuk perlakuan didasari dari sebuah penelitian yang melaporkan bahwa suplementasi brokoli sebanyak 200 mg/KgBB dapat mencegah terjadinya kerusakan otak yang disebabkan oleh insufisiensi plasenta, dimana suplementasi diberikan selama kehamilan (Black *et al.*, 2015). Dikarenakan pada penelitian ini ekstrak brokoli diberikan hanya 3 hari pada kehamilan, maka ditetapkan 200 mg/kgBB sebagai dosis minimum dan ditambah dengan 2 dosis di atasnya yaitu 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB, yang diharapkan dapat bertindak sebagai pencegah kecacatan yang disebabkan oleh kafein. Diberikan dengan cara penyondean.

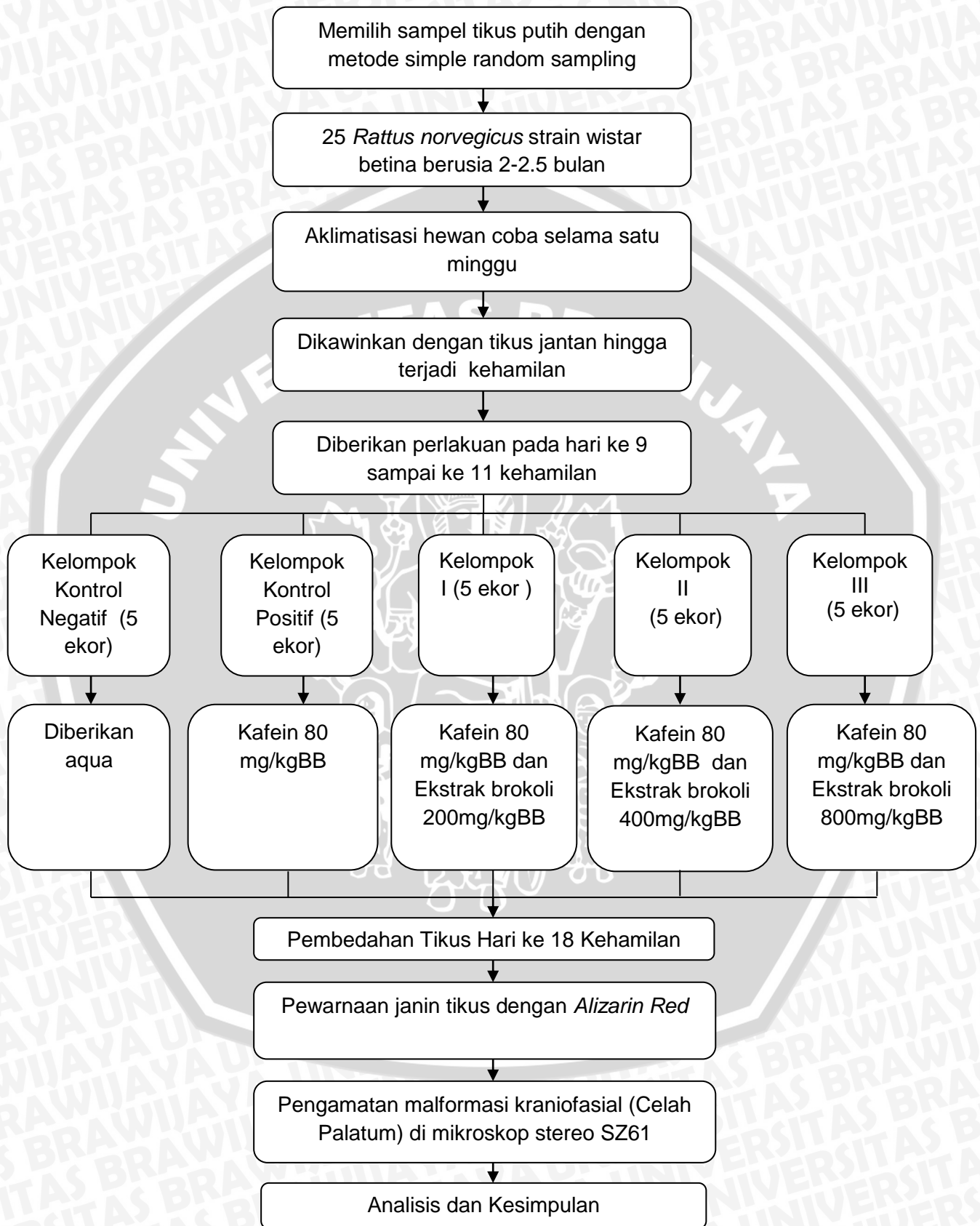
4. Malformasi

Kejadian malformasi berupa celah palatum dapat diamati pada hari ke 18 kehamilan yang akan dilakukan pembedahan pada tikus. Setiap janin tikus yang lahir diamati dan dibandingkan antar kelompok, apakah terjadi celah palatum atau tidak dengan menggunakan pewarnaan *alizarin red*. *Alizarin red* merupakan suatu metode mikroteknik untuk mengetahui pembentukan tulang pada janin tikus atau untuk mendeteksi proses kalsifikasi tulang janin. Tulang yang diwarnai dengan *alizarin red* akan berwarna merah tua jika tulang tersebut telah mengalami kalsifikasi. Warna ini muncul karena zat warna yang diberikan terikat oleh kalsium pada matriks tulang (Soeminto, 2002).

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai pengaruh ekstrak brokoli terhadap malformasi berupa celah palatum pada janin tikus (*Rattus norvegicus*) yang disebabkan oleh kafein. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut :





Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

Selama proses aklimatisasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 30 gram dan diberikan secara *ad libitum* selama 7 hari (1 minggu).

4.7.2 Perawatan Tikus

Tikus ditimbang dan dilakukan aklimatisasi selama satu minggu di dalam kandang berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm yang telah diberi sekam, tiap kandang berisi 5 ekor tikus. Tikus diberi air minum dan diet normal 1 kali sehari. Sekam pada kandang tikus diganti setiap harinya.

4.7.3 Pengawinan Hewan Percobaan

Pengawinan hewan dilakukan pada masa estrus dengan memasukan 1 ekor jantan ke kandang yang berisi 2 ekor betina pada sore hari. Keesokan paginya dilakukan pengamatan di daerah vagina, jika ditemukan sumbat vagina (*vagina plug*, maka tikus dinyatakan kawin, bila sumbat vagina tidak ditemukan dilanjutkan dengan cara membuat apusan vagina).

Cara membuat apusan vagina yaitu mengusapkan *cotton bud* di bagian vagina tikus betina, kemudian ditoreskan pada kaca objek dan diberikan cairan NaCl fisiologi. Lihat pada mikroskop dengan pembesaran 40x. Tikus dinyatakan kawin apabila ditemukan sperma dalam apusan vaginanya. Tikus yang terbukti kawin dinyatakan sebagai hari ke-0 dari kehamilan.

4.7.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cairan penyari. Cairan pelarut dalam pembuatan ekstrak adalah pelarut

yang optimal untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan pemilihan cairan penyaring terdiri dari berbagai aspek yaitu selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan (Depkes RI, 2000).

4.7.5 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (Depkes RI, 2000). Dalam penelitian ini, ekstrak brokoli diperoleh dari metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan hasilnya berupa ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dapat langsung diberikan secara intraperitoneal kepada tikus.

4.8 Langkah Penelitian

a. Langkah I :

Brokoli ditimbang sebanyak 2.4 kg, kemudian dilakukan pengeringan dan penyerbukan. Setelah itu baru dilakukan pengekstrakan dengan maserasi berulang menggunakan etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* tekanan rendah pada suhu 65°C, hingga didapat ekstrak kental. Penelitian menggunakan sampel sebanyak 25 ekor tikus putih strain wistar dibagi

menjadi 5 kelompok (berdasarkan rumus Federer) diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar. Kafein yang digunakan adalah kafein murni berupa bubuk, kemudian dilarutkan dengan air untuk diberikan secara intraperitoneal kepada tikus.

b. Langkah II :

Dilakukan pemeriksaan tikus jantan dan betina yang sehat, berat badan antara 130-150 gram dan berusia 2-2.5 bulan. Kemudian tikus diberikan pakan pellet di laboratorium seperti biasa. Dengan suhu ruangan yang cocok 23-25 derajat celsius dan keramaian lingkungan sekitar 45-55%. Tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan hingga hamil yang ditandai dengan adanya *vaginal plug* dan disebut dengan hari ke-0 kehamilan.

c. Langkah III:

Tikus yang sudah hamil (N=25), dibagi dalam 5 kelompok, dan diberikan perlakuan sebagai berikut :

Kelompok kontrol negatif : diberikan aqua tanpa kafein dan ekstrak brokoli

Kelompok kontrol positif : diberikan kafein dengan dosis 80 mg/kg

Kelompok I : diberikan kafein 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 1 (200 mg/kgBB) dengan penyondean

Kelompok II : diberikan kafein 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 2 (400 mg/kgBB) dengan penyondean

Kelompok III : diberikan kafein 80 mg/kg intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 3 (800 mg/kgBB) dengan penyondean

Perlakuan diatas, dimulai pada hari ke 9 sampai 11 kehamilan.

Kemudian akan dilakukan pembedahan pada hari ke 18 kehamilan, dan

akan diamati kejadian malformasi berupa celah palatum dengan menggunakan pewarnaan *alizarin red* dan dibandingkan antar kelompok.

d. Langkah IV:

Setelah hari ke 18 kehamilan, maka akan dilakukan pembedahan pada tikus dimana dalam pelaksanaannya ini perlu persiapan agar pekerjaannya lebih lancar dan perlakuan yang dilakukan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Adapun tahap-tahap pembedahan tikus, antara lain :

Tabel 4.1 Prosedur Pembedahan Tikus (*Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi UGM*)

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1	Tikus dibunuh dengan cara <i>cervical dislocation</i> (dislokasi leher).	➤ Jika dengan cara <i>cervical dislocation</i> pastikan hewan uji terbunuh dengan cepat, jangan sampai menyiksa hewan uji.
2	Posisikan tikus pada papan bedah menggunakan <i>pins</i> .	Pastikan tubuh tikus terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
3	Bedah pada bagian uterus menggunakan gunting bengkok.	Jika perlu, cukur bulu tikus pada bagian perut dan bersihkan sisa bulu dengan kapas yang dibasahi air.
4	Ambil janin tikus dan tempatkan pada wadah yang aman.	Membersihkan janin tikus dari darah atau kotoran.

Adapun langkah-langkah persiapan pewarnaan pada janin yaitu :

- a. Mempersiapkan larutan KOH (4%, 2% dan 1%).

- b. Larutan pewarna *alizarin red* disiapkan dan dibuat stok (cadangan).
- c. Pewarna *alizarin red* bubuk dilarutkan dalam 50% larutan asetat hingga jenuh kemudian diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan larutan gliserin PA sebanyak 10 mL.
- d. Alkohol hidrat 1% ditambahkan sebanyak 60 mL kemudian diaduk hingga merata dan stok sudah siap.
- e. Larutan pewarna dibuat dengan menambahkan 1 mL larutan *alizarin red* yang sudah dibuat ke dalam 100 mL larutan KOH 2% pada temperatur ruang.
- f. Larutan penjernih dibuat dengan cara sebagai berikut :

Tabel 4.2 Larutan Penjernih (Riswiyanto, 2005)

Larutan penjernih A	Gliserin (20 bagian), KOH 4% (3 bagian) dan Akuades (77 bagian)
Larutan penjernih B	Gliserin (50 bagian), KOH 4% (3 bagian) dan Akuades (47 bagian)
Larutan penjernih C	Gliserin (75 bagian) dan Akuades (25 bagian)

Adapun metode pewarnaan pada janin tikus yaitu :

- a. Dilakukan pembedahan tikus pada hari ke 18 kehamilan, kemudian janin diambil dan diletakkan di gelas arloji.
- b. Bersihkan janin tersebut dari membran ekstra embrional dan bulu-bulu atau kotoran agar tidak mengganggu saat proses kalsifikasi.
- c. Janin dimasukkan ke dalam botol bening yang berisi alkohol 96% selama 12 jam. Larutan alkohol ini bersifat fiksatif.

- d. Larutan Alkohol 96% dibuang dan diganti dengan larutan KOH 1% selama \pm 3 jam pada botol yang sama.
- e. Larutan KOH 1% dibuang dan diganti akuades larutan *alizarin red* pada botol yang sama selama 3 jam.
- f. Larutan diganti dengan larutan KOH 2% selama 30 menit.
- g. Larutan diganti dengan larutan penjernih A selama 1 jam dan dilanjutkan penggantian dengan larutan penjernih B dan penjernih C masing-masing selama 1 jam.
- h. Pengamatan (Riswiyanto, 2005).

Larutan-larutan yang digunakan dalam percobaan ini mempunyai fungsi masing-masing. Larutan alkohol berfungsi sebagai fiksatif. Larutan KOH berfungsi agar otot menjadi transparan dan skeletannya terlihat jelas. Larutan pewarna *alizarin red* berfungsi agar skeleton berwarna merah sehingga dapat terlihat jelas. Larutan penjernih A, B dan C berfungsi untuk mengurangi kelebihan pewarna yang masuk ke dalam jaringan otot sehingga otot menjadi tampak jernih transparan. Sedangkan, larutan gliserin berfungsi sebagai larutan media penyimpanan (Faturohman, 2014).

4.8 Analisis Data

Data-data hasil yang diperoleh dikelompokkan dan dimasukkan ke dalam tabel serta diuji kemaknaannya dengan menggunakan One Way ANOVA untuk membandingkan hasil kehamilan berupa malformasi antar kelompok perlakuan. Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95% dengan $\alpha=0,05$. Hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila $p<0,05$.