

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Penelitian eksperimental dilakukan dengan serangkaian kegiatan percobaan untuk mengetahui gejala maupun pengaruh yang ditimbulkan karena perlakuan tertentu. Salah satu jenis penelitian eksperimental adalah *true eksperimental* yaitu rancangan eksperimental yang memenuhi tiga syarat, yaitu ada kelompok kontrol, ada random, dan ada replikasi (Notoatmodjo, 2010 dan Zainuddin, 2011). Sedangkan pendekatan *post test only control group design* adalah salah satu jenis pendekatan pada *true experimental* dimana fenomena yang terjadi akibat adanya perlakuan atau intervensi dari peneliti (respon) hanya diamati setelah perlakuan atau intervensi tersebut diberikan.

Perlakuan yang dilakukan yaitu tindakan ovariektomi untuk menciptakan kondisi hipoestrogen. Dilanjutkan dengan pemberian ekstrak kacang tunggak dengan berbagai dosis yaitu 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, dan 5 mg/kg (Khusniati *et al.* 2014; Azizah *et al.* 2014; Yulinda *et al.* 2014). Penelitian ini ingin mengetahui penurunan proliferasi sel colon pada tikus hipoestrogen.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang sering digunakan sebagai hewan percobaan merupakan strain albino dari *Rattus Norvegicus* yaitu Galur Wistar yang lebih tahan terhadap perlakuan ovariektomi serta mempunyai ukuran tubuh tidak terlalu kecil.

a. Kriteria Inklusi

Untuk menjaga homogenitas sampel maka diberlakukan kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Jenis kelamin betina.
2. Umur 9 - 12 minggu
3. Berat badan : 150 – 250 gram.
4. Tikus Sehat

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit (karena infeksi dan diare)

c. Besar sampel

Besar sampel atau dalam penelitian ini disebut sebagai replikasi yang merupakan banyaknya tikus yang digunakan dalam setiap kelompok sampel penelitian. Replikasi adalah banyaknya unit eksperimen, yang mendapat perlakuan sama pada kondisi tertentu (Zainuddin, 2011). Hidayat (2010) menyebutkan bahwa untuk banyaknya replikasi ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = banyaknya kelompok

r = jumlah replikasi (banyaknya ulangan) pada tiap kelompok

perlakuan

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq \frac{18}{3}$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan rumus di atas maka ditemukan jumlah replikasi adalah 6.

Sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi 4 kelompok X 6 menjadi 30 ekor.

d. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Tikus yang telah sesuai dengan kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Pembagian kelompok tikus dilakukan dengan secara acak (*simple randomized sampling*). Pembagian kelompok tikus tersebut diatas adalah sebagai berikut :

- 1) Kelompok kontrol (+) : kelompok tikus yang diovariectomi dan tidak diberi ekstrak KT
- 2) Kelompok perlakuan 1 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 1,25 mg/kg
- 3) Kelompok perlakuan 2 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 2,5 mg/kg
- 4) Kelompok perlakuan 3 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 5 mg/kg

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

- a. Pemeliharaan tikus, tindakan ovariektomi dan terminasi di laboratorium farmakologi FKUB.
- b. Pengekstrakan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA UB.
- c. Pemeriksaan kandungan ekstrak kacang tunggak dengan metode LC-MS di Polinema (Tian, 2004).
- d. Pembuatan preparat (slide untuk pemeriksaan HE) di laboratorium patologi anatomi FKUB.
- e. Pengukuran proliferasi sel colon di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan oktober 2015 sampai dengan bulan Januari 2016.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Pemberian ekstrak kacang tunggak dalam dosis 1,25 mg/kgBB; 2,5 mg/kgBB; 5 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel Tergantung

Jumlah sel epitel colon *Rattus norvegicus*.

4.5 Definisi Operasional

a. Ovariectomy

Ovariectomy dilakukan dengan pengambilan organ ovarium kanan dan kiri tikus yang bertujuan untuk menyebabkan kondisi hipoeestrogen.

b. *Vigna unguiculata* merupakan tanaman Kacang Tunggak yang dipanen saat tua dan berasal dari daerah Nusa Penida-Bali.

c. Pemberian ekstrak kacang tunggak :

Pemberian ekstrak kacang tunggak dengan dosis 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg dan 5 mg/kg selama 30 hari dimulai saat tikus telah mengalami kondisi hipoeestrogen (diperiksa dengan pH indikator MERCK) diberikan per oral (Khusniyati *et al.*, 2014; Spencer *et al.*, 2004)..

d. Jumlah sel epitel colon tikus.

Pada slide colon tikus yang diamati adalah jumlah sel epitel. Ciri-ciri sel epitel colon yaitu nukleus berwarna ungu tua serta sitoplasma berwarna merah muda pada pengecatan hematoxilin eosin. Jumlah sel epitel dihitung sebanyak lima lapang pandang dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Kimura *et al*, 2011 dan Deng XH *et al*, 2014)..

4.6 Instrumen Penelitian

a. Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

1) Kandang

a) Ukuran Kandang : berupa box plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 20 cm, ditutup dengan kawat berjaring.

b) Jumlah kandang : pada masa aklimatisasi, kandang sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas. Masing-masing kandang ditempati 2

tikus. Setelah ovariectomi, tikus dipisahkan dalam kandang masing-masing 1 kandang ditempati 1 tikus.

2) Tempat minum di masing-masing kandang

b. Alat menimbang tikus

1) Timbangan atau neraca digital

c. Bahan dan Alat Ekstrak Kacang Tunggak

1) Bahan :

a) 10 kg kacang tunggak yang diperoleh dari petani I Wayan Kanca di daerah Nusa Penida - Bali

b) Metanol for Analisis

2) Alat :

a) Timbangan

b) Pengaduk

c) Blender

d) Kertas saring *Whatman*

e) *Rotary evaporator*

f) Oven

d. Alat dan Bahan Ovariectomi

1) Alat :

a) 1 set alat bedah termasuk pisau scalpel no.11

b) Spuit 1 cc

c) Meja operasi kecil

d) Baki plastik

e) Sarung tangan

f) Duk steril



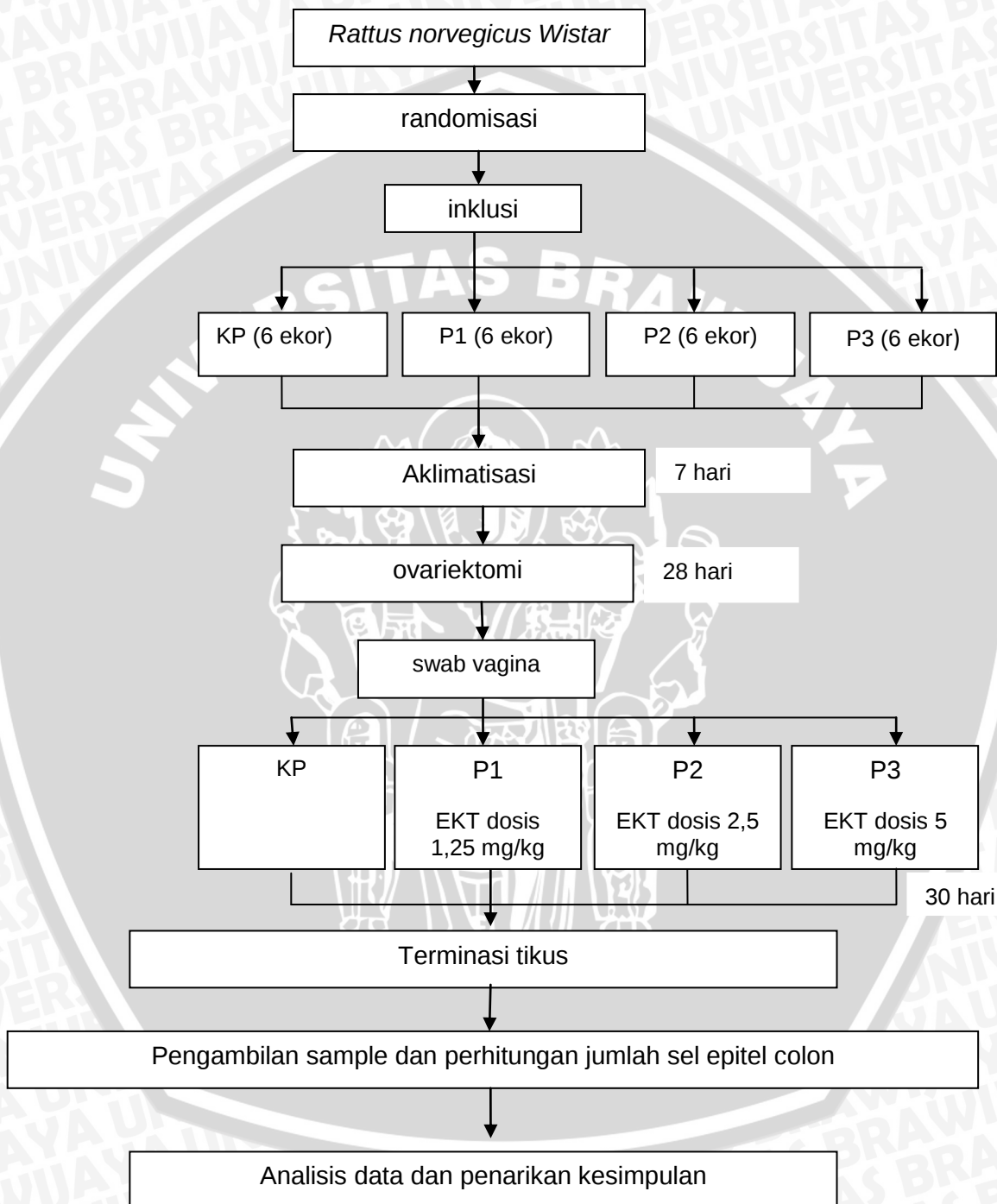
- g) Korentang
- h) Bengkok
- i) Kandang pemulihan
- 2) Bahan
 - a) Agen anestesi (kombinasi :Ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg)
 - b) etanol
 - c) povidon iodine
 - d) Benang cat gut (cromik 3/0 dan silk3/0)
 - e) Kassa steril
- e. Alat dan Bahan untuk swab vagina
 - 1) Alat : pH indikator strip MERCK
 - 2) Bahan : secret mukosa vagina yang berada di introitus vagina tikus
- f. Alat Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak kepada Hewan Coba
 - 1) Botol dengan penutup
 - 2) Spuit 1 ml
 - 3) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)
- g. Alat untuk pengambilan organ colon oleh petugas teknisi yang terlatih
 - 1) Alat bedah minor (scalpel, pinset, gunting, klem, pemegang jaringan).
 - 2) Wadah sebagai tempat penyimpanan jaringan
 - 3) Papan untuk meja operasi.
- h. Bahan untuk pembuatan slide histologi colon
 - 1) Formalin 10%
 - 2) Xylol
 - 3) Parafin cair
 - 4) Alkohol (70%, 80%, 90%, dan 100%)

- 5) Alkohol asam 1%
- 6) Amonia cair
- 7) Cat utama Harris Hematoksilin
- 8) Cat Eosin 1%



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram alur penelitian

4.7.2 Prosedur Perawatan Hewan Coba

- a. Hewan coba ditempatkan pada kandang yang terbuat dari bahan plastik, ditutup dengan kawat kasa halus. Kandang diletakkan pada suhu ruang 20-28°C. Kandang diberi alas sekam setebal 0,5 – 1 cm dan diganti 2 kali setiap minggu pada hari Senin dan Jumat. Cahaya ruangan di control persis jam 12, jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00 esok harinya)
- b. Tikus diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Pakan standar dibuat dari campuran produk pakan ternak dengan tepung terigu dengan perbandingan 3 banding 1 dengan kandungan Vitamin B1, Vitamin B2, Asam Folat, Zat Besi dan Zn.

Tabel 4.1 Komposisi Pakan Standar di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya

Komposisi	Jumlah
Air	Maksimal 12%
Protein Kasar	12 – 14%
Lemak Kasar	Minimal 4%
Serat Kasar	Maksimal 6%
Abu	Maksimal 7,5%
Kalsium	0,9 – 12%
Fosfor	0,6 – 0,8 %

Sumber : Laboratorium Farmakologi FKUB, 2015

Sebanyak 20-25 gr/ekor pakan kering kemudian di tambahkan air dan ditimbang menjadi 40-50 gr/ekor. Minum tikus diletakkan pada botol minuman dengan kebutuhan harian 60 ml/ekor.

- c. Pengukuran berat badan tikus dilakukan setiap minggu sekali.

4.7.3 Prosedur Ekstraksi kacang tunggak

Prosedur ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Prosedur pembuatan sebagai berikut:

- a. Biji kacang tunggak diangin-anginkan di suhu ruang, kemudian ditumbuk hingga menjadi bubuk halus
- b. Bubuk KT dimasukkan ke dalam toples tertutup ukuran 2L dan direndam dengan metanol hingga permukaan methanol melebihi permukaan bubuk KT, diaduk hingga benar-benar tercampur (homogen).
- c. Hasil adukan didiamkan selama 1 malam hingga mengendap.
- d. Diaduk setiap hari hingga 7 hari
- e. Disaring untuk mendapatkan lapisan bagian atas yang terdiri dari metanol dan zat aktif terlarut yang terlarut.
- f. Proses diatas dilakukan hingga 3 kali.
- g. Hasil rendaman dimasukkan dalam labu evaporasi 1 L.
- h. Labu evaporasi dipasang pada evaporator dan *water bath* diisi hingga penuh.
- i. Semua rangkaian alat kemudian dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik.
- j. Larutan metanol dibiarkan menguap pada labu evaporasi dan dibiarkan hingga berhenti menetes pada labu penampung ($\pm$ 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- k. Hasil ekstraksi yang berbentuk pasta kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik/kaca dan disimpan di dalam lemari es saat sedang menunggu proses

LCMS

4.7.4 Prosedur Ovariektomi

- a. Tikus ditimbang dengan timbangan digital untuk penentuan dosis agen anestesi
- b. Pemberian agen anestesi secara intraperitoneal
- c. Persiapan lapang operasi pada abdomen tikus. Rambut abdomen dicukur, kemudian oleskan etanol.
- d. Lakukan sebuah insisi kecil tegak lurus peritoneal (*tranverse peritoneal*) sepanjang 0,4-0,6 cm dengan pisau scalpel ukuran 11 di pertengahan abdomen dan secara ringan arahkan ke sisi kanan, mendekati puting susu kedua kanan.
- e. Setelah mencapai kavum peritoneal, jaringan adiposa ditarik sampai tuba uterina kanan dan ovarium teridentifikasi. Lakukan juga untuk tuba dan ovarium kiri. Letakkan masing-masing organ di atas duk steril.
- f. Lakukan pengikatan pada daerah distal tuba uterine, dan potong ovarium. Lakukan pada ovarium sisi sebaliknya.
- g. Masukkan kembali tuba ke dalam kavum peritoneal. Lalu jahit kembali kedalam 2 lapisan (otot dan kulit) dengan catgut. Untuk peritoneum dan otot menggunakan benang yang mudah diabsorpsi (*ethichon cromatic sutures-3/0*), sedangkan untuk kulit menggunakan benang non-absorpsi (*ethicon mersilk sutures-3/0*)
- h. Olesi bekas jahitan dengan povidon iodine
- i. Lakukan perawatan dengan teknik aseptik pada tikus post ovariektomi.

(Khajuria, *et al.* 2012)

4.7.5 Prosedur pengukuran pH vagina

Prosedur pengukuran pH vagina menggunakan pH indikator strips MERCK:

- Tikus dipegang dengan posisi terlentang.
- Vagina tikus dibuka.
- Gunakan catton swab untuk mengambil secret mukosa vagina yang berada pada introitus vagina dan kanalis vaginalis tikus dengan 3 kali putaran searah jarum jam.
- Hasil swab di oleskan pada pH indicator strips MERCK selama 1 sampai 3 detik maksimal 10 menit.
- Baca hasil pemeriksaan pH indicator strips sesuai dengan standard pH indicator strips MERCK (pH 0-14) (Ferris *et al*, 2006).

4.7.6 Prosedur pemberian ekstrak kacang tunggak

- Empat minggu (28 hari) setelah dilakukan ovariektomi (Wiyasa, 2012)
- Berat badan tikus ditimbang tiap 7 hari sekali
- Dihitung dosis masing-masing tikus untuk 7 x pemberian selama 7 hari yaitu :

$$= \frac{\text{BB tikus} \times \text{dosis (0,5mg/kgBB atau 2,5mg/kgBB atau 5mg/kgBB)} \times 7 \text{ hari}}{1000 \text{ mL}}$$
- Pasta hasil ekstrak kacang tunggak diencerkan hingga sebanyak 7mL
- Hasil pengenceran diberikan per oral melalui sonde tiap hari 1 mL selama 30 hari.

4.7.7 Prosedur Terminasi Hewan Coba dan Pengambilan Sampel Organ

- Tikus diterminasi dengan diberi agen anastesi dengan dosis 2-3 kali dosis anastesi yaitu dengan injeksi IM Ketamin 0,6 mL
- Tikus yang sudah mati diletakkan diatas alas papan dengan abdomen menghadap ke atas.

- c. Tikus di ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan jarum suntik (*needle*) yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki.
- d. Dilakukan pengambilan jaringan colon tikus.
- e. Sampel organ dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan.
- f. Setelah dilakukan pengambilan sampel, bangkai tikus yang tersisa dan tidak digunakan dikubur dengan aman sehingga tidak terjadi pencemaran lingkungan.

4.7.8 Prosedur Pembuatan Spesimen Jaringan Colon

Spesimen untuk mengetahui adanya penurunan proliferasi sel colon

1) Pembuatan blok parafin

- a) Jaringan segar
- b) Jaringan colon tikus direndam dalam larutan fiksatif berupa formalin 10% minimal 24 jam
- c) Jaringan dipotong gross dengan ketebalan 2-3 mm
- d) Prosesing jaringan dengan menggunakan metode *autoprocessing* dengan alat *Sakura Tissue Tex Processor*
- e) Direndam dalam *xylol*, kemudian paraffin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan embedding dengan mencelupkan jaringan dalam paraffin cair yang telah dituang dalam wadah.
- f) Setelah beberapa saat paraffin akan memadat dan jaringan colon tikus berada dalam blok parafin.
- g) Preparat pada blok paraffin hasil *embedding* dimasukkan pada penjepit (*block holder*) mikrotom dan diatur kesejajaran permukaan potong dengan mata pisau *mikrotom*.
- h) Jaringan diiris dengan ukuran 3-4 μm .

2) Deparafinisasi

- a) Preparat dicelupkan dalam *xylol* sebanyak 3 kali, didiamkan, masing-masing selama 15 menit.
- b) Preparat dicelupkan ke larutan alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) dan *aquades* secara berurutan masing-masing selama 5 menit.

3) Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

- a) Preparat dicat menggunakan Harris Hematoksilin selama 10-15 menit.
- b) Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.
- c) Preparat dicelupkan ke alkohol asam 1% sebanyak 2-5 kali.
- d) Dicelupkan kembali dengan ammonia cair sebanyak 3-5 kali.
- e) Kemudian dilakukan pengecatan Eosin 1% selama 10-15 menit.

4) Dehidrasi

- a) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat yaitu alkohol 70%, 80%, 90%, 100% masing-masing selama 3 menit.

5) Clearing

- a) Penjernihan dengan *xylol* I & II masing-masing 60 menit

6) Mounting

7) Perhitungan jumlah sel epitel colon *Rattus norvegicus*

- a) Preparat sampel disiapkan untuk melakukan pengamatan.
- b) Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya Olympus XC 10 dengan perbesaran 400x dan lima lapang pandang dengan pengambilan secara acak (Kimura *et al*, 2011 dan Deng XH *et al*, 2014). Kemudian dilakukan perhitungan sel epitel colon.

- c) Sel epitel colon yang diamati adalah sel epitel colon yang berada di lapisan permukaan colon dan di kript. Sel ini menggambarkan inti berwarna ungu tua dihitung dari satu lapang pandang ke lapang pandang berikutnya
- d) Jumlah kumulatif sel pada lima lapang pandang yang terkumpul kemudian dirata-rata. Jumlah rata-rata sel epitel per lima lapang pandang dijadikan sebagai data.
- e) Perhitungan jumlah sel dibawah bimbingan ahli patologi anatomi.

4.8 Pengolahan Data

Data yang dihasilkan dari pengukuran jumlah proliferasi sel colon pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kemudian dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Sebelumnya untuk mengetahui data berdistribusi normal dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan Saphiro Wilk (terpenuhi bila $p > 0,05$) dan uji homogenitas. Berikut urutan uji statistic yang dilakukan :

- a. Uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok data berdasarkan pada satu factor secara signifikan.
- b. Uji perbandingan berganda *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan yang lebih rinci antara pasangan kelompok sampel yang saling berbeda dan pasangan kelompok sampel yang sama.
- c. Analisis Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui apakah pemberian perlakuan berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap variabel tergantung.