

BAB III
BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan/Subjek Penelitian

3.1.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan :

- Sarung tangan
- Sonde lambung (*gavage*)
- Alat penindik telinga mencit
- Neraca analitis (*CHQ electronic balance DJ 1002BH 1000 gr/0.01 gr*)
- Jarum suntik 25G
- Syringe 1 cc (Terumo)
- Tabung mikrosentrifuga 1,5 mL
- Sentrifuga (Genofuge)
- Mikropipet 1 – 10 μ L (EPPENDORF)
- Mikropipet 10 – 100 μ L (EPPENDORF)
- Mikropipet 200 – 1000 μ L (GILSON)
- *White tip*
- *Yellow tip*
- *Blue tip*
- Tabung Falcon 15 mL
- Tabung Falcon 50 mL
- Rak tabung Falcon 15 ml
- *96 wells plate*
- Botol Duran berulir 600 mL
- Autoklaf (KSG Olching, KS-9)
- Inkubator goyang/*Shaking Incubator* (HEIDOLPH UNIMAX 1010 & HEIDOLPH incubator 1000)

Bahan-bahan yang digunakan :

- *Azoxymethane (AOM) (Sigma – A2853 – 100 mg)*
- *Dextran sulfate sodium (DSS) (AMRESCO – 0198 – 50 g)*
- Alkohol 70 %
- *Aquadest*
- *Aquabidest steril IPHA laboratorium*
- Sari buah merah
- IFN- γ 's ELISA Kit (R&D Lot 260372) yang terdiri dari :
 - *Mouse IFN- γ Standard*
 - *Calibrator Diluent RD1 – 12*
 - *Assay Diluent RD1 – 21*
 - *Wash Buffer Concentrate*
 - *Mouse IFN- γ Conjugate*
 - *Color Reagent A*
 - *Color Reagent B*
 - *Stop Solution*

3.1.2 Subjek penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah 28 mencit galur Balb/C jantan, berumur 8 minggu dengan berat badan rata-rata 25 gram yang diperoleh dari Bagian Pemeliharaan dan Penelitian Hewan Coba, Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran (PPIK) Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung.

3.1.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran (PPIK), Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung.

Waktu penelitian dimulai pada bulan Desember 2009 – Juli 2010.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Disain Penelitian

Penelitian ini bersifat prospektif eksperimental laboratorium sungguhan dengan rancangan acak lengkap (RAL), bersifat komparatif. Mencit dibagi dalam 4 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit.

3.2.2 Variabel Penelitian

3.2.2.1 Definisi Konseptual Variabel

Variabel terkontrol :

- galur mencit
- jenis kelamin mencit
- umur mencit
- berat badan mencit
- cara pemeliharaan
- waktu perlakuan

Variabel perlakuan :

- AOM 12 mg/kg BB
- DSS 2,5%
- sari buah merah 0,1mL/hari
- *aquabidest* 0,1mL/hari

Variabel respon : kadar IFN- γ serum mencit

3.2.2.2 Definisi Operasional Variabel

- Mencit model kanker kolorektal: mencit yang diinjeksi *azoxymethane* (AOM) 12 mg/kgBB secara intraperitoneal dosis tunggal pada hari ke-1 dan diberi *dextran sulfate sodium* (DSS) 2,5% (w/v) pada hari ke-6 sampai hari ke-10, hari ke-27 sampai hari ke-31, dan hari ke-48 sampai hari ke-52.
- Galur mencit: Balb/C.
- Jenis kelamin mencit: jantan.
- Umur mencit: 8 minggu.
- Cara pemeliharaan: diberi makan pelet dan minum *aquadest ad libitum*.
- Waktu perlakuan: sari buah merah atau *aquabidest* 0,1 mL/hari diberikan setiap hari pada pukul 13.00 WIB.
- AOM 12 mg/kgBB (0,4 mL) dosis tunggal disuntikkan secara intraperitoneal pada hari ke-1.
- DSS 2,5% (w/v) diberikan melalui air minum (*ad libitum*) pada hari ke-6 sampai hari ke-10, hari ke-27 sampai hari ke-31, dan hari ke-48 sampai hari ke-52.
- Sari buah merah atau *aquabidest* 0,1 ml/hari diberikan per oral menggunakan sonde lambung pada hari ke-11 sampai hari ke-26, hari ke-32 sampai hari ke-47, dan hari ke-53 sampai hari ke-68.
- Pengambilan serum: pada hari ke-69 semua mencit diambil darahnya melalui vena retroorbital, kemudian disentrifuga dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatan (serum) diambil dan disimpan pada suhu -20°C .
- Kadar IFN- γ dalam serum mencit diukur dengan metode ELISA.

3.2.3 Perhitungan Besar Sampel

Besarnya sampel ditentukan berdasarkan rumus di bawah ini yang mana untuk menentukan nilai F hanya dapat dihitung apabila *the error degree of freedom* besarnya 15 atau lebih (Kemas Ali Hanafiah, 2000)

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

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

$$3 (r - 1) \geq 15$$

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

$$r \geq 6$$

Jadi bila $n=6$ telah memenuhi syarat di atas.

$t = \text{treatment/perlakuan}$

$r = \text{replacement/perulangan}$

mempertimbangkan *drop out* (DO) 20%, dilakukan penambahan 1 ekor mencit pada masing-masing kelompok sehingga jumlah mencit yang digunakan sebanyak 28 ekor ($n=7$).

3.2.4 Prosedur Kerja

3.2.4.1 Pengumpulan Bahan

- Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) kultivar merah panjang, segar, dan berwarna merah terang, berasal dari Wamena, Papua, Irian Jaya.
- *Azoxymethane (AOM) Sigma* – A2853 – 100 mg
- *Dextran sulfate sodium (DSS) AMRESCO* – 0198 – 50 g

3.2.4.2 Persiapan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah buah merah. Pembuatan sari buah merah ini dilakukan di Laboratorium Farmakognostik Sekolah Farmasi, ITB, Bandung, dengan prosedur sebagai berikut :

1. Buah merah dipotong-potong dan dicuci sampai bersih
2. Selanjutnya buah dikukus dan dipisahkan dari *mesokarpnya*, kemudian diperas hingga diperoleh pasta berwarna merah.
3. Pasta dipanaskan dengan suhu tidak melebihi 40°C , hingga diperoleh bagian minyak.

4. Bagian minyak dipisahkan dari bagian airnya, kemudian dibiarkan selama 24 jam sampai terdapat sisa pasta yang mengendap.
5. Selanjutnya bagian minyak dipisahkan dari pasta yang mengendap, lalu dipanaskan kembali pada suhu di bawah 40⁰C.
6. Sari buah merah disimpan di lemari pendingin pada suhu 4⁰C. Sebelum dimulai perlakuan, sari buah merah terlebih dahulu dibiarkan dalam suhu ruangan selama beberapa saat.

3.2.4.3 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang sudah ditindik dan diadaptasikan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak menggunakan undian. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit yaitu kelompok kontrol negatif (*aquabidest* 0,4 ml intraperitoneal, *aquadest ad libitum*, *aquabidest* 0,1 ml per oral), kelompok kontrol positif buah merah (*aquabidest* 0,4 ml intraperitoneal, *aquadest ad libitum*, sari buah merah 0,1 ml per oral), kelompok kontrol positif AOM dan DSS (AOM 12 mg/kgBB intraperitoneal, DSS 2,5% (w/v) *ad libitum*, dan *aquabidest* 0,1 ml per oral), dan kelompok perlakuan (AOM 12 mg/kgBB intraperitoneal, DSS 2,5% (w/v) *ad libitum*, dan sari buah merah 0,1 ml per oral).

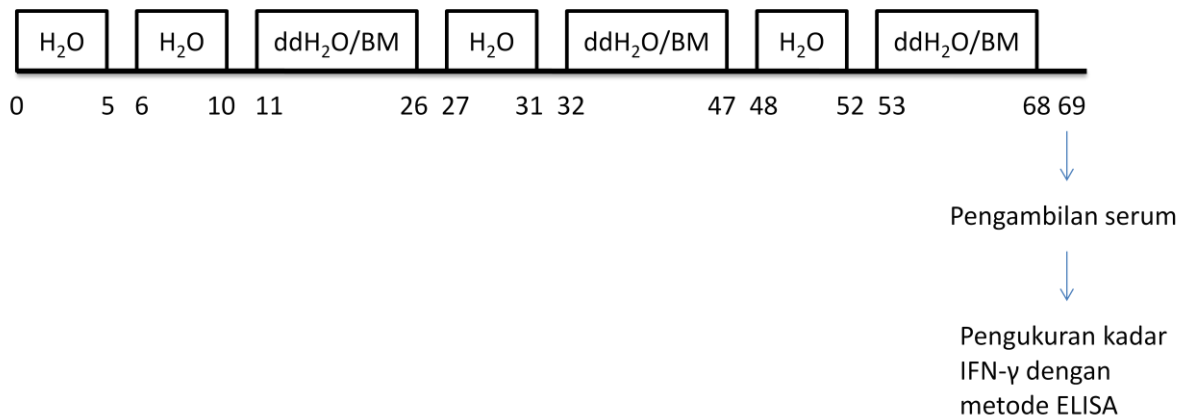
3.2.4.4 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Setelah kering alat-alat tadi dibungkus dengan *aluminium foil*, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, dengan tekanan 121 psi selama 20 menit.

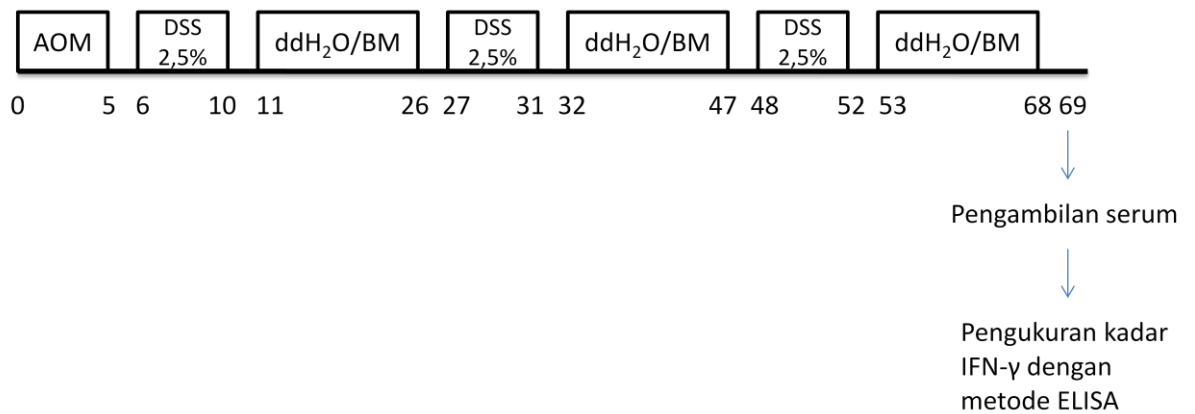
3.2.4.5 Prosedur Penelitian

Kelompok mencit mendapatkan perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif: masing-masing mencit disuntik 0,4 ml *aquabidest* dosis tunggal secara intraperitoneal. Pada hari ke-6 diberikan *aquadest ad libitum* selama 5 hari, dilanjutkan dengan pemberian *aquabidest* per oral 0,1 ml/hari menggunakan sonde lambung selama 16 hari. Siklus pemberian *aquadest ad libitum* dan *aquabidest* per oral diulang 2 kali.
2. Kelompok kontrol positif buah merah: masing-masing mencit disuntik 0,4 ml *aquabidest* dosis tunggal secara intraperitoneal. Pada hari ke-6 diberikan *aquadest ad libitum* selama 5 hari, dilanjutkan dengan pemberian sari buah merah per oral 0,1 ml/hari menggunakan sonde lambung selama 16 hari. Siklus pemberian *aquadest ad libitum* dan sari buah merah per oral diulang 2 kali.
3. Untuk kelompok kontrol positif AOM dan DSS, masing-masing mencit disuntikkan AOM 12 mg/kgBB (0,4 ml) dosis tunggal secara intraperitoneal, pada hari ke-6 diberikan DSS 2,5% (w/v) *ad libitum* selama 5 hari, dilanjutkan dengan pemberian *aquabidest* per oral 0,1 ml/hari menggunakan sonde lambung selama 16 hari. Siklus pemberian DSS dan *aquabidest* diulang sebanyak 2 kali.
4. Untuk kelompok perlakuan, masing-masing mencit disuntikkan AOM 12 mg/kgBB (0,4 ml) dosis tunggal secara intraperitoneal, pada hari ke-6 diberikan DSS 2,5% (w/v) *ad libitum* selama 5 hari, dilanjutkan dengan pemberian sari buah merah per oral 0,1 ml/hari menggunakan sonde lambung selama 16 hari. Siklus pemberian DSS dan sari buah merah diulang sebanyak 2 kali.
5. Pada hari ke-69 semua mencit diambil darahnya melalui vena retroorbitalis, lalu disentrifuga hingga didapatkan serumnya. Kadar IFN- γ serum selanjutnya diukur menggunakan metode ELISA.



Gambar 3.1 Bagan pemberian *aquadest* dan buah merah pada kelompok kontrol negatif (KN) dan kontrol positif (KP).



Gambar 3.2 Bagan pemberian AOM, DSS, buah merah dan *aquadest* pada kelompok kontrol positif AOM dan DSS (AOM+DSS) dan kelompok perlakuan.

Prosedur ELISA IFN- γ

1. *Reagents*, sampel dan larutan standar disiapkan.
2. Sampel berupa serum mencit.
3. Larutan standar dibuat dengan susunan sebagai berikut :
 - Tabung 1 (3000 pg/ml) : 200 μ l *mouse IFN- γ standard*
 - Tabung 2 (600 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah
100 μ l *mouse IFN- γ standard*
 - Tabung 3 (150 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah

- Tabung 4 (75 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah
100 μ l larutan Tabung 2
 - Tabung 5 (37,5 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah
100 μ l larutan Tabung 3
 - Tabung 6 (9,4 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah
100 μ l larutan Tabung 5
 - Tabung 7 : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12* ditambah
100 μ l larutan Tabung 5
 - Tabung 8 (0 pg/ml) : 200 μ l *calibrator diluent RD6 – 12*
4. 50 μ l *Assay diluent RDI – 21* dimasukkan ke dalam tiap sumur.
 5. Kemudian ditambahkan 50 μ l larutan standar dan sampel ke dalam setiap sumur, inkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang.
 6. Larutan dibuang kemudian dicuci sebanyak 5 kali dengan menggunakan *wash buffer* yang telah diencerkan dalam 600 ml *aquadest* steril.
 7. 100 μ l *mouse IFN- γ conjugate* dimasukkan ke dalam tiap sumur, inkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang.
 8. Larutan dibuang kemudian dicuci sebanyak 5 kali dengan menggunakan *wash buffer* yang telah diencerkan dalam 600 ml *aquadest* steril.
 9. 100 μ l *substrate solution* (campuran colour reagent A dan colour reagent B dengan perbandingan 1:1) dimasukkan ke dalam tiap sumur, inkubasi selama 30 jam dalam suhu ruang.
 10. Kemudian tambahkan 100 μ l *stop solution* ke dalam setiap sumur.

Setelah dilakukan prosedur ELISA, digunakan *microplate reader* yang telah diatur pada panjang gelombang 450 nm untuk membaca kadar IFN- γ pada tiap sumur.

3.2.5 Metode Analisis

Parameter yang diukur adalah kadar IFN- γ dalam tiap sumur yang diamati dan dianalisis kadarnya dengan cara dibandingkan dengan kurva standar yang telah diketahui konsentrasinya. Analisis dilakukan dengan menggunakan Analisis Varian (ANAVA) satu arah dengan $\alpha = 0,05$, dilanjutkan dengan *Post Hoc Tukey-HSD* dengan tingkat kepercayaan 95%, tingkat kemaknaan berdasarkan nilai $p \leq 0,05$

3.2.5.1 Hipotesis Statistik

- $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$
Tidak ada perbedaan rerata kadar IFN- γ serum antar kelompok perlakuan.
- $H_A = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$
Sedikitnya ada perbedaan rerata kadar IFN- γ serum pada sepasang kelompok perlakuan.

3.2.5.2 Kriteria Uji

Diterima atau tidaknya H_0/H_A ditentukan berdasarkan kriteria uji sebagai berikut:

Jika $F_{hitung} \leq F_{tabel}$ dan $p > 0,05$ maka H_0 gagal ditolak.

Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ dan $p \leq 0,05$ maka H_0 ditolak, terima hal lainnya.

3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Penelitian yang menggunakan hewan coba ini telah memperoleh persetujuan dari komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha-Rumah Sakit Immanuel dengan memperhatikan prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.