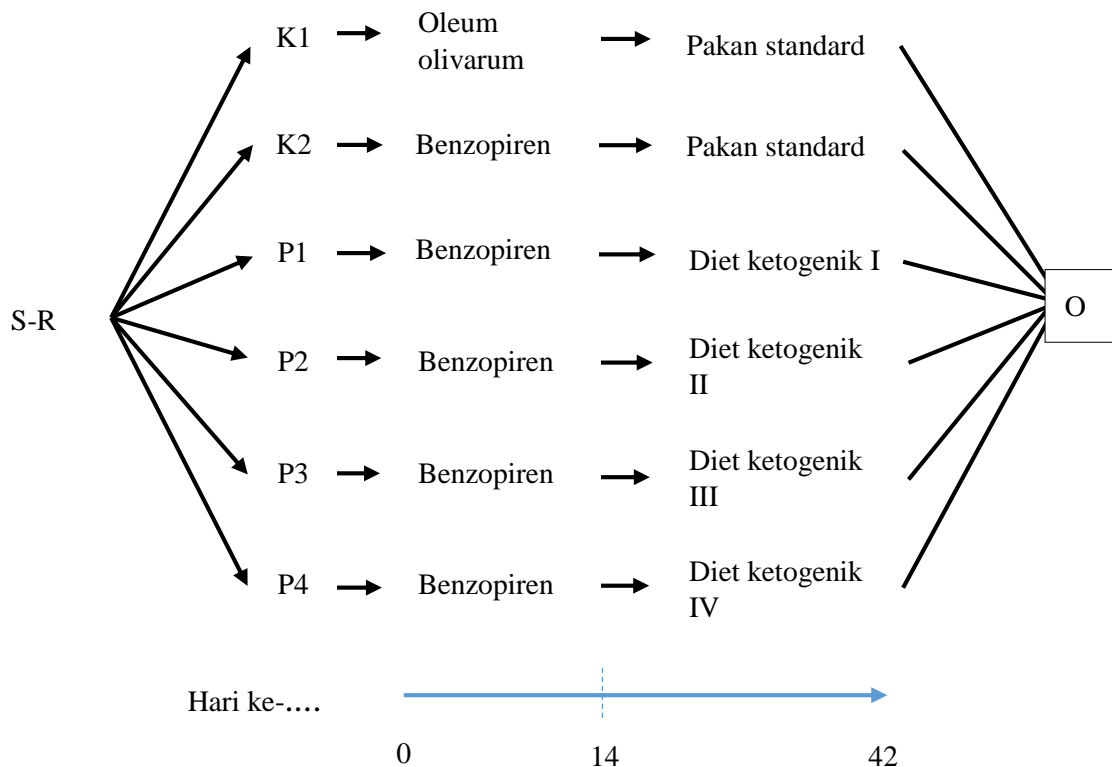


**BAB 4****MATERI DAN METODE PENELITIAN****4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Nomor 2.KE142.07.2019. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test only-control group*, yang menggunakan mencit betina sebagai subyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian diet ketogenik pada mencit yang diinjeksi larutan benzopiren secara subkutan pada daerah payudara kanan. Parameter pengukuran variabel berupa kadar TNF- $\alpha$ . Berikut adalah skema rancangan penelitian :



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

S-R : sample random

K1 : kelompok kontrol negatif, mencit diinduksi dengan oleum olivarum secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada payudara kanan dan diberikan pakan standard selama 28 hari

- K2 : Kelompok kontrol positif, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan pakan standard selama 28 hari
- P1 : Kelompok diet ketogenik 1, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 60% protein, 0% karbohidrat, 30% lemak, 10% serat
- P2 : kelompok diet ketogenik 2, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 45% protein, 0% karbohidrat, 45% lemak, 10% serat
- P3 : kelompok diet ketogenik 3, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 30% protein, 0% karbohidrat, 60% lemak, 10% serat
- P4 : kelompok diet ketogenik 4, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 15% protein, 0% karbohidrat, 75% lemak, 10% serat
- O : pengukuran kadar TNF- $\alpha$  serum

## 4.2 Unit Replikasi, Randomisasi, dan Besar Replikasi

### 4.2.1 Unit Replikasi

Unit replikasi yang digunakan pada eksperimen ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina yang diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan pada daerah payudara kanan dan memiliki kriteria inklusi sebagai berikut:

- 1) jenis kelamin betina
- 2) usia 2-3 bulan
- 3) berat badan 15-25 gram
- 4) sehat dan aktif selama pemberian paparan benzopiren
- 5) belum pernah dikawinkan sama sekali/tidak bunting

Kriteria eksklusi meliputi :

- 1) Mencit sakit selama penelitian
- 2) Mencit mati selama penelitian

#### 4.2.2 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah secara acak (*random sampling*).

#### 4.2.3 Besar Replikasi

Untuk menentukan besar sampel (replikasi) yang dibutuhkan digunakan rumus Higgins-Kleinbaum sebagai berikut:

$$r \geq \frac{(1)}{1-f} \times \frac{2\sigma^2(Z_{1-\alpha}+Z_{1-\beta})^2}{d^2}$$

r = jumlah replikasi

$Z_{1-\alpha}$  = 1,96 (bila  $\alpha=0,05$ )

$Z_{1-\beta}$  = 0,842 (bila  $\beta=0,20$ )

$\sigma$  = simpangan baku kelompok kontrol (2,582)

d = selisih nilai rerata kelompok protein p53 yang mengalami mutasi antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (14,75-6,67) (Irmawati, 2018)

f = proporsi kegagalan (failed) 50%

sebelum dikoreksi dengan rumus  $\frac{(1)}{1-f}$  diperoleh replikasi 1,6 (dibulatkan 2)

setelah dikoreksi dengan  $\frac{(1)}{1-0,5} \times 2 \geq 4$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus Higgins-Kleinbaum diperoleh besar replikasi minimal adalah 4 untuk tiap kelompok. Dalam penelitian ini digunakan 6 replikasi untuk tiap kelompok. Terdapat enam kelompok perlakuan sehingga total sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 36 ekor mencit dengan rincian seperti yang telah disebutkan pada bagian 4.1.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah rasio pemberian diet ketogenik.

#### 4.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar TNF- $\alpha$  mencit.

#### 4.3.3 Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah dosis benzopiren, lamanya pemberian benzopiren, dan lamanya pemberian diet.

#### 4.3.4 Variabel perancu

Variabel perancu dalam penelitian ini adalah bias cahaya pada pembacaan ELISA *reader*.

### 4.4 Definisi Operasional Variabel

1. Diet ketogenik adalah diet dengan rasio predominasi lemak dan sangat rendah karbohidrat yang menyebabkan terbentuknya badan keton. Mencit diberikan paparan diet ketogenik dengan rasio yang telah dijelaskan pada bagian 4.1 setelah diinduksi dengan larutan benzopiren selama 14 hari, pemberian diet dilakukan setiap hari selama 28 hari.
2. Dosis benzopiren adalah jumlah benzopiren yang telah dilarutkan dalam oleum olivarum yang diinduksikan pada payudara kanan mencit, yaitu 100mg benzopiren/100 mL oleum olivarum per 20gBB, setiap hari, selama 14 hari. Dosis benzopiren yang diinduksi secara subkutan ke payudara mencit sebanyak 0,3mg/20gBB/hari.

3. Kadar TNF- $\alpha$  diukur dengan metode *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA). Pengukuran dilakukan setelah pemberian perlakuan selama 42 hari untuk kemudian dibandingkan hasilnya.

## 4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba mencit (*Mus musculus*) (betina, sehat, usia 2-3 bulan, berat badan 15-25 g, diberi pakan standard dan diet ketogenik), benzopiren, oleum olivarum, serum dari mencit, larutan standard (1280ng/L), pre-coated ELISA plate, pengencer standard, streptavidin-HRP, larutan penghenti, larutan substrat A, larutan substrat B, *wash buffer concentrate* (30x), antibodi ADP anti-mouse terkonjugasi biotin, dan air terdistilasi.

### 4.5.2 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini beserta justifikasi penggunaan instrumen adalah kandang mencit (ukuran 30 x 45 x 20 cm, terbuat dari plastik ditutup kawat kasa, dilengkapi tempat makan dan botol minum, setiap kandang diisi dengan 6 ekor mencit atau 1 kelompok), inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , kertas penyerap, *precision pipettes and disposable pipette tips*, tabung bersih, *microplate reader* dengan  $450 \pm 10\text{nm wavelength filter}$ , *sput* dan *syringe* untuk injeksi larutan benzopiren ke tubuh mencit.

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dalam kurun waktu 5 bulan (bulan Juli 2019 hingga November 2019).

#### 4.7 Prosedur Operasional Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan bahan dan instrumen penelitian

1. Pembuatan pakan berupa pakan standard dan diet ketogenik dengan rasio seperti berikut:

Pakan standard : 20% protein, 62% karbohidrat, 12% lemak

Diet ketogenik 1 : 60% protein, 0% karbohidrat, 30% lemak, 10% serat

Diet ketogenik 2 : 45% protein, 0% karbohidrat, 45% lemak, 10% serat

Diet ketogenik 3 : 30% protein, 0% karbohidrat, 60% lemak, 10% serat

Diet ketogenik 4 : 15% protein, 0% karbohidrat, 75% lemak, 10% serat

2. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dan diberikan pakan standard serta minum
3. Larutan benzopiren dibuat dengan melarutkan benzopiren dalam oleum olivarum dengan perbandingan 100mg benzopiren untuk 100mL oleum olivarum.

##### 4.7.2 Pembagian kelompok menjadi kelompok kontrol dan perlakuan

Setelah mencit diaklimatisasi selama 7 hari, dilakukan randomisasi dan pembagian mencit menjadi 6 kelompok dengan rincian, 2 kelompok kontrol (kontrol negatif (K1) dan positif (K2)) dan 4 kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4) dengan pembagian sebagai berikut:

- K1 : kelompok kontrol negatif, mencit diinduksi dengan oleum olivarum secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada payudara kanan dan diberikan pakan standard selama 28 hari
- K2 : Kelompok kontrol positif, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan pakan standard selama 28 hari
- P1 : Kelompok diet ketogenik 1, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 60% protein, 0% karbohidrat, 30% lemak, 10% serat
- P2 : kelompok diet ketogenik 2, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 45% protein, 0% karbohidrat, 45% lemak, 10% serat
- P3 : kelompok diet ketogenik 3, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 30% protein, 0% karbohidrat, 60% lemak, 10% serat
- P4 : kelompok diet ketogenik 4, mencit diinduksi dengan larutan benzopiren secara subkutan sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari pada daerah payudara kanan dan diberikan diet ketogenik pada hari ke-15 dengan rasio 15% protein, 0% karbohidrat, 75% lemak, 10% serat
- Penandaan kelompok dilakukan dengan pemberian warna yang berbeda pada bagian-bagian tubuh mencit.

#### 4.7.3 Pemberian injeksi benzopiren

1. Pada 14 hari berikutnya (hari ke-8 sampai ke-21), mencit kelompok K1 diinjeksi dengan oleum olivarum sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari secara subkutan pada payudara kanan. Sedangkan mencit kelompok K2 hingga K6 diinjeksi dengan larutan benzopiren sebanyak 0,3mg/20gBB/hari selama 14 hari secara subkutan pada payudara kanan.
2. Semua kelompok diberikan pakan standard.

#### 4.7.4 Pemberian diet

Pada hari ke-22 sampai dengan hari ke-59 dilakukan pemberian diet yang berbeda, yaitu pakan standard untuk kelompok kontrol (K1 dan K2) dan diet ketogenik untuk kelompok P1 hingga P4 dengan rasio sebagai berikut:

P1 = rasio diet ketogenik 1, 60% protein, 0% karbohidrat, 30% lemak, 10% serat

P2 = rasio diet ketogenik 2, 45% protein, 0% karbohidrat, 45% lemak, 10% serat

P3 = rasio diet ketogenik 3, 30% protein, 0% karbohidrat, 60% lemak, 10% serat

P4 = rasio diet ketogenik 4, 15% protein, 0% karbohidrat, 75% lemak, 10% serat

#### 4.7.5 Pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$

1. Pada hari ke-60 mencit dikorbankan.
2. Dilakukan pengambilan serum mencit dan pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  serum dengan menggunakan metode ELISA.

##### a. Prinsip assay :

Alat ini adalah ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). ADP ditambahkan ke sumur yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal ADP. Setelah inkubasi, antibodi ADP *anti-mouse* terkonjugasi biotin ditambahkan dan akan berikatan dengan ADP mencit. Setelah inkubasi, antibodi ADP *anti-mouse* terkonjugasi biotin



yang tidak terikat akan hanyut selama tahap pencucian. Streptavidin-HRP ditambahkan dan akan mengikat antibodi ADP *anti-mouse* yang terkonjugasi biotin. Setelah inkubasi, Streptavidin-HRP yang tidak terikat akan hanyut selama tahap pencucian. Larutan substrat kemudian ditambahkan dan warna berubah secara proporsional dengan jumlah ADP mencit. Ditambahkan larutan penghenti dan absorbansi diukur pada 450 nm.

b. Prosedur assay :

1. Serum dibiarkan membeku selama 10-20 menit pada suhu ruang.
2. Serum disentrifus dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 20 menit.
3. Semua reagen, larutan standard dan sampel yang telah dibuat pada suhu kamar tadi disiapkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
4. Jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian ditentukan terlebih dahulu. Strip yang akan digunakan, dimasukkan ke bingkai. Strip yang tidak digunakan disimpan pada suhu 2-8°C.
5. 50µl larutan standard ditambahkan ke sumur standard.
6. 40µl sampel ditambahkan ke sumur sampel.
7. 10µl antibodi anti-ADP ditambahkan ke sumur sampel.
8. 50µl streptavidin-HRP ditambahkan ke sumur sampel dan sumur standard, lalu dicampur dengan baik.
9. Plate ditutup dengan sealer, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
10. Sealer dilepas dan plate dicuci 5 kali dengan buffer pencuci. Sumur direndam dengan minimal 0,35 ml buffer pencuci selama 30 detik sampai 1 menit setiap kali pencucian. Untuk pencucian

otomatis, semua sumur diaspirasi dan dicuci 5 kali dengan buffer pencuci. Kemudian plate dikeringkan pada tissue atau kertas penyerap lainnya.

11. Larutan substrat A sebanyak 50 $\mu$ l ditambahkan ke setiap lubang, lalu ditambahkan 50 $\mu$ l larutan substrat B ke masing-masing lubang. Plate yang ditutup dengan sealer baru diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C dalam gelap.
12. 50 $\mu$ l larutan penghenti ditambahkan ke masing-masing sumur, warna biru akan berubah menjadi kuning.
13. *Optical density* (OD) dari masing-masing sumur ditentukan dengan menggunakan *microplate reader* yang telah diatur dengan panjang gelombang 450nm dalam waktu 30 menit setelah menambahkan larutan penghenti.

#### 4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Urutan analisis data yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas

Untuk menguji variabel penelitian yang diperiksa berdistribusi normal, dengan menggunakan *Shapiro-Wilk test*.

2. Uji homogenitas

Untuk meyakinkan bahwa data antar kelompok memiliki matriks kovarian yang homogen, dengan menggunakan *Levene test*.

3. Uji one way ANOVA

Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok penelitian dengan data yang berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji LSD untuk melihat perlakuan yang memberikan efek berbeda.

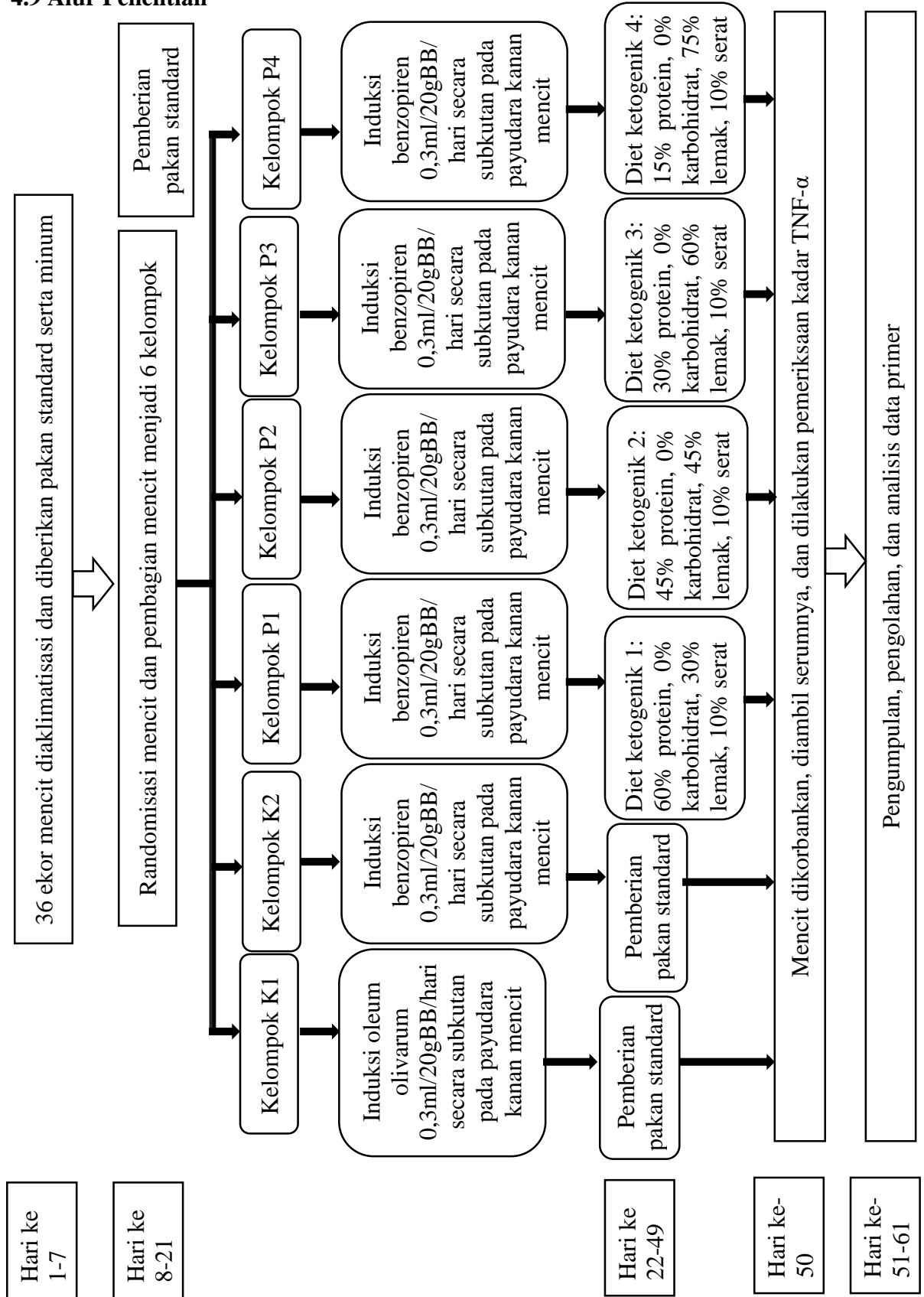
4. Uji Brown-Forsythe :

Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok penelitian dengan data yang berdistribusi normal namun tidak homogen, kemudia dilanjutkan dengan uji Games-Howell.

5. Uji Kruskal Wallis:

Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok penelitian dengan data yang tidak berdistribusi normal, dilanjutkan dengan *Mann-Whitney test*.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian