

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis eksperimental dengan rancangan penelitian *pre test and post test control group design* uji memori spasial, kadar malondialdehid, jumlah sel pyramidal area CA1, CA2-CA3 yang mengalami kerusakan pada mencit model demensia.

B. Subjek dan Lokasi Penelitian

Subjek penelitian ini adalah mencit jantan albino galur Swiss Webster dengan berat badan 25- 35 g dan berumur kurang lebih 6-8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Universitas Setia Budi, Surakarta.

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dan Laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

Populasi adalah jumlah keseluruhan dari satuan-satuan atau individu-individu yang karakteristiknya hendak diteliti (Kuntjojo, 2009). Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirsak yang diperoleh dari PT. Borobudur, Semarang, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi sebagai sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun sirsak (*Anona muricata* L.) yang diperoleh dari PT. Borobudur, Semarang, Jawa Tengah dengan nomer batch 030PQ01.5.

D. Variabel Penelitian

1. Klasifikasi variabel penelitian

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel , yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak daun sirsak

Variabel tergantung adalah variabel dari titik persoalan yang merupakan kriteria penelitian, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah memori spasial pada uji *Morris Water Maze*, perhitungan kadar Malondialdehid (MDA), pengukuran jumlah sel piramidal hipokampus area CA1, CA2-CA3, serta gambaran histopatologi hipokampus.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, selain variabel bebas, yaitu kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium, kondisi fisik dari hewan uji, yang meliputi : jenis mencit, jenis kelamin mencit, berat badan mencit, umur mencit, jenis pakan mencit, dan jumlah pakan yang diberikan.

2. Definisi operasional variabel penelitian

Pertama, ekstrak etanol daun sirsak (EEDS) adalah ekstrak daun sirsak yang diperoleh dari PT. Borobudur Semarang Jawa Tengah dengan nomer batch 030PQ01.5 dengan variasi dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB.

Kedua, mencit model demensia adalah mencit jantan galur Swiss yang dibuat *demensia* setelah diinduksi plumbum asetat.

Ketiga, memori spasial adalah memori mencit dalam menemukan *platform* pada uji *morris water maze* yang dinilai berdasarkan waktu latensi.

Keempat, waktu latensi adalah waktu yang digunakan mencit mulai dari mencit dimasukkan ke kolam sampai mencapai *platform* dalam satuan detik.

Kelima, *acquisition trial* adalah waktu ketika mencit dilepaskan ke dalam kolam sampai mencapai *platform*.

Keenam, *probe trial* adalah waktu yang dibutuhkan mencit berputar-putar pada area tempat *platform* yang sudah dipindahkan sebelumnya.

Ketujuh, uji sensori-motoris adalah waktu yang dibutuhkan mencit pada area *platform*, yang sebelumnya sudah diganti dengan penanda warna mencolok pada *platform*.

Kedelapan, perhitungan kadar MDA adalah kadar yang diperoleh dengan pengukuran kadar MDA cerebrum kiri otak mencit dengan metode TBARs menggunakan spektrofotometer dan hasilnya dinyatakan dalam satuan mmol/ ml.

Kesembilan, gambaran hispatologi hipokampus adalah pengamatan yang diperoleh dari perhitungan jumlah sel piramidal area CA1, dan CA2-CA3 dari satu irisan hipokampus kanan yang mengalami kerusakan

Kesepuluh, dosis efektif adalah dosis atau konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang menghasilkan respon biologis.

Kesebelas, perhitungan waktu latensi adalah waktu selisih antara waktu pra perlakuan (T1) dengan waktu paska perlakuan (T2)

Keduabelas, persentase daya peningkatan waktu latensi adalah jumlah persentase waktu pra perlakuan (T1) dikurangi waktu paska perlakuan (T2) dibagi waktu pra perlakuan (T1) dikalikan 100 persen.

Ketigabelas, persentase daya penurunan waktu latensi adalah jumlah persentase waktu paska perlakuan (T2) dikurangi waktu pra perlakuan (T2) dibagi waktu pra perlakuan (T1) dikalikan 100 persen.

E. Bahan, Alat dan Hewan Percobaan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirsak (EEDS) dengan variasi dosis ekstrak etanol daun sirsak adalah 100, 200, dan 400 mg/KgBB. Plumbum asetat dari Merck untuk penginduksi *demensia*, NaCl 0,9% (Otsuka) sebagai pelarut, Plumbum asetat, CMC-Na 1% sebagai pelarut ekstrak, kuersetin dari Sigma Aldrich dengan pelarut CMC Na 1% sebagai pembanding, dan bahan untuk uji memori adalah air dan santan.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan pelarut ekstrak etanol daun sirsak adalah alat-alat gelas (buatan Iwaki), plastik, kain flanel, dan timbangan analitik

(buatan Mark). Pada uji memori, alat-alat yang digunakan adalah *Morris water maze* (buatan Hager), *stopwatch* (buatan Casio), kandang mencit, alat-alat gelas, timbangan analitik, alat suntik (One Med), dan jarum oral (One Med). Pada pemeriksaan histopatologi alat yang digunakan adalah perlengkapan bedah, alat-alat gelas, dan *Optilab* untuk pemeriksaan preparat histopatologi.

3. Hewan Percobaan

Hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Swiss yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan \pm 20 gram. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus (Federer, 1963) dalam Anggraini (2008) :

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

Dengan; t = kelompok perlakuan (6 kelompok)

n = jumlah sampel tiap kelompok

Sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah :

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Pada penelitian ini digunakan 30 mencit jantan galur Swiss yang terbagi 6 kelompok perlakuan secara acak (*randomized*), sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit ($n \geq 4$).

4. Pengelompokan Hewan Uji

Percobaan hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Swiss. Sebelum dilakukan penelitian, mencit terlebih dahulu diakliminasi selama 1 minggu disesuaikan dengan kondisi, kemudian ditimbang berat badannya. Dalam penelitian ini digunakan mencit sebanyak 30 ekor dengan kelompok uji, dengan masing-masing kelompok uji terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok I adalah kelompok normal yang tidak diberikan perlakuan, kelompok II adalah kontrol positif yang diberikan secara per oral kuersetin dengan dosis 4,2 mg/KgBB (Kale *et al*, 2018), kelompok III adalah kontrol negatif yang diberikan plumbum asetat secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/KgBB (Owolabi, 2013), kelompok IV adalah kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak dosis 100 mg/KgBB

secara per oral, kelompok V adalah kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak dosis 200 mg/KgBB secara per oral, dan kelompok VI adalah kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak dosis 400 mg/KgBB secara per oral.

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Larutan pembawa yang digunakan sebagai pensuspensi adalah CMC-Na 0,5 %. Larutan CMC Na 0,5 % dibuat dengan menimbang 500 mg CMC-Na, digerus dalam mortir dengan sebagian air panas sedikit demi sedikit sampai larut, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml. Apabila volumenya belum mencapai 100 ml, maka ditambahkan air sampai volumenya tersebut.

Sediaan uji dibuat dengan mensuspensikan ekstrak etanol daun sirsak ke dalam larutan CMC-Na 0,5 %. Dibuat dengan tiga tingkatan dosis, yaitu pada dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB.

2. Pembuatan larutan Plumbum asetat

Larutan dibuat dengan pelarut *aqua bidestilata* . Larutan plumbum asetat diberikan secara intra peritoneal dengan dosis 50 mg/KgBB.

3. Penyiapan larutan pembanding kuersetin

Penggunaan dosis kuersetin yang efektif 300 mg/KgBB mampu menghambat *acetylcholinesterase* pada tikus (Sriraksa,et al, 2011). Untuk mencit setelah dikonversikan mendapatkan dosis kuersetin menjadi 42 mg/ KgBB, kemudian larutan stok ditimbang sebanyak 4,2 mg kuersetin dilarutkan ke dalam 2,5 ml larutan CMC Na 0,5 %.

4. Pengujian Memori Spasial dengan uji *Morris Water Maze*

Morris Water Maze berupa kolom berbentuk drum sirkuler berukuran diameter 1, 8 m dan tinggi 0,5 m. Kolom tersebut diisi dengan air hingga kedalaman 0,2 m. terdapat pula sebuah platform berbentuk sirkuler berwarna putih dengan diameter 13 cm dan tinggi 18 cm ditempatkan 2 cm di bawah permukaan air. Agar platform tidak terlihat, digunakan santan yang ditambahkan ke dalam air. Permukaan drum dibagi menjadi 4 kuadran A, B, C, dan D.

Uji memori spasial dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan untuk membandingkan memori spasial mencit sebelum dan sesudah perlakuan pada tiap kelompok mencit. Semua hewan coba sebelum diberikan perlakuan diuji dahulu dengan *Morris water maze* metode *hidden platform test (escape latency)* selama 8 hari berturut-turut untuk dihitung waktunya mencapai platform. Tiap hari dilakukan 2 kali percobaan pada tiap mencit.

Setiap awal percobaan, ditentukan satu titik awal tempat mencit diletakkan pertama kali di dalam kolam, lalu mencit akan berenang mencari platform dan naik ke dalam platform. Waktu yang dibutuhkan mencit untuk mencapai platform (*escape latency*) dicatat, setelah mencit berhasil sampai platform, maka diberi waktu untuk beristirahat di atas *platform* selama 30 detik, lalu dikeringkan dan dikembalikan ke dalam kandang untuk menghangatkan tubuh sebelum dilakukan percobaan selanjutnya. Setiap kali percobaan harus selesai dalam waktu 90 detik, bila dalam waktu 90 detik mencit gagal mencapai platform, maka mencit dituntun ke arah platform, dan dibiarkan selama 30 detik untuk beristirahat. Setelah itu mencit diletakkan kembali ke kandang untuk persiapan diadakan percobaan berikutnya. Pada percobaan berikutnya, ditentukan lagi satu titik awal secara random tempat mencit diletakkan di dalam kolom pada awal uji ini, lalu mencit akan berenang mencari *platform* dan naik ke atas *platform*. Waktu yang dibutuhkan mencit untuk mencapai platform (*escape latency*) dicatat. Setelah mencit berhasil mencapai *platform*, maka diberi waktu untuk beristirahat di atas *platform* selama 30 detik.

5. Pengujian kadar Malondialdehid (MDA)

Pada hari ke-9, setelah pengujian memori spasial, hewan uji dieutanasia menggunakan gas CO₂. Setelah itu cerebrum diambil, bulbus olfaktorius dan cerebellum dipisahkan. Cerebrum diiris menjadi 2 bagian yaitu cerebrum kiri dan cerebrum kanan. Cerebrum kiri digunakan untuk pengujian status antioksidan dan cerebrum kanan untuk pemeriksaan histopatologi hipokampus. Cerebrum kiri dimasukkan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -70 °C sampai waktu pengujian status antioksidan dilakukan.

Metode yang digunakan untuk pengukuran kadar MDA dalam penelitian adalah metode *Thiobarbituric acid reactive substance* (TBARs). Sebanyak 0,1 g

cerebrum kiri di homogenisasi menggunakan 0.9 ml larutan KCl 1.15% pada alat *Teflon Potter-Elvehjem homogenizer* kemudian 0.2 ml dari otak yang telah di homogenkan ditambahkan dengan 0.2 ml *Sodium dedocyl sulfate* 8.1%, 1.5 ml larutan asam asetat 20% sampai pH 3,5 dengan bantuan NaOH, dan 1.5 ml larutan air 0.8% dari TBA. Campuran tersebut di tambahkan dengan air 4.0 ml, dipanaskan pada suhu 95 °C selama 60 menit kemudian didinginkan dengan air. Setelah dingin ditambahkan 1.0 ml air dan 5.0 ml campuran n-butanol: *pyridine* (15:1, v/v), dicampur kuat-kuat. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, lapisan organik diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer visible. TEP (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*) digunakan sebagai larutan standar (Ohkawa *et al.*, 1979). Selanjutnya dari data absorbansi larutan sampel dan larutan standar *tetraethoxypropane* (TEP) dihitung kadar MDA.

6. Perhitungan Jumlah Sel Piramidal CA1 dan CA2-CA3

Pada hari ke-9, setelah pengujian memori spasial, hewan uji dieutanasia menggunakan gas CO₂. Setelah itu cerebrum diambil, bulbus olfaktorius dan cerebellum dipisahkan. Cerebrum diiris menjadi 2 bagian yaitu cerebrum kiri dan cerebrum kanan. Cerebrum kiri digunakan untuk pengujian status antioksidan dan cerebrum kanan untuk pemeriksaan histopatologi hipokampus. Cerebrum kiri dimasukkan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -70 °C sampai waktu pengujian. Otak mencit kemudian dibuat preparat histologis dengan potongan koronal dan dilakukan pengecatan HE. Setiap jaringan dibuat 2 preparat dengan tebal irisan 2µm. Dari setiap preparat dilihat seluruh daerah hipokampus pada kedua hemisfer otak, kemudian dipilih hipokampus pada kedua hemisfer yang utuh dan dihitung seluruh sel piramidal normal dan rusak pada lapisan sel piramidal hipokampus sebanyak tujuh lapang pandang dengan pembesaran 400x yang diamati menggunakan mikroskop cahaya *Labomed*. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan aplikasi *image J*. Sel piramidal dihitung pada seluruh daerah CA1 dan CA2-CA3. Hasil perhitungan masing-masing kelompok kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji *One Way Anova* dilanjut-kan *Post Hoc Test LSD*

G. Analisis Hasil

1. Analisis data memori spasial

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data waktu latensi pra perlakuan dan paska perlakuan pada tahap uji acquisition trial, probe trial, dan uji sensori-motorik. Data waktu latensi pra perlakuan dan paska perlakuan dari masing-masing uji dinalisis terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*), jika data tidak terdistribusi normal ($p<0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p>0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA). Analisa statistik pada penelitian ini menggunakan ANOVA satu jalan. Uji dilanjutkan dengan *Post Hoc* test untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok perlakuan.

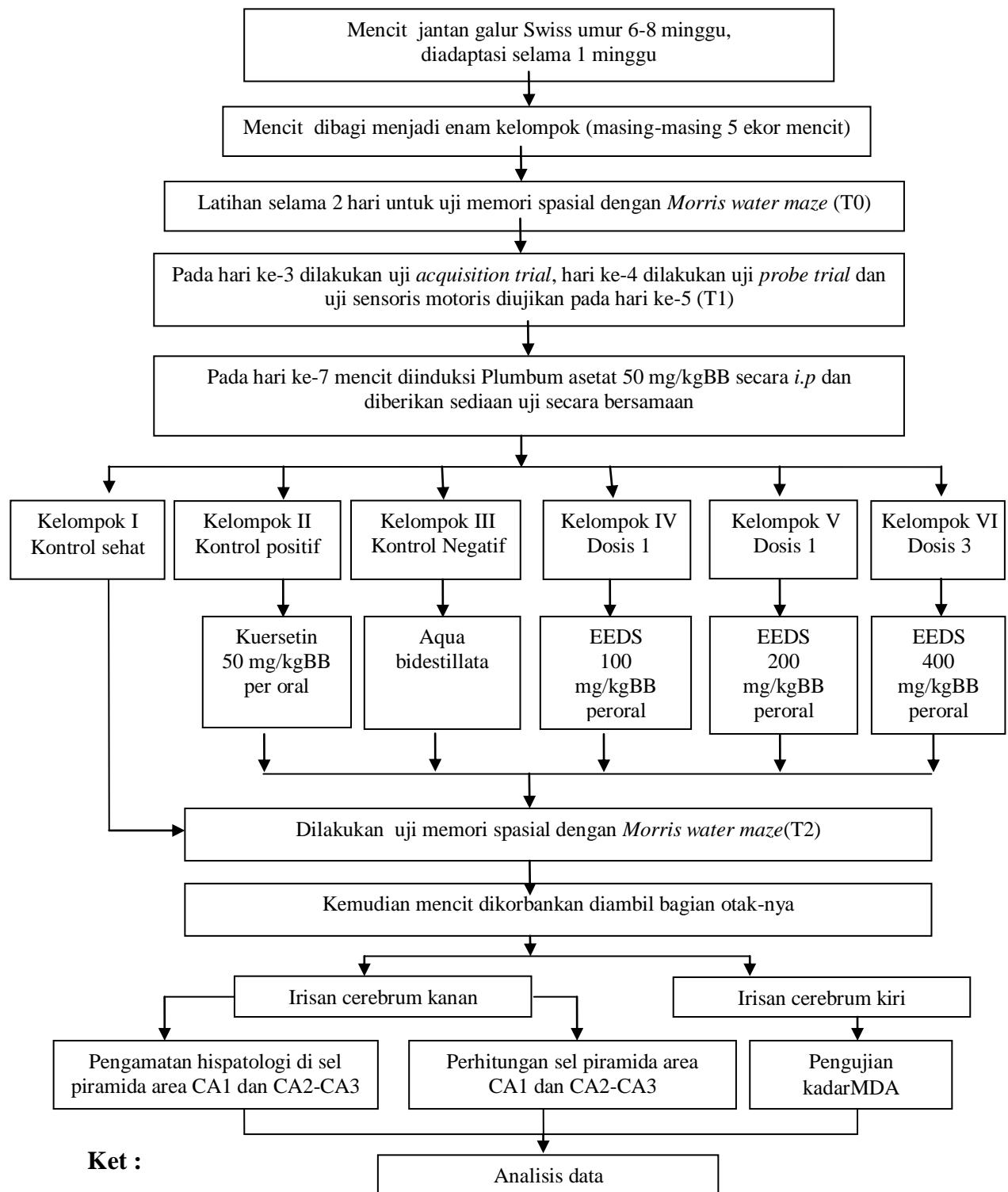
2. Analisis data Kadar Malondialdehid (MDA) dan perhitungan jumlah sel piramidal hipokampus yang mengalami kerusakan di area CA1 dan CA2-CA3

Data perhitungan jumlah sel pyramidal hipokampus yang mengalami kerusakan di area CA1 dan CA2-CA3, dan kadar malondialdehid (MDA) dilakukan dengan menguji data yang diperoleh dengan uji normalitas dan homogenitas dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan program SPSS 18.0. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui data homogen atau tidak. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal ($p>0,05$) dan homogen ($p>0,05$), maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji statistik parametrik dengan uji ANOVA satu jalur dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* (LSD) untuk menunjukkan perbedaan yang signifikan antar pasang kelompok perlakuan.

Jika dengan uji *Saphiro wilk* dan uji *Levene* didapatkan data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila hasil signifikansi $<0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%

untuk membandingkan antara dua sampel dalam satu variabel. Apabila hasil signifikansi $>0,05$, berarti data berbeda tidak bermakna.

H. Alur Penelitian



Ket :

ip = intraperitoneal

EEDS = ekstrak etanol daun sirsak

MDA = Malondialdehid