

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombinasi fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dan kemoterapi doksorubisin. Bahan uji disediakan oleh departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain

1. CMC-Na
2. Aquadest
3. Formalin 10%
4. Normal salin Otsuka
5. Benzo(a)pirena Sain Aldrich
6. Oleum olivarum
7. Bahan kimia untuk pembuatan dan pengamatan histopatologi
8. Pakan mencit

4.1.3 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan

4.2 Alat Penelitian

1. Kandang mencit dan perlengkapannya
2. Timbangan hewan coba
3. Timbangan analitik

4. Sonde lambung
5. *Disposable Syringe*
6. Jarum suntik 23G
7. Seperangkat alat bedah
8. Mortir dan stamper
9. Alat-alat gelas
10. Mikroskop dengan kamera digital
11. Kaca obyek
12. Kaca penutup
13. Tabung Venoject
14. Sentrifuge
15. Pot plastik

4.3 Prosedur Penelitian

4.3.1 Penyiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan 40 ekor mencit jantan dengan keadaan sehat berdasarkan pengamatan visual. Homogenisasi sampel dengan menentukan umur mencit antara 2-2,5 bulan dan berat badan 20-30 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Universitas Airlangga. Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasi selama 1 minggu. Setiap mencit dipelihara terpisah dengan perlakuan yang sama, diet yang sama, dan dipelihara dalam kandang kawat berukuran yang sama yaitu 50 cm x 25 cm x 20 cm dalam ruangan kandang 5 m x 3,5 m.

4.3.2 Induksi Benzo(a)pirena

Dosis benzo(a)pirena yang diperlukan untuk menimbulkan kanker fibrosarkoma pada mencit adalah 0,3% (b/v) dalam *oleum olivarum* dibuat untuk induksi kanker dalam kelompok perlakuan. Larutan benzo(a)pirena dalam *oleum olivarum* diberikan dengan cara

disuntikkan secara subkutan pada bagian tengkuk mencit setiap 2 hari sekali selama 10 hari (Ekowati *et al.*, 2012).

4.3.3 Perhitungan Jumlah Benzo(a)pirena

Dalam penelitian dipakai 40 ekor mencit yang masing-masing mencit dalam tiap kelompok uji diinduksi benzo(a)pirena 0,3% (b/v) sebanyak 0,2 ml secara subkutan di daerah tengkuk sebanyak 5 kali dalam 10 hari.

Perhitungan jumlah benzo(a)pirena yang dibutuhkan adalah:

- Volume *oleum olivarum* yang dibutuhkan seluruhnya adalah:
 $0,2 \text{ ml} \times 5 \text{ (kali pemberian)} \times 40 \text{ ekor} = 40 \text{ ml}$
- Jumlah benzo(a)pirena yang dibutuhkan untuk membuat 40 ml larutan benzo(a)pirena dengan kadar 0,3% (b/v) adalah:
 $40 \text{ ml} \times 0,3 \text{ g}/100 \text{ ml} = 0,12 \text{ gram} = 120 \text{ mg}$

4.3.4 Cara Pembuatan Larutan Benzo(a)pirena 0,3 % (b/v)

Untuk penyuntikan 40 ekor mencit yang akan dibuat kanker:

- a. Ditimbang 120 mg benzo(a)pirena
- b. *Oleum olivarum* yang telah disterilkan dan benzo(a)pirena dipindahkan ke *laminar air flow cabinet*. Benzo(a)pirena dilarutkan dalam 40 ml *oleum olivarum* dengan bantuan pemanasan
- c. Dimasukkan larutan benzo(a)pirena ke dalam wadah tertutup
- d. Larutan benzo(a)pirena dalam wadah tertutup disterilkan dengan autoklaf 115°C selama 30 menit
- e. Bila tidak digunakan, disimpan dalam lemari pendingin.

4.3.5 Penyiapan Bahan Uji

Pemberian tiap dosis dalam bentuk ekstrak kering yang di suspensikan dalam musilago CMC Na 0,5%. Kontrol negatif di beri musilago CMC Na 0,5%.

Pembuatan musilago CMC Na 0,5% :

Di timbang 0,5 gram CMC Na, di taburkan di atas air panas 20xnya, dibiarkan mengembang (\pm 15 menit), digerus sampai terbentuk musilago. Kemudian, dipindahkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi dan ditambah air sampai 100 mL. Lalu, di berikan kepada kelompok kontrol secara oral.

4.3.5.1 Perhitungan Dosis Doksorubisin

Dosis doksorubisin yang digunakan untuk pasien adalah 1,2 mg/kg BB mencit (Wang, *et al.*, 2010) yang diinjeksikan secara intraperitoneal seminggu 2 kali selama 2 minggu. Konsentrasi doksorubisin pada sediaan adalah 2 mg/dl. Volume maksimal injeksi intraperitoneal adalah 1,0 ml/kg BB (Ritschel, 1974).

1. Dosis

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit} &= 1,2 \text{ mg/kg BB} \\ &= 0,024 \text{ } \mu\text{g}/20 \text{ g BB mencit} \end{aligned}$$

2. Pembuatan Larutan Stok

$$\text{Sediaan} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 2 \text{ mg} = 10 \text{ ml} \times C_2$$

$$C_2 = 2/10 = 0,2 \text{ mg} \rightarrow 0,2 \text{ mg}/10\text{mL}$$

3. Perhitungan dosis mencit

Dosis mencit = berat (gram) / 20 gram x dosis konversi

Volume yang disuntikkan = (dosis mencit larutan stok) x Dosis maksimal tiap rute

Misal: Mencit (22 gram) = $22/20 \times 0,024 = 0,0264$ mg

Volume suntik i.p = $(0,0264 \text{ mg} / 0,2) \times 1,0 \text{ mL} = 0,132 \text{ mL}$

4.3.5.2 Perhitungan Dosis Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto

Dosis fraksi diterpen lakton yang digunakan berdasarkan dosis andrografolida. Dosis andrografolida hamster adalah 50 mg/kg BB per oral atau setara dengan 20 g/400 g BB hamster (Manoharan *et al.*, 2012). Konversi dosis dari hamster (400 g) ke mencit (20 g) dengan faktor pengali 0,08. Dosis andrografolida yang digunakan pada mencit adalah 1,6 mg/20 g BB atau 80 mg/kg BB mencit. Dari hasil penetapan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto dengan KLT-Densitometri, diperoleh persentase rata-rata kandungan andrografolida dalam fraksi yaitu $13,45 \% \pm 0,15$ (b/b) (Endarini, 2013). Perhitungan yang dibutuhkan adalah :

- Dosis andrografolida untuk tiap mencit
sekali pemberian (kel. 2) = 80 mg/kg BB mencit
Fraksi kering yang dibutuhkan = $(80 \text{ mg} \times 100 \text{ mg}) / 13,45 \text{ mg}$
= 594, 80 mg/kg BB
- Dosis andrografolida untuk tiap mencit
sekali pemberian (kel. 4) = 80 mg/kg BB mencit
Fraksi kering yang dibutuhkan = $(80 \text{ mg} \times 100 \text{ mg}) / 13,45 \text{ mg}$
= 594, 80 mg/kg BB

Cara pembuatan suspensi sediaan serbuk fraksi diterpen lakton sambiloto adalah sebagai berikut :

- Ditimbang fraksi diterpen lakton sambiloto sesuai dengan yang dihitung
- Ekstrak disuspensikan dalam CMC Na 0,5%, aduk sampai homogen
- Suspensi dari fraksi diterpen lakton sambiloto diberikan pada mencit selama 15 hari secara per oral

4.3.6 Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Dilakukan pengelompokan mencit jantan usia 2-2,5 bulan menjadi 5 kelompok dengan jumlah 10 mencit dalam tiap kelompok. Semua mencit dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang mencit 50 cm x 25 cm x 20 cm dan diletakkan dalam ruangan berukuran 2,5 m x 2,5 m dengan temperatur ruangan $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai jam 6 pagi sampai jam 6 malam). Mencit diadaptasikan pada kondisi penelitian selama satu minggu dengan kondisi yang sama. Perlakuan dimulai setelah mencit diadaptasikan, yang meliputi 5 perlakuan yaitu:

- Kelompok 1 : Mencit normal yang tidak diinduksi larutan benzo(a)pirena dan tidak diberi terapi.
- Kelompok 2 : Mencit diinduksi larutan benzo(a)pirena 0,3 % (b/v) secara subkutan pada tengkuk mencit 2 hari sekali selama 10 hari, lalu proses karsinogenesis selama $2 \pm$ bulan, kemudian diberikan bahan uji

pembawa musilago CMC-Na 0,5% per oral setiap hari selama 15 hari.

Kelompok 3 : Mencit diinduksi larutan benzo(a)pirena 0,3 % (b/v) secara subkutan pada tengkuk mencit 2 hari sekali selama 10 hari, lalu proses karsinogenesis selama $2 \pm$ bulan, kemudian diberikan bahan uji suspensi fraksi diterpen lakton sambiloto yang sebanding dengan andrografolida 594,80 mg/kg BB per oral setiap hari selama 15 hari.

Kelompok 4 : Mencit diinduksi larutan benzo(a)pirena 0,3 % (b/v) secara subkutan pada tengkuk mencit 2 hari sekali selama 10 hari, lalu proses karsinogenesis selama ± 2 bulan, kemudian diberikan injeksi intraperitoneal doxorubisin 1,2 mg/20g BB pada hari pertama perlakuan.

Kelompok 5 : Mencit diinduksi larutan benzo(a)pirena 0,3 % (b/v) secara subkutan pada tengkuk mencit 2 hari sekali selama 10 hari, lalu proses karsinogenesis selama $2 \pm$ bulan, kemudian diberikan dosis kombinasi fraksi diterpen lakton sambiloto 594,80 mg/kg BB andrografolida per oral setiap hari selama 15 hari dan injeksi intraperitoneal doxorubisin dosis 1,2 mg/20g BB pada hari pertama perlakuan.

4.3.7 Pengambilan Darah Hewan Coba

Pada akhir perlakuan, hewan coba mencit dibius dengan eter dan darah diambil secara *intracardial* dengan spuit injeksi sebanyak ± 1 ml. Kemudian Darah dimasukkan ke dalam tabung venoject yang bersih dan kering untuk pemeriksaan serum (SGOT dan SGPT) dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang sudah terpisah diambil dan dimasukkan ke dalam tabung venoject lain yang bersih, kering, serta bertutup rapat untuk pemeriksaan selanjutnya. Jika serum tidak langsung diperiksa maka harus disimpan pada lemari es suhu 2°C - 8°C selama maksimal 4 hari, karena jika lebih dari 4 hari akan mengalami degradasi aktivitas sebesar 10%.

4.3.8 Pengambilan Organ Hati, Ginjal, dan Jantung

Pengambilan organ hati, ginjal, dan jantung dilakukan pada akhir masa perlakuan dan setelah pengambilan darah. Mencit dibius dengan eter namun tidak sampai mati, kemudian diambil darahnya secara intrakardial. Selanjutnya, mencit dikorbankan dengan pemberian eter, lalu diambil organ hati, ginjal, dan jantungnya. Organ tersebut disimpan dalam wadah yang berisi larutan formalin 10% untuk selanjutnya dipreparasi untuk pengamatan histopatologi.

4.3.9 Pemeriksaan Serum Hewan Coba

Pemeriksaan SGOT dan SGPT pada serum hewan coba mencit dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

4.3.9.1 Pemeriksaan SGOT (AST)

Dibuat larutan pereaksi dengan mencampur reagen 1 (Tris Buffer pH 7,8; L-aspartat; dan NaN_3) dengan reagen 2 (α -ketoglutarat; NADH; MDH; dan LDH).

Ke dalam tabung reaksi dipipet 1,0 ml larutan pereaksi dan 100 μl serum. Campur sampai homogen dan diamkan selama 1 menit. Kemudian diamati serapan awal sampel dengan spektrofotometer ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Catat penurunan serapan setiap menit selama 3 menit.

Dihitung perbedaan rata-rata serapan per menit ($\Delta A/\text{menit}$)

Aktivitas enzim SGOT = $\Delta A/\text{menit} \times F$ (Untuk $\lambda = 340 \text{ nm}$; $F = 1746$)

4.3.9.2 Pemeriksaan SGPT (ALT)

Dibuat larutan pereaksi dengan mencampur reagen 1 (Tris Buffer pH 7,8; L-aspartat; dan NaN_3) dengan reagen 2 (α -ketoglutarat; NADH; MDH; dan LDH).

Ke dalam tabung reaksi dipipet 1,0 ml larutan pereaksi dan 100 μl serum. Campur sampai homogen dan diamkan selama 1 menit. Kemudian diamati serapan awal sampel dengan spektrofotometer ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Catat penurunan serapan setiap menit selama 3 menit.

Dihitung perbedaan rata-rata serapan per menit ($\Delta A/\text{menit}$)

Aktivitas enzim SGPT = $\Delta A/\text{menit} \times F$ (Untuk $\lambda = 340 \text{ nm}$; $F = 1746$)

4.3.9.3 Pembuatan Preparat Histopatologi Hati, Ginjal, dan Jantung

Pembuatan preparat histopatologi hati, ginjal, dan jantung, dilakukan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, menggunakan metode parafin dengan beberapa tahapan, yaitu :

1. Fiksasi dan pencucian

Organ hati, ginjal, dan jantung dimasukkan wadah yang sudah diisi larutan formalin 10% dan dibiarkan 24 jam. Semua organ harus tenggelam dalam larutan formalin 10%. Kemudian organ dicuci dengan air mengalir selama 30 menit.

2. Dehidrasi dan *clearing*

Organ hati, ginjal, dan jantung yang telah dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, dimasukkan ke dalam reagen dengan urutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I, II, dan xylol III masing-masing selama 30 menit.

3. Infiltrasi

Setelah dilakukan dehidrasi dan *clearing*, organ hati, ginjal, dan jantung dimasukkan dalam parafin I yang mencair selama 1 jam lalu dimasukkan ke dalam parafin II, kemudian parafin III, masing-masing selama 1 jam, selanjutnya dioven dengan suhu 50-60 °C selama 1 jam.

4. Pembuatan blok parafin

Disiapkan beberapa cetakan besi yang sebelumnya telah diolesi gliserin dengan maksud untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan besi tersebut, kemudian cetakan besi tersebut diisi dengan parafin cair panas. Organ selanjutnya

dimasukkan dengan menggunakan pinset ke dalam cetakan besi dengan posisi diatur, ditunggu sampai parafin tersebut membeku atau mengeras.

5. Pengirisan dengan mikrotom

Blok parafin yang sudah mengeras disiapkan. Mikrotom dibersihkan, digosok dengan kertas tisu pada relnya hingga bersih, kemudian rel tersebut diberi minyak pelicin. Mata pisau dipasang pada mikrotom. Blok sediaan dipasang pada mikrotom, diatur tinggi rendahnya permukaan blok pada skala 10-15. Sudut permukaan organ diatur dengan arah potongan pisau harus membentuk 45° , dan tebal tipisnya potongan diatur, biasanya $3\mu\text{m}$, untuk organ yang keras dapat dengan ketebalan $\pm 5\mu\text{m}$. Pemotongan diambil secara random, tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7 μm , setelah itu jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya telah diolesi putih telur dan dikeringkan diatas hotplate dengan suhu 60°C .

6. Pewarnaan

Jaringan diwarnai dengan menggunakan Hematoxylin Eosin (HE), sehingga terlihat jelas bagian-bagian selnya, sitoplasma berwarna merah sedangkan intinya berwarna biru. Proses pewarnaan dilakukan dengan memasukkan irisan jaringan yang terletak pada gelas obyek ke dalam reagen dengan urutan: xylol I (5 menit), xylol II (5 menit), xylol III (3 menit), alkohol absolut I (3 menit), alkohol absolut II (2 menit), alkohol absolut III (3 menit), alkohol 96% (2 menit), alkohol 90% (2 menit), alkohol 80% (1 menit), alkohol 70%

(1 menit), dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Kemudian jaringan direndam dalam Hematoxylin selama 4 sampai 10 menit, lalu dicuci lagi dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya direndam dalam Eosin selama 3-8 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70% (1 menit), alkohol 80% (2 menit), alkohol 90% (3 menit), alkohol absolut I, II, III masing-masing 3 menit, xylol I (3 menit), II (4 menit), dan xylol III (5 menit).

7. *Mounting*

Bila pewarnaan sudah kering selesai, maka gelas obyek yang ada sayatan jaringan tersebut ditutup dengan gelas penutup yang sebelumnya sudah diolesi dengan canada balsam.

4.4 Analisa Data

4.4.1 Analisis Data Enzim SGOT dan SGPT

Data yang diperoleh yaitu aktivitas enzim SGOT dan SGPT dari masing-masing kelompok perlakuan, dianalisis secara statistik dengan uji ANOVA (*One Way*) pada derajat kepercayaan 95% (harga $\alpha = 0,05$) sebagai variabel bebas adalah dosis, sedangkan variabel tergantung adalah kadar SGOT dan SGPT. Hipotesis yang diajukan untuk statistik penelitian adalah sebagai berikut:

- H_0 = tidak ada perbedaan bermakna dari variabel tergantung antar kelompok perlakuan
- H_a = ada perbedaan bermakna dari variabel tergantung antar kelompok perlakuan

Dari hasil analisis, didapatkan harga F_{hitung} yang kemudian dibandingkan dengan F_{tabel}

- Apabila harga $F_{hitung} > F_{tabel}$ (harga signifikansi $< \alpha$), maka H_0 ditolak dan dapat disimpulkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan
- Tetapi bila harga $F_{hitung} < F_{tabel}$ (harga signifikansi $> \alpha$), maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

Apabila terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan, maka analisis dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui ada tidaknya efek perlakuan antar pasangan kelompok. Harga LSD digunakan sebagai pembanding selisih antara rata-rata hasil pemeriksaan.

- Apabila selisih harga rata-rata tersebut lebih kecil dari harga LSD yang diperoleh, maka tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok tersebut.
- Apabila selisih harga rata-rata lebih besar atau sama dengan harga LSD yang didapat, maka ada perbedaan yang bermakna antar kelompok tersebut.

4.4.2 Analisis Data Preparat Histopatologi

Untuk pengamatan terhadap preparat histopatologi organ hati, ginjal, dan jantung digunakan tiga macam parameter kerusakan, yaitu kongesti, degenerasi, dan nekrosis. Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali, kemudian digunakan perbesaran 400 kali. Selanjutnya pada tiap macam kerusakan ditetapkan persen kerusakannya preparat berdasarkan pengamatan lima lapang pandang yang berbeda. Kemudian diberikan skor berdasarkan persen kerusakan yang terjadi.

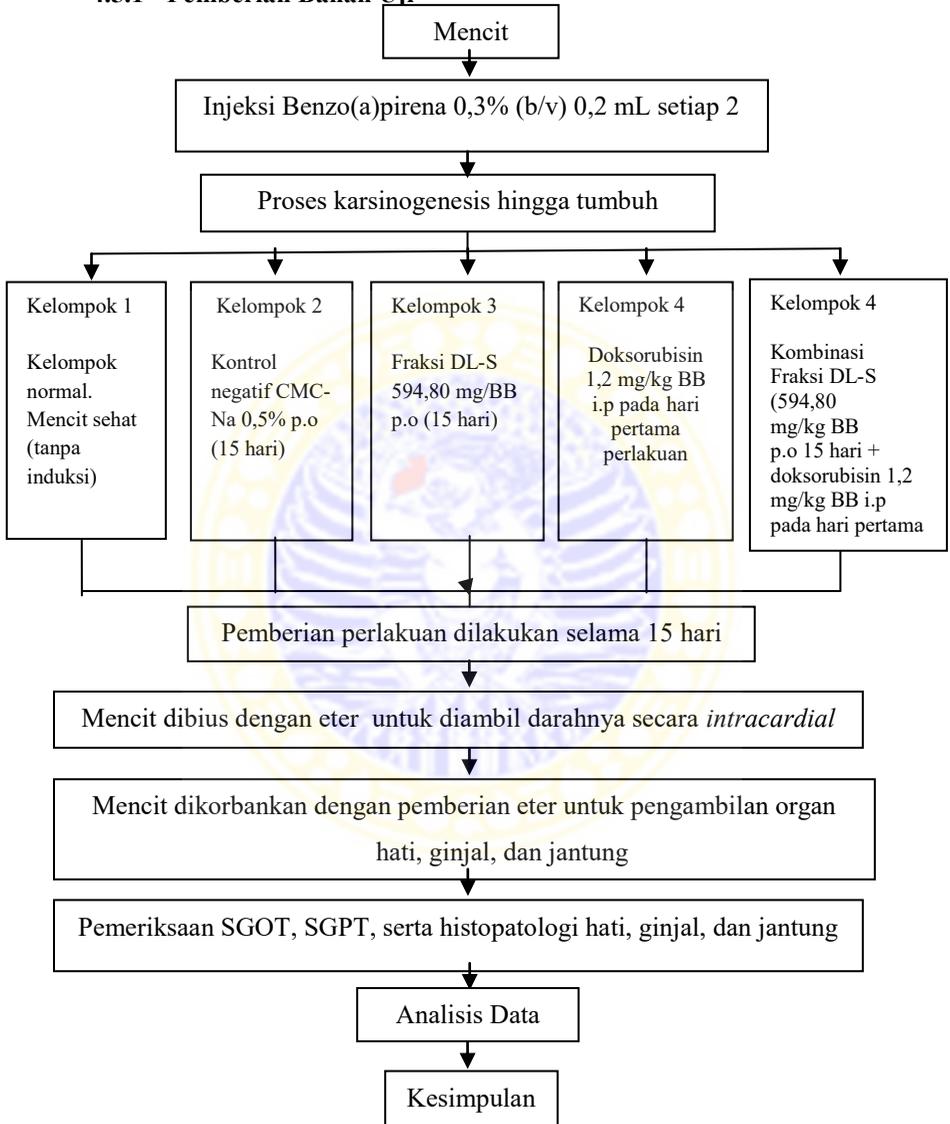
Tabel IV.1 Kategori dan Penilaian Kerusakan Organ

Kategori kerusakan	Persen kerusakan	Skor
Normal	0%	0
Kerusakan ringan	> 0% - 25%	1
Kerusakan sedang	> 25% - 50%	2
Kerusakan berat	> 50% - 75% atau lebih	3

Dari pemberian skor diatas, akan diperoleh tiga macam data kerusakan untuk masing-masing organ hati, ginjal, dan jantung. Data pertama diperoleh dari hasil pengamatan adanya kongesti organ tiap kelompok perlakuan, data kedua adalah hasil pengamatan adanya degenerasi sel tiap kelompok perlakuan, dan data ketiga diperoleh dari hasil pengamatan adanya nekrosis inti sel tiap kelompok perlakuan. Ketiga data tersebut diolah dan diuji menggunakan uji Kruskal-Wallis, apabila terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5%.

4.5 Skema Penelitian

4.5.1 Pemberian Bahan Uji



Gambar 4.1 Kerangka Operasional