

## **BAB 3**

# **MATERI DAN METODE**

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama lima bulan yaitu mulai bulan Februari hingga bulan Juli 2011. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat, yaitu : Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, sebagai tempat pembuatan ekstrak etanol daun Salam (*Eugenia polyantha*) ; Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, sebagai tempat pembuatan larutan dan penghitungan dosis DMBA dan ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) serta sebagai tempat preparasi sampel hewan coba ; Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang meliputi pemeliharaan hewan coba, percobaan karsinogenesis, dan pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) ; Sedangkan pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi kelenjar *mammae* dilaksanakan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

### 3.2. Bahan dan Materi Penelitian

#### 3.2.1. Bahan Penelitian

##### a. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* betina umur 45 hari dengan berat antara 60-70 gram. Dalam penelitian ini digunakan tikus putih galur *Sprague dawley* (SD) betina karena

tikus ini lebih sensitif daripada galur *Wistar* dalam menumbuhkan kanker payudara. (Kubatka *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 1997).

Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor, kelompok penelitian tersebut terbagi dalam lima kelompok perlakuan. Hewan coba yang dipakai berasal dari LPPT UGM.

#### **b. Tanaman**

Penelitian ini menggunakan bahan yang berasal dari tanaman, yaitu daun salam (*Eugenia polyantha*). Daun salam diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak etanolnya. Ekstrak etanol yang diperoleh dibagi dalam tiga macam dosis yaitu 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB. Dosis yang dipakai ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Susilowati dkk (2004) menggunakan daun sambung nyawa *Gynura procumbens*.

#### **c. Agen karsinogen**

Sebagai bahan karsinogen digunakan DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) (Sigma Chem Co), Nomor catalog RPMI 1640 / R 6504 dengan dosis DMBA 20 mg/kgBB. Dosis yang dipakai ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Meiyanto dkk. (2007).

#### **d. Bahan Kimia**

Bahan kimia yang digunakan diantaranya bahan untuk ekstraksi, yaitu etanol 96% dan CMC-Na (E.Merck) 0,5% sebagai pelarut ekstrak *Eugenia polyantha*, minyak jagung (*corn oil*) sebagai pelarut DMBA, untuk pembuatan preparat histopatologi bahan yang digunakan adalah Buffer formalin 10% untuk fiksasi organ dan HE (Hemaktosilin dan Eosin) sebagai pewarna sediaan histopatologi untuk pemeriksaan mikroskopis organ kelenjar *mammae*.

#### **3.2.2. Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol daun salam meliputi *rotary evaporator*, timbangan elektrik (Shimadzu, tipe LS-6DT), pH meter (TOA HM-60S), dan *vortex* (B7600 Barnstead Thermolyne, IQWA USA).

Peralatan untuk preparasi sampel terdiri dari *glassware*, sonde oral, mortir dan stamper, seperangkat alat bedah (pinset, scalpel, blade, gunting), pot salep, *backer glass*, tube steril, labu takar, pipet tetes, timbangan gram elektrik, pH meter TOA HM-60S, ultra sentrifugator (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, tipe LS-6DT), *vortex*, mikropipet, steril *disposable syringe*, kandang hewan coba.

Peralatan untuk pembuatan sediaan histopatologi meliputi *object glass*, pipet, *tissue processor automatic* (Sakura Finetek Japan Co., Ltd), *water bath* (Sakura Finetek Japan Co., Ltd), *hot plate*, *microtome* dan blade. Sedangkan Alat untuk pemeriksaan sediaan histopatologi yaitu mikroskop (Olympus ® CX-21).

### **3.3. Metode Penelitian**

#### **3.3.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Eugenia polyantha***

Daun salam (*Eugenia polyantha*) dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur dengan panas matahari secara tidak langsung dengan ditutupi kain berwarna gelap/hitam agar tidak banyak senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut rusak. Tujuan dari dilakukan pengeringan adalah untuk mengurangi kandungan air dan agar bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi mikroba.

Setelah kering, simplisia dibuat serbuk dengan cara digiling kemudian diayak hingga diperoleh serbuk daun salam (*Eugenia polyantha*). Serbuk tersebut sebanyak 500 gram diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Maserasi merupakan proses pengestrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan. Pengadukan dilakukan 2 kali yaitu pada pagi dan sore hari, setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Maserasi dilakukan 3 kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diendapkan, lalu disaring dan selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

#### **3.3.2. Pembuatan Larutan Karsinogen DMBA dalam *corn oil***

*Dimetilbenz[a]antrasen* (DMBA) ditimbang secara analitik, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan minyak jagung dengan volume

tertentu. Selanjutnya diaduk dengan alat vortex sampai terlarut dan homogen. Pembuatan larutan DMBA diperhitungkan sehingga volume yang diberikan ke tikus antara 0,5 - 1,0 ml untuk dosis DMBA 20 mg/kgBB.

Rumus umum yang digunakan adalah :

$$\text{Volume pemberian DMBA} = \text{berat badan tikus} / 1000 \times 20 / \text{kadar DMBA}$$

Sebanyak 60 mg DMBA ditimbang dan dilarutkan dalam 30 ml minyak jagung, hingga diperoleh larutan DMBA dengan kadar 2 mg/ml. Tikus dengan berat badan 60 gr diberi DMBA dengan volume pemberian 0,6 ml. Volume pemberian DMBA menjadi = Berat Badan hewan coba/100.

### 3.3.3. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etanolik daun salam (*Eugenia polyantha*) yang akan diberikan pada hewan coba disuspensikan dalam aquades dengan *suspending agent* CMC Na 0,5 % di dalam mortir. Pembuatan CMC Na 0,5 % dengan cara menaburkan CMCNa 0,1 gr dalam aquades hangat 20 ml dan diaduk sampai larut. Ekstrak, sesuai dengan dosis, disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5 % hingga diperoleh suspensi ekstrak dengan konsentrasi yang jika diberikan kepada hewan coba masing-masing akan mendapatkan volume pemberian antara 0,5 – 1,5 ml. Volume pemberian ini tidak melebihi volume maksimal yang diperbolehkan jika diberikan secara peroral kepada hewan coba (tikus).

Rumus umum yang digunakan adalah :

$$\text{Volume pemberian} = \text{berat badan tikus} / 1000 \times \text{dosis} / \text{kadar ekstrak}$$

Sebanyak 1000 mg ekstrak etanolik *Eugenia polyantha* disuspensikan dalam CMC Na 0,5 % 20 ml, sehingga diperoleh kadar ekstrak 50 mg/ml. Untuk mendapat volume pemberian ekstrak yaitu tikus dengan berat badan 60 gram, dosis ekstrak 500 mg/kgBB dibutuhkan 0,6 ml suspensi ekstrak, pada dosis 250 mg/kgBB membutuhkan 0,3 ml suspensi ekstrak, sedangkan pada dosis 750 mg/kg BB dibutuhkan 0,9 ml suspensi ekstrak. Larutan ekstrak etanolik daun *Eugenia polyantha* dalam CMC Na 0,5% ini selalu dibuat baru, sebelum diberikan kepada hewan coba. Berhubung selalu ada peningkatan berat badan hewan coba setiap minggunya, maka selalu ada peningkatan jumlah ekstrak yang diberikan pada hewan coba setiap minggu serta penyesuaian kadar ekstrak yang dibuat.

#### **3.3.4. Perlakuan pada Hewan Coba**

Desain penelitian ini pada dasarnya menggunakan model pre inisiasi DMBA yang dimaksudkan adalah pemberian ekstrak etanol senyawa anti kanker *Eugenia polyantha* diberikan sebelum pemberian senyawa karsinogen DMBA. Hewan coba yang digunakan tikus putih galur *Sprague dawley* betina umur 45 hari dengan berat badan rata-rata 60-70 gram. Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran sama berupa bak dari plastik yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, setiap bak terdapat 5 ekor tikus, pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Seluruh kandang ditempatkan pada satu ruang yang memiliki ventilasi cukup baik.

Sejumlah 20 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan memerlukan lima

ekor tikus. Pengelompokan hewan percobaan pada setiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

**Kelompok K (+) : Kelompok Kontrol Positif DMBA.**

Pada minggu pertama tikus diberi DMBA 20 mg/kg BB dalam minyak jagung (*corn oil*) secara peroral, frekuensi pemberian seminggu dua kali selama lima minggu. Kelompok ini tanpa diberi ekstrak. Minggu ke-6 hingga minggu ke-19 hanya diberi pakan, kemudian pada minggu ke-19 dilakukan pembedahan.

**Kelompok K (-) : Kelompok Kontrol Negatif**

Pada kelompok perlakuan ini tikus diberi CMC Na 0,5 % dan diberi *corn oil* secara peroral, pemberian dilakukan pada minggu pertama sampai minggu ke-7 dengan frekuensi pemberian setiap hari. Tanpa diberi ekstrak daun salam dan DMBA. Minggu ke-8 hingga minggu ke-19 hanya diberi pakan, kemudian pada minggu ke-19 dilakukan pembedahan.

**Kelompok P1 : Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 250 mg/kg BB.**

Tikus diberi ekstrak etanol *Eugenia polyantha* dosis 250 mg/kg BB secara peroral, pemberian dilakukan setiap hari selama tujuh minggu dan mulai diberikan DMBA 20 mg/kgBB secara peroral pada minggu ke tiga penelitian dengan frekuensi pemberian seminggu dua kali selama lima minggu. Minggu ke-8 hingga minggu ke-19 hanya diberi pakan, kemudian pada minggu ke-19 dilakukan pembedahan.



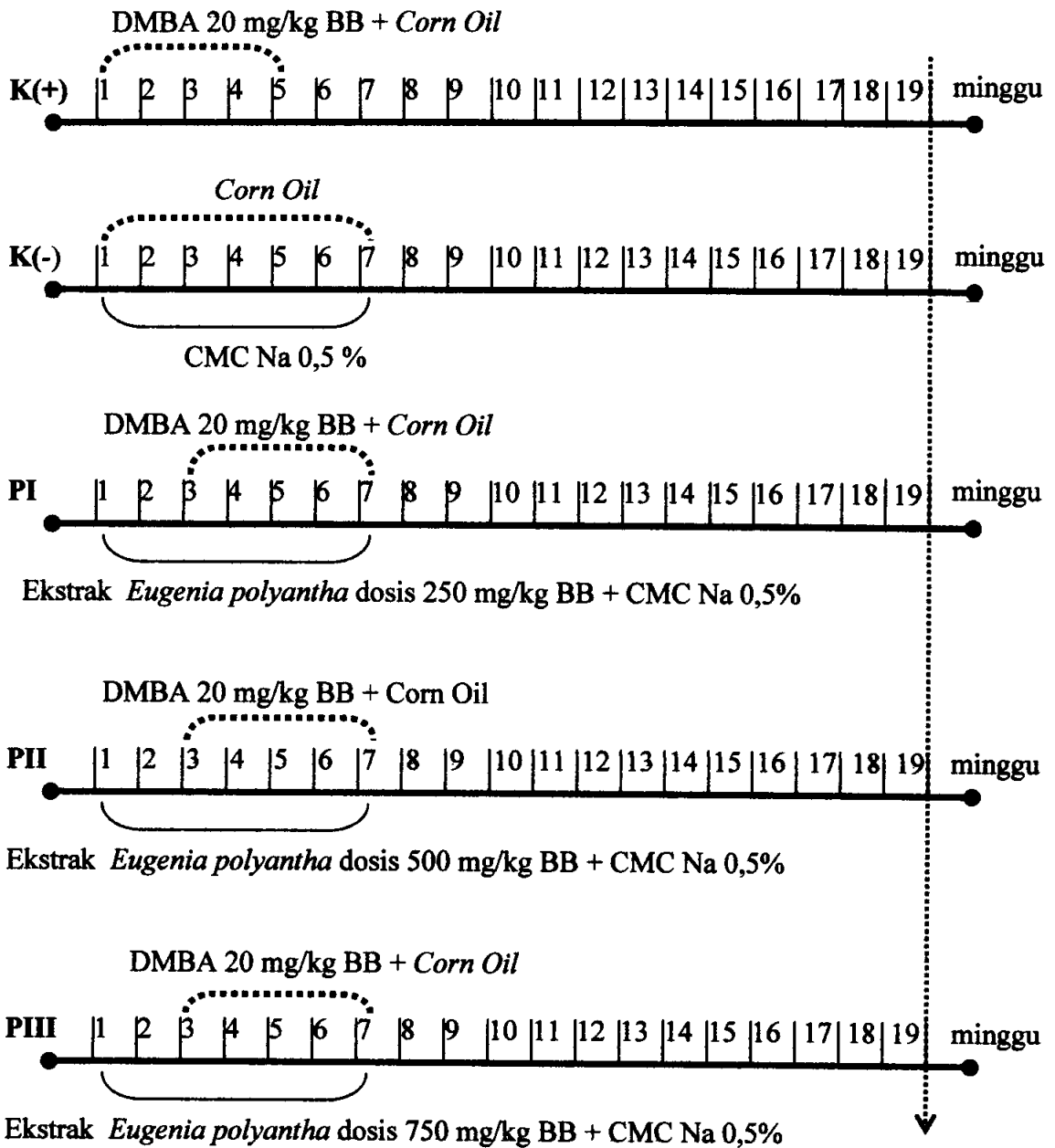
**Kelompok P2 : Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 500 mg/kg BB**

Kelompok perlakuan ini diberi ekstrak *Eugenia polyantha* dosis 500 mg/kg BB secara peroral, pemberian dilakukan setiap hari selama tujuh minggu dan mulai diberikan DMBA 20 mg/kg BB secara peroral pada minggu ke tiga penelitian dengan frekuensi pemberian seminggu dua kali selama lima minggu. Minggu ke-8 hingga minggu ke-19 hanya diberi pakan, kemudian pada minggu ke-19 dilakukan pembedahan.

**Kelompok P3 : Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 750 mg/kg BB**

Kelompok perlakuan ini diberi ekstrak *Eugenia polyantha* dosis 750 mg/kg BB secara peroral, pemberian dilakukan setiap hari selama tujuh minggu dan mulai diberikan DMBA 20 mg/kg BB secara peroral pada minggu ke tiga penelitian dengan frekuensi pemberian seminggu dua kali selama lima minggu. Minggu ke-8 hingga minggu ke-19 hanya diberi pakan, kemudian pada minggu ke-19 dilakukan pembedahan.

Minggu ke :



Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi organ kelenjar *mammae* (pewarnaan HE)

Pembedahan Tikus dan fiksasi organ dalam formalin 10 %

Gambar 3.1. Skema Operasional Kelompok Perlakuan

### 3.3.5. Pemeriksaan Histopatologi dengan Metode Pengecatan Hematoksin Eosin (HE)

Pada akhir pengamatan, dilakukan nekropsi terhadap hewan uji. Analisis histopatologi dilakukan terhadap organ kelenjar *mammae* untuk mengetahui keadaan sitologinya serta tingkat keparahan tumor/kanker yang terjadi pada organ secara mikroskopis. Proses pembuatan preparat meliputi proses jaringan dan pengecatan HE dapat dilihat pada lampiran 1.

### 3.3.6. Cara Menghitung Nilai Masing-masing Skor

Cara penghitungan dengan metode ini telah dilakukan sebelumnya oleh Elston and Ellis (1991) untuk menghitung skor kanker *mammae* pada kucing dan anjing, yang kemudian hingga sekarang dijadikan acuan metode penghitungan skor kanker *mammae*.

Pada penelitian ini digunakan mikroskop cahaya untuk pengamatan secara mikroskopis kelenjar *mammae* tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pembesaran 400 X.

Kriteria penilaian gambaran histopatologi kelenjar *mammae* menggunakan tiga macam struktur mikroskopis kelenjar *mammae* yaitu :

1. Formasi asiner atau tubulus yang menggambarkan persentase kepadatan tubulus dalam satu lapang pandang
2. *Pleomorfisme* pada inti sel atau *nuclear atypia*, dan
3. Jumlah sel yang mengalami mitosis atau aktivitas mitosis.

Setiap elemen yang dinilai atau diskor diberi nilai 1-3. Dilihat dalam lima lapang pandang yang kemudian skornya di rata-rata (Hamid, 2010).

### 3.4. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini variabel yang diamati adalah tingkat kerusakan jaringan kelenjar *mammae* adapun rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena kondisi lingkungan dan umur homogen serta sampel dilakukan secara acak dengan lima macam kelompok perlakuan dimana satu kelompok perlakuan terdiri dari 4 ulangan (Kusriningrum, 2008).

Ulangan \ Perlakuan	K+	K -	P I	P II	P III
U 1					
U 2					
U 3					
U 4					

### 3.5. Variabel Penelitian

Beberapa peubah yang diamati dalam penelitian ini meliputi:

- Variabel bebas : Ekstrak etanol *Eugenia polyantha* yang terdiri dari tiga dosis yaitu 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB.
- Variabel tergantung : Gambaran Histopatologi kelenjar *mammae* tikus
- Variabel kendali : Tikus galur *Sprague dawley*, umur, jenis kelamin, kandang, jumlah pakan dan minum *ad libitum*.
- Variabel antara : DMBA 20 mg/kgBB.

### 3.6. Deskripsi Operasional

Perubahan histopatologi kelenjar *mammae* adalah perubahan tingkat mikroskopik pada kelenjar *mamae* hewan coba. Metode penilaian gambaran histopatologi kelenjar *mammae* yang digunakan pada penelitian ini yaitu berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Elston and Ellis, 1991. Penilaian gambaran histopatologi kelenjar *mammae* menggunakan tiga macam struktur mikroskopis kelenjar *mammae* yaitu :

1. Formasi asiner atau tubulus :

Menggambarkan persentase kepadatan tubulus dalam satu lapang pandang, semakin padat tubulusnya semakin sedikit sel kanker yang menyerang sel normal tersebut dan semakin rendah derajat karsinogenesisnya.

2. *Pleomorfisme* pada inti sel atau *nuclear atypia* :

Pleomorfisme adalah variasi yang nyata dalam bentuk dan ukuran inti sel anaplastik. Pleomorfisme ini dapat dilihat melalui gambaran di bawah mikroskop, berupa :

- Inti sel hiperkromatik (berwarna lebih gelap dari sel normal)
- Rasio inti sel dengan sitoplasma (cairan dalam sel) dapat mendekati 1 : 1, yang normalnya 1 : 4 atau 1 : 6
- Bentuknya dan ukuran inti sel tidak teratur
- Kromatin terlihat kasar dan bergumpal serta anak inti sel berukuran sangat mencolok

- Terdapat banyak kumparan (spindle) kacau yang dapat memberi bentukan tripolar atau pun kuadripolar, dan sering terdapat suatu kumparan besar dan kumparan lain kecil
3. Jumlah sel yang mengalami mitosis atau aktivitas mitosis : terjadi banyak pembelahan sel (mitosis)

Metode Skoring :

1. Jumlah Tubulus :

- Jika  $> 75\%$  (skor 1)
- Jika  $10 - 75\%$  (skor 2)
- Jika  $< 10\%$  (skor 3)

2. Atipia Nukleus

- Nukleus kecil dan seragam (skor 1)
- Nucleus sedang sampai besar agak bervariasi (skor 2)
- Bentuk dan ukuran nukleus bervariasi dan sel tampak keruh (skor 3)

3. Jumlah mitosis

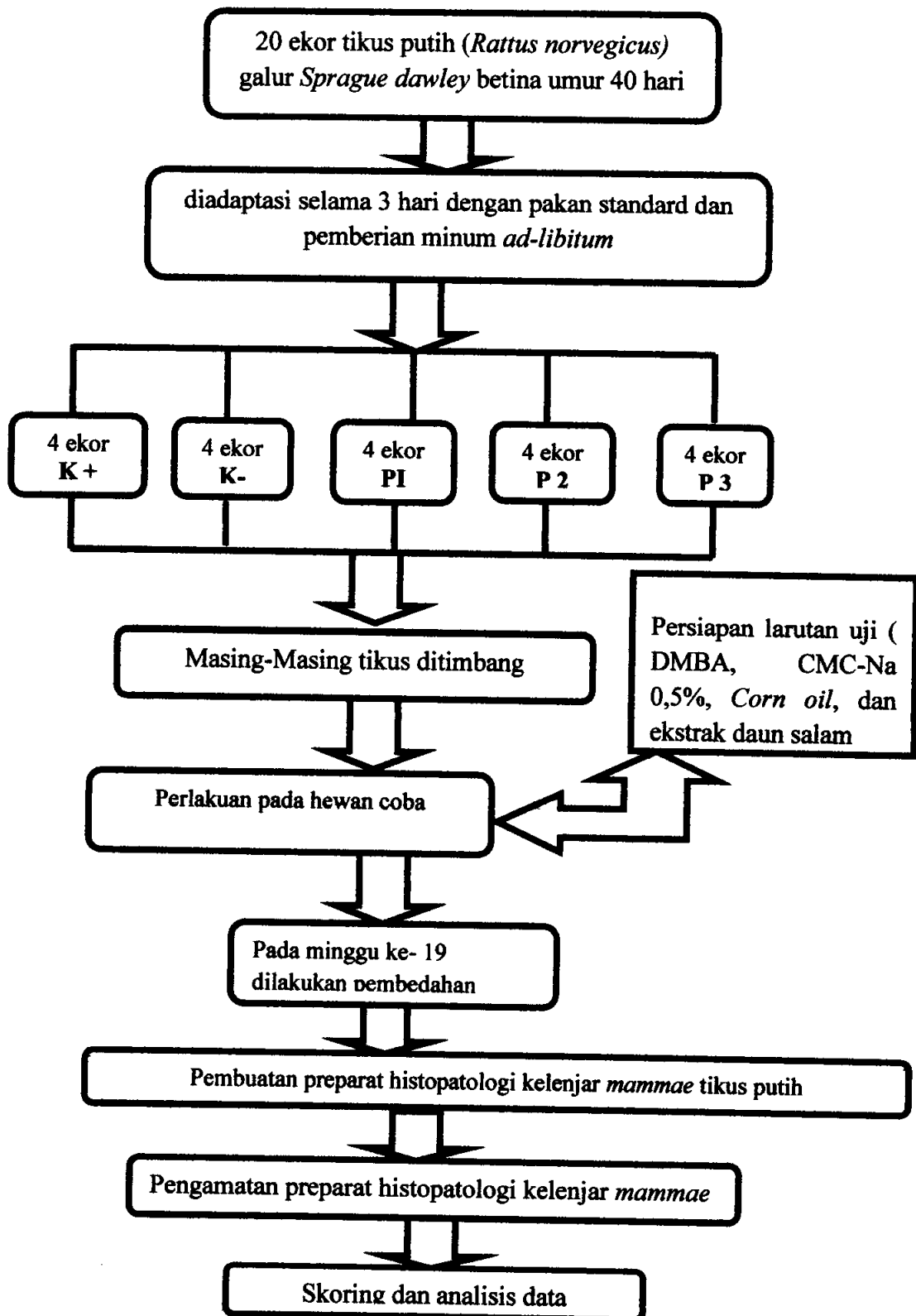
- Dalam satu lapang pandang terdapat  $0 - 7$  (skor 1)
- Dalam satu lapang pandang terdapat  $8 - 16$  (skor 2)
- Dalam satu lapang pandang terdapat  $>17$  (skor 3)

Setiap elemen yang dinilai atau diskor diberi nilai 1-3. Dilihat dalam 5 lapang pandang yang kemudian skornya di rata-rata.

Total skor 3-5 (grade I), total skor 6-7 (grade II) dan total skor 8-9 (grade III) (Hamid, 2010).

### 3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam bentuk skor nilai tingkat perubahan gambaran histopatologis kelenjar *mammae* tikus putih disusun dalam bentuk tabel untuk kemudian dianalisis. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan perubahan gambaran histopatologis kelenjar *mammae* akibat pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) dilakukan uji statistik menggunakan program statistik komputer (SPSS 18,0 *for windows*). meliputi uji *Kruskal Wallis* dan juga menggunakan tabel sidik ragam. Derajat perubahannya diolah dengan penilaian peringkat (Rank) dan bila terdapat perbedaan yang nyata dilakukan dengan uji *Mann-whitney* (Mehotcheva, 2008).

**Diagram Alir Penelitian**

Gambar 3.2. Diagram Alir Penelitian