

# SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SALAM  
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI  
KELENJAR MAMMAE TIKUS Galur  
*Sprague dawley* YANG DI INISIASI  
DMBA (Dimetilbenz[a]antrasen)**



Oleh :

**RIZALDI FERIAN UTAMA**

**NIM 060810004**


**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SALAM TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI KELENJAR *MAMMAE*  
TIKUS Galur *Sprague dawley* YANG DI INISIASI  
DMBA (Dimetilbenz[a]antrasen)**


Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh  
**RIZALDI FERIAN UTAMA**  
NIM 060810044

Menyetujui  
Komisi Pembimbing,



**(Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.)**  
Pembimbing Utama



**(Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.)**  
Pembimbing Serta

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SALAM TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI KELENJAR *MAMMAE*  
TIKUS Galur *Sprague dawley* YANG DI INISIASI  
DMBA(Dimetilbenz[a]antrasen)**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 12 Juli 2012

METERAI  
TEMPEL

PAJAK MENANGKAT BANGSA  
TGL 20

D6D88ABF11621029

ENAM RIBU RUPIAH

6000 DJP

Rizaldi Ferian Utama

NIM. 060810044

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian  
Tanggal: 5 Juli 2012

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

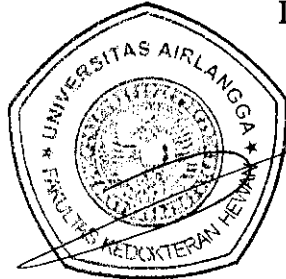
Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si.  
Sekretaris : Julien Supraptini., drh.,SU.  
Anggota : Arimbi, drh., M.Kes.  
Pembimbing Utama : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.  
Pembimbing Serta : Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Telah diuji pada  
Tanggal : 12 Juli 2012

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si.  
Anggota : Julien Supraptini., drh.,SU.  
: Arimbi, drh., M.Kes.  
: Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.  
: Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Surabaya, 12 Juli 2012  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



**Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.**  
NIP. 19531216.197806.2.001

**THE EFFECT OF GIVING *Eugenia polyantha* EXTRACT  
TO MAMMARY GLAND HISTOPATHOLOGIC  
ON *Rattus norvegicus* STRAIN *Sprague dawley*  
INITIATION WITH DMBA  
(Dimetilbenz[a]antrasen)**

**Rizaldi Ferian Utama**

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to know the effect of *Eugenia polyantha* extract to histopathological change of mammary gland *Sprague dawley* rats which induce with 20 mg/kg body weight DMBA. Twenty female rats (*Rattus norvegicus* strain *Sprague dawley*) 45 days old with 60-70 g body weight were divided into five groups. The first group was only given DMBA and *corn oil*, as positive control. The second group was given CMC-Na and *corn oil*, as negative control. The third group was given 250 mg/kg body weight *Eugenia polyantha* extract and DMBA. The fourth and fifth group were given the same treatment as the third group, only using higher dose of *Eugenia polyantha* was 500 and 750 mg/kg body weight. The data were compared using *Kruskal-Wallis* and *Mann-Whitney* test. This research showed that *Eugenia polyantha* extract changed the histopathological of rats mammary gland. There were decrease grade score from grade III to grade II and I. The effective dose of *Eugenia polyantha* extract to repair mammary gland cell was 500 mg/kg body weight.

**Keyword:** DMBA initiation , mammary gland histopathologic, *Eugenia polyantha* extract

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Alhamdulillah kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **"Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam Terhadap Gambaran Histopatologi Kelenjar *Mammae* Tikus Galur *Sprague Dawley* Yang Di Inisiasi DMBA (Dimetilbenz[a]antrasen)."**

Penulis menyadari bahwa pelaksanaan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dari banyak pihak, untuk itu pada kesempatan kali ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P. dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. selaku dosen pembimbing, saya sampaikan terima kasih atas segala saran dan bimbingan yang senantiasa diberikan kepada penulis hingga skripsi ini terselesaikan. Berjuta-juta terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing penelitian yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.

Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si., ibu Julien Supraptini., drh.,SU. dan ibu Arimbi, drh, M.kes., selaku dosen penguji skripsi, terima kasih atas segala nasehat yang diberikan kepada penulis demi kesempurnaan skripsi ini.

Bapak Trilas Sardjito, drh., M.Si. selaku dosen wali dan juga seluruh dosen beserta jajaran staf Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dan membekali ilmu selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Dr. Soeharsono, drh., M.Si selaku dosen yang telah mengajari saya dalam pembuatan dan pembacaan model statistika yang digunakan pada metode analisis data penelitian ini.

Kedua orang tuaku tersayang, Sunaryo dan Retno Muslinawati, serta saudara penulis, Satria Adi Wicaksono yang selalu memberi dukungan, semangat dan kasih sayang yang amat besar kepada penulis.

Teman kost 37 jojoran yang selalu menemani di saat suka dan duka saat penulisan skripsi. Rekan penelitian penulis : Reina Puspita, Dwi Setyaning, Randi Sagasiousman. dan seluruh teman angkatan 2008 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan, dukungan, serta kerjasama yang telah diberikan.

Semua pihak lain yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini baik langsung maupun tidak langsung. Semoga segala bantuan dan bimbingan kepada penulis menjadi sebuah amal ibadah yang akan dibalas oleh Allah SWT. Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, Juli 2012

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Landasan Teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	6
1.5. Manfaat Hasil Penelitian.....	6
1.6. Hipotesis.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1. Kanker.....	7
2.2. Karsinogenesis.....	8
2.3. Karsinogenesis Pada Kanker <i>Mammae</i> oleh DMBA.....	11
2.4. Tinjauan Histologi Kelenjar <i>Mammae</i> Normal dan Yang Terkena Kanker.....	13
2.5. Tinjauan Tentang <i>Grading</i> dan <i>Staging</i> .....	16
2.6. Tinjauan Tentang Daun Salam.....	17
2.6.1. Klasifikasi Daun Salam.....	17
2.6.2. Morfologi Tanaman.....	17
2.6.3. Nama daerah.....	18
2.6.4. Nama lain.....	19
2.6.5. Daerah Distribusi dan Habitat.....	19
2.6.6. Kandungan Kimia.....	19
<b>BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>22</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2. Bahan dan Materi Penelitian.....	22
3.2.1. Bahan Penelitian.....	22
3.2.2. Alat Penelitian.....	24

3.3. Metode Penelitian .....	25
3.3.1. Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun <i>Eugenia polyantha</i> .....	25
3.3.2. Pembuatan Larutan Karsinogen DMBA dalam <i>corn oil</i> .....	25
3.3.3. Pembuatan Larutan Uji .....	26
3.3.4. Perlakuan pada Hewan Coba .....	27
3.3.5. Pemeriksaan Histopatologi dengan Metode HE .....	31
3.3.6. Cara Menghitung Nilai Masing-masing Skor .....	31
3.4. Rancangan Penelitian .....	32
3.5. Variabel Penelitian .....	32
3.6. Deskripsi Operasional.....	33
3.7. Analisis Data.....	35
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
4.1. Formasi Tubulus .....	37
4.2. Atipia Nukleus .....	38
4.3. Jumlah Mitosis.....	39
<b>BAB 5 PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>46</b>
6.1. Kesimpulan.....	46
6.2. Saran .....	46
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>47</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>54</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Efek pemberian ekstrak daun salam <i>Eugenia polyantha</i> terhadap skoring formasi tubulus pada gambaran histopatologi kelenjar <i>mammae</i> tikus putih .....	38
4.2. Efek pemberian ekstrak daun salam <i>Eugenia polyantha</i> terhadap skoring atypia nukleus pada gambaran histopatologi kelenjar <i>mammae</i> tikus putih .....	39
4.3. Efek pemberian ekstrak daun salam <i>Eugenia polyantha</i> terhadap skoring jumlah mitosis pada gambaran histopatologi kelenjar <i>mammae</i> tikus putih .....	40

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1. Struktur Kimia <i>7,12-dimetilbenz(a)antrasen</i> (DMBA).....	12
2.2. Gambaran histologi kelenjar <i>mammae</i> mormal .....	15
2.3. Gambaran kelenjar <i>mammae</i> tikus terkena kanker setelah inisiasi DMBA .....	15
2.4. Tanaman <i>Eugenia Polyantha</i> .....	18
3.1. Skema operasional kelompok perlakuan.....	30
3.2. Diagram Alir Penelitian .....	36
4.1. Gambaran histopatologi kelenjar <i>mammae</i> yang digunakan sebagai <i>grading</i> .....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Proses pembuatan preparat dan pengecatan HE.....	54
2. Hasil Skoring <i>Grading</i> kelenjar <i>mammae</i> .....	56
3. Rerata skor gambaran histopatologis kelenjar <i>mammae</i> tikus setiap kelompok perlakuan .....	57
4. Hasil Uji Statistik .....	58
5. Dokumentasi Kegiatan .....	67

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

BB	= Berat Badan
CMC-Na	= Carboxymethyl Cellulose Natrium
COX	= Siklooxigenase
DMBA	= Dimetilbenz(a)anthracen
DNA	= Deoxyribonucleic acid
GST	= Glutation S-Transferase
HE	= Hematoxylin Eosin
L	= Liter
LOX	= Lipooksigenase
LPPT UGM	= Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
PAH	= Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
RNA	= Ribonucleic Acid
Sitokrom P-450	= Sitokrom Porphyrin 450
HE	= Hematoksilin dan Eosin
SPSS	= Statistical Package for the Social Sciences
<	= kurang dari
>	= lebih dari

# **BAB 1**

# **PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker adalah tumor ganas yang ditandai dengan pertumbuhan abnormal sel-sel tubuh. Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) pada tahun 2002, kanker merupakan penyebab kematian nomor tiga setelah penyakit jantung dan stroke. Salah satu keganasan yang sering ditemukan di seluruh dunia adalah kanker payudara. Data *World Health Organization (WHO)* pada tahun 2004 menunjukkan bahwa lebih dari 1,2 juta wanita di dunia terdiagnosis kanker payudara. Pada wanita Indonesia kanker payudara merupakan jenis keganasan kedua terbanyak setelah kanker leher rahim (Agustina, 2008).

Kanker *mammae* merupakan kanker yang paling banyak dialami wanita di seluruh dunia dan menduduki urutan kedua penyebab kanker serta kematian pada wanita. Berbagai faktor penyebab kanker *mammae* telah ditemukan. Lebih dari separuh kasus kanker *mammae* disebabkan faktor hormonal dan reproduksi di samping faktor lainnya seperti usia, kehamilan pertama di usia yang tinggi, riwayat keluarga dan obesitas (Kumala, 2008).

Menurut Liptak (2004) kecenderungan meningkatnya jumlah kasus kanker *mammae* juga terjadi pada hewan, khususnya pada anjing dan kucing. Hampir 50% kanker *mammae* terjadi pada anjing dan 85% pada kucing adalah maligna. Kasus kanker *mammae* pada anjing betina menempati tempat kedua terbanyak setelah kanker kulit. Diperkirakan 165-198 dari 10.000 ekor anjing betina mengidap kanker *mammae* dimana 50% bersifat benigna dan 50% bersifat



maligna, sedangkan pada kucing kasus kanker *mammae* lebih jarang terjadi, namun dari keseluruhan kasus kanker *mammae* pada kucing tercatat 85% bersifat maligna dan sisanya bersifat benigna.

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) merupakan karsinogen kimiawi yang banyak terdistribusikan secara luas di lingkungan. PAH adalah kelompok bahan kimia yang terbentuk selama proses pembakaran batubara, minyak, gas, kayu, sampah atau zat organik lainnya yang tidak sempurna. Ada lebih dari 100 jenis PAH yang berbeda dan biasanya merupakan campuran yang kompleks dalam lingkungan. Termasuk dalam golongan senyawa PAH adalah *Dimetilbenz(a)antrasen* (DMBA) (Li, 2010).

*Dimetilbenz[a]antrasen* (DMBA) merupakan salah satu senyawa toksik dari golongan senyawa PAH (Polisiklik Aromatik Hidrokarbon) yang sangat spesifik untuk pembuatan model kanker payudara pada beberapa hewan uji jika diberikan secara peroral atau intragastrik. DMBA diabsorpsi di dalam intestinal dan masuk ke dalam sirkulasi darah, kemudian menuju vena porta, dan mengalami metabolisme di hepar menjadi metabolit epoksida dehidrodiol yang sangat reaktif. Metabolit ini mampu berinteraksi dengan target makromolekul di dalam tubuh (DNA) dengan membentuk ikatan kovalen, disebut *DNA adduct* yang dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga terjadi proses karsinogenesis (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

Berdasarkan hasil pengamatan histopatologis yang dilakukan oleh Meiyanto dkk (2007) pada *glandula mammae* tikus yang mengalami kanker *mammae* setelah di inisiasi dengan karsinogen DMBA (timbul *nodul*) terjadi

proliferasi berat dari epitel acini ke arah *lumen acini*, dengan ukuran epitel acini bervariasi disertai ditemukan adanya gambaran mitosis. Massa tumor yang solid terlihat sebagai lobulus dari tumor sel yang dipisahkan oleh jaringan ikat tipis. Ditemukan juga adanya proses peradangan yang sangat berat.

Pengobatan kanker saat ini yang umum dilakukan adalah mengangkat jaringan kanker melalui operasi, namun cara ini tidak dapat mengatasi kanker yang mengalami metastasis ke berbagai organ lain. Penggunaan kemoterapi dan penyinaran juga kurang selektif dalam membunuh sel kanker sehingga seringkali sel normal juga ikut rusak dan mati akibat penyinaran (Pratiwi dkk., 2008). Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi, dikarenakan rendahnya selektifitas anti kanker dan belum jelasnya proses karsinogenesis itu sendiri. Kendala lain yang dihadapi dalam pengobatan kanker adalah mahalnya biaya pengobatan. Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, penelitian dan pengembangan obat kanker menjadi sangat penting untuk terus dilakukan. Namun usaha pencegahan kanker yang dilakukan sejak dini kiranya merupakan jalan terbaik terhindar dari masalah - masalah yang ditimbulkan kanker (Susilowati, 2004).

Menurut Susilowati dkk (2004) upaya penemuan kemopreventif dalam rangka pencegahan dan penundaan proses karsinogenesis serta pengurangan kanker untuk terjadi kembali, merupakan strategi baru yang menjanjikan. Senyawa kemopreventif dapat berupa bahan makanan ataupun senyawa kimia baik natural (fitokimia) atau sintetik. Upaya ini merupakan alternatif yang mudah dan murah terhindar dari kanker terutama bagi masyarakat dengan resiko tinggi.

Penggunaan daun salam (*Eugenia polyantha*) tampaknya menjadi alternatif untuk diketahui aktivitasnya sebagai kemopreventif, karena ekstrak bahan tersebut mengandung senyawa flavonoid yang mampu menghambat karsinogenesis. Senyawa flavonoid tersebut dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif penyebab inisiasi kanker (Ren *et al.*, 2003).

Berdasarkan penelitian Susilowati dkk (2004) pencegahan karsinogenesis menggunakan daun sambung nyawa (*Gynura procumbents*) menggunakan dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB mampu menurunkan aktivitas proliferasi sel-sel tumor *glandula mammae* dari tikus yang diinisiasi DMBA, oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan daun yang berbeda yaitu daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan menggunakan dosis pemberian yang sama untuk mengetahui efektivitas pemberian dalam mencegah terjadinya dan perkembangan lanjut dari sel-sel kanker tersebut.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat perubahan gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus galur *Sprague dawley* setelah pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) pada berbagai dosis dan DMBA?

## 1.3. Landasan Teori

*Dimetilbenz[a]antracen* (DMBA) merupakan salah satu senyawa toksik dari golongan senyawa PAH (Polisiklik Aromatik Hidrokarbon) yang sangat spesifik untuk pembuatan model kanker payudara pada beberapa hewan uji jika

diberikan secara peroral atau intragastrik. DMBA diabsorpsi di dalam intestinal dan masuk ke dalam sirkulasi darah, kemudian menuju vena porta, dan mengalami metabolisme di hepar menjadi metabolit epoksida dehidrodiool yang sangat reaktif. Metabolit ini mampu berinteraksi dengan target makromolekul di dalam tubuh (DNA) dengan membentuk ikatan kovalen, disebut *DNA adduct* yang dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga terjadi proses karsinogenesis (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

Tubuh memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan senyawa karsinogen. Daun salam adalah tanaman asli Indonesia yang mengandung minyak atsiri, tannin dan flavonoid yang biasa digunakan masyarakat Indonesia sebagai bumbu masakan (Dalimartha, 2003).

Penggunaan daun salam menjadi alternatif untuk diketahui aktivitasnya sebagai obat kanker, karena daun salam mengandung senyawa flavonoid yang mampu menghambat karsinogenesis. Senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif penyebab inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim *xanthin oksidase*, *siklooksigenase* (COX) dan *lipooksigenase* (LOX) yang diperlukan dalam proses peroksidasi sehingga menunda siklus sel (*cell cycle arrest*) (Ren *et al.*, 2003).

Kandungan dari daun salam yaitu tanin, minyak atsiri, seskuiterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, dan karbohidrat. Kandungan kimia lainnya yaitu Thiamin, Riboflavin, Niacin, vitamin B6, vitamin B12, dan folat. Bahkan mineral seperti selenium terdapat di dalam kandungan daun salam (Pidrayanti, 2008). Selain itu daun salam juga mengandung beberapa vitamin, di

antaranya vitamin C, vitamin A, vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan (Riansari, 2008).

Berdasarkan kenyataan empiris dan data-data yang tersedia tersebut, maka dapat dikatakan bahwa daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan berbagai kandungan senyawa kimia yang dimiliki memiliki potensi sebagai antioksidan penangkal radikal bebas yang dikembangkan sebagai kemopreventif pencegah kanker.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui adanya perubahan gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus galur *Sprague dawley* setelah pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) pada berbagai dosis dan DMBA.

#### **1.5. Manfaat Hasil Penelitian**

Memberikan informasi tentang pentingnya pengamatan histopatologi pada kelenjar *mammae* tikus galur *Sprague Dawley* setelah pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) dan inisiasi DMBA.

#### **1.6. Hipotesis**

Terdapat perubahan gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus galur *Sprague dawley* setelah pemberian ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) pada berbagai dosis dan inisiasi DMBA.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (*invasi*) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (*metastasis*). Definisi lain menyatakan kanker adalah penyakit seluler yang pertumbuhannya tidak terkendali karena kehilangan fungsi pada pengaturan sirkulasi proliferasi sel dan penjagaan homeostasis sedangkan sel normal dapat mengendalikan pertumbuhan dan diferensiasi untuk menjaga homeostasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Setiap sel yang menyusun tubuh dapat menjadi kanker sehingga dapat mengakibatkan terganggunya keseimbangan fungsi tubuh secara keseluruhan. Perubahan sifat pertumbuhan tersebut disebabkan karena adanya perubahan genetik (*transformasi*), utamanya pada gen yang mengatur pertumbuhan, yaitu onkogen dan tumor suppressor (Meiyanto, 1999).

Pertumbuhan sel kanker lebih bersifat otonom daripada sel normal dan mempunyai keseimbangan positif yaitu jumlah sel yang dibuat lebih banyak daripada jumlah sel yang hilang. Sel kanker mempunyai beberapa sifat morfologik yang spesifik. Inti selnya besar dan berbeda nyata dalam bentuk maupun ukurannya. Kadar asam nukleat dalam inti tinggi dan distribusi kromatin dalam intinya kasar. Sedangkan pola kromosomnya seringkali tetraploid hal ini dikarenakan adanya penambahan kromosom yang tidak teratur (Bari *et al.*, 2004).

Morfologi sel kanker yang berbeda dengan sel normal ada kaitannya dengan kecepatan pertumbuhan tumor. Tumor yang tumbuh lambat seperti misalnya tumor jinak, menunjukkan morfologi yang normal atau hampir normal. Sebaliknya, sel tumor ganas yang tumbuh cepat, morfologinya sangat berbeda dari sel normal, mirip dengan sel yang belum terdeferensiasi. Pertumbuhan yang cepat ini juga menjelaskan mengapa sel tumor ganas hampir seluruhnya terdiri dari inti, dan hanya sedikit mengandung sitoplasma (Suryohudoyo, 2000).

## 2.2. Karsinogenesis

Proses karsinogenesis merupakan proses terjadinya kanker yang diawali dengan adanya kerusakan DNA atau mutasi pada gen-gen pengatur pertumbuhan, seperti gen *p53* dan *ras* (Hanahan and Weinberg, 2000). Mutasi tersebut umumnya disebabkan karena adanya paparan senyawa karsinogen seperti senyawa golongan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) (misalnya DMBA) yang metabolit aktifnya dapat berikatan dengan DNA (Rundle *et al.*, 2002). Proses menuju terjadinya kanker yang progresif umumnya berjalan lama dan melibatkan perubahan-perubahan genetik lanjut serta perubahan ekspresi gen yang dapat mempengaruhi sifat pertumbuhan sel.

Dasar perubahan seluler yang menyebabkan karsinogenesis adalah adanya perubahan basa DNA dari sel target yang biasa dikenal dengan mutasi (King, 2000). Menurut Silalahi (2006) mutasi yang terjadi pada DNA di dalam gen yang mengatur siklus sel (pertumbuhan, kematian dan pemeliharaan sel) akan



menyebabkan penyimpangan siklus sel, dan salah satu akibatnya adalah pembentukan kanker atau karsinogenesis.

Sebagian besar kanker disebabkan oleh faktor-faktor ekstrinsik, yaitu semua karsinogen lingkungan (karsinogen kimia, radiasi dan virus) dan faktor-faktor yang mengubah kondisi kesehatan seseorang, misalnya ketidak-seimbangan hormonal dan kekurangan zat tertentu dalam makanan. Faktor genetik dan faktor psikogenik juga mempunyai peranan menentukan kemungkinan seseorang untuk menderita kanker. Beberapa kanker mempunyai satu faktor yang dominan sebagai penyebabnya. Pertumbuhan kanker dapat dibagi dalam tiga fase utama yaitu fase inisiasi, promosi dan progresi (Kartawiguna, 2001).

**Inisiasi** merupakan stadium pertama dan merupakan hasil dari adanya perubahan genetik yang menyebabkan terjadinya proliferasi abnormal dari satu sel. Tahap inisiasi merupakan tahap yang diperlukan untuk pembelahan sel. Pada tahap ini terjadi perubahan genetik yang menetap akibat rangsangan bahan atau agen inisiator yang menimbulkan kerusakan DNA dan sel. Kerusakan DNA dan sel yang terjadi bersifat *irreversible*, respon sel yang termutasi berubah terhadap lingkungan dan tumbuh secara berlebihan sehingga berpotensi sebagai sel kanker. Jika sel normal berproliferasi secara berlebihan dan berkembang menjadi sel kanker maka sel tersebut akan memasuki tahap promosi (Saputra, 2010).

Stadium **promosi**, merupakan tahap yang kedua dari proses karsinogenesis. Promosi adalah proses yang menyebabkan sel terinisiasi berkembang menjadi sel preneoplasma oleh stimulus zat lain (promotor). Sel terinisiasi dapat tetap tenang bila tidak dihidupkan oleh zat yang disebut

promotor. Promotor sendiri tidak dapat menginduksi perubahan ke arah neoplasma sebelum bekerja pada sel terinisiasi (Kartawiguna, 2001). Perbedaan antara tahap inisiasi dan tahap promosi adalah sifat tahap promosi yang *reversible* artinya risiko timbulnya kanker akan hilang bila promotornya dihilangkan. Mungkin sifat yang *reversible* inilah yang menyebabkan pada tahap promosi ini terjadi penghambatan karsinogenesis secara kemopreventif, termasuk perubahan gaya hidup dan diet (Saputra, 2010).

Tahap akhir dari pertumbuhan sel kanker adalah **progresi**. Bagian yang paling penting dari tahap ini adalah invasi sel kanker sampai ke jaringan lokal dan menyebar ke tempat yang lebih jauh (metastase). Tahap ini bersifat *reversible* (Saputra, 2010). Stadium progresi lebih sering terjadi dari sel promosi, ditandai munculnya neoplasma ganas diikuti perubahan genetik nyata yang melibatkan perubahan struktur dalam inti sel. Jika stadium promosi adalah stadium yang potensial untuk maksud pencegahan terhadap perkembangan kanker, maka stadium progresi harus diobati dengan harapan kesembuhan. Pada tahap ini populasi sel tumor sepenuhnya adalah maligna (Pitot, 1993). Pada stadium progresi terdapat dua fase yaitu fase prevaskuler dan fase vaskuler. Pada fase vaskuler disebut juga fase **metastasis**, yaitu tahap perkembangan tumor yang bersifat maligna dan terjadinya pelepasan sel-sel tumor ganas dari koloni primernya. Sel-sel tumor ganas ini dapat memasuki saluran pembuluh darah sehingga dapat menyebar ke seluruh tubuh dan berkembang di tempat yang jauh (Schneider, 1997).

### 2.3. Karsinogenesis pada kanker *mammae* oleh karsinogen DMBA

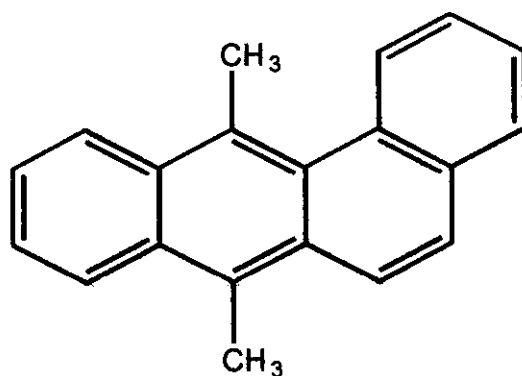
Pengetahuan tentang karsinogenesis pada kanker *mammae* diawali dengan penelitian pada hewan coba tikus yang diamati secara periodik perkembangan patogenesisnya. Perkembangan kanker diamati dengan cara palpasi dan pengambilan darah kapiler setiap minggu mulai minggu ke-4 sampai minggu ke-13 setelah pemberian DMBA. Pada akhir eksperimen semua tumor yang dapat dipalpasi dan yang tidak dapat dipalpasi dieksisi dan selanjutnya dimasukkan ke dalam formalin 10% lalu siap dianalisis secara histopatologi (Appelt dan Reicks, 1999).

Saat ini diketahui bahwa banyak senyawa alam dan sintetik, sisa-sisa industri batu bara, industri minyak, zat warna, bahan makanan dan minuman serta asap rokok mengandung senyawa karsinogen. Diperkirakan 80% penyakit kanker manusia disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan, khususnya zat kimia yang bersifat karsinogenik (Crank, 1992).

Salah satu senyawa karsinogen penyebab kanker adalah golongan *polisiklik aromatik hidrokarbon*. PAH merupakan kontaminan yang umum pada udara, air, tanah, serta merupakan hasil konjugasi dari agen radikal bebas selama proses pembakaran yang tidak sempurna dari minyak bumi dan batubara. Senyawa PAH akan dimetabolisme dalam tubuh menjadi bentuk epoksida yang reaktif. Senyawa reaktif ini akan mudah berikatan kovalen dengan makromolekul jaringan termasuk DNA (Nebert *et al.*, 2004).

Banyak senyawa dari golongan PAH yang sering digunakan dalam percobaan karsinogenesis. Umumnya senyawa golongan ini merupakan produk

pyrolisis dari minyak, bahan-bahan biologi, turunan tembakau, pembakaran batubara dan gas. Salah satu senyawa PAH adalah *7,12-dimetilbenz(a)antrasen* (DMBA). DMBA sudah banyak dipakai sebagai senyawa karsinogen dalam berbagai penelitian sebelumnya untuk menginduksi kanker payudara tikus (Singletary *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1999 ; Kubatka *et al.*, 2002). Struktur kimia DMBA memiliki 4 cincin aromatik yang berikatan, khas struktur PAH dengan tiga atau lebih cincin aromatik dan 2 substituent metal (Gambar 2.1) (Pitot and Dragan, 2001).



Gambar 2.1. Struktur kimia *7,12-dimetilbenz(a)antrasen* (DMBA) (Pitot and Dragan, 2001)

DMBA termasuk dalam kategori karsinogen sekunder. DMBA akan berubah menjadi bentuk ultimate karsinogen setelah mengalami metabolisme. Reaktivitas DMBA dapat meningkat karena adanya perubahan struktur menjadi bentuk kationik elektrofil dan atau radikal bebas. Pembentukan kationik elektrofil ini merupakan hasil esterifikasi DMBA oleh sulfotransferase menjadi benzilic carbonium (Gregus and Klaasen, 2001).

Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA yaitu

terbentuknya epoksid dihidrodiol dan kation radikal. Epoksid dihidrodiol akan mengikat gugus amino ekosiklik purin DNA secara kovalen menjadi bentuk *adduct* stabil, sedangkan kation radikal akan mengikat N7 atau C8 purin menjadi bentuk *adduct* tidak stabil yaitu depurinisasi menjadi tempat yang kehilangan apurinik pada DNA. Jalur epoksid dihidrodiol inilah yang bertanggungjawab terhadap inisiasi tumor oleh karsinogen DMBA daripada bentuk kation radikal (Kannan *et al.*, 2008).

#### **2.4 Tinjauan Histologi kelenjar *mammae* normal dan yang terkena kanker *mammae***

Kelenjar *mammae* adalah kelenjar yang kompleks, yang pada dasarnya merupakan kelenjar sudorifera yang kemudian mengalami modifikasi tinggi yang spesifik dan menghasilkan air susu pada betina. Pertumbuhan kelenjar *mammae* meningkat menjelang pubertas akibat pengaruh rangsangan hormon, dengan berlangsungnya kebuntingan maka pertumbuhan ditingkatkan secara nyata dan mencapai puncaknya pada periode laktasi, sesaat setelah partus. Kelenjar *mammae* merupakan kelenjar tubulo alveolar majemuk yang terdiri dari stroma yaitu rangka dasar yang merupakan jaringan ikat, parenkim yaitu bagian epitel seperti mioepitel dan epitel sekresi, saluran-saluran pembuluh darah dan limfe, jaringan syaraf serta jaringan lunak (Dellman dan Brown., 1992)

Alveoli dibungkus oleh epitel kubus yang bervariasi tinggi pada berbagai stadium sekresi. Alveoli dan salurannya dikelilingi oleh sel kontraktil mioepitel yang disebut sel keranjang (sel basket), membentuk kubus untuk menampung hasil sekresi sebelum disalurkan keluar alveoli. Produksi air susu yang

berkesinambungan menyebabkan lumen alveoli akan membesar. Tubulo alveolar membentuk lobular yang dipisahkan oleh jaringan ikat. Sistem penyaluran air susu berawal dari dalam lobulus sebagai duktus intralobularis, epitelnya berbentuk kubus sebaris tanpa aktivitas sekresi, setelah saluran melalui septa jaringan ikat interlobularis yang terdiri dari dua lapis sel berbentuk kubus terdapat serabut otot polos yang memanjang berkaitan dengan saluran tersebut, setelah bergabung dengan saluran yang lain membentuk duktus laktiferus. Lapisan epitel kubus tersebut berlanjut pada saluran yang lebih besar dan otot polos semakin jelas. Duktus laktiferus bermuara ke dalam sinus laktiferus di dasar puting susu, kemudian dari sinus laktiferus berlanjut ke permukaan luar puting susu. Sel interstisial pada kelenjar *mammae* memiliki struktur penunjang penting untuk unit sekretori yang mengandung pembuluh darah, limfe dan syaraf. Di dalam tiap unit sekretori terdapat jaringan ikat longgar dengan ikatan pembuluh darah dan limfe secara ekstensif, serta sel plasma dan limfosit (Dellman dan Brown, 1992).

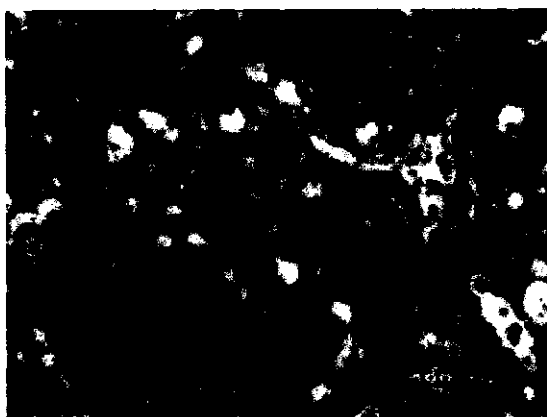
Pada kelenjar *mammae* normal nonlaktans ditandai dengan adanya banyak jaringan ikat dan sedikit unsur kelenjar. Lobulus mengandung kelompok-kelompok tubuli kecil yang dilapisi epitel kuboid atau silindris rendah. Tubuli ini mirip duktus dan tetap dalam tahap ini selama kelenjar *mammae* ini tidak aktif. Mungkin terdapat sedikit perubahan siklik pada kelenjar *mammae*, tetapi kelenjar ini mengalami regresi pada akhir siklus menstruasi. Kadang-kadang terlihat tubulus yang lebih nyata, seperti duktus intralobular kecil atau duktus ekskretorius intralobular besar yang keluar lobulus untuk bersatu dengan duktus interlobular. Tubuli ekskretorius dikelilingi jaringan ikat intralobular longgar dan halus yang

mengandung fibroblast, limfosit, sel plasma, dan eosinofil. Daerah ini dikelilingi oleh jaringan ikat padat interlobular dan jaringan lemak (Eroschenko, 2001).



Gambar 2.2. Gambaran kelenjar *mammae* normal nonlaktans dengan pewarnaan H.E dengan perbesaran 400x (Eroschenko, 2001).

Pada kelenjar *mammae* tikus yang terkena kanker *mammae* setelah inisiasi DMBA secara mikroskopis menunjukkan terjadinya proliferasi berat dari epitel acini kearah lumen acini, ukuran epitel acini bervariasi disertai ditemukan gambaran mitosis. Masa tumor yang solid (padat) terlihat sebagai lobulus dari tumor sel yang dipisahkan oleh jaringan ikat tipis. Perkembangan neoplasma berlanjut sampai pada tahap progresi yang menetap (Hamid, 2010)



Gambar 2.3. Gambaran kelenjar *mammae* yang terkena kanker *mammae* setelah inisiasi DMBA (Hamid, 2010)

## 2.5 Tinjauan tentang *Grading* dan *Staging*

Perubahan histopatologi kelenjar *mammae* adalah perubahan tingkat mikroskopik pada kelenjar *mammae*. Metode penilaian gambaran histopatologi kelenjar *mammae* (*Grading*) berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Elston and Ellis, 1991

Penilaian dari metode semikuantitatif untuk *grading* histopatologis adalah dengan menilai kanker dari tiga parameter, yaitu : formasi tubulus, variasi aktivitas nukleus dan mitosis yang kemudian setiap elemen yang dinilai atau di skor diberi nilai 1-3. Dilihat dalam 5 lapang pandang yang kemudian skornya di rata-rata dan diberi rentang skor sama dengan nilai angka romawi (Rezaie *et al*, 2009).

1. Formasi Tubulus : untuk menilai formasi tubulus, struktur kualitatif tubular harus menunjukkan pusat lamina jelas, semua bagian dari setiap blok tumor diberi skor yang dilihat dari struktur tubular yang dinilai secara semikuantitatif. Skor dari satu jika >75% dari daerah tersebut terdiri dari tubulus yang normal. Skor dua jika tumor antara 10 dan 75% dari lapang pandang yang menunjukkan formasi tubulus. Skor tiga jika tubulus yang nampak <10%.
2. Nuclear *pleomorfisme* : skor 1 jika inti tumor kecil, dengan peningkatan sedikit atau variasi ukuran dibandingkan dengan inti normal dan memiliki garis reguler dan keseragaman kromatin. Skor 2 diberikan bila inti lebih besar dari normal, memiliki inti vesikuler lebih terbuka yang terlihat, biasanya tunggal, nukleolus dan terdapat variasi dalam ukuran dan bentuk.



Sebuah variasi yang nyata pada ukuran dan bentuk, terutama ketika inti yang sangat besar dan aneh terlihat pada skor 3, lebih jauh lagi adalah inti vesikuler dengan nukleoli membesar dan sering beberapa menonjol.

3. Jumlah mitosis : skor 1 jika dalam satu lapang pandang terdapat 0 – 7 mitosis. Dalam satu lapang pandang terdapat 8 – 16 (skor 2). Dan jika dalam satu lapang pandang terdapat >17 (skor 3).

## **2.6 Tinjauan Tentang Daun Salam (*Eugenia polyantha*)**

### **2.6.1. Klasifikasi Daun Salam (*Eugenia polyantha*)**

Menurut Tjitrosoepomo (1996) daun salam (*Eugenia polyantha*) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Klas	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaaceae
Genus	: Eugenia
Spesies	: <i>Eugenia polyantha</i>

### **2.6.2. Morfologi Tanaman**

Salam tumbuh liar di hutan dan pegunungan, atau ditanam di pekarangan dan sekitar rumah. Pohon ini dapat ditemukan di daerah dataran rendah hingga ketinggian 1400 meter. Tinggi pohon salam mencapai 25 meter, batang bulat,

permukaan licin, bertajuk rimbun dan barakar tunggang. Daun tunggal, letak berhadapan panjang tangkai daun 0,5-1 cm. Daun berbentuk lonjong sampai elips atau bundar telur sungsang, ujung meruncing, pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas licin berwarna hijau tua, permukaan bawah berwarna hijau muda, panjang 5-15 cm, lebar 3-8 cm, jika diremas berbau harum. Bunga majemuk tersusun dalam malai yang keluar dari ujung ranting, berwarna putih, baunya harum. Buahnya bulat, diameter 8-9 mm, buah muda berwarna hijau, setelah masak menjadi merah gelap, rasanya agak sepat. Biji bulat, diameter sekitar 1 cm, berwarna cokelat. Pohon salam ditanam untuk diambil daunnya sebagai pelengkap bumbu dapur, sedangkan kulit pohonnya digunakan sebagai bahan pewarna jala dan buahnya dapat dimakan. Pohon salam dapat pula diperbanyak dengan biji, cangkok, atau setek (Dalimatha, 2003).



Gambar 2.3. Daun Salam (*Eugenia polyantha*) (Sumono and Wulan, 2009)

### 2.6.3. Nama Daerah

Di Indonesia tanaman ini memiliki beberapa nama daerah seperti : Meselanagan (Sumatra), ubar serai (Melayu), gowok (Sunda), manting, salam (Jawa), salam (Madura) (Dalimartha, 2003).

#### 2.6.4. Nama Lain

Nama lain dari *Eugenia polyantha* adalah *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp, *Eugenia lucidula* Miq. (Tjitrosoepomo, 1996).

#### 2.6.5. Daerah Distribusi dan Habitat

Terdapat di Birma ke arah selatan sampai Indonesia. Di Jawa tumbuh di Jawa Barat sampai Jawa Timur pada ketinggian 5 m sampai 1.000 m di atas permukaan laut. Pohon Salam dapat tumbuh di dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 1800 m, banyak tumbuh di hutan maupun rimba belantara (Dalimarta, 2003).

#### 2.6.6 Kandungan Kimia

Menurut Suyekti dkk (1994) hasil uji fotokimia ekstrak kasar daun salam dan fraksi-fraksinya, menunjukkan adanya lima golongan senyawa yaitu saponin, terpenoid, steroid, flavonoid dan tannin. Menurut Sudarsono dkk (2002) juga menyebutkan minyak atsiri dalam daun salam terdiri dari seskuiterpen, lakton dan fenol.

Kandungan kimia lain *Eugenia polyantha* yaitu tanin, minyak atsiri, seskuiterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, dan karbohidrat. Kandungan kimia lainnya yaitu Thiamin, Riboflavin, Niacin, vitamin B6, vitamin B12, dan folat. Bahkan mineral seperti selenium terdapat di dalam kandungan daun salam (Pidrayanti, 2008). Selain itu daun salam juga mengandung beberapa vitamin, di antaranya vitamin C, vitamin A, vitamin E yang berfungsi sebagai

antioksidan (Riansari, 2008).

Vitamin C dan E merupakan antioksidan yang berupa mikronutrien. Vitamin E ini yang larut dalam lemak ini merupakan antioksidan yang melindungi komponen sel serta membran sel dari oksidasi oleh radikal bebas. Sedangkan fungsi dari vitamin C yaitu sebagai antioksidan yang dapat melindungi molekul-molekul yang sangat diperlukan oleh tubuh, seperti protein, lipid, asam nukleat dan karbohidrat dari kerusakan oleh radikal bebas (Lelono *et al.*, 2009).

Flavonoid yang terkandung dalam daun salam, selain memberikan aroma yang khas, juga diketahui memiliki efek antioksidan (Kwang-Geun dan Shibamoto, 2001). Flavonoid tersebut merupakan senyawa fenolik alam yang memiliki sifat antioksidan karena mampu menangkap radikal bebas dengan melakukan reaksi oksidasi di dalam sel dan berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker (Meiyanto dkk., 2007).

Senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim *xanthin oksidase*, *siklooksigenase (COX)* dan *lipooksigenase (LOX)* yang diperlukan dalam proses peroksidasi sehingga menunda siklus sel/*cell cycle arrest* (Ren *et al.*, 2003). Sebagian besar flavonoid telah terbukti mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia namun bersifat tidak toksik pada sel normal manusia (Ren *et al.*, 2003).

Senyawa golongan flavonoid mampu menghambat proses karsinogenesis baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penghambatan terjadi pada tahap inisiasi, promosi maupun progresi melalui mekanisme molekuler antara lain inaktivasi

senyawa karsinogen, antiproliferatif, penghambatan angiogenesis dan daur sel, induksi apoptosis, dan aktivitas antioksidan (Ren *et al.*, 2003). Sifat antioksidan dari senyawa flavonoid juga dapat menghambat proses karsinogenesis. Fase inisiasi kanker seringkali diawali melalui oksidasi DNA yang menyebabkan mutasi oleh senyawa karsinogen (Kakizoe, 2003). Karsinogen aktif seperti radikal oksigen, peroksida dan superoksida, dapat distabilkan oleh flavonoid melalui reaksi hidrogenasi maupun pembentukan kompleks (Ren *et al.*, 2003).

## **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 sirynges*, 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]antracen* (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 :

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

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.

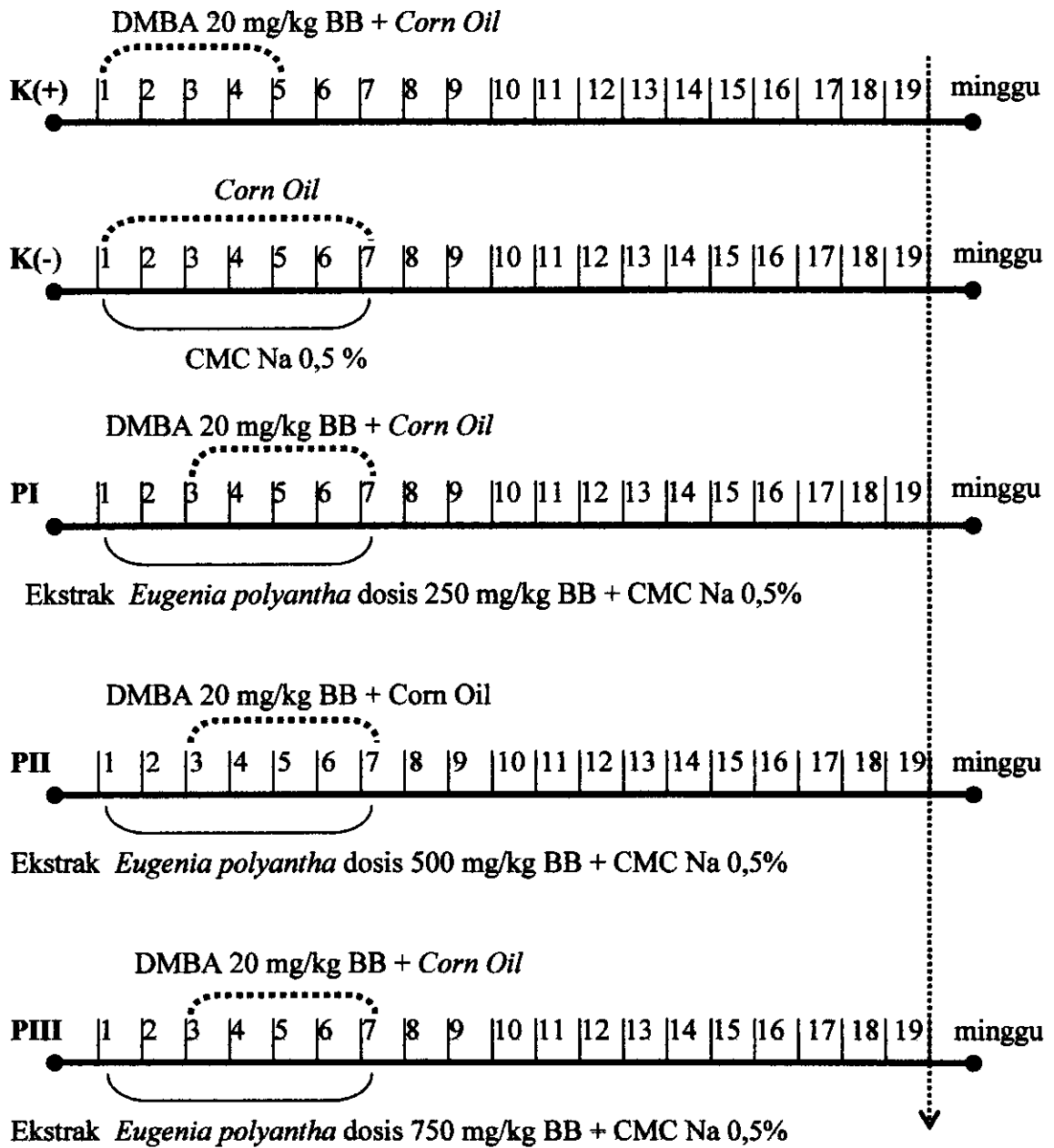
**Kelompok P2 : Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 500 mg/kg BB**

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 Hematoksilin 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).

Perlakuan \ Ulangan	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)

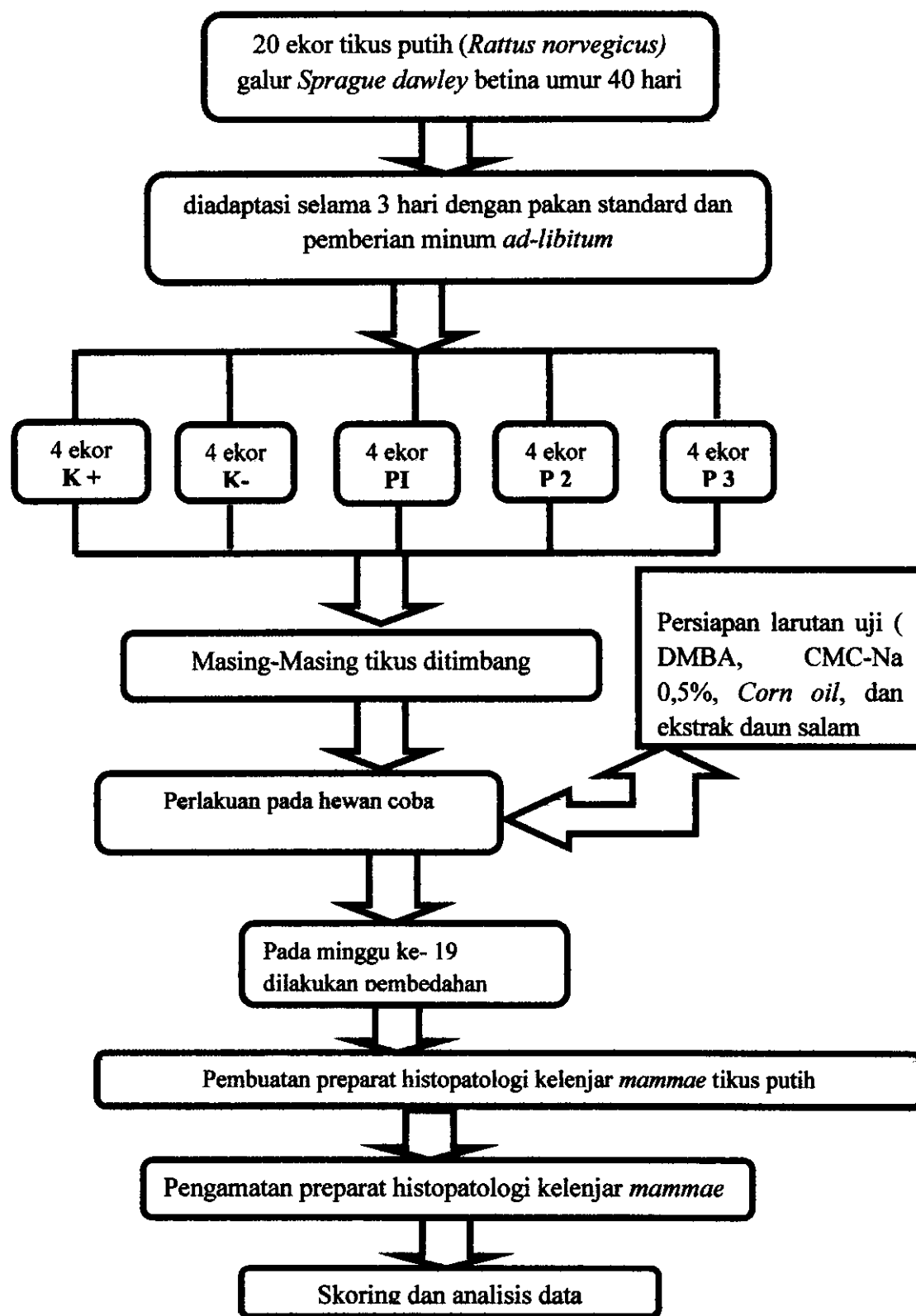
Setiap elemen yang dinilai atau diskor diberi nilai 1-3. Dilihat dalam 5 lapang pandang yang kemudian skornya di rata-rata.

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

## **BAB 4**

# **HASIL PENELITIAN**

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### Pengamatan Perubahan Histopatologi Kelenjar *Mammae*

Pada penelitian ini, pengamatan perubahan histopatologi pada kelenjar *mammae* tikus galur *Sprague dawley* dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop Olympus ® CX-21 terhadap preparat histopatologi kelenjar *mammae* dengan pewarnaan HE. Pengamatan terhadap gambaran histopatologi kelenjar *mammae* dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu : kelompok kontrol positif (DMBA 20 mg/kg BB), kelompok kontrol negatif (CMC-Na 0,5 % + *corn oil*), kelompok perlakuan I (ekstrak *Eugenia polyantha* 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB), kelompok perlakuan II (ekstrak *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB), kelompok perlakuan III (ekstrak *Eugenia polyantha* 750 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB). Penetapan skor dilakukan pada seluruh preparat secara mikroskopis dengan metode Elston and Ellis (1991) yang dijadikan acuan pada penghitungan skor kanker *mammae*. Hasil skoring yang didapat selanjutnya ditabulasi kemudian diolah dengan program SPSS 18 for *Windows*.

#### 4.1 Formasi asiner atau tubulus

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa terdapat hasil yang berbeda nyata pada masing-masing kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan bahwa Kelompok K(-) berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan yaitu K(+), P1, P2 dan P3 ( $p < 0,05$ ), dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Efek pemberian ekstrak daun salam *Eugenia polyantha* terhadap skoring formasi tubulus pada gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus putih.

Perlakuan	Median
Kelompok K (+) DMBA 20 mg/kg BB	2,80 <sup>e</sup>
Kelompok K (-) CMC-Na 0,5% + <i>Corn oil</i>	1,20 <sup>a</sup>
Kelompok P1 <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	2,20 <sup>c</sup>
Kelompok P2 <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	1,60 <sup>b</sup>
Kelompok P3 <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB + Dmba 20 mg/kg BB	2,40 <sup>d</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Atipia nukleus

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa terdapat hasil yang berbeda nyata pada masing-masing kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan bahwa Kelompok K(-) berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan yaitu K(+), P1, P2 dan P3 ( $p < 0,05$ ). Kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ( $p > 0,05$ ), dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Efek pemberian ekstrak daun salam *Eugenia polyantha* terhadap skoring atypia nukleus pada gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus putih.

Perlakuan	Median
Kelompok K (+) DMBA 20 mg/kg BB	2,80 <sup>e</sup>
Kelompok K (-) CMC-Na 0,5% + <i>Corn oil</i>	1,20 <sup>a</sup>
Kelompok P1 <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	2,20 <sup>cd</sup>
Kelompok P2 <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	1,60 <sup>b</sup>
Kelompok P3 <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB + Dmba 20 mg/kg BB	2,20 <sup>d</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3 Jumlah mitosis

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa terdapat hasil yang berbeda nyata pada masing-masing kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan bahwa Kelompok K(-) berbeda nyata dengan kelompok perlakuan K(+), P1, dan P3 ( $p < 0,05$ ). Kelompok K(-) dengan P2 tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ( $p > 0,05$ ).



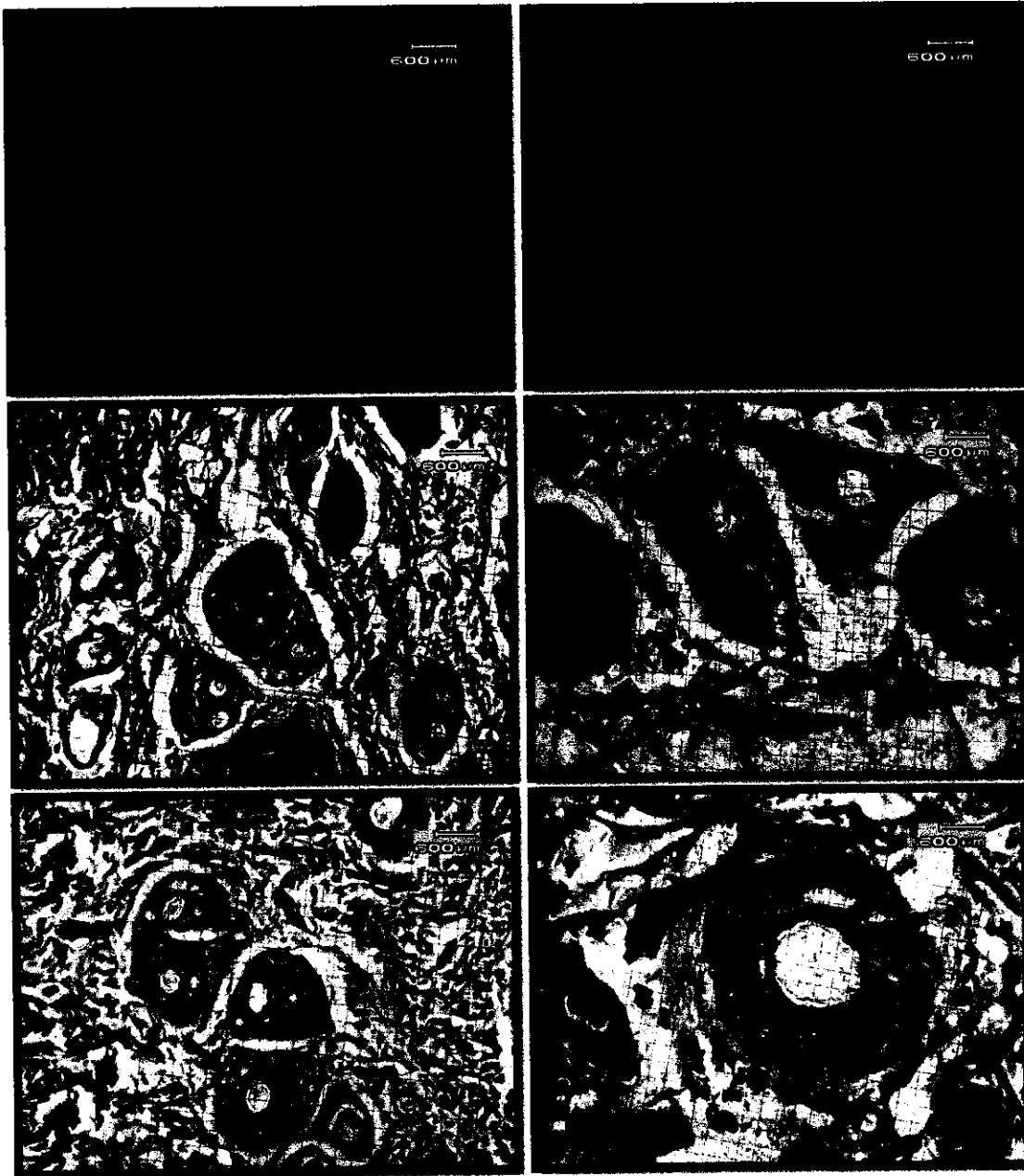
Tabel 4.3. Efek pemberian ekstrak daun salam *Eugenia polyantha* terhadap skoring jumlah mitosis pada gambaran histopatologi kelenjar *mammae* tikus putih.

Perlakuan	Median
Kelompok K (+) DMBA 20 mg/kg BB	2,50 <sup>d</sup>
Kelompok K (-) CMC-Na 0,5% + <i>Corn oil</i>	1,20 <sup>a</sup>
Kelompok P1 <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	2,20 <sup>bc</sup>
Kelompok P2 <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB	1,40 <sup>a</sup>
Kelompok P3 <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB + Dmba 20 mg/kg BB	2,20 <sup>c</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Hasil penilaian atau *grading* tampak bahwa perlakuan kontrol positif (pemberian DMBA 20 mg/kg BB) menunjukkan grade III, artinya jumlah lobulus atau aciner <10%, bentuk dan ukuran nukleus bervariasi, sel tampak keruh ditandai dengan nukleolus tampak kurang jelas. Jumlah sel yang mengalami mitosis >17 per lapang pandang. Pada kelompok P1 (pemberian *Eugenia polyantha* 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB) dan P3 (pemberian *Eugenia polyantha* + DMBA 20 mg/kg BB) menunjukkan grade II, artinya jumlah lobulus atau aciner antara 10-75%, bentuk dan ukuran nukleus sedang sampai besar agak bervariasi, jumlah mitosis antara 8-16 per lapang pandang. Sedangkan pada kontrol negatif (pemberian CMC-Na 0,5% + *corn oil*) dan pada kelompok P2 (pemberian *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB) menunjukkan grade I, berarti jumlah lobulus atau aciner >75%, nukleus kecil dan seragam, jumlah sel yang mengalami mitosis per lapang pandang yaitu antara 0-7.

Hasil gambaran histopatologi kelenjar *mammae* yang digunakan sebagai *grading* dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Gambaran histopatologi kelenjar *mammae* yang digunakan sebagai *grading*, A. Formasi tubulus dengan skor 1 >75%, B. Formasi tubulus dengan skor 3 <10% (Perbesaran 100x), C. Atipia nucleus dengan skor 1, D. Atipia nucleus dengan skor 3 (pembesaran 400x), E. Sel epitel tanpa mitosis skor 1 (pembesaran 1000x), F. Sel epitel dengan mitosis skor 3 (pembesaran 1000x).

# **BAB 5**

## **PEMBAHASAN**

## BAB 5 PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa total kerusakan histopatologi kelenjar *mammae* pada kelompok K(+) (pemberian DMBA 20 mg/kg BB + pelarut *corn oil*) menunjukkan *grade* paling tinggi yaitu *grade* III dengan rerata skor 3, berarti terdapat jumlah lobulus atau aciner terendah yaitu <10%, kemudian terdapat gambaran nukleus dengan bentuk dan ukuran bervariasi dan sel tampak keruh ditandai dengan adanya nukleolus yang tampak kurang jelas. Gambaran sel yang berada pada fase mitosis dengan skor 3 jumlahnya lebih banyak, yaitu lebih dari 17 sel per lapang pandang. Cara skoring dengan metode *Grading* tersebut juga sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hamid, 2010 dan Rezaie, *et al* 2009 bahwa karsinoma kelenjar *mammae* ditandai dengan adanya jumlah formasi tubulus yang rendah, nukleus dengan bentuk dan ukuran bervariasi dan jumlah mitosis yang lebih dari 17 sel per lapang pandang.

Pada perlakuan P1 (pemberian DMBA + *Eugenia polyantha* 250 mg/kg BB) dan pada perlakuan P3 (pemberian DMBA + *Eugenia polyantha* 750 mg/kg BB) menunjukkan *grade* II dengan skor rerata 2, yaitu jumlah tubulus dalam satu lapang pandang berkisar antara 10-75%, bentuk dan ukuran nukleus sedang sampai besar agak bervariasi, jumlah mitosis berkisar antara 8-16 per lapang pandang.

Pada perlakuan K(-) (pemberian CMC-Na 0,5% + *corn oil*) dan pada perlakuan P2 (pemberian DMBA + *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB) menunjukkan *grade* I dengan skor rerata 1, berarti jumlah lobulus atau aciner

>75%, nukleus kecil dan seragam, jumlah sel yang mengalami mitosis per lapang pandang yaitu berkisar antara 0-7.

Kriteria pertama dalam penentuan *grading* adalah pengamatan pada formasi asiner atau tubulus yang menggambarkan persentase kepadatan tubulus dalam satu lapang pandang. Berdasarkan hasil *grading* pada penelitian ini menggambarkan bahwa jumlah tubulus identik dengan kerapatan formasi antar tubulus atau duktus kelenjar *mammae* yang sering dikaitkan dengan peran adesi sel. Adesi antar sel tampaknya memegang peranan pada hasil formasi tubulus dengan jumlah sedikit pada awal karsinoma atau pada *preneoplastic lesion* (Asgeirsson *et al*, 2000).

Kriteria kedua dalam penentuan *grading* adalah pengamatan inti sel yaitu *nuclear atypia* atau *pleomorfisme*, pada karsinoma *mammae* ditandai dengan bentuk dan ukuran inti sel yang bervariasi, nukleoli tampak kecil dan kurang jelas atau kabur (Rezaie *et al* 2009). Bentuk dan ukuran nukleus digunakan sebagai faktor prognostik, bagaimanapun fitur ukuran nukleus tidak bisa dipisahkan sebagai tumor primer dari metastasis. Evaluasi ukuran nukleus dapat digunakan untuk morfometrik *grading* pada kanker *mammae* (Kronqvist *et al*, 1998)

Kriteria ketiga adalah pengamatan jumlah sel yang mengalami mitosis atau aktivitas mitosis. Hasil penilaian *grading* melalui pengamatan jumlah mitosis yang tertinggi terjadi pada perlakuan K(+) (pemberian DMBA 20 mg/kg BB), yaitu rerata skor 3 artinya lebih dari 17 sel yang mengalami aktivitas mitosis dalam satu lapang pandang, sedangkan yang terendah terjadi pada perlakuan K(-) (pemberian CMC-Na 0,5% + *corn oil*) dan pada perlakuan P2 (pemberian DMBA

+ *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB), yaitu rerata skor 1 artinya terdapat 0-7 sel yang mengalami aktivitas mitosis dalam satu lapang pandang. Aktivitas mitosis ini juga merupakan salah satu kriteria dalam penentuan *grade* histopatologik kelenjar *mammae* (Dalle *et al* 2010).

Pada kelompok perlakuan I dengan pemberian dosis *Eugenia polyantha* 250 mg/kg BB dan perlakuan III dengan pemberian dosis *Eugenia polyantha* 750 mg/kg BB mampu menurunkan tingkat kerusakan mikroskopis kelenjar *mammae* secara nyata ( $p < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif namun kelompok perlakuan I dan III ini menunjukkan hasil penilaian *grade* II yang artinya sudah menunjukkan efek kemopreventif untuk menghambat karsinogen dari kanker *mammae* namun masih dalam tingkat sedang. Untuk perlakuan II dengan pemberian dosis *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB merupakan dosis paling optimal karena menurunkan kerusakan histopatologi kelenjar *mammae* paling nyata bila dibandingkan dengan dosis ekstrak pada perlakuan I maupun perlakuan III yaitu dengan skor penilaian *grade* I.

Pada hasil penelitian ini didapatkan bahwa dosis ekstrak paling tinggi, yaitu dosis 750 mg/kgBB tidak memberikan hasil paling optimal dalam menurunkan kerusakan histopatologi kelenjar *mammae*. Peningkatan dosis ekstrak akan berpengaruh pada kadar flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak namun semakin tinggi dosis juga akan menginduksi enzim GST (*Glutathione S-transferase*) dalam jumlah yang sangat tinggi pula (Kolacz, *et al.*, 2007).

Pada dasarnya, GST (*Glutathione S-transferase*) merupakan kelompok enzim sitosolik multifungsi yang di hasilkan di hepar dan berperan penting dalam

detoksifikasi senyawa elektrofilik xenobiotik melalui konjugasi dengan glutathion (GSH). Aktivitas GST (*Glutathione S-transferase*) dapat dipacu oleh beberapa jenis senyawa baik senyawa endogen maupun senyawa eksogen. Konjugat glutathion kemudian ditransport ke ginjal untuk diekskresikan melalui urin sebagai asam merkapturat. Dengan adanya peningkatan enzim GST ini, maka senyawa karsinogen akan mengalami detoksifikasi sehingga cepat diekskresikan dan tidak sempat mengalami tahap-tahap perkembangan selanjutnya menjadi kanker. (Hesham, 2005).

## **BAB 6**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan gambaran histopatologi kelenjar *mammae* yaitu formasi tubulus, atypia nukleus, dan jumlah mitosis antar kelompok perlakuan kontrol positif induksi DMBA saja dengan perlakuan kontrol negatif dan perlakuan ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) berbagai dosis (250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB) + DMBA
2. Dosis ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) 500 mg/kg BB optimal dalam menurunkan kerusakan histopatologi kelenjar *mammae*.

### 6.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diuraikan sebagai berikut :

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk eksplorasi senyawa aktif dari ekstrak etanol *Eugenia polyantha* sebagai antikarsinogenesis.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan dosis ekstrak daun salam *Eugenia polyantha* dosis 500 mg/kg BB sebagai efektivitas dalam pencegahan karsinogenesis.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

**RIZALDI FERIAN UTAMA.** Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam Terhadap Gambaran Histopatologi kelenjar *Mammae* Tikus Galur *Sprague Dawley* Yang Di Inisiasi DMBA (Dimetilbenz[a]antrasen). Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan Bapak Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing penelitian, Ibu Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. selaku dosen pembimbing kedua.

Kanker adalah tumor ganas yang ditandai dengan pertumbuhan abnormal sel-sel tubuh, kanker juga merupakan penyebab kematian nomor tiga setelah penyakit jantung dan stroke. Salah satu keganasan yang sering ditemukan di seluruh dunia adalah kanker payudara. Kanker *mammae* merupakan kanker yang paling banyak dialami wanita di seluruh dunia dan menduduki urutan kedua penyebab kanker serta kematian pada wanita.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh ekstrak etanolik daun salam (*Eugenia polyantha*) yang dilihat dari gambaran histopatologi kelenjar *mammae* berdasarkan *grading* (formasi tubulus, atypia nukleus dan jumlah mitosis) terhadap senyawa karsinogenik DMBA dan dosis yang paling optimal dalam menurunkan kerusakan histopatologi kelenjar *mammae*. Subyek uji penelitian ini adalah tikus putih galur *Sprague dawley* betina umur 45 hari yang kemudian dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol positif (pemberian DMBA 20 mg/kg BB), kelompok kontrol negatif (pemberian CMC-Na 0,5 % + *corn oil*),

kelompok perlakuan I (pemberian ekstrak *Eugenia polyantha* 250 mg/kg BB dalam CMC-Na 0,5 % + DMBA 20 mg/kg BB dalam *corn oil*), kelompok perlakuan II (pemberian ekstrak *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB dalam CMC-Na 0,5 % + DMBA 20 mg/kg BB dalam *corn oil*), kelompok perlakuan III (pemberian ekstrak *Eugenia polyantha* 750 mg/kg BB dalam CMC-Na 0,5 % + DMBA 20 mg/kg BB dalam *corn oil*). Pengamatan dilakukan secara mikroskopis, yang dilihat pada lima lapangan pandang yang berbeda dengan perbesaran 100 kali, 400 kali dan 1000 kali. Perubahan yang diamati antara lain yaitu formasi tubulus, atypia nukleus, dan jumlah mitosis. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Eugenia polyantha* 500 mg/kg BB mampu menurunkan kerusakan histopatologi kelenjar *mammae* dan merupakan dosis paling optimal dalam menurunkan tingkat kerusakan histopatologi kelenjar *mammae*.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, N.N. 2008. Pengaruh Pemberian Polifenol Teh Hijau Terhadap Skor Derajat Histologis Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H [Karya Ilmiah]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Amindariati, S. and A. Gunawan, 2008. Buku Histologi Paket I. Edisi 6. Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga Surabaya. 1-17.
- Anderson, L.E., G.A. Boorman, J.E. Morris, L.B. Sasser, P.C. Mann, S. L. Grumbein, J.R. Hailey, A. Mc Nally, R.C. Sills, and J.K. Haseman. 1999. Effect of 13 week Magnetic Fields Exposure on DMBA-Initiated Mammary Gland Carcinomas in Female Sprague-Dawley Rats, *Carcinogenesis* (20) 8: 1615-1620.
- Appelt, L.C., and M.M. Reicks. 1999. Soy Induces Phase II But Does Not Inhibit Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Carcinogenesis in Female Rats. *J of Nutrition*. 129 : 1820-1826.
- Asgeirsson, K.S, J.G. Jonasson, L. Tryggvadottir, K. Olafsdottir, J.R. Sigurgeirsdottir, S. Ingvarsson, and H.M. Ogmundsdottir. 2000. Altered expression of E-cadherin in breast cancer. patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer*. (4): 1098-1106.
- Barl, J., E. Cohen-Noyman, B. Geiger, and M. Oren. 2004. Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *J. Oncogene*: 1-10.
- Crank, G. 1992. Environmental Carcinogenesis. *Majalah Farmasi Indonesia*, 3, 4.
- Dalimartha, S. 2003. Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker. Penerbit Swadaya. Jakarta. 1-52.
- Dalle, J.R, W.K. Leow, D. Raccoceanu, A.E. Tutac, T.C. Putti. 2010. Automatic Breast Cancer Gradding of Histopathological Images.
- Dellman, H.D and E.M. Brown. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Penerjemah R.Hartono. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Elston, C.W., and I.O. Ellis. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value histological grade in breast cancer : experience from a large study with long term follow up. *Histopathology* 19 : 403-410.

- Eroschenko, V.P. 2001. Atlas Histologi Di Fiore Dengan Korelasi Fungsional. Edisi 9. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 326-331.
- Gregus, Z. and C.D. Klaasen. 2001. Mechanisms of Toxicity, in Curtis D. Klaasen, Cassaret & Doull's : Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> Ed., Mc.Graw Hill. Medical Publishing Division, New York, 40-41.
- Hamid, I.S. 2010. Efek Ekstrak *Gynura procumbens* Pada Karsinogenesis Kelenjar Mammae Tikus Yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a)antrasen : Kajian Enzimatik dan Genetik [Disertasi]. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada.
- Hanahan, D. and R.A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer, Cell, Medical Publishing Division, New York; 100: 57-70.
- Hesham, A.E. 2005. Hepatoprotective Effect of Green Tea (*Camellia sinesis*) Extract Againts Tamoxifen-Induced Liver Injury in Rat. Journal of Biochemistry andMolecular Biology 38: 563-570.
- Junqueira, C.L., J. Carneiro and R.O. Kelley. 1998. Histologi Dasar. Edisi 8. Penerbit Buku Kedokteran E.G.C. Jakarta. 1-3, 370-388.
- Kakizoe, T. 2003. Chemoprevention of Cancer Focusing on Cincial Trial. National Cancer Center. Jpn.J.Clin.Oncol. 33(9): 421-442.
- Kannan, K. And E. Perrota. 2008. Polycyclic Aromatic Hidrocarbons in Livers of California Sea Others. Journal of Science direct. 71: 649-655.
- Kartawiguna, E. 2001. Faktor – Faktor yang Berperan pada Karsinogenesis. Journal Kedokteran Trisakti. 20(1) : 16-26.
- King, R. J. B. 2000. Cancer Biology, 2<sup>nd</sup> Ed., Pearson Eduation Limited, London.
- Kolaez, G. S., J. Klusek., A. Kolataj. 2007. The Effect of Exogenous GSH, GSSG and GST-E on Glutathion concentration and Activity of Selected Glutathione Enzimes in Liver, Kidney and Muscle of Mice. Journal of Animal Science. 2: 111-117.
- Kronqvist. P, T. Kuopio, Y. Collan. Morphometric grading of invasive ductal breast cancer. I. Thresholds for nuclear grade. *Br J Cancer*. 78(6): 800-5.
- Kubatka, P., E. Ahlersova., I. Ahlers, B. Bojkova, K. Kalicka, E. Adamekova, M. Markova, M. Chamilova, and M. Cermakova. 2002. Variability of Mammary Carsinogenesis Induction in Female Sprague Dawley and Wistar Rats : the Effect of Season and Age. *Physol. Res*. 633-640.

- Kumala, N. 2008. Efek Lignan Terhadap Resiko Kanker Mammar. Indonesian Journal of Cancer 1: 13-17.
- Kusriningrum R.S. 2008. Perancangan Percobaan. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Kwang-Geun, L. Dan T. Shibamoto. 2001. Antioksidant Property of aroma extract isolated from clove buds [*syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry*]. Food Chemistry 74 (4): 443 - 448.
- Lelono, R.A.A., S. Tachibana., K. Itoh. 2009. In Vitro Antioksidative activities and polyphenol content of *Eugenia polyantha* Wight grown in Indonesia. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12 (24), 1564-1570.
- Li, Q. 2010. Immunosuppression of T- Dependent Antibody Responses by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Arsenic in Spleen Cells from C57BL/6J Mice [M.Sc. Thesis]. The University of New Mexico.
- Liptak, J. 2004. Mammary Tumors in Cats and Dogs. <http://www.acvs.org/AnimalOwners/HealthConditions/SmallAnimalTopics/MammaryTumorsinCatandDogs/>. [22 Desember 2011]
- Mehotcheva, H.T. 2008. The Kruskal Wallis Test. //http: let.rug.nl/nerbonne/teach/Mehotcheva-2008kruskalwallis.pdf [27 Februari 2012].
- Meiyanto, E. 1999. Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker. Menelusuri Mekanisme Aksinya. MFI. 10(4): 224-236.
- Meiyanto, E., S. Susilowati, S. Tasminatun, R. Murwanti, dan Sugiyanto. 2007. Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik *Gynura procumbens (Lour)*, Merr pada Karsinogenesis Kanker Payudara Tikus. Majalah Farmasi Indonesia 18(3): 154-161.
- Melendez-Colon, V., I. Luch, A. Seidel and A. Baird. 1999. Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hidrocarbon Results From Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites, *Carcinogenesis*. 20(10): 1885-1891.
- Nebert, D.W., T.P. Dalton., A.B. Okey., F.J. Gonzalez, 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Reseptor-mediated Induction of the CYP1 enzim in Environmental Toxicity and Cancer. J. Biol. Chem. 279: 23847-23850.
- Pidrayanti, L.T.M.U. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Terhadap Kadar LDL Kolesterol Serum Tikus Jantan Galur Wistar Hiperlipidemia. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.



- Pitot, H.C. 1993. The Molekuler Biology of Carcinogenesis, *Cancer*. 72: 962-970.
- Pitot, H.C., and Y.P. Dragan., 2001, Chemical Carcinogenesis, in Curtis D. Klaasen, Casarett & Doull's : Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> ed, Mc. Graw Hill. Medical Publishing Division, New York : 241-280.
- Pratiwi, D., N. Hastuti, I. Armandari, N. Nur, M. Ikawati, S. Riyanto, and E. Meiyanto. 2008. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) Meningkatkan Ekspresi P53 pada Sel Payudara Tikus Galur *Sprague dawley* Terinduksi 7,12 Dimetilbenzen[A]Antrasena. Prosiding Kongres Ilmiah ISFI XVI. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Ren, W., Z. Qiao., H. Wang. L. Zhu. dan L. Zhang. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Review*. 23(4): 519-534.
- Rezaie A., A. Tavasoli., A. Bahonar., and M. Mehrazma. 2009. Grading in Canine Mammary Gland Carcinoma. *Journal of Biological Sciences* 9(4): 333-338.
- Riansari, A. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Terhadap Kadar Kolesterol Total Serum Tikus Jantan Galur Wistar Hiperlipidemia. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Rundle, A.D. Tang. P. Brandt-Rauf., J. Zhou, A. Kellyc, F. Schnabled, and F.P. Pererab. 2002. Association between the ras *p21* oncoprotein in blood samples and breast cancer. *Cancer Letters* 185 : 71-78.
- Saputra, Y.W. 2010. Efek Kemopreventif Ekstrak Metanol Kulit Kayu Kluwih (*Artocarpus communis* J.R.&G) pada Karsinogenesis Kanker Payudara Tikus Betina yang Diinduksi dengan DMBA. [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Schneider, K.A. 1997. Cancer Genetics, *Encyclopedia of Human Biology*. 2: 311-320.
- Silalahi, J. 2006. Antioksidan dalam Diet dan Karsinogenesis. *Cermin Dunia Kedokteran*. 153: 39-42.
- Singletary, K., C. Macdonald, and M. Wallig, 1997. The Plasticizer Benzyl Butyl Phtalate (BBP) Inhibits 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced rat Mammary DNA Adduct Formation and Tumorigenesis, *Carsinogenesis* 18(8): 1669-1673.

- Sudarsono, D.S., I.A. Gunawan. Wahyuono. Donatus., dan Purnomo. 2002. Tumbuhan Obat II, Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan. Pusat Studi Obat Tradisional, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 96-100.
- Sumono, A., and A. Wulan. 2009. Kemampuan Air Rebusan Daun Salam (*Eugenia polyantha* W) dalam Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri *Streptococcus* sp. *Majalah Farmasi Indonesia*. 20(3): 112-117.
- Suryohudoyo P. 2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta. 129.
- Susilowati, S. 2004. Efek Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr terhadap Proliferasi Sel Kanker Payudara Tikus yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz [a] antracen (DMBA). Thesis. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Suyekti, S., A. Muhtadi dan Supriyatna. 1994. Aktivitas Hipoglikemik Daun Salam dan Herba Bulu Lutung. *Cermin Dunia Kedokteran*. No.95: 50-54.
- Tjitrosoepomo dan Gembong. 1996. Morfologi Tumbuhan, 11-98, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Proses pembuatan preparat meliputi proses jaringan dan pengecatan Hematoksilin dan Eosin (HE).

**a. Proses jaringan**

Untuk menghindari pencemaran jaringan oleh enzim (autolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik, pemotongan organ harus diperlakukan dengan tepat. Fiksasi jaringan dilakukan bertujuan agar sifat-sifat morfologik dan kimia jaringan dapat terpelihara dengan baik selain itu juga untuk mengeraskan jaringan sehingga lebih mudah dipotong dan meningkatkan afinitas terhadap bahan cat. Fiksatif yang digunakan pada penelitian ini adalah formalin 10%. Selanjutnya masing-masing organ tersebut dipotong kira-kira setebal 3-5 mm (Amindariati dkk., 2008).

Agar diperoleh potongan tipis, maka setelah proses fiksasi jaringan harus mengalami proses *embedding*, yaitu infiltrasi jaringan dengan suatu zat yang dapat memberi konsistensi kuat pada organ saat dipotong dengan menggunakan mikrotom. Zat yang dapat digunakan antara lain gelatin, seloidin, parafin, resin, atau bahan liat lainnya (Junqueira *et al.*, 1998). Pada penelitian ini jaringan diimpregnasi dengan parafin.

**b. Proses *embedding***

Proses *embedding* atau impregnasi jaringan biasanya didahului oleh proses dehidrasi dan penjernihan. Dehidrasi dilakukan melalui perendaman jaringan didalam larutan alkohol dengan konsentrasi semakin tinggi, mulai 70% sampai 96%. Penjernihan (*clearing*) dilakukan dengan menggantikan alkohol dalam jaringan, pada teknik parafin larutan yang dipakai untuk menggantikan

alkohol adalah xilol. Peresapan xilol dalam jaringan menyebabkan jaringan menjadi transparan (jernih) (Amindariati dkk., 2008). Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam parafin yang dicairkan di atas penangas dengan suhu 58–60° C. Pemanasan menyebabkan pelarut menguap dan ruangan yang tertinggal diisi oleh parafin. Blok parafin kecil yang mengandung jaringan tersebut kemudian diiris (*sectioning*) dengan pisau baja atau pisau kaca mikrotom menjadi setebal 1-10  $\mu\text{m}$ . Potongan tersebut dimasukkan ke dalam air hangat dan dipindahkan ke atas *Slide* kaca. Selanjutnya diinkubasi diatas plat hangat untuk menguapkan air yang terbawa secara perlahan (Junqueira *et al.*, 1998).

### c. Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

*Hematoxylin Eosin* (HE) merupakan pewarnaan rangkap dua yang merupakan referensi standar untuk pewarnaan rutin jaringan. Dari semua pewarnaan yang ada, kombinasi hematoxylin dan eosin (HE) paling banyak dipakai. Hematoxylin memulas nukleus sel dan struktur bersifat asam lainnya (seperti bagian kaya RNA pada sitoplasma). Sebaliknya, eosin memulas sitoplasma menjadi merah dan kolagen menjadi merah muda (Junqueira *et al.*, 1998).

Lampiran 2. Hasil skoring *grading* kelenjar *mammae*

		Formasi Asiner Tubulus					Rata 2	Atipia Nukleus					Rata2	Jumlah Mitosis					Rata2	Grade
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
+)	U1	3	3	2	3	3	2,8	3	2	2	3	3	2,6	3	2	3	2	3	2,6	8
	U2	2	3	2	3	3	2,6	3	3	3	2	3	2,8	3	2	2	3	2	2,4	7,8
	U3	2	3	3	3	3	2,8	2	3	3	3	3	2,8	3	2	2	2	3	2,4	8
	U4	3	3	3	2	3	2,8	3	3	2	3	3	2,8	2	3	3	3	2	2,6	8,2
(-)	U1	1	2	1	1	1	1,2	1	1	2	1	1	1,2	1	2	1	1	1	1,2	3,6
	U2	1	1	2	1	1	1,2	2	1	1	1	2	1,4	2	1	1	1	1	1,2	3,8
	U3	1	1	1	2	1	1,2	1	1	1	2	1	1,2	2	1	1	2	1	1,4	3,8
	U4	1	1	1	1	2	1,2	2	1	1	1	1	1,2	1	1	2	1	1	1,2	3,6
P1	U1	2	2	3	2	2	2,2	1	2	3	2	2	2,2	2	2	3	2	2	2,2	6,6
	U2	2	2	2	3	2	2,2	2	3	2	2	2	2,2	2	2	2	2	2	2	6,4
	U3	2	2	3	2	2	2,2	2	3	2	2	2	2,2	2	2	3	2	2	2,2	6,6
	U4	2	2	2	3	2	2,2	2	2	3	2	2	2,2	2	3	2	2	2	2,2	6,6
P2	U1	1	2	1	2	1	1,4	2	2	1	1	2	1,6	1	2	1	2	1	1,4	4,4
	U2	2	2	1	2	2	1,8	2	1	1	2	1	1,4	2	1	2	1	1	1,4	4,6
	U3	1	2	2	2	1	1,6	2	1	2	1	2	1,6	2	2	1	2	1	1,4	4,6
	U4	2	1	2	1	2	1,6	2	1	2	2	1	1,6	2	1	1	1	2	1,4	4,6
P3	U1	3	1	2	3	3	2,4	2	2	3	2	2	2,4	3	2	2	2	2	2,2	7
	U2	3	2	3	2	2	2,4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2,2	6,6
	U3	3	2	2	2	3	2,4	2	3	3	2	2	2,4	3	2	2	2	2	2,2	7
	U4	3	2	2	3	2	2,4	2	2	2	2	3	2,2	2	2	3	2	2	2,2	6,8

**Lampiran 3.** Rerata skor gambaran histopatologis kelenjar *mammae* tikus setiap kelompok perlakuan

Perlakuan	Rerata skor (pada 5 lapang pandang)	Total Skor	Grade
I. Kelompok K (+) DMBA 20 mg/kg BB <b>Formasi Tubulus</b> <b>Atipia Nukleus</b> <b>Jumlah Mitosis</b>	2,8 2,6 2,6	8	III
II. Kelompok K(-) CMC-Na 0,5% + corn oil <b>Formasi Tubulus</b> <b>Atipia Nukleus</b> <b>Jumlah mitosis</b>	1,2 1,2 1,2	3,6	I
III. Kelompok P1 <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB <b>Formasi Tubulus</b> <b>Atipia Nukleus</b> <b>Jumlah Mitosis</b>	2,2 2,2 2,2	6,6	II
IV. Kelompok P2 <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB <b>Formasi Tubulus</b> <b>Atipia Nukleus</b> <b>Jumlah Mitosis</b>	1,4 1,6 1,4	4,4	I
V. Kelompok P3 <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg BB <b>Fomasi Tubulus</b> <b>Atipia Nukleus</b> <b>Jumlah Mitosis</b>	2,4 2,4 2,2	7	II

Keterangan : Ketentuan untuk skor :

- Jumlah tubulus : .75% (skor I), 10-75% (skor 2), ,10% 9skor 3)
- Atipia nucleus : nukleus kecil dan seragam (skor 1), nukleus sedang sampai besar agak bervariasi (skor 2), bentuk dan ukuran nukleus bervariasi dan sel tampak keruh (skor 3)
- Jumlah mitosis : dalam satu lapang pandang 0-7 (skor 1), 8-16 (skor 2) dan >17 (skor 3)

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

Lampiran 4. Hasil Uji Statistik

Summarize

Case Processing Summary<sup>a</sup>

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Tubulus * Perlakuan	20	100,0%	0	,0%	20	100,0%
Atipianukleus * Perlakuan	20	100,0%	0	,0%	20	100,0%
Jumlahmitosis * Perlakuan	20	100,0%	0	,0%	20	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries<sup>a</sup>

			Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Perlakuan	K+	1	2,80	2,60	2,60
		2	2,60	2,80	2,40
		3	2,80	2,80	2,40
		4	2,80	2,80	2,60
	Total	N	4	4	4
		Median	2,8000	2,8000	2,5000
	K-	1	1,20	1,20	1,20
		2	1,20	1,40	1,20
		3	1,20	1,20	1,40
		4	1,20	1,20	1,20
Total	N	4	4	4	
	Median	1,2000	1,2000	1,2000	
P1	1	2,20	2,20	2,20	
	2	2,20	2,20	2,00	
	3	2,20	2,20	2,20	
	4	2,20	2,20	2,20	
	Total	N	4	4	4
		Median	2,2000	2,2000	2,2000
P2	1	1,40	1,60	1,40	
	2	1,80	1,40	1,40	
	3	1,60	1,60	1,40	



	4		1,60	1,60	1,40
	Total	N	4	4	4
		Median	1,6000	1,6000	1,4000
P3	1		2,40	2,40	2,20
	2		2,40	2,00	2,20
	3		2,40	2,40	2,20
	4		2,40	2,00	2,20
	Total	N	4	4	4
		Median	2,4000	2,2000	2,2000
Total	N		20	20	20
		Median	2,2000	2,1000	2,2000

a. Limited to first 100 cases.

### NPar Tests Kruskal-Wallis Test

		Ranks	
	Perlakuan	N	Mean Rank
Tubulus	K+	4	18,50
	K-	4	2,50
	P1	4	10,50
	P2	4	6,50
	P3	4	14,50
	Total	20	
Atipianukleus	K+	4	18,50
	K-	4	2,63
	P1	4	12,50
	P2	4	6,38
	P3	4	12,50
	Total	20	
Jumlahmitosis	K+	4	18,50
	K-	4	3,00
	P1	4	12,00
	P2	4	6,00
	P3	4	13,00
	Total	20	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Chi-square	18,780	17,591	18,147
df	4	4	4
Asymp. Sig.	,001	,001	,001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(1 2)

**Mann-Whitney Test**

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K+	4	6,50	26,00
	K-	4	2,50	10,00
	Total	8		
Atipianukleus	K+	4	6,50	26,00
	K-	4	2,50	10,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K+	4	6,50	26,00
	K-	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,530	-2,428	-2,397
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011	,015	,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(1 3)

**Mann-Whitney Test**

		Ranks		
Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K+	4	6,50	26,00
	_ P1	4	2,50	10,00
	Total	8		
Atipianukleus	K+	4	6,50	26,00
	_ P1	4	2,50	10,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K+	4	6,50	26,00
	_ P1	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,530	-2,530	-2,397
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011	,011	,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(1 4)

**Mann-Whitney Test**

		Ranks		
Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K+	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		
Atipianukleus	K+	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K+	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,381	-2,428	-2,494
Asymp. Sig. (2-tailed)	,017	,015	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(1 5

**Mann-Whitney Test**

Ranks

Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K+	4	6,50	26,00
	_ P3	4	2,50	10,00
	Total	8		
Atipianukleus	K+	4	6,50	26,00
	_ P3	4	2,50	10,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K+	4	6,50	26,00
	_ P3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,530	-2,397	-2,494
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011	,017	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(2 3)

**Mann-Whitney Test**

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K-	4	2,50	10,00
	_ P1	4	6,50	26,00
	Total	8		
Atipianukleus	K-	4	2,50	10,00
	_ P1	4	6,50	26,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K-	4	2,50	10,00
	_ P1	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,646	-2,530	-2,428
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008	,011	,015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(2 4)

**Mann-Whitney Test**

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K-	4	2,50	10,00
	_ P2	4	6,50	26,00
	Total	8		
Atipianukleus	K-	4	2,63	10,50
	_ P2	4	6,38	25,50
	Total	8		
Jumlahmitosis	K-	4	3,00	12,00
	_ P2	4	6,00	24,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,500	2,000
Wilcoxon W	10,000	10,500	12,000
Z	-2,477	-2,291	-2,049
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013	,022	,040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,114 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(2 5)

**Mann-Whitney Test**

Ranks

Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	K-	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		
Atipianukleus	K-	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	K-	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,646	-2,397	-2,530
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008	,017	,011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(3 4)

**Mann-Whitney Test**

		Ranks		
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	P1	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		
Atipianukleus	P1	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	P1	4	6,50	26,00
	_ P2	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,477	-2,530	-2,530
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013	,011	,011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

## NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(3 5)

**Mann-Whitney Test**

		Ranks		
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	P1	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		
Atipianukleus	P1	4	4,50	18,00
	_ P3	4	4,50	18,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	P1	4	4,00	16,00
	_ P3	4	5,00	20,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	8,000	6,000
Wilcoxon W	10,000	18,000	16,000
Z	-2,646	,000	-1,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008	1,000	,317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	1,000 <sup>a</sup>	,686 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

NPAR TESTS

/M-W= Tubulus Atipianukleus Jumlahmitosis BY Perlakuan(4 5)

### Mann-Whitney Test

Ranks

Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tubulus	P2	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		
Atipianukleus	P2	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		
Jumlahmitosis	P2	4	2,50	10,00
	_ P3	4	6,50	26,00
	Total	8		

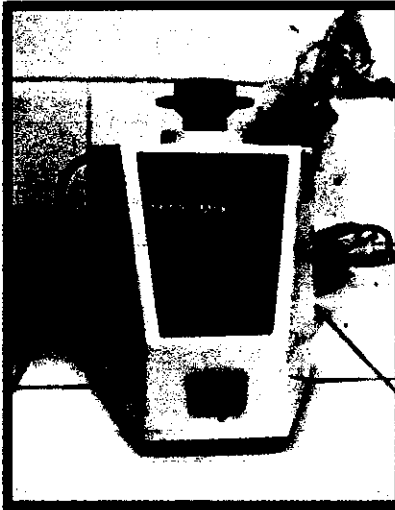
Test Statistics<sup>b</sup>

	Tubulus	Atipianukleus	Jumlahmitosis
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	10,000	10,000	10,000
Z	-2,477	-2,397	-2,646
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013	,017	,008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>	,029 <sup>a</sup>

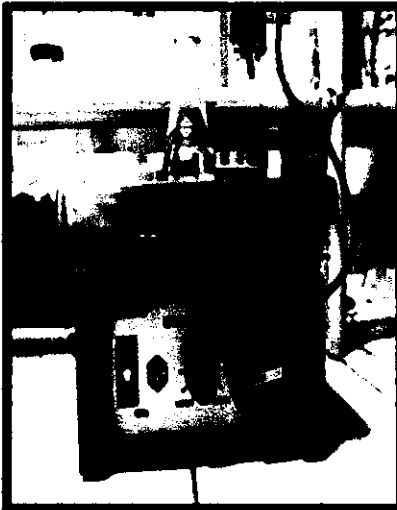
a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

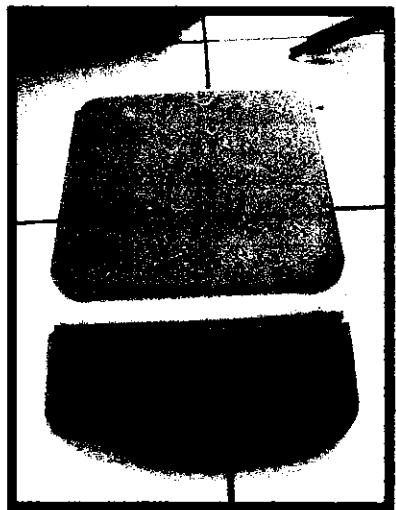


**Lampiran 5. Dokumentasi Kegiatan****Alat dan Bahan Penelitian**

Vortex Mixer



Pemanas air



Timbangan digital tikus



Larutan CMC NA, Larutan DMBA, dan Larutan Ekstrak Daun Salam

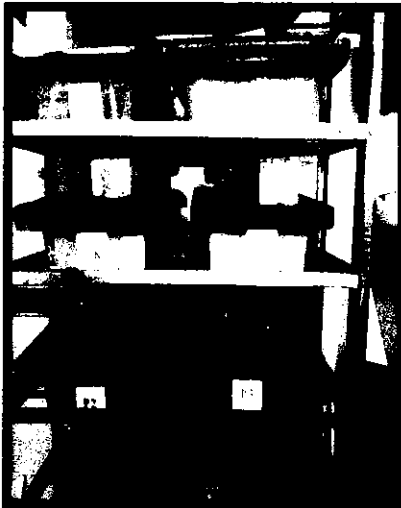


Alat preparasi (Aluminium foil, Disposable syringe, Mortir dan Gelas ukur)



Peralatan Bedah (Pinset, Scalpel, Blade, masker, pot obat dan Glove)

**Jalannya Penelitian**



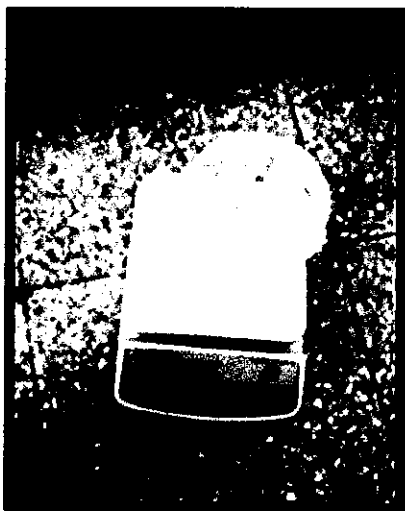
**Pemeliharaan Hewan Coba**



**Pemberian tanda pada tikus**



**Pemberian pakan**



**Penimbangan tikus**



**Pemberian DMBA peroral**



**Pemberian larutan ekstrak**



**Pembedahan Hewan Coba**



**Diskusi dengan dosen**