

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 - Februari 2015.

Pembuatan larutan taurin, ekstrak daun sirsak dan pengamatan mikroskop cahaya dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Lampung. Pemeliharaan mencit, menginduksi benzo()piren, pemberian taurin dan ekstrak daun sirsak dilakukan di Laboratorium MIPA Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Pembedahan dan proses mikroteknik dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : mikroskop, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi dan raknya, erlenmeyer, corong, pipet volum, pipet tetes, gunting, pisau, timbangan analitik, alat bedah, kandang tikus,, gelas objek, spatula, blood counter tabulator, bak pemeliharaan mencit (*Mus musculus*) galur *ddy* , rak preparat, alat bedah, kaca penutup, tempat minum, jarum suntik, neraca analitik, sentrifugator, corong pisah, pipet plat tetes,

kertas saring, blender, corong kecil, *rotary evaporator*, neraca analitik, mikroskop cahaya, counter, penggaris, alat tulis dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan adalah : pakan pelet, air minum, mencit jantan (*Mus musculus*) galur *ddy* berumur 5-7 minggu dengan berat badan ± 20 gram, benzo(a)piren, aquades, daun sirsak (*Annona muricata*), etanol, aquadest 200 mL, corn oil, taurin, eosin, giemsa dan benzo()piren.

C. Rancangan Percobaan

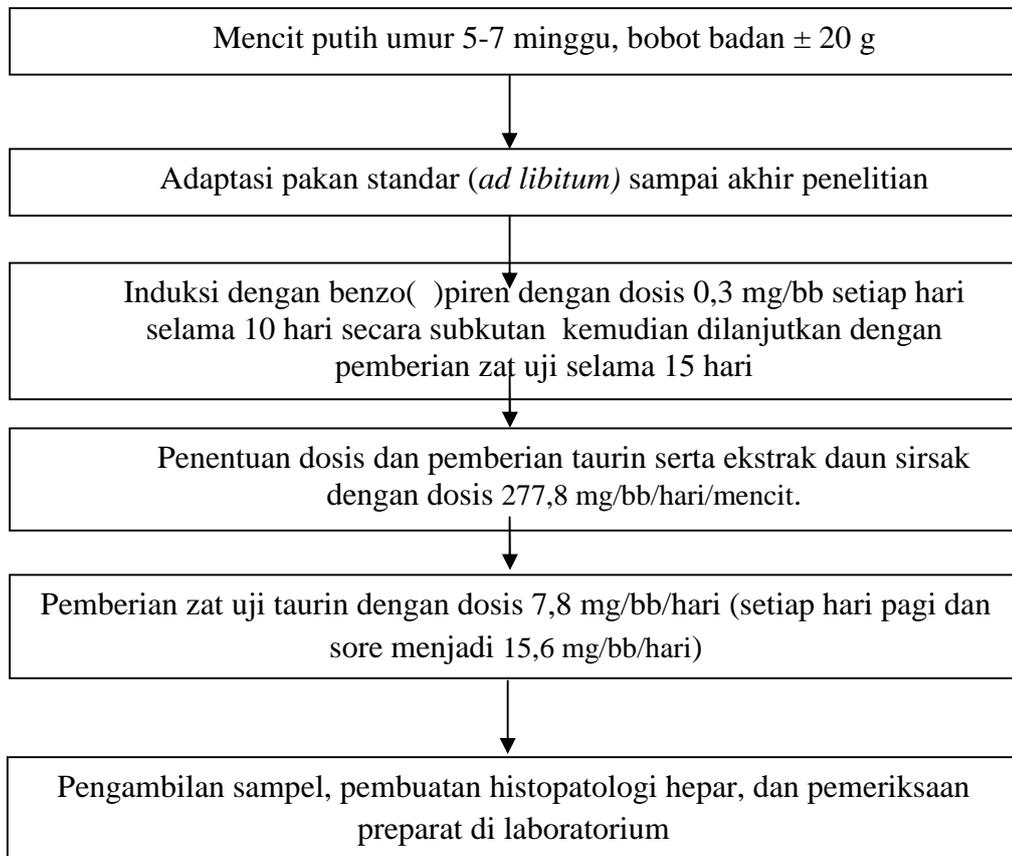
Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental. Oleh karena itu, rancangan eksperimen yang digunakan adalah rancangan acak lengkap yang terdiri atas 5 kelompok perlakuan, dengan masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ekor sebagai ulangan. Kelompok I, diberi 0,2 ml corn oil selama 15 hari ;

Kelompok II, diinduksi dengan benzo()piren tanpa pemberian bahan uji selama 10 hari ; Kelompok III, diberi taurin dengan 7,8 mg/bb/hari, pagi dan sore = 15,6 mg/bb/hari dimulai sejak 15 hari sebelum induksi benzo()piren ; Kelompok IV, setelah diinduksi benzo()piren, daun sirsak dosis 277,8 mg/bb BB mencit ; Kelompok V, setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian senyawa taurin dengan dosis 7,8 mg/bb/hari, pagi dan sore sebanyak 15,6 mg/bb/hari.

D. Parameter

Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi hepar mencit putih (*Mus musculus*) dan bobot hepar mencit yang terinduksi benzo()piren.

E. Alur Penelitian



F. Pelaksanaan

1. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur *ddy* sebanyak 25 ekor, yang berumur 5-7 minggu, bobot badan \pm 20 g. Hewan tersebut diperoleh dari bagian Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor, Jawa Barat.

2. Aklimasi Hewan Uji

Penelitian diawali dengan aklimasi mencit jantan (*Mus musculus*) galur *ddy* selama 15 hari di Laboratorium MIPA Terpadu Universitas Lampung.

dikelompokkan dalam 5 kelompok. Selama aklimasi, mencit percobaan dipelihara dalam kandang secara individu pada kondisi lingkungan yang homogen.

3. Makanan dan Minuman Mencit (*Mus musculus*)

Makanan mencit berupa pakan pelet yaitu *comfeed BR II* yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Bahan dan Komposisi Pakan Mencit

BAHAN DASAR PAKAN MENCIT	
Jagung	
Bekatul	
Bungkil kedelai	
Tepung Daging	
Garam	
Vitamin	
Mineral	

ANALISIS PROKSIMAT PAKAN MENCIT	PRESENTASE SETIAP 100 GRAM
KADAR AIR	MAX 12,0%
PROTEIN KASAR	MIN 19,0%-21,0%
LEMAK KASAR	MIN 5,05%
SERAT KASAR	MAX 5,0%
ABU	MX 7,0%
CALSIUM	MIN 0,9%
PHOSPOR	MIN 0,6%-0,9%
COCCIDIOSTAT	-
ANTIBIOTIKA	-

Minuman mencit berupa air mineral yang diberikan melalui botol gelas minuman. Makanan dan minuman mencit diberikan secara *ad libitum* (sampai kenyang atau secukupnya).

4. Induksi Karsinogenik Terhadap Hewan Uji Dengan Benzo(a)piren

Induksi karsinogenik dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan benzo()piren pada jaringan subkutan mencit di bagian tengkuk. Benzo()piren 0,3 mg dilarutkan dalam 0,2 ml corn oil. Injeksi dilakukan setiap hari selama 10 hari. Semua kelompok diinduksi dengan benzo()piren selama 10 hari secara subkutan kemudian dilanjutkan dengan pemberian zat uji selama 15 hari (Sugitha dan Djalil, 1989).

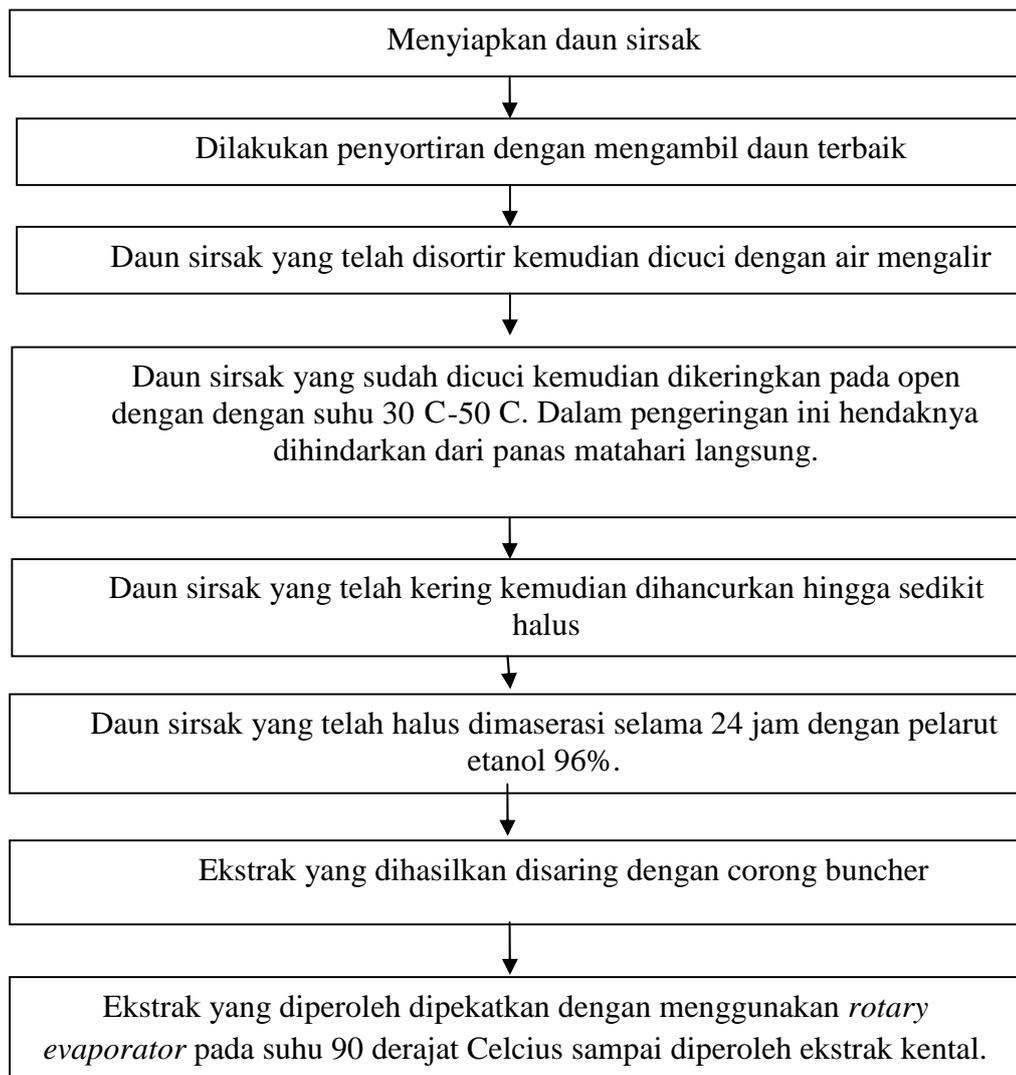
Kemudian ditunggu sampai adanya kanker, yaitu munculnya benjolan (nodul) di bagian tengkuk. Benzo()piren diberikan selama 10 hari karena sel kanker akan tumbuh setelah terinduksi antara 9-13 hari. Pada periode ini terlihat dan terasa perubahan pada tengkuk dan kaki mencit (Gustanti, 1999). Untuk kontrol mencit (*Mus musculus*) tidak diinjeksi benzo()piren.

5. Penentuan Dosis dan Pemberian Senyawa Taurin serta Ekstrak Daun Sirsak.

Penentuan dosis sediaan senyawa taurin dibuat berdasarkan literatur dari Shao (2008), yaitu 3 g/70 kg berat badan pada manusia. Dosis taurin pada mencit dihitung dengan menggunakan tabel konversi manusia ke mencit ukuran 20 g menurut Nugraha (2011). Nilai konversi dari manusia ke mencit adalah 0,0026. Sehingga diperoleh dosis senyawa taurin untuk mencit, yaitu $3000 \text{ mg} \times 0,0026 = 7,8 \text{ mg/bb/hari}$.

Penentuan dosis ekstrak daun sirsak dalam penelitian ini mengacu dosis yang diberikan pada tikus, yaitu 106,84615 g/bb/hr (Dewi, 2007). Dosis

ekstrak daun sirsak pada mencit dihitung dengan menggunakan tabel konversi manusia ke mencit adalah 0,0026, sehingga diperoleh dosis seduhan daun sirsak untuk mencit, yaitu $106,84615 \times 0,0026 = 0,27779$ g/bb/hari sehingga diperoleh 277,8 mg/bb/hari (Ngatidjan, 1991).



Gambar 7. Bagan alur pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*)

6. Uji Anti Kanker Taurin Terhadap Hewan Uji

Uji *in vivo* untuk antikanker dilakukan dengan memberikan taurin pada mencit yang telah diinduksi benzo()piren. Pemberian zat uji taurin

diberikan setiap hari (pagi dan sore) secara oral selama 15 hari. Perlakuan tersebut meliputi:

Tabel 2. Dosis pada tiap kelompok perlakuan

Kelompok	Keterangan	Jumlah Mencit
I (kontrol normal)	Diberi 2ml corn oil selama 15 hari.	5
II (kontrol negatif)	Diinduksi dengan benzo()piren tanpa pemberian bahan uji selama 10 hari.	5
III (preventif)	Diberi taurin dengan 7,8 mg/bb/hari (pagi&sore = 15,6 mg/bb/hari) dimulai sejak 15 hari sebelum induksi benzo()piren.	5
IV	Setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian taurin dengan dosis 7,8 mg/bb/hari (pagi&sore = 15,6 mg/bb/hari).	5
V	Setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian ekstrak daun sirsak dengan dosis 277,8 mg/bb mencit.	5

Pengamatan terhadap adanya nodul (kanker) dilakukan secara mikroskopik dengan membuat preparat dari organ yang diambil dan dilakukan pengamatan secara histopatologi untuk melihat adanya pembentukan kanker pada organ tersebut.

7. Preparasi Pembuatan Sediaan Histologis Hepar

Pada akhir perlakuan mencit dikorbankan dan diambil hepar untuk dibuat sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). *Hematoxylin Eosin* bersifat pewarna basa, yaitu memulas jaringan basofilik sedangkan eosin memulas jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini merupakan pewarnaan yang paling sering digunakan.

Sampel hepar difiksasi dengan formalin 10% dan dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk pembuatan sediaan mikroskopis jaringan hepar.

Metode teknik histopatologi menurut Ali (2007) dibagi menjadi 10 teknik, yaitu :

1. *Fixation*

- a) Memfiksasi specimen berupa potongan organ hati yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.
- b) Mencuci dengan air mengalir.

2. *Trimming*

- a) Mengecilkan organ ± 3 mm
- b) Memasukkan potongan organ hati tersebut kedalam *embedding cassette*.

3. *Dehidrasi*

- a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu
- b) Berturut-turut melakukan perendaman organ hati dalam alkohol bertingkat 80% dan 90% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolute I, II, III selama 1 jam.

4. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan xylol I, II, III masing-masing selama 1 jam.

5. *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam.

6. *Embedding*

- a) Membersihkan sisa paraffin yang ada pada pan dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan di usap dengan kapas.
- b) Menyiapkan paraffin cair dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan memasukkan ke dalam oven dengan suhu diatas 58 derajat Celcius.
- c) Menuangkan paraffin cair ke dalam pan
- d) Memindahkan satu-persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
- e) Memasukkan pan kedalam air.
- f) Melepaskan paraffin yang berisi potongan hati dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu empat derajat Celcius beberapa saat.
- g) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel hangat.
- h) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- i) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

7. *Cutting*

- a) Melakukan pemotongan pada ruang dingin
- b) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu
- c) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- d) Memilih lembar pemotongan yang paling baik, mengapungkan pda air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu

sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.

- e) Memindahkan lembaran jaringan kedalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan slide bersih dan menempatkan pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.
- g) Menempatkan slide yang berisi jaringan pada inkubator (suhu 37 derajat celcius) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8. *Staining* (pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*.

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, memilih slide yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut:

- a) Untuk pewarnaan , zat kimia yang pertama digunakan *xylol* I, II, III masing-masing selama 5 menit.
- b) Zat kimia yang yang digunakan *alcohol absolute* I, II, III masing-masing selama 5 menit.
- c) Zat kimia yang ketiga yaitu aquades selama 1 menit.
- d) Potongan organ dimasukkan dalm zat warna *Harris Hematoxylin Eosin* selama 20 menit.
- e) Memasukkan potongan organ hati dalam aquades selama 1 menit dengan sedikit mengoyang-goyangkan organ.
- f) Mencelupkan organ dalam asam alcohol 2-3 celupan.

- g) Dibersihkan dalam aquades bertingkat masing-masing 1 an 15 menit.
- h) Memasukkan potongan organ dalam eosin selama 2 menit.
- i) Secara berurutan memasukkan potongan organ dalam *alcohol* 96% selama 2 menit , *alcohol* 96%, *alcohol* III dan IV masing-masing selama 3 menit.
- j) Terakhir memasukkan kedalam *xylol* IV dan V masing-masing selama 5 menit.

9. *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan slide diatas kertas tisu pada tempat datar, meneteskan dengan bahan mounting yaitu kanada balsam dan ditutup dengan *cover glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10. Membaca slide dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop sinar dengan pembesaran 400x.

Metode yang digunakan dalam melihat preparat adalah prosedur double blinded (Ali, 2007).

Pada akhir perlakuan mencit dikorbankan, dilanjutkan dengan isolasi hepar untuk fiksasi ke dalam formalin 10% selama 4-8 jam. Langkah pertama pembuatan sediaan histologis hepar, yaitu dehidrasi menggunakan etanol, dilanjutkan embedding dan pemotongan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μ m. Hasil pemotongan kemudian diwarnai menggunakan hematoxilin-eosin dan diamati dengan mikroskop cahaya (Dimitrios, 2006).

G) Penilaian Histopatologi

Skoring derajat histopatologi hepar yang digunakan berdasarkan penelitian Uji Toksisitas Akut dan Subakut yang dilakukan Maretnowati *et al* (2005), yang telah dipublikasikan dalam Majalah Farmasi Airlangga, sebagai berikut:

Tabel 3. Skor Penilaian Derajat Kerusakan Histopatologi Sel Hepar

Tingkat perubahan	Skor
Normal	0
Ringan (mild)	1
Sedang (moderate)	2
Berat (severe)	3

Derajat kerusakan hati terbagi dalam tiga tingkatan, yaitu derajat kerusakan 1 (kerusakan ringan) yang memiliki kriteria kerusakan sel hepar mencapai 1-25%, derajat kerusakan 2 (kerusakan sedang) yang memiliki kriteria kerusakan mencapai 26-50% dan derajat kerusakan 3 (kerusakan berat) yang memiliki kriteria kerusakan sel hepar mencapai >50%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan hasil pengamatan mikroskopik organ hepar dari setiap kelompok perlakuan dengan kontrol.

H. Prosedur Pengamatan Bobot Hepar Mencit

Prosedur pengamatan berat basah organ hepar dilakukan dengan menimbang organ hepar yang masih segar menggunakan timbangan digital dengan 2x ulangan dan dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Dewi, 2012).

I. Analisis Data

Data dianalisis dengan metode statistik menggunakan uji anova satu arah (*one way anova*) pada taraf 5% ($p < 0,05$), selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Fisher*. Data yang diperoleh dari pengamatan secara mikroskopis diuji dengan uji statistik menggunakan uji statistik *Kruskal-Wallis*, untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Data diolah dengan menggunakan Komputer Program Minitab 14 (Hanafiah, 2011).