

III. METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan uji berupa tikus putih betina galur *Sprague Dawley*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Balai Penelitian dan Pengujian Veteriner (BPPV) dengan waktu pelaksanaan selama 4 (empat) minggu. Perhitungan dosis serta pembuatan ekstrak daun sirsak dilakukan di laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, sedangkan perhitungan dosis serta pembuatan infusa daun sirsak dilakukan di laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, serta tempat pengamatan secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Populasi dan Sampel

Populasi adalah tikus putih betina galur Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram yang diperoleh dari Kampus IPB (Institut Pertanian Bogor Dramaga) Fakultas Peternakan, Bogor . Sampel adalah jaringan payudara tikus putih populasi yang telah diinduksi DMBA dengan dosis dan kurun waktu tertentu. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

D. Besar Sampel

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 4 kelompok. Menurut Federer (1977) rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental dengan rancangan acak lengkap adalah :

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel yang diperlukan tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor ($n \geq 4,75$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 4 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih, yaitu:

Kelompok kontrol (K) : tikus yang hanya diberi *aquadest* 1 cc setiap hari selama 4 minggu.

Kelompok 1 : tikus yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu selama 4 minggu, dan diberi *aquadest* 1 cc setiap hari selama 4 minggu.

Kelompok 2 : tikus yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kg BB sekali sehari selama 4 minggu.

Kelompok 3 : tikus yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu selama 4 minggu dan diberi infusa daun sirsak dosis 0,2 gr/ml sekali sehari selama 4 minggu.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi:

- a. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bererak aktif)
- b. Memiliki berat 100-200 gram
- c. Berjenis kelamin betina
- d. Berusia sekitar 5-7 minggu

Kriteria Eksklusi:

- a. Mati selama masa adaptasi, atau sebelum diberi perlakuan
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium

F. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak dan infusa daun sirsak.

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi jaringan payudara tikus putih yang diinduksi karsinogen DMBA.

2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak dan infusa daun sirsak	<p>Ada 4 kelompok dengan perlakuan yang berbeda</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kelompok I (kontrol negatif) - Kelompok II (kontrol positif) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 x seminggu selama 4 minggu, - Kelompok III (perlakuan coba) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 x seminggu selama 4 minggu + ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB/hr selama 4 minggu, - Kelompok IV (perlakuan coba) = induksi DMBA 20 mg/kgBB 2 x seminggu selama 4 minggu + infusa daun sirsak 0,2 gr/ml/hari selama 4 minggu, . 	Kategorik
Gambaran Histopatologi payudara	<p>- Melihat dari hiperplasi epitel, dalam 5 lapang pandang, dari jaringan payudara yang dikategorikan secara bertingkat menurut Ting <i>et al</i> (2007), yaitu:</p> <p><i>Grade 0</i> = normal</p> <p><i>Grade 1</i> = <i>mild hyperplasia</i> (2-4 lapis epitel yang</p>	Kategorik

mengalami hiperplasia)

Grade 2 = severe hyperplasia (>4 lapis epitel yang

mengalami hiperplasia)

Grade 3 = hyperplasia with atypia

Grade 4 = in situ carcinoma ductal

Grade 5 = invasive carcinoma ductal

G. Bahan dan Cara Kerja

Alat dan Bahan Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sonde, alat bedah minor, toples kaca, neraca analitik Mettler Toledo dengan tingkat ketelitian 0,01 gr, spuit oral 1 cc dan 5 cc, kandang tikus, botol minum tikus, kapas, alat untuk membuat preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan paraffin), Alat untuk melihat gambaran histologi (*deck glass, object glass*, mikroskop cahaya), Larutan NaCl untuk mencuci payudara tikus setelah dilakukan laparotomi, serta tikus putih.

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun sirsak, aquabidest, DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracence) (Sigma), pakan (pelet) dan minum tikus, dan larutan kloroform sebagai pembius tikus sebelum dibedah.

Cara Kerja dari penelitian di atas adalah:

1. Ekstraksi Daun Sirsak dalam etanol 70%

Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan etanol 70%. Simplisia kering daun sirsak di giling dan di ayak dengan menggunakan ayakan yang sesuai, setelah sebelumnya dipotong kecil-kecil. Sebanyak 500 gram daun sirsak direndam dalam larutan etanol 70%. Setiap hari rendaman diaduk-aduk dan disaring sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat dikentalkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi kemudian diencerkan dengan menggunakan akuades sesuai dengan dosis yang diinginkan, yaitu 40 mg/kgbb. Dosis tersebut merupakan dosis yang paling berpengaruh pada penelitian Hermawan *et al.*(2013) dilihat dari kadar fenol yang terkandung di dalamnya. Fenol merupakan salah satu gugus dari *acetogenins*. Dengan berat tikus yang diambil adalah 200mg, maka perhitungan dosis pemberiannya adalah:

Dosis Pemberian = dosis yang diinginkan x berat tikus

$$\text{Dosis Pemberian} = \frac{40 \text{ mg}}{\text{kg}} \times 200 \text{ gr}$$

$$\text{Dosis Pemberian} = \frac{40 \text{ mg} \times 200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}}$$

$$\text{Dosis Pemberian} = 8 \text{ mg/tikus}$$

Larutan terapi diberikan kepada tikus dengan dosis yang 8 mg per tikus dan dilarutkan dalam 1 ml larutan aquades setiap hari selama 4 minggu.

2. Pembuatan Infusa Daun Sirsak

Infusa dibuat dari dari daun sirsak 20 % b/v dengan cara sebagai berikut :200 gr Daun sirsak ditambah dengan 1200 ml (1000 ml + 200 ml ekstra aquades) aquades dipanaskan dalam panci infusa menggunakan penangas air selama 15 menit terhitung setelah suhu dalam panci mencapai 90°C , sambil sesekali diaduk. Saring sampai memperoleh volume 1000 ml. Bila volume kurang dari 1000 ml maka dapat ditambahkan air panas yang dilewatkan melalui ampas daun sehingga diperoleh 1000 ml infusa daun sirsak dengan konsentrasi zat aktif 20%. Larutan terapi diberikan kepada tikus dengan dosis 0,2 gr/ml/ hari selama 4 minggu.

Pada pasien tumor tahap awal dengan berat badan 50 kg, dr. Paulus Wahyudi Halim menyarankan untuk merebus 10 daun sirsak (8 gram) dalam 3 gelas air (600 ml) hingga didapatkan hasil 1 gelas (200 ml) infusa daun sirsak (Syariefa, 2011). Dosis ini lah yang akan digunakan untuk dikonversikan dari dosis manusia ke dosis tikus dengan menggunakan rumus konversi Laurence dan Bacharach (1964). Dengan faktor konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200gr) adalah 0,018, maka dosis yang akan diberikan kepada tikus adalah $70/50 \times 8 \times 0,018 = 0,2$ mg dalam 2 ml.

3. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih betina galur Sprague Dawley yang berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram selama 1 minggu untuk adaptasi tikus di tempat pemeliharaan. Pemberian makanan berupa pellet, serta minuman berupa air kepada tikus uji dilakukan secara ad libitum, suhu kandang dijaga dengan suhu optimal sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Masing-masing kelompok diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setiap kali akan diinduksi dan setiap pekan setelah diinduksi terakhir berat badan tikus ditimbang sampai tikus diterminasi.

4. Induksi kanker payudara dengan DMBA dan pengambilan sampel

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang akan digunakan adalah serbuk DMBA yang dilarutkan dengan menggunakan minyak jagung. Induksi menggunakan sonde oral, dengan jadwal pemberian seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kgBB dengan pelarut minyak jagung, diberikan selama 4 minggu. Setiap tikus dengan berat sekitar 200 gram mendapatkan kurang lebih 1 ml larutan dengan konsentrasi 4mg/mL. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus yang diberi perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi. Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama, dan setelah induksi. Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus dimatikan/diterminasi dengan anastesi

menggunakan uap eter lebih dahulu, kemudian diambil jaringan payudara dengan pembedahan.

5. Pembuatan preparat dari jaringan payudara tikus

Adapun prosedur pembuatan preparat histologi (Aprilia, 2010), yaitu:

a. Fixation

Memfiksasi spesimen berupa potongan organ yang telah dipilih kemudian langsung difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 1 jam, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit..

b. Trimming

Mengecilkan organ menjadi setebal 2-4 mm.

c. Dehydration

Dilakukan perendaman dalam alkohol 75% selama 1 jam, kemudian dengan alkohol 75% selama 1 jam, alkohol 95% selama 1 jam, dan alkohol 95% selama 1 jam. Kemudian potongan jaringan itu direndam dalam alkohol absolut I kurang lebih selama 1 jam, kemudian dilanjutkan perendaman dengan alkohol absolut II selama 1 jam.

d. *Clearing*

Dilakukan perendaman potongan jaringan pada xylol I, dan II, masing masing selama 1 jam secara bergantian dan berurutan, dengan tujuan untuk menghilangkan alkohol dan menjernihkan jaringan.

e. *Impregnation*

Dilakukan Impregnasi dengan menggunakan paraffin cair I selama 1 jam dalam oven suhu 60 °C, lalu dipindahkan ke paraffin cair II selama 1 jam kembali dalam oven suhu 60 °C.

f. *Embedding*

Masukan jaringan ke dalam cangkir logam. Lalu tuangkan paraffin cair dengan suhu 58° C pada cangkir logam yang sudah dimasukan jaringan, dan ditutup dengan *embedding cassette*. Kemudian didiamkan sampai mulai dingin, dan dimasukan sekitar 10 menit ke dalam *freezer*. Kemudian setelah dingin, *embedding cassette* yang sudah tertempel jaringan dan parafin dikeluarkan dari cangkir logam. Blok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

g. *Cutting*

1. Blok paraffin yang telah terbentuk didinginkan terlebih dahulu. Selanjutnya, dilakukan pemotongan blok paraffin di ruangan dingin. Dilakukan pemotongan kasar dan dilanjutkan pemotongan halus dengan

ketebalan 4-5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*. Setelah pemotongan, dipilih lembaran jaringan yang paling baik. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam wadah *water bath* selama beberapa detik sampai mengambang sempurna. Lembaran tersebut diambil dengan slide bersih. Prosedur ini dilakukan dengan gerakan menyendok. Lalu diletakan di tengah atau pada sepertiga atas ataupun bawah. Usahakan jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.

h. *Staining* (pewarnaan) dengan Meyer Hematoksilin Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide kemudian dipilih yang terbaik. Selanjutnya secara berurutan slide dimasukan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut:

1. Slide dimasukan ke dalam *xylol* I, II. Masing-masing dilakukan selama 1 menit.
2. Slide dimasukan ke dalam alkohol absolut I, 90%, 80%, dan 75% masing masing selama 1 menit.
3. Slide dicuci dengan *aquadest* selama 1 menit.
4. Slide dimasukan ke dalam bahan pewarna preparat meyer hematosilin selama 5-7 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
5. Slide dimasukan ke dalam Li CO₃ selama 3 menit, untuk meperjelas warna.

6. Slide dimasukkan ke dalam alkohol 95% sebanyak 10 celupan.
7. Slide dimasukkan ke dalam eosin selama 3 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol absolute masing-masing sebanyak 10 celupan.
8. Slide dicelupkan ke dalam *xylol* I, II, dan III, masing-masing dilakukan selama 5 menit.

i. *Mounting*

Setelah proses pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar. Slide ditetaskan dengan bahan mounting yaitu kanada balsam. Kemudian ditutup menggunakan *cover glass*. Lakukan secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara di bawah jaringan.

j. Pembacaan slide dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x dan 400x.

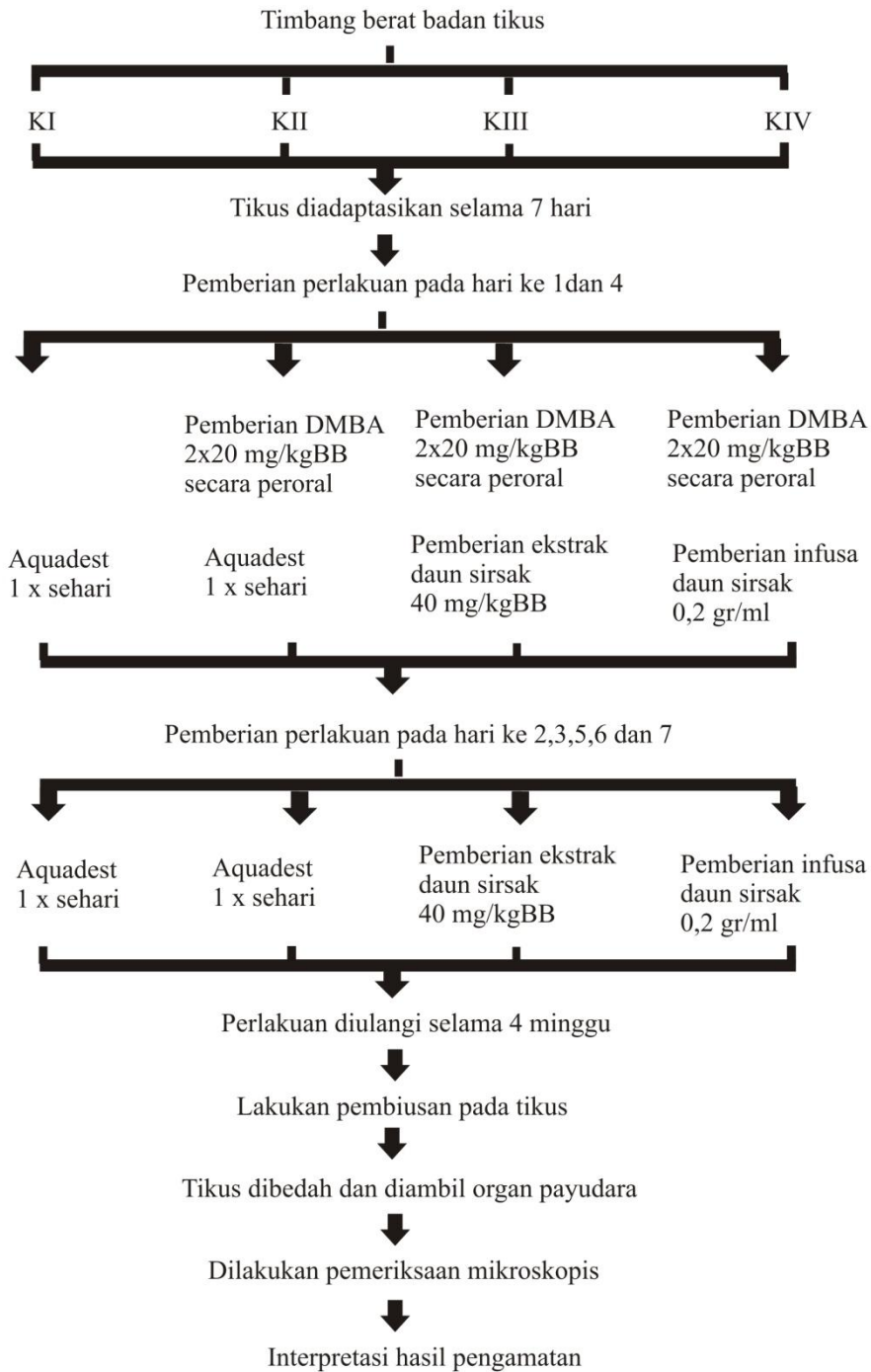
H. Analisis Data

Setelah menentukan variabel yang dihubungkan yaitu kategorik dengan numerik, dengan jenis hipotesis komparatif tidak berpasangan dengan lebih dari dua kelompok, maka digunakan uji *one way* ANOVA. Dengan menggunakan uji *one way* ANOVA diperlukan uji normalitas data dan uji varians data. jadi sebelumnya dilakukan uji Shapiro-Wilk. Hipotesis

dianggap bermakna jika didapatkan $p > 0,05$. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen (tidak memenuhi syarat parametrik), akan diuji dengan uji Kruskal Wallis. Jika pada uji *one way* ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna) maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci. Untuk uji *Post Hoc* Kruskal Wallis digunakan uji Mann-Whitney.

I. Alur Penelitian

Sebelum dilakukan pemberian ekstrak, infusa, serta DMBA, tikus terlebih dahulu di timbang berat badan awalnya, kemudian dikelompokkan menjadi 4 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 tikus putih. Kemudian tikus-tikus tersebut diadaptasi selama 7 minggu, kemudian diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya, yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, positif, kelompok ekstrak, dan kelompok infusa. Perlakuan dilakukan selama 4 minggu, sebelum kemudian diambil jaringan payudaranya.



Gambar 3. Diagram Alur Penelitian

J. Etika Penelitian

Ilmuwan Penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu replacement, reduction dan refinement. Untuk itu penelitian ini diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, karena penelitian ini memanfaatkan hewan percobaan dalam pelaksanaannya.