

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 (empat) kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif (I), 1 kelompok kontrol positif (II), dan 2 kelompok perlakuan (III dan IV) , serta 6 kali pengulangan pada masing masing kelompok.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 4 (empat) minggu. Pembuatan infusa daun sirsak dilakukan di Laboratorium Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sedangkan pengamatan gambaran mikroskopis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## C. Populasi dan Sampel

### 1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Dalam penelitian ini populasi adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague Dawley* yang diinduksi senyawa *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) sebagai model onkogenesis jaringan payudara.

*Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* umumnya digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian karena memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan manusia, yakni termasuk ke dalam kelas mamalia. Oleh karena itu, tikus sering dijadikan model penelitian aplikasi kesehatan manusia karena terdapat persamaan fisiologis. Selain itu, sifat-sifat *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* telah diketahui dengan jelas, antara lain: mudah dipelihara dalam jumlah besar, cepat berkembang biak dan tidak rentan terhadap infeksi bakteri dan virus, serta cukup agresif dibandingkan dengan galur lainnya (Permana, 2010).

### 2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague Dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil, ekor lebih panjang daripada badan, dan berumur 2 bulan dengan berat rata-rata berkisar antara 100-200 gram, yang diinduksi senyawa *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA).

Jumlah sampel pada penelitian ini didapatkan berdasarkan jumlah perlakuan yang dilakukan. Setiap perlakuan akan menggunakan pengulangan dengan rumus Federer (1977) untuk rancangan acak lengkap yaitu:

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

dengan  $t$  = jumlah kelompok dan  $n$  = jumlah ulangan

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

Maka banyaknya pengulangan yang diambil pada masing-masing kelompok adalah 6 (enam) kali pengulangan. Sehingga total tikus putih betina yang dibutuhkan sebagai sampel adalah 24 (dua puluh empat) ekor.

### **Kriteria Inklusi**

- a. Tikus putih betina galus *Sprague Dawley* sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- b. Memiliki berat 100-200 gram
- c. Berusia sekitar 2-3 bulan

### **Kriteria Eksklusi**

- a. Tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan.

**Kriteria *Drop Out***

- a. Tikus mati.
- b. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, rambut kusam atau rontok).

**D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

## 1. Variabel Penelitian

- a. Variabel terikat: gambaran mikroskopis jaringan payudara tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang diinduksi senyawa DMBA
- b. Variabel bebas: dosis infusa daun sirsak (*Annona muricata*)

## 2. Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada Tabel 1 sebagai berikut:

**Tabel 1.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis infusa daun sirsak	<p>Ada 4 kelompok dengan perlakuan yang berbeda</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kelompok I (kontrol negative)</li> <li>- Kelompok II (kontrol positif) = induksi DMBA 2x20 mg/kgBB/minggu selama 4 minggu</li> <li>- Kelompok III (perlakuan)= induksi DMBA 2x20 mg/kgBB/minggu selama 4 minggu + infusa daun sirsak 0,1 g/ml/hari selama 4 minggu</li> <li>- Kelompok IV (perlakuan) = induksi DMBA 2x20 mg/kgBB seminggu selama 4 minggu + infusa daun sirsak 0,2 g/2ml/hari selama 4 minggu</li> </ul>	Kategorik
Gambaran Mikroskopis payudara	<p>Gambaran mikroskopis dilihat dengan menilai hyperplasia pada 5 lapangan pandang pada mikroskop, dengan perbesaran 400x, lalu dirata-ratakan. Penilaian berdasarkan Ting <i>et. al</i> (2007):</p> <p>0 = normal</p> <p>1 = <i>mild hyperplasia</i> (2-4 lapisan epitel yang mengalami hyperplasia)</p> <p>2 = <i>severe hyperplasia</i> (&gt;4 lapisan epitel yang mengalami hiperplasia)</p> <p>3 = <i>atypia</i></p> <p>4 = <i>ductal carcinoma in situ</i></p> <p>5 = <i>ductal carcinoma invasive</i></p>	Numerik

## **E. Alat dan Bahan Penelitian**

### **Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Hewan percobaan yang digunakan untuk pengujian efek kemopreventif kanker payudara adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) betina galur *Sprague Dawley*. Tikus tersebut diperoleh dari Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Bahan yang digunakan pada infusa daun sirsak adalah aquades. Bahan kimia yang digunakan untuk penginduksian tikus tumor payudara ialah *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) dan minyak jagung. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pemeriksaan mikroskopis jaringan payudara adalah kertas tisu, formalin 10%, xylol, alkohol, alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 70%, parafin, Mayer's hematoksin, lithium karbonat, eosin, dan aquades.

### **Alat**

Peralatan yang digunakan untuk infusa adalah alat-alat gelas, penangas air, dan kertas saring. Alat yang dibutuhkan dalam pemeliharaan tikus berupa kandang, tempat minum dan makan, timbangan digital, sonde lambung berujung *Nasogastric tube* (NGT). Untuk pengambilan jaringan, digunakan alat-alat bedah minor. Sedangkan alat untuk pembuatan serta pengamatan

gambaran mikroskopis adalah tissue basket, gelas objek, cover glass, spidol, label, oven, cangkir logam, tissue *embedding cassette*, freezer, mikrotom, *water bath*, mikroskop cahaya dan digital electronic eyepiece camera serta satu unit komputer untuk pengambilan foto gambaran mikroskopis.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **Persiapan Hewan Percobaan**

Tikus betina ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam, pakan berupa pelet dan air minum diberikan ad libitum. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, ventilasi yang cukup serta penyorotan yang cukup dimana lamanya terang 14 jam dan lama gelap 10 jam. Sebelum melakukan percobaan tikus diadaptasi dalam kandang selama 7 hari untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya,. Kesehatan tikus dipantau setiap hari, dan berat ditimbang setiap minggu.

### **Pembuatan Infusa Daun Sirsak**

Infusa dibuat dari dari daun sirsak 100 % b/v dengan cara mencampurkan 100 gr daun sirsak dengan 1200 ml (1000 ml + 200 ml ekstra aquades) aquades. Campuran tersebut dipanaskan dalam panci infusa menggunakan penangas air selama 15 menit terhitung setelah suhu dalam panci mencapai 90<sup>0</sup> 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 10%.

Menurut Syariefa (2011), dosis optimal bagi manusia pada tumor tahap awal (berat badan 50 kg) adalah dengan merebus 10 daun sirsak (8 gram) dalam 3 gelas (600 ml) sehingga didapatkan 1 gelas (200 ml) infusa daun sirsak. Dengan faktor konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200gr) adalah 0,018, maka dosis yang akan diberikan kepada tikus adalah  $70/50 \times 8 \times 0,018 = 0,2$  g dalam 2 ml. Untuk perlakuan kelompok lainnya adalah dengan memberikan infusa dengan setengah dosis dengan konsentrasi yang sama (10%), yaitu 0,1 g dalam 1 ml.

### **Pembuatan Larutan DMBA**

Pelarut yang digunakan untuk senyawa DMBA adalah *corn oil*, atau minyak jagung, karena DMBA larut dalam pelarut ini. Minyak jagung merupakan senyawa *inert* yang digunakan untuk melarutkan DMBA, tidak memiliki sifat karsinogenik

Berdasarkan penelitian oleh Meiyanto (2007) telah ditetapkan dosis serta frekuensi DMBA yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 20 mg/kg BB, dua kali seminggu selama 4 minggu. Selain itu disebutkan pula bahwa pemberian DMBA dengan dosis 20 mg/kg BB sebanyak 10 kali dalam 4 minggu telah dapat mengakibatkan perubahan secara mikroskopis.

Berat tikus rata-rata yang digunakan adalah 200 gram, sehingga perhitungan dosis pada penelitian ini adalah



$$\frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} = \frac{d}{200\text{g}}$$
$$d = \frac{20\text{mg}}{1000\text{g}} \times 200\text{g}$$
$$d = 4\text{mg}$$

kemudian 4 mg DMBA ini dilarutkan dalam 1 ml minyak jagung untuk diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung.

### **Penginduksian DMBA dan Infusa Daun Sirsak**

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. Setiap tikus dengan berat sekitar 200 gram mendapatkan kurang lebih 1 ml larutan dengan konsentrasi 4mg/ml.

Selama penginduksian senyawa DMBA, tikus setiap hari diinduksi infusa daun sirsak sebagai kemopreventif dari perkembangan senyawa DMBA tersebut. Infusa daun sirsak diberikan dengan dosis 0,1 gram dalam 1 ml/hari pada kelompok perlakuan 1 dan 0,2 gram dalam 2 ml/hari pada kelompok perlakuan 2, dengan menggunakan sonde lambung. Penginduksian DMBA dan Infusa daun sirsak dilakukan selama 4 minggu

Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus yang diberi perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi. Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama, dan

setelah induksi. Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Kelompok Perlakuan

No	Hewan Percobaan	Jenis perlakuan
1	Kelompok I	Pemberian Aquades 1 ml/hari setiap hari
2	Kelompok II	Pemberian DMBA 4 mg/ml 2 kali/minggu + Aquades 1 ml/hari setiap hari
3	Kelompok III	Pemberian DMBA 4 mg/ml 2 kali/minggu + Infusa daun sirsak 0,1 g dalam 1ml setiap hari
4	Kelompok IV	Pemberian DMBA 4 mg/ml 2 kali/minggu + Infusa daun sirsak 0,2 g dalam 2 ml setiap hari

### **Terminasi dan Pembuatan Preparat Jaringan Payudara Tikus**

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir dan pengecekan payudara masing-masing tikus selama 4 minggu. Tikus dilakukan terminasi dengan dianestesi menggunakan uap eter lebih dahulu, lalu dilakukan dislokasi servikal. Pembedahan tikus dilakukan setelah proses terminasi untuk dilakukan pengambilan jaringan payudara tikus. Setelah jaringan payudara tikus diambil, dilakukan pembuatan preparat jaringan payudara tikus di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan prosedur sebagai berikut:

a. *Fixation*

1. Spesimen berupa potongan organ, dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
2. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali selama 15 menit.

b. *Trimming*

Organ dikecilkan hingga ukuran  $\pm 3$  mm.

c. Dehidrasi

Dehidrasi dengan :

- Alkohol 75% selama 1 jam
- Alkohol 75% selama 1 jam
- Alkohol 95% selama 1jam
- Alkohol 95% selama 1 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam

d. *Clearing*

*Clearing* dilakukan dengan xilol I dan II masing–masing selama 1 jam.

e. Impregnasi

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan parafin cair I dan II masing-masing selama 1 jam dalam oven suhu 65 °C.

f. *Embedding*

Memasukkan 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. Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
2. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es
3. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.
4. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60 °C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
5. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
6. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (Suhu 37 °C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

h. *Straining* (Pewarnaan) dengan Prosedur Pulasan Meyer Hematoksilin–Eosin:

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut.

1. Dilakukan deparafinisasi dalam:
  - Larutan *xylol* I selama 1 menit
  - Larutan *xylol* II selama 1 menit
2. *Hydrasi* dalam:
  - Alkohol absolut 1 menit
  - Alkohol 90% selama 1 menit
  - Alkohol 80% selama 1 menit

- Alkohol 70% selama 1 menit
- Aquades selama 1 menit

3. Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:

- Meyer hematoksilin selama 5-7 menit
- Air mengalir selama 5 menit
- Li CO<sub>3</sub> selama 3 menit
- Alkohol 95% sebanyak 10 celupan
- Eosin selama maksimal 3 menit

4. Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan

- Alkohol 80% sebanyak 10 celupan
- Alkohol 90% sebanyak 10 celupan
- Alkohol absolut sebanyak 10 celupan

5. Penjernihan:

- *Xylol* I selama 5 menit
- *Xylol* II selama 5 menit
- *Xylol* III selama 5 menit

i. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting* yaitu kanada balsam dan ditutup dengan *deck glass*, cegah janan sampai terbentuk gelembung udara.

### **Pengamatan Jaringan Payudara Tikus**

Preparat dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pengamatan dilakukan

dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Gambaran mikroskopis yang diamati adalah epitel kelenjar jaringan payudara tikus dalam 5 lapang pandang. Hal ini ditujukan untuk melihat sejauh mana tingkat perubahan yang terjadi pada epitel kelenjar payudara tikus yang diinduksi DMBA secara oral dan infusa daun sirsak selama 4 minggu. Penilaian epitel kelenjar dilakukan dengan menggunakan grade berdasarkan Ting *et al.* (2007):

0 = normal

1 = *mild hyperplasia* (2-4 lapisan epitel yang mengalami hyperplasia)

2 = *severe hyperplasia* (>4 lapisan epitel yang mengalami hiperplasia)

3 = *atypia*

4 = *ductal carcinoma in situ*

5 = *ductal carcinoma invasive*

## **G. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Uji Normalitas Data**

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik. Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50.

### **2. Uji Parametrik**

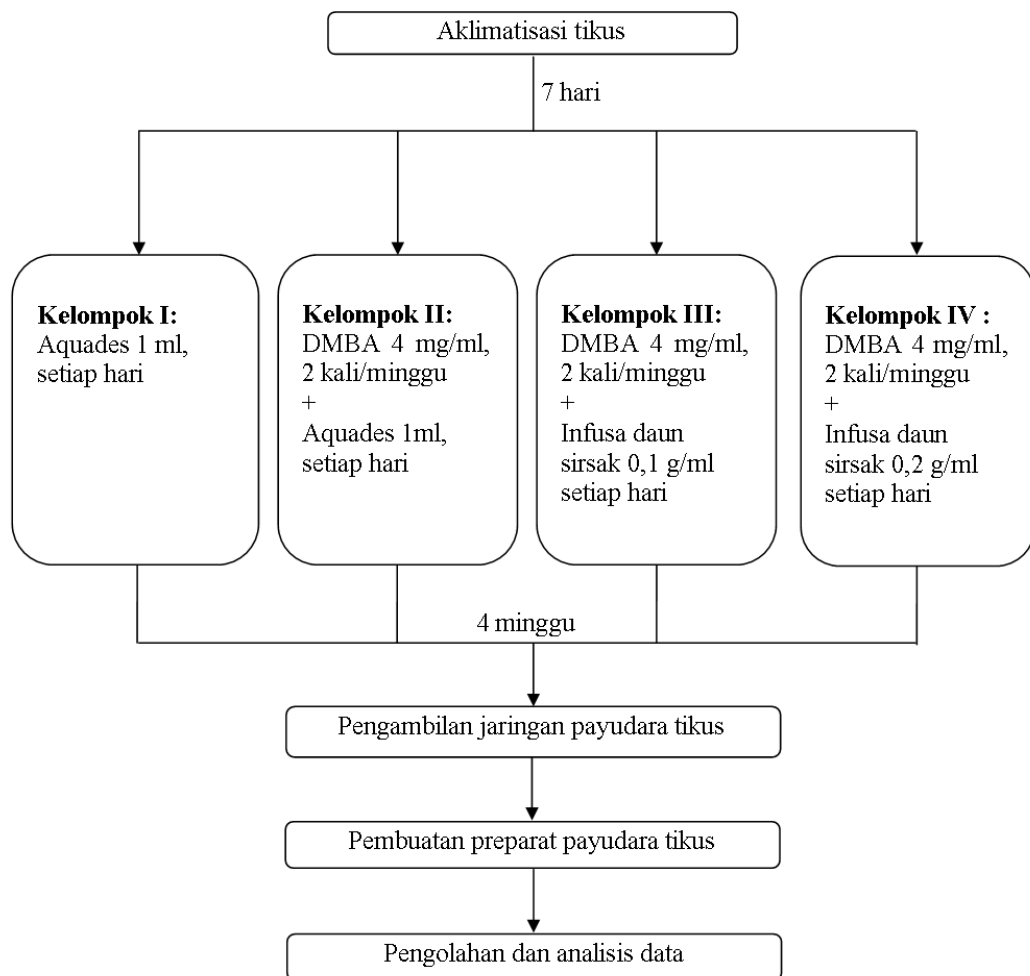
Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametric *one way* ANOVA. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, akan diuji dengan uji Kruskal-Wallis.

### 3. Uji *Post Hoc*

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. Sedangkan Alat untuk melakukan analisis *post-hoc* untuk uji Kruskal–Wallis adalah dengan uji Mann–Whitney.

## H. Diagram Alir

Sebelum penelitian, dilakukan aklimatisasi tikus untuk membuat tikus beradaptasi. Aklimatisasi tikus dilakukan selama 7 hari. Kemudian tikus dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, dan perlakuan 2. Tikus diberi perlakuan selama 4 (empat) minggu. Setelah itu, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan payudara tikus. Kemudian, dilakukan pembuatan preparat jaringan payudara tikus putih untuk melihat gambaran mikroskopis jaringan payudara pada masing-masing kelompok. Diagram alir penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Diagram Alir Penelitian

## I. Etika Penelitian

Penggunaan hewan coba di dalam penelitian perlu dijamin kesejahteraannya, sehingga dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba harus diterapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu replacement, reduction dan refinement. Sebelum penelitian dilakukan, peneliti mengajukan *etical approval* ke Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.