

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun widuri (*Calotropis gigantea*) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap histologi fibrosarkoma mencit yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi :

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun widuri dengan konsentrasi yang berbeda, perlakuan yang digunakan adalah (K-) kontrol negatif, (K+) kontrol positif, (P1) 50 mg/Kg BB, (P2) 100 mg/Kg BB, (P3) 150 mg/Kg BB
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah histologi fibrosarkoma
3. Variabel kendali jenis hewan uji yaitu mencit dengan strain balb/c, jenis kelamin jantan umur 50-60 hari dan diaklimatisasi selama 7 hari dengan berat badan awal antara 20-30 gr yang diberi makan pelet dan diberi minum secara *ad libitum* dan konsentrasi 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) 25 mg/Kg BB.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Biosistem Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur balb/c jenis kelamin jantan, umur 50-60 hari dengan berat badan antara 20-30 gram. Banyak sampel yang digunakan adalah 30 ekor mencit jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit jantan sebagai ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer tutup 1000 ml, erlenmeyer vacum 500 ml, beaker glass 500 ml, neraca analitik (ketelitian 0.0001 g), *syringe* 1 ml dan 3 ml, spatula, jerigen 1000 ml, pompa cakum, kertas saring, timbangan hewan (ketelitian 0,2), *vortex*, pinset, alat bedah, *hot plate*, dengan *magnetic stirrer* (untuk pengaduk), mikrotom, masker (sekali pakai), sarung tangan karet (sekali pakai), wadah silinder, jangka sorong (ketelitian 0.05 mm), komputer, oven, pengaduk, timbangan hewan, alat kebersihan, kantung sampah, botol minum mencit, tempat makan mencit, kandang mencit, rak kandang, kaca preparat, kaca penutup, kertas label, tissue dan mikroskop.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin jantan, umur 50-60 hari dengan berat badan antara 30-32 gram. Banyak sampel yang digunakan adalah 30 ekor yang diperoleh dari peternak di daerah Wagil, Malang, Jawa Timur. Aseton, sekam, pakan mencit (pelet), NaOH, Etanol destilat 70%, chloroform, formalin 10%, alkohol 70%, larutan gelatin 0,5%, xylol, etanol absolut, paraffin, aquades, hematoxilin, eosin, larutan perak koloidal, Na CMC 0,5% dan etelan. Senyawa 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) diperoleh dari laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) diperoleh dengan mengekstraksi daun widuri yang didapat dari LIPI Purwodadi Pasuruan Jawa Timur,

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu mempersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam kayu, tempat makan dan minum mencit, pakan mencit. Hewan coba yang berjumlah 30 ekor selanjutnya diaklimatisasi selama 5 hari, diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.2 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah hewan coba di aklimatisasi, mencit dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Perlakuan masing-masing berjumlah 5 ekor sebagai ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut :

1. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif (K-) adalah kelompok mencit normal yang tidak diinduksi DMBA dan tidak diberi perlakuan
2. Kelompok 2 sebagai kontrol positif (K+) adalah kelompok yang diinduksi DMBA 0,025 mg/gram BB dan diberikan pelarut etanol 70% dan CMC-Na 0,5% sebanyak 0,1 ml 2 kali seminggu selama 6 minggu
3. Kelompok 3 (P1) yaitu kelompok mencit yang diinduksi DMBA sebanyak 0,025 mg/gram BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak etanol daun widuri dosis 50 mg/Kg BB/hari secara per oral setelah 6 minggu penginduksian DMBA.
4. Kelompok 4 (P2) yaitu kelompok mencit yang diinduksi DMBA sebanyak 0,025 mg/gram BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak etanol daun widuri dosis 100 mg/Kg BB/hari secara per oral setelah 6 minggu penginduksian DMBA.
5. Kelompok 5 (P3) yaitu kelompok mencit yang diinduksi DMBA sebanyak 0,025 mg/gram BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak etanol daun widuri dosis 150 mg/Kg BB/hari secara per oral setelah 6 minggu penginduksian DMBA.
6. Kelompok 6 (P4) adalah kelompok yang diinduksi DMBA 0,025 mg/gram BB dan diberikan obat anti kanker berupa Metotrexat 2 kali seminggu selama 6 minggu sebanyak 0,1 ml.

Pemberian 0,1 mL DMBA 25 µg/0,1 mL aseton dilakukan dengan cara disuntikkan secara subkutan di tengkuk mencit sebanyak 2 kali seminggu yaitu hari senin dan kamis selama 6 minggu. Selanjutnya ekstrak daun widuri sebagai

pengobatan dilakukan secara oral sebanyak 0,5 mL setiap hari selama 2 minggu setelah 6 minggu penginduksian DMBA kecuali pada kontrol positif dan kontrol negatif. Selama perlakuan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun Widuri

Sampel daun Widuri dari seluruh bagian daun dicuci kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan pemanasan menggunakan sinar matahari secara tidak langsung yaitu ditutup sampel dengan kain hitam sampai kering selama \pm 5 hari. Kemudian daun diblender hingga terbentuk serbuk lalu diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh agar diperoleh serbuk yang seragam.

Sampel yang telah dipreparasi kemudian diekstraksi. Ekstraksi senyawa dilakukan dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk daun widuri ditimbang sebanyak 120 g dan perlakuan dibagi menjadi dua masing-masing 60 gram. Lalu diekstraksi dengan perendaman masing-masing menggunakan 300 ml pelarut etanol 70% selama 24 jam dan pengadukannya dibantu dengan shaker selama 3 jam, kemudian disaring. Diulangi perlakuan sampai diperoleh filtrate yang bening. Filtrat ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak pekat. Kemudian ekstrak pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama minimal 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi. Lalu ekstrak pekat dilarutkan dengan CMCNa 0,5% kemudian diuji aktivitas anti kanker secara *in vivo*.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan CMC Na 0.5%

Sediaan larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan menimbang 500 mg CMC Na kedalam 10 ml aquades panas kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi mass yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.5 Pembuatan Sediaan 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasena

Penyediaan 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena diberikan pada konsentrasi 25 mg/Kg BB yang telah dihomogenkan dengan aseton. Sebanyak 0,1 mL DMBA dibuat dengan melarutkan 25 μ g DMBA dengan 0,1 ml aseton. Pemberian DMBA setiap mencit dilakukan sebanyak 2 kali seminggu pada hari senin dan kamis. Senyawa DMBA diberikan pada mencit kontrol positif, P1, P2, P3 dan P4.

3.6.6 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba dilakukan 2 minggu sekali setiap akan dilakukannya penginduksian. Dimulai dari awal penelitian sampai penelitian berakhir. Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan untuk mengetahui perubahan fluktuasi berat badan mencit selama penelitian.

3.6.7 Pengambilan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah 8 minggu masa perlakuan. Seluruh mencit dibius dengan kloroform, dibedah dan diambil sampel jaringan fibrosa dibagian

tengkuk pada daerah subkutan untuk dibuat preparat mikroanatomi. Sediaan mikroanatomi jaringan kulit mencit diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali (10x10) dan 400 kali (40x10) lalu difoto.

3.6.8 Pembuatan Preparat Histologi

Setelah 8 minggu masa perlakuan, mencit kelompok kontrol negatif (-), kontrol positif (+) dan hasil perlakuan (Ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) dan DMBA) dilakukan pembedahan dan diambil jaringan kulit mencit untuk dilakukan pembuatan preparat sebagai berikut:

1. Sampel jaringan subkutan dibagian kulit tengkuk mencit diambil untuk dibuat preparat mikroanatomi. Pengambilan sampel dilakukan setelah mencit dibius dengan kloroform. Ditetesi bagian tengkuk mencit dengan air hangat agar dalam pencabutan bulu-bulu di tengkuk lebih mudah. Dicabut bulu-bulu di bagian tengkuk mencit menggunakan pinset. Diambil kulit di bagian tengkuk dan disimpan dalam larutan formalin 10%.
2. Pembuatan preparat dilakukan mulai dari tahap pertama *Coating*, dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam dengan alkohol 70% minimal semalam, kemudian objek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik per slide lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan sehingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
3. Tahap kedua adalah jaringan kulit yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam dilanjutkan dengan

pencucian secara bertingkat dengan alkohol, yaitu alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3 kali), xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.

4. Tahap ketiga adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan parafin 3 kali selama 30 menit
5. Tahap keempat adalah *embedding*, yaitu bahan beserta parafin dituangkan dalam kotak karton atau wadah yang sudah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap disekat bahan. Blok parafin disimpan selama semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga benar-benar keras.
6. Tahap kelima adalah pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar balok sehingga parafin sedikit meleleh. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayaan dimulai dengan mengatur ketebalan, kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan kedalam air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik, irisan yang terpilih diambil dengan *objek glass* yang sudah dicoating lalu dikeringkan diatas *hot plate*.
7. Tahap keenam adalah *deparanisasi*, yaitu preparat dimasukkan dengan larutan dalam xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit.
8. Tahap ketujuh adalah tahap dehidrasi, yaitu preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali) etanol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.

9. Tahap kedelapan adalah tahap pewarnaan, preparat diwarnai dengan hematoxilin selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
10. Tahap kesembilan adalah tahap *dehidrasi*, preparat direndam dengan etanol 80%, 90%, dan 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
11. Tahap kesepuluh adalah tahap *clearing* dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit kemudian dikeringkan.
12. *Mounting* dengan etilen hasil akhir akan diamati dengan mikroskop dan dipotret kemudian data dicatat.
13. Pemotretan preparat dalam pengamatan mikroskop disajikan secara jelas.

3.6.9 Pengamatan Struktur Histopatologis Fibrosarkoma Mencit (*Mus musculus*)

Pemeriksaan histopatologi untuk melihat pertumbuhan sel kanker dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel pada jaringan. Pengamatan terhadap histopatologis fibrosarkoma mencit (*Mus musculus*) diamati dibawah mikroskop komputer olympus tipe cx31 dengan menggunakan perbesaran 100 kali dan 400 kali pada lima lapang pandang.

Pemeriksaan perubahan pertumbuhan sel kanker secara histopatologi dilakukan dengan mengamati:

- a. Jumlah sel fibroblas

- b. Persentase luas kerusakan serat kolagen

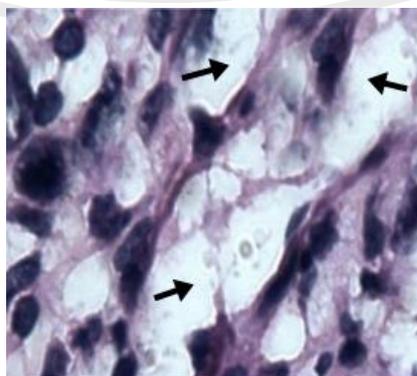
3.7 Prosedur Penghitungan Jumlah Sel Fibroblas

Sediaan tumor yang dilakukan pengecatan dengan Hematoxilin-Eosin dihitung jumlah sel fibroblas dari area yang diamati dengan pembesaran 400x pada 5 lapang pandang yang dipilih secara acak dari tiap preparat, kemudian diambil nilai rata-ratanya.

Histologi sel fibroblas yang mengalami kelainan memperlihatkan ciri yaitu susunan sel yang tidak teratur, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (*pleomorphism*), inti sel membesar, bentuk inti bermacam-macam, serta terjadi banyak mitosis (Cotran *et al.*, 1999).

3.8 Prosedur Penghitungan Persentase Luas Kerusakan Serat Kolagen

Untuk mengetahui besar kerusakan serat kolagen dilakukan melalui penghitungan kerusakan serat kolagen pada ruang-ruang kosong (tanda panah) seperti pada gambar 2.5 yang menandakan serat kolagen berkurang pada 5 lapang pandang yang dipilih secara acak tiap 1 ekor mencit.



Gambar 2.5 Ruang-ruang kosong pada serat kolagen

Perhitungan ini dilakukan dengan cara mempersentase jumlah kerusakan dengan menggunakan milimeter block. Cara menghitung persentase kerusakan serat kolagen:

$$x = \frac{\text{jumlah kotak milimeter block pada area kerusakan}}{\text{jumlah seluruh kotak pada milimeter block}} \times 100$$

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA satu arah. Apabila dari hasil analisis diperoleh nilai $F_{hitung} > F_{tabel} (0,05)$ dilanjutkan dengan uji