

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap kadar IFN- γ dan ekspresi Caspase 3, serta rata-rata berat badan pada fibrosarcoma mencit (*Mus musculus* L.) akibat induksi 7,12-Dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA).

3.2 Variabel Penelitian

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

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% akar Widuri (*Calotropis gigantean* L.) dengan dosis yang berbeda, perlakuan yang digunakan adalah kontrol negatif (K-), kontrol positif, (K+), P1 (dosis 50 mg/Kg BB), P2 (dosis 100 mg/Kg BB), P3 (dosis 150 mg/Kg BB), dan P4 (metotreksat), serta dosis 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) 0,025 mg/g BB.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar IFN- γ dan ekspresi Caspase 3 serta rata-rata berat badan pada mencit (*Mus musculus* L.).
3. Variabel kendali jenis hewan uji yaitu mencit dengan strain balb/c, jenis kelamin jantan umur 50-60 hari dan diaklimatisasi selama 1 minggu

dengan berat badan awal antara 20-30 g yang diberi makan pelet dan diberi minum secara *ad libitum*.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 sampai Januari 2015 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) galur balb/c jenis kelamin jantan, umur 50-60 hari dengan berat badan antara 20-30 g sebanyak 30 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer (1000,500 ml), beaker glass 500 ml, neraca analitik (ketelitian 0.0001 g), disposable syringe (1 ml, 3 ml), jerigen 1000 ml, tip (blue, white, yellow), timer, kertas saring, timbangan hewan (ketelitian 0,2), vortex, pinset, alat bedah, hot plate, dengan magnetic stirrer, mikrotom, masker, hand glove, rotary shaker, vakum evaporator, lemari es, oven, pengaduk, kantung sampah, botol minum mencit, tempat makan mencit, kandang mencit, rak kandang, botol falcon 15 mL, kertas label, ependof 1,5 ml, tissue, mikroskop, preparat poly-L-lysine, inkubator, spektrofotometer.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) jenis kelamin jantan, galur balb/c, umur 50-60 hari dengan berat badan antara 20-30 g. Senyawa 7,12-dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA), metotreksat (obat antikanker), akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.), sekam, pakan mencit (pelet), serbuk kayu, NaOH, aseton, Etanol (50%, 70%, 80%, 90%, dan 95%), aluminium foil, chloroform, formalin 10%, alkohol 70%, CMC Na (*Carboxymethyl cellulose natrium*) 0,5% dan etelan. Pada analisis IFN- γ dari plasma darah mencit digunakan *Interferon-gamma (IFN- γ) Mouse pre-coated*, ELISA Kit Komabiotech No katalog K0331138 (Kit Mouse IFN- γ standard, *calibrator Diluent* RD1-2, *Assay Diluent* RD1-21, *Wash Buffer Concentrate*, *Mouse IFN- γ Conjugate*, *Color Reagent A*, *Color Reagent B*, *Stop Solution*), pewarnaan Imunohistokimia (xyllol, akuades, PBS, H₂O₂, DI watter, antibodi primer caspase 3, antibodi skunder berlabel biotin, SA-HRP (*Strep advin-horseradish peroxidase*), DAB (*diaminobenzidine*), Counterstains HE (*Hematoxylin Eosin*), dan gelatin).

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Preparasi Hewan Coba

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu mempersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam, tempat makan dan minum mencit, pakan mencit. Hewan coba yang berjumlah 30 ekor selanjutnya diaklimatisasi selama 1 minggu, diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.2 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit sebagai ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif (K-): Mencit (pembanding) tanpa perlakuan *7,12-dimetilbenz(α)Antrasena* (DMBA) dan tanpa pemberian ekstrak etanol 70% akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.).
2. Kelompok kontrol positif (K+): Mencit dengan perlakuan *7,12-dimetilbenz(α)Antrasena* (DMBA) 0,025 mg/g BB dan pemberian CMC-Na 0,5%.
3. Kelompok I (P1): Mencit dengan perlakuan *7,12-dimethylbenz(α)Antrasena* (DMBA) 0,025 mg/g BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan pemberian ekstrak etanol 70 % akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dosis 50 mg/kg BB/hari, setelah 6 minggu perlakuan DMBA.
4. Kelompok II (P2): Mencit dengan perlakuan *7,12-dimethylbenz(α)Antrasena* (DMBA) 0,025 mg/g BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan pemberian ekstrak etanol 70 % akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dosis 100 mg/kg BB/hari, setelah 6 minggu perlakuan DMBA.
5. Kelompok III (P3): Mencit dengan perlakuan *7,12-dimetilbenz(α)Antrasena* (DMBA) 0,025 mg/g BB diberikan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan pemberian ekstrak etanol 70 % akar Widuri (*Calotropis*

gigantea L.) dosis 150 mg/kg BB/hari, setelah 6 minggu perlakuan DMBA.

6. Kelompok IV (P4): Mencit dengan perlakuan 7,12-dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA) 0,025 mg/g BB dan pemberian obat anti kanker berupa metotreksat 2 kali seminggu selama 6 minggu sebanyak 0,5 ml.

Pemberian 7,12-dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA) dosis 0,025 mg/g BB sebanyak 0,5 ml, dilakukan dengan cara diinduksikan secara subkutan di tengkuk mencit sebanyak 2 kali seminggu selama 6 minggu. Selanjutnya ekstrak etanol 70% akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) sebagai terapi dilakukan secara oral sebanyak 0,5 ml setiap hari selama 2 minggu setelah 6 minggu penginduksian DMBA kecuali pada K- dan K+. Selama perlakuan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Sampel akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dari seluruh bagian akar dicuci kemudian dipotong kecil-kecil. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 2x24 jam agar membentuk simplisia. Simplisia akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dihaluskan menggunakan blender dan diayak sesuai ukuran 60 mesh sehingga diperoleh serbuk Widuri (*Calotropis gigantea* L.) yang seragam.

Sampel yang telah dipreparasi kemudian diekstraksi. Ekstraksi senyawa dilakukan dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) 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 filtrat 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.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan CMC Na 0,5%

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

3.6.5 Pembuatan Larutan 7,12-dimetilbenz(α)Antresena

Penyediaan 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) diberikan pada dosis 0,025 mg/ gram BB. Larutan DMBA dibuat dengan melarutkan 25 μ g DMBA dengan 0,1 ml aseton. Senyawa DMBA disimpan pada suhu 4° C dan dibungkus dengan aluminium foil.

3.6.6 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan 1 minggu sekali selama masa percobaan, dan dilakukan palpasi untuk mengamati perkembangan kanker. Adanya kematian hewan coba serta keadaan klinis sehari-hari yang sesuai dengan penelitian dicatat.

3.6.7 Pengambilan Sampel

Setelah 3 minggu masa perlakuan mencit dibius dengan Chloroform. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara dibuka bagian dada mencit dengan menggunakan alat bedah sehingga terlihat jantung dan isi perutnya. Darah diambil dari vena dengan menggunakan syringe 1 ml dan dimasukkan tabung vac 5 ml. Tabung disentrifus 4000 rpm selama 7 menit sehingga sel-sel darah mengendap. Bagian yang bening diambil dan dimasukkan dengan ependorf 1 ml untuk menentukan kadar IFN- γ menggunakan digunakan *Interferon-gamma* (IFN- γ) *Mouse pre-coated*, ELISA Kit Komabiotech No katalog K0331138. Pengambilan jaringan kanker dilakukan dengan cara membersihkan bulu mencit disekitar tengkuk dengan air hangat, setelah itu dilakukan pembedahan dan pengambilan jaringan fibroblas untuk analisis Caspase 3 dengan metode pewarnaan imunohistokimia.

3.6.8 Pengukuran kadar IFN- γ dengan Metode ELISA

A. Persiapan reagen dan sampel

1. *Wash buffer* yang tersedia adalah yang 20X, dibutuhkan *wash buffer* 1X sehingga dilakukan pengenceran dengan cara, 50 ml dari *wash buffer* 20X ditambahkan ke dalam air deionisasi 1000 ml. Apabila terbentuk kristal pada *wash buffer* 20X, maka ditempatkan pada suhu ruang kemudian divortex sampai larut.
2. Rekonstitusi standar IFN- γ dilakukan dengan menambahkan *Assay Buffer* A sesuai dengan label yang tertera pada vial untuk membuat 20 ng/ml

standar *stock solution*. Larutan dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit kemudian divortex agar tercampur sempurna.

B. Prosedur Kerja

1. *Assay buffer* A dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1-6, pada tabung 1 sebanyak 487,5 μl dan pada tabung 2-6 masing-masing 250 μl . Dipipet 12,5 μl dari *stock solution* dan dimasukkan ke dalam tabung 1, kemudian dari tabung 1 dipipet 250 μl dan dimasukkan ke dalam tabung 2, dari tabung 2 dipipet 250 μl dan dimasukkan ke dalam tabung 3, demikian seterusnya sampai tabung 6, sehingga didapat konsentrasi mulai dari 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 pg/ml.
2. Plate dicuci sebanyak 4 X dengan *wash buffer* 1X masing-masing 300 μl .
3. Plate kolom 1 dan 2, diisi dengan Matrix A masing-masing 50 μl kemudian ditambahkan 50 μl *standard dilution* ke dalam plate kecuali pada baris terakhir, ditambahkan *assay buffer* sebanyak 50 μl .
4. Plate kolom 3-8, diisi dengan *assay buffer* A masing-masing 50 μl kemudian ditambahkan 50 μl plasma sampel ke dalam plate kecuali pada baris terakhir.
5. Plate ditutup rapat dengan *plate sealer* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam sambil dishaker pada 200 rpm.
6. Isi plate dibuang kemudian plate dicuci 4 kali dengan *wash buffer* 1X.
7. Larutan *IFN- γ detection antibody* ditambahkan 100 μl pada setiap lubang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam sambil dishaker.
8. Isi plate dibuang kemudian plate dicuci 4 kali dengan *wash buffer* 1X.

9. Laruta *Avidin-HRP D* ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit sambil dishaker.
10. Isi plate dibuang kemudian plate dicuci 5 kali dengan *wash buffer 1X*. Pada pencucian terakhir tunggu sekitar 1 menit 30 detik.
11. *Substrat solution F* ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang dalam kondisi gelap kemudian diinkubasi selama 15 menit, terjadi perubahan warna menjadi biru.
12. *Stop solution* ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang. Terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning.
13. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm maksimal dalam waktu 30 menit setelah penambahan *stop solution* (Komabiotech, 2014).

3.6.9 Analisis Ekspresi Caspase 3 dengan Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan IHK pada penelitian ini menggunakan protokol IHK paraffin dari Cell Signaling Technology, (2007). Metode tersebut meliputi tiga langkah utama yang meliputi deparaffinisasi (*rehidrasi*), antigen unmasking dan pewarnaan (*staining*). Berikut ini adalah langkah-langkah pelaksanaannya.

1. Deparaffinisasi (*rehidrasi*)

Langkah ini diawali proses inkubasi dengan menginkubasi jaringan pada gelas objek dalam larutan xylol sebanyak tiga kali, masing-masing selama 10 menit. Selanjutnya diinkubasi jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat, mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 100, 96, 80 dan 70% masing-masing dilakukan sebanyak dua kali selama 10 menit. Proses deparaffinisasi

diakhiri dengan inkubasi jaringan dalam akuades sebanyak dua kali, masing-masing selama 5 menit.

2. Antigen unmasking

Antigen unmasking bertujuan untuk membuka epitop antigen, sehingga antigen dapat berikatan dengan antibodi. Antigen unmasking dilakukan dengan merebus jaringan dalam 10 mM larutan PBST (*buffer natrium sitrat*) pada suhu 85°C selama 10 menit. *Buffer natrium sitrat* dengan melarutkan 2,49 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ dalam 1 L akuades.

3. Pewarnaan (*Staining*)

Proses pewarnaan (*staining*) dilakukan setelah proses pendinginan pada antigen unmasking. Pewarnaan diawali dengan jaringan diinkubasi pada gelas objek dengan PBS. Selanjutnya ditetesi dengan larutan 3% H_2O_2 (*Hidrogen Peroksida*) selama 20 menit. Setelah itu, ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. PBS berperan sebagai larutan pencuci (*wash buffer*). Pada pembuatan PBS, ditambahkan Tween 20 sebanyak satu tetes. Tween 20 berperan sebagai deterjen, yaitu untuk menyatukan antara PBS dengan protein target. Tween 20 juga dapat membersihkan protein-protein lain yang bukan target, sehingga memperjelas pengamatan protein target.

Inkubasi dilanjutkan di dalam larutan blocking (*blocking solution*) selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan blocking dibuat dengan cara melarutkan susu skim (*skim milk*) ke dalam PBS, dengan perbandingan 0,1 g susu skim dalam 100 ml PBS. Larutan *blocking* sebanyak 100-400 μL

ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet, selanjutnya ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Tahapan selanjutnya adalah inkubasi jaringan dalam larutan antibodi primer pada suhu 4°C (suhu kulkas) selama semalam. Antibodi primer (1:2500) sebanyak 100-400 µL ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet. Inkubasi ini bertujuan mengefektifkan reaksi antara antigen yang terdapat pada jaringan dengan antibodi primer (reaksi Ag-Ab). Pada penelitian ini, antibodi primer yang digunakan adalah antibodi Caspase-3.

Setelah semalam, ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan diinkubasi dalam larutan antibodi sekunder berlabel biotin (anti rabbit 196 biotin berlabel) selama 60 menit pada suhu ruang. Antibodi sekunder dengan pengenceran 1:2500 sebanyak 100-400 µL ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet. Inkubasi ini bertujuan mengefektifkan reaksi antara antibodi primer yang sudah terikat pada jaringan dengan antibodi sekunder (reaksi Ag-Ab), selanjutnya ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Pada penelitian ini, antibodi sekunder yang digunakan adalah antibodi anti rabbit yang dilabel dengan enzim SA-HRP (*Streptavidin - horseradish peroxidase*) Selama 60 menit. Selanjutnya antibodi sekunder dilarutkan dan dilanjutkan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan diinkubasi dengan larutan DAB (*diaminobenzidine*) dengan

pengenceran 1:1000 selama pada suhu ruang, DAB ini sebagai substrat bagi enzim SA-HRP. Reaksi antara DAB dan enzim SA-HRP menghasilkan warna coklat. Selanjutnya jaringan ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, jaringan diinkubasi dengan larutan hematoxilin selama 5-10 menit pada suhu ruang. Menurut Panigoro *et al.*, (2007), hematoxilin merupakan salah satu pewarna yang baik untuk diagnosis histopatologik, karena hematoxilin berperan mewarnai nukelus dan jaringan terkalsifikasi dengan warna ungu.

Inkubasi jaringan berlanjut dalam akuades sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit. Setelah diinkubasi dengan akuades, langkah penting lain dalam metode imunohistokimia yang termasuk ke dalam bagian pewarnaan (*staining*) adalah dehidrasi, penjernihan dan penutupan jaringan pada gelas objek (*mounting*) (Panigoro *et al.*, 2007, Cell Signaling Technology, 2007).

Proses dehidrasi dilakukan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat, mulai dari konsentrasi rendah ke tinggi. Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 70, 80, 96 dan 100%. Inkubasi dilakukan masing-masing selama tiga menit. Setelah inkubasi dalam etanol 100%, selanjutnya adalah mounting dengan cara jaringan diinkubasi dalam larutan xylol selama 3 menit. Selanjutnya, jaringan siap ditutup dengan obyek glass. Sediaan histologis siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Perubahan histopatologi yang terlihat pada jaringan berdasarkan pewarnaan IHK dikelompokkan berdasarkan dua parameter, yaitu rata-rata

jumlah dot untuk warna coklat DAB yang terlokalisasi dan rata-rata tingkat kepekatan untuk DAB yang tidak terlokalisasi karena membentuk area berwarna coklat. Warna coklat DAB yang terlokalisasi dianalisis menggunakan Imunoratio. Warna coklat DAB yang tidak terlokalisasi dihitung berdasarkan analisis semikuantitatif. Hal ini dilakukan dengan memberikan skor terhadap tingkat kepekatan warna coklat pada area yang terbentuk (Kanter *et al.*, 2004 yang dimodifikasi, Suja *et al.*, 2009 yang dimodifikasi). Skor IHK pada penelitian ini meliputi:

Skor 0 (tidak terdapat area berwarna coklat, 0%),

Skor 1 (warna coklat sangat kurang pekat, + 1-20%),

Skor 2 (warna coklat kurang pekat, + 21- 40%),

Skor 3 (warna coklat agak pekat, + 41-60%),

Skor 4 (warna coklat pekat, + 61-80%), dan

Skor 5 (warna coklat sangat pekat, + 81-100%).

Hal ini sebagaimana Kanter *et al.*, (2004) yang memberi skor pewarnaan IHK secara semikuantitatif dengan rincian skor 0 (tidak ada warna), 1 (lemah), 2 (cukup kuat), 3 (kuat), dan 4 (sangat kuat). Suja *et al.*, (2009) memberi skor pewarnaan IHK dengan perkiraan persentase kepekatan warna coklat hasil reaksi enzim SA-HRP dan DAB yang ditunjukkan dengan tanda positif (+). Skor Suja *et al.*, (2009) meliputi 0 (tidak ada warna), 1-30% (+), 30-60% (++), dan 60-100% (+++).

3.7 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini diolah secara statistik menggunakan SPSS 16. Analisis (kadar IFN- γ dan ekspresi caspase 3) dilakukan dengan menggunakan One Way Anova dan apabila terdapat perbedaan maka diuji lanjut menggunakan *Post Hoc Turkey* HSD dengan tingkat kepercayaan 95%, tingkat kemaknaan berdasarkan nilai $P \leq 0,05$.

