

## BAB III

### SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek/Objek/Bahan Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* (RN) galur wistar betina usia 3-4 minggu, sebanyak 28 ekor berasal dari Biofarma yang dibagi 5 kelompok perlakuan.

Kriteria inklusi :

- Tikus sehat (bergerak aktif dan lincah, rambut tidak tampak kusam dan rontok)
- Berat badan 80-200 gram
- Tikus belum pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya

Kriteria eksklusi :

- Sakit atau mengalami penurunan berat badan selama masa adaptasi

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Daun dewa

2. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) (berasal dari Sigma-Aldrich, St. Louis)
3. Minyak jagung
4. Pakan standar tikus BR-2
5. Aquades
6. PBS-Formalin 10%
7. Bahan pembuatan dan pewarnaan preparat
  - *Hematoxylin* dan Eosin

### 3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Kandang terbuat dari bak semi plastik dengan ukuran panjang x lebar x tinggi = 30 x 45 x 20 cm, dengan bagian atas tertutup oleh kawat strumun.
2. Sonde untuk memasukkan ekstrak daun dewa
3. Mikroskop cahaya
4. Timbangan analitik
5. Peralatan untuk pembuatan preparat
  - Medium transport jaringan hati
  - *Tissue processor*
  - Mikrotom
  - *Object glass*
  - *Hot plate*
  - *Cover glass*

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vivo* dengan rancangan acak lengkap. Metode yang digunakan adalah uji pemberian ekstrak air daun dewa terhadap tikus *Rattus norvegicus* betina yang diinduksi DMBA. Selanjutnya dilakukan observasi gambaran jaringan hati dengan parameter pada vena sentral yang utuh dan degenerasi hidropik hepatosit pemeriksaan histopatologi.

### 3.2.2 Definisi Konsep dan Operasional Variable

#### 3.2.2.1 Definisi Konsep Variable

- a. Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak daun dewa
- b. Variabel terikat:
  - i. Vena sentral utuh
  - ii. Degenerasi hidropik hepatosit
- c. Variabel terkendali:
  - i. Makanan tikus
  - ii. Lingkungan pemeliharaan tikus
  - iii. Konsentrasi DMBA
  - iv. Jenis tikus
  - v. Usia dan berat badan tikus

### 3.2.2.2 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Konsentrasi ekstrak daun dewa	Konsentrasi ekstrak daun dewa ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu yakni (n), (1/2n), dan (2n).	Timbangan	Numerik	- Konsentrasi 1: 250 mg/kgBB. - Konsentrasi 2: 500 mg/kgBB. - Konsentrasi 3: 750 mg/kgBB
Gambaran jumlah vena sentral yang utuh	Gambaran jumlah vena sentral yang utuh pada seluruh wilayah/zona secara random pada zona 1, 5 dan 9 dengan pembesaran 40X	Mikroskop dan Image Raster	Numerik	Hasil ukur sesuai dengan perhitungan
Gambaran jumlah degenerasi hidropik hepatosit	Gambaran jumlah degenerasi hepatosit dihitng pada seluruh wilayah/zona secara random pada zona 1, 5 dan 9 dengan pembesaran 1000X	Mikroskop dan Image Raster	Numerik	Hasil ukur sesuai dengan perhitungan

### 3.2.3 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok didasarkan pada rumus Frederer dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Jumlahnya perlakuan (t) adalah lima, sehingga jumlah sampel perlakuan (r) adalah

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

$$(r-1) (5-1) \geq 15$$

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

**Keterangan:**

r: *repetition* yaitu jumlah sampel pada tiap kelompok

t: *treatment* yaitu jumlah kelompok perlakuan

Jumlah minimal sampel yang akan di gunakan untuk penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Total sampel adalah 5 kelompok x 5 ekor = 25 ekor ditambah 10% untukantisipasi *dropout* sehingga total tikus menjadi 28 ekor.

**3.2.4 Kelompok Perlakuan**

Tikus dibagi dibagi menjadi 5 kelompok, masing masing kelompok 5 sampel yaitu:

- a. Kelompok I (Kontrol normal): Tikus *Rattus norvegicus* betina yang diberi pakan normal.
- b. Kelompok II (Kontrol negatif): Tikus *Rattus norvegicus* betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal.
- c. Kelompok III (Perlakuan 1): Tikus *Rattus norvegicus* betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 250 mg/kgBB.
- d. Kelompok IV (Perlakuan 2): Tikus *Rattus norvegicus* betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 500 mg/kgBB.
- e. Kelompok V (Perlakuan 3): Tikus *Rattus norvegicus* betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 750 mg/kgBB.

### 3.2.5 Prosedur Penelitian

#### 3.2.5.1 Penentuan Kadar Ekstrak Daun Dewa

Kadar ekstrak air daun dewa yang di gunakan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu. Penelitian terdahulu konsentrasi efektif yang menghambat proliferasi sel kanker adalah sebesar 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750 mg/kgBB.<sup>23</sup>

#### 3.2.5.2 Pembuatan Ekstrak Air Daun Dewa (*Gynura divaricata*)

Daun dewa yang digunakan adalah dari Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung. Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan pelarut air, pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi Universitas Institut Teknologi Bandung, pembuatan ekstrak dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

Daun dewa yang sudah dipanen diambil 1kg lalu diekstraksi dengan 8L air setiap 1kg simplia kering, dalam suhu 100 derajat selama 1,5 jam di dalam kondensor reflux. Hasil ini disaring, 90% dari total gabungan filtratnya dipekatkan pada suhu 50 derajat *celcius* oleh evaporator, lalu diliofilisasi utuk memperoleh hasil 26,3gram ekstrak kering.<sup>24</sup> Cara lain membuat ekstrak air daun dewa ditimbang dulu 3gram dalam 300 ml air, dengan suhu 121 derajat *celcius*, kemudian di ekstraksi 3 kali lalu di sentrifugasi buat memperoleh supernatan.<sup>13</sup>

### 3.2.5.3 Induksi Tikus

Tikus Wistar betina usia 3-4 minggu yang telah diadaptasi, diinduksi DMBA dengan konsentrasi 20 mg/kg BB selama 4,5 minggu dengan pemberian 2 kali setiap minggu.<sup>4, 25</sup>

### 3.2.5.4 Perlakuan percobaan

Penelitian ini diawali dengan masa adaptasi pada hewan coba agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan di ruangan Laboratorium Biomedik lantai 4 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung selama 1,5 minggu. Selama proses adaptasi tersebut, bobot tubuh dan kondisi tikus dipantau setiap harinya untuk menghindari adanya *drop out*. Untuk memenuhi kriteria inklusi, tikus yang sakit dan mengalami penurunan berat badan minimal 10% setelah masa adaptasi akan dikeluarkan dari kelompok uji.

Setelah masa adaptasi, tikus diinduksi DMBA 20 mg/kg BB selama 4,5 minggu dengan pemberian 2 kali setiap minggunya.<sup>4, 25</sup> Pada induksi ke 5 (minggu ke 2), masing-masing tikus diberikan perlakuan pemberian ekstrak pelarut air daun dewa dengan konsentrasi yang diberikan adalah 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kg BB dengan cara transesofageal menggunakan sonde oral dan pemberian dilakukan 3 kali setiap minggunya.<sup>4, 23</sup>

### 3.2.5.5 Pembuatan Preparat

Pada minggu ke-8, tikus akan dikorbankan kemudian nekropsi jaringan kanker dengan terlebih dahulu dianestesi menggunakan ketamine HCL dengan dosis 0,2 cc/100g BB secara intramuskular. Selanjutnya dilakukan pembedahan dan nekropsi pengambilan mikrostruktur jaringan hati. Preparat histiologi jaringan hati tikus dibersihkan dengan menggunakan larutan normal saline, lalu difiksasi menggunakan 10% PBS-formalin selama 24 jam selanjutnya dilakukan proses pembuatan preparat histopatologi.<sup>26</sup> Jaringan hati terlebih dahulu diproses dengan menggunakan *tissue processor* sebelum kemudian ditanam di dalam parafin. Parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 sampai 5µm lalu ditempelkan pada *object glass* dan dipanaskan dengan *hot plate*. Deparafinisasi dengan *xylol* selama 6 menit lalu secara berturut-turut dicuci dengan alkohol 90%, 80%, dan 70%. *Object glass* dicuci dengan air mengalir dan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Hematoxylin* dan Eosin (H&E). Prinsip pewarnaan yang bersifat asam akan menarik zat/larutan yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat/larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah. Tahapan pewarnaan yaitu: pertama, deparafinasi: untuk menghilangkan/melarutkan *paraffin* yang terdapat pada jaringan dengan menggunakan *xylol*, kemudian rehidrasi untuk memasukkan air ke dalam jaringan.

Pewarnaan pertama dengan menggunakan *hematoxylin* untuk memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan, dilakukan differensiasi yang bertujuan mengurangi warna biru pada inti dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma dengan menggunakan HCL 0,6%, lalu dilakukan *blueing* untuk memperjelas warna biru pada inti sel.<sup>27,28</sup>

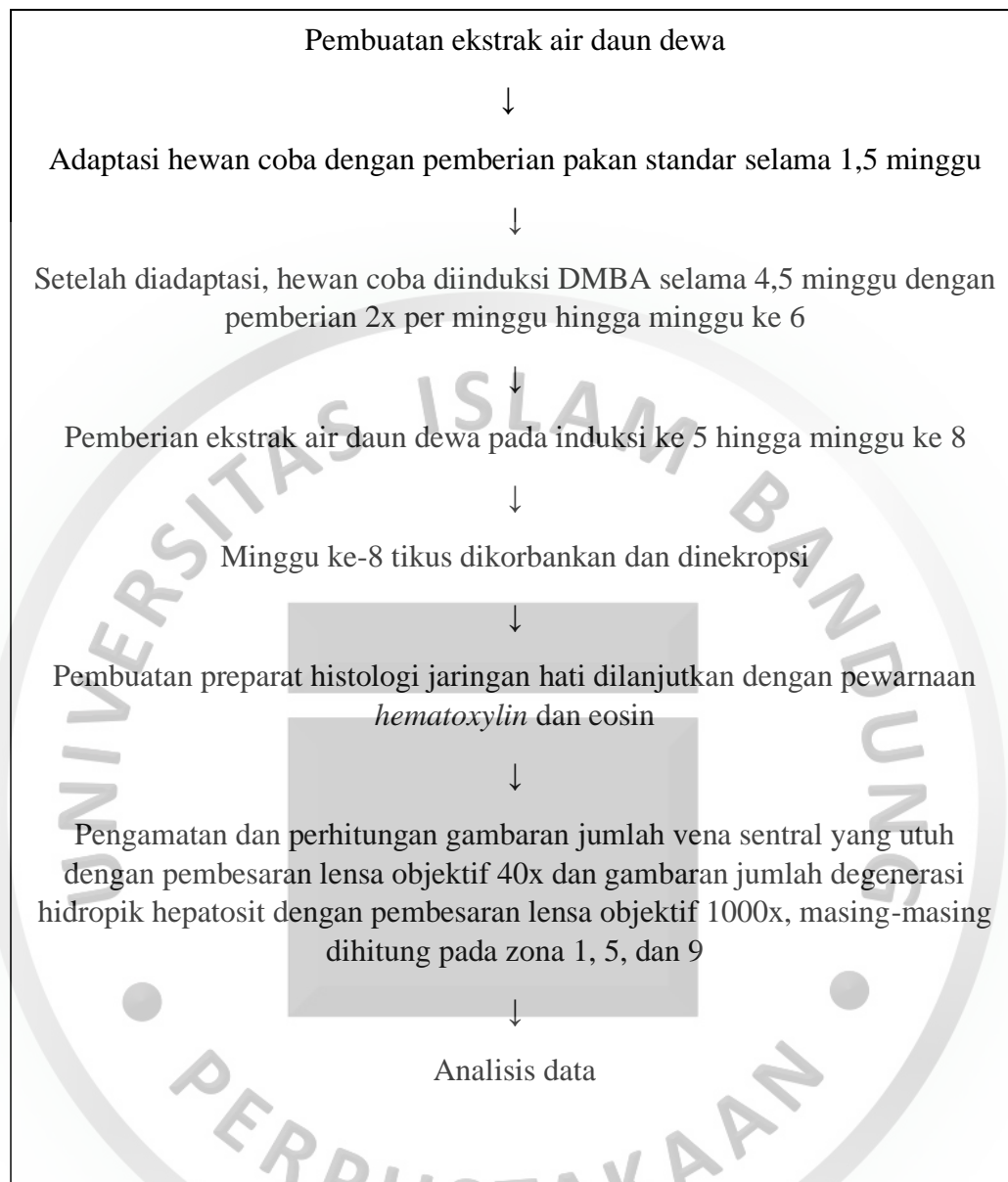


Pewarnaan kedua untuk memberi warna merah pada sitolasma sel dengan menggunakan zat *eosin*. Terakhir dehidrasi untuk menghilangkan air dari jaringan. Kemudian, teteskan entelan pada *object glass* dan tutup dengan *cover glass* kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.<sup>27,28</sup>

#### **3.2.5.6 Pengamatan Jumlah Vena Sentral Utuh dan Degenerasi Hidropik Hepatosit**

Jumlah vena sentral utuh dan degenerasi hidropik hepatosit dalam suatu jaringan dapat dilakukan dengan cara menghitung jumlah mitosis sel dalam 10 *High Power Field* (HPF) atau lapang pandang besar. HPF adalah area lapangan yang terlihat dengan objektif 40x, 100x, dan 1000x, serta tergantung pada diameter lapangan mikroskop. Luas HPF yang diukur dalam mm<sup>2</sup> dapat sangat bervariasi dari mikroskop ke mikroskop. Preparat dibaca berdasarkan setiap lapang pandang yang terlebih dahulu telah dibagi menjadi 9 kotak, kemudian seluruh preparat tersebut diberi tanda 1 sampai 9 kotak dan dibaca pada kotak ke 1, 5, dan 9 yang setiap kotak terdiri dari 1 lapang pandang. Untuk melihat jumlah vena sentral utuh menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x, selain itu untuk melihat jumlah degenerasi hidropik hepatosit menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x

### 3.2.6 Alur Penelitian



**Gambar 3.1 Alur Penelitian**

### 3.2.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS versi 24 dengan nilai  $p < 0,05$ . Sebelum melakukan analisis statistik untuk menilai rerata jumlah vena sentral utuh dan degenerasi hidropik hepatosit, keseluruhan data diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel dilanjutkan dengan uji homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan tidak homogen, dan data tidak terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* untuk menilai perbedaan rerata antar kelompok secara keseluruhan karena salah satu variabel bersifat numerik dan jumlah kelompok lebih dari 2. Hasil uji menunjukkan hasil yang signifikan, maka dilakukan uji statistik lanjutan dengan menggunakan uji *Man Withney* untuk menilai kelompok yang berbeda paling signifikan.

### 3.2.8 Waktu Penelitian

No.	Waktu	Kegiatan
1.	Januari- Februari 2019	Pencarian jurnal Penyusunan proposal penelitian Sidang usulan penelitian
2.	Maret 2019	Mempersiapkan daun sirsak Mempersiapkan DMBA
3.	April 2019	Mengekstrak daun sirsak dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi Unisba Induksi kanker payudara di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung Pemberian perlakuan pada hewan coba
4.	Mei-Juli 2019	Perlakuan nekropsi dan pembuatan preparat histopatologi Pengamatan hasil penelitian
5.	September- Desember 2019	Analisis statistic hasil yang didapat dan membuat pembahasan Pengumpulan artikel
6.	Januari 2020	Sidang skripsi

### 3.2.9 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, pengestrakan dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung, dan determinasi tanaman dewa dilakukan di SITH Institut Teknologi Bandung.

### 3.2.10 Aspek Etik Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan tikus *Rattus norvegicus* galur wistar betina berusia 3-4 minggu yang sebelumnya telah dikembangkan oleh Biofarma. Penggunaan tikus *Rattus norvegicus* dalam penelitian ini dilakukan sebaik-baiknya untuk kemajuan ilmu pengetahuan, penelitian, dan kepentingan masyarakat dengan mempertimbangkan aspek etik penelitian. Komite etik penelitian Fakultas Kedokteran Islam Bandung telah menyetujui dengan nomor: 93/Komite Etik. FK/IV/2019.