

BAB IV

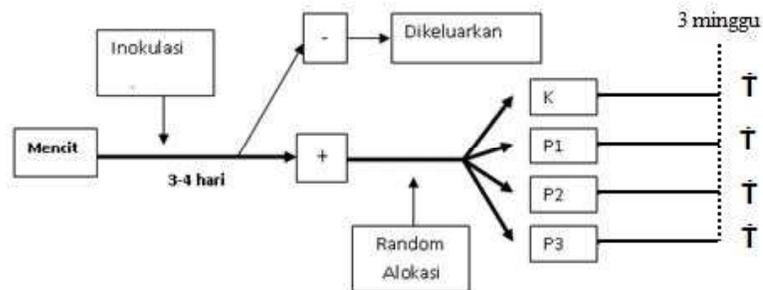
METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*post test only control group design*" untuk mengetahui indeks mitosis dan "*pre and post test control group design*" untuk perubahan diameter massa tumor (selisih sesudah dan sebelum perlakuan). Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat NS 0,175 mL/hari.
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat NS 0,36 mL/hari.
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat NS 0,7 mL/hari.

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 7. Skema rancangan penelitian

4.2. Sampel Penelitian

Hewan coba adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kriteria inklusi :

- Mencit betina berusia 3 bulan
- Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi
- Tidak ada abnormalitas anatomis.
- Tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi

Kriteria eksklusi :

- Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi.
- Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)

Besar sampel menurut *Research Guidelines For Evalution The Safety and Efficiency of Herbal Medicines* dari World Health Organization (WHO) tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% tiap kelompok, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit. Dua puluh empat mencit yang sudah berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak dengan cara penomoran dan pengundian. Pembagian menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit.

Kelompok P3 : 6 mencit

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 2 bulan. Perlakuan pada mencit dan proses pengambilan jaringan dilakukan di laboratorium Histologi FK Universitas Indonesia, proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Gajah Mada / RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah pemberian dosis bertingkat ekstrak *Nigella sativa*.

4.4.2. Variabel antara

Variabel antara adalah indeks mitosis.

4.4.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah perubahan diameter massa tumor.

4.4.3. Definisi operasional

1. Ekstrak NS adalah ekstrak yang berasal dari biji *Nigella sativa*, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2 mg/mL, diberikan dengan dosis bertingkat 0,175 mL/hari, 0,36 mL/hari dan 0,7 mL/hari.

Skala variabel : rasio.

2. Indeks mitosis adalah perbandingan jumlah sel-sel yang mengalami mitosis yaitu pada fase profase, metafase, anafase dan telofase dengan jumlah keseluruhan sel dalam populasi sel.²⁵ Pada penelitian ini menggunakan metoda yang digunakan Aihara M dkk.

Skala variabel : rasio.

3. Perubahan diameter massa tumor adalah dengan cara mengurangi diameter massa tumor sudah dan sebelum perlakuan. Cara pengukuran dengan menggunakan alat caliper tumor (CaliPro^R), diukur pada diameter terbesar tumor satu dimensi, satuannya (cm).

Skala variabel : cm.

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1. Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina *strain* C3H dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu.

Kanker payudara mencit diperoleh dari mencit donor dilanjutkan dengan ditransplantasikan ke mencit resipien.

Ekstrak *nigella sativa* yang digunakan, diperoleh dengan cara :

- 1 kg *nigella sativa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50mg) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.
- Hasil ekstrak dimasukkan dalam labu *rotary evaporator* dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
- Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.
- Didapatkan hasil 5,5mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), dan hasil ekstrak diencerkan dengan *aquabidest* sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk biji 5 gram 1 x sehari⁸, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026³⁵ dikalikan konstanta hasil ekstrak

0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$ mg/hari (0,36 mL). Selain itu juga diberikan dosis 0,035mg (0,175 mL)/hari dan 0,14 mg (0,7 mL)/hari.

4.5.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan garam fisiologik
- c. Es batu
- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. *Bufferedformalin* 10%
- b. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute, xylol
- c. Parafin cair (Histoplast)
- d. Albumin danpoly-L-lysine
- e. Bahan pengecatan TDEC
- f. Canada balsam dan entelan

4.5.4. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Gunting lurus 10 Cm
5. Gunting bengkok 10 Cm
6. Pinset anatomi 10 Cm

4. Spuit 1cc
5. Jarum suntik trocar
9. Alas fiksasi

4.5.5. Alat untuk pengukuran diameter tumor

4.5.6. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan

- 1 unit *multi head microscope Olympus^R*
- *Nikon^R digital net camera DN 100 + SD Card*
- 1 unit komputer personal *Intel Pentium^R Processor*

4.6. Pelaksanaan Penelitian

4.6.1 Cara perlakuan

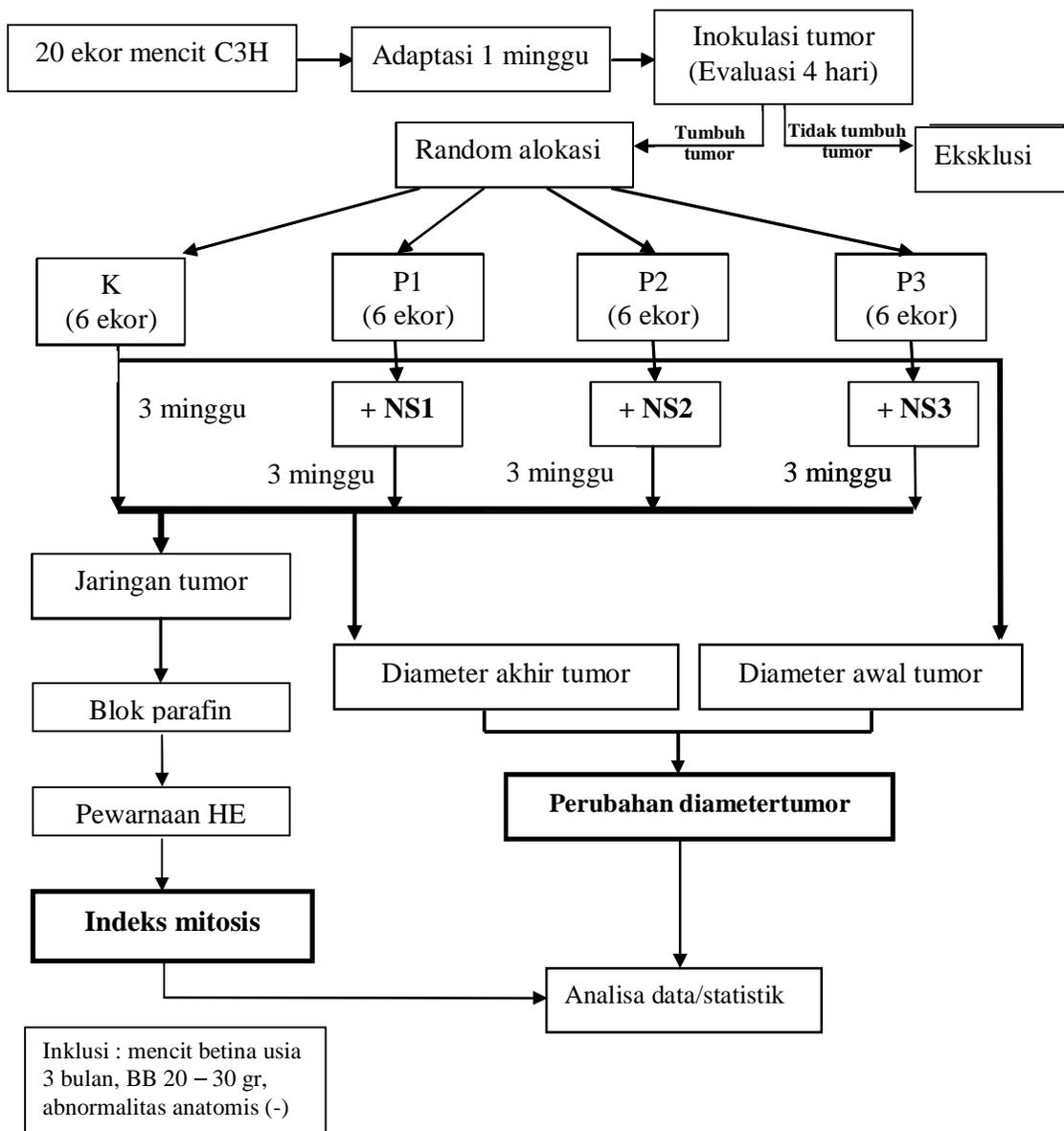
Dua puluh empat ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara *ad libitum*.

Dua puluh empat ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum* dan diukur diameter tumornya. Perlakuan pemberian ekstrak *Nigella sativa* dengan menggunakan pipet mikro selama 3 minggu.

Setelah perlakuan selesai, diameter tumor diukur kembali. Mencit di anaestesi dengan eter selanjutnya mencit dibunuh dengan cara di dislokasi

cervical-nya, kemudian diambil jaringan tumor. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok parafin.

4.7. Alur Kerja



Gambar 8. Alur kerja

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Prosedur transplantasi tumor

- a. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- d. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan ke arah jalur susu (milk streak) mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin dengan ketepatan 10^{-1} .
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

- g. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

4.8.2. Prosedur pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro^R) dengan ketepatan 10^{-2} . Tumor diukur pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi.

4.8.3. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

a. Fiksasi

Potongan kanker payudara dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan *aquadest* selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan kanker payudara dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan *alkohol-xylol* selama 1 jam dan kemudian larutan *xylol* murni selama 2 x 2jam.

c. *Impregnasi*

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. *Embedding*

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyekt yang sebelumnya telah diolesi *polilisin* sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyekt dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan HE

1. <i>Xylol</i>	1 menit	11. Air	15 detik
2. <i>Xylol</i>	2 menit	12. Alkohol 80%	15 detik
3. <i>Xylol</i>	2 menit	13. Alkohol 96%	30 detik
4. Alkohol 100%	2 menit	14. Alkohol 100%	45 detik
5. Alkohol 96%	2 menit	15. <i>Xylol</i>	1 menit
6. Alkohol 80%	2 menit	16. <i>Xylol</i>	1 menit
7. Air	1 menit		
8. <i>Mayer HE</i>	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. <i>Eosin</i> (0,5%)-Alkohol-Asam asetat	1 menit		

4.8.4. Prosedur penghitungan indeks mitosis

Indeks mitosis dihitung dengan metode yang digunakan oleh Aihara M dkk., dimana sediaan tumor yang dilakukan pengecatan dengan Hematoxylin-Eosin dihitung jumlah sel yang sedang mengalami mitosis (dalam fase profase,

metafase, anafase dan telofase) per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat dalam satu blok paraffin, kemudian diambil nilai rata-ratanya. Preparat dibaca mulai dari kiri ke kanan, kemudian kebawah mulai dari kiri lagi berurutan.³⁴

4.9. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan Shapiro-Wilk test didapatkan distribusi data normal dan homogen. Analisis statistik untuk uji beda variabel indeks mitosis dan perubahan diameter massa tumor menggunakan *one way ANOVA*, yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*. Uji korelasi dengan *Pearson test* dilakukan terhadap keempat kelompok perlakuan dan kontrol.

Batas derajat kemaknaan bila variabel yang dianalisis mempunyai nilai $p \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Seluruh analisis data dilakukan dengan program komputer.

4.10. Persyaratan Etik

Penelitian mengikuti *animal ethics* dalam mengelola hewan coba. Sebelum melaksanakan penelitian, proposal telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh hewan coba dirawat sesuai standar pemeliharaan hewan.