

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu perawatan, perlakuan dan pembedahan terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi FK UB. Prosedur Imunohistokimia untuk melihat ekspresi TNF- α dan ICAM-1 dilaksanakan di Laboratorium Biomol FMIPA UB. Pengamatan hasil Imunohistokimia dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB. Penelitian ini dilakukan selama bulan September sampai dengan Desember 2013.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Perawatan Hewan Coba

Kandang pemeliharaan kelompok untuk tikus terbuat dari kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 12 cm sebanyak lima buah beralaskan sekam ditutup kawat ram, tempat pakan, tempat minum (*nipple*), sekam, pakan standar (komposisi pakan standar: air 12%, protein 12%, lemak kasar 3-7%, serat kasar 8%, abu 10%, fosfor 0,9-1,2%, koksidiostat, antibiotik), dan air minum.

4.2.2 Alat dan Bahan Induksi Kanker Mammae

Timbangan analitik, mortar, spuit, aluminium foil, botol steril, DMBA (*7,12-dimethylbenz(a)anthracene*), minyak biji bunga matahari dan *normal saline*.

4.2.3 Alat dan Bahan Terapi Kanker Mammae

Timbangan analitik, mortar, serbuk kurkumin (Lot No. M9H7703, Nacalai Tesque, Inc), vitamin E (*α -tocopherol*), pelarut kristal CMCNa 5%, NaCl fisiologis dan botol steril.

4.2.4 Alat Perlakuan Terapi Kepada Hewan Coba

Sonde lambung (*oral gavage*).

4.2.5 Alat Pembedahan Tikus

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, spidol permanen, pot sampel dan alkohol.

4.2.6 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi TNF- α dan ICAM-1 Menggunakan Metode Imunohistokimia

Larutan PFA 4%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, *etanol absolute*, xylol, paraffin cair, mikrotom, gelas objek, *hot plate*, inkubator, normal serum (blocking), antibodi primer antibodi (TNF- α *anti rabbit* dan ICAM-1 *anti rabbit*), antibodi sekunder *anti rabbit* berlabel biotin, streptavidin, *Diaminobenzidine* (DAB).

4.3 Rancangan Penelitian

Kriteria *purposive* hewan coba adalah tikus putih galur Sprague Dowley, umur 10-12 minggu, jenis kelamin betina, berat badan antara 150-200 gram, dan sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini mendapatkan sertifikasi layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya No. 189/KEP/UB (Lampiran 1).

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok A (kontrol negatif), B (kontrol positif), C (perlakuan 1), D (perlakuan 2) dan E (perlakuan 3). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
A (Kontrol negatif)	Tanpa perlakuan
B (Kontrol positif)	Induksi DMBA 10 mg/kg BB dan estrogen 20.000 IU
C (Perlakuan 1)	Induksi DMBA 10 mg/kg BB dan estrogen 20.000 IU/kg BB. Terapi kurkumin 48 mg/kg BB + vitamin E 300 IU/ekor
D (Perlakuan 2)	Induksi DMBA dosis 10 mg/kg BB dan estrogen 20.000 IU/kg BB. Terapi kurkumin 72 mg/kg BB + vitamin E 200 IU/ekor
E (Perlakuan 3)	Induksi DMBA dosis 10 mg/kg BB dan estrogen 20.000 IU/kg BB. Terapi kurkumin 108 mg/kg BB + Vitamin E 100 IU/ekor

Penentuan jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus sebagai berikut (Montgomery, 2011).

Sehingga,

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok (terdiri dari dua macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan rumus perhitungan di atas, maka jumlah ulangan yang diperlukan dalam setiap kelompok paling sedikit 4 kali.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

- Variabel bebas : - Induksi DMBA
- Induksi estrogen
- Terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E

Variabel tergantung : Ekspresi TNF- α dan ICAM-1

Variabel kendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) betina umur 10-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, pakan standar, air minum *ad libitum* dan dalam suhu ruang.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Hewan coba diadaptasikan dalam kandang kelompok selama 1 minggu sebelum perlakuan. Diberi pakan standar sebanyak 20 g (10% dari berat badan) dan minum secara *ad libitum* setiap hari selama 1 minggu selama masa adaptasi. Pemberian pakan dilakukan setiap pagi dan sore (Koolhaas, 2010).

Dilakukan penimbangan pada tikus dan didapatkan berat badan antara 150-200 gram. Tikus dibagi dalam 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu A (kontrol negatif), B (kontrol positif), C (perlakuan 1), D (perlakuan 2) dan E (perlakuan 3). Tikus dipelihara di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran UB Malang.

4.5.2 Preparasi DMBA

Dosis DMBA yang dibutuhkan pada setiap ekor tikus adalah 10 mg/kg BB dengan berat tikus rata-rata 175 gram, yang dilarutkan dalam 1 ml pelarut/ekor berupa campuran antara minyak biji bunga matahari dan *normal saline* dengan perbandingan 1:3 (modifikasi Cordeiro, 2011). Perhitungan dosis tercantum pada Lampiran 4.

DMBA yang digunakan diperoleh dari Sigma-Aldrich. Preparasi DMBA dilakukan dengan menimbang DMBA sesuai dosis yang sudah disesuaikan dengan berat badan tikus, dosis yang digunakan adalah 10 mg/kg BB (modifikasi Cordeiro dan Kaliwal, (2011) dengan dosis 20 mg/kg BB). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 10. Setelah ditimbang, DMBA dihaluskan menggunakan mortar. DMBA kemudian dilarutkan dengan NaCl fisiologis serta minyak biji bunga matahari dengan perbandingan 1:3 (Pugalendhi *et al.*, 2011). Proses pelarutan dilakukan dengan menambahkan NaCl fisiologis dan minyak biji bunga matahari ke dalam mortar sambil terus diaduk hingga homogen. Kemudian larutan yang telah homogen dimasukkan ke dalam botol steril dan dibungkus menggunakan aluminium foil agar tidak tumpah.

4.5.3 Pembuatan Hewan Model Kanker Mammae

Pembuatan hewan coba kanker mammae dilakukan dengan menginduksi DMBA dan estrogen. Induksi DMBA dengan dosis induksi 10 mg/kg BB diberikan setiap dua hari sekali sebanyak 10 kali secara sub kutan pada mammae tikus (modifikasi Cordeiro, 2011). Perhitungan dosis tercantum pada Lampiran 4. Induksi estrogen dilakukan dengan dosis 20.000 IU/kg BB secara *intramuscular* sebanyak

lima kali yang dilakukan secara bergantian dengan induksi DMBA (modifikasi Naciff *et al*, 2002). Perhitungan dosis tercantum pada Lampiran 5.

4.5.4 Pengamatan Tikus Pasca Induksi DMBA

Tikus yang sudah diinduksi DMBA ditimbang berat badannya dan dipalpasi pada daerah mammae. Palpasi dilakukan seminggu sekali untuk mengetahui perkembangan kanker sampai terbentuknya nodul pada mammae tikus (Hamid dan Meiyanto, 2009). Adanya benjolan pada daerah mammae yang telah mengeras dengan bentuk yang tidak beraturan menunjukkan terjadinya kanker mammae (Khasanah, 2013).

4.5.5 Pelaksanaan Terapi Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E

Bahan terapi kanker mammae dibuat dengan menggunakan kombinasi kurkumin dan vitamin E diberikan per oral sebanyak 1 ml per ekor per hari. Perhitungan dosis kurkumin dan vitamin E tercantum pada lampiran 6 dan lampiran 7. Terapi dosis satu (P1) kombinasi kurkumin dengan dosis 48 mg/kg BB dan vitamin E dengan dosis 300 IU/kg BB, terapi dosis dua (P2) kombinasi kurkumin dengan dosis 72 mg/kg BB dan vitamin E dengan dosis 200 IU/kgBB, sedangkan terapi dosis tiga (P3) kombinasi kurkumin dengan dosis 108 mg/kg BB dan vitamin E dengan dosis 100 IU/kg BB. Terapi dilakukan secara peroral melalui sonde lambung dan diberikan setiap hari selama 21 hari.

4.5.6 Pengambilan Sampel Organ Mammae

Pengambilan organ mammae pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 50. Langkah pertama tikus dimasukkan dalam wadah yang berisi kloroform 10%. Kemudian tikus diletakkan pada posisi terlentang dan

dilakukan insisi pada bagian abdomen, kemudian organ mammae diambil. Organ mammae dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% dan selanjutnya dimasukkan dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4%.

4.5.7 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi

Jaringan mammae difiksasi pada *paraformaldehid* (PFA) 4%. Kemudian dilakukan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan absolut) masing-masing selama 60 menit. Setelah itu dilakukan *clearing* menggunakan xylol 2 kali masing-masing 60 menit. Selanjutnya dilakukan infiltrasi menggunakan parafin cair lalu dilakukan *embedding* pada blok parafin dan didinginkan pada suhu 4°C. Organ mammae dalam blok parafin dipotong 5 µm menggunakan *rotary microtome*. Potongan organ dicelupkan dalam air hangat suhu 37 – 40°C lalu diambil menggunakan objek glass dan dikeringkan dengan *hot plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 38 – 40°C selama 24 jam. Pembuatan preparat mammae secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 14.

4.5.8 Pengamatan Ekspresi TNF- α dan ICAM-1

Pengamatan ekspresi TNF- α dan ICAM-1 dilakukan dengan metode imunohistokimia. Langkah pertama preparat mammae direndam ke dalam xylol I, xylol II, ethanol absolut 1, ethanol absolut 2, ethanol 90%, ethanol 80%, ethanol 70%, ethanol 30% dan aquades selama masing-masing 1x5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. *Unmusking* dalam buffer sitrat pH 6 dan EDTA pH 8 selama 10-20 menit pada suhu 100°C lalu angkat slide dan cuci dengan aquades. Selanjutnya ditetesi 3% H₂O₂ selama 10 menit untuk menghentikan enzim peroksidase dalam jaringan. Dicuci kembali dengan

PBS pH 7,4 selama 5 menit selama 3 kali dan diblok dengan susu skim 1% dalam PBS selama 30 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya, diinkubasi dengan antibodi primer *anti rabbit TNF- α* dalam susu skim 1% dalam pbs-tween suhu 4°C selama 16-24 jam. Lalu cuci slide dengan PBS 3 kali. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder *goat anti-rabbit IgG Biotin Labeled* selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 45 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditetesi dengan DAB (*Diaminobenzidine*) selama 30 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit lalu slide direndam dalam air kran selama 10 menit. Slide dicuci dengan aquades dan dikeringkan kurang lebih satu malam. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. *Mounting slide* dengan cairan pekat dan ditutup dengan *cover glass* lalu keringkan dalam suhu ruang. Hasil diamati menggunakan mikroskop *olympus* dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Pengamatan preparat imunohistokimia dilakukan dengan menghitung presentase area yang kemudian di analisa dengan *software axio vision*.

4.5.9 Analisa Data Ekspresi TNF- α dan ICAM-1

Data penelitian berupa ekspresi TNF- α dan ICAM-1 organ mammae tikus putih diamati menggunakan metode Imunohistokimia kemudian dianalisis statistika dengan uji *one way analysis of variant* (ANOVA). Menggunakan

program SPSS 16 *for windows*. Uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test* (Kusriningrum, 2008).

