

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain analisis eksperimental secara *in silico* dan *in vivo*. Secara *in silico*, senyawa nobiletin (golongan flavonoid) dalam fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dianalisis menggunakan metode *molecular docking* terhadap protein VEGF dan HER-2. Sedangkan analisis laboratoris dilakukan secara *in vivo* perlakuan terhadap hewan uji tikus betina galur *Sprague dawley* yang terinduksi DMBA dengan pengecatan histologi kelenjar payudara dengan Hematoksillin-Eosin dan uji Imunohistokimia dengan antibodi VEGF.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi, Laboratorium Mikroanatomi Fakultas Kedokteran Hewan, dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit IV Universitas Gadjah Mada serta Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Seluruh kegiatan dalam penelitian ini akan dilaksanakan pada

bulan Juli 2018 sampai bulan April 2019. Sedangkan untuk analisis data dilaksanakan pada bulan Mei 2019.

C. Populasi dan Sampel

Besar sampel yang digunakan yaitu 20 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* yang berumur 40 hari dengan berat badan 40 sampai 60 gram. Terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB sebanyak 2 kali seminggu selama 5 minggu dan pemberian FKB dengan dosis 750 mg/kg BB dan 1.500 mg/kg BB.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1) Variabel bebas : fraksi kloroform herba bandotan
(*Ageratum conyzoides L.*).

2) Variabel kontrol : fase gerak dan fase diam

3) Variabel tergantung : warna spot dan nilai Rf

b. Uji *In Silico* dengan *Molecular Docking*

1) Variabel bebas : struktur optimasi senyawa nobiletin

2) Variabel kontrol : struktur protein VEGF, HER- 2, dan COX-
2, serta perangkat lunak dan keras komputer.

3) Variabel tergantung: skor *docking*

c. Pengecatan Hematoksillin-Eosin

- 1) Variabel bebas : dosis ekstrak
- 2) Variabel kontrol : usia dan berat badan hewan uji, kondisi lingkungan, serta waktu pemberian.
- 3) Variabel tergantung: histologi sel kelenjar payudara

d. Uji Imunohistokimia

- 1) Variabel bebas : kadar ekstrak
- 2) Variabel kontrol : usia dan berat badan hewan uji, kondisi lingkungan, serta waktu pemberian
- 3) Variabel tergantung: ekspresi protein

2. Definisi Operasional

- a. Nilai Rf : merupakan faktor retardasi solut yang diperoleh dari perbandingan jarak elusi sampel dengan jarak elusi fase gerak pada plat silika gel (Gandjar, *et al.*, 2015).
- b. Skor *Docking* : merupakan nilai afinitas dari ikatan antara protein dan ligan.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Seperangkat komputer, gelas ukur (*Pyrex*), pipet (*Pyrex*), bejana, mikroskop, *rotary evaporator* (*IKA RV10*), corong pisah (*Pyrex*), *waterbath*, kandang, bunsen, blok kayu, gelas objek (slide), oven

(*Memmert*), blender, timbangan analitik (*Sartorius*), alat bedah, serta lampu UV 254 dan 366 nm.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Utama : Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang diperoleh di Kasihan, Bantul, Yogyakarta.

b. Bahan Lainnya

Kloroform (*Bratachem*), etanol 70% (*Bratachem*), akuades, *Haematoxyllin*, *Eosin*, plat gel silika, struktur protein VEGF, COX-2, dan HER-2, *xylol*, metanol, aplikasi *Autodock Vina* dan seperangkat aplikasi lainnya, *7,12-dimethylbenz[a]antrasen* (DMBA), *corn oil*, CMC-Na 0,5%, serta antibodi VEGF

F. Cara Kerja

1. Uji *In Silico* dengan *Molecular Docking*

Disiapkan seperangkat komputer dan mengunduh aplikasi *Autodock Vina* dan aplikasi pendukung lainnya seperti *DS Visualizer*, *AutoDockTools*, *Phyton*, *YASARA* dan *Open Babel*. Aplikasi tersebut dapat diunduh secara gratis melalui beberapa situs di internet. Setiap aplikasi memiliki fungsi dalam proses *molecular docking*. Aplikasi utama yang digunakan adalah *Autodock Vina*. *DS Visualizer* digunakan untuk preparasi dan visualisasi protein target dan ligan uji. Sedangkan *AutoDockTools* digunakan untuk mengolah protein target dan ligan uji. *AutoDockTools* ini dapat dijalankan dengan pengaktifan aplikasi *Phyton* terlebih dahulu. Hasil dari *molecular*

docking diukur nilai RMSD menggunakan YASARA. Sedangkan untuk mengkonversi hasil *docking* menjadi ekstensi pdb, sehingga dapat divisualisasi digunakan *Open Babel*.

Struktur protein target VEGF, HER-2 dan COX-2 diunduh melalui *Protein Data Bank* (PDB) sesuai dengan PDB ID. Struktur yang diunduh berupa struktur, ligan, sekuen dan sisi aktif. Sedangkan untuk struktur ligan uji, dapat dibuat dengan menggambarkan struktur 2D senyawa nobiletin menggunakan aplikasi lunak *MarvinSketch 6.0.0*. Untuk menyimpan struktur ligan dalam 3D dilakukan konversi.cml menjadi .pdb.

Molekul protein target yang dibuka pada aplikasi *AutoDock Vina* ditambahkan hidrogen polar dengan *tools Hydrogen → Add → Polar Only*. Kemudian struktur diubah menjadi ekstensi .pdbqt. Perubahan tersebut dapat dilakukan dengan *tools Grid*. Ditentukan pula ukuran *Grid* yang akan digunakan untuk proses *docking*. Setelah protein target sudah siap, disiapkan file ligan saja (tanpa protein). Kemudian dilakukan seleksi untuk ikatan yang dapat mengalami rotasi dengan klik *tools Ligan → Torsion Tree → Choose Torsion*. Sama seperti protein target, ligan disimpan dalam ekstensi .pdbqt.

Docking dilakukan dengan membuka *command prompt* dan menuliskan perintah `cd Nama_Direktori\Nama_Sub_Direktori`. Maka setelah beberapa saat akan muncul hasil *running* dari *docking* berupa nilai afinitas dan RMSD. Hasil dari *docking* dapat diamati interaksinya dengan aplikasi *DSVisualizer*. Perlu diperhatikan pula file yang dapat dilihat melalui

aplikasi ini harus dalam ekstensi .pdb, maka harus dikonversikan dari .pdbqt menjadi .pdb menggunakan aplikasi *Open Babel*. Visualisasi menggunakan *DSVisualizer* ini dimaksudkan untuk melihat secara jelas posisi ligan dan protein serta gambaran interaksinya secara 3 dimensi (3D).

2. Determinasi Tanaman

Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) diperoleh pada lahan bebas di daerah Kasihan, Bantul, Yogyakarta kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Farmakognosi, Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

3. Pembuatan Senyawa Uji

Tanaman sebanyak 1 kg dicuci kemudian dikeringan selama 2 hari menggunakan oven pada suhu 60°C. Simplisia yang telah kering digiling hingga diperoleh serbuk halus. Serbuk halus kemudian diekstraksi dengan metode maserasi yaitu dengan direndam menggunakan etanol 70% selama 5 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Kemudian 2 hari berikutnya dilakukan remaserasi menggunakan etanol 70%.

Ekstrak etanolik herba bandotan diperoleh dengan penyaringan setelah proses remaserasi. Kemudian untuk memperoleh fraksi kloroform dilakukan fraksinasi menggunakan corong pisah. Fraksi kloroform kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Untuk optimalisasi fraksi, dilakukan pemanasan menggunakan *waterbath*. Kemudian fraksi kloroform dilakukan penimbangan menggunakan timbangan analitik dan

dihitung rendemennya.

4. Analisis Senyawa dengan Metode KLT

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi senyawa pada fraksi kloroform herba bandotan. Sebagai fase diam digunakan silika gel F 254nm dan sebagai fase gerak digunakan campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 7:2 serta digunakan pembanding rutin (flavonoid) serta quinin (alkaloid).

Fase gerak dijenuhkan selama 90 menit atau hingga kertas saring yang digunakan sebagai penanda menjadi bening. Selanjutnya fraksi sebanyak 25 mg dilarutkan dengan akuades sebanyak 1 ml kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler diatas plat silika gel F 254nm dengan jarak elusi 8 cm secara vertikal. Plat kemudian dimasukkan kedalam bejana berisi fase gerak yang telah jenuh. Fase gerak tidak boleh sampai menyentuh batas bawah (tempat ditotolkannya sampel). Kemudian ditunggu hingga terjadi elusi sampai batas atas. Lalu plat dikeluarkan, dibiarkan kering, dan dilakukan pengamatan dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Dengan proses pengamatan ini, terlihat secara jelas spot akibat elusi sampel maupun kontrol pada plat silika gel F 254nm. Kemudian dilakukan pengukuran jarak elusi dan dihitung nilai Rf masing-masing. Untuk visualisasi warna yang lebih tampak dilakukan penyemprotan plat silika gel F 254nm dengan amoniak.

5. Penyiapan dan Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji berjumlah 20 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* berumur 40 hari diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada. Kemudian dilakukan adaptasi kandang selama 1 minggu dan diberi pakan setiap hari.

Hewan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu masing- masing 4 ekor. Kelompok K.DMBA merupakan kelompok kontrol yang diinduksi DMBA (telah dilarutkan dengan corn oil) pada dosis 20 mg/kg BB 2 kali dalam seminggu selama 5 minggu. Kelompok K.FKB merupakan kelompok kontrol ekstrak diberikan dengan dosis 1500 mg/kg BB 1 kali sehari pada minggu keempat dan kelima. Kelompok K.CMCNa merupakan kelompok tanpa perlakuan dan diberikan larutan CMC-Na 0,5 % selama 5 minggu sebagai suplemen. Kemudian untuk kelompok DMBA+FKB750 dan DMBA+FKB1500 merupakan kelompok yang diberikan perlakuan DMBA kemudian diberikan ekstrak FKB (telah dilarutkan dalam larutan CMC-Na 0,5%) pada minggu keempat dan kelima dengan dosis masing-masing 750 mg/kg BB dan 1.500 mg/kg BB.

Setelah diberikan perlakuan, hewan uji dilakukan nekropsi organ payudara. Organ tersebut dilakukan fiksasi dengan menggunakan buffer formalin 10% untuk mengawetkan organ. Kemudian organ disimpan dalam pot organ untuk selanjutnya dilakukan pengecatan.

Tabel 2. Jadwal Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Kelompok Perlakuan	Minggu Ke-				
	1	2	3	4	5
K.DMBA	DMBA				
K.FKB				FKB 1500 mg/kg BB	
K.CMCNa	Pelarut CMC-Na 0,5%				
DMBA+FKB750	DMBA			FKB 750 mg/kg BB	
DMBA+FKB1500	DMBA			FKB 1500 mg/kg BB	

Keterangan :

DMBA = Induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB.

FKB = FKB dosis 1500 mg/kg BB.

FKB = FKB dosis 750 mg/kg BB.

CMC-Na = Larutan CMC Na 0,5%

6. Penyiapan Jaringan

Organ yang telah dinekropsi kemudian diambil jaringannya untuk dilakukan penyiapan preparat. Jaringan dari blok paraffin dipotong dengan ketebalan 4-6 μm menggunakan mikrotom. Kemudian dimasukkan ke dalam *waterbath* (30-40°C) untuk menghilangkan kerutan pada potongan dan mencairkan paraffin. Jaringan diletakkan pada *slide* objek dan ditetesi albumin sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *slide* objek dipanaskan dengan oven pada suhu 30-40°C agar lebih steril.

7. Pengecatan Hematoksillin-Eosin

Pewarnaan preparat histologi menggunakan Hematoksillin-Eosin terdapat beberapa tahapan. Dimulai dengan menghilangkan paraffin pada jaringan menggunakan *xylol III* kemudian *xylol II* selama masing-masing 3 menit. Kemudian *slide* dicelupkan ke dalam alkohol bertingkat 100%, 95%, dan 70%. Selanjutnya dilakukan pewarnaan pertama dengan perendaman menggunakan Hematoksillin selama 5 menit. Untuk menghilangkan warna biru pada sitoplasma sel, dilakukan perendaman singkat menggunakan HCl 0,6%. Sedangkan untuk memperjelas inti sel digunakan lithium karbonat 0,5%. Sitoplasma kemudian diberi warna merah menggunakan Eosin selama 5 menit atau disebut sebagai pewarnaan kedua.

Tahap pewarnaan didiamkan selama 2 menit. Kemudian air dalam jaringan harus dihilangkan yaitu dengan menggunakan alkohol bertingkat. Selanjutnya dilakukan *mounting* agar jaringan lebih awet sebelum dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop.

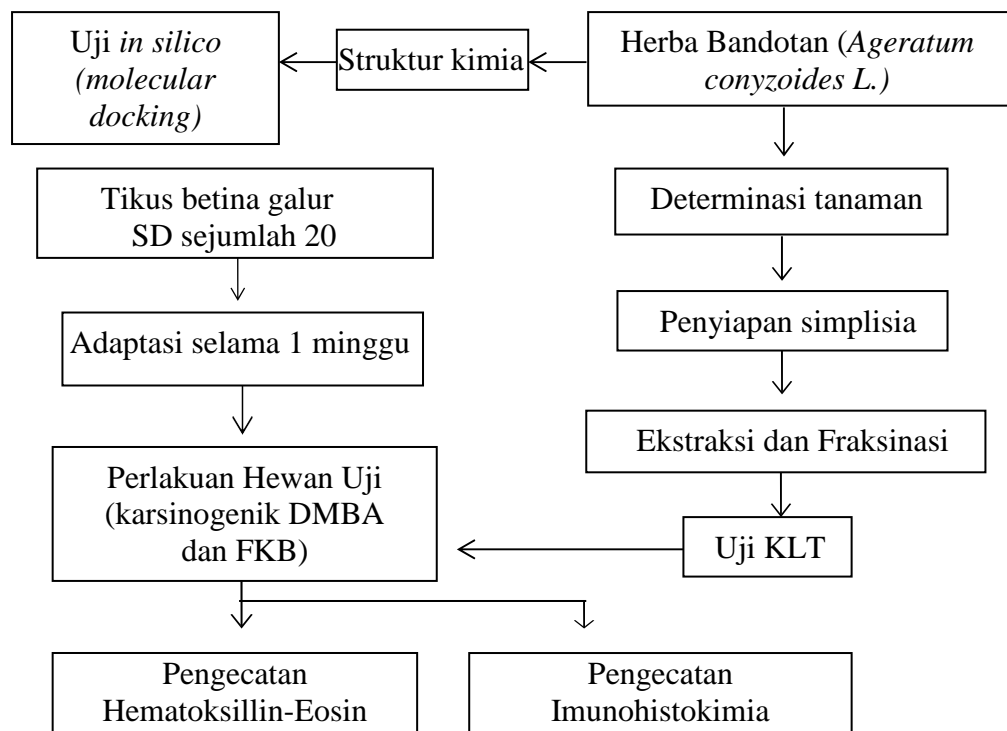
8. Pengecatan dengan Metode Imunohistokimia

Mula-mula jaringan dari blok parafin dipotong setebal 3-4 mikron dengan mikrotom, dibiarkan semalam di inkubator dengan suhu 37-40°C. Kemudian dilakukan deparafinisasi dengan *xylol* selama 3x masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dicelupkan dalam alkohol bertingkat 100%, 95%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian dicuci dengan aquadest selama 5 menit.

Dilakukan proses *blocking endogenous peroxidase activity* dalam H_2O_2 (*peroxide blocking solution*) dalam metanol 3% selama 10 menit dan kemudian diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* $25^\circ C$ selama 10 menit. Antibodi primer (pengenceran 1:25) ditambahkan sebanyak 100 ul kemudian diinkubasi 1 jam pada suhu kamar.

Perlakuan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan PBS 2x masing-masing 3-5 menit dan dilanjutkan dengan pemberian antibodi sekunder, diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian *slide* dicuci dengan PBS 2x masing-masing 3-5 menit dilanjutkan dengan pemberian DAB atau *Deaminobenzinidine* (pengenceran 1:50) 3-5 menit dan diinkubasi dengan HE selama 3 menit. Setelah selesai, dilakukan pencucian pada air mengalir dan dilakukan *mounting*.

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

1. Analisis *Molecular Docking*

Dilakukan analisis data terhadap senyawa nobiletin dimana afinitas kestabilan yang baik dinyatakan dengan nilai *scoring* terendah pada suatu molekul pada nilai RMSD kurang dari 2 Å.

2. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Analisis kandungan kimia dilakukan dengan membandingkan nilai Rf dibawah UV 245 dan 366 nm kemudian diamati warna bercak setelah disemprotkan amoniak antara sampel dengan pembanding. Nilai Rf diukur dari perbandingan jarak eluen sampel dengan jarak total eluen.

3. Analisis Uji Hematoksillin-Eosin

Pengamatan mikroskopis menggunakan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* dianalisis deskriptif pada sel epitel duktus

4. Analisis Uji Imunohistokimia

Pengamatan dilakukan secara mikroskopis dengan menghitung jumlah ekspresi VEGF pada jaringan yang membentuk warna coklat. Kemudian dilakukan *scoring* dimana *score* yang masuk dalam batas bawah dan atas merupakan sampel yang memiliki aktivitas lebih baik dalam menghambat ekspresi sel.