

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental laboratoris yang terdiri dari pengujian kandungan senyawa dengan metode KLT, uji *in vivo* fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) menggunakan metode *Haematoxylin-Eosin* dan *Immunohistochemistry* dengan hasil berupa gambaran histopatologi kanker hepar pada tikus galur *Sprague dawley* terinduksi DMBA, serta uji *in silico* dengan menggunakan *molecular docking* terhadap ekspresi protein VEGF.

#### B. Tempat dan Waktu

##### 1. Tempat

Penelitian dimulai dengan ekstraksi di Laboratorium Penelitian dan dilanjutkan fraksinasi dan evaporasi di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, Universitas Ahmad Dahlan. Uji *in vivo* dimulai dengan uji karsinogenesis di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit IV dilanjutkan uji HE dan IHC di Laboratorium Mikroanatomi dan Makroanatomi Universitas Gadjah Mada.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2018 – April 2019.

### C. Besar Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague dawley* berumur 40 hari dengan berat 70-100 gram yang didapatkan dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada.

### D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 1. Variabel Penelitian

##### a. Analisis kandungan kimia dengan metode KLT

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

Variabel tergantung : Nilai Rf dan warna bercak pada plat KLT

Variabel terkendali : Fase diam dan fase gerak

##### b. *In silico* dengan Molekular Docking

Variabel bebas : Bentuk konformasi optimasi nobiletin

Variabel tergantung : *Docking score*

Variabel terkendali : Struktur protein, perangkat keras dan lunak komputer

##### c. Uji *In vivo* dengan metode *Haematoxylin-Eosin*

Variabel bebas : Dosis ekstrak

Variabel tergantung : Keadaan histologi sel hepar

Variabel terkendali : Usia hewan uji, berat badan, suhu dan waktu pemejanaan.

d. Uji *In vivo* dengan metode *Imunohistochemistry*

Variabel bebas : Dosis ekstrak

Variabel tergantung : Ekspresi VEGF

Variabel terkendali : Kondisi perlakuan

2. Definisi Operasional

a. *Retardation Factor* (Rf)

Hasil pemisahan senyawa dapat diidentifikasi menggunakan nilai Rf, yaitu jarak yang digerakkan senyawa dari titik asal dibagi jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal.

b. *Docking Score*

*Score docking* merupakan nilai yang digunakan untuk mengetahui ligan dan reseptor bereaksi. Selain itu merupakan nilai yang digunakan untuk mengetahui besarnya energi yang dibutuhkan ligan dan reseptor agar dapat berikatan.

c. Histopatologi Hepar

Histopatologi merupakan pemeriksaan terhadap perubahan-perubahan abnormal pada tingkat jaringan. Histopatologi hepar memiliki fungsi sebagai penegakan diagnostik sehingga dapat ditentukan tindakan preventif dan kuratif yang tepat.

## E. Instrument Penelitian

### 1. Determinasi

Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) didapatkan dari Bantul, Yogyakarta.

### 2. Ekstraksi dan Fraksinasi

a. Alat : Bejana, pengaduk, corong, gelas ukur, erlenmeyer, corong pisah, cawan petri pewaktu, *waterbath*, timbangan analitik, *rotary evaporator*, cawan petri, kulkas.

b. Bahan : Serbuk simplisia herba bandotan, etanol 70%, alumunium foil, kertas saring, *tissue*, kloroform, akuades.

### 3. Kromatografi Lapis Tipis

a. Alat : Bejana, plat KLT, penggaris, pensil, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

b. Bahan : Fraksi kloroform herba bandotan, silica gel GF 254 nm, etil asetat, asam asetat glasial, asam format, akuades, kloroform, amoniak.

### 4. *Molecular Docking*

Diperlukan seperangkat *computer* dan layanan internet.

### 5. Uji Karsinogenesis

a. Alat : Kandang tikus, pipet, mikropipet, tabung reaksi, spuit.

b. Bahan : *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley*, CMC-Na 0,5%, akuades, DMBA, *corn oil*, fraksi kloroform herba bandotan, pelet.

## 6. Pembuatan Preparat Histopatologi

- a. Alat : Pisau bedah, *tissue cassette*, *pan*, cangkir logam, *embedding cassette*, *waterbath*, pisau baja mikrotom.
- b. Bahan : Eter, formalin 10%, akuades, alkohol 95%, alkohol absolut, *xylol*, paraffin.

## 7. Uji *in vivo*

- a. Alat : *Staining jar*, gelas objek, inkubator, kaca penutup, *slide*, mikroskop.
- b. Bahan : Akuades, *Haematoxylin-Eosin* 0,1%, alkohol 70%, alkohol 80, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol 100%, *tissue*, *xylene*, kanada balsam, *peroxidase blocking solution*, *prediluted blocking serum*, antibodi monoklonal, *phosphate buffer saline*, *diamonobenzinidine*.

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dilakukan di laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Ahmad Dahlan.

### 2. Pembuatan Senyawa Uji

#### a. Penyerbukan

Herba bandotan didapat dari daerah Bantul, Yogyakarta dicuci dan dikeringkan dengan sinar matahari selama 3-5 hari. Simplisia kering kemudian digiling halus.

#### b. Pembuatan ekstrak etanolik herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.)

Serbuk simplisia daun herba bandotan sebanyak 1 kg dimaserasi dengan penambahan etanol 70% sebanyak 10 liter (perbandingan 1:10) selama 5 hari di dalam wadah tertutup, kemudian disaring. Proses penyaringan akan menghasilkan ekstrak cair/ maserat dan ampas. Ampas kemudian diremaserasi selama 2 hari untuk memaksimalkan kandungan senyawa didalamnya. Hasil penyaringan pertama dan kedua diukur volumenya, kemudian maserat disimpan dalam wadah tertutup untuk menghindari kontaminan.

c. Pembuatan fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*)

Setelah didapatkan ekstrak etanolik herba bandotan, dilakukan fraksinasi menggunakan kloroform dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 100 ml ekstrak etanolik herba bandotan dan 100 ml kloroform dimasukkan ke dalam corong pisah lalu didiamkan hingga 5 menit. Pengocokan dilakukan secara manual selama 15 menit, kemudian didiamkan selama 10 menit. Setelah terbentuk dua fase, bagian yang terlarut (bagian bawah) dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60° C dengan kecepatan 100 rpm. Untuk mendapatkan fraksi, dilakukan pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 100° C. Ekstrak kental yang merupakan fraksi kloroform kemudian ditimbang untuk mendapatkan nilai rendemen.

### 3. Uji Kandungan Senyawa Kimia

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Silika gel GF 254 digunakan sebagai fase diam sedangkan fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform:methanol (7:2 v/v). Sebanyak 25 mg fraksi kloroform dilarutkan dengan 1 ml kloroform kemudian dilakukan penotolan diatas plat KLT dengan jarak elusi 8 cm. Plat tersebut dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan.

Plat dikeluarkan dari bejana setelah eluen mencapai batas plat, kemudian plat dikeringkan pelarut/ fase geraknya. Plat diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan diukur masing-masing nilai Rf bercak. Untuk mengetahui kandungan flavonoid, diamati warna bercak sebelum dan sesudah diuapkan dengan ammoniak.

### 4. *Molecular Docking*

#### a. Pengunduhan Aplikasi *Autodock Vina* dan Aplikasi Pendukung

*Autodock Vina* merupakan aplikasi *multiplatform* dan bebas untuk diunduh. Beberapa aplikasi lain yang juga diperlukan, diantaranya:

##### 1) *Autodock Vina*

Aplikasi ini digunakan untuk melakukan tahapan *molecular docking*. Pengunduhan aplikasi dapat dilakukan melalui laman <https://vina.scripps.edu/download.html>

## 2) *DS Visualizer*

Preparasi reseptor target dan ligan serta visualisasi hasil *molecular docking* dapat dimulai dengan mengunduh <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>

## 3) *MGL Tools*

*MGL tools* diperlukan dalam mengelola reseptor target dan ligan uji sehingga dapat dieksekusi oleh aplikasi *Autodock Vina*. Aplikasi ini dapat diunduh melalui laman <http://mgltools.scripps.edu/download>

## 4) *Python*

*Python* dimanfaatkan untuk menjalankan aplikasi-aplikasi dalam bahasa pemrograman. Pengunduhan dapat dilakukan di <http://www.python.org/ftp/python/2.5.2/python-2.5.2.msi>

## 5) *YASARA*

*YASARA* digunakan untuk proses mengukur nilai RMSD melalui <http://www.yasara.org/viewdl.htm>

## 6) *Open Babel*

Aplikasi ini digunakan untuk mengkonversi hasil *docking* dari format PDBQT menjadi PDB sehingga dapat divisualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. *Open Babel* dapat diunduh melalui laman <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>

b. Pengunduhan Reseptor Target

Struktur protein target dapat diunduh dengan mengunjungi laman [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) dengan PDB ID 5XV7 untuk VEGF, 5IKQ untuk protein COX-2 dan 1MV0 untuk c-Myc. Data unduhan tersebut berupa struktur, sisi aktif, ligan asli (*native ligand*) dan sekuen dengan format .pdb.

c. Preparasi Protein Target

Preparasi protein target dilakukan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Ligan pada protein dihapus kemudian pastikan protein bebas molekul air, hemoglobin dan sebagainya. Ligan yang telah dipreparasi disimpan dengan nama 5xv7.pdb, 5ikq.pdb dan 1mv0.pdb.

Preparasi ligan asli sebagai ligan uji menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dengan membuka file 5xv7.pdb, 5ikq.pdb dan 1mv0.pdb.

kemudian menghapus residu protein dan menyisakan ligan. Ligan disimpan dengan nama ligan1.pdb, ligan2.pdb dan ligan3.pdb.

Penelitian ini menggunakan ligan asli 5-Fluorourasil dan nobiletin. Keduanya dapat dipreparasi dengan mengunduh struktur ligan dengan format .sdf kemudian diubah menjadi .pdb dengan aplikasi *Open*

*Babel*. Protein, ligan dan ligan asli yang telah dipreparasi siap digunakan untuk uji *In silico* dengan *Autodock Vina*.

d. Konversi File Protein dan Ligan dalam Bentuk PDBQT

Konversi dimulai dengan mengubah tipe file format .pdb menjadi tipe dokumen .pdbqt menggunakan *MGLTools* dan *Autodock Tools*. Aplikasi *Autodock Vina* hanya bisa dijalankan dengan tipe dokumen .pdbqt. Selanjutnya dilakukan penambahan atom hidrogen pada protein uji kemudian simpan file dengan nama 5xv7.pdbqt, 5ikq.pdbqt dan 1mv0.pdbqt. Penyimpanan file juga dilakukan pada program aplikasi *Autodock Vina* di *drive C*. Luas wilayah *docking* dapat diatur melalui submenu *Grid* pada *Grid Box*. Luas wilayah ini akan mempengaruhi nilai RMSD pada setiap konformasi, sehingga diperlukan beberapa kali penyesuaian luas wilayah *docking* untuk mendapatkan nilai RMSD dibawah 2 Å. Dokumen kemudian disimpan dengan nama ligan1.pdbqt, ligan2.pdbqt dan ligan3.pdbqt di dalam berkas *Vina*.

e. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina*

Sebelum menjalankan aplikasi, pastikan dokumen 5xv7.pdbqt, 5ikq.pdbqt dan 1mv0.pdbqt serta ligan1.pdbqt, ligan2.pdbqt dan ligan3.pdbqt berada dalam berkas *Vina*. Kemudian dibuat dokumen baru dengan nama conf.txt. Formulir diisi keterangan sesuai proses *docking* yang dilakukan. Reseptor diisi dengan 2okv.pdbqt, ligan diisi

dengan *ligan1.pdbqt*, *center\_x*, *y*, *z* dan *size\_x*, *y*, *z* diisi dengan nilai sesuai *grid box*. Setelah selesai dokumen disimpan di berkas *Vina*.

Nilai RMSD dapat ditentukan dengan mengisi *Command Prompt Windows*. Kode diketikkan pada *Command Prompt Windows* kemudian tunggu hingga muncul nilai afinitas dan RMSD pada setiap konformasi (ada 9 konformasi). Konformasi dipilih dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Dokumen *output.pdbqt* kemudian dipecah menjadi masing-masing konformasi untuk memudahkan analisis dan visualisasi. Hasil pemecahan akan muncul dalam berkas *Vina*.

*f. Visualisasi Hasil Molecular Docking*

Visualisasi dilakukan dengan bantuan *DS Visualizer*, kemudian dilakukan analisis hingga diketahui gambaran posisi dan ikatan protein pada setiap ligan yang diujikan. Sebelumnya dokumen dengan file format *.pdbqt* diubah menjadi *.pdb* melalui *Open Babel*. Visualisasi bertujuan untuk melihat posisi ligan (*Define Ligand*) dan interaksinya (*Ligand Interaction*) secara tiga dimensi sehingga letak ikatan ligan dan protein akan terlihat jelas. Visualisasi dapat diperjelas dengan mengubah latar warna dan melabeli protein dengan asam amino.

## 5. Uji Karsinogenesis

### a. Preparasi Sampel

Hewan uji berupa tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague dawley* berumur 40 hari dengan rentang berat badan 70-100 gram diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada.

### b. Pembuatan Larutan CMC-Na 0,5%

Larutan CMC-Na 0,5% didapatkan dengan melarutkan 250 mg CMC-Na kedalam sebagian akuades hangat. Dilakukan pengadukan dan ditambahkan akuades hingga larut, kemudian ditambahkan sisa akuades hingga didapatkan volume larutan 500 ml.

### c. Pembuatan larutan DMBA

Larutan DMBA didapatkan dengan melarutkannya dengan *corn oil* di dalam *conical tube* kemudian di *vortex* selama 15 menit.

### d. Pemejanaan Hewan Uji

Larutan disuntikkan secara per oral menggunakan spuit. Penyuntikan secara per oral (mulut) dilakukan dengan cara menelusur searah tepi-tepi langit kearah belakang hingga esophagus. Kemudian larutan disemprotkan secara perlahan dan setelah pemberian selesai kanul ditarik keluar secara perlahan.

e. Perlakuan Hewan Uji

Sebanyak 20 hewan uji diadaptasikan di kandang percobaan selama 1 minggu. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok sesuai perlakuan. Kelompok A (kontrol tanpa perlakuan) diberikan larutan CMC-Na 0,5% dengan dosis 1 ml/200 gram. Kelompok B (kontrol DMBA) diberikan larutan DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB dua kali seminggu selama 5 minggu. Kelompok C (kontrol ekstrak) diberikan dengan dosis 1500 mg/kgBB setiap hari selama 5 minggu. Kelompok D dan E (DMBA + ekstrak) diinduksikan dengan DMBA 20 mg/kgBB dua kali seminggu selama 5 minggu kemudian diberikan dosis ekstrak 750 mg/kgBB pada kelompok D dan 1500 mg/kgBB pada kelompok E pada minggu ke 4 dan 5. Penentuan dosis dilakukan berdasarkan berat badan tikus dengan penimbangan berkala setiap minggunya.

**Tabel 2.** *Time line* Perlakuan Hewan Uji

Kelompok Perlakuan	Waktu (minggu)				
	1	2	3	4	5
A					
B					
C					
D					
E					

Keterangan:

-  → CMC-Na 0,5%
-  → DMBA
-  → Ekstrak 1500 mg/kgBB
-  → Ekstrak 750 mg/kgBB

## 6. Pembuatan Preparat Histopatologi

### a. Preparasi Organ

Tikus dikorbankan dengan eter pada minggu keenam setelah injeksi terakhir. Organ hati diambil melalui pembedahan toraks.

### b. Pembuatan dan Pemotongan Blok Parafin

#### 1) *Fixation*

Spesimen berupa potongan organ hati difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam kemudian dicuci dengan air mengalir.

#### 2) *Trimming*

Organ dipotong dengan ukuran 3-5 mm kemudian potongan organ dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

#### 3) Dehidrasi dan Pembersihan

Dilakukan dengan perendaman dengan alkohol 95% selama 2 jam kemudian dilanjutkan perendaman dengan alkohol absolut masing-masing selama 1 jam. Proses pembersihan dilakukan dengan perendaman dalam *xylol* selama 1 jam.

#### 4) Impregnasi

Jaringan yang telah dipotong diletakkan dalam paraffin selama 1 jam pada suhu 65°C.

#### 5) *Embedding*

*Embedding* dilakukan dengan pemanasan menggunakan *pan* beberapa saat. Parafin cair dituangkan dalam cangkir logam kemudian dipanaskan pada suhu 58°C. Proses dilanjutkan dengan menuangkan paraffin cair ke dalam *pan*, satu per satu jaringan dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar *pan*. *Pan* direndam sebagian dengan air, jaringan dilepaskan dari *pan* dengan memasukkannya pada suhu 4-6 °C.

#### 6) *Cutting*

Pemotongan kasar dilakukan menggunakan kapel hangat, dilanjutkan dengan pemotongan halus. Blok paraffin dipotong menggunakan pisau baja mikrotom setebal 4 µm di ruangan dingin. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *waterbath* hingga mengembang sempurna kemudian diletakkan di atas *slide* kaca.

### 7. Uji in vivo

#### a. Metode *Haematoxylin-Eosin*

Pengecatan *Haematoxylin-Eosin* dimulai dengan memasukkan gelas objek berisi potongan jaringan ke dalam *staining jar* kemudian dilakukan deparafinisasi dilanjutkan pencucian menggunakan akuades

sebanyak 2 kali. Gelas objek diberi larutan *Haematoxylin-Eosin* 0,1% dan diinkubasikan selama 1 menit. Selanjutnya gelas objek dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% lalu dikeringkan menggunakan tisu. Gelas objek dimasukkan dalam larutan *xylene* selama 5 menit. Slide diletakkan di atas kertas tisu medium datar, ditetesi dengan bahan *mounting* (kanada balsam) dan tutup menggunakan kaca penutup. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

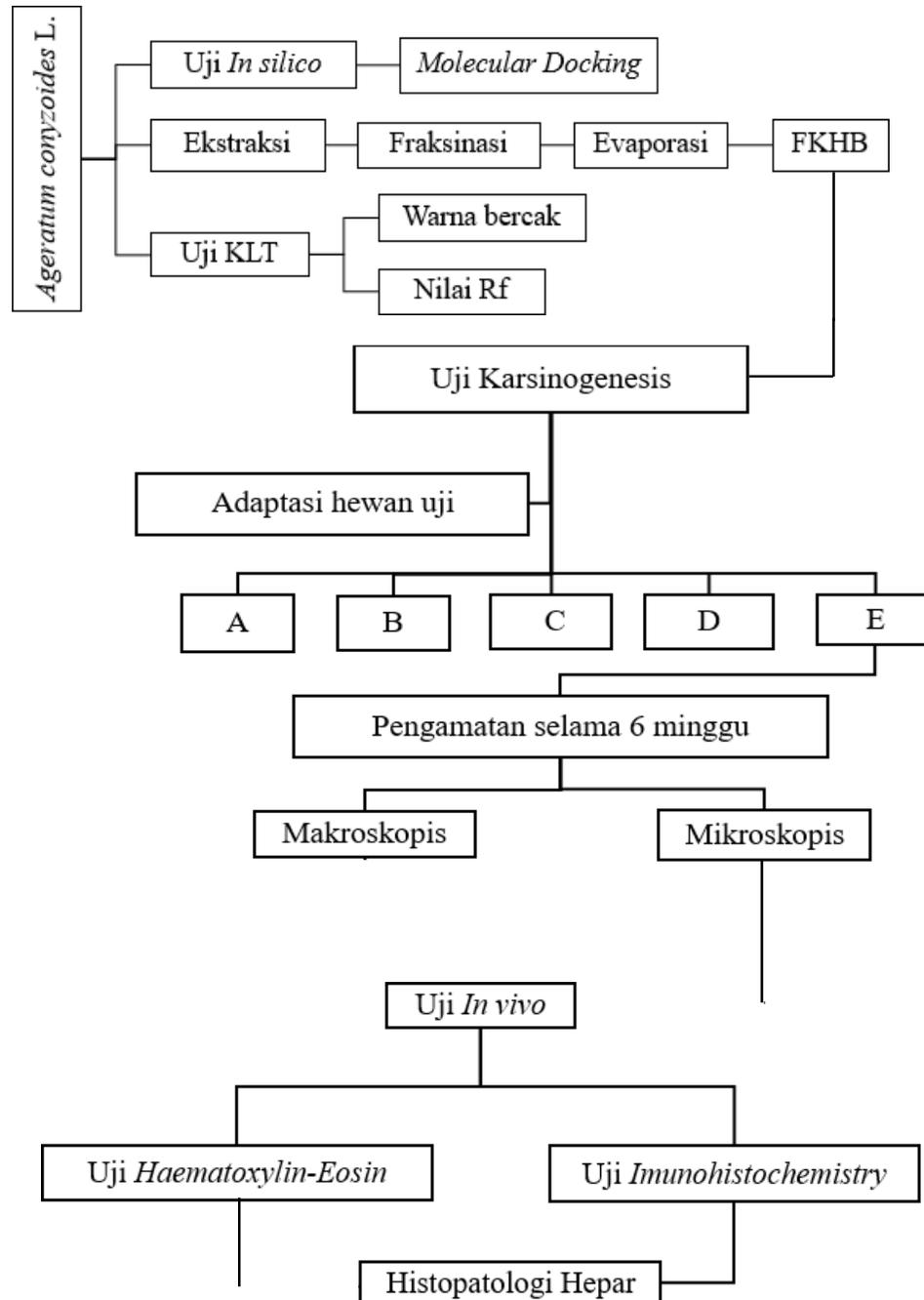
b. Metode *Imunohistochemistry (IHC)*

Uji *immunohistochemistry* bertujuan untuk mengidentifikasi ekspresi protein VEGF terhadap sel atau jaringan tertentu menggunakan antibodi. Prosedur dimulai dengan melakukan deparafinasi preparat dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi preparat menggunakan etanol 100% selama 2 menit, etanol 95% selama 2 menit dan etanol 70% selama 1 menit, kemudian dengan air selama 1 menit.

Preparat direndam selama 10 menit pada suhu kamar dalam *peroxidase blocking solution*, diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit. Preparat direndam dalam antibodi monoklonal anti-VEGF 25°C selama 10 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* selama 5 menit, lalu diinkubasikan dengan kromogen *Diaminobenzinidine (DAB)* 25°C

selama 10 menit, dilanjutkan inkubasi dengan *Haematoxylin-Eosin* selama 3 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir, kemudian dibersihkan dan ditetesi *mounting media*. Preparat ditutup dengan *coverslip* dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya.

### G. Skema Langkah Kerja



**Gambar 6.** Skema Langkah Kerja

## H. Analisis Data

### 1. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi senyawa nobiletin yang terkandung dalam flavonoid dilakukan menggunakan metode KLT. Data yang diolah adalah perbandingan nilai Rf hasil elusi dengan warna bercak setelah diuapikan amoniak. Lempeng KLT diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Warna yang dihasilkan kemudian dilakukan interpretasi warna bercak dan analisis kualitatif kandungan flavonoid.

### 2. Uji *In Silico*

*Molecular Docking* dilakukan untuk menganalisis kekuatan ikatan protein terhadap nobiletin. Interpretasi dilakukan menggunakan skor *docking*. Hasil skor yang relatif kecil menunjukkan bahwa ikatan protein dan ligan semakin kompleks, semakin stabil dan dapat dikatakan bahwa ligan semakin poten.

### 3. Uji *Haematoxylin-Eosin*

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya untuk membandingkan histopatologi hati antara kelompok dengan pemberian DMBA, ekstrak dan kombinasi keduanya. Penilaian derajat kerusakan hati dilakukan secara kualitatif dengan interpretasi sebagai berikut:

**Tabel 3.** Skor Penilaian Derajat Histopatologi Hepar

Kategori	Degeneratif	Nekrosis
None	0	0
Minimal (0-25%)	1	1
Mild (25-50%)	2	2
Moderate (50-75%)	3	3
Severe (75-100%)	4	4

#### 4. Uji *Imunohistochemistry*

Pengamatan dilakukan terhadap ekspresi protein VEGF. Preparat akan menghasilkan warna coklat apabila terdapat ekspresi protein yang tinggi di dalam preparat organ tersebut. Preparat normal akan menunjukkan warna biru. Penilaian derajat kerusakan dilakukan secara kualitatif dan selanjutnya akan dilanjutkan analisis semi kuantitatif.

