

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang “Uji Aktivitas Antitumor Ekstrak Metanol Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea*) pada Kulit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi DMBA Secara In Vivo”, merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi :

1. Variabel bebas: ekstrak metanol benalu teh (*Scurrula atropurpurea*) dengan konsentrasi 750mg/KgBB; 1500mg/KgBB dan 2250mg/KgBB dalam 0,5 ml Na CMC 0,5% per hari.
2. Variabel terikat adalah preparat histopatologi jaringan kulit yang terkena kanker ditandai dengan adanya kerusakan pertumbuhan sel (displasia) dan ketebalan lapisan kulit serta kejadian tumor yang meliputi insidensi tumor, volume nodul (ukuran nodul), luas permukaan luka dan kerontokan bulu. Parameter pendukung yaitu perubahan berat badan mencit.
3. Variabel terkontrol adalah hewan percobaan mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/c* jenis kelamin jantan, umur 4-6minggu dengan berat badan 15-20gram, pakan mencit berupa pelet serta air minum secara *ad libitum*. Bahan karsinogen yang digunakan adalah DMBA dengan konsentrasi 25 μ g/100 μ l aseton.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosistem dan Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Mei-Agustus 2013. Adapun jadwal kegiatan penelitian tercantum dalam table 3.1 sebagai berikut:

Tabel 3.1 Jadwal kegiatan penelitian.

No	Uraian	April				Mei				Juni				Juli				Agustus				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	Aklimatisasi				v																	
2	Pembuatan ekstrak benalu teh dan Na CMC0,5%					v	v															
3	Pemberian senyawa DMBA					v	v	v	v	v	v											
4	Pemberian ekstrak benalu teh											v	v	v	v	v	v					
5	Pengamatan																	v	v	v	v	v

3.4 Instrumen Penelitian

3.4.1 Alat

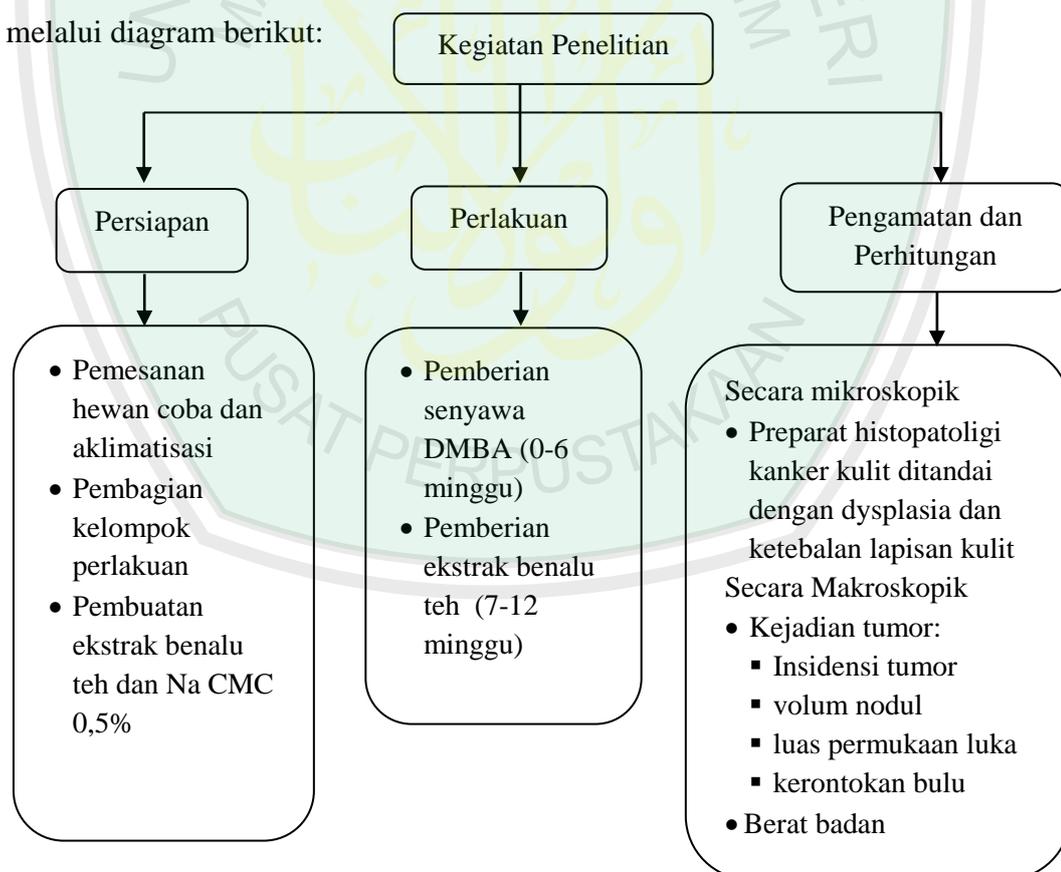
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), kawat, tempat makan, tempat minum, *beaker glass*, *erlenmeyer*, gelas ukur, kertas saring, timbangan digital, ayakan tepung, papan bedah, satu set alat bedah, pipet tetes, gunting, pinset, pengaduk kaca, corong bunchner, *rotary evaporator*, *refrigerator*, mikrotom, kaset, *water bath*, *obyek glass*, *deck glass*, sonde lambung yang dimodifikasi, kamera, mikropipet, tip, *hot plate*, *sentrifius*, botol flakon, mikroskop, spuit ukuran 1 ml, *hand glove*, dan masker.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/c* jenis kelamin jantan, umur 4-6 minggu dengan berat badan 15-20 g, Na-CMC, pakan (pellet), serbuk kayu (sekam), air, ekstrak benalu teh, DMBA, *klorofom*, etanol (70%, 75%, 80%, 95%), etanol absolut, formalin 10%, *xylene*, *paraffin*, minyak imersi, hematoksilin eosin, alkohol, aquades, kapas dan tisu.

3.5 Kegiatan Penelitian

Kegiatan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi persiapan, perlakuan serta pengamatan dan perhitungan. Secara umum dapat disajikan melalui diagram berikut:



Gambar 3.1. Kegiatan Penelitian

3.5.1. Tahap Persiapan

3.5.1.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba di kandangkan dua minggu sebelum perlakuan untuk proses aklimasi pada suhu kamar (20-25°C). Selama proses aklimasi ini mencit diberi makan pelet ternak standard dan minum secara *ad libitum*. Astutiningsih (2010) menyatakan bahwa proses aklimatisasi dilakukan selama satu minggu. Pada tahap ini dilakukan pengamatan pada keadaan umum dan berat badan mencit. Mencit yang sakit tidak diikutsertakan dalam percobaan. Hamizah *et al.*, (2012) mengemukakan bahwa mencit dipelihara dilaboratorium dengan kelembapan yang dikondisikan, temperaturnya antara 21-25°C dan siklus penerangan 12 jam terang serta 12 jam gelap. Mencit diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

3.5.1.2 Pembagian Kelompok dan Perlakuan

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/c* kelamin jantan, umur 4-6 minggu dengan berat badan 15-20 g (Manoharan, 2010). Sebanyak 24 mencit yang dibagi kedalam 4 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit, keempat kelompok tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Pembagian kelompok perlakuan

Kelompok	Keterangan	Jumlah Mencit
K+	Mencit diinduksi DMBA konsentrasi 25µg dalam 100µl aseton.	6
P1	Mencit diinduksi DMBA konsentrasi 25µg dalam 100µl aseton diikuti dengan pemberian ekstrak benalu teh 750mg/KgBB dalam 0,5 ml Na-CMC 0,5%	6
P2	Mencit diinduksi DMBA konsentrasi 25µg dalam 100µl aseton diikuti dengan pemberian ekstrak benalu teh 1500mg/KgBB dalam 0,5 ml Na-CMC 0,5%	6
P3	Mencit diinduksi dengan DMBA konsentrasi 25µg dalam 100µl aseton diikuti dengan pemberian ekstrak benalu teh 2250mg/KgBB dalam 0,5 ml Na-CMC 0,5%	6

Perhitungan dosis ekstrak dan DMBA yang diberikan saat perlakuan:

- Perhitungan konversi dosis ekstrak

$$\begin{aligned} \text{Dosis 1: } 750\text{mg/KgBB} &= \text{dosis (gr) : } 1000 \text{ gr} \\ &= (750 : 1000)\text{gr} : 1000\text{gr} \\ &= 0,00075 \text{ gr/gr BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 2: } 1500\text{mg/KgBB} &= \text{dosis (gr) : } 1000 \text{ gr} \\ &= (1500 : 1000)\text{gr} : 1000\text{gr} \\ &= 0,0015 \text{ gr/gr BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3: } 2250\text{mg/KgBB} &= \text{dosis (gr) : } 1000 \text{ gr} \\ &= (2250 : 1000)\text{gr} : 1000\text{gr} \\ &= 0,00225 \text{ gr/gr BB} \end{aligned}$$

- Perhitungan dosis ekstrak yang diberikan pada hewan coba

Diketahui berat badan mencit setelah diaklimatisasi rata-rata 20 gr

$$\begin{aligned} \text{Dosis 1} &= 0,00075 \times 20 \\ &= 0,015 \text{ gr/ } 20 \text{ grBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 2} &= 0,0015 \times 20 \\ &= 0,03 \text{ gr/ } 20 \text{ grBB mencit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3} &= 0,00225 \times 20 \\ &= 0,045 \text{ gr/ } 20 \text{ grBB mencit} \end{aligned}$$

- Perhitungan kebutuhan NaCMC untuk 10 ekor mencit masing-masing 0,5ml selama 5 hari = $10 \times 0,5 \times 5 = 25$

- Perhitungan kebutuhan ekstrak yang telah diencerkan dengan NaCMC untuk 10 ekor mencit masing-masing 0,5ml selama 5 hari:

$$\begin{aligned} \text{Dosis 1} &= 25/0,5 \times 0,015 \text{ gr} \\ &= 0,75 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 2} &= 25/0,5 \times 0,03 \text{ gr} \\ &= 1,5 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3} &= 25/0,5 \times 0,045 \text{ gr} \\ &= 2,25 \text{ gr} \end{aligned}$$

a) Dosis 3

$$\begin{aligned} \text{Menghitung konsentrasi total} &= 0,75 \text{ gr} + 1,5 \text{ gr} + 2,25 \text{ gr} \\ &= 4,5 \text{ gr} \end{aligned}$$

Larutan NaCMC 0,5% yang dibutuhkan untuk melarutkan 4,5gr ekstrak metanol benalu teh untuk mendapatkan dosis 3 adalah: $4,5 \times 0,5 = 0,045X$

$$X = 50$$

Jadi, 4,5gr ekstrak metanol benalu teh dilarutkan dengan NaCMC 0,5% sampai volumenya menjadi 50ml diambil 25ml untuk perlakuan dosis 3, sehingga sisa larutan 25.

b) Dosis 2

$$\text{Konsentrasi } 3 \times 25 \text{ ml} = \text{konsentrasi dosis } 2 \times V_2$$

$$0,045 \times 25 = 0,03 V_2$$

$$V_2 = 37,5$$

Sisa larutan ekstrak metanol benalu teh pada dosis 3 sebanyak 25ml diencerkan hingga volumenya menjadi 37,5ml. Diambil 25ml untuk perlakuan dosis 2, sehingga sisa larutan ekstrak menjadi 12,5ml.

c) Dosis 1

Konsentrasi $2 \times 12,5\text{ml}$ = konsentrasi dosis 1 $\times V_1$

$$0,03 \times 12,5 = 0,015 V_1$$

$$V_1 = 25$$

Sisa larutan ekstrak metanol benalu teh pada dosis 2 sebanyak 12,5ml diencerkan hingga volumenya menjadi 25ml. Dan larutan ekstrak metanol benalu teh sebanyak 25ml diberikan untuk perlakuan mencit dosis 1.

3.5.1.3 Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak Benalu teh (*Scurrula atropurpurea*) dengan cara sebagai berikut: daun dan batang benalu teh dikumpulkan dari perkebunan teh Wonosari Lawang. Sampel dikering-anginkan dengan tujuan untuk menghilangkan kadar air dan dihaluskan hingga menjadi serbuk kering agar luas permukaannya semakin besar sehingga senyawa yang diinginkan cepat keluar dan lebih banyak. Bubuk kering benalu teh sebanyak 1 kg dimaserasi dengan methanol 70% sebanyak $3 \times 2,5$ L hingga ampas tidak berwarna lagi. Maserat dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol (Fitrya, 2011). Ekstrak yang sudah pekat dikeringkan dengan mengalirkan gas N_2 untuk menghilangkan pelarut yang masih ada. Ekstrak yang telah diperoleh

kemudian diidentifikasi menggunakan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa flavonol dalam ekstrak tersebut.

3.5.1.4 Uji Fitokimia

Ekstrak metanol benalu teh dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Kemudian ditambahkan 0,5 mL HCl pekat lalu dipanaskan pada penangas air, jika terjadi perubahan warna merah tua sampai ungu menunjukkan hasil yang positif (metode Bate Smith-Metchalf). Untuk uji lanjutnya larutan ekstrak dan metanol ditambahkan dengan logam Mg kemudian diamati perubahan warna yang terjadi (metode Wilstater). Warna merah sampai jingga menunjukkan senyawa flavon, warna merah tua menunjukkan flavonol atau flavonon, warna hijau sampai biru menunjukkan aglikon atau glikosida (Kristanti, dkk, 2008 dan Marlaina, 2005).

3.5.1.5 Pembuatan larutan Na-CMC 0,5%

Sediaan larutan Na-CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 500mg Na-CMC ke dalam 10ml aquadest dingin, dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen lalu diencerkan dalam labu ukur dengan aquadest hingga volume mencapai 100ml.

3.5.2 Tahap Perlakuan

3.5.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Pemeliharaan hewan coba ini dilakukan dengan pemberian makan pelet dan minum secara *ad libitum*, yaitu hewan coba diberi makan pelet 3-5 g/mencit/hari dan minum ditambahkan jika telah habis. Pemberian pakan

dilakukan pada pukul 08.00 WIB. Penggantian sekam dilakukan seminggu 2 kali. Ini dilakukan hingga penelitian berakhir (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

3.5.2.2 Pemberian Senyawa Karsinogen (DMBA)

Semua hewan coba yang telah diaklimatisasi diinduksi DMBA dengan konsentrasi 25 μ g dalam 100 μ l aseton secara subkutan sebanyak 2 kali dalam satu minggu pada pukul 12.00 WIB selama 6 minggu.

3.5.2.3 Pemberian Ekstrak Benalu Teh (*Scurrula oortiana*)

Ekstrak benalu teh (*Scurrula oortiana*) sebagai anti tumor diberikan pada hewan coba setelah diinduksi DMBA yaitu minggu ke-7. Ekstrak diberikan dengan konsentrasi bertingkat yaitu dosis 1 sebanyak 750mg/KgBB dalam 0,5 ml CMC 0,5%; dosis 2 sebanyak 1500mg/KgBB dalam 0,5 ml CMC 0,5%; dan dosis 3 sebanyak 2250mg/KgBB dalam 0,5 ml CMC 0,5% pada pukul 12.00 WIB. Pemberian ini dilakukan setiap hari hingga minggu ke-12.

3.5.3 Tahap Pengamatan dan Perhitungan

3.5.3.1 Perhitungan Berat Badan Mencit

Pengamatan berat badan untuk setiap kelompok penting untuk dilakukan, karena penurunan berat badan bahkan hingga kematian hewan coba merupakan parameter termudah untuk diamati. Untuk mengetahui perkembangan berat badan mencit dapat dilakukan dengan cara menimbanginya sebanyak satu kali dalam seminggu.

3.5.3.2 Pengamatan dan perhitungan Kejadian Tumor

Insidensi tumor dihitung dari jumlah tikus yang terkena tumor pada setiap kelompok dengan cara dilakukan palpasi (satu minggu dua kali) yakni proses

perabaan yang dilakukan dengan menggunakan jari pada sekujur permukaan tubuh mencit (Astutiningsih, 2010). Volume nodul diukur dengan cara mengukur diameter nodul dengan menggunakan jangka sorong dengan taraf ketelitian 0,05 pada tiap-tiap mencit dan dihitung volume dengan formula sebagai berikut (Manoharan, 2010):

$$V = \frac{4}{3}\pi [D_1/2][D_2/2][D_3/2]$$

Keterangan: V = Volume

D_{1,2,3} = Diameter

Pengukuran luas permukaan luka dapat diukur dengan menggunakan mistar. Pengukuran dilakukan pada awal penginduksian DMBA dan akhir penelitian.

3.5.3.3 Pengambilan Sampel, Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Jaringan Kulit

3.5.3.3.1 Pengambilan Sampel Untuk Pengukuran Volume Nodul dan Pengamatan Gambaran Histopatologi Kulit Mencit (*Mus musculus*)

1. Hewan coba diukur diameter nodul menggunakan jangka sorong dengan taraf ketelitian 0,05.
2. Mencit dianastesi secara inhalasi dengan menggunakan klorofom.
3. Diambil jaringan kulit dimulai dari bagian yang tidak terdapat nodul hingga yang terdapat nodul.
4. Setelah diambil kemudian nodul dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan dan dibuat preparat.

3.5.3.3.2 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit Mencit (*Mus musculus*) Yang Terkena Tumor

Pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan dengan langkah sebagai berikut (Fitria, 2010):

1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, kulit difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

2. Tahap Dehidrasi

Pada tahap ini, kulit yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan etanol 70% selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan etanol 80%, dilanjutkan ke dalam larutan etanol 95% sebanyak 2 kali dan dalam etanol absolut selama 1 jam dan diulang sebanyak 2 kali pada etanol absolute yang berbeda.

3. Tahap Penjernihan

Pada tahap ini, kulit yang telah didehidrasi kemudian dijernihkan untuk menarik kadar etanol dengan menggunakan larutan *xylene* I selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke dalam *xylene* II selama 1,5 jam.

4. Tahap Embeding

Pada tahap ini, kulit dimasukkan ke dalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan *paraffin* yang dicairkan pada suhu 60° C, kemudian *paraffin* dibiarkan mengeras dan dimasukkan kedalam *freezer* selama \pm 1 jam.

5. Tahap Pematangan

Pada tahap ini, kulit yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 mikron dengan pisau mikrotom. Hasil potongan dimasukkan kedalam *water bath* dengan suhu 34°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan diambil dengan obyek glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan.

6. Tahap Pewarnaan

Hasil potongan diwarnai dengan *hematoxilin eosin* (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut :

- a) Preparat direndam dalam larutan *xylene* I selama 10 menit.
- b) Preparat diambil dari *xylene* I dan direndam dalam larutan *xylene* II selama 5 menit.
- c) Preparat diambil dari *xylene* II dan direndam dalam etanol absolut selama 5 menit.
- d) Preparat diambil dari etanol absolut dan direndam dalam etanol 96% selama 30 detik.
- e) Preparat diambil dari etanol 96% dan direndam dalam etanol 50% selama 30 detik.
- f) Preparat diambil dari etanol 50% dan direndam dalam *running tap water* selama 5 menit.
- g) Preparat diambil dari *running tap water* dan direndam dalam *meyer hematoksilin* selama 1-5 menit.
- h) Preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam *running tap water* selama 2-3 menit.
- i) Preparat diambil dari *running tap water* dan direndam dalam pewarnaan eosin selama 1-5 menit.
- j) Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam etanol 75% selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam etanol

absolut selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda.

- k) Preparat diambil dan direndam dalam *xylene* III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam *xylene* IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam *xylene* V selama 10 menit.
- l) Preparat diangkat dan dikeringkan.
- m) Preparat ditutup menggunakan *deck glass*.

3.5.3.3.4 Pengamatan Preparat Histopatologi Jaringan Kulit yang Terkena Tumor

Pengamatan terhadap histopatologis kulit mencit (*Mus musculus*) diamati dibawah mikroskop komputer dengan menggunakan perbesaran 40-100x pada lima lapang pandang. Pengukuran dilakukan pada ketebalan lapisan kulit mencit. Nilai rata-rata tebal lapisan kulit diperoleh dengan cara menarik garis secara vertikal dan horizontal pada lapisan epidermis dengan lapang pandang yang dipilih secara acak.

3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui Uji Aktivitas Antitumor Ekstrak Benalu Teh (*Scurulla atropurpurea*) pada Kulit Mencit (*Mus muculus*) yang Diinduksi DMBA data pengukuran ketebalan lapisan kulit dianalisis dengan menggunakan uji ANAVA satu arah. Apabila dihasil analisis diperoleh nilai $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ (0,01) dilanjutkan dengan uji duncan signifikansi $\alpha 1\%$.