

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Alat dan Bahan

#### 4.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain : alat-alat gelas, spuit injeksi 1 ml 30 G (Terumo<sup>®</sup>, Japan), spuit injeksi 1 ml 26 G (Terumo<sup>®</sup>, Japan), spuit per oral, labu takar, pipet volume, *scalpel* dan *bladder*, gunting bedah, pinset, papan lilin dan alat fiksasi, pipet mikro (Socorex<sup>®</sup>, Swiss), timbangan analitik (Chyo<sup>®</sup> Jupiter C3, 100MD), timbangan gram elektrik (PJ, Precisia<sup>®</sup> Junior, Swiss), mikroskop binokuler (Olympus<sup>®</sup>, Japan), kamera (Olympus<sup>®</sup>, Japan).

#### 4.1.2 Bahan Uji

Bahan uji, yaitu ekstrak etanol rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### 4.1.3 Bahan Kimia

Bahan karsinogen yang digunakan adalah benzo(a)pirene, bahan tersebut diperoleh dari SIGMA Chemical Co. USA. Bahan-bahan lain seperti dimetilsulfoksida (DMSO), pelarut ekstrak CMC Na 0,5% dari Bratacho, Surabaya dan aquades mempunyai derajat murni pereaksi, diperoleh dari E. Merck. Formalin didapatkan dari Bratacho, Surabaya.

#### 4.1.4 Hewan Percobaan

Mencit betina (*Mus musculus*) galur *Balb/c* umur dua bulan, diperoleh dari Pengembangbiakan Hewan Laboratorium Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Mencit betina tersebut kemudian dikawinkan, kemudian anak mencit jantan hasil perkawinan dipisahkan dan digunakan sebagai hewan uji. Seluruh mencit jantan yang digunakan dalam penelitian ini ditempatkan pada

kandang yang terbuat dari plastik segi empat berukuran panjang 40 cm, lebar 25 cm, dan tinggi 15 cm. Pengaturan pencahayaan kandang dengan waktu terang selama 12 jam dan gelap 12 jam. Bagian atas kandang diberi tutup kawat strimin sedemikian rupa sehingga mencit tidak lepas, selain itu makanan, minuman, dan sirkulasi udara dapat terpenuhi. Hewan uji diberikan minuman berupa aquadestilata dan makanan bentuk pelet jenis BR 2 dari PT. Comfeed. Pakan dan minum diberikan *ad libitum*.

#### 4.2. Variabel Penelitian

- Variabel Bebas : Ekstrak etanol rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dengan beberapa pola pemberian
- Variabel Tergantung : Jumlah nodul tumor paru dan gambaran histopatologi paru mencit
- Variabel Kendali : Umur mencit, jenis kelamin, cara aplikasi bahan obat, kandang dan pengendalian hewan coba.

#### 4.3 Prosedur penelitian

##### 4.3.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria*)

Rimpang *Curcuma zedoaria* dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur dengan panas matahari tidak langsung dengan ditutupi kain warna gelap. Setelah kering, diserbuk dan diayak hingga diperoleh serbuk rimpang *Curcuma zedoaria*. Sebanyak 500 gram serbuk diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Pengadukan dilakukan 2 kali yaitu pada pagi dan sore hari, setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Maserasi dilakukan 3 kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian dienapkan, lalu

disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

#### **4.3.2 Uji Karsinogenisitas Benzo(a)pirena dengan Metode *Newborn Mice***

Mencit yang diperoleh dari Pusat Pengembangbiakan Hewan Laboratorium Pusvetma Surabaya dikawinkan dan ditunggu hingga melahirkan. Anak-anak mencit yang baru lahir dipisahkan tanpa memperhatikan jenis kelamin. Empat kelompok disuntik secara intraperitoneal dengan larutan benzo(a)pirene dalam dimetilsulfoksida (DMSO) pada hari ke-1, ke-8, ke-15 setelah kelahiran dengan dosis masing-masing 0,2  $\mu\text{mol}$ ; 0,4  $\mu\text{mol}$ ; dan 0,8  $\mu\text{mol}$ . Volume penyuntikan setiap penyuntikan adalah 20  $\mu\text{L}$ . Satu kelompok disuntik DMSO dengan dosis dan waktu yang sama seperti B(a)P sebagai kontrol pelarut DMSO. Pada umur 21 hari anak mencit bisa disapih dari induknya kemudian mencit jantan dan betina dikandangkan secara terpisah untuk menghindari terjadinya perkawinan selama uji karsinogenisitas.

#### **4.3.3 Perlakuan pada Hewan Percobaan**

Mencit-mencit yang telah disuntik dengan B(a)P dibagi menjadi lima kelompok :

1. Kelompok I sebagai kontrol Benzo(a)pirene, tidak mendapat perlakuan ekstrak etanol rimpang kunyit putih sampai akhir percobaan.
2. Kelompok II sebagai kontrol pelarut, mencit jantan setelah disuntik intraperitoneal DMSO tidak diberi perlakuan apa-apa sampai delapan minggu. Jumlah mencit jantan yang digunakan untuk masing-masing kelompok adalah 4 ekor.

3. Kelompok III diberi 500 mg/kg BB ekstrak rimpang *Curcuma zedoaria* pada hari ke 20 seminggu dua kali selama 8 minggu.
4. Kelompok III diberi 500 mg/kg BB ekstrak rimpang *Curcuma zedoaria* pada hari ke 27 seminggu dua kali selama 8 minggu.
5. Kelompok IV diberi 500 mg/kg BB ekstrak rimpang *Curcuma zedoaria* pada hari ke 34 seminggu dua kali selama 8 minggu.

Jumlah mencit jantan yang digunakan untuk setiap kelompok adalah 4 ekor. Pada akhir perlakuan pada umur mencit (4 bulan), semua kelompok mencit dikurbankan dan dilakukan nekropsi guna menghitung jumlah nodul tumor yang tumbuh dan preparasi organ paru guna pembuatan preparat histopatologi.

#### **4.4 Analisis Data**

Semua data yang diperoleh dibandingkan antar kelompok kontrol pelarut, kelompok kontrol B(a)P, kelompok poloa perlakuan I, II dan III. Jumlah nodul tumor dihitung pada setiap kelompok perlakuan kemudian dibandingkan, selanjutnya dianalisis dengan anava uji F, bila memberikan hasil yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan bantuan program perangkat lunak SPSS versi 18.0. Gambaran histopatologi paru diamati secara deskriptif kualitatif dan dibandingkan setiap kelompok perlakuan.