

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Rumah Hewan Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, pemberian perlakuan dan pembedahan terhadap hewan coba. Laboratorium Terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya sebagai tempat pembuatan ekstrak tomat. Laboratorium Genetika Molekular Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya sebagai tempat pemeriksaan aktivitas antioksidan dan pengukuran kadar likopen tomat. Laboratorium Histologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya sebagai tempat pembuatan sediaan histologi. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan, yaitu pada bulan Maret-Agustus 2012.

#### **3.2 Hewan Coba**

Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) strain BALB/C betina sebanyak 30 ekor berumur 5-7 minggu dengan berat badan berkisar 20-25 g yang diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma), Surabaya. Mencit diberi pakan berupa pelet AD2 (Japfa Comfeed Surabaya) dan diberi minum berupa air bersih PDAM yang diberikan secara *ad libitum*. Mencit diletakkan dalam kandang hewan yang diberi sekam sebagai alas kandang mencit.

### 3.3. Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.3.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian ini meliputi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) segar yang diperoleh dari pasar tradisional di Surabaya, serta senyawa karsinogen untuk penginduksi kanker menggunakan DMBA (7,12-dimetilbenz( a)antrasena) produksi Sigma Chem.Co., USA yang diperoleh dari CCRC Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta. Bahan lainnya adalah DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), minyak jagung, akuades, larutan bius (kloroform), larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) / garam fisiologi, etanol, aseton, metanol dan n-heksan. Bahan-bahan untuk pembuatan sediaan histologi kelenjar mammae meliputi larutan buffer, alkohol 70%, 80%, 96%, dan absolut, alkohol 70%+HCL, xylol alkohol, xylol, parafin, entellan, *Meyer's* albumin, akuades, dan pewarna *Harry's Hematoxylin-Eosin*.

#### 3.3.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat untuk: pemeliharaan hewan coba (bak plastik berukuran 36x28x12 cm yang dilengkapi dengan kawat kasa penutup, tempat makan dan botol minuman), pembuatan ekstrak tomat (timbangan elektrik, *blender*, kertas saring, gelas pengaduk, pisau, *beaker glass*, gelas ukur, tabung *erlenmeyer*, dan *rotary evaporator*), perlakuan (*disposable syringe* 2 cc berkanul dan botol-botol kecil untuk larutan yang akan diberikan ke hewan uji), pembuatan dan pengamatan sediaan histologi (seperangkat alat bedah, botol film, pipet tetes, pisau *cutter*, gelas beaker, *hand counter*, *object glass*, *cover glass*, mikroskop binokuler (Olympus), *paraffin bath*,

Bunsen, *mikrotom*, dan alat dokumentasi), pemeriksaan aktivitas antioksidan dan pengukuran kadar likopen tomat (timbangan digital, labu ukur, botol vial, pipet mikro, pipet ukur, gelas ukur, aluminium foil, corong pisah, erlemeyer, magnetic stirrer dan seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis) serta penyimpanan ekstrak tomat (lemari pendingin).

### 3.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari variabel :

1. Variabel bebas : dosis ekstrak tomat
2. Variabel terikat : diameter duktus, diameter lumen duktus, tebal epitel duktus dan jenis lapisan epitel duktus kelenjar mammae
3. Variabel terkendali : berat badan mencit, strain mencit, umur mencit, pakan, air minum, suhu pemeliharaan dan kelembapan kandang.

### 3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) / *Completely Randomized Design*.

### 3.6 Tahap Penelitian

#### 3.6.1 Pemeliharaan hewan coba

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di rumah hewan, ditempatkan pada kandang yang dialasi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa. Mencit diberi

makan berupa pelet serta diberi minum secara *ad libitum*, dan diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 2 minggu sebelum diberi perlakuan. Untuk pemeliharaan, setiap kandang diisi 5 ekor mencit.

### 3.6.2 Pembuatan ekstrak tomat

Tomat yang telah diperoleh dicuci dengan air sampai bersih, kemudian 250 g tomat segar ditimbang dan diblender selama 3 menit kemudian dimaserasi dengan 250 ml metanol selama 15 menit, sambil dikocok. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak pekat, berat ekstrak total ditimbang dan didapatkan 7,65 g.

### 3.6.3 Tahap penentuan kadar likopen

Penentuan kadar likopen dilakukan berdasarkan Sharma (1996) dalam Andayani *et al.*, (2008), ekstrak tomat ditimbang sebanyak 5 g, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer bertutup yang dilapisi dengan kertas aluminium foil pada bagian luar dan terlindungi dari cahaya, kemudian ditambahkan 50 ml larutan (heksana : aseton : etanol = 2 : 1 : 1) v/v, dikocok selama 30 menit dengan magnetik *stirrer*, ekstrak tomat dipindahkan ke corong pisah kemudian ditambah 10 ml akuabidestilata kemudian dikocok lagi selama 15 menit. Lapisan polar dan lapisan non polar dipisah, semua lapisan atas (non polar) diambil dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambah kloroform (pelarut organik) sampai tanda batas. Kadar likopen total ditentukan dari lapisan non polar (bagian atas) dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 471 nm. Pengukuran total likopen tidak menggunakan larutan standar likopen, melainkan

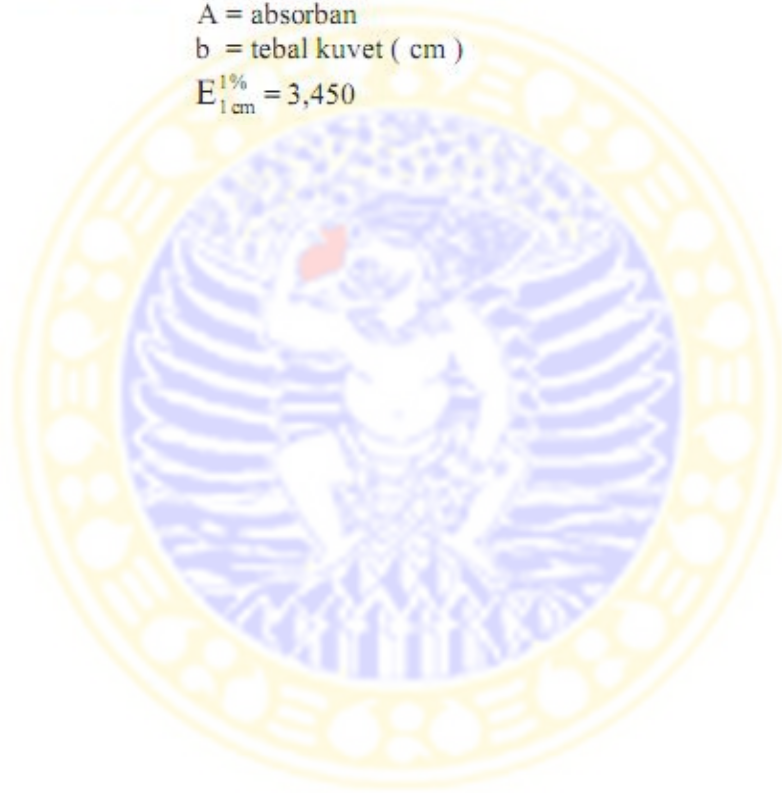
$$C = \frac{A}{E_{1cm}^{1\%} \times b}$$

Keterangan : C = konsentrasi ( g/100 ml )

A = absorban

b = tebal kuvet ( cm )

$$E_{1cm}^{1\%} = 3,450$$

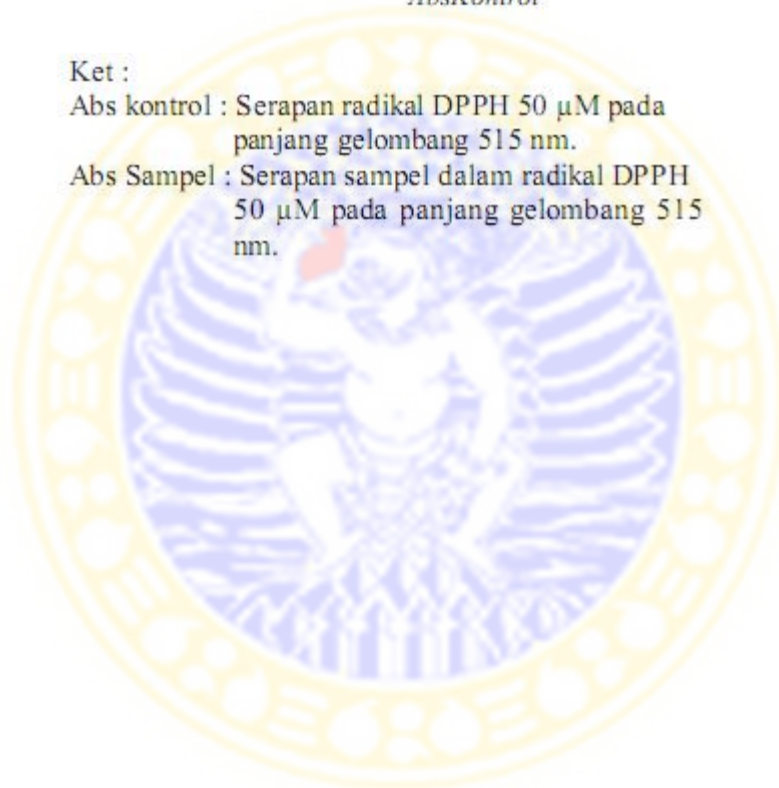


$$\frac{AbsKontrol - AbsSampel}{AbsKontrol} \times 100\%$$

Ket :

Abs kontrol : Serapan radikal DPPH 50  $\mu$ M pada panjang gelombang 515 nm.

Abs Sampel : Serapan sampel dalam radikal DPPH 50  $\mu$ M pada panjang gelombang 515 nm.



Kelompok kontrol negatif (K-) : diberi DMBA dalam minyak jagung

Kelompok perlakuan 1 (P1) : diberi ekstrak tomat dosis 100 mg/kgBB  
mencit dan DMBA dalam minyak jagung

Kelompok perlakuan 2 (P2) : diberi ekstrak tomat dosis 250 mg/kgBB  
mencit dan DMBA dalam minyak jagung

Kelompok perlakuan 3 (P3) : diberi ekstrak tomat dosis 400 mg/kgBB  
mencit dan DMBA dalam minyak jagung

Kelompok perlakuan 4 (P4) : diberi ekstrak tomat dosis 500 mg/kgBB  
mencit dan DMBA dalam minyak jagung

Hewan coba ditimbang setiap 7 hari mulai minggu ke 1 hingga minggu terakhir pengamatan (minggu ke-8), untuk mengetahui perkembangan berat badannya.

### **3.6.6 Tahap pembedahan mencit**

Pembedahan dilakukan pada minggu ke-9, mencit dikorbankan dengan dibius kloroform, kemudian kelenjar mammae diambil pada bagian kanan daerah inguinal. Kelenjar mammae yang telah didapat selanjutnya dicuci dan dibilas dengan larutan garam fisiologis untuk menghilangkan sisa-sisa darah, kemudian difiksasi dengan larutan buffer formalin.

### **3.6.7 Tahap pembuatan sediaan histologi kelenjar mammae**

Pembuatan sediaan kelenjar mammae dilakukan dengan metode paraffin (Sugiharto, 1989), dengan melalui berbagai tahapan berikut :

1. Fiksasi (*Fixation*), dilakukan dengan cara memasukkan organ kelenjar mammae ke dalam larutan formalin, dibiarkan selama lebih dari 24 jam.
2. Dehidrasi (*Dehydration*), organ kelenjar mammae didehidrasi dengan cara berturut-turut dimasukkan kedalam larutan alkohol 70% (4x30 menit), alkohol 80% (2x30 menit), alkohol 96% (30 menit), dan alkohol absolut (30 menit),
3. Penjernihan (*clearing*), dilakukan dengan memasukkan organ kelenjar mammae kedalam larutan xylol bekas (15 menit) dan xylol murni (60 menit),
4. *Infiltrasi*, organ berturut-turut dimasukkan kedalam larutan xylol paraffin = 1:1 (30 menit), parafin murni I, II, dan III masing-masing selama 60 menit,
5. Penanaman (*embedding*), membuat blok-blok dengan cara memasukkan parafin cair III kedalam kotak-kotak kecil, kemudian organ dimasukkan dan diatur letaknya, didiamkan hingga dingin dan mengeras,
6. Penyayatan (*sectioning*), blok parafin dipotong dengan ketebalan 5  $\mu$ m menggunakan mikrotom hingga terbentuk pita. Pita yang terbentuk diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya diolesi dengan *Meyer's* albumin,
7. Pewarnaan (*staining*), preparat organ kelenjar mammae yang sudah dioven dimasukkan berturut-turut kedalam larutan xylol (2x10 menit), alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, dan alkohol 70% masing-masing selama 5 menit, pewarna *Harris's hematoxylin* (3 menit),



kemudian dipindahkan ke air mengalir (5 menit), lalu dimasukkan berturut-turut kedalam akuades (5 menit), alkohol 70% + HCL (30 detik), *eosin* (2 menit), akuades (5 menit), alkohol (70%, 80%, 96%, alkohol absolut), dan xylol alkohol (1:1) masing-masing selama 5 menit, dan terakhir dipindahkan kedalam xylol murni (2x10 menit),

8. Penutupan (*mounting*), preparat pada gelas obyek diberi *entellan* kemudian ditutup dengan *cover glass*.

### 3.6.8 Tahap pengambilan data

Pengambilan data dilakukan dengan mengamati sediaan histologi kelenjar mammae dari tiap ekor mencit pada tiap kelompok yang dibuat 2 irisan dengan jarak irisan 20  $\mu\text{m}$ . Histologi kelenjar mammae yang diamati adalah diameter duktus, diameter lumen duktus, tebal epitel duktus dan jenis lapisan epitel duktus kelenjar mammae. Pengamatan histologi dilakukan pada seluruh daerah lapang pandang dan diamati seluruh duktus yang terlihat. Pengukuran duktus kelenjar mammae dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya dan mikrometer dengan menggunakan pembesaran 400x. Pengukuran diameter duktus, diameter lumen duktus, dan tebal epitel duktus kelenjar mammae dengan cara mengukur dan merata-rata panjang diameter dan tebal epitel pada sisi yang berbeda. Sedangkan pengamatan jenis epitel duktus dikelompokkan ke dalam bentuk epitel selapis, berlapis teratur dan berlapis tidak teratur.

Data tambahan yang diamati adalah pengamatan terhadap mencit yang mati dan perkembangan berat badan hewan coba. Mencit ditimbang setiap 7 hari mulai minggu ke 1 hingga minggu terakhir pengamatan (minggu ke-8).

### 3.7 Analisis data

Dalam penelitian ini, data rata-rata diameter duktus tebal epitel duktus kelenjar mammae dianalisis dengan menggunakan uji statistik *one way* ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar perlakuan yang diberikan. Didahului dengan uji normalitas untuk mengetahui distribusi data dan uji homogenitas untuk mengetahui homogenitas variansi, kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan pada tingkat kepercayaan 5%. Pada data diameter lumen duktus dilakukan dengan uji *Brown Forsythe* dan dilanjutkan dengan uji *Games-Howell* ( $\alpha = 0,05$ ), sedangkan pada data jenis lapisan sel epitel duktus dihitung persentasenya dari seluruh duktus yang diamati pada tiap kelompok.