

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Termasuk ke dalam penelitian eksperimen karena pada penelitian ini terdapat manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003). Objek pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan. Pengamatan yang dilakukan adalah pada bobot tubuh, jumlah eritrosit, jumlah mikronukleus, ukuran mikronukleus pada mencit jantan yang mendapatkan perlakuan berupa pemberian ekstrak daun honje (*Etlintera elatior*).

#### 3.2 Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancang Acak Lengkap (RAL) di mana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Penelitian ini terbagi menjadi tujuh perlakuan. Masing-masing perlakuan terdapat 4 ekor mencit jantan. Kelompok perlakuan dosis merupakan kelompok mencit yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak daun honje (*Etlintera elatior*). Dosis ekstrak daun honje yang digunakan dalam penelitian ini adalah 300; 450; 600; dan 700 mg/kg.

Penelitian ini memiliki 2 kelompok kontrol dan 1 kelompok preventif. Kelompok kontrol terdiri atas kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan berupa induksi siklofosamid melalui intravena. Kontrol negatif adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan berupa Na-CMC yang diberikan secara oral. Preventif adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan ekstrak daun honje 300 mg/kg BB, hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun honje tidak memiliki efek mutagen terhadap mencit. Banyaknya replikasi yang dilakukan dalam penelitian ini didapatkan menggunakan rumus dari Federer (1977) yaitu:

$$(T - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(7 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq \frac{21}{6}$$

$$r \geq 3,5 \text{ atau } 4$$

Keterangan :

r : Jumlah replikasi

T : Jumlah perlakuan.

Pengacakan kandang serta pemberian nomor pada mencit dilakukan untuk menghilangkan bias pada saat proses pengambilan data (Sudjana, 2002). Hasil pengacakan kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1

*Hasil Pengacakan Kandang Mencit dan Jenis Perlakuan Ekstrak Daun Honje*

<b>Kandang / Perlakuan</b>	<b>Nomor Mencit</b>			
A	11	19	13	24
B	18	27	12	2
C	3	16	15	14
D	5	25	21	22
E	6	4	8	1
F	26	9	23	20
G	7	10	17	28

Keterangan: A = Kontrol Negatif, Na-CMC 0.5%, B = Kontrol Positif, Siklofosfamid 50 mg/kg BB, C = Preventif, ekstrak daun honje 300 mg/kg BB, D = Dosis 1, Siklofosfamid 50 mg/kg BB, Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 300 mg/kg BB, E = Dosis 2, Siklofosfamid 50 mg/kg BB, Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 450 mg/kg BB, F = Dosis 3, Siklofosfamid 50 mg/kg BB, Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 600 mg/kg BB, G = Dosis 4, Siklofosfamid 50 mg/kg BB, Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 700 mg/kg BB.

Setelah pengacakan kandang dan pembagian jenis perlakuan, maka dapat dibuat *timeline* perlakuan terhadap hewan uji. *Timeline* dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2  
*Timeline Perlakuan Terhadap Hewan Uji*

Kel.	Perlakuan*							
	Jam ke-0	30 jam kemudian	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5	Hari ke-6	Hari ke-7	Hari ke-8
A	Lar. Na-CMC							
B	Lar. S1	Lar. Na-CMC						
C	Ekstrak H1							
D	Lar. S1	Ekstrak H1	Ekstrak H1	Ekstrak H1	Ekstrak H1	Ekstrak H1	Ekstrak H1	Mencit didislokasi leher dan diambil sumsum tulang pahunya.
E	Lar. S1	Ekstrak H2	Ekstrak H2	Ekstrak H2	Ekstrak H2	Ekstrak H2	Ekstrak H2	
F	Lar. S1	Ekstrak H3	Ekstrak H3	Ekstrak H3	Ekstrak H3	Ekstrak H3	Ekstrak H3	
G	Lar. S1	Ekstrak H4	Ekstrak H4	Ekstrak H4	Ekstrak H4	Ekstrak H4	Ekstrak H4	

Keterangan : \* = Semua perlakuan setelah mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam, S1 = Siklofosamid 50 mg/kg BB, H1 = Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 300 mg/kg BB, H2 = Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 450 mg/kg BB, H3 = Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 600 mg/kg BB, H4 = Na-CMC 0.5%, ekstrak daun honje 700 mg/kg BB.

### 3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) jantan yang ada di rumah mencit Kebun Botani UPI. Sampel penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berusia tiga bulan dengan bobot tubuh 30-35 gram yang sudah dikondisikan hingga mengalami mikronukleus dengan pemberian siklofosamid. Parameter yang diamati adalah bobot tubuh, jumlah eritrosit, jumlah mikronukleus, dan ukuran mikronukleus.

### 3.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan dari bulan Februari hingga bulan April 2019. Penelitian dilakukan mulai dari aklimatisasi mencit hingga pengolahan data hasil penelitian. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada mencit dilakukan di Laboratorium Perkembangan Hewan di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) Bandung. Pembuatan ekstrak bunga honje dilakukan di

Rizal Fauzan Abdurochman Sugina, 2019

**UJI AKTIVITAS ANTIMUTAGENIK EKSTRAK DAUN HONJE (*Etlingera elatior*) TERHADAP MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI SIKLOFOSFAMID**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Laboratorium Instrumen Kimia FPMIPA UPI dengan menggunakan alat *Freeze Dryer*. Perhitungan parameter jumlah mikronukleus dilakukan di Laboratorium Riset Lingkungan FPMIPA UPI.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Persiapan Alat Bahan dan Hewan Uji**

Alat dan bahan yang diperlukan disiapkan. Tempat penyimpanan mencit digunakan sebanyak 7 buah kandang berukuran 40 x 30 x 25 cm. Sebelum kandang digunakan, terlebih dahulu dibersihkan lalu diberikan serbuk kayu hingga mencapai ketinggian 5 cm, diberikan tempat pakan dan tempat minum. Kandang kemudian diletakkan di tempat yang bersih, memiliki penyiaran dan sirkulasi udara yang baik, dan aman dari gangguan-gangguan yang membuat mencit merasa stress seperti suara bising dan hewan-hewan.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berusia 3 bulan dengan bobot tubuh 30 – 35 gram. Mencit didapatkan dari Biofarma Cisarua Lembang. Mencit kemudian dikelompokkan dengan masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor ke dalam tujuh buah kandang. Pengelompokan dilakukan berdasarkan pada perbedaan jenis perlakuan yang akan diberikan. Mencit kemudian diaklimatisasi selama satu minggu dan diberikan pakan serta minum secara *ad libitum*. Pada akhir aklimatisasi, mencit ditimbang bobot tubuhnya sebelum memasuki masa perlakuan

#### **3.5.2 Pembuatan Ekstrak Daun Honje**

Tanaman honje didapatkan dari Kebun Percobaan Manoko, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat. Daun honje kemudian dipisahkan dari tangkainya. Daun yang telah terpisah dari tangkainya kemudian dibersihkan sehingga terpisah dari kotoran lalu diblender menggunakan pelarut air. Daun honje yang telah halus kemudian dimasukan ke dalam wadah dan diserahkan ke Laboratorium Instrumen Kimia di Departemen Pendidikan Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia untuk dibuat sediaan ekstrak menggunakan teknik *Freeze drying* sehingga dihasilkan sediaan kering ekstrak daun honje. Sediaan yang didapatkan kemudian disaring sehingga didapatkan serbuk halus ekstrak daun honje. Serbuk

halus ekstrak daun honje kemudian ditimbang untuk ditentukan dosis pemberian terhadap hewan uji.

### 3.5.3 Pembuatan Larutan Na-CMC 0.5%

Larutan Na-CMC 0.5% digunakan sebagai pensuspensi bahan uji yang akan diberikan secara oral kepada mencit. Serbuk Na-CMC didapatkan secara *online* dari Sinar Kimia Abadi di Semarang. Serbuk Na-CMC yang telah didapatkan kemudian ditimbang sebesar 0.5 gram kemudian dilarutkan ke dalam akuades hingga mencapai 100 ml. Larutan Na-CMC diaduk hingga homogen.

### 3.5.4 Pembuatan Larutan Siklofosamid 50 mg/kg BB

Siklofosamid yang digunakan merupakan siklofosamid dengan merek dagang *Cyclovid*®. Siklofosamid didapatkan secara *online* dari apotek *Medicastore*, Jakarta. Dosis siklofosamid yang akan diberikan kepada mencit adalah sebesar 50 mg/kg BB (Rahmawati & Tabran, 2015). Siklofosamid 50mg/kg bb dilarutkan dalam *Aqua Pro Injection* dan disesuaikan dengan bobot tubuh mencit yang akan diinduksi. Perhitungan dosis untuk pemberian siklofosamid adalah sebagai berikut:

$$\frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 50 \text{ mg} = 1,5 \text{ mg}$$

Apabila stok larutan siklofosamid dalam air steril yang tersedia adalah 1% maka yang jumlah larutan yang diinduksikan secara intravena ke hewan uji adalah:

$$\frac{1,5 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times 100 \text{ ml} = 0,15 \text{ ml}$$

### 3.5.5 Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Daun Honje

Dosis ekstrak bunga honje yang diberikan kepada hewan uji adalah sebesar 300; 450; 600; 700 mg/kg BB. Dosis tersebut merupakan modifikasi dari penelitian Chasanah (2013). Selain kelompok yang diberi ekstrak daun honje, terdapat dua kelompok perlakuan kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif dan satu kelompok preventif.

Jumlah ekstrak daun honje yang diberikan ke mencit disesuaikan dengan dosis dan bobot tubuh mencit. Selain itu, banyaknya ekstrak daun honje yang diberikan disesuaikan dengan kapasitas maksimal volume lambung mencit yaitu

sebesar 20 g atau 1 ml (Ngatidjan, 1991). Ekstrak daun honje yang telah ditimbang kemudian dicampurkan dengan Na-CMC untuk membuat sediaan ekstrak daun honje.

Ekstrak daun honje dengan dosis 300 mg/kg BB yang diberikan kepada mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 300 \text{ mg} = 9 \text{ mg/ekor}$$

Karena dalam satu dosis terdapat empat ekor mencit, maka perhitungan pembuatan sediaan larutan ekstrak adalah:

$$9 \text{ mg} \times 4 \text{ ekor} = 36 \text{ mg/4 ml}$$

Ekstrak daun honje dengan dosis 450 mg/kg BB yang diberikan kepada mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 450 \text{ mg} = 13.5 \text{ mg/ekor}$$

Karena dalam satu dosis terdapat empat ekor mencit, maka perhitungan pembuatan sediaan larutan adalah:

$$13.5 \text{ mg} \times 4 \text{ ekor} = 54 \text{ mg/4 ml}$$

Ekstrak daun honje dengan dosis 600mg/kg BB yang diberikan kepada mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 600 \text{ mg} = 18 \text{ mg/ekor}$$

Karena dalam satu dosis terdapat empat ekor mencit, maka perhitungan pembuatan sediaan larutan adalah:

$$18 \text{ mg} \times 4 \text{ ekor} = 72 \text{ mg/4 ml}$$

Ekstrak daun honje dengan dosis 750 mg/kg BB yang diberikan kepada mencit adalah sebagai berikut:

$$\frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 700 \text{ mg} = 21 \text{ mg/ekor}$$

Karena dalam satu dosis terdapat empat ekor mencit, maka perhitungan pembuatan sediaan larutan adalah:

$$21 \text{ mg} \times 4 \text{ ekor} = 84 \text{ mg/4 ml}$$

### 3.5.6 Pemberian Siklofosfamid

Larutan siklofosfamid yang telah dibuat berdasarkan bobot tubuh serta dosis pemberian diberikan kepada mencit secara intravena melalui ekor dengan menggunakan *syringe*. Induksi siklofosfamid diberikan 30 jam sebelum pemberian ekstrak daun honje.

### 3.5.7 Pemberian Ekstrak Daun Honje

Ekstrak daun honje (*Etlintera elatior*) yang telah dibuat diberikan kepada mencit secara oral dengan menggunakan sonde oral secara *gavage*. Ekstrak daun honje diberikan kepada mencit sesuai dosis yang telah ditentukan. Ekstrak diberikan setiap pagi hari selama enam hari berturut-turut. Selama proses pemberian ekstrak, mencit tetap diberi pakan sebanyak 10 gram per ekor mencit dan minum seperti biasa,

### 3.5.8 Analisis Kemampuan Ekstrak Daun Honje

#### a. Perhitungan Bobot Tubuh Mencit

Bobot tubuh mencit jantan ditimbang menggunakan timbangan digital. Selama masa perlakuan mencit tetap ditimbang, yaitu sebelum induksi siklofosfamid, sebelum pemberian ekstrak daun honje, dan sebelum dislokasi. Data yang didapatkan kemudian diolah secara statistik.

#### b. Perhitungan Jumlah Eritrosit

Mencit jantan yang akan dihitung jumlah eritrositnya dilukai ujung ekornya untuk diambil darah sebanyak 1 cc. Darah yang didapatkan dihitung jumlahnya dengan alat *haemocytometer* dan diamati di mikroskop cahaya. Data yang didapatkan kemudian diolah secara statistik.

#### c. Pembuatan Preparat Apusan Sumsum Tulang

Pada hari kedelapan, seluruh mencit dimatikan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah untuk diambil tulang pahanya. Tulang paha mencit kemudian dipotong setiap ujungnya untuk diambil sumsum tulangnya. Sumsum tulang paha mencit diambil dengan menggunakan spuit yang berisi 1 ml NaCl fisiologis kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dengan menggunakan pipet tetes, sedangkan endapannya

digunakan sebagai sediaan sel (Chasanah, 2013). Sediaan sel kemudian dibuat preparat apus sumsum tulang. Preparat dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan alkohol 70% selama 10 menit. Preparat apus yang telah kering kemudian diwarnai dengan larutan pewarna Giemsa selama 30 menit. Preparat yang telah terwarnai kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan kembali pada suhu kamar. Preparat yang telah siap kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

#### **d. Jumlah Mikronukleus**

Preparat apusan sumsum tulang mencit yang telah dibuat dan diamati menggunakan mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 400x kemudian dihitung jumlah mikronukleusnya dari 1000 sel yang ditemukan. Hasil pengamatan didokumentasikan dan dicatat jumlah mikronukleus setiap dosis perlakuan. Data yang didapatkan kemudian diolah secara statistik.

#### **e. Ukuran Mikronukleus**

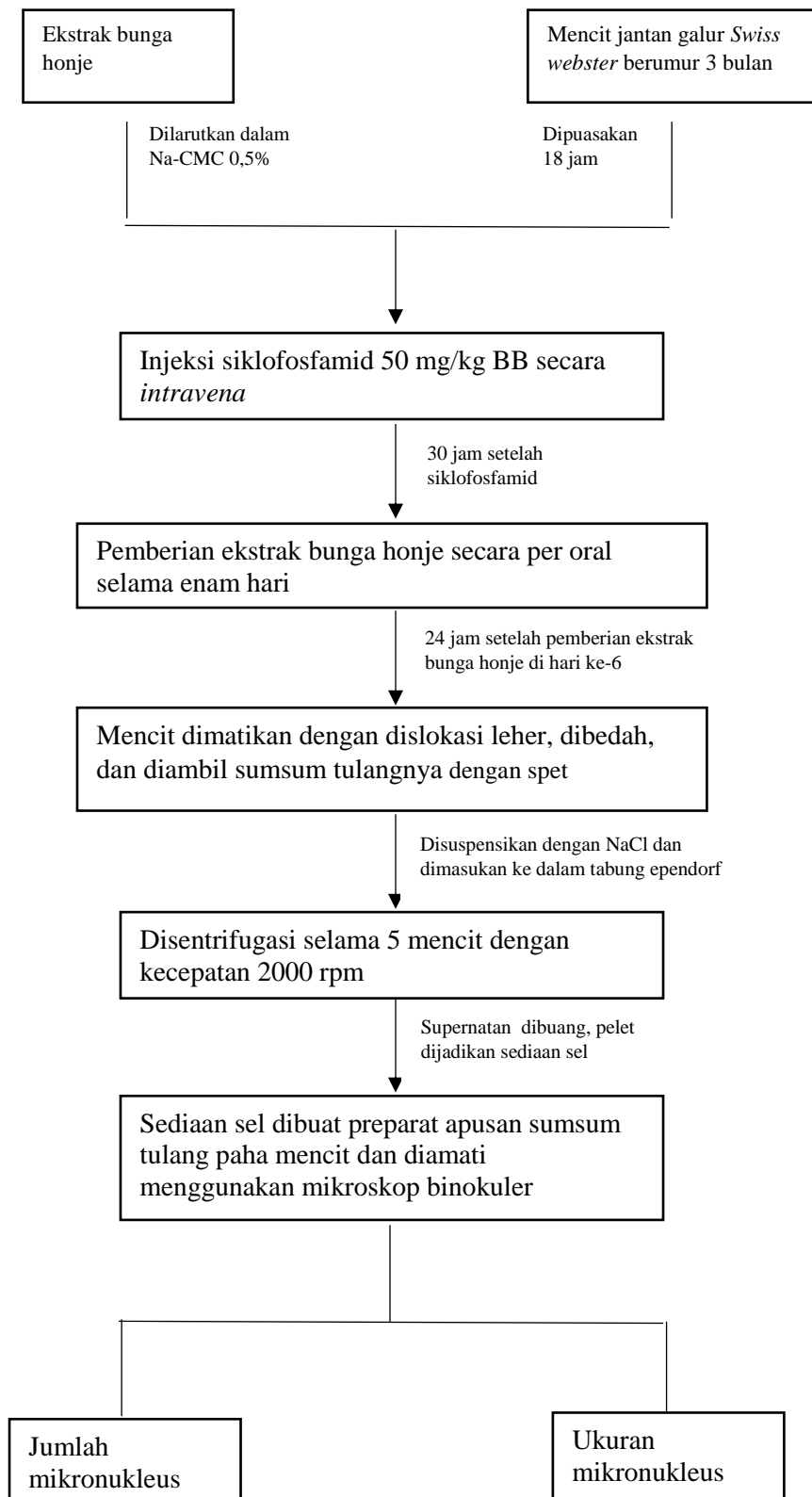
Preparat apusan sumsum tulang mencit diamati menggunakan *microcam* untuk melakukan pengukuran mikronukleus yang ditemukan. Data yang didapatkan kemudian diolah secara statistik.

#### **f. Analisis Statistik**

Data hasil pengamatan mikronukleus yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak IBM SPSS *statistics* versi 24 untuk sistem operasi *Windows*. Tahap pengujiannya dimulai dengan melakukan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui apakah data yang didapatkan terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal kemudian dilanjutkan dengan uji variasi homogenitas Levene. Data yang terdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis menggunakan uji *One-Way Analysis of Variance* atau lebih dikenal dengan uji *One-Way ANOVA*. Untuk melihat pengaruh ekstrak daun honje dilakukan uji berikutnya dengan menggunakan uji Tukey HSD. Data yang tidak terdistribusi normal dan juga tidak homogen, akan diuji dengan menggunakan uji nonparametrik uji Kruskal-Wallis.



### 3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian