

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian uji toksisitas subkronis oral selama 28 hari merupakan isolat miristisin dari biji pala. Sampel yang digunakan adalah sebanyak 84 gram isolat miristisin dari minyak atsiri biji pala hasil penelitian sebelumnya (Ansory *et al.*, 2020).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah toksisitas subkronis miristisin dalam beberapa variasi dosis yang sudah ditentukan. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel sebagai berikut:

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi dosis miristisin sebesar 2,1; 27,3 dan 354,9 mg/kg BB.

2.2 Variabel Tergantung. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah gejala toksik dan histopatologi otak dan pankreas tikus putih (*Rattus novergicus*).

2.3 Variabel Terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah jenis kualitas dan kuantitas pakan, minum, suhu ruang, dan kelembaban pada setiap hewan diusahakan sama (Haryoto., Suhendi A., W.E.P., Sujono T.A., 2015). Kondisi sampel, waktu pengamatan, suasana laboratorium, perlakuan peneliti dan jenis kelamin tikus juga termasuk dalam variabel terkendali dalam penelitian ini.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, isolat miristisin biji pala merupakan isolat hasil destilasi minyak atsiri pada tanaman pala.

Kedua, hiperaktivitas adalah suatu kondisi dimana hewan uji menjadi lebih aktif dari biasanya (Octariani *et al.*, 2021).

Ketiga, kejang adalah suatu kondisi terjadinya kejang pada hewan uji (Novia *et al.*, 2022).

Keempat, tingkah laku yang aneh adalah tingkah laku tikus yang tidak normal seperti berjalan mundur.

Kelima, tremor adalah suatu kondisi terjadinya getaran pada hewan uji (Novia *et al.*, 2022).

Keenam, piloereksi adalah kondisi bulu berdiri karena hewan uji tegang (Octariani *et al.*, 2021).

Ketujuh, lemas adalah menurunnya aktivitas tikus dari aktivitas normal.

Kedelapan, grooming adalah gerakan kaki menggaruk dan menjilati bagian tubuh tikus.

Kesembilan, dyspnea adalah keadaan sesak saat bernafas.

Kesepuluh, tikus putih (*Rattus novergicus*) adalah tikus putih galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesebelas, histopatologi adalah metode yang digunakan untuk mengamati efek toksik yang terjadi pada organ otak dan pankreas tikus setelah pemberian miristisin secara oral selama 28 hari.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain kandang tikus lengkap dengan tempat pakan dan minum, timbangan analitik, spuit oral, corong, gelas ukur, objek glass, deck glass, tabung reaksi, stoples, mikroskop binokuler, alat pewarna jaringan, seperangkat alat bedah meliputi pinset, scalpel, gunting bedah, jarum, meja lilin, alat pelindung diri meliputi jas laboratorium, masker, dan handscoon.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat miristisin dengan kemurnian 92,13 % yang telah dianalisis menggunakan kromatografi GC-MS (Ansory *et al.*, 2020). Pelarut propilen glikol, formalin NBF 10% sebagai pengawet organ setelah dilakukan pembedahan, pewarna eosin sebagai pewarna preparat organ yang diamati, dan hewan uji tikus putih dengan rentang umur 2 – 3 bulan dan berat badan yang berkisar antara 200-300 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Larutan Uji Miristisin

Pembuatan larutan stok untuk kelompok dosis 1 konsentrasi 0,02% dengan mengambil 0,02 ml isolat miristisin kemudian dilarutkan dengan propilen glikol 100 ml. Pada kontrol dosis 2 konsentrasi 0,2% dengan mengambil isolat miristisin sebanyak 0,2 ml dilarutkan dengan propilen glikol 100 ml. Pada kelompok kontrol dosis 3 konsentrasi 2% dengan mengambil isolat miristisin sebanyak 2 ml dilarutkan dengan propilen

glikol 100 ml. Selanjutnya membuat seri pengenceran pada masing – masing kelompok kontrol dosis 2,1 mg/kg BB tikus, 27,3 mg/kg BB tikus, 354,9. Pembuatan jumlah larutan sediaan uji isolat miristisin tergantung dari berat badan tikus pada masing – masing kelompok kontrol.

2. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Pengujian pada penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus novergicus*) sebanyak 70 ekor jantan dan betina yang sudah diaklimatisasi selama 7 hari sebelum percobaan. Hewan uji dikelompokkan ke dalam 7 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdapat 5 ekor tikus putih jantan dan betina. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol normal, kelompok selanjutnya kelompok merupakan kelompok perlakuan dan yang terakhir merupakan kelompok satelit. Kelompok kontrol negatif diberikan propilen glikol 10%. Kelompok kedua adalah kelompok perlakuan pemberian isolat miristisin dosis 2,1 mg/kg BB. Kelompok ketiga adalah kelompok perlakuan isolat miristisin dosis 27,3 mg/kg BB. Kelompok keempat adalah kelompok pemberian isolat miristisin dosis 354,9 mg/kg BB. Kelompok terakhir merupakan kelompok satelit yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan isolat miristisin dosis 354,9 mg/kg BB.

3. Pemberian Sediaan Uji dan Volume Pemberian

Aturan pemberian sediaan uji pada dasarnya harus disesuaikan dengan cara pemberian atau paparan yang sesuai pada manusia, pemberian secara oral diberikan dengan volume pemberian sebanyak 1 mL sediaan uji per 100 gram berat badan hewan uji, jika pada keadaan tertentu volume pemberian bisa diberikan sampai 2 mL sediaan uji per 100 gram berat badan hewan uji jika digunakan pembawa air. Sediaan uji diberikan setiap hari pada hewan uji, 7 hari dalam seminggu selama 28 hari. Cara ini dilakukan dengan mempertimbangkan bahwa terdapat organ yang memiliki regenerasi dalam waktu cepat dan bertujuan untuk mempertahankan konsentrasi sediaan uji dalam tubuh tetap atau steady state sehingga pengamatan efek toksik dapat dilakukan (BPOM, 2022).

4. Pengamatan Gejala Toksik

Berdasarkan (BPOM, 2022), pengamatan terhadap gejala ketoksikan dan gejala klinis yang terdiri perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, ekskresi, sekresi, aktivitas otonom (misalnya lakrimasi, piloereksi, keadaan pupil (mengecil atau melebar), pola pernapasan yang tidak biasa), perubahan cara berjalan tingkah laku yang

aneh misalnya berjalan mundur, dan kejang dilakukan setiap hari selama 28 hari. Untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 14 hari kemudian atau pada hari ke – 42 untuk mengetahui proses penyembuhan kembali dari pengaruh ketoksikan. Menjelang akhir periode pengujian (pada minggu ke-4) sebaiknya dilakukan pemeriksaan reaktivitas sensorik terhadap rangsangan dari berbagai jenis (misalnya, rangsangan pendengaran, visual dan proprioseptif), pemeriksaan kekuatan cengkraman (grip) dan pemeriksaan aktivitas motorik. Pada penelitian ini diamati gejala toksik yang berupa hiperaktivitas, kejang, berjalan mundur, tremor, piloereksi, lemas, dan grooming.

5. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Makanan

Semua hewan ditimbang setidaknya setiap minggu. Volume sediaan uji ditentukan mengacu pada berat badan hewan yang terkini. Dalam pelaporan untuk pembuatan kurva berat badan, data berat badan diplotkan 1 titik di tiap minggu. Pengukuran konsumsi pakan yang diberikan kepada hewan uji harus dilakukan setidaknya setiap minggu. Jika bahan uji diberikan melalui air minum, konsumsi air juga harus diukur setidaknya setiap minggu. Pemberian pakan dan minum kepada hewan uji disesuaikan dengan standar laboratorium dan secara *ad libitum* kecuali tujuan penelitian yang membutuhkan pakan khusus atau pembatasan asupan pangan (BPOM, 2022).

6. Penimbangan Berat Organ

Berdasarkan (BPOM, 2022) hewan uji yang telah di euthanasia atau dikorbankan harus segera di nekropsi dan dilanjutkan pengamatan makropatologi pada setiap organ. Organ yang akan ditimbang harus dikeringkan terlebih dahulu menggunakan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk memperoleh bobot organ absolut. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan hewan uji}} \times 100$$

7. Pengamatan Histopatologi Hewan Uji

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi, hewan dari kelompok dosis dan kelompok satelit yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan fungsi organ dan hematologi, hewan yang sekarat (*moribound*) dan mati selama periode pengujian. Apabila terjadi kelainan histopatologi pada kelompok dosis tertentu maka semua hewan dalam kelompok tersebut juga harus dilakukan pemeriksaan histopatologi. Pada penelitian ini

dilakukan pengamatan histopatologi pada otak dan dan pankreas tikus putih (*Rattus novergicus*) (BPOM, 2022).

8. Euthanasia hewan

Prinsip pengorbanan hewan uji berdasarkan dengan petunjuk cara dan metode pengorbanan hewan uji sesuai dengan *ethical clearance* dan tidak mempengaruhi hasil uji toksisitas. Teknik yang dapat digunakan untuk mengorbankan hewan uji antara lain dengan cara dislokasi leher untuk hewan uji kecil misalnya mencit dan tikus dengan berat badan kurang lebih 200 gram. Kedua dengan anestesi inhalasi dengan obat bius halogenated seperti halotan, isofluran, dan sevofluran atau CO² dengan menggunakan chamber khusus, akan tetapi pemakaian CO² dapat menyebabkan kerusakan organ seperti otak. Pemakaian eter untuk anestesi dan euthanasia sudah tidak dianjurkan lagi. Ketiga, anestesi dengan teknik penyuntikan obat bius dapat dilakukan dengan dosis yang disarankan untuk euthanasia (dosis letal) misalnya menggunakan ketamine dan xylazine, urethane atau pentobarbital. Keempat, dengan pengeluaran darah atau eksaguinasi melewati vena jugularis atau arteri karotis yang sebelumnya sudah dianestesi terlebih dahulu (BPOM, 2022).

9. Pembuatan Preparat dan Pemeriksaan Histopatologi

Berdasarkan (BPOM, 2022) pada hari ke - 29 pelaksanaan uji toksisitas, dilakukan pengamatan histopatologi untuk mengetahui kelainan atau kerusakan pada organ hewan uji yang muncul akibat pemberian sediaan uji. Pada prinsipnya pemeriksaan histopatologi yaitu organ yang sudah dilakukan fiksasi menggunakan formalin kemudian dicuci, di dehidrasi, pembuatan blok menggunakan parafin, kemudian pemotongan menjadi sayatan tipis dan dilakukan pewarnaan yang selanjutnya diperiksa menggunakan mikroskop. Pemeriksaan histopatologi wajib dilakukan menggunakan skoring lesio. Organ otak dan pankreas yang akan digunakan diambil dan dipotong dengan ukuran 1 cm³. Kemudian dilakukan fiksasi dengan merendam organ ke dalam larutan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% dengan volume minimal 10 kali lipat dari volume organ dan harus sering digoyang dan dalam keadaan tertutup baik. Organ dibiarkan selama 24 – 48 jam pada suhu kamar (250°C). Organ dimasukkan kedalam botol, masing – masing botol beri nomor kode hewan dan tanggal pembedahan. Dilanjutkan fiksasi kedua dengan organ hasil potongan dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% setidaknya

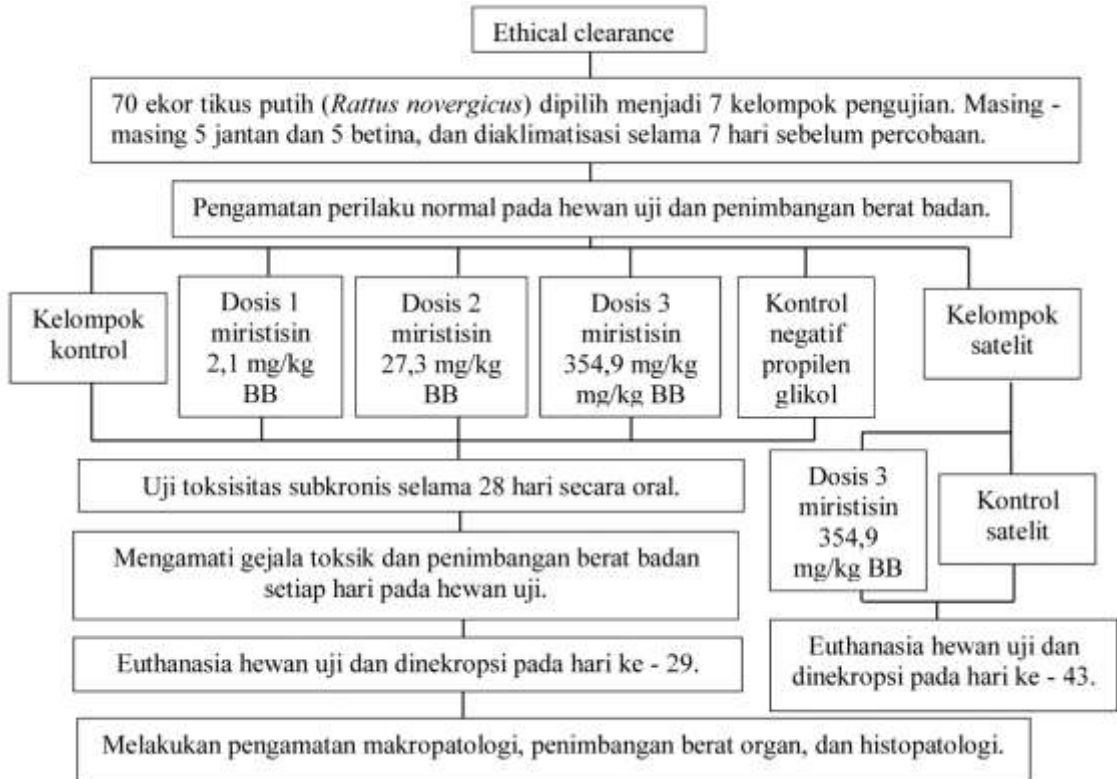
selama 1 – 3 hari. Setelah dilakukan pencucian setelah fiksasi dengan cara kaset yang berisi organ dimasukkan ke dalam bak yang berisi air dan dialiri air terus menerus minimal selama 6 jam. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dan pembedahan melalui larutan etanol 70% (nomor 1), etanol 80% (nomor 2), etanol 90% (nomor 3), etanol absolut I (nomor 4), etanol absolut II (nomor 5), xylol I (nomor 6), xylol II (nomor 7), dan xylol III (nomor 8) kedalam masing – masing bejana. Waktu perendaman diatur dari setiap bejana , bejana 1 sampai 6 selama 2,5 jam, bejana nomor 7 selama 1,5 jam, dan bejana nomor 8 selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan proses infiltrasi atau peredaman pada parafin cair dengan bejana yang berukuran 1 liter sebanyak 3 buah bejana masing – masing berisi parafin cair dan suhu dipertahankan 56 – 58°C dalam lemari pemanas. Dilanjutkan proses pembersihan organ dengan memasukkan organ dalam kantong yang telah dilakukan proses dehidrasi selama 1 jam. Setelah dilakukan proses infiltrasi, selanjutnya dilakukan pembuatan blok parafin dengan memanaskan cawan porselen diatas bunsen kemudian menuangkan parafin cair kedalam cawan porselen. Organ yang berada dalam cawan porselen didiamkan sampai membeku kemudian direndam dalam air selama 1 jam dan disimpan kedalam lemari es selama 12 jam. Organ yang berada dalam parafin yang sudah membeku selanjutnya dikeluarkan dari cawan dan blok parafin dan dilakukan pemotongan sesuai kelompok organ, potongan dibuat 2 x 2 cm. Potongan blok parafin diletakkan pada permukaan blok kayu, ditulis kode organ dan tempat penjepit pada mikrotom. Kemudian potongan organ yang ditanam pada blok parafin dan diletakkan pada kaset dilakukan pemotongan menjadi sayatan tipis menggunakan mikrotom dengan ukuran ketebalan sebesar 3 – 5 μ m. Potongan diambil dengan pinset dan dimasukkan kedalam bak berisi air hangat dengan suhu 56 – 58°C, selanjutnya diambil dengan objek glass. Preparat dikeringkan dalam ruang terbuka atau disimpan didalam inkubator dengan suhu \pm 37°C selama semalam kemudian dilanjutkan proses pewarnaan. Proses pewarnaan dilakukan dengan menggunakan hematoxilin eosin. Bejana nomor 1 dan bejana nomor 2 masing – masing diisi dengan xylol 100%, bejana nomor 3 dan bejana nomor 4 diisi dengan etanol absolut, bejana nomor 5 diisi dengan etanol 90%, bejana nomor 6 diisi dengan etanol 80%, dan bejana nomor 7 diisi dengan etanol 70%. Waktu diatur sesuai dengan bejana masing - masing. Preparat histopatologi ditempatkan pada keranjang khusus, dan melakukan perendaman pada bejana 1 dan 2 untuk

proses deparafinasi masing – masing 12 menit sambil menggoyangkan bejana, perendaman preparat dalam etanol absolut I dan II tiap preparat dilakukan selama 5 menit untuk dilakukannya proses dehidrasi, kemudian memindahkan kedalam etanol 90%, 80%, dan 70% dengan waktu selama 5 menit. Kemudian masukkan pada air mengalir selama 12 menit, dilakukan perendaman pada larutan Hematoksilin Mayer selama 5 menit, dan pencucian melalui air mengalir selama 2 x 12 menit. Pewarnaan menggunakan eosin 0,25% selama 12 menit dan dilakukan pencucian melalui air mengalir selama 5 menit. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan cara mencelupkan etanol 70% sebanyak 8 kali, dilanjutkan memasukkan ke dalam etanol 80% dan 90%, dan etanol absolut I dan absolut II tiap preparat selama 10 menit. Terakhir memasukkan ke dalam xylol I, xylol II, dan xylol III tiap preparat selama 12 menit. Kaca obyek ditutup menggunakan kaca penutup menggunakan perekat eukit. Selanjutnya dilakukan pengamatan preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x (BPOM, 2022).

10. Pemusnahan Hewan Uji

Hewan uji setelah selesai dilakukan percobaan dimusnahkan dengan cara penguburan. Pada metode ini semua bangkai dikubur pada kedalaman yang aman dari risiko penggalian oleh hewan lainnya pada sekitar lokasi penguburan (BPOM, 2022)

E. Alur Penelitian



Gambar 7 Alur Penelitian

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS. Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini untuk menentukan skor kerusakan jaringan otak dan pankreas hewan uji. Data dianalisis menggunakan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* dan uji homogenitas menggunakan uji *Homogeneity of Variance Test*. Data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan data tidak terdistribusi tidak normal ($p < 0,05$). Analisa hasil data yang terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Dilanjutkan dengan uji post hoc Tukey untuk menentukan kelompok yang signifikan terhadap kelompok kontrol. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok hewan uji dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.