

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian uji toksisitas akut ini yaitu minyak atsiri yang didapat dari biji pala (*Myristica fragrans* H.) yang diperoleh dari daerah Jawa Barat. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji pala yang diperoleh dari daerah Jawa Barat dan diambil secara acak dengan cara memilih biji pala yang masih segar.

B. Variabel Penelitian

1. Indikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah minyak pala. Variabel kedua adalah dosis minyak atsiri pada tikus putih jantan. Variabel ketiga adalah efek racun dari minyak atsiri pala. Variabel keempat adalah tikus putih jantan (*Mus musculus*).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini berisi pengenalan dari semua variabel yang diperiksa secara langsung. Variabel utama yang diidentifikasi sebelumnya dapat diklasifikasikan ke dalam variabel yang berbeda, yaitu variabel independen, variabel dependen, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah sesuatu yang dapat diubah-ubah untuk mempelajari pengaruh suatu perlakuan terhadap variabel tergantung. Pada penelitian variabel bebasnya adalah dosis minyak atsiri biji pala.

Variabel tergantung dapat diartikan sebagai titik permasalahan yang merupakan kriteria peneliti. Pada penelitian ini variabel tergantungnya adalah pengaruh pemberian minyak atsiri biji pala dan efek toksik terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

Variabel terkontrol dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar memperoleh hasil yang tidak tersebar dan dapat dilakukan dengan cepat dan tepat oleh peneliti lain. Pada penelitian ini variabel terkendalinya adalah minyak atsiri biji pala, kondisi fisik hewan uji meliputi galur, jenis kelamin, usia, berat badan, dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji pala diambil dari tanaman pala di daerah Jawa Barat, dengan ciri-ciri segar, tidak busuk, dan bebas dari hama.

Kedua, minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* H.) adalah minyak atsiri yang dihasilkan dari proses destilasi uap dan di uji senyawa kimia menggunakan GC-MS.

Ketiga, hewan uji adalah hewan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit putih jantan.

Keempat, gejala-gejala klinis yang muncul pada hewan uji toksisik akut adalah perubahan perilaku grooming, piloereksi, profil neurogikal, perubahan pernafasan, gastrointestinal, dan profil autonomik.

Kelima, *Lethal Dose* 50 (LD_{50}) adalah dosis tertentu yang menyebabkan 50% respon kematian pada populasi hewan uji dalam jangka waktu tertentu.

Keenam, dosis uji toksisitas akut yang digunakan dengan metode *fixed dose* adalah minyak atsiri biji pala dosis 5, 50, 300, 2000, 5000 mg/KgBB yang diberikan pada hewan uji dengan mengkonversi dosis yang sesuai hewan yang digunakan yaitu mencit.

Ketujuh, pengamatan berat badan dengan cara menimbang berat badan mencit sesaat sebelum diberikan perlakuan dan selama 14 hari setelah diberi perlakuan.

Kedelapan, pengamatan makropatologi yang merupakan pengamatan makroskopik terhadap organ sasaran yaitu, lambung, paru-paru, jantung, hati dan ginjal hewan uji yang dibandingkan dengan kelompok plasebo. Pemeriksaan makropatologi dilakukan dengan kasat mata untuk melihat pengaruh makropatologi dari pemberian minyak atsiri biji pala terhadap organ hewan uji.

Kesembilan, pengamatan indeks organ dilakukan dengan cara menimbang berat badan mencit. Organ sasaran yang diamati meliputi lambung, paru-paru, jantung, hati dan ginjal sehingga indeks organ mencit dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ indeks organ} : \frac{\text{Berat organ mencit}}{\text{Berat badan mencit}} \times 100$$

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah minyak atsiri biji pala *Myristica fragrans* H.), mencit putih jantan dengan usia 30-120 hari dan berat badan sekitar 20-30 gram, CMC 0,5% sebagai kelompok plasebo.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini destilasi uap, erlenmayer, GC-MS, spuit oral, kandang mencit, ram kawat, timbangan digital, skapel, gunting, kertas label, papan bedah, spuit 1 cc, mikropipet, nampan, objek glass, beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur, stopwatch, termometer, labu ukur, dan pipet volume.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi berfungsi untuk memastikan kebenaran simplisia yang digunakan sebagai bahan baku penelitian baik dilakukan pengamatan secara mikroskopis maupun makroskopis dengan mengacu pada data pustaka terpercaya dan valid. Proses identifikasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar, Jawa tengah.

2. Pengambilan bahan

Sampel tanaman pala diperoleh dari wilayah Bogor, Jawa Barat. Tanaman pala yang masih segar dan tidak busuk serta bebas dari hama, kemudian sampel disortir dan ditimbang sebanyak 35 kg lalu dicuci menggunakan air yang mengalir (Kemenkes, 2017).

3. Destilasi minyak atsiri

Destilasi minyak atsiri biji pala dilakukan di B2P2TOOT, Tawangmangu, Jawa tengah. Proses destilasi dilakukan untuk memperoleh minyak atsiri dengan menggunakan metode destilasi uap. Langkah pertama, menyiapkan alat dan bahan serta menyiapkan rangkaian set alat destilasi uap. Rangkaian alat destilasi uap sendiri terdiri dari ketel air, kondensor, konektor, ketel penampung simplisia, dan teko aluminium yang digunakan sebagai tempat menampung hasil destilasi (minyak atsiri). Langkah kedua, memasukkan air pada ketel air hingga $\frac{3}{4}$ bagian ketel, kemudian gilingan kasar biji pala dimasukkan kedalam ketel penampung simplisia. Lalu ketel dipanaskan dega menggunakan kompor gas. Proses destilasi dilakukan selama 4 jam dihitung mulai dari tetesan kondensat pertama (Yuliarto dkk., 2012).

Prinsip metode destilasi uap yaitu menguapkan air dalam ketel menjadi uap yang akan masuk kedalam ketel yang berisi gilingan kasar biji pala. Kemudian dilakukan proses pendinginan dengan kondensor terhadap uap yang membawa minyak atsiri dalam biji pala. Uap yang

masih dalam keadaan panas tersebut akan memasuki pipa spiral yang berada di dalam kondensor selanjutnya pada bagian luar kondensor dialiri air dingin sehingga uap panas berubah menjadi dingin.

Kondensat atau uap air dingin yang keluar dari kondensor ini masih berupa campuran air dan minyak maka dari itu perlu dilakukan pemisahan sehingga didapatkan minyak atsiri biji pala. Pemisahan air dan minyak atsiri dilakukan dengan menampung kondensat, kemudian dipisahkan menggunakan corong pisah.

4. Analisis minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptis. Pengamatan organoleptik pada minyak atsiri meliputi warna, aroma, bentuk dan rasa minyak. Hasil destilasi minyak atsiri kemudian dimasukkan ke dalam wadah berbahan kaca yang bersih dan bening kemudian dilakukan pengamatan pada warna dan kejernihan minyak atsiri. Bau dan rasa minyak atsiri haruslah sesuai dengan tanaman asalnya (Gunawan, 2004).

4.2 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri dilakukan seperti identifikasi minyak atsiri pada umumnya. Pertama, teteskan minyak atsiri pada permukaan air, minyak atsiri akan menyebar dan permukaan air akan tampak jernih dan tidak keruh. Kedua, teteskan 1 tetes minyak atsiri pada kertas saring dan diamkan beberapa menit. Minyak atsiri akan terbukti murni jika minyak yang ditetaskan menguap dengan sempurna tanpa meninggalkan noda (Guenther, 1990).

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Penetapan indeks bias ditetapkan dengan alat refractometer dan diulang minimal sebanyak tiga kali percobaan. Awalnya bagian prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol. Refraktrometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, kemudian catat suhu ruang tempat bekerja lalu teteskan cairan minyak atsiri yang diukur pada prisma dan kemudian alat ditutup kembali. Gerakan pemutar di bagian sebelah kanan alat kemudian atur sehingga batas gelap dan terang tepat pada garis. Skala yang ada pada alat kemudian dicatat sebagai indeks biasnya (Guenther 1987).

4.4 Uji kelarutan dalam etanol. Sebanyak 1 ml minyak atsiri biji pala dipipet ke dalam gelas ukur 10 ml, ditambahkan etanol 90% dengan cara bertahap. Pada setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya (SNI, 2006).

4.5 Uji kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri daun beluntas

menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dilengkapi dengan Capillary Column DB-5 5% Phenyl Methyl Siloxane (diameter dalam 250 μm , panjang 60 m, dan ketebalan film 0.25 μm) dan detektor yang digunakan FID. Kondisi GC: suhu pada oven 80°C, suhu pada injector 200°C, suhu pada detector 230°C. Gas pembawa helium dengan kecepatan aliran 1 ml/menit. Waktu retensi 40 menit, dan mass range 40-400m/z (Pitpiangchan, 2009).

5. Penetapan dosis

Penetapan dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis minyak atsiri biji pala dipilih berdasarkan tingkat *fixed dose*, yaitu 5 mg/KgBB, 50 mg/KgBB, 300 mg/KgBB, 2000 mg/KgBB dan 5000 mg/KgBB yang diharapkan akan memberikan efek toksik pada hewan uji.

6. Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan CMC 0,5% dibuat dengan cara menimbang serbuk CMC sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dalam aquadest panas 100 mL sambil diaduk hingga homogen. Sediaan minyak atsiri biji pala dibuat dengan cara minyak atsiri biji pala yang telah ditimbang lalu disuspensikan dengan CMC 0,5% pada volume ad 100 mL sampai homogen.

7. Penyiapan hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) dalam keadaan sehat berumur 2-3 bulan sebanyak 30 ekor dengan bobot badan 20-30 gram. Dimana hewan uji telah di aklimatisasi terlebih dahulu selama kurang lebih 7 hari supaya dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan selama proses adaptasi dilakukan, pengamatan kondisi umum serta penimbangan berat badan dilakukan setiap harinya.

8. Pengelompokan hewan uji

Pada penelitian ini hewan uji dibagi menjadi lima kelompok perlakuan terdapat sebanyak 30 ekor mencit putih jantan. Dimana pembagian kelompok menjadi lima bagian secara acak yaitu satu kelompok plasebo dan empat kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok uji terdiri atas lima ekor mencit putih jantan.

Kelompok I : Diberi larutan CMC 0,5% (kelompok plasebo).

Kelompok II : Diberi sediaan minyak atsiri biji pala dengan dosis 5 mg/kg BB.

Kelompok III : Diberi sediaan minyak atsiri biji pala dengan dosis 50 mg/kg BB.

Kelompok IV : Diberi sediaan minyak atsiri biji pala dengan dosis 300 mg/kg BB.

Kelompok V : Diberi sediaan minyak atsiri biji pala dengan dosis 2000 mg/kg BB.

Kelompok VI : Diberi sediaan minyak atsiri biji pala dengan dosis 5000 mg/kg BB.

9. Pemberian sediaan uji dan volume pemberian

Sebelum dilakukannya perlakuan terhadap hewan uji, mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 3-4 jam tetapi boleh diberi air minum. Kemudian hewan uji ditimbang untuk menentukan volume pemberian pada hewan uji. Sediaan uji diberikan dosis tunggal pada hewan uji secara oral dengan menggunakan alat sonde oral. Setelah perlakuan pada hewan uji, mencit dapat diberikan makan sekitar 1-2 jam kemudian. Jika pemberian sediaan uji berulang, pakan dapat diberikan setelah perlakuan tergantung pada lama pemberian sediaan uji.

10. Pengamatan hewan uji

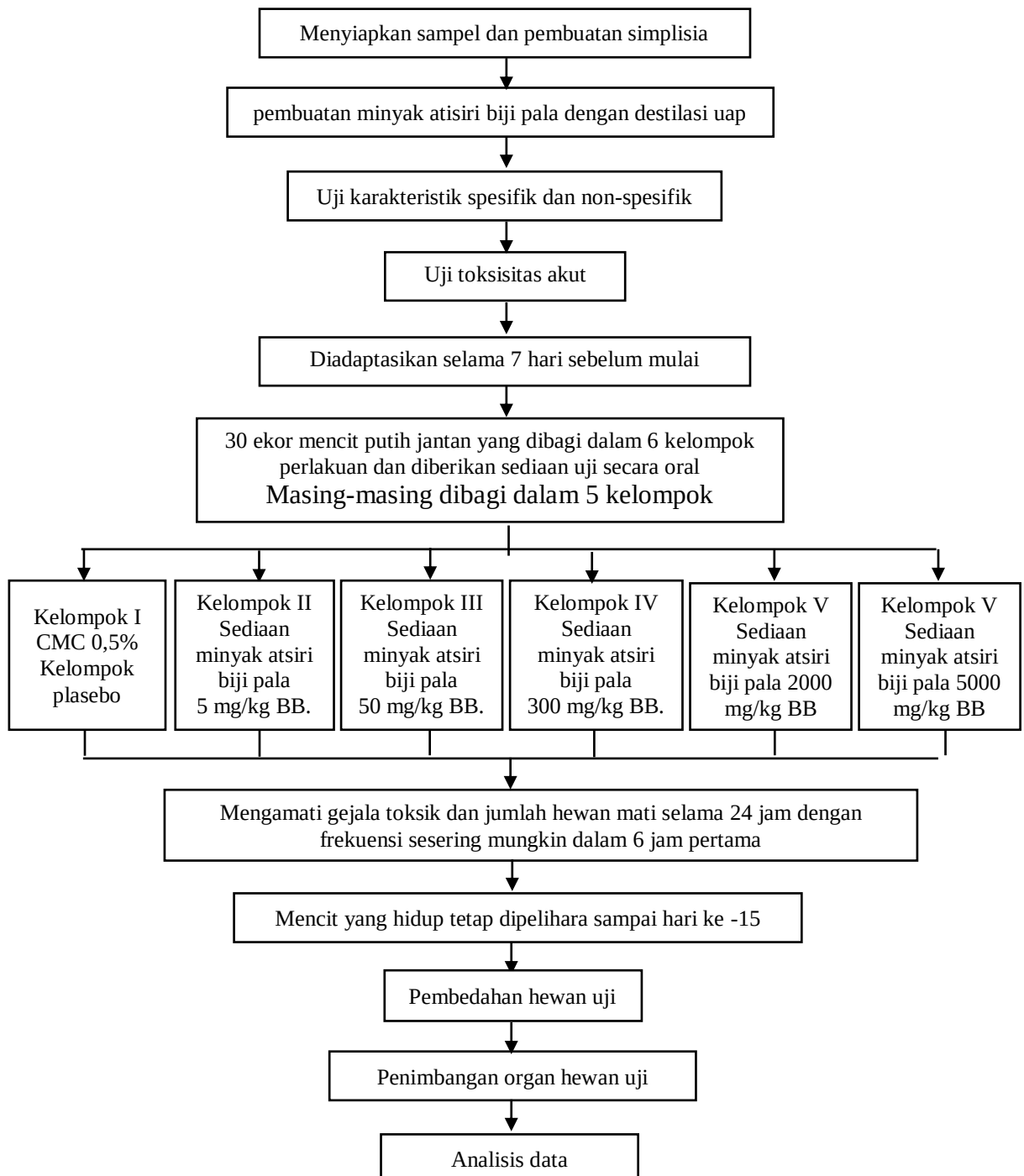
Hewan uji diamati selama 30 menit. Pertama, setelah pemberian produk uji setiap 4 jam selama 24 jam pertama dan kemudian sehari sekali selama 14 hari. Durasi pengamatan dapat bervariasi tergantung pada respon toksik dari hewan uji dan waktu onset dan pemulihan. Waktu munculnya atau hilangnya gejala toksisitas harus dicatat secara sistematis dalam catatan individu untuk setiap hewan. Pengamatan tambahan diperlukan jika hewan menunjukkan gejala toksik yang persisten. Pengamatan yang diamati meliputi piloereksi, kejang, salivasi, pernapasan abnormal, tremor, kejang, diare, lemas, dan koma. Hewan yang sekarat atau tampak kesakitan harus ditidurkan. Dalam kasus hewan laboratorium yang mati, waktu kematiannya harus dicatat. Saat mengamati perilaku hewan laboratorium, jalan mundur, jalan tengkurap, dan berat badan diperhitungkan. Berat hewan uji diperiksa sebelum pengujian dan minimal satu minggu setelahnya, perubahan berat badan dianalisis. Pada akhir penelitian, hewan yang masih hidup ditimbang dan kemudian dilakukan dislokasi leher.

11. Pengamatan makropatologi organ

Pada penelitian ini hewan uji mencit putih jantan yang telah dikorbankan dilakukan pengamatan organ secara makroskopik dan penimbangan bobot organ meliputi lambung, paru-paru, jantung, hati

dan ginjal. Indeks organ dari kelompok perlakuan dan kontrol plasebo dalam persen dihitung melalui perbandingan bobot organ dan bobot badan. Lambung, paru-paru, jantung, hepar, dan ginjal diamati secara makroskopik dibandingkan terhadap kelompok plasebo.

E. Skema Alur Penelitian



F. Analisis Hasil

Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan menggunakan SPSS. Analisis pertama dilakukan dengan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, kemudian dilakukan uji homogenitas dengan Levene jika data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan analisis varians one way *ANOVA* untuk mengetahui hubungan antar perlakuan, jika terdapat perbedaan yang signifikan maka uji dilanjutkan menggunakan *post hoc*. Ketika data tidak berdistribusi normal maka digunakan *post hoc* Dunnett's T3, namun jika data berdistribusi normal digunakan *post hoc* Tukey.