

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian uji toksisitas subkronis adalah isolat miristisin biji pala. Sampel yang digunakan sebanyak 42 g isolat miristisin dari minyak atsiri pala hasil penelitian sebelumnya (Ansory *et al.*, 2020).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah 3 variasi dosis miristisin. Variabel utama kedua yaitu gejala klinis, berat organ hewan uji, pengamatan makropatologi, dan pemeriksaan histopatologi organ jantung dan hati. Variabel utama ketiga yaitu tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini terdiri dari beberapa macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas yaitu variabel yang tidak tergantung dengan variabel lain dimana dapat diubah-ubah untuk mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi dosis isolat miristisin dari biji pala dengan dosis 2,1; 27,3 dan 354,9 mg/kg BB tikus.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung diukur untuk mengetahui efek yang disebabkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah uji toksisitas subkronis oral 28 hari untuk mengetahui gejala toksik, berat organ hewan uji, pengamatan makropatologi, dan pemeriksaan histopatologi pada organ jantung dan hati tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang dijaga agar tetap konstan untuk meminimalisir adanya pengaruh variabel lain yang dapat mempengaruhi hasil variabel terikat. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu kondisi sampel, waktu pengamatan, ruangan, kandang, dan jenis kelamin tikus.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, isolat senyawa miristisin adalah hasil isolasi miristisin menggunakan metode destilasi fraksinasi pengurangan tekanan dengan kemurnian 92,13% (Ansory *et al.*, 2020).

Kedua, hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar sehat baik jantan maupun betina yang tidak sedang bunting, dengan usia 6-8 minggu serta memiliki berat badan sekitar 120-200 g yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketiga, uji toksisitas subkronis merupakan uji untuk mendeteksi efek toksik yang terjadi pada hewan uji setelah pemberian suatu sediaan yang diberikan dalam dosis berulang selama 14 hari, 28 hari atau 90 hari.

Keempat, gejala toksik adalah perubahan yang tidak diinginkan atau berbahaya akibat paparan zat tertentu.

Kelima, pengamatan makropatologi adalah suatu pengamatan yang dilakukan secara kasat mata yang dilakukan tanpa menggunakan kaca pembesar.

Keenam, pemeriksaan histopatologi adalah suatu pemeriksaan organ yang diperoleh setelah pembedahan dan diamati menggunakan mikroskop.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah miristisin dengan kemurnian 92,13% dari hasil isolasi penelitian (Ansory *et al.*, 2020); pelarut propilen glikol; *aquadest*; pelet; preparat histopatologi jantung dan limpa menggunakan larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10%; etanol 70%; etanol 80%; etanol 90%; etanol absolut; *xylol*; parafin cair; kristal CuSO_4 ; larutan Hematoksin Eosin.

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu kandang tikus, timbangan, spuit oral, spuit injeksi, termometer, *stopwatch*, labu tentukur, gelas ukur, pipet tetes, pisau, pinset, botol fiksasi, lemari pemanas, kantong kasa, objek glass, *cover glass*, mikrotom, mikroskop binokuler, *tissue cassette*, alat dehidrasi otomatis, wadah proses dehidrasi.

3. Hewan uji

Hewan uji digunakan dalam penelitian ini adalah 70 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang dibagi menjadi 7 kelompok masing-masing 5 jantan dan betina meliputi kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif, kelompok dosis 2,1 mg/Kg BB tikus, dosis 27,3 mg/Kg BB tikus, dosis 354,9 mg/Kg BB tikus, satelit kontrol normal dan satelit dosis 354,9 mg/Kg BB tikus. Hewan uji yang digunakan sehat baik jantan maupun betina yang tidak sedang bunting, dengan usia 6-8 minggu serta berat badan sekitar 120-200 g.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan larutan uji senyawa miristisin

Dibuat larutan stok 0,02% untuk digunakan sebagai dosis 1 dengan menimbang 0,02 g isolat miristisin dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan ditambahkan pelarut propilen glikol hingga tanda batas. Dibuat larutan stok 0,2% untuk digunakan sebagai dosis 2 dengan menimbang 0,2 g isolat miristisin dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan ditambahkan pelarut propilen glikol hingga tanda batas. Dibuat larutan stok 2% untuk digunakan sebagai dosis 3 dengan menimbang 2 g isolat miristisin dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan ditambahkan pelarut propilen glikol hingga tanda batas.

2. Penetapan dosis dan lama pemberian

Penetapan dosis terendah miristisin mengacu pada dosis efektif miristisin 3 mg/kg BB mencit sebagai antidepresan (Prajindra, 2021). Dibuat 3 variasi dosis yaitu 3; 39 dan 507 mg/kg BB mencit dengan mempertimbangkan dosis batas uji. Dosis tersebut kemudian dikonversi menjadi 2,1; 27,3 dan 354,9 mg/kg BB tikus dengan volume maksimal pemberian hewan uji tikus 5 mL per oral dengan pemberian setiap hari selama 28 hari (Peraturan BPOM, 2022).

3. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah 70 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar sehat baik jantan maupun betina yang tidak sedang bunting dan belum pernah beranak dengan usia 6-8 minggu seberat 120-200 g. Hewan uji diaklimatisasi selama seminggu terhadap lingkungan, dan hewan uji jantan dan betina ditempatkan pada kandang yang terpisah untuk meminimalkan hewan uji betina yang bunting, serta setiap hewan uji harus ditimbang dan diberi tanda (Peraturan BPOM, 2022).

4. Pengelompokan hewan uji

Hewan uji penelitian ini berjumlah 70 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok pertama adalah kelompok kontrol (tidak mendapat perlakuan); kelompok kedua adalah kelompok yang mendapat perlakuan dosis 2,1 mg/kg BB tikus; kelompok ketiga adalah kelompok yang mendapat perlakuan dosis 27,3 mg/kg BB tikus; kelompok keempat adalah kelompok yang mendapat perlakuan dosis 354,9 mg/kg BB tikus; kelompok kelima adalah kelompok kontrol negatif yang mendapat perlakuan propilen glikol; kelompok keenam adalah kelompok satelit kontrol (tidak mendapatkan perlakuan); kelompok ketujuh adalah kelompok satelit yang mendapat perlakuan dosis tertinggi dengan dosis 354,9 mg/kg BB tikus. Setiap kelompok hewan uji terdiri dari 5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina dan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak lebih 20% dari rata-rata berat badan (Peraturan BPOM, 2022).

5. Pengamatan gejala klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan sebelum dan setelah pemberian perlakuan terhadap hewan uji untuk mengetahui perubahan gejala dengan cara diamati setiap hari selama 28 hari berupa grooming, piloereksi, dispnea, asthenia, konvulsi, lakrimasi, paralisis, dan edema. Pada kelompok satelit pengamatan lanjutan dilakukan selama 14 hari kemudian dan dilihat apakah terjadi proses penyembuhan dari pengaruh toksik sebelumnya (Peraturan BPOM, 2022).

6. Monitoring konsumsi pakan dan berat badan

Hewan uji ditimbang setiap hari untuk mengetahui berat badan sebelum diberi perlakuan dan diukur jumlah asupan pakan dan minum hewan uji yang diberikan. Berat badan ini digunakan dalam pemilihan volume pemberian yang akan diberikan kepada hewan uji. (Peraturan BPOM, 2022).

7. Pengamatan makropatologi

Pengamatan makropatologi dilakukan setelah euthanasia dengan dislokasi pada leher tikus. Dilakukan nekropsi dengan mengambil organ jantung dan limpa hewan uji pada setiap kelompok perlakuan di hari terakhir yaitu hari ke-29 dan hari ke-43. Pengamatan makropatologi dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna, konsistensi, dan

permukaan organ dengan membandingkan kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok kontrol normal (Peraturan BPOM, 2022).

8. Penimbangan organ

Penimbangan organ jantung dan limpa dilakukan pada hari terakhir perlakuan yaitu hari ke-28 dan hari ke-42 pada tikus yang telah dinekropsi dikeringkan dengan kertas penyerap dan dilakukan penimbangan organ pada setiap kelompok untuk mendapatkan bobot organ. Bobot organ relatif diperoleh dengan membagi bobot organ absolut dengan bobot badan. Hasil bobot organ relatif yang didapat tiap kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol normal (Peraturan BPOM, 2022).

9. Pembuatan preparat histopatologi

Organ jantung dan limpa yang telah dinekropsi diambil dan dipotong dengan ukuran 1 cm³ kemudian dilakukan fiksasi pertama dengan merendam di dalam larutan dapar formalin/*Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% ditutup dengan baik serta dibiarkan selama 24-48 jam pada suhu kamar (25°C). Dilakukan penomoran tanggal nekropsi dan kode hewan pada botol (Peraturan BPOM, 2022). Dibuang formalin dari botol lalu dipotong spesifik/*trimming* dan dimasukkan ke dalam satu *tissue cassette*. Pada fiksasi kedua tissue dimasukkan ke dalam botol berisi larutan dapar formalin untuk di fiksasi selama 3 jam (Peraturan BPOM, 2022).

Dilakukan proses dehidrasi dengan masing-masing bejana diisi larutan etanol 70% (nomor 1); 80% (nomor 2); 90% (nomor 3); etanol absolut I (nomor 4); etanol absolut II (nomor 5); xilen I (nomor 6); xilen II (nomor 7), paraplast (nomor 8) dimana lamanya perendaman diatur pada bejana nomor 1-6 diatur selama 1,5 jam; bejana nomor 7 selama 1,5 jam; bejana nomor 8 selama 6 jam (Peraturan BPOM, 2022). Dilakukan proses infiltrasi pada organ jantung dan limpa dimana sebanyak 3 buah bejana I, II, III berisi parafin cair yang berukuran 1 L dan suhunya dipertahankan 56-58°C dalam lemari pemanas selama 60 menit (Peraturan BPOM, 2022).

Dibuat sediaan blok menggunakan alat *paraffin embedding console* dimana organ jantung dan limpa yang direndam parafin cair segera dimasukkan ke dalam cawan porselin yang telah berisi parafin cair permukaan organ yang akan dipotong ditempelkan pada cawan porselin dan dibiarkan membeku kemudian cawan direndam dalam air kira-kira 60 menit lalu disimpan di dalam lemari es selama 12 jam,

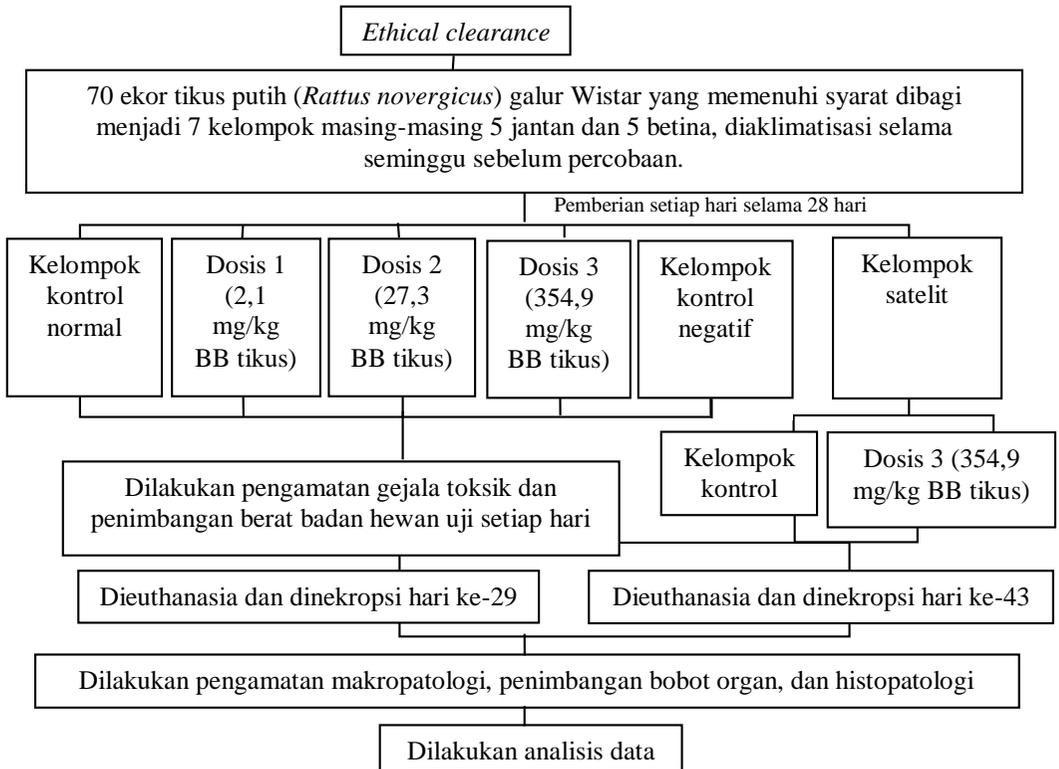
setelah itu dikeluarkan dan dipotong dengan ukuran 2 x 2 cm kemudian dilekatkan pada permukaan blok. Ditempelkan 4 potongan blok parafin pada 4 permukaan yang licin kemudian 2 permukaan kayu yang kasar untuk menulis kode dan tempat penjepit pada mikrotom. Dilakukan pemotongan tipis organ menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 μm kemudian diambil dengan pinset, dimasukkan ke dalam bak yang berisi air hangat dengan suhu 56-58 $^{\circ}\text{C}$ dan segera diambil menggunakan kaca objek dengan menghindari lipatan/kerutan pada pita parafin. Preparat selanjutnya dikeringkan dengan cara disimpan dalam ruang terbuka suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) atau disimpan dalam incubator ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) selama semalam (Peraturan BPOM, 2022).

Dilakukan pewarnaan menggunakan Hematoksilin Eosin dengan cara preparat histopatologi direndam di dalam bejana nomor 1 dan 2 yang berisi xilen 100% selama 12 menit sambil digoyang, kemudian direndam preparat pada bejana nomor 3 dan 4 yang berisi etanol absolut 5 menit; dipindahkan ke bejana nomor 5 (etanol 90%), nomor 6 (etanol 80%) dan nomor 7 (etanol 70%) 5 menit; dialiri air 12 menit; direndam larutan Hematoksilin Mayer 5 menit; dialiri air 2 x 12 menit; diwarnai dengan eosin 0,25% 12 menit; dialiri air 5 menit. Dichelupkan etanol 70% 8 kali, dimasukkan etanol 80, 90% dan etanol absolut I dan II 10 menit. Dimasukkan xilen I, II, III selama 12 menit. Ditutup kaca objek dengan perekat eukit. Diamati di mikroskop dengan perbesaran 400x. Tampak inti sel biru kelabu dan sitoplasma merah muda (Peraturan BPOM, 2022).

10. Pemeriksaan histopatologi

Dilakukan pemeriksaan kerusakan jantung dengan menilai kondisi sel jantung. Penilaian nekrosis menggunakan kriteria Dallas dengan melihat adanya infiltrasi sel radang dan nekrosis (Mustofa *et al.*, 2021). Dilakukan pemeriksaan kerusakan limpa dengan menilai persen nekrosis (Ma'shum, 2020).

E. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian uji toksisitas subkronis miristisin terhadap jantung dan limpa tikus putih.

F. Analisis Data

Data kuantitatif pada penelitian ini yang diperoleh dari skor kerusakan jantung dan limpa pada tikus putih dianalisis dengan diuji normalitasnya menggunakan Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) artinya data dianggap tidak terdistribusi normal dan sebaliknya, dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji Homogeneity of Variances dianggap homogen jika ($p > 0,05$). Apabila data terdistribusi normal dilakukan uji menggunakan one way ANOVA jika ($p > 0,05$) maka rata-rata sama dan dilakukan uji untuk menentukan kelompok mana yang paling signifikan terhadap kelompok kontrol menggunakan uji Post Hoc, Bonferroni untuk data yang normal dan homogen sedangkan untuk data yang normal tetapi tidak homogen menggunakan uji Post Hoc, Games-Howell dengan dilihat hasil signifikan ($> 0,05$) tidak berbeda signifikan.