

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test with control group design*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Desember 2017. Tempat penelitian untuk pemeliharaan hewan coba, induksi sodium nitrit dan pemberian obat, terminasi dan perfusi dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia (FK UII). Pembuatan blok parafin, pemotongan sediaan preparat, dan pengecatan Hematoksilin Eosin dilakukan di Laboratorium Riset FK UII. Pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UII.

3.3. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* jantan dari galur *Wistar* yang dikembangkan oleh Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusi subjek penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* jantan, berumur 3-4 bulan dengan berat badan 150-250 gram dari galur *Wistar*. Kriteria eksklusi dari penelitian ini ialah tikus yang sakit dan mati selama dilaksanakannya penelitian.

Tikus dibagi secara random menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus (n=6). Pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol (K) : sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari
2. Kelompok perlakuan 1 (P1) : sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari + propolis 100 mg/kgBB/hari
3. Kelompok perlakuan 2 (P2) : sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari + propolis 200 mg/kgBB/hari

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini gambaran histopatologis hepar.

3.4.2. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah propolis dengan dosis 100 mg/kgBB/hari dan 200 mg/kgBB/hari yang diberikan selama 60 hari.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Propolis

Propolis adalah bahan yang diproduksi oleh lebah dari substansi resin pada kulit kayu serta pucuk-pucuk tanaman dan dicampurkan dengan enzim dalam air liur lebah kemudian digunakan untuk memperkuat dan melindungi sarangnya. Propolis yang digunakan ialah produk propolis komersil yang dijual bebas di apotek dengan merek Melia Propolis® dimana 1 ml mengandung 600 mg propolis. Propolis diberikan secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 100 dan 200mg/kgbb (modifikasi Ichwan, 2016).

3.5.2. Gambaran histopatologis hepar

Gambaran histopatologis hepar adalah dihitung jumlah sel hepatosit yang sehat dan dibandingkan dengan jumlah sel hepatosit yang mengalami degenerasi serta nekrosis pada sepuluh lapang pandang dengan vena sentralis berada ditengah-tengah lapang pandang yang diamati dengan perbesaran 400x pada mikroskop cahaya. Degenerasi adalah kerusakan sel yang bersifat *reversible*, dengan gambaran sel hepatosit terlihat membesar, sitoplasma jernih granular dapat ditemukan vakuolisasi pada sitoplasma, inti terletak di tengah dan masih normokromatik. Nekrosis adalah kerusakan sel yang bersifat *irreversible*, dengan gambaran inti mengalami penyusutan, berbatas tidak tegas, menjadi berwarna gelap yang disebut dengan piknosis, atau inti akan terpecah dan menimbulkan fragmen-fragmen zat kromatin yang tersebar dalam sel yang disebut karioreksis. Inti sel selanjutnya dapat kehilangan kemampuan untuk diwarnai sehingga tampak tidak memiliki inti yang disebut dengan kariolisis. Gambaran

histopatologis dinilai dengan skoring Brunt *et al* (1999) sebagai berikut.

Tabel 3. Skor penilaian derajat histopatologi hepatosit

	Degenerasi	Nekrosis
None	0	0
Minimal (0-25%)	1	1
Mild (25-50%)	2	2
Moderate (50-75%)	3	3
Severe (75-100%)	4	4

3.5.3. Induksi sodium nitrit

Induksi Sodium nitrit adalah pemberian 50mg/KgBB/hari larutan sodium nitrit peroral menggunakan sonde dengan frekuensi pemberian satu kali sehari selama 60 hari berturut-turut (modifikasi Cholil, 2016).

3.6. Instrumen Penelitian

3.6.1. Alat penelitian

- a. Kandang untuk pengelompokan tikus
- b. Sduit sonde
- c. Alat bedah minor
- d. Kaca obyek
- e. Kaca penutup
- f. Mikroskop cahaya terhubung kamera optilab
- g. Alat pembuatan blok parafin, pembuatan slide dan alat pengecatan Hematoksilin Eosin
- h. *Infus set*

3.6.2. Bahan penelitian

- a. Bahan uji propolis yang diperoleh dari apotek yang dijual bebas
- b. Sodium nitrit
- c. Zat pewarna Hematoksilin Eosin (HE)

- d. Ketamine
- e. Aquades
- f. Bahan untuk pembuatan blok parafin

3.7. Alur Penelitian

3.7.1. Adaptasi dan pemeliharaan hewan coba

Hewan coba dipelihara di tiga kandang berukuran (40x20x20) cm³. Dalam satu kandang berisi satu kelompok tikus yang terdiri dari 6 tikus. Setiap hari tikus diberi makanan berupa pelet standar untuk tikus dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dalam siklus terang gelap selama 12 jam. Siklus terang dimulai pada pukul 07.00 WIB dan siklus gelap dimulai pukul 19.00 WIB. Persiapan ini memerlukan waktu selama 7 hari sebelum perlakuan.

3.7.2. Pemberian propolis dan sodium nitrit

Pada penelitian ini, induksi hepatotoksisitas yang dipilih ialah sodium nitrit. Pemberian sodium nitrit dilakukan secara peroral dengan sondase sebanyak 50mg/kgBB/hari selama 60 hari dengan frekuensi pemberian satu kali sehari. Sodium nitrit tersebut dapat memberikan efek hepatotoksik pada tikus.

Pada kelompok perlakuan 1 (P1) diberikan propolis dengan dosis 100mg/kgBB/hari dan kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan propolis sebanyak 200mg/kgBB/hari secara peroral dengan sondase. Kelompok kontrol (K) hanya diberikan sodium nitrit saja. Pemberian propolis tersebut dilakukan selama 60 hari. Pada hari ke-61 dilakukan terminasi dan perfusi.

3.7.3. Terminasi, perfusi transkardial, dan pengambilan jaringan

Pada hari ke-61 dilakukan terminasi dan perfusi transkardial. Sebelum terminasi, tikus dianestesi dengan diberikan injeksi intramuskuler ketamine (100 mg/kg). Perfusi transkardial menggunakan larutan NaCl dengan volume 100-200 ml sampai cairan perfusi yang keluar jernih. Setelah perfusi, hepar diseksi dengan hati-hati, diambil sebagian dari lobus sinistra kemudian difiksasi dengan larutan PBs buffer formalin selama 24 jam.

3.7.4. Pembuatan dan pemotongan blok paraffin

Adapun prosedur pembuatan preparat histologi, yaitu:

a. Dehydration

Pada tahap ini dilakukan perendaman dalam alkohol 95% selama 2 jam. Setelah itu, potongan jaringan tersebut direndam dalam alkohol absolut I, II dan III. Masing-masing perendaman dilakukan selama 1 jam.

b. Clearing

Pada tahap *clearing*, dilakukan perendaman potongan jaringan dalam silol I dilanjutkan dengan perendaman dalam silol II dan silol III masing-masing selama 1 jam.

c. Impregnation

Potongan jaringan diletakkan dalam paraffin I kemudian dilanjutkan dengan peletakan pada paraffin II diikuti paraffin III yang masing-masing selama 2 jam.

d. Embedding

Pada tahap ini dilakukan pemasanan *pan* di atas api beberapa saat dan diusap dengan kapas untuk membersihkan sisa-sisa paraffin dalam *pan*. Lalu paraffin cair disiapkan dengan memasukkan cangkir logam dan dimasukan dalam oven dengan suhu 58° C. Kemudian paraffin cair dituangkan ke dalam *pan*, satu per satu jaringan dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar *pan* dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya. Setelah itu, *pan* diapungkan di dalam air. Bila pan telah dingin, paraffin yang berisi jaringan tersebut dilepaskan dari *pan* dengan memasukkan ke dalam suhu 4-6° C beberapa saat. Paraffin yang berisi jaringan lalu dipotong menggunakan kapel hangat sesuai letak jaringan yang ada. Kemudian diletakkan pada balok kayu dan pinggirnya serta ujungnya dibuat sedikit meruncing. Blok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

e. Cutting

Blok paraffin yang telah terbentuk didinginkan terlebih dahulu. Selanjutnya, blok paraffin dipotong kasar lalu dipotong halus dengan ketebalan 4µm yang

dilakukan di ruangan dingin. Setelah pemotongan, dipilih lembaran jaringan yang paling baik, kemudian diapungkan di dalam air dan dilakukan penekanan salah satu sisi lembaran jaringan dengan ujung jarum dan sisi lainnya ditarik menggunakan kuas yang runcing untuk menghilangkan kerutannya. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam wadah *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Lembaran tersebut diambil dengan slide bersih. Selanjutnya slide dikeringkan dengan meletakkan slide pada *hotplate*. Satu blok paraffin diambil satu potongan sebagai sampel kemudian dilakukan pewarnaan HE.

3.7.5. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Pengecatan Hematoksilin Eosin dilakukan dengan mengikuti protokol di Laboratorium Riset FK UII. Protokol tersebut secara singkat dapat dijelaskan sebagai berikut. Gelas obyek yang berisi potongan jaringan dimasukkan dalam staining jar, dilakukan deparafinisasi kemudian dicuci dengan aquadest 2 kali. Selanjutnya, gelas obyek dimasukkan diberi larutan Hematoksilin Eosin 0,1% dan dimasukkan kedalam inkubator selama 1 menit. Gelas obyek tersebut dimasukkan dalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan 100%, kemudian dikeringkan dengan tissue. Gelas obyek yang sudah kering dimasukkan kedalam larutan xylene I, II dan III masing-masing selama 5 menit. Setelah dilakukan pewarnaan, slide ditempatkan diatas kertas tisu pada tempat datar. Slide ditetaskan dengan bahan mounting yaitu Kanada balsam. Kemudian ditutup menggunakan kaca penutup.

3.7.6. Pengamatan preparat

Pemeriksaan histopatologi hepar dilakukan dengan mengamati lesi pada sepuluh lapangan pandang dengan vena sentralis berada ditengah-tengah lapang pandang dengan perbesaran 400x. Tingkat kerusakan pada hepar dinilai menggunakan metode skoring Brunt *et al.*, (1999) berdasarkan persentase terjadinya degenerasi dan nekrosis (tabel 4).

Tabel 4. Skor penilaian derajat histopatologi hepatitis (Brunt *et al.*, 1999)

	Degenerasi	Nekrosis
None	0	0
Minimal (0-25%)	1	1
Mild (25-50%)	2	2
Moderate (50-75%)	3	3
Severe (75-100%)	4	4

3.8 Analisis Data

Data diuji normalitas distribusinya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* serta uji homogenitas dengan *Levene test*. Kemudian, untuk melihat perbedaan rerata skor histopatologis hepar antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, dan kelompok perlakuan 2 digunakan analisa statistik *One Way Anova*, kemudian dilanjutkan dengan *Post hoc test* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan signifikan.

3.9 Etika Penelitian

Sebelum melaksanakan prosedur penelitian di laboratorium, peneliti mengajukan *ethical clearance* pada komite etik FK UII. Peneliti meminta izin kepada laboratorium, yaitu Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia (FK UII), Laboratorium Riset FK UII, serta Laboratorium Parasitologi FK UII. Sebelum dilakukan terminasi pada tikus (*Rattus norvegicus*), tikus dibius terlebih dahulu agar tidak merasa sakit.