BAB III
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen karena pada penelitian ini objek yang diteliti diberi perlakuan dan adanya kontrol sebagai pembanding.

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini sering digunakan jika percobaan bersifat homogen, seperti percobaan dalam laboratorium atau rumah kaca (Nazir, 2003). Secara acak, mencit-mencit dikelompokkan pada 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Banyaknya pengulangan (replikasi) yang dilakukan (Gomez, 1995) yaitu :

$T\ (r-1) \geq 20$

$5\ (r-1) \geq 20$

$r \geq 5$

Keterangan : T = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Hasil perhitungan diatas menunjukkan bahwa pengulangan yang dibutuhkan pada setiap kelompok sebanyak 5 kali atau 5 ekor mencit sehingga jumlah total mencit yang digunakan sebanyak 25 ekor. Setiap mencit diberi nomor (1–25) dan setiap kandang diberi tanda (A–E) untuk menunjukkan kelompok yang berbeda. Setelah itu, randomisasi dilakukan untuk mengelompokkan setiap

mencit sehingga didapatkan kelompok mencit yang akan menempati setiap kandang.

Tabel 3.1. Pengaturan Randomisasi Mencit

1C	2A	3C	4A	5B
6C	7B	8C	9E	10B
11D	12A	13E	14B	15E
16D	17D	18A	19E	20B
21C	22D	23D	24E	25A

Tabel 3.2. Penempatan Mencit pada Setiap Kelompok

Kandang	Perlakuan (konsentrasi bekatul)	No. Mencit				
A	0%	2	4	12	18	25
B	3,3%	5	7	10	14	20
C	6,6%	1	3	6	8	21
D	10%	11	16	17	22	23
E	13,3%	9	13	15	19	24

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian adalah seluruh organ hati mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur Swiss Webster, sedangkan sampelnya adalah gambaran histologi organ hati mencit.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Agustus 2010. Pembuatan pakan berlemak dan pakan dengan tambahan bekatul dilakukan di

Laboratorium Ekologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit dan pemberian perlakuan dilakukan di rumah kaca Kebun Botani FPMIPA UPI. Pembedahan dan pengambilan organ hati dilakukan di Laboratorium Fisiologi FPMIPA UPI. Pembuatan preparat histologi hati dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan FPMIPA UPI.

E. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Aklimasi Mencit

Mencit diaklimasi di rumah kaca Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI selama tujuh hari dengan suhu ruangan rata-rata 23-26°C. Tahap ini bertujuan untuk membuat hewan uji beradaptasi dengan kondisi lingkungan saat percobaan.

Mencit dimasukkan kedalam kandang berukuran 30 × 20 × 12 cm. Setiap kandang berisi satu mencit. Selama aklimasi, mencit hanya diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan sebanyak 6 gram/hari/ekor. Botol minuman diisi ulang apabila air sudah habis dan dibersihkan tiga hari sekali. Kandang dibersihkan dan diganti serbuk gergajinya seminggu sekali.

b. Pembuatan Pakan Berlemak

Pembuatan pakan berlemak diawali dengan mengekstrak 250 g lemak sapi dengan cara memanaskannya di dalam air. Cairan lemak yang terbentuk kemudian

dicampur dengan 1 kg pakan standar laboratorium yang berasal dari PT. Charoen Pokphand Indonesia (no.cp551). Setelah homogen, adonan dibentuk menjadi pelet menggunakan penggilingan daging. Pelet kemudian dikeringkan menggunakan oven.

c. Penentuan Konsentrasi dan Pembuatan Pakan dengan Tambahan Bekatul

Pada penelitian ini, bahan yang diuji adalah bekatul. Konsentrasi bekatul yang digunakan adalah 0%, 3,3%, 6,6%, 10%, dan 13,3% dari banyaknya pakan yang diberikan (6 gram/ekor/hari). Penentuan konsentrasi ini berdasarkan penelitian sebelumnya dimana pemberian serat bekatul sebanyak 10% dari jumlah pakan yang diberikan (Kahlon *et al.*, 1992).

Tabel 3.3. Penentuan Konsentrasi

No.	Kelompok Perlakuan	Konsentrasi Bekatul	Jumlah Bekatul (g/6g/ekor/hari)
1	Kontrol	0%	0
2	I	3,3%	0,2
3	II	6,6%	0,4
4	III	10%	0,6
5	IV	13,3%	0,8

Bekatul disaring kemudian ditimbang sesuai perhitungan diatas. Bekatul dan pakan standar dicampur dengan air hingga menjadi adonan. Adonan ini kemudian digiling menggunakan penggilingan daging hingga membentuk pelet. Pelet kemudian dikeringkan menggunakan oven.

2. Tahap Perlakuan

a. Pemberian Pakan Berlemak

Setelah diaklimasi, mencit diberi pakan berlemak selama tujuh hari (Pradestiawan, 2008). Banyaknya pakan yang diberikan 6 g/hari/ekor. Tahap ini bertujuan untuk meningkatkan kolesterol mencit sehingga mencit mengalami *hiperkolesterolemia*. Penambahan kolesterol sebesar 200 mg tiap 100 g pakan dapat meningkatkan kadar kolesterol serum tikus putih (Iswari 1995). Pada tahap ini mencit diberi air minum biasa.

b. Pemberian Pakan dengan Tambahan Bekatul

Setelah mengalami *hiperkolesterolemia*, mencit diberi pakan dengan tambahan bekatul sesuai konsentrasi yang telah ditentukan selama 14 hari. Pakan ini diberikan sebanyak 6 g/hari/ekor. Selama perlakuan ini mencit diberi air minum biasa.

3. Tahap Pengambilan Organ

Setelah melewati tahap perlakuan, mencit dibedah untuk diambil organ hatinya. Pembedahan dan pengambilan organ dilakukan menggunakan alat-alat bedah dan dilakukan dengan hati-hati agar organ yang akan diambil tidak rusak. Organ hati kemudian dicuci dengan larutan garam fisiologis. Setelah dicuci, organ hati dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan formalin 4% untuk proses pengawetan dan fiksasi.

4. Tahap Pembuatan Preparat Histologi Hati

Organ hati yang telah difiksasi kemudian dibuat preparat histologinya. Terdapat dua metode pembuatan preparat yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode beku (*freezing microtome*) dengan pewarnaan *Sculthz-Smith* dan metode parafin dengan pewarnaan *Hematoxylin Erlich-Eosin*.

Metode beku (*freezing microtome*) adalah salah satu cara membuat preparat irisan dengan cara membekukan jaringan sehingga keras dan mudah diiris. Kelebihan dari metode ini adalah prosesnya cepat, jaringan hanya sedikit mengerut dibandingkan dengan metode parafin, dan hampir setiap metode pewarnaan dapat dikerjakan bila menggunakan metode ini. Tetapi kekurangannya adalah sulit untuk mendapatkan irisan yang tipis dan seri, juga hampir tidak mungkin untuk dapat melihat elemen-elemen struktural dalam kedudukannya yang asli. Prosesnya diawali dengan mencelupkan jaringan yang telah difiksasi kedalam larutan garam fisiologis kemudian jaringan dibekukan dengan menuangkan N_2 (nitrogen cair) keatas jaringan. Setelah beku, jaringan diiris menggunakan mikrotom dengan ketebalan 20µm. Irisan kemudian diambil menggunakan kuas halus lalu dimasukkan kedalam larutan garam fisiologis. Setelah proses pengirisan, selanjutnya dilakukan proses pewarnaan dengan metode *Schultz-Smith*. Metode pewarnaan ini merupakan metode untuk mewarnai kolesterol atau ester-esternya yang terpapar pada jaringan. Terdapat dua reagent yang dibutuhkan pada metode ini yaitu hidrogen peroksida 3% dan asam asetat glasial. Prosesnya diawali dengan memasukkan irisan kedalam larutan hidrogen peroksida selama 3 menit, kemudian irisan dicuci dengan akuades. Setelah itu,

irisan diletakkan diatas gelas objek hingga mengering. Irisan kemudian ditetesi asam asetat glasial lalu ditutup dengan kaca objek. Preparat kemudian diamati dan diambil gambarnya. Hasil dari metode pewarnaan *Schultz-Smith* adalah kolesterol atau ester-esternya berwarna hijau untuk beberapa saat, kemudian menjadi coklat setelah 30 menit (Suntoro, 1983).

Metode selanjutnya adalah metode parafin dengan pewarnaan *Hematoxylin Erlich-Eosin*. Metode ini digunakan untuk melihat keadaan struktur hati yang lebih jelas karena dengan metode beku hal ini tidak dapat dilakukan. Dengan metode parafin, hampir semua macam jaringan dapat dipotong dengan baik. Hasil irisannya pun dapat jauh lebih tipis daripada metode beku. Tetapi, bila menggunakan metode ini jaringan akan menjadi keras, mengerut, dan mudah patah. Tahapan kerja dari metode parafin adalah sebagai berikut : fiksasi, pencucian (*washing*), dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi, penanaman (*embedding*), penyayatan (*sectioning*), penempelan (*affixing*), deparafinisasi, pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), dan pelabelan (*labelling*).

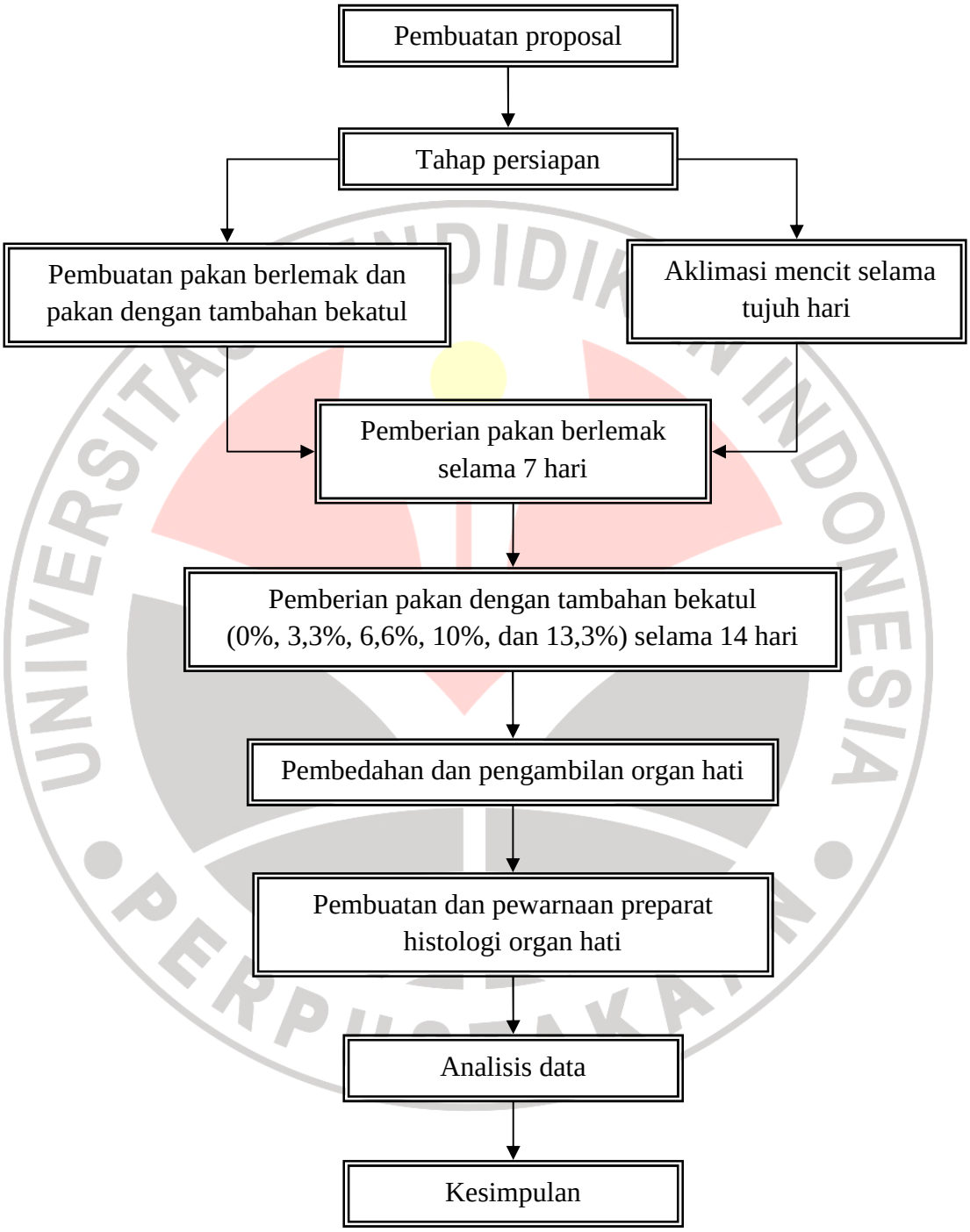
Organ hati yang telah difiksasi dengan larutan formalin 4% kemudian dicuci dengan akuades. Tahap berikutnya adalah dehidrasi yang dilakukan dengan merendam organ dalam larutan alkohol bertingkat (konsentrasi 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut) masing-masing larutan diganti sebanyak tiga kali setiap 30 menit. Setelah dehidrasi, dilakukan tahap penjernihan dengan larutan toluol sampai organ tampak jernih atau transparan. Organ yang tidak jernih menunjukkan dehidrasi kurang baik sehingga organ harus didehidrasi kembali. Setelah tampak jernih, organ dapat memasuki tahap infiltrasi parafin.

Tahap ini dilakukan didalam oven yaitu dengan merendam organ dalam cairan parafin dengan titik leleh 48–52°C, 52–54°C, dan 54–56°C selama masing-masing 1–2 jam. Setelah diinfiltrasi, organ ditanam dalam parafin keras menggunakan cetakan logam hingga terbentuk blok parafin dengan organ ditengahnya. Tahap penyayatan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4µm. Irisan yang terbentuk ditempel pada gelas objek yang sebelumnya telah diolesi haupt atau albumin. Agar benar-benar menempel, irisan kemudian ditetesi akuades lalu diletakkan diatas hot plate dengan suhu 40°C hingga mengering. Tahap selanjutnya adalah deparafinisasi yaitu menghilangkan parafin yang terdapat didalam jaringan dengan cara merendam jaringan didalam larutan xilol selama 15 menit. Setelah itu, jaringan memasuki tahap pewarnaan. Langkahnya yaitu mencelupkan jaringan kedalam alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 30%, dan akuades. Setelah itu, jaringan dicelupkan kedalam larutan pewarna Hematoxylin Erlich selama 3–7 detik lalu dicuci dengan air. Jaringan kemudian dicelupkan kedalam alkohol 30%, 50%, 60%, dan 70%. Setelah itu, jaringan direndam dalam larutan pewarna yang kedua yaitu Eosin Y 0,5% (dalam alkohol 70%) selama 1–3 menit. Setelah terwarnai, jaringan dicelupkan kedalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut lalu direndam dalam xilol selama 10 menit. Tahap berikutnya adalah penutupan dengan cara menetesi jaringan dengan entelan kemudian ditutup dengan kaca penutup. Terakhir preparat diberi label dengan keterangan yang jelas. Dengan demikian jaringan siap diamati dan diambil gambarnya (Suntoro, 1983).

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara kualitatif yaitu dengan melihat, membandingkan, dan mendeskripsikan gambaran histologis organ hati dari setiap kelompok perlakuan dengan kontrol. Analisis dilakukan pada gambaran histologi yang didapat dari kedua metode pembuatan preparat histologi yaitu metode beku dengan pewarnaan *Schultz-Smith* dan metode parafin dengan pewarnaan *Hematoxylin Erlich-Eosin*. Parameter pada metode pertama adalah banyaknya bagian yang berwarna hijau gelap. Warna tersebut menunjukkan ester kolesterol yang terpapar pada jaringan hati. Parameter pada metode kedua adalah ukuran hepatosit dan kerapatan antar hepatosit. Parameter tersebut dapat menunjukkan banyaknya kolesterol yang terdapat dalam sitoplasma hepatosit.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.5. Diagram Alur Penelitian