

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia Universitas Pendidikan Indonesia dan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor pada bulan Juni - Agustus 2015.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu *automatic tissue processor*, spektrofotometer dan mikroskop cahaya.

3.2.2. Bahan

Bahan utama penelitian adalah senyawa tungsten trioksida (WO_3) berukuran *bulk*. Bahan lainnya adalah *aquadest*, polietilen glikol (PEG) BM 6000 sebesar 2%, bahan pakan, obat-obatan mencit, formalin 10%, alkohol absolut, xylol, *paraffin*, pewarna hematoksilin dan eosin.

3.3. Persiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus jantan galur Sprague dawley berumur 6 minggu. Sampel kemudian diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari untuk proses adaptasi dengan pakan dan lingkungan.

3.4. Pengelompokkan Variasi Dosis

Sebanyak 45 ekor tikus jantan dibagi menjadi 9 kelompok variasi dosis dan setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus. Pengelompokkan variasi dosis ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kelompok Dosis

Kelompok	Jumlah Tikus	Perlakuan
Kontrol	5	Diberi larutan PEG 2%
1	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 15 mg/kgbb dengan PEG 2%
2	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 45 mg/kgbb dengan PEG 2%
3	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 135 mg/kgbb dengan PEG 2%
4	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 405 mg/kgbb dengan PEG 2%
5	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 1215 mg/kgbb dengan PEG 2%
6	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 2000 mg/kgbb dengan PEG 2%
7	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 4000 mg/kgbb dengan PEG 2%
8	5	Diberi larutan suspensi WO ₃ 5000 mg/kgbb dengan PEG 2%

3.5. Pembuatan Sediaan Uji

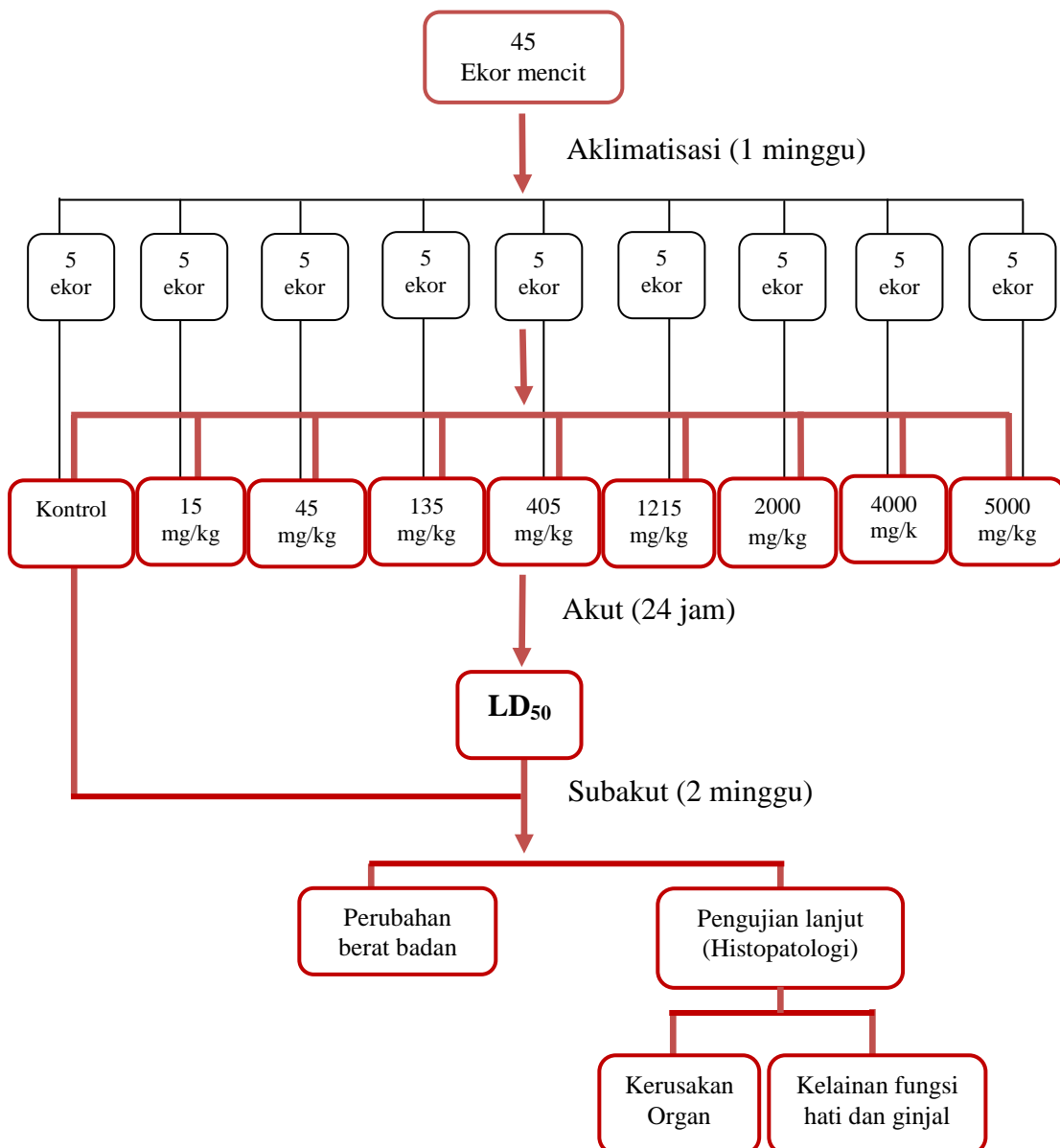
Larutan suspensi WO₃ dengan berbagai variasi dosis dibuat dengan cara menggerus sejumlah WO₃ kemudian ditambah larutan PEG 2% dengan volume yang disesuaikan. Larutan suspensi yang dihasilkan berwarna kuning. Takaran WO₃ dan volume PEG untuk pembuatan sediaan uji ditunjukkan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Takaran WO₃ dan Volume PEG Untuk Pembuatan Sediaan Uji

Sediaan Uji	Berat WO ₃	Volume PEG
Dosis 15 mg/kgbb	11,25 mg	7,5 ml
Dosis 45 mg/kgbb	33,75 mg	7,5 ml
Dosis 135 mg/kgbb	101,25 mg	7,5 ml
Dosis 405 mg/kgbb	303,75 mg	7,5 ml
Dosis 1215 mg/kgbb	911,25 mg	7,5 ml
Dosis 2000 mg/kgbb	1500 mg	7,5 ml
Dosis 4000 mg/kgbb	3000 mg	7,5 ml
Dosis 5000 mg/kgbb	6000 mg	7,5 ml

3.6. Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu tahap pertama adalah uji toksisitas akut untuk menentukan nilai LD₅₀ dari WO₃. Tahap kedua adalah uji toksisitas subakut untuk melihat efek pemberian WO₃ terhadap berat badan hewan uji. Tahap ketiga adalah uji histopatologi untuk melihat kelainan fungsi organ dan kerusakan organ hati serta ginjal dari hewan uji. Tahapan penelitian secara keseluruhan dapat dilihat dari bagan alir yang ditunjukkan pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Bagan Alir Penelitian Uji Toksisitas dan Histopatologi

3.6.1. Uji Toksisitas Akut

Sebanyak 45 ekor tikus yang telah diaklimatisasi dibagi menjadi 9 kelompok variasi dosis WO_3 yaitu kontrol (PEG 2%), 15 mg/kgBB, 45 mg/kgBB, 135 mg/kgBB, 405 mg/kgBB, 1215 mg/kgBB. Dilakukan pengamatan terhadap mortalitas untuk perhitungan nilai LD_{50} dan perubahan tingkah laku hewan. Apabila hewan uji tidak ada yang mati dalam 24 jam, pangujian dilanjutkan dengan dosis yang lebih besar yaitu 2000 mg/kg, 4000 mg/kg, dan 5000 mg/kg. Dosis diberikan secara oral menggunakan sonde lambung dan pengujian dilakukan selama 24 jam.

3.6.2. Uji Toksisitas Subakut

Uji toksisitas subakut dilakukan selama 14 hari untuk melihat efek pemberian zat uji WO_3 terhadap berat badan hewan uji dan dilakukan uji lanjutan (histopatologi) pada hari ke 15. Dosis diberikan setiap hari yang berdasarkan hasil uji sebelumnya.

3.6.3. Uji Histopatologi

3.6.3.1. Pembedahan Hewan Uji

Pembedahan hewan uji dilakukan pada hari ke 15. Tikus dikorbankan dengan metode anestesi menggunakan ketamine 10% untuk kemudian dilakukan pembedahan untuk uji kerusakan organ hati dan ginjal.

3.6.3.2. Pembuatan Preparat Jaringan

a. Fiksasi

Tikus yang telah dibedah, diambil organ hati dan ginjalnya kemudian direndam dengan larutan Formalin 10% selama 24 jam (Muntiha, 2001)

b. Pemotongan Jaringan Organ

Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan formalin matang, jaringan ditiriskan pada saringan, selanjutnya dipotong menggunakan pisau *scalpel* dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (Muntiha, 2001)

c. Dehidrasi, Filtrasi dan *Clearing*

Keranjang yang di dalamnya berisi jaringan organ, dimasukkan ke dalam mesin *automatic processor*. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut: etanol 70% (2 jam), etanol 80% (2 jam), etanol 90 % (2 jam), etanol *absolute* (2 jam), etanol *absolute* (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya keranjang dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya (Muntiha, 2001).

d. Vakum

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara dari jaringan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur (59 - 60°C), di vakum selama 30 menit. Keranjang diangkat, *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair (Muntiha, 2001).

e. Pemandaman

Cetakan dari bahan *stainles steel* dihangatkan di atas api bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara itu ditempat lain, disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (20°C) sebelum dilakukan pemotongan (Muntiha, 2001).

f. Pengirisan dan Peletakan Pada Gelas Objek

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian diiris menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3 – 4µm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyektif. Kaca obyektif dengan jaringan di

atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai (Muntiha, 2001).

g. Pewarnaan

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan ke dalam larutan xylol (dua kali pencelupan) masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, dicelupkan kedalam etanol *absolute* 2 menit, etanol 95%, dan etanol 80% masing-masing selama 1 menit. Bilas dengan air keran selama 1 menit, larutan hematoksilin 8 menit, bilas lagi dengan air keran 30 detik, air keran lagi 2 menit, kemudian dicelupkan pada larutan eosin selama 2 – 3 menit, dan bilas lagi dengan air keran 1 menit. Selanjutnya dicelupkan secara berurutan pada etanol 95%, etanol *absolute* I, etanol *absolute* II masing-masing 10 celupan, dan dilakukan pencelupan pada larutan xylol I 1 menit, larutan xylol II 2 menit.

Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup (*cover glass*). Hasil pewarnaan dilihat di bawah mikroskop (Muntiha, 2001).

3.6.3.3. Pemeriksaan Parameter Biokimia Darah

Pemeriksaan biokimia darah meliputi parameter yang berkaitan dengan fungsi ginjal (kreatinin dan ureum) dan hati (*Alanine Transaminase*) dengan menggunakan serum darah yang diambil setelah tikus dipingsankan. Plasma darah kemudian dimasukkan kedalam alat spektrofotometer untuk diuji biokimia darahnya.