

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dikelompokkan menjadi 7 kelompok dengan 5 kali ulangan antara lain kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dosis 0,1 mg/gr, 0,2 mg/gr, 0,3 mg/gr, 0,4 mg/gr dan 0,5 mg/gr berat badan.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dan timbal asetat dengan konsentrasi 0,3 mg/gr berat badan.

3.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas (Nurhayati, 2007). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA dan histopatologi hepar pada mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan yang meliputi nekrosis hepar, pelebaran sinusoid, dan kerusakan vena sentralis.

3.2.3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jenis kelamin jantan, dengan berat badan 20-30 gr, usia 2-3 bulan sebanyak 35 ekor, daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) muda 5-6 tangkai dari ujung batang, minuman mencit secara *ad libitum* dan makanan jenis *pellet*.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2013-Januari 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Optik dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Tabel 3.1 :Rancangan waktu penelitian

Kegiatan	Desember				Januari			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Aklimatisasi			√					
Ekstraksi			√					
Perlakuan				√	√	√		
Pengambilan data							√	

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus*) dengan 7 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor. Jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20-30 gram sebanyak 35 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat makan dan minum tikus, alat pencekok oral (sonde modifikasi), masker, sarung tangan, timbangan analitik, hot plate, labu ukur 100 ml, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 500 ml, beaker glass 250 ml, kaca glass, *objek glass*, corong Buchner, parafin, ayakan tepung/ kertas saring, *hand counter*, pipet tetes, seperangkat alat bedah, botol spesimen, rotari evaporator, mikroskop komputer, kertas label, kapas, spidol permanen, spektrofotometer.

3.5.2 Bahan

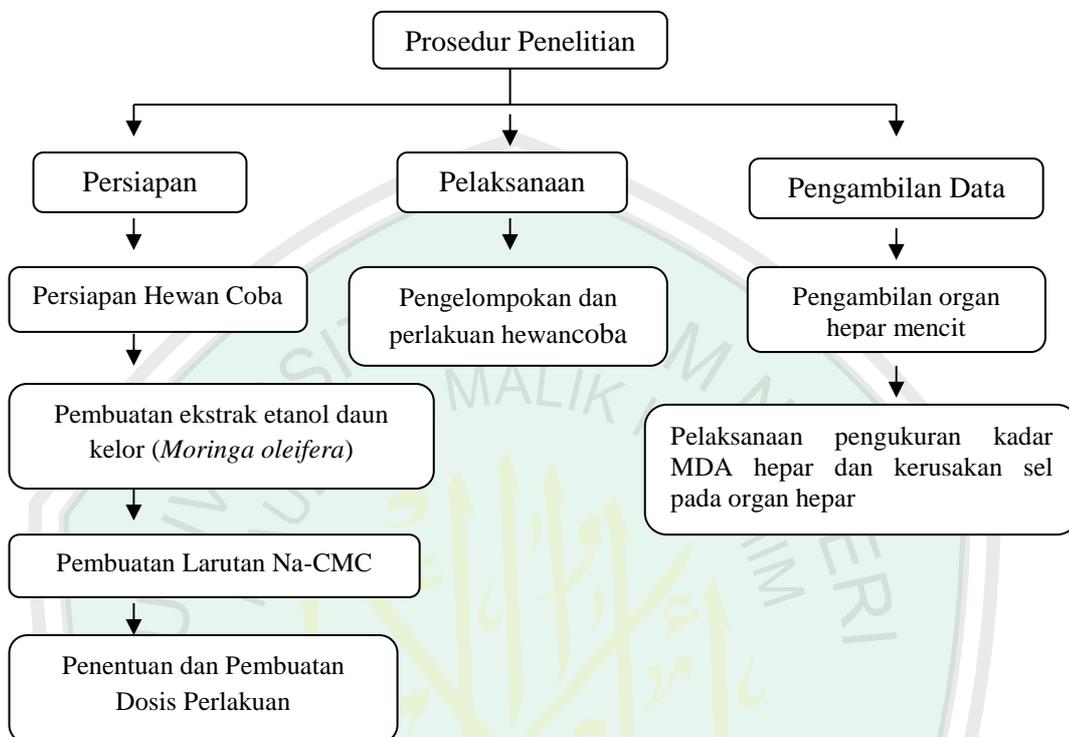
Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.), aquades, pakan mencit berupa, alkohol 70%, kloroform, EDTA, CMC 0,5%, serutan kayu, larutan KCl 1,15%, *sodium dodecyl sulfat* (SDS) 8,1%, larutan asam asetat 20%, NaOH, larutan *thiobarbituric acid* (TBA) 0,8%, larutan PBS (Phosphate Buffer Saline), Na-CMC, NaCl 0,9%, formalin 10%, etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 96%), dan xylol.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu :

1. Tahap persiapan : tahap yang meliputi persiapan hewan coba (aklimatisasi), pembuatan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.), pembuatan larutan Na CMC, penentuan dan pembuatan dosis perlakuan.
2. Tahap pelaksanaan : tahap yang meliputi pengelompokan dan perlakuan hewan coba.

3. Tahap pengambilan data : tahap meliputi proses analisis kadar MDA hepar dan pembuatan preparat histologi hepar.



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan Perlakuan

3.6.1.1 Aklimatisasi dan Pembagian Kelompok

Hewan coba diaklimatisasi sebelum perlakuan dilakukan selama satu minggu (7 hari). Mencit diberi minum secara *ad libitum* (berlebih), makan berupa *pellet* dan dibagi menjadi 7 kelompok dengan masing-masing 5 ulangan seperti berikut:

P1 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan perlakuan kontrol (tanpa pemberian timbal asetat dan juga tanpa pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*))

- P2 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB saja.
- P3 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,1 mg/gr BB.
- P4 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,2 mg/gr BB.
- P5 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,3 mg/gr BB.
- P6 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,4 mg/gr BB.
- P7 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,5 mg/gr BB.

3.6.1.2 Pembuatan Estrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*) sebanyak 100 gram dimaserasi dengan etanol 70% beberapa kali hingga pelarut menjadi bening. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong Buncher. Filtrat yang telah diperoleh dipisahkan dengan rotari evaporator dengan suhu 40⁰C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya disimpan dan digunakan sebagai

perlakuan. Pembuatan stok ekstrak hanya untuk persediaan selama 1 minggu sehingga perlu dilakukan 2 kali proses ekstraksi.

3.6.1.3 Pembuatan Sediaan Larutan Na-CMC 0,5 %

Sediaan larutan Na-CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 50 mg Na-CMC ke dalam 10 ml aquades dingin, kemudian diaduk hingga homogen kemudian dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.1.4 Perhitungan Dosis Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan Mencit

A. Jumlah Timbal Asetat Yang Dibutuhkan

$0,3 \text{ mg/gr} = 0,0003 \text{ gr/gr}$ (satunya adalah berat badan mencit). Rata-rata berat badan mencit yang digunakan adalah 20 gram, maka timbal yang dibutuhkan tiap mencit adalah $0,0003 \times 20 = 0,006 \text{ mg/ mencit}$. Jadi jumlah timbal asetat yang dibutuhkan untuk 35 mencit adalah $0,006 \times 35 = 0,21 \text{ mg}$. Akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihihkan maka timbal asetat total stok ditambah hingga menjadi sebanyak 0,3 mg.

B. Dosis Stok

Volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari)

$$0,5 \text{ (volume sonde)} \times 35 \text{ ekor mencit} \times 7 \text{ hari} = 122,5 \text{ ml}$$

Total stok adalah sebanyak 122,5 ml, akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihihkan maka volume total stok larutan menjadi sebanyak 130 ml. Larutan stok ini digunakan selama 7 hari perlakuan pemberian timbal asetat.

3.6.1.5 Pembuatan Sediaan Larutan Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan

Sediaan larutan timbal asetat 0,3 mg/gr berat badan dibuat dengan mengukur stok timbal asetat sebanyak 0,3 mg pada neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan aquades hingga homogen, setelah itu ditambah aquades hingga mencapai volume 130 ml. Hal ini didasarkan pada pemberian timbal asetat pada mencit adalah sebesar 0,5 ml karena batas maksimum lambung mencit adalah 1 ml sehingga total volume yang dibutuhkan selama 7 hari untuk 5 ekor mencit adalah sebesar 122,5 ml. Dikarenakan volume larutan yang diperlukan dalam praktik selalu melebihi total larutan stok, maka volume larutan ditambah hingga volume 130 ml.

3.6.1.6 Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Berdasarkan hasil penelitian milik Sumarno *et al* (2007) menyatakan bahwa pemberian ekstrak tepung daun kelor dengan dosis 0,2 mg/gr berat badan mampu menurunkan kadar MDA dan memperbaiki jaringan hepar yang rusak. Maka dalam penelitian ini akan digunakan dosis ekstrak *Moringa oleifera* yang lebih besar daripada dosis yang digunakan oleh Sumarno *et al* (2007). Dosis *Moringa oleifera* yang digunakan adalah 5 dosis bertingkat dengan rentang 0,1 mg/gr berat badan. Dosis *Moringa oleifera* yang digunakan yaitu:

A. Dosis Perlakuan *Moringa oleifera*

- a. Dosis I : 0 mg/ gr BB per hai = 0 mg/ gr berat badan
- b. Dosis II : 0,1mg/ gr BB per hari = 0,0001 mg/gr berat badan
- c. Dosis III : 0,2 mg/ gr BB per hari = 0,0002 mg/gr berat badan
- d. Dosis IV : 0,3 mg/ gr BB per hari = 0,0003 mg/gr berat badan
- e. Dosis V : 0,4 mg/ gr BB per hari = 0,0004 mg/gr berat badan

f. Dosis VI : 0,5 mg/ gr BB per hari = 0,0005 mg/gr berat badan

B. Dosis perlakuan

Dosis stok = volume sonde (ml)x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian

(hari) = 15 ml/ hari

Dosis stok = 0,5 x 5 x 14 = 35 ml

3.6.1.7 Perhitungan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Tiap

Dosis Perlakuan

- a. Dosis I : 0 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0 gr
- b. Dosis II : 0,0002 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,007 gr
- c. Dosis III : 0,0002 gr / 0,5 ml = y gr / 35ml ; maka y = 0,014 gr
- d. Dosis IV : 0,0003 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0,021 gr
- e. Dosis V : 0,0004 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0,028 gr
- f. Dosis VI : 0,0005 gr / 0,5 ml = y gr / 35ml ; maka y = 0,035 gr

Total kebutuhan ekstrak = 0 + 0,007gr + 0,014gr + 0,021gr + 0,028gr +
0,035gr = 0,105 gr

Jadi stok yang dibutuhkan selama 14 hari adalah 0,105 gram.

C. Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

1. Dosis VI = 0,105 gr x 0,5 ml = 0,0005 gr x k ml

k = 105 ml

Jadi 0,105 gram ekstrak dilarutkan dengan Na-CMC hingga volumenya 105 ml, kemudian diambil 35 ml untuk stok ekstrak dosis VI untuk perlakuan selama 14 hari. Sisa stok sebanyak 70 ml akan diencerkan dan digunakan untuk dosis selanjutnya.

$$2. \text{ Dosis V} = 0,0005 \text{ gr} \times 70 \text{ ml} = 0,0004 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 87,5 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan dosis VI sebanyak 70 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 87,5 ml. Diambil 35 ml untuk stok ekstrak dosis V selama 14 hari sehingga sisa larutan adalah sebesar 52,5 ml.

$$3. \text{ Dosis IV} = 0,0004 \text{ gr} \times 52,5 \text{ ml} = 0,0003 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 70 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis V sebanyak 52,5 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 70 ml. Diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis IV selama 14 hari sehingga sisa larutan adalah 35 ml.

$$4. \text{ Dosis III} = 0,0003 \text{ gr} \times 35 \text{ ml} = 0,0002 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 52,5 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis IV sebesar 35 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 52,5 ml dan diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis III selama 14 hari. Sisa larutan adalah sebesar 17,5 ml.

$$5. \text{ Dosis II} = 0,0002 \text{ gr} \times 17,5 \text{ ml} = 0,0001 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 35 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis III sebesar 17,5 ml kemudian diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 35 ml. Diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis II selama 14 hari sehingga tidak tersisa larutan stok (0 ml).

$$6. \text{ Dosis I} = 0 \text{ gr} \times 0 \text{ ml} = 0 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 0 \text{ ml}$$

3.6.2 Tahap Perlakuan

3.6.2.1 Perlakuan Pemaparan Timbal Asetat

Pemaparan timbal asetat yang dilakukan dengan cara menginduksi mencit dengan menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 7 hari setelah hari ke-7 aklimatisasi pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan P3 (kelompok yang hanya diberi ekstrak *Moringa oleifera* saja).

3.6.2.2 Perlakuan Pemberian Ekstrak Etanol *Moringa oleifera*

Pemaparan ekstrak etanol *Moringa oleifera* yang dilakukan dengan cara oral menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 14 hari setelah hari ke-15 aklimatisasi (atau hari ke-8 setelah pemaparan timbal asetat) pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan P2 (kelompok yang hanya diberi ekstrak timbal asetat saja).

3.6.3 Tahap Pengamatan

3.6.3.1 Pengukuran kadar MDA hepar mencit (*Mus musculus*)

Pemeriksaan kadar MDA jaringan hepar dilakukan dengan metode *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) sesuai dengan metode Ohkawa (1979) dalam Jawi *et al* (2008). Sebanyak 1,0 gram jaringan hepar basah dihancurkan dan dicampur dengan 9,0 ml larutan KCl 1,15% dalam *Teflon Potter-Elvehjem homogenizer*. Ke dalam 0,2 ml homogenat jaringan hepar ditambahkan 0,2 ml *sodium dodecyl sulfat* (SDS) 8,1%, 1,5 ml larutan asam asetat 20%, NaOH sampai mencapai pH 3,5, dan 1,5 ml larutan *thiobarbituric acid* 0,8%. Campuran

tersebut diencerkan dengan air sampai volumenya mencapai 4,0 ml dan dipanaskan dengan suhu 95⁰C selama 60 menit. Setelah itu, sampel didinginkan dengan air kran, dan ke dalamnya ditambahkan 1,0 ml air, 5,0 ml campuran n-butanol pyridine (15:1, V/V), dan dikocok sampai merata. Selanjutnya campuran disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Lapisan organik diambil dan absorbannya dibaca dengan spektrofotometer gelombang 532 nm. Sebagai standar dipakai 1,1,3,3-tetramethoxypropane. Nilai TBARS dinyatakan dalam nmol MDA/g jaringan hati.

3.6.3.2 Tahap pembuatan preparat hepar mencit (*Mus musculus*)

Pada akhir perlakuan semua mencit dibius dengan kloroform, kemudian dilakukan pembedahan dan diambil sampel heparnya. Sampel hepar tersebut kemudian akan dibuat preparat histologi yang sebelumnya telah direndam dengan larutan formalin 10%. Adapun langkah-langkah pembuatan preparat hepar adalah:

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi, lalu direndam dengan alkohol 70% minimal semalam. Kemudian objek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30 sampai 40 detik per slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan sehingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
2. Tahap kedua, organ hepar yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam. Kemudian dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan 90%, 95%, etanol absolut (3kali), xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.

3. Tahap ketiga, adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan parafin sebanyak 3 kali selama 30 menit.
4. Tahap keempat, *embedding*, bahan beserta parafin dituangkan ke dalam kotak karton atau wadah yang telah dipersiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap di dekat bahan. Blok parafin dibiarkan semalam dalam suhu ruang, kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga blok benar-benar keras.
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata dengan mengatur ketebalan irisan. Kemudian hepar dipotong dengan ukuran 5 μm , lalu pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan. Kemudian dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang dipilih diambil dengan gelas objek yang sudah *dicoating* lalu dikeringkan di atas *hotplate*.
6. Tahap deparafisasi yakni preparat dimasukkan dalam *xylol* sebanyak dua kali selama 5 menit.
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat dimasukkan dalam aquades selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan Hematoxilen selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci

dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarnaan Eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.

9. Tahap berikutnya adalah dehidrasi dengan memasukkan preparat pada seri etanol bertingkat dari 80%, 90% dan 95% hingga etanol absolut (2 kali) selama 5 menit.
10. Tahap *clearing* dilakukan dengan memasukkan preparat pada xilol dua kali selama 5 menit dan dikeringkan.
11. Selanjutnya tahap *mounting* dilakukan dengan entellan. Hasil diamati di bawah mikroskop komputer dengan perbesaran 400 kali atau 100 kali dan difoto kemudian dicatat persentase kerusakan.

Preparat histologi hepar diamati di bawah mikroskop dalam lima lapangan pandang yang berbeda, dengan perbesaran 100 kali. Setiap preparat digeser lima kali lapang pandang kemudian skor dijumlah dan dibagi lima, maka hasil dari lima kali pergeseran itu adalah data dari satu preparat. Kriteria prosentase kerusakan dapat dilihat pada Tabel 3.2 di bawah ini:

Tabel 3.2 Kriteria Prosentase Kerusakan Gambaran Histopatologi Sel Hepar (Metode Thomas and Ritcher, 1984 dalam Astuti dkk, 2006 yang telah dimodifikasi)

Parameter	Kategori	Keterangan
Nekrosis	Berat	Luas nekrosisnya lebih dari $\frac{3}{5}$ luas lapang pandang.
	Sedang	Luas nekrosisnya kurang dari $\frac{3}{5}$ luas lapang pandang.

	Ringan	Luas nekrosisnya kurang dari 1/5 luas lapang pandang.
Pelebaran Sinusoid	Besar	Sinusoid berbentuk tidak teratur dan pelebaran yang terjadi paling besar dibandingkan dengan yang lain.
	Sedang	Sinusoid berbentuk tidak teratur dan pelebaran tidak terlalu besar dibandingkan dengan kategori besar.
	Kecil	Sinusoid sedikit mengalami pelebaran
Kerusakan Vena sentralis	Berat	Lebih dari setengah bagian vena sentral mengalami perdarahan
	Sedang	Setengah bagian vena sentral mengalami perdarahan
	Kecil	Sedikit dari bagian vena sentral yang mengalami perdarahan

Penjelasan

- Nekrosis ditandai dengan nukleus menjadi lebih kecil dan padat (piknotik), hancur bersegmen-segmen (karioreksis), nukleus tidak tampak jelas (kariolisis) dan sulit dibedakan antara nukleus dengan sitoplasma.
- Kerusakan vena sentralis ditandai dengan adanya perdarahan pada bagian vena sentral

3.7 Analisa Data

Analisis yang digunakan adalah ANOVA *one way*. Apabila dari hasil analisis menunjukkan H_0 ditolak (ada pengaruh) maka akan diuji lanjut dengan BNJ dengan taraf signifikan 1% untuk melihat perbedaan antara kelompok kontrol dengan masing-masing perlakuan.

