

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Pembedahan dan proses *mikroteknik* dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2014 sampai bulan Februari 2015.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah *baker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, seperangkat alat bedah, instrumen pemeriksaan kadar SOD, *microtube* 1,5 mL, *micropipet*, *whitetips*, *bluetips*, *yellowtips*, vorteks, spektrofotometer, kuvets, penangas air, sentrifuge, neraca analitik, mikroskop, gelas objek dan kaca penutup, bak pemeliharaan mencit, jarum suntik, dan kamera digital.

Bahan yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 30-40 gram, mencit diperoleh dari BPPV Lampung, homogenat hati mencit, pakan pellet, larutan trikloroasetat (TCA) 20%, larutan tiobarbiturat (TBA) 0,67%, larutan tetraetoksipropan 1,5 nmol/60 uL (pengenceran 1/80.000 kali) untuk standar MDA, reagen pemeriksaan SOD, taurin, glifosat-Roundup, larutan bouin/formalin, aquades, parafin, *hematoxylin-eosin*.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap (RAL). Pengujian pada mencit dilakukan secara *in vivo*. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, yaitu : kelompok kontrol (K0), kelompok glifosat (K1), dan kelompok taurin+ glifosat (K2). Masing-masing perlakuan terdiri dari 8 ekor sebagai ulangan.

3.4 Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar SOD dan MDA hati, struktur histologi organ hati, bobot hati, dan berat badan mencit yang telah diinduksi herbisida glifosat-Roundup secara oral setiap hari selama 25 hari.

3.5 Pelaksanaan

3.5.1 Aklimasi Hewan Uji

Mencit diaklimasi selama dua minggu diberi makan dan minum yang sama secara *ad libitum*. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum dan berat badan mencit. Mencit yang sakit tidak diikutsertakan dalam percobaan.

3.5.2 Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji mencit dibagi dalam tiga kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 8 ekor sebagai ulangan. Pemberian pakan dilakukan pada pagi hari, antara pukul 09.00-10.00 WIB.

Tabel 1. Dosis pada tiap kelompok perlakuan

Kelompok	Keterangan	Jumlah mencit
K0 (Kontrol normal)	Diberi makan dan minum <i>ad libitum</i> sampai akhir masa penelitian tanpa pemberian taurin dan herbisida glifosat	8
K1 (Glifosat)	Diberi makan dan minum <i>ad libitum</i> , lalu diinduksi herbisida glifosat dengan dosis 25 mg/kg BB mencit per hari secara oral selama 25 hari . Berdasarkan penelitian, dosis ini dapat menginduksi peroksidasi lipid pada mencit (Ozden <i>et al</i> , 2012)	8
K2 (Taurin + Glifosat)	Diberi makan dan minum <i>ad libitum</i> , lalu diberi taurin dengan dosis 7800 mg/kg BB mencit per hari dan glifosat 25 mg/kg BB mencit per hari selama 25 hari. Dosis taurin menurut Shao dan Hathcock (2008), yaitu 3 gram/70 kg berat badan pada manusia. Dosis taurin pada mencit dihitung dengan menggunakan tabel konversi manusia ke mencit ukuran 20 gram menurut Nugraha (2011). Nilai konversi dari manusia ke mencit adalah 0,0026. Sehingga diperoleh dosis taurin untuk mencit, yaitu $3000 \text{ mg} \times 0,0026 = 7,8 \text{ mg/g BB} = 7800 \text{ mg/kg BB}$ mencit.	8

3.5.3 Pembuatan Homogenat Hati

Pembuatan homogenat hati menggunakan jaringan hati dengan berat 100 mg yang ditempatkan pada *test tube* 1,5 mL, lalu ditambahkan 0,5 mL PBS 0,1 M pH 7,4. Jaringan hati lalu divorteks yang telah dipasang *micropestle* dan dilumatkan hingga homogen, kemudian ditambahkan 0,5 mL PBS 0,1 M pH 7,4 sehingga volume menjadi 1 mL. Homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dipindahkan ke *test tube* kosong dan disimpan pada suhu -20°C.

3.5.4 Analisis Aktivitas Enzim SOD Pada Hati Mencit

Aktivitas SOD ditentukan secara biokimia yaitu dengan menggunakan kit RanSOD[®]. Aktivitas SOD total ditetapkan dari derajat penghambatan pembentukan warna formazan. Ini yang diukur dengan spektrofotometer A 505 nm. Reagen-reagen pada kit ini terdiri dari *mixed substrate* yang mengandung xantin dan INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-pheniltetrazolium chloride), buffer fosfat, xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar. Sebanyak 15 µl sampel/standar dimasukkan ke dalam kuvet, lalu ditambahkan *mixed substrate* 500 µl dan campur dengan baik. Kemudian ditambahkan enzim xantin oksidase 75 µl dan serapan cahaya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detik pertama setelah penambahan enzim (A1) dan 3 menit kemudian (A2).

Perhitungan :

$$\frac{A1 - A2}{3} = \Delta A/\text{menit}$$

Kecepatan sampel diluent/buffer fosfat (S1) = kecepatan yang tidak diinhibisi = 100%.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{100 - (\Delta A \text{ standar/menit} \times 100)}{\Delta A \text{ S1/menit}}$$

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ standar/menit} \times 100)}{\Delta A \text{ S1/menit}}$$

% inhibisi sampel yang diperoleh diplot pada kurva log 10/semilog standar.

3.5.5 Pemeriksaan Kadar MDA

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Sebanyak 400 µl sampel direaksikan dengan 200 µl *trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk deproteinisasi. Kemudian divorteks dan disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit.

Supernatan yang terbentuk diambil dan tambahkan 400 µl TBA 0,67%.

Selanjutnya sampel divorteks dan diinkubasi dalam pemanas air pada suhu 96⁰C, 10 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca serapan pada panjang gelombang 530 nm (Zainuri dan Wanandi, 2012).

3.5.6 Pembuatan Preparat Sayatan Hati

Pembuatan preparat hati menggunakan metode parafin dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Menurut Nurlaili (2010), pembuatan sayatan hepar adalah sebagai berikut :

1. *Fixation*, yaitu memfiksasi spesimen yang berupa organ hati dengan larutan formalin 10% dan mencucinya dengan air mengalir.
2. *Trimming*, yaitu mengecilkan ± 3 mm dan memasukkan potongan organ hati ke dalam *embedding cassette*.
3. *Infiltrasi* yaitu dengan menambahkan paraffin sebanyak 3 kali selama 30 menit.
4. *Dehidrasi* yaitu berturut-turut melakukan perendaman organ hati ke dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolut I, II, III selama 1 jam.
5. *Clearing* yaitu membersihkan sisa alkohol dengan xilol I, II, III, masing-masing selama 1 jam.
6. *Impregnasi* dengan menggunakan paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam.
7. *Embedding*, yaitu menyiapkan paraffin cair dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan memasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58°C , lalu menuangkan paraffin cair ke dalam pan dan memindahkan satu persatu dari *embedding cassette*. Pan dimasukkan ke dalam air. Kemudian melepaskan paraffin yang berisi potongan hati dari pan dengan memasukkan ke

dalam suhu 4-6⁰C beberapa saat. Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel hangat. Meletakkan pada balok kayu, meratakan pinggirnya dan ujungnya dibuat sedikit meruncing.

8. *Cutting*, yaitu melakukan pemotongan dan blok didinginkan terlebih dahulu. Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan gelas obyektif kemudian dikeringkan diatas *hot plate*.
9. *Staining*, yaitu pewarnaan dengan *hematoxylin-eosin*. Langkah-langkahnya secara berurutan sebagai berikut. Slide direndam ke dalam xilol I, II, III masing-masing 5 menit, lalu alkohol absolut I, II, III masing-masing 5 menit, aquades selama 1 menit, lalu pewarna *hematoxylin-eosin* selama 20 menit, dibilas dengan aquades 5menit, direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolut masing-masing selama 5 menit. Terakhir memasukkan dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit.
11. *Mounting* dengan etilen atau kanada balsam dan ditutup dengan *cover glass*.
12. Pemotretan preparat dalam pengamatan dimikroskop disajikan secara jelas.

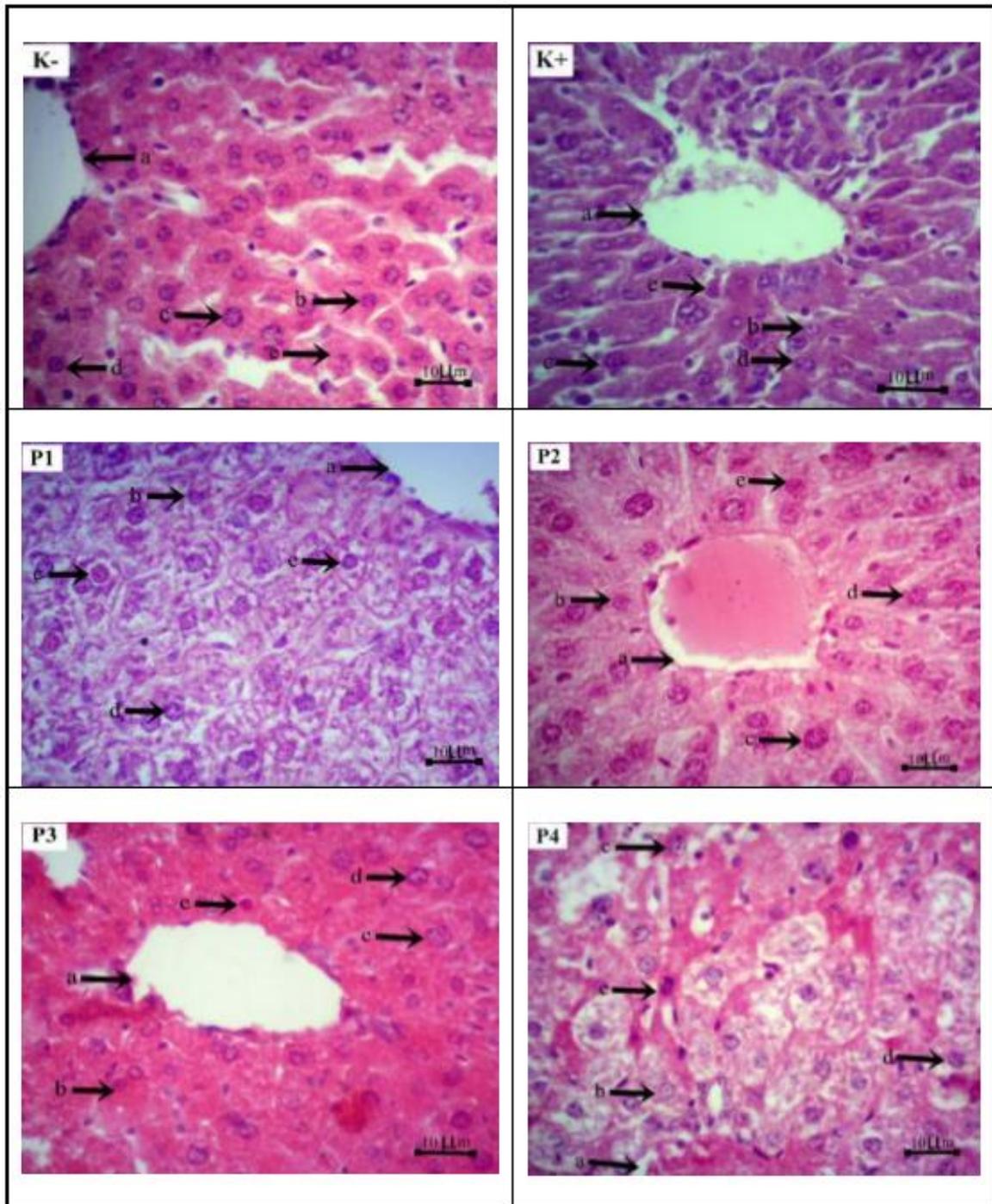
3.5.7 Pengamatan Histologi

Pengamatan dilakukan dengan membandingkan preparat histologi hati antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Preparat histologis hati diamati di bawah mikroskop cahaya dalam lima lapangan pandang yang berbeda, dengan perbesaran 400 kali. Setiap lapangan pandang dihitung 20 sel secara acak sehingga dalam 1 preparat tersebut teramati 100 sel hati. Kemudian dihitung rerata bobot skor perubahan histopatologi hepar dari lima lapangan pandang dari masing-masing mencit dengan model *Skoring Histopathology Manja Roenigk*. Kemudian dicatat dan dihitung jumlah persentase kerusakan yang terjadi (Maulida *et al*, 2010).

Tabel 2. Kriteria penilaian derajat histopatologi sel hepar model *Skoring Histopathology Manja Roenigk* (Maulida *et al*, 2013).

Tingkat Perubahan	Nilai
Normal	1
Degenerasi parenkimatososa	2
Degenerasi hidropik	3
Nekrosis	4

Data yang didapat dari setiap parameter pengamatan dicatat dan disusun ke dalam bentuk tabel. Data diuji kemaknaannya terhadap pengaruh kelompok perlakuan dengan bantuan program *SPSS Release 15*.



Gambar 9. Gambaran histologis hepar mencit dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x. a. Vena sentralis, b. Sel hepatosit normal, c. Degenerasi parenkimatosa, d. Degenerasi hidropik, e. Nekrosis. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif, *castrol oil* 0,3 ml), P1 (MSG 4 mg/g BB), P2 (MSG 4 mg/g BB + Vit C 0,26 mg/g BB), P3 (*castrol oil* 0,3 ml + MSG 4 mg/g BB + Vit E 0,26 mg/g BB), P4 (*castrol oil* 0,3 ml + MSG 4 mg/g BB + Vit C 0,26 mg/g BB + Vit E 0,26 mg/g BB (Maulida *et al*, 2013))

Kriteria gambaran mikroskopis hepatosit menurut Maulida *et al* (2013):

- a. Normal : tampak sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen dan membran sel berbatas tegas.
- b. Degenerasi parenkimatosa : tampak sitoplasma keruh karena terdapat endapan protein.
- c. Degenerasi hidropik : tampak vakuola pada sitoplasma sel maupun di sekeliling inti sel.
- d. Nekrosis : tampak inti sel piknotik dan sitoplasma sel menggumpal.

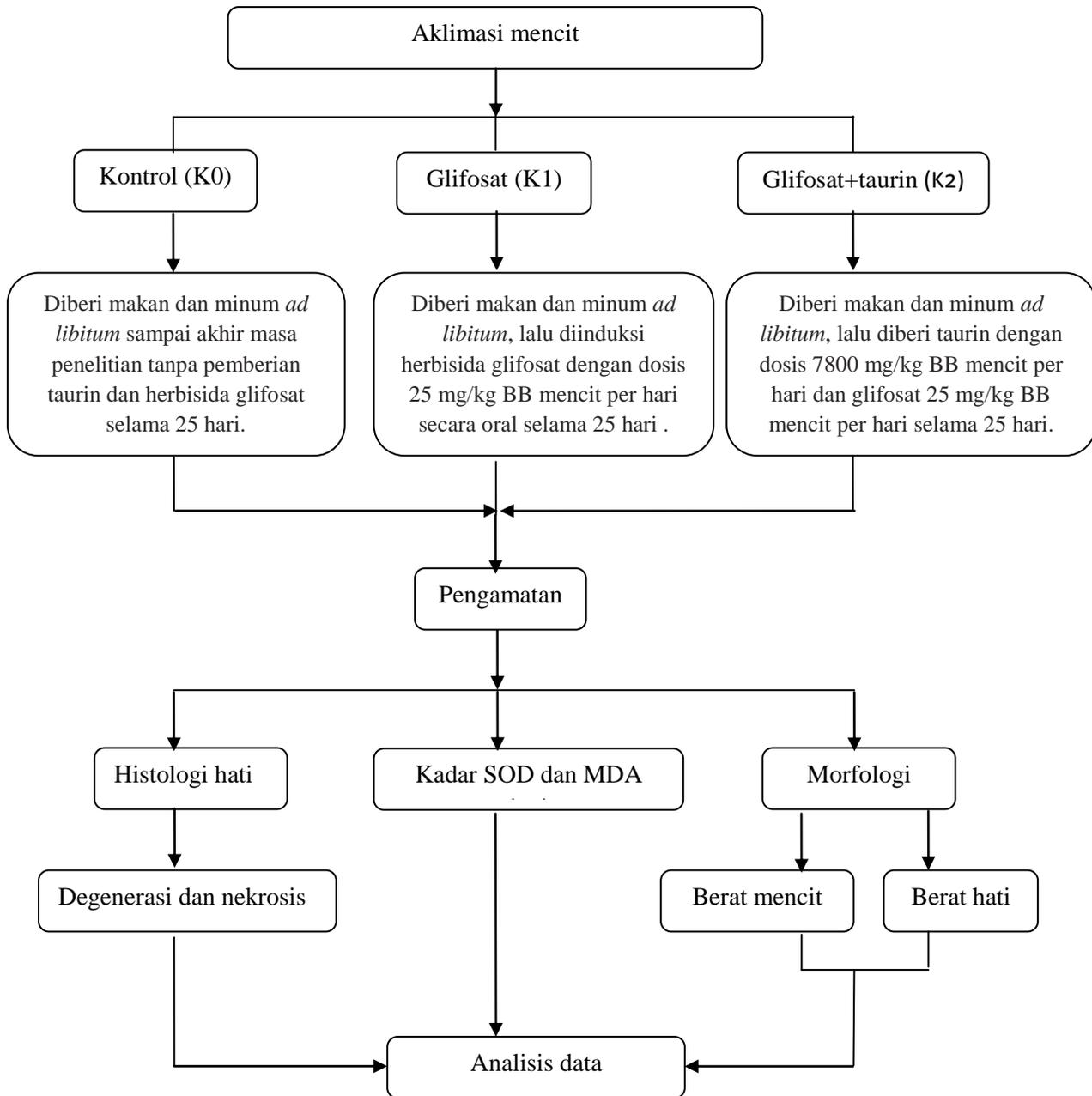
3.5.8 Pengamatan Berat Badan Mencit

Selama 25 hari percobaan, diamati berat badan mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil pengamatan dicatat dan dibandingkan untuk setiap kelompok perlakuan.

3.6 Analisis Data

Data dianalisis dengan *one ways Anova* pada taraf 5 % ($P < 0,05$) untuk melihat perbedaan pengaruh antar perlakuan dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) / uji Tukey (Abbasoglu, 2001).

Bagan rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 10 berikut.



Gambar 10. Bagan rancangan penelitian