

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan metode acak terkontrol.

B. Waktu dan Tempat

Pembuatan ekstrak jintan hitam dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unila. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di *animal house* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Unila. Terminasi hewan coba serta pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unila. Secara keseluruhan penelitian ini membutuhkan waktu selama 3 bulan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel penelitian sebanyak 30 ekor dipilih secara acak dan dibagi ke dalam 5 kelompok

dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus frederer (Sastroatmojo dan Ismael, 2008).

Menurut rumus Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental yakni $(t-1)(n-1) > 15$. Dimana t merupakan kelompok perlakuan, dan n adalah jumlah pengulangan atau sampel setiap kelompok.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Dari rumus ini didapatkan kelompok sampel lebih atau sama dengan 5, namun peneliti akan menggunakan sampel sebanyak 6 untuk tiap kelompok, sehingga total sampel seluruhnya adalah 30 ekor. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi
 - a. Sehat
 - b. Memiliki berat badan antara 200-250 gram
 - c. Jenis kelamin jantan
 - d. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu (dewasa)

2. Kriteria eksklusi
 - a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital)
 - b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

D. Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu gentamisin dengan dosis 80 mg/kgBB dan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dengan dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB.

2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologis dengan metode paraffin meliputi : Larutan Bouin's untuk fiksasi, garam fisiologis NaCl (0,9%), alkohol teknis, toluol, xylol, akuades, pewarna haematoxylin dan eosin Y, parafin dengan titik cair 50-55⁰ C, Meyer's albumin, enthelan (Yunadir, 2008).

3. Alat Penelitian

- a. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat badan tikus.
- 2) Spuit oral 1 cc
- 3) Spuit 1 cc
- 4) Gunting minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi)
- 5) Kapas dan alkohol

b. Alat Pembuat Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi menggunakan mikrotom.

E. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

a. Cara pembuatan ekstrak etanol jintan hitam

Ekstrak dibuat di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unila dengan menggunakan etanol sebagai pelarut.

Menurut Sulistianto dkk (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan jintan hitam. Selanjutnya seluruh bagian dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 70% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam dan kemudian dilanjutkan dengan maserasi selama 24 jam.

Bahan yang telah dimaserasi selama 24 jam selanjutnya disaring (filtrasi). Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapatkan akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan *Rotary evaporator* pada suhu 40⁰ C sehingga diperoleh ekstrak. Selanjutnya dari larutan ekstrak ini akan dibuat larutan stok. Larutan stok yang dimaksud adalah larutan pekat dengan dosis 100 g/100 ml, hal ini dimaksudkan agar mempermudah dalam perlakuan pada tikus saat percobaan. Ekstrak dibuat dengan melarutkan 100 g berat ekstrak jintan hitam kedalam 100 ml akuades sehingga dalam 1 ml ekstrak mengandung 1000 mg.

b. Cara perhitungan dosis ekstrak jintan hitam

Dosis pertengahan ekstrak etanol jintan hitam yang akan digunakan dalam penelitian ini berdasar pada penelitian Utami dkk (2011) sebesar 500, 1000, 1500mg/kgBB. Pada penelitian tersebut dosis ini telah terbukti dapat menurunkan kadar serum kreatinin, serum urea, dan *blood urea nitrogen* (BUN) terhadap tikus yang diinduksi gentamisin.

1) Dosis untuk tiap kelompok III

$$500 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg (berat tikus)} = 100 \text{ mg}$$

2) Dosis untuk tiap kelompok IV

$$1000 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 200 \text{ mg}$$

3) Dosis untuk tiap kelompok V

$$1500 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ Kg} = 300 \text{ mg}$$

Penentuan dosis untuk masing-masing perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat badan hewan uji yaitu sekitar 200 gr. Untuk masing-masing dosis perhari ada tikus dihitung dari konsentrasi larutan stok.

Dosis pemberian ekstrak jintan hitam pada masing-masing kelompok III, IV dan V.

Tikus kelompok III

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,1 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok III akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,1 ml

Tikus kelompok IV

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{200 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,2 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok IV akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,2 ml.

Tikus kelompok V

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{300 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,3 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok V akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,3 ml.

2. Prosedur pemberian Dosis Gentamisin

Dosis gentamisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya yang telah terbukti dapat meningkatkan serum kreatinin, serum urea dan BUN pada tikus percobaan yang diberikan gentamisin 80 mg/kgBB/hari dan diberikan selama 8 hari (Singh dkk, 2008).

Dosis gentamisin pada tikus yang telah terbukti toksis yaitu 80 mg/kgBB. Hal ini berarti sebagai berikut :

Pada berat tikus rata-rata sekitar 200 mg atau 0,2 kg maka dosis perekor tikus sebesar:

$$80 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 = 16 \text{ mg (perekor tikus)}$$

Dosis gentamisin yang dipilih adalah vial 80 mg dalam 2 ml, hal ini dikarenakan pemberian obat lewat intraperitoneal. Maka perhitungan dosis injeksinya adalah sebagai berikut:

$$\frac{80 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{16 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

Maka x adalah :

$$x = \frac{16 \text{ mg} \times 2 \text{ ml}}{80 \text{ mg}}$$

$$x = 0,4 \text{ ml}$$

3. Prosedur penelitian

- a. Tikus sebanyak 30 ekor dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, yang hanya diberikan aquades. Kelompok II sebagai kontrol patologis, diberikan gentamisin dengan dosis 80 mg/kgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak jintan hitam dosis 500 mg/kgBB, kelompok IV dengan dosis ekstrak jintan hitam sebanyak 1000 mg/kgBB, dan kelompok V dosis ekstrak jintan hitam sebanyak 1500 mg/kgBB. Kemudian selang 2 jam kemudian, kelompok III, IV, dan V diberikan induksi gentamisin sebesar 80 mg/kgBB. Masing-masing diberikan secara intra peritoneal selama 8 hari. Kemudian pada hari 9 dan 10, masing-masing tikus dari kelompok III, IV, dan V tetap diberikan ekstrak jintan hitam.
- b. Mencekoki tikus dengan ekstrak jintan hitam selama 8 hari dan melakukan injeksi gentamisin secara intraperitoneal selama 8 hari, dilanjutkan pemberian ekstrak jintan hitam peroral hingga hari ke 10. Tikus tetap diberi makan *ad libitum*.
- c. Perlakuan dihentikan setelah 10 hari.

- d. Enam tikus jantan dari tiap kelompok dinarkosis dengan kloroform
- e. Dilakukan laparatomi pada tikus yang telah dinarkosis dan diambil hepar untuk dibuat sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin.

Hemaktosilin bersifat pewarna basa, yaitu memulas jaringan basofilik sedangkan eosin memulas jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini merupakan pewarnaan yang paling sering digunakan (Junquiera dkk, 2007).

- f. Sampel hepar difiksasi dengan formalin 10% dan dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk pembuatan sediaan mikroskopis jaringan hepar.
- g. Metode teknik histopatologi yaitu:
 - 1) *Fixation*
 - a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ hati yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.
 - b) Mencuci dengan air mengalir.
 - 2) *Trimming*
 - a) Mengecilkan organ ± 3 mm.
 - b) Memasukkan potongan organ hati tersebut ke dalam *embedding cassette*.

3) *Dehidrasi*

- a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
- b) Berturut-turut melakukan perendaman organ hati dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolut I, II, III selama 1 jam.

4) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan xilol I, II, III masing-masing selama 1 jam.

5) *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam.

6) *Embedding*

- a) Membersihkan sisa paraffin yang ada pada pan dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan usap dengan kapas.
- b) Menyiapkan paraffin cair dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan memasukkan ke dalam oven dengan suhu diatas 58⁰ C.
- c) Menuangkan paraffin cair ke dalam pan.
- d) Memindahkan satu-persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
- e) Memasukkan pan ke dalam air.

- f) Melepaskan paraffin yang berisi potongan hati dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4-6⁰ C beberapa saat.
- g) Meotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel hangat.
- h) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- i) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

- a) Melakukan pemotongan pada ruangan dingin.
- b) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- c) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- d) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e) Memindahkan lembaran jaringan kedalam *waterbath* selama beberapa detik samapai mengembang sempurna.
- f) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tangan atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.

g) Menempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator (suhu 37⁰ C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8) *Staining* (pewarnaan) dengan Harris Hematoxylin Eosin
Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga yaitu aquades selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan dalam zat warna Harris Hematoxylin selama 20 menit.

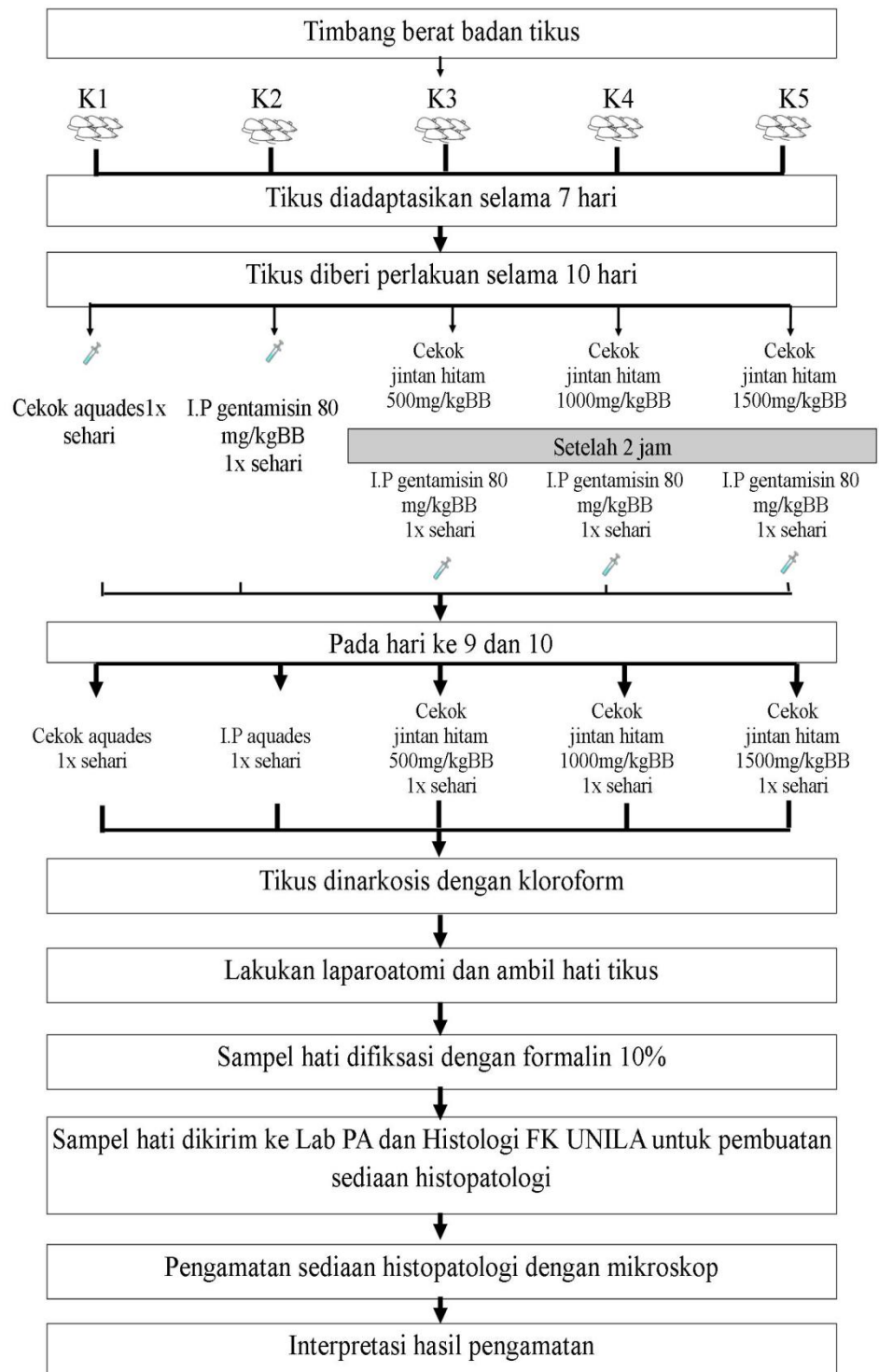
Kemudian memasukkan potongan organ hati dalam aquades selama 1 menit dengan sedikit menggoyang-goyangkan organ. Keenam, mencelupkan organ dalam asam alkohol 2-3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dalam aquades bertingkat masing-masing 1 dan 15 menit. Kedelapan, memasukkan potongan organ dalam eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir memasukkan kedalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

9) *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan *slide* diatas kertas tisu pada tempat datar, meneteskan dengan bahan *mounting* yaitu kanada balsam dan ditutup dengan *cover glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara

10) Membaca slide dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop sinar dengan pembesaran 400x. Metode yang digunakan dalam melihat preparat adalah prosedur *double blinded* (Yunidar, 2008).



Gambar 8. Diagram Alir Penelitian.

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel Independen:
 - 1) Perlakuan coba: pemberian ekstrak jintan hitam dan gentamisin.
 - 2) Perlakuan kontrol negatif: pemberian gentamisin tanpa pemberian ekstrak jintan hitam.
 - 3) Perlakuan kontrol normal: pemberian akuades.
- b. Variabel dependen adalah gambaran histopatologi hepar tikus.

2. Definisi Operasional Variabel

- a. Variabel Independen

Pemberian ekstrak jintan hitam dilakukan pada tikus percobaan.
Tikus percobaan yang dilakukan terbagi atas kelompok percobaan.

 - 1) Kelompok I

Tikus diberikan aquades sebanyak 0,4 ml.
 - 2) Kelompok II

Tikus diberikan gentamisin secara intraperitoneal sebanyak 0,4 ml selama 8 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades sebanyak 0,4 ml pada hari ke 9 dan 10.
 - 3) Kelompok III

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,1 ml peroral kemudian 2 jam kemudian diberikan gentamisin secara

intraperitoneal 0,4 ml. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari, pada hari ke 9 dan 10 tikus hanya diberikan ekstrak jintan hitam peroral sebanyak 0,1 ml.

4) Kelompok IV

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,2 ml peroral kemudian 2 jam kemudian diberikan gentamisin secara intraperitoneal 0,4 ml ml. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari, pada hari ke 9 dan 10 tikus diberikan ekstrak jintan hitam peroral sebanyak 0,2 ml.

5) Kelompok V

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,3 ml peroral kemudian 2 jam kemudian diberikan gentamisin secara intraperitoneal 0,4 ml. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari, pada hari ke 9 dan 10 tikus diberikan ekstrak jintan hitam peroral sebanyak 0,3 ml.

b. Gambaran Histopatologi

Sediaan mikroskopis dengan pewarnaan HE diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x10 pada 5 lapang pandang kemudian ditentukan persentasenya. Kerusakan yang dinilai adalah hepatosit yang mengalami degenerasi, dimana hepatosit terlihat membengkak, tampak edematosa (degenerasi balon), dengan sitoplasma iregular bergumpal dan rongga-rongga jernih yang lebar (Robbins dkk, 2007). Tiap lapangan pandang

dihitung dalam bentuk persentase antara rentang 0% - 100% berdasarkan kriteria diatas.

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan program SPSS versi 17.0. Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data (Saphiro-Wilk). Jika varian data distribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan metode *one way annova*. Jika varian data tidak berdistribusi normal maka alternatifnya dipilih uji Kruskal-Wallis. Hipotesis akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan analisis *pos hoc* test, yaitu dengan uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2009).