

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Kandang Hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Biologi Umum Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi untuk pembuatan serbuk jamur, ekstrak kasar PSK. Laboratorium Histologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi untuk pembuatan serta pengamatan preparat hati. Untuk isolasi dan pemurnian PSK di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga. Uji enzim SGPT dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Februari sampai Agustus 2012.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit jantan jenis *Mus musculus* L., berumur 8-12 minggu, berat badan sekitar 25-30 gram yang diperoleh dari Instalansi Kandang Hewan Percobaan (IKHP) Pusvetma Surabaya.

3.2.2 Bahan penelitian

Jamur *Coriolus versicolor* diperoleh di hutan Sumber Kecamatan Jatirejo Kabupaten Mojokerto dan Lamongan dengan ciri-ciri sebagai berikut: berbentuk setengah lingkaran dengan diameter 3-5 cm, pipih, tipis, dan keras, permukaan atasnya beludru dan memiliki zona konsentris yang menarik dengan berbagai warna. Selanjutnya dilakukan pemurnian untuk mendapatkan polisakarida krestin.

Bahan yang digunakan untuk isolasi dan pengukuran kadar polisakarida krestin yaitu: *aquadest*, *aquabidest*, ammonium sulfat, *phosphate buffered saline* (PBS), *phenol* dan *sulphuric acid*.

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat sediaan hati yaitu: kloroform, *buffered formalin*, etanol 70%, 80%, 96% dan absolut, *xylol*, parafin, *hematoxylin*, *eosin*, etanol asam.

Bahan yang digunakan untuk pengujian kadar enzim SGPT yaitu: serum darah, R1 yang terdiri dari TRIS, L-Alanine, dan LDH (lactate dehydrogenase), dan R2 yang terdiri dari 2-oxoglutarate.

3.2.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini antara lain kandang berupa bak plastik berukuran 30 x 13 x 19 cm dengan tutup dari kawat kasa, *dissecting set*, jarum injeksi ukuran 24G, *disposable syringe* 1 ml, cawan petri, timbangan digital, tabung dialisis, gelas ukur, *beaker glass*, *ependorf*, *sentrifuge*, *magnetic stirrer*, blender, tabung *erlenmeyer*, *rotary evaporator*, *Whatman paper* no. 41, tabung anestesi,

vortex, mikropipet, mikroskop cahaya, botol fiksatif, *staining jar*, papan parafin, tabung reaksi, oven, *freeze dryer* dan spektrofotometer. Sebagian alat dapat dilihat pada lampiran 6.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap koleksi dan pembuatan serbuk jamur *Coriolus versicolor*

Tubuh buah dari jamur *Coriolus versicolor* dikoleksi dari hutan Sumber Kecamatan Jatirejo Kabupaten Mojokerto dan Lamongan. Umumnya jamur ini ditemukan pada bongkahan kayu yang telah mati dan biasanya tumbuh saat musim hujan. Jamur yang telah diperoleh diidentifikasi, kemudian dicuci dengan air sampai bersih kemudian dikering-anginkan. Selanjutnya, jamur dipotong kecil-kecil lalu dimasukkan dalam oven pada suhu 40⁰ C selama 24 jam untuk menghilangkan kandungan airnya. Setelah 24 jam, jamur dihaluskan dengan cara diblender sampai menjadi serbuk kasar (Wahyuningsih dkk., 2009)..

3.3.2 Tahap pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor*

Pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor* dilakukan menurut metode Wahyuningsih dkk (2009) dengan cara sebagai berikut: serbuk kasar sebanyak 200 gram ditambah air sebanyak 3 liter dan dipanaskan pada suhu 80⁰-98⁰ C selama 2-3 jam untuk melarutkan polisakarida. Kemudian, supernatan disaring dengan menggunakan saringan. Selanjutnya disaring lagi menggunakan kertas saring. Residu yang ada diambil untuk diekstrak lagi sebanyak 2 kali ekstraksi dengan penambahan

air sebanyak 2 liter untuk tiap ekstraksi dan dipanaskan pada suhu 80° - 98° C selama 2 jam. Hasil yang didapat berupa supernatan dari ketiga ekstraksi \pm 2 liter dan disimpan dalam suhu 4° C.

3.3.3 Tahap isolasi polisakarida krestin (PSK)

Isolasi polisakarida krestin dilakukan menurut Cui dan Christi (2003) dan Wahyuningsih dkk (2009) dengan cara sebagai berikut: larutan ekstrak jamur difiltrasi menggunakan kertas *Whatman* no.41 dengan corong *buchner* dan vakum kemudian diambil supernatannya. Supernatan dlioofilisasi menggunakan *freeze drying*, untuk 150 ml dilakukan liofilisasi selama \pm 24 jam (Lampiran 1). Kemudian serbuk kering ekstrak jamur dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 90% dengan menimbang 30 gr ammonium sulfat yang dilarutkan dalam akuades 50 ml kemudian diresuspensi menggunakan mikropipet. Kemudian dilakukan penambahan ekstrak jamur kering sebanyak 1 gram kemudian distirer selama \pm 20 menit pada suhu 4° C selanjutnya disentrifus (9000 rpm/40 menit, 4° C) dan diambil peletnya. Pelet dilarutkan dengan 30 ml larutan salin selanjutnya didialisis menggunakan membran nitroselulosa selama 24 jam di dalam PBS pada suhu 4° C. Kemudian dilanjutkan *freeze drying* kembali.

3.3.4 Tahap penentuan konsentrasi polisakarida krestin (PSK)

Pengukuran konsentrasi polisakarida krestin dengan *phenol-sulphuric acid* dilakukan menurut metode Wahyuningsih dkk (2009), dan didapatkan persamaan

regresi linearnya $y = 0,008x - 0,079$, dengan y adalah nilai OD dan x adalah konsentrasi polisakarida. Kemudian membuat 2 blanko lagi yang berisi masing-masing 100 μ l akuades. Selanjutnya, membuat larutan sampel yang berisi ekstrak polisakarida krestin dari tubuh buah jamur *Coriolus versicolor* sebanyak 50 μ l dan ditambah 50 μ l akuades. Blanko dan larutan sampel ditambah 50 μ l *phenol* 80%, lalu divorteks. Larutan tersebut masing-masing ditambah 2 ml H_2SO_4 . Kemudian dilakukan pembacaan nilai OD pada panjang gelombang 490 nm. Nilai OD yang dapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi di atas untuk mendapat konsentrasi PSK (Lampiran 2).

3.3.5 Tahap aklimatisasi hewan coba

Sebelum diberi perlakuan, hewan coba dipelihara terlebih dahulu selama 7 hari untuk penyesuaian diri terhadap lingkungan laboratorium (aklimatisasi).

3.3.6 Tahap pemeliharaan

Pemeliharaan mencit dilakukan dalam rumah hewan yang dilengkapi dengan rak-rak kandang. Kandang mencit berupa bak plastik yang ditutupi dengan kawat kasa dan diberi alas sekam, dilengkapi dengan botol minum. Pakan yang diberikan berupa pakan kelinci, yang diberikan pada mencit antara pukul 09.00-11.00 WIB. Minuman yang diberikan berupa air PDAM, yang diberikan secara *ad libitum*.

3.3.7 Tahap perlakuan

Semua pemberian PSK dilakukan dengan dosis tunggal secara *gavage* (Lihat lampiran 6) selama 5 hari dalam seminggu selama 62 hari kemudian diamati hasilnya. Penentuan dosis berdasarkan penelitian yang dilakukan Jian *et al.*, (1999). Perlakuan dan kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. P0 : kelompok kontrol, mencit diberi akuades sebagai kontrol normal
2. P1 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 1,5 mg/kg BB
3. P2 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 3 mg/kg BB
4. P3 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 6 mg/kg BB

3.3.8 Tahap pembuatan sediaan hati

Pembuatan sediaan hati dilakukan menurut metode Mandasari (2011). Hewan coba dikorbankan menggunakan kloroform. Jika mencit sudah mati, segera dibedah. Kemudian organ hati diambil, dibersihkan dengan larutan salin, lalu dimasukkan ke dalam larutan *buffered formalin*. Selanjutnya di *washing* dengan air mengalir selama 2 jam. Setelah di *washing*, dehidrasi dengan etanol 70% sebanyak 3 kali masing-masing 30 menit, dehidrasi dengan etanol 80% sebanyak 2 kali masing-masing 30 menit, dehidrasi dengan etanol 90% satu kali selama 30 menit, dehidrasi dengan etanol absolut satu kali selama 30 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam *xylol* selama 15 menit dan diganti dengan *xylol* murni semalam. Selanjutnya organ hati secara berturut-turut dimasukkan dalam larutan *xylol* : parafin = 1:1 selama 30 menit, parafin I, parafin II, dan parafin III masing-masing selama 60 menit.

3.3.9 Tahap pewarnaan sediaan hati

Pewarnaan sediaan hati dilakukan menurut metode Mandasari (2011). Sediaan irisan hati yang sudah menempel di gelas obyek dideparafinisasi dalam *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 2-5 menit, kemudian hidrasi dengan etanol bertingkat mulai dari absolut hingga air.

Sediaan hati diwarnai dengan *haematoxylin* selama 5 sampai 10 menit, kemudian dicuci di air dan diferensiasi dalam etanol asam (1% HCl dan 70% etanol). Selanjutnya dicuci di air dan diwarnai dengan *eosin* selama 1 sampai 2 menit. Lalu dicuci kembali dengan air. Kemudian didehidrasi dengan etanol bertingkat mulai dari konsentrasi 70% hingga absolut. Setelah itu dimasukkan ke dalam *xylol* sebanyak 2 kali.

3.3.10 Pemeriksaan hepatosit yang mengalami kerusakan

Setiap preparat organ diamati di bawah mikroskop cahaya dalam 4 lapang pandang, sesuai dengan arah jarum jam pada jam 3, jam 6, jam 9, dan jam 12 (Husen dan Winarni, 2005), dengan menggunakan *grateculae* dan perbesaran 400x. Kemudian dibuat persentase pada jumlah hepatosit normal maupun yang mengalami kerusakan. Menurut Widyarini (2010), kerusakan hepatosit meliputi pembengkakan sel, perubahan hidropik dan nekrosis. Pembengkakan sel merupakan degenerasi yang sangat ringan dan sangat reversibel. Sel-sel hati tidak dapat mengeliminasi air yang masuk ke dalam sel sehingga tertimbun di dalam sel, sehingga sel mengalami pembengkakan dengan sitoplasma yang tampak keruh dan terdapat granula-granula di

dalamnya akibat endapan protein. Sedangkan perubahan hidropik ditandai dengan hepatosit akan nampak vakuola berisi air dalam sitoplasma yang tidak mengandung lemak atau glikogen. Apabila kerusakan ini berlanjut maka terjadi nekrosis, yaitu terjadi perubahan inti dan hepatosit mengalami kematian.

3.3.11 Tahap pengambilan serum darah pada hewan coba

Hewan coba yang masih hidup dikorbankan menggunakan kloroform. Kemudian diambil serum darahnya melalui *intracardiac* dan dimasukkan ke dalam tabung *sentrifuge* lalu diletakkan secara miring. Setelah itu, diletakkan di dalam kulkas semalam. Kemudian *disentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4⁰ C selama 15 menit dan diambil serumnya. Serum disimpan dalam suhu -20⁰ C sampai pengukuran enzim GPT dilakukan

3.3.12 Tahap pengukuran kadar enzim GPT dalam serum

Pengujian kadar SGPT adalah sebagai berikut: membuat monoreagent yang digunakan sebagai larutan blanko untuk kalibrasi. Cara membuat monoreagent yaitu 1000 µl R1 dicampur dengan 250 µl R2 kemudian diabsorbansi dengan λ 365 nm. Langkah selanjutnya adalah membuat sampel, yaitu 10 µl serum darah dicampur dengan 1000 µl R1 kemudian didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya ditambah R2 sebanyak 250 µl lalu dibaca di spektrofotometer pada panjang gelombang 365 nm pada menit ke 1, 2, 3, dan 4. Untuk menentukan kadar SGPT digunakan rumus:

$$\text{Kadar SGPT} = \frac{(A1 - A2) + (A2 - A3) + (A3 - A4)}{3} \times 3971$$

Keterangan: A = waktu pengamatan

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pada enam kelompok dengan enam kali ulangan.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang akan diamati adalah:

1. Variabel bebas, yaitu dosis polisakarida krestin (PSK).
2. Variabel terikat, yaitu presentase hepatosit normal, presentase kerusakan hepatosit berupa pembengkakan sel, hidropik dan nekrosis serta kadar SGPT.
3. Variabel terkontrol, yaitu jenis hewan coba, umur hewan coba, berat badan hewan coba, jenis jamur, kebersihan kandang, jenis pakan, air minum dan waktu perlakuan.

3.6 Cara Memperoleh Data

Gambaran hepatosit yang mengalami kerusakan didapat dengan mengamati preparat sediaan hati di bawah mikroskop cahaya, sedangkan kadar SGPT didapat

dari hasil pengujian menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.7 Analisis Data

Data kerusakan hepatosit dan kadar SGPT diuji normalitas dan homogenitasnya. Setelah data normal dan homogen dianalisis dengan *one way anova* yang dilanjutkan dengan uji Duncan untuk menentukan perbedaan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$

