

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan uji dengan *posttest only control group design*

B. Subjek Penelitian

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat badan ± 20 gram yang di peroleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Mencit BALB/c jantan di beri perlakuan aklimatisasi, di pelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan yang sama, diberi pakan standart BRI.

Penentuan jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan perhitungan dengan rumus Federer (Faderer, 1963 dalam Prasetyo, 2010).

$$\text{Rumus Federer : } (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

N : Jumlah subjek tiap kelompok penelitian

T : Jumlah kelompok dalam penelitian

Terdapat 6 kelompok penelitian sehingga perhitungan banyaknya subyek penelitian: $(n-1) (t-1) \geq 15$

$$n \geq 5$$

Pada perhitungan dengan rumus Federer subjek minimal yang dibutuhkan tiap kelompok lebih besar sama dengan 5 sehingga pada penelitian ini dibutuhkan 5 ekor hewan uji tiap kelompok. Jumlah mencit yang diperlakukan dalam penelitian ini adalah 30 ekor. Sebanyak 30 ekor mencit diadaptasi selama 1 minggu, kemudian mencit dibagi menjadi 6 kelompok secara simple random sampling, masing-masing terdiri dari 5 ekor.

Keenam kelompok tersebut diberikan perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok I tanpa diberi perlakuan sebagai kontrol normal (K-N)
2. Kelompok II sebagai kontrol hanya disensitisasi dengan OVA saja (K-OVA)
3. Kelompok III diberi perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kg bb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P1)
4. Kelompok IV diberi perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 350 mg/kg bb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P2)
5. Kelompok V diberi perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kg bb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P3)
6. Kelompok VI sebagai kontrol positif dengan pemberian metilprednisolon peroral dengan dosis 0.13 mg/mencit/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-MP).

Pemberian ekstrak *Citrullus lanatus* dilakukan peroral selama 28 hari.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam waktu lima bulan. Tempat penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel

- a. Variabel bebas: dosis *Citrullus lanatus*
- b. Variabel tergantung: jumlah sel goblet duodenum
- c. Variable terkendali: mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat \pm 20 gram yang dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu, dipelihara dalam kandang, pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades.

2. Definisi operasional

- a. Ekstrak *Citrullus lanatus*

Ekstrak yang diperoleh dari daging buah *Citrullus lanatus* matang dan berwarna merah. Buah *Citrullus lanatus* tersebut berasal dari daerah Sentolo, Kulon Progo, Yogyakarta. Daging buah *Citrullus lanatus* yang sudah kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 80%. Ekstrak etanol diberikan per-oral menggunakan sonde. Dosis ekstrak sebesar 175 mg/kg bb/hari pada kelompok III, 350 mg/kg bb/hari pada kelompok IV, 700 mg/kg bb/hari pada kelompok V.

b. Proliferasi sel goblet duodenum

Jumlah sel goblet duodenum diamati secara histologis dengan teknik pewarnaan HE menggunakan perbesaran 400x pada sepuluh lapang pandang.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spuit injeksi tuberculin 1 cc, alat biopsi, gunting bedah, seperangkat alat pembuatan preparat histology dengan pewarnaan HE, kapas, kandang mencit diberi kode, mikroskop cahaya dan optilep.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah *Citrullus lanatus* diperoleh dari daerah Sentolo, Kulon Progo, Yogyakarta; mencit galur BALB/c umur 8 minggu berat 20 gram; pakan dan minum adlibitum; etanol 80% untuk pembuatan ekstrak; alkohol 70%; akuades 3 liter; ovalbumin dengan merk *Merck*; formalin 10% untuk pengawetan organ setelah pembedahan; pengecatan *hematoxylin eosin*; Metilprednisolon.

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol *Citrullus lanatus*

Buah semangka (*Citrullus lanatus*) dibuat ekstrak etanol menurut penelitian sebelumnya dengan cara sebagai berikut :

- a. *Citrullus lanatus* disiapkan sebanyak 10 kg, dicuci lalu diiris tipis, kemudian dikeringkan dalam mesin *freeze drying* agar kering.
- b. *Citrullus lanatus* yang sudah kering dihaluskan dengan blender menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia.

- c. Simplisia ditimbang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 80% sampai terendam seluruhnya selama ± 24 jam dengan perbandingan simplisia : etanol 80% = 1 : 10 pada suhu ruangan selama 5 x 24 jam sambil sesekali diaduk sampai semua komponen terekstraksi.
- d. Setelah 24 jam, ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung pada toples kaca. Sisa bahan penyaringan direndam lagi dengan etanol (remaserasi) selama 2 x 24 jam, sama seperti perendaman yang dilakukan sebelumnya.
- e. Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring.
- f. Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam *water bath* menggunakan *rotary evaporator*. Hasil penguapan berupa ekstrak kental ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya. Setelah ditimbang didapatkan hasil ekstrak *Citrullus lanatus* sebesar 136,01 gram.

2. Uji efek antiinflamasi mencit BALB/c diinduksi Ovalbumin

- a. Persiapan, pengelompokkan dan aklimatisasi subyek uji mencit BALB/c sebanyak 30 ekor, umur 8 minggu dengan berat ± 20 gram dibagi menjadi 6 kelompok lalu diletakkan dalam kandang plastik yang ditutup dengan anyaman kawat. Mencit dipelihara dan diberi makan dan minum yang sama yaitu BR I dan akuades. Sebelum diberikan perlakuan untuk penelitian, mencit diadaptasikan selama 1

minggu terlebih dahulu di kandang pemeliharaan. Selama penelitian mencit ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan.

b. Uji efek antiinflamasi ekstrak *Citrullus lanatus*

Perlakuan terhadap hewan uji pada penelitian ini meliputi pemberian ekstrak *Citrullus lanatus* dilakukan peroral selama 28 hari dan sensitisasi mencit BALB/c menggunakan OVA secara intraperitoneal dan peroral. Sensitisasi intraperitoneal dilakukan pada hari ke-15 dan hari ke-22 dengan 0,15ml/mencit OVA dalam NaCl dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan pada 7,75 ml natrium klorida. Sensitisasi berikutnya pada hari ke-23 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar peroral dengan 0.15ml/mencit OVA dalam akuades dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 7,75 ml akuades.

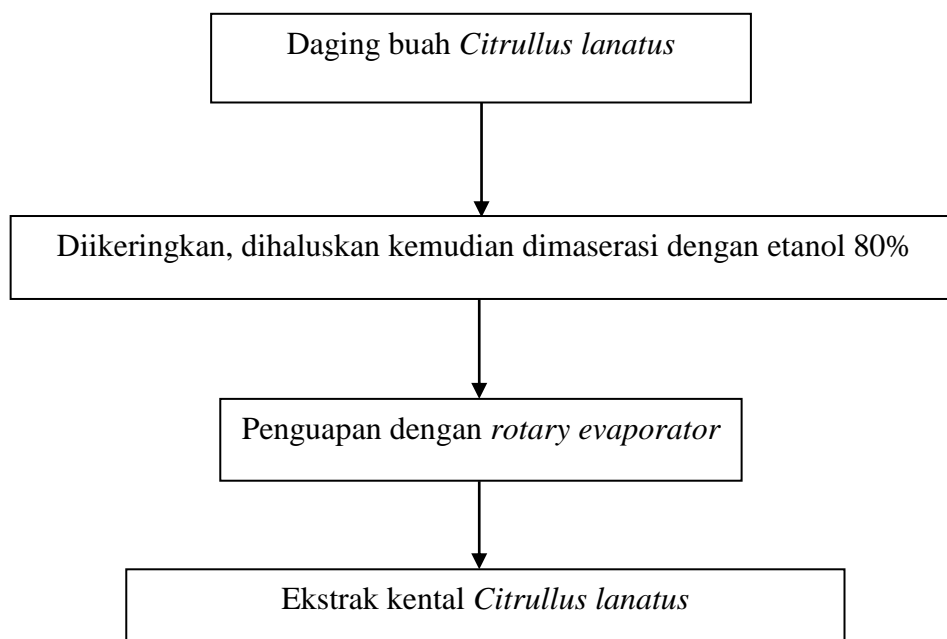
Mencit dikorbankan 24 jam setelah pemaparan OVA yang terakhir. Hewan diletakkan terlentang pada gabus yang dilapisi *aluminium foil*. Kulit abdomen mencit dibuka dengan gunting, sehingga tampak lapisan mesenterium dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat dengan jelas. Bagian saluran pencernaannya yaitu duodenum (usus halus) bagian proksimal, distal dari bagian pilorus lambung diambil lalu disimpan dalam formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* (HE).

Pengamatan preparat histologi dilakukan pada perbesaran 400x dengan menghitung jumlah sel goblet tiap 100 sel epitel sebanyak 20 vili duodenum pada 10 lapang pandang tiap preparat hewan uji.

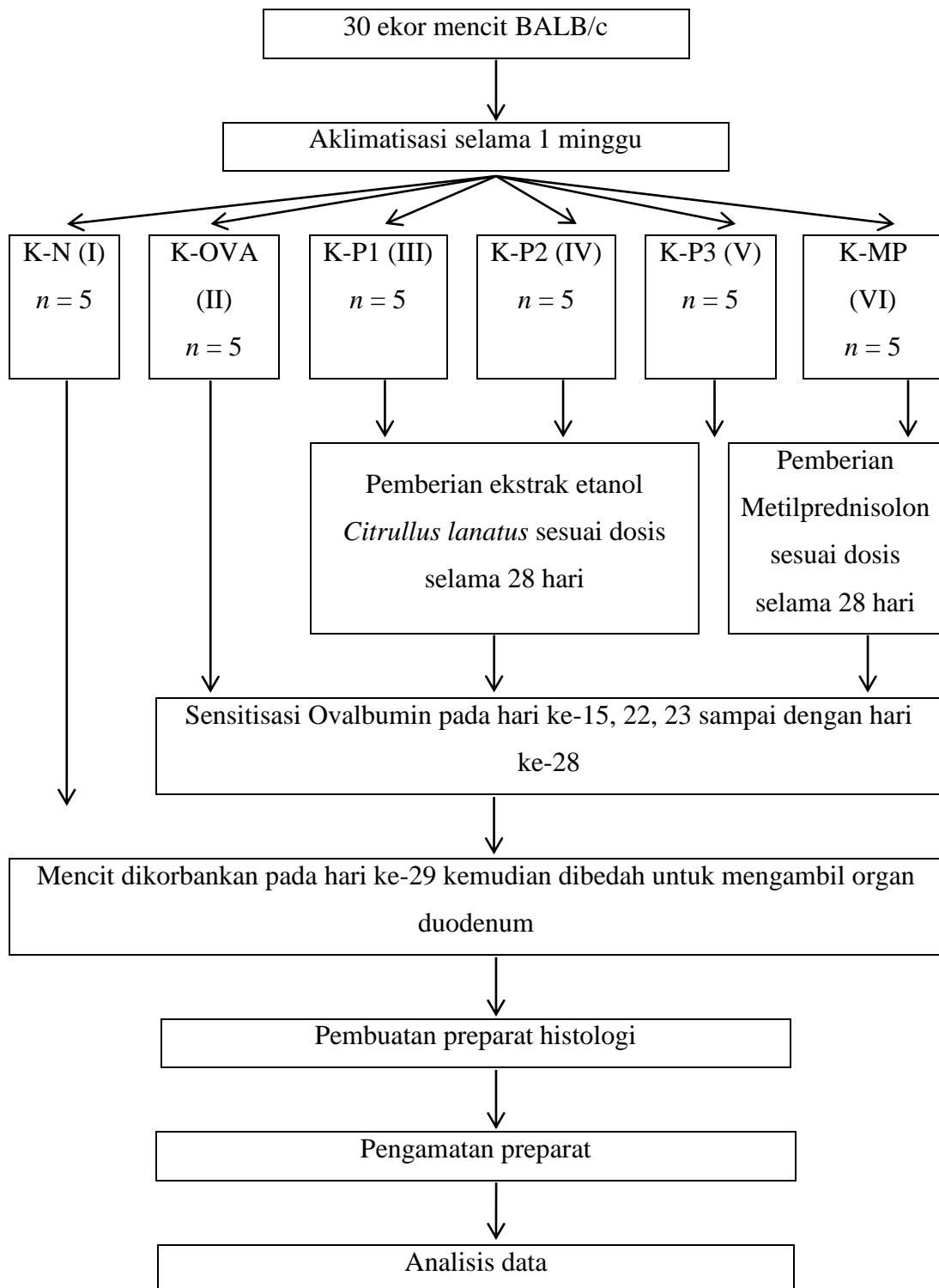
Cara kerja penelitian ini secara sistematis dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.

G. Analisis Data

Data penelitian ini berupa presentase perbandingan jumlah sel goblet dengan sel epitel yang diuji normalitas distribusinya dengan menggunakan *Shapiro Wilk*. Jika distribusi data normal, data dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan *Tukey test* untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan mencit. Jika distribusi data tidak normal, data dianalisis dengan *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.



Gambar 6. Pembuatan Ekstrak *Citrullus lanatus*



Gambar 7. Uji Ekstrak Etanol *Citrullus lanatus* Terhadap Jumlah Sel Goblet Duodenum Mencit BALB/c