

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan uji dengan *post-test only control group design*.

#### B. Subyek Penelitian

Hewan uji pada penelitian ini berupa mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat  $\pm 20$  gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Mencit BALB/c diberi perlakuan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades.

Perhitungan besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1963 dalam Syamsianah, 2015).

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

Keterangan:

$n$  = jumlah subyek tiap kelompok penelitian

$t$  = jumlah kelompok dalam penelitian

Terdapat 6 kelompok penelitian sehingga perhitungan banyaknya subyek penelitian:

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

$$n \geq 4$$

Hasil perhitungan dengan menggunakan rumus Federer subyek minimal yang dibutuhkan tiap kelompok lebih besar sama dengan 4 sehingga dibutuhkan 4

ekor hewan uji tiap kelompok. Jumlah mencit minimal yang dibutuhkan pada penelitian ini berjumlah 24 ekor.

Cara pengambilan sampel diambil dari mencit yang genetik dan sifatnya sama, untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan mencit sebelum dan sesudah perlakuan. Selama dalam pemeliharaan, mencit diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades. Mencit yang telah diaklimatisasi selama satu minggu, kemudian dibagi menjadi 6 kelompok secara *simple random sampling* yang masing-masing minimal terdiri dari 4 ekor.

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

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

### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas: ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kgbb/hari; 350 mg/kgbb/hari; dan 700 mg/kgbb/hari selama 28 hari berturut-turut.
2. Variabel tergantung: diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c.
3. Variabel terkontrol: mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat  $\pm$  20 gram yang dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kandang, pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades.

## E. Definisi Operasional

### 1. Ekstrak Etanol Buah *Citrullus lanatus*

Ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* adalah ekstrak yang didapatkan dari buah *Citrullus lanatus* matang yang dibuat menjadi simplisia, dimaserasi selama 7 hari menggunakan larutan penyari etanol 80% dan diuapkan hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak etanol diberikan peroral dengan alat bantu sonde pada mencit BALB/c dengan dosis sebesar 175 mg/kgbb/hari, 350 mg/kgbb/hari, dan 700 mg/kgbb/hari.

### 2. Mencit BALB/c Model Alergi

Mencit BALB/c model alergi adalah mencit yang dibuat alergi saluran pencernaan dengan cara sensitisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam Al(OH)<sub>3</sub>/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml aluminium hidroksida. Sensitisasi berikutnya dilakukan pada hari ke-22 intraperitoneal dengan 0.15 cc OVA dalam akuades/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Pada hari ke-23 hingga hari ke-28, mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades yang dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2.5 ml akuades. Mencit dikorbankan 24 jam setelah pemberian OVA yang terakhir (Subijanto, 2008; Meilandani, 2014).

### 3. Diameter Pulpa Alba Limpa

Pulpa alba merupakan salah satu kompartemen penyusun limpa yang terdiri atas PALS, folikel, dan zona marginal (Cesta, 2006). Preparat limpa dicat dengan teknik *hematoxylin eosin* kemudian diameter pulpa alba limpa

diamati secara histologis dengan mikroskop menggunakan optilab pada perbesaran 10x10 pada 10 lapang pandang (Makiyah, 2014). Data merupakan data kuantitatif yang didapat dengan menghitung diameter pulpa alba limpa. Diameter didapatkan dari rata-rata diameter maksimum transversal dengan diameter maksimum tegak lurus (Anggarasari *et al.*, 2014). Satuan yang digunakan adalah  $\mu\text{m}$ .

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa spuit injeksi tuberkulin 1 cc, alat biopsi, gunting bedah, seperangkat alat pembuatan sediaan histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE), kapas, kandang mencit diberi kode, mikroskop cahaya, dan optilab.

Bahan penelitian yang digunakan adalah buah *Citrullus lanatus*; mencit galur BALB/c umur 8 minggu, berat  $\pm 20$  gram; pakan dan minum *ad libitum*; etanol 80% untuk pembuatan ekstrak; alkohol 70%; akuades; Ovalbumin dengan merek *Merck*; formalin 10% untuk pengawetan organ setelah pembedahan; pengecatan *Hematoxylin Eosin*; dan Metilprednisolon.

#### **G. Jalannya Penelitian**

1. Pembuatan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus*
  - a. Buah *Citrullus lanatus* sebanyak 10 kg dicuci bersih lalu ditiriskan dan dipotong tipis. Potongan buah dimasukkan ke dalam mesin *freeze drying* agar kering.

- b. Setelah potongan buah benar-benar kering dan mudah dipatahkan dengan tangan, buah dihaluskan dengan *blender* menjadi partikel-partikel kecil yang disebut dengan simplisia.
  - c. Simplisia ditimbang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 80% 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. Setelah maserasi bahan disaring kembali.
  - e. Ekstrak hasil maserasi atau filtrat yang dihasilkan ditampung menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C, sampai pelarut habis menguap.
  - f. Hasil penguapan berupa ekstrak kental buah *Citrullus lanatus* ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya (Sogara, 2014; Prinarbaningrum, 2015).
2. Uji efek antialergi dengan model alergi Ovalbumin (OVA) pada mencit BALB/c
    - a. Persiapan, pengelompokkan dan aklimatisasi subyek uji

Mencit BALB/c sebanyak 30 ekor, umur 8 minggu, berat  $\pm$  20 gram dibagi menjadi 6 kelompok secara acak. Mencit dipelihara dan diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades. Sebelum diberi perlakuan untuk penelitian, mencit diaklimatisasi selama 1 minggu di kandang pemeliharaan. Selama penelitian mencit ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan mencit.

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/kgbb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P1).
- 4) Kelompok IV diberi perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 350 mg/kgbb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P2).
- 5) Kelompok V diberi perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kgbb/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).

b. Model alergi Ovalbumin pada mencit BALB/c

Hewan uji diberi ekstrak etanol *Citrullus lanatus* peroral selama 28 hari dan sensitisasi mencit BALB/c menggunakan OVA secara intraperitoneal. Sensitisasi intraperitoneal dilakukan pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam Al(OH)<sub>3</sub>/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml aluminium hidroksida dan pada hari ke-22 dengan 0.15 cc OVA dalam akuades/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Pada hari ke-23 hingga hari ke-28, mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades yang dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2.5 ml akuades.

3. Pembedahan mencit

Berikut langkah-langkah pembedahan mencit:

- 1) Mencit dikorbankan 24 jam setelah pemaparan OVA yang terakhir.  
Hewan uji diletakkan pada toples yang berisi kloroform hingga mati.
- 2) Hewan uji diletakkan terlentang pada gabus yang dilapisi *aluminium foil*. Setiap ekstremitas difiksasi menggunakan jarum pentul.
- 3) Kulit pada bagian perut didesinfeksi dengan alkohol 70%, lalu kulit abdomen dibuka dengan gunting bedah, sehingga tampak lapisan mesenterium dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat jelas.
- 4) Ambil bagian limpa yang menempel pada *curvatura mayor* lambung lalu disimpan dalam formalin 10% (Ariyani, 2015; Prinarbaningrum, 2015).

#### 4. Pembuatan preparat

Setelah mengorbankan mencit, dibuat preparat histologi dengan cara sebagai berikut:

- 1) Pengambilan jaringan sekecil mungkin namun masih representatif.
- 2) Fiksasi jaringan dengan cara merendam dalam formalin buffer fosfat 10% selama 24 jam kemudian diiris agar dapat dimasukkan dalam kotak untuk diproses dalam *tissue processor*.
- 3) Jaringan tersebut dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, toluene 1, dan toluene 2 masing-masing selama 2 jam.
- 4) Jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam sebanyak 2 kali kemudian diambil dengan pinset dilanjutkan dengan pemblokkan menggunakan blok parafin.
- 5) Pemotongan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 µm. Jaringan yang terpotong dikembangkan di atas air lalu ditangkap dengan gelas objek.
- 6) Keringkan pada suhu kamar dan preparat siap untuk diwarnai dengan *Hematoxylin Eosin* (HE) (Budiawan *et al.*, 2013).

Proses pewarnaan diawali dengan aplikasi reagen pewarnaan Mayer's Hematoksilin selama delapan menit, dibilas dengan air mengalir, dicuci dengan lithium karbonat selama 15-30 detik, dibilas kembali dengan air mengalir. Preparat dicelupkan ke dalam pewarna Eosin selama dua menit, dicuci dengan air mengalir, dan akhirnya dikeringkan. Sediaan dicelupkan ke dalam alkohol 90% sebanyak sepuluh kali celupan, alkohol absolut (pa) I sebanyak 10 kali



celupan, alkohol absolut (pa) II selama 2 menit, xylol (pa) I selama satu menit dan xylol (pa) II selama dua menit setelah kering. Perekat permount ditetaskan pada sediaan, ditutup dengan gelas penutup, dan dibiarkan kering. Sediaan siap diamati dan dianalisis menggunakan mikroskop setelah perekat kering (Sari, 2012).

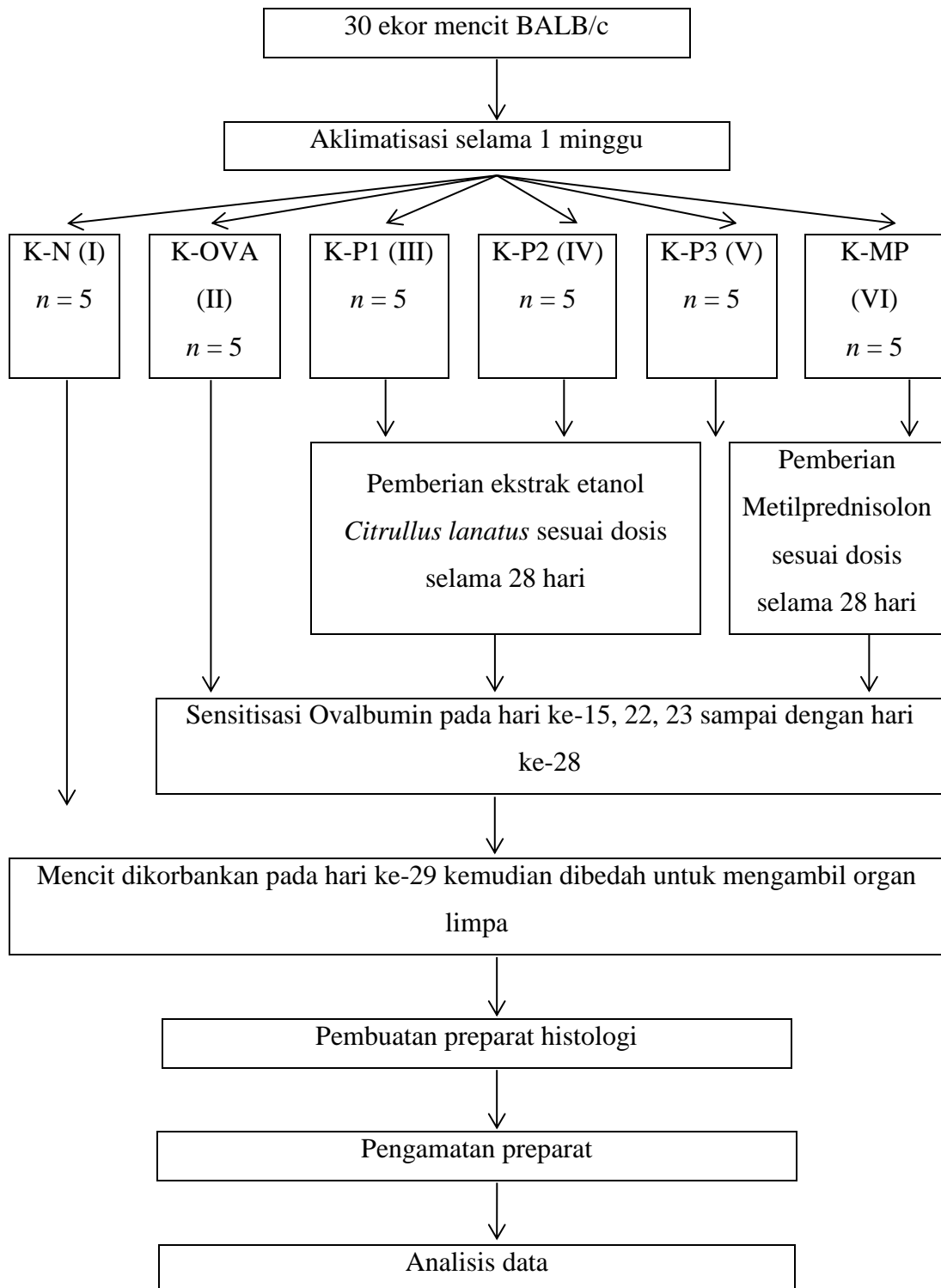
#### 5. Pengamatan preparat

Pengamatan preparat histologi dilakukan dengan mengukur diameter pulpa alba limpa pada tiap sampel hewan uji dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 10x10 pada 10 lapang pandang dengan optilab (Makiah, 2014). Data merupakan data kuantitatif yang didapat dengan menghitung diameter pulpa alba limpa. Diameter didapatkan dari rata-rata diameter maksimum transversal dengan diameter maksimum tegak lurus nya (Anggarasari *et al.*, 2014). Satuan yang digunakan adalah  $\mu\text{m}$ .

Cara kerja penelitian ini digambarkan secara sistematis pada gambar 6.

## H. Analisis Data

Data penelitian ini berupa rata-rata diameter pulpa alba limpa yang didapatkan diuji normalitas distribusinya dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*. Data dianalisis dengan *Kruskal-Wallis* karena distribusi data tidak normal dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.



Gambar 6. Alur Penelitian