

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan uji dengan *post-test only control group design* (Septiawati *et al.*, 2013).

B. Subyek Penelitian

Hewan uji dalam penelitian ini adalah mencit galur BALB/c jantan dengan usia 8 minggu dan berat ± 20 gram yang diperoleh dari Unit Pengelolaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada. Mencit BALB/c diberi perlakuan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang dengan pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades.

Jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan menggunakan rumus Federer (Salim, 2013).

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

Keterangan :

n = jumlah subjek tiap kelompok penelitian

t = jumlah kelompok dalam penelitian

sehingga perhitungan jumlah sampel :

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

$$n \geq 4$$

Penelitian ini akan menggunakan 6 kelompok hewan uji sehingga hasil perhitungan menggunakan rumus Federer didapatkan hasil $n \geq 4$, sehingga jumlah sampel tiap kelompok adalah 5 hewan uji.

Pengambilan sampel penelitian ini adalah mencit dengan genetik dan sifat yang sama. Untuk menghindari variasi umur dan berat badan maka dilakukan pengelompokan secara acak dan dilakukan penimbangan sebelum dan sesudah penelitian. Mencit diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades selama masa pemeliharaan. Mencit diaklimatisasi selama satu minggu kemudian dikelompokkan menjadi 6 kelompok secara *simple random sampling* yaitu kelompok I, II, III, IV, V dan VI dimana setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit (Geniosa, 2016).

Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok I : Kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan apapun (K-N)
2. Kelompok II : Kelompok kontrol hanya disensitisasi Ovalbumin
(K-OVA)
3. Kelompok III : Kelompok yang diberi perlakuan ekstrak etanol daging buah *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kgbb/hari peroral selama 28 hari dan disensitisasi dengan Ovalbumin (K-1)
4. Kelompok IV : Kelompok yang diberi perlakuan ekstra etanol daging buah *Citrullus lanatus* dosis 350 mg/kgbb/hari peroral selama 28 hari dan disensitisasi dengan Ovalbumin (K-P2)
5. Kelompok V : Kelompok yang diberi perlakuan ekstra etanol daging buah *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kgbb/hari peroral selama 28 hari dan disensitisasi dengan Ovalbumin (K-P3)

6. Kelompok VI : Kelompok kontrol positif yang diberi metilprednisolone peroral dengan dosis 0,13 mg/mencit/hari dan disensitisasi dengan Ovalbumin (K-MP)

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada sebagai tempat perlakuan pada mencit BALB/c.
- b. Laboratorium histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta sebagai tempat pengamatan hasil preparat organ duodenum mencit BALB/c.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama lima bulan.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : ekstrak etanol daging buah *Cirullus lanatus* dengan dosis 175 mg/kgbb/hari, 350 mg/kgbb/hari dan 700 mg/kgbb/hari yang diberikan pada mencit BALB/c selama 28 hari.
- b. Variabel tergantung : tebal epitel duodenum mencit BALB/c (Ambiyani, 2013).
- c. Variabel terkendali : mencit BALB/c jantan umur 8 minggu, berat ± 20 gram yang diberi perlakuan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades (Sumardi, 2010).

2. Definisi Operasional

a. Ekstrak etanol daging buah *Citrullus lanatus*

Ekstrak etanol daging buah *Citrullus lanatus* adalah ekstrak yang diperoleh dari daging buah *Citrullus lanatus* yang dibuat simplisia kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan larutan penyari etanol 80% kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak etanol diberikan peroral dengan bantuan sonde. Dosis untuk kelompok K-P1 adalah 175 mg/kgbb/hari, kelompok K-P2 adalah 350 mg/kgbb/hari dan kelompok K-P3 adalah 700 mg/kgbb/hari (Prinarbaningrum, 2015; Senja et al., 2014).

b. Mencit BALB/c model alergi saluran pencernaan

Mencit strain BALB/c disensitisasi secara intraperitoneal dengan ovalbumin (OVA). Mencit dipapar OVA secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 0,15 mg OVA dalam Al(OH)₃/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan dalam 7,75 ml alumunium hidroksida. Mencit kemudian dipapar OVA lagi pada hari ke-22 secara intraperitoneal dengan dosis 0,15 mg OVA dalam akuades/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilautkan dalam 10 ml akaudes. Pada hari ke-23 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar dengan OVA peroral dengan 0,15 ml OVA dalam akuades dibuat dari 2,5 mg OVA dalam 2,5 ml akuades. Mencit kemudian dikorbkan setelah 24 jam pemaparan OVA yang terakhir. (Prinarbaningrum, 2015).

3. Tebal Epitel Duodenum

Epitel duodenum adalah sel-sel epitel kolumnar yang melapisi vili pada lapisan mukosa duodenum (Eroschenko, 2010). Ukuran tebal epitel duodenum hewan uji diamati dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 x pada 4 lapang pandang, setiap lapang pandang diukur 4 epitel yang diukur dari membrana basal hingga ke ujung epitel tanpa mengukur brush border yang hasilnya dalam satuan mikron (Nurani, 2013).

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa spuit injeksi tuberkulin 1 cc, alat biopsi, gunting bedah, seperangkat alat pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE, kandang mencit yang diberi kode, dan mikroskop cahaya.

2. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah semangka (*Citrullus lanatus*) yang berasal dari daerah Sentolo, Kulon Progo, Yogyakarta, mencit galur BALB/c umur 8 minggu dengan berat ± 20 gram, pakan dan minum *ad libitum*, etanol 80% untuk pembuatan ekstrak, alkohol 70%, akuades 3 liter, Ovalbumin dengan merk *Merck*, formalin 10% untuk pengawetan organ setelah dilakukan pembedahan, pengecatan *Hematoxylin Eosin* dan Metilprednisolon.

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus*
 - a. Buah *Citrullus lanatus* disiapkan sebanyak 10 kg, dikupas, dicuci bersih lalu diiris tipis kemudian dikeringkan menggunakan mesin *freeze drying*.
 - b. Buah *Citrullus lanatus* yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender* menjadi simplisia atau partikel-partikel yang kecil.
 - c. Simplisia ditimbang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 80% sampai terendam seluruhnya dengan perbandingan simplisia : etanol 80% = 1 : 10 pada suhu ruangan selama 5 x 24 jam sambil diaduk sesekali 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 diremaserasi, 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*.
 - g. Hasil penguapan berupa ekstrak kental ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya. (Sogara, 2014; Prinarbaningrum, 2015).
2. Uji Antiinflamasi mencit BALB/c diinduksi Ovalbumin
 - a. Persiapan, pengelompokan dan aklimatisasi subyek uji

Mencit BALB/c usia 8 minggu sebanyak 30 ekor dengan berat ± 20 gram dibagi menjadi 6 kelompok secara acak kemudian diletakkan dalam kandang plastik yang ditutup dengan anyaman kawat. Mencit dipelihara dan diberi makan yang sama yaitu BR 1 dan akuades. Mencit diadaptasi selama 1 minggu di dalam kandang pemeliharaan sebelum dilakukannya perlakuan. Selama penelitian mencit ditimbang setiap minggu untuk memantau pertambahan berat badan mencit (Sumardi, 2010).

b. Induksi Ovalbumin pada mencit BALB/c

- 1) Mencit BALB/c jantan disensitisasi secara intraperitoneal dengan Ovalbumin.
- 2) Mencit diimunisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0,15 cc Ovalbumin dalam $\text{Al}(\text{OH})_3$ /mencit dari 2,5 mg Ovalbumin yang dilarutkan dalam 7,75 ml aluminium hidroksida.
- 3) Pada hari ke-22 mencit diimunisasi kembali secara intraperitoneal dengan 0,15 cc Ovalbumin dalam akuades/mencit dari 2,5 mg Ovalbumin yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Pada hari ke-23 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar peroral dengan 0,15 cc Ovalbumin dalam akuades yang dibuat dari 2,5 mg ovalbumin dalam 2,5 ml akuades.
- 4) Mencit dikorbankan 24 jam setelah pemaparan terakhir Ovalbumin (Prinarbaningrum, 2015; Geniosa, 2016).

3. Pembedahan mencit

Cara pembedahan hewan uji dalam penelitian ini meliputi :

- a. Hewan uji diletakkan pada toples yang berisis kloroform hingga mati.
- b. Hewan uji diletakkan terlentang pada gabus yang dilapisi aluminium foil.
- c. Kulit pada bagian perut didesinfeksi menggunakan alkohol 70% kemudian kulit abdomen dibuka menggunakan gunting bedah steril sehingga lapisan mesenterium dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat dengan jelas.
- d. Hewan uji yang telah dikorbankan kemudian diambil organ duodenum bagian proksimal, distal dari bagian pylorus lambung kemudian disimpan dalam formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi (Prinarbaningrum, 2015).

4. Pembuatan Preparat

Tahap pembuatan preparat histologi dilakukan setelah mencit dikorbankan diambil organ yang akan diamati. Langkah-langkah pembuatan preparat adalah mengambil jaringan pada organ duodenum sekecil mungkin namun masih representatif. Fiksasi dengan cara merendam jaringan pada formalin buffer fosfat 10% selama 24 jam kemudian diiris agar dapat diproses dalam *tissue processor*. Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90% dan 96%, toluen 1 dan toluen 2 masing-masing selama 2 jam. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam parafin cair bersuhu 56° C selama 2x2 jam kemudian diambil dan diblok menggunakan paraffin blok.

Jaringan kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan tebal 4-5 μm lalu digenangkan pada air kemudian ditangkap menggunakan gelas objek kemudian dilakukan pengecatan menggunakan HE.

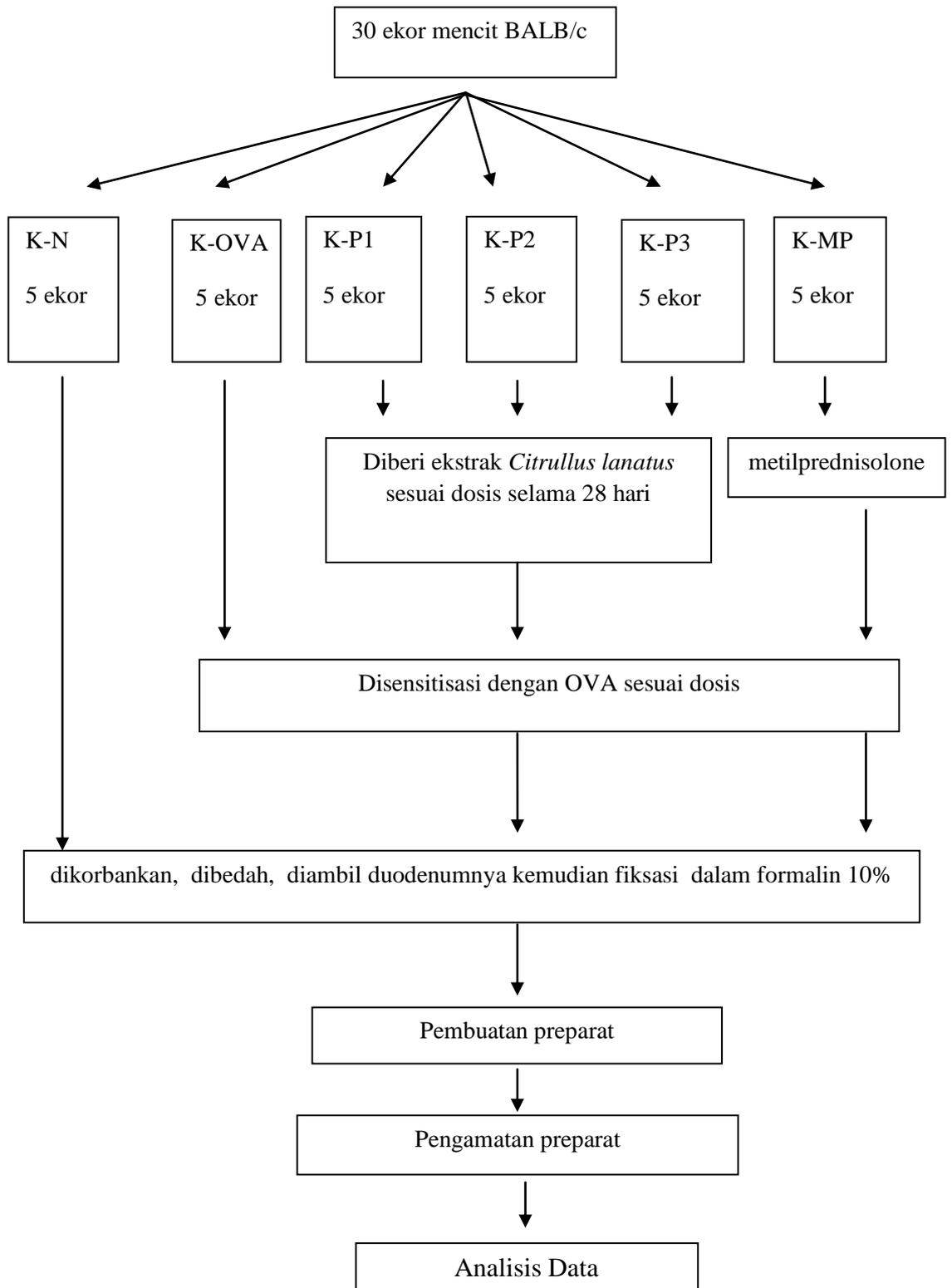
Proses pewarnaan diawali dengan aplikasi reagen pewarnaan Mayer's Hematoksilin selama delapan menit, dibilas dengan air mengalir, dicuci dengan lithium karbonat selama 15-30 detik, dibilas kembali dengan air mengalir. Preparat dicelupkan ke dalam pewarna Eosin selama dua menit, dicuci dengan air mengalir, 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. Perakat *permount* diteteskan 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 tebal epitel organ duodenum menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 x pada 4 lapang pandang (Nurani, 2013).

G. Analisis Data

Data penelitian ini berupa ukuran tebal epitel yang diuji normalitas distribusinya menggunakan *Kolmogorov Smirnov* karena jumlah sampel lebih dari 50. Data dianalisis menggunakan *One Way Anova* karena distribusi data normal dan dilanjutkan uji *Tukey* (Desiana, 2015).



Gambar 7. Alur Penelitian