

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Desain Penelitian**

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

##### **B. Subyek Penelitian**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c jantan, berat badan  $\pm 20$  g, umur 8 minggu 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 BR I.

Penentuan jumlah sampel yang diperlukan dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Federer, 1963 dalam Jaber, 2012).

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

Keterangan :

n = jumlah subjek tiap kelompok penelitian

t = jumlah kelompok dalam penelitian

sehingga, perhitungan banyaknya subjek penelitian :

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

$$n \geq 4$$

Pada perhitungan dengan rumus Federer subjek minimal yang dibutuhkan tiap kelompok lebih besar sama dengan 4 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 *C. papaya* dosis 175 mg/kgbb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P1)
4. Kelompok IV diberi perlakuan ekstrak etanol buah *C. papaya* dosis 350 mg/kgbb/hari dan disensitisasi dengan OVA (K-P2)
5. Kelompok V diberi perlakuan ekstrak etanol buah *C. papaya* 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)

Pemberian ekstrak etanol *C. papaya* dan Metilprednisolon dilakukan peroral selama 28 hari.

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

Penelitian ini dilakukan dalam waktu lima bulan. Tempat penelitian di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### **D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

#### **1. Variabel**

- a. Variabel bebas : dosis ekstrak etanol *Carica Papaya L.*
- b. Variabel tergantung : ukuran tebal epitel duodenum
- c. Variabel terkontrol : mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat 20 gram yang dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan yang sama, pakan standar BR-I.

#### **2. Definisi operasional**

- a. Ekstrak *Carica papaya L.*

Ekstrak diperoleh dari *Carica papaya L.* yang matang dan berwarna jingga didapat dari daerah Borobudur, Magelang. Buah *C. papaya* kemudian di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 80%. Ekstrak etanol diberikan per-oral menggunakan sonde. Dosis ekstrak meliputi 175 mg/kgbb/hari pada K-P1, 350 mg/kgbb/hari pada K-P2, dan 700 mg/kgbb/hari pada K-P3.

b. Tebal epitel duodenum

Ukuran tebal epitel duodenum diamati pada preparat histologis dengan teknik pewarnaan HE perbesaran 400x pada 4 lapang pandang yang hasilnya dalam satuan mikron (Nurani, 2013)

### **E. Alat dan Bahan Penelitian**

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

Bahan penelitian yang digunakan yaitu buah *Carica papaya L.* ; mencit galur BALB/c umur 8 minggu dengan berat 20 gram; pakan dan minum *adlibitum*; ovalbumin merk Merck; Metilprednisolon; etanol 80% untuk pembuatan ekstrak; alkohol 70%; akuades 3 liter; formalin 10% untuk pengawetan organ setelah pembedahan; pengecatan *hematoxyclyne eosin*.

### **F. Jalannya Penelitian**

#### **3. Pembuatan ekstrak etanol buah *Carica papaya L.***

Pembuatan ekstrak etanol *Carica papaya L.* diperoleh dengan cara sebagai berikut:

- a. Buah *Carica papaya L.* pascapanen, berwarna jingga merata disiapkan sebanyak 10 kg dicuci bersih, ditiriskan, dan dipotong tipis.
- b. Potongan buah selanjutnya dimasukkan dalam mesin *freeze drying* agar kering.

- c. Buah yang sudah benar-benar kering mudah dipatahkan dengan tangan, dihaluskan dengan *blender* menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia.
- d. Simplisia siap untuk dimaserasi dengan cara direndam dalam pelarut etanol 80% sampai terendam seluruhnya  $\pm$  24 jam.
- e. Setelah 24 jam, ekstrak etanol disaring dengan kertas penyaring. Residu kembali dimaserasi lagi dengan cara yang sama.
- f. Ekstrak hasil maserasi atau filtrat yang dihasilkan ditampung menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya.
- g. Penguapan dilakukan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 45-50<sup>0</sup>, sampai pelarut habis menguap, sehingga didapatkan ekstrak kental buah *Carica papaya L.*

#### **4. Uji efek antiinflamasi mencit BALB/c diinduksi Ovalbumin**

- a. Persiapan, pengelompokan dan aklimatisasi subyek uji

Mencit BALB/c sebanyak 24 ekor, umur 8 minggu dengan berat  $\pm$  20 gram dibagi menjadi 6 kelompok lalu diletakkan ke dalam kandang plastic 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 diadaptasi selama 1 minggu terlebih dahulu di kandang pemeliharaan. Selama penelitian, mencit ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badannya.

b. Induksi OVA pada mencit BALB/c

Perlakuan terhadap hewan uji pada penelitian ini meliputi :

- 1) Mencit BALB/c jantan disensitisasi dan *dichallenge* secara intraperitoneal dengan OVA.
- 2) Mencit diinduksi 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.
- 3) 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 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar lagi secara peroral dengan 0,15 cc OVA dalam akuades dibuat dari 2,5 mg OVA dalam 2,5 ml akuades
- 4) Mencit dikorbankan 24 jam setelah akhir pemaparan OVA

**5. Pembedahan mencit**

Cara pembedahan hewan uji dalam penelitian ini meliputi :

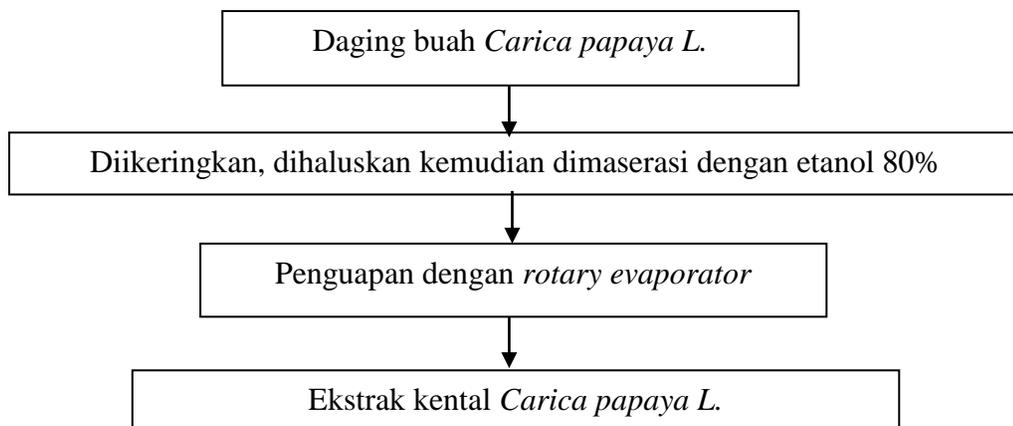
- a. Hewan uji dikorbankan dengan kloroform.
- b. Hewan uji yang telah mati diletakkan terlentang pada gabus yang dilapisi aluminium foil.
- c. Kulit abdomen dibuka dengan gunting, sehingga tampak lapisan mesenterium dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat dengan jelas.

- d. Bagian saluran pencernaannya yaitu duodenum (usus halus) bagian proksimal, distal dari bagian pylorus lambung diambil dan disimpan dalam formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi
- e. Dilakukan pengecatan menggunakan *Hematoxyclyne Eosin* (HE) untuk melihat penebalan epitel duodenum
- f. Mengukur tebal epitel duodenum pada tiap sampel hewan uji dengan mengamati menggunakan mikroskop perbesaran 400 x.

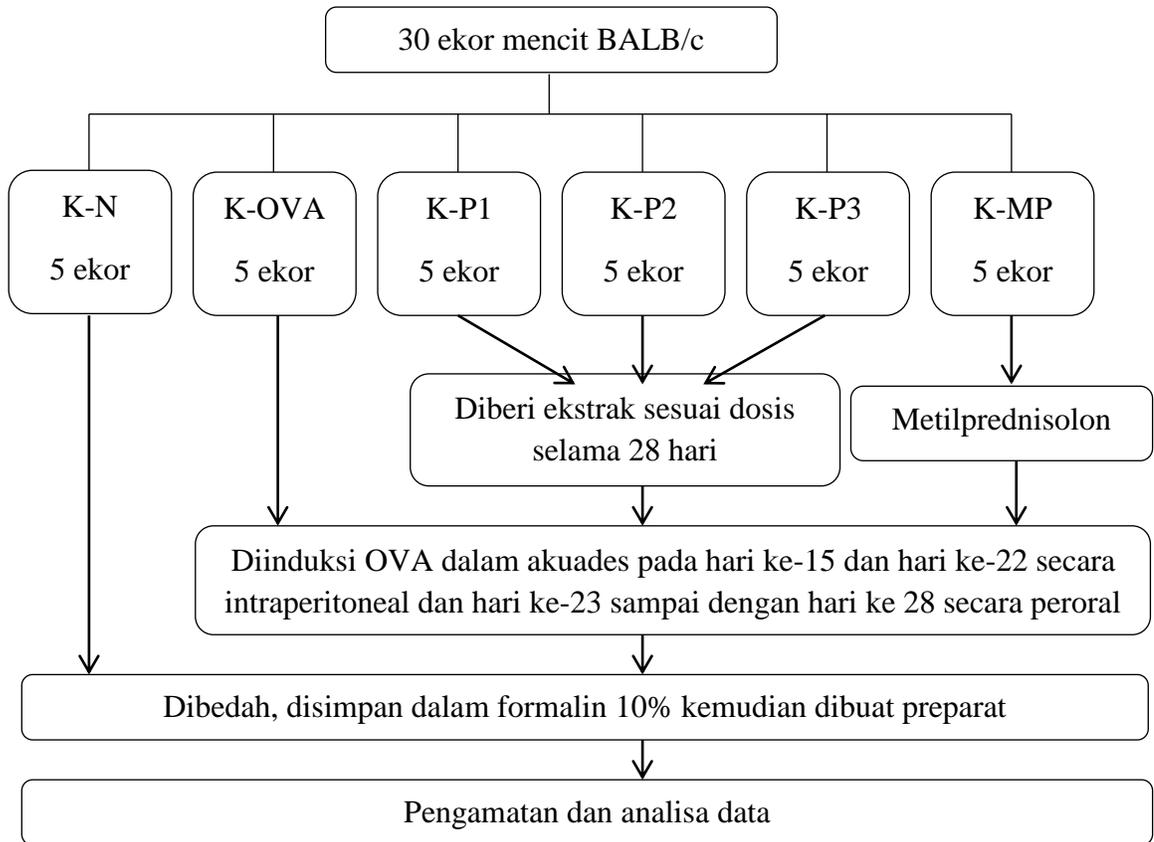
Skema pembedahan mencit dan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.

#### G. Analisis Data

Data penelitian ini berupa ukuran tebal 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 4. Pembuatan ekstrak *Carica papaya L.*



Gambar 5. Alur penelitian

