

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental in vivo pada hewan uji.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi UGM dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UMY. Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan dari bulan September 2017.

C. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini berupa 24 ekor mencit berjenis kelamin jantan, dengan berat badan 30 – 40 gram dan berumur \pm 8 minggu.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai dosis ekstrak biji labu kuning (*C. moschata*) yang diberikan secara per oral.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil pengamatan histologi organ hepar dan ginjal mencit.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/C berjenis kelamin jantan, usia \pm 8 minggu, dan berat badan 30 – 40 gram yang dipelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan yang sama, dan pakan AD II.

E. Definisi Operasional

1. Toksisitas subkronis adalah efek merugikan yang muncul akibat pemberian suatu bahan kimia secara berulang setiap hari kepada hewan percobaan dalam jangka waktu tertentu.
2. Ekstrak biji *C. moschata* adalah sediaan kental dari simplisia biji *C. moschata* yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.
3. Pengamatan histologi hepar adalah rerata skor histopatologi hepar yang dihitung berdasarkan skor kerusakan sel hepar Mandja Roenigk.
4. Pengamatan histologi ginjal adalah rerata skor histopatologi ginjal yang dihitung berdasarkan skor kerusakan sel ginjal.

F. Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: bejana, blender, *rotary evaporator*, penangas (*water bath*), corong, alat-alat gelas, kertas label, kompor listrik, timbangan analitik, seperangkat alat bedah, seperangkat alat pembuat preparat histologi, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: biji labu kuning, etanol 70%, *aquadest*, CMC Na 0,5%, kloroform, formalin 10%, pewarna HE, dan paraffin.

G. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Bahan

Biji *C. moschata* diperoleh dari daerah Purwodadi. Biji *C. moschata* dilakukan sortasi basah dan dikeringkan. Pengeringan ini dilakukan dengan cara pengeringan di bawah sinar matahari selama 3 hari. Tahap akhir yang dilakukan adalah sortasi kering untuk mendapatkan biji yang utuh dan tidak rusak.

2. Identifikasi Biji *C. moschata*

Identifikasi bahan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi di Fakultas Farmasi UGM. Hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan adalah benar biji *C. moschata*.

3. Ekstraksi

Biji *C. moschata* ditumbuk kemudian diserbuk halus menggunakan *blender*. Serbuk yang telah diperoleh sebanyak 900 gram kemudian

dimaserasi selama 5 hari menggunakan pelarut alkohol 70% sebanyak 750 ml. Maserat kemudian disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring hingga benar-benar jernih. Ampasnya diremaserasi selama 2 hari menggunakan pelarut alkohol 70% sebanyak 250 ml. Sese kali maserat diaduk agar homogen dan tersari sempurna. Ekstrak cair yang telah diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 90 rpm (Depkes, 1986).

4. Uji toksisitas Subkronik

a. Aklimatisasi

Sebelum mendapatkan perlakuan, 24 ekor mencit Balb/c jantan sehat, berusia \pm 8 minggu dengan berat badan 30 – 40 gram, mengalami masa adaptasi dan diberi ransum pakan standar dan minum selama 7 hari secara *ad libitum*. Proses aklimatisasi dilakukan di Laboratorium Biomedik FKIK UMY.

b. Pengelompokan Hewan Uji

Mencit BALB/C jantan normal dibagi menjadi 4 kelompok. Setiap kelompok terdiri atas 6 ekor mencit. Empat kelompok perlakuan tersebut adalah:

- a. Kelompok kontrol (K) : tidak diberi perlakuan (ekstrak), hanya diberi akuades per oral selama 30 hari
- b. Kelompok CM 400 : ekstrak biji *C. moschata* diberikan dengan dosis 400 mg/kgBB

- c. Kelompok CM 600 : ekstrak biji *C. moschata* diberikan dengan dosis 600 mg/kgBB
- d. Kelompok CM 900 : ekstrak biji *C. moschata* diberikan dengan dosis 900 mg/kgBB.

c. Pemberian Ekstrak Biji *C. moschata* dan Pengamatan

Pemberian perlakuan CMC Na 0,5% dan ekstrak biji *C. moschata* adalah dengan cara peroral menggunakan sonde selama 30 hari. Pengamatan yang dilakukan pada hewan uji dalam penelitian ini meliputi pengukuran berat badan, kerontokan bulu dan kematian hewan uji.

d. Pembedahan Mencit

Pada hari ke-31 Mencit terlebih dahulu dikorbankan dengan cara diberi kloroform. Mencit dibedah untuk diambil organ hepar dan ginjal. Organ tersebut difiksasi dengan formalin 10%.

e. Pembuatan Preparat Histologi Hepar dan Ginjal

Pembuatan preparat dimulai dengan memotong sampel organ hepar dan ginjal dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm, kemudian direndam dalam formalin 10%. Sampel organ selanjutnya diperkecil lagi dengan irisan tipis untuk disimpan dalam tissue cassette dan dilakukan fiksasi dalam larutan formalin 10%.

Setelah fiksasi, dilakukan proses dehidrasi dan clearing dengan satu sesi larutan yang terdiri dari: alkohol 70 %, alkohol 80 %, alkohol

90 %, alkohol 96 %, alkohol absolut, toluene, dan parafin, secara bertahap dalam waktu satu hari. Sampel organ di *blocking* dengan *embedding* set yang dituangi parafin cair kemudian didinginkan. Blok parafin yang sudah dingin dipotong menggunakan microtome dengan ketebalan $\pm 4 - 5$ mikron. Proses yang terakhir adalah pewarnaan dengan metode Harris Hematoxylin – Eosin dan mounting media (Jenova, 2009).

f. Pengamatan Preparat Histologi Organ Hepar dan Ginjal

1) Histologi Organ Hepar

Pengamatan dilakukan dengan cara menganalisis gambaran histologi atau mikroskopis hepar diperoleh dari setiap mencit yang dibuat masing-masing 1 preparat jaringan hepar. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x.

Dalam setiap preparat diambil data dari 5 lapang pandang pada setiap ulangan, kemudian data tersebut dihitung nilai rerata kerusakan sel hepar sesuai kategorinya dengan skor gambaran histologi hepar modifikasi Manja Roenigk (Tabel 1) (Siegmund, 2002).

Tabel 1. Skor gambaran histologis hepar modifikasi Manja Roenigk.

Skor	Integritas Gambaran Hepar
1	Normal tidak ada perubahan patologis
2	Degenerasi parenkimatosa
3	Degenerasi hidropik
4	Nekrosis

Data tersebut dijumlah dan diakumulasikan dengan menghitung persentase kerusakan. Data yang sudah diakumulasikan dengan menghitung persentase kerusakan. Data yang sudah diakumulasikan kemudian dijumlah dan dihitung reratanya, sehingga didapatkan nilai 1 ulangan dalam setiap perlakuan. Berikut rumus persentase menurut (Januar, 2014 cit Rofiqoh, 2015):

$$\text{Kerusakan sel (\%)} = \frac{\text{jumlah sel rusak}}{\text{jumlah sel keseluruhan}} \times 100\%$$

2) Histologi Organ Ginjal

Pengamatan preparat histologi ginjal mencit BALB/C dilakukan dengan mengamati dan menghitung jumlah kerusakan ginjal yang mengalami perdarahan dan jumlah sel peradangan PMN. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x pada 5 lapangan pandang. Kerusakan ginjal di nilai dari skor perdarahan serta jumlah sel peradangan PMN. Penilaian derajat kerusakan ginjal dihitung dengan skor kerusakan perdarahan dan peradangan seperti pada Tabel 2 dan 3 (Makiyah, 2005).

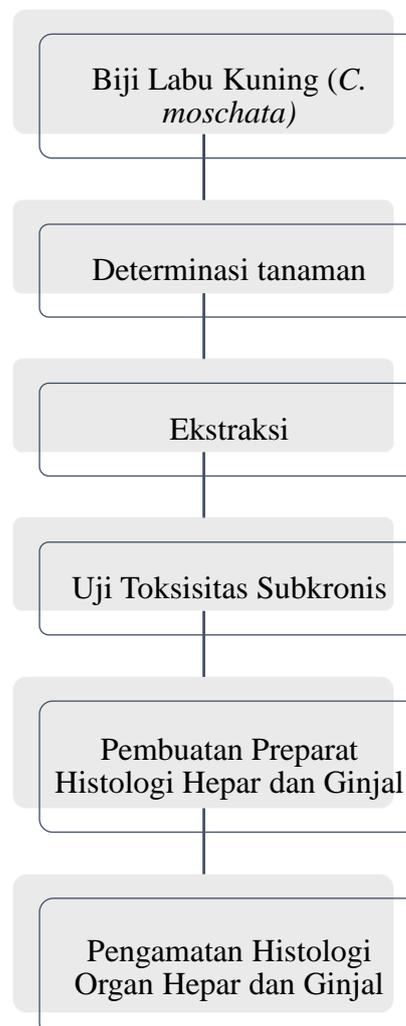
Tabel 2. Skor Perdarahan Ginjal

Skor	Area perdarahan per lapang pandang
0	Tidak ada perdarahan
1	Perdarahan <25%
2	Perdarahan 26 – 50%
3	Perdarahan 51 – 75%
4	Perdarahan 75 – 100%

Tabel 3. Skor Jumlah PMN Ginjal

Skor	Jumlah PMN
0	0
1	1 – 5
2	6 – 10
3	11 – 15
4	16 – 20
5	Terbentuk nodulus limfatikus

H. Skema Langkah Kerja



I. Analisis Data

Data yang berupa berat badan dan kematian di analisis secara deskriptif.

Data skor kerusakan hepar, skor perdarahan ginjal, dan skor jumlah PMN ginjal dianalisis statistik dengan Kruskal Wallis kemudian dilanjutkan dengan Mann Whitney.

