

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *invivo* pada hewan uji.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi biji *C. moschata* dan uji toksisitas dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY dan determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Penelitian dilakukan selama enam bulan dari bulan Oktober 2017 hingga bulan Maret 2018.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah mencit galur Balb/c yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Pada penelitian kali ini menggunakan 10 ekor mencit Balb/C untuk pengamatan uji toksisitas akut dan 6 ekor mencit Balb/C untuk pengamatan uji toksisitas subkronik dalam setiap kelompoknya.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian
 - a. Variabel bebas

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

b. Variabel tergantung

1. Uji toksisitas akut

Variabel tergantung untuk uji toksisitas akut pada penelitian ini adalah jumlah kematian hewan coba dan gejala klinis dalam durasi waktu 24 jam.

2. Uji toksisitas subkronis

Variabel tergantung untuk uji toksisitas subkronik pada penelitian ini adalah histologi organ lambung pada mencit meliputi skor jumlah sel Poli Morfo Nuklear (PMN) dan skor perdarahan.

c. Variabel Terkendali

Subjek penelitian yang digunakan berupa mencit dengan galur yang sama yaitu Balb/c, berjenis kelamin jantan, berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 25-35 gram yang diberi pakan BR1 dan minuman dari air sumur kampus UMY.

2. Definisi Operasional

- a. Biji labu *C. moschata* yang digunakan adalah biji yang nampak tua dengan bentuk lonjong, berwarna kuning kecoklatan dan berisi.
- b. LD50 merupakan suatu besaran yang diturunkan secara statistik, guna menyatakan dosis tunggal suatu senyawa yang dapat mematikan atau

menimbulkan efek toksik yang berarti pada 50% hewan coba setelah perlakuan.

- c. Preparat histologi lambung adalah objek atau gambaran struktur jaringan lambung yang diamati menggunakan mikroskop yang dipotong tipis dari organ lambung utuh yang telah difiksasi dan diberi pewarnaan Hematoxylin Eosin.
- d. Perdarahan lambung adalah salah satu manifestasi gambaran kerusakan lambung yang dapat terjadi karena adanya peradangan ataupun erosi mukosa lambung.
- e. Polimorfonuklear(PMN) adalah sel darah putih yang pertama kali muncul ketika terjadi peradangan pada organ. Sel PMN mempunyai bentuk nukleus yang bervariasi, berinti tiga dan bergranula.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 2, yaitu :

Tabel 2. Bahan untuk penelitian

No	Nama Bahan	Sumber/Merek Tipe
1	Etanol	Merck
2	Aquades	Bratachem
3	Formalin 10 %	Merck
4	Eter	
5	Hematoxylin Eosin (HE)	
6	Biji labu kuning	Purwodadi, Jawa Tengah
7	Mencit galur Balb/C	
8	Makanan dan minuman mencit	

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3, yaitu:

Tabel 3. Alat yang digunakan untuk penelitian

No	Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
1	Bejana	Stainless steel
2	Blender	HB Stainless
3	<i>Rotary evaporator</i>	Heidolph
4	Penangas	Akebonno
5	Propipet	Glasfirin
6	Mikropipet	Gilson
7	Timbangan analitik	Casbee
8	Alat-alat gelas	Pyrex
9	Sonde lambung	
10	Alat bedah	
11	Alat untuk membuat preparat histologi	

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak *C. moschata*

a. Pengumpulan bahan

Biji *C. moschata* didapatkan dari perkebunan di daerah Purwodadi kemudian disortasi untuk memisahkan biji dari daging buahnya. *C. moschata* dikeringkan menggunakan panas matahari selama 3 hari supaya biji tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Terakhir, dilakukan sortasi kering untuk mengumpulkan biji yang tua dengan bentuk lonjong, berwarna kuning kecoklatan dan berisi.

b. Identifikasi bahan

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

c. Pembuatan Ekstrak

Biji *C. moschata* ditumbuk kemudian diserbuk halus menggunakan blender. Sebanyak 1000 gram serbuk biji *C. moschata* dimaserasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 7500 ml selama 5 hari. Maserat kemudian disaring menggunakan kain flannel dan kertas saring hingga benar-benar jernih. Ampas biji *C. moschata* diremaserasi selama 2 hari menggunakan pelarut etanol sebanyak 2500 ml. Maserat diaduk sesekali agar homogen dan tersari sempurna. Ekstrak cair yang telah diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator dengan kecepatan 90 rpm pada suhu 50°C (Depkes RI, 1986).

2. Uji Toksisitas

a. Aklimatisasi

Sebanyak 64 ekor mencit Balb/c jantan sehat, berusia 2 – 3 bulan dengan berat badan 25 – 35 gram, mengalami masa adaptasi dan diberi pakan BR1 dan minum selama 7 hari secara ad libitum sebelum mendapatkan perlakuan. Proses aklimatisasi dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

b. Toksisitas akut

1. Pengelompokan hewan uji

Kelompok penelitian dibagi menjadi 4, yaitu :

- a. Kelompok Kontrol (K) : diberi perlakuan CMC Na 0,5%
- b. Kelompok Perlakuan 1 (CM 300) : diberi 300 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*
- c. Kelompok Perlakuan 2 (CM 2000) : diberi 2000 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*
- d. Kelompok Perlakuan 3 (CM 7500) : diberi 7500 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*
- e. Kelompok Perlakuan 4 (CM 15000) : diberi 15000 mg/kgBB ekstrak biji *C. Moschata*

2. Pemberian Ekstrak dan Pengamatan

Mencit dipuasakan selama 3-4 jam sebelum pemberian ekstrak *C. moschata* untuk mengosongkan lambung. Pemberian perlakuan ekstrak *C. moschata* pada mencit Balb/C dilakukan secara peroral.

Pengamatan uji toksisitas akut dilakukan selama 24 jam. Hewan uji diamati sebelum diberi perlakuan untuk mengetahui perubahan gejala yang terjadi dengan membandingkan gejala atau perilaku sebelum dan setelah perlakuan.

Kriteria pengamatan meliputi :

1. Aktivitas mencit : aktivitasvitas lokomotor turun, aktivitas lokomotor naik dan melompat-lompat
2. Reaksi yang aneh : berkeliling tanpa arah, menyeruduk, dan gerakan berputar-putar
3. Ekor abnormal : ekor kaku dan ekor lemas
4. Sianosis
5. Kematian

c. Uji Toksisitas Subkronis

1. Pengelompokan hewan uji

Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 sesuai dengan dosis yang akan diberikan dan 1 pada kelompok kontrol.

- a. Kelompok Kontrol (K) : diberi perlakuan CMC Na 0,5%
- b. Kelompok Perlakuan 1 (CM 400) : diberi 400 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*
- c. Kelompok Perlakuan 2 (CM 600) : diberi 600 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*
- d. Kelompok Perlakuan 3 (CM 900) : diberi 900 mg/kgBB ekstrak biji *C. moschata*

2. Pemberian Ekstrak dan Pengamatan

Pemberian perlakuan ekstrak *C. moschata* pada mencit Balb/C dilakukan secara peroral. Pengamatan uji toksisitas subkronik dilakukan selama 30 hari. Kriteria pengamatan meliputi :

- a. Data berat badan : pemeriksaan berat badan dilakukan seminggu sekali
- b. Pengamatan histologi lambung : analisis organ dilakukan setelah mencit dibedah.

3. Pembedahan mencit dan pengamatan mikroskopis lambung

Pada hari ke 31 dilakukan determinasi terhadap mencit menggunakan eter. Setelah itu mencit diposisikan pada papan bedah menggunakan penjepit. Mencit mulai dibedah dan diambil lambungnya. Lambung difiksasi menggunakan formalin 10%. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histologi terhadap lambung.

a. Pembuatan preparat histologi

Lambung dipotong dengan ukuran 0,3x0,3x0,3 cm. Kemudian 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 (Maria dkk, 2017).

Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patofisiologi Anatomi FK UGM.

a. Pengamatan preparat histologi lambung

Pemeriksaan preparat histopatologi lambung masing-masing dilakukan sebanyak 5 lapang pandang mikroskop pada pembesaran 10x dan 40x. Perubahan histopatologi yang diamati berupa adanya perdarahan dan infiltrasi sel radang dengan menghitung jumlah PMN. Variabel perubahan histopatologi lambung yang diamati kemudian diskoring menurut Makiyah dkk (2016) seperti pada Tabel 2 untuk skoring perdarahan dan Tabel 3 untuk skoring jumlah PMN.

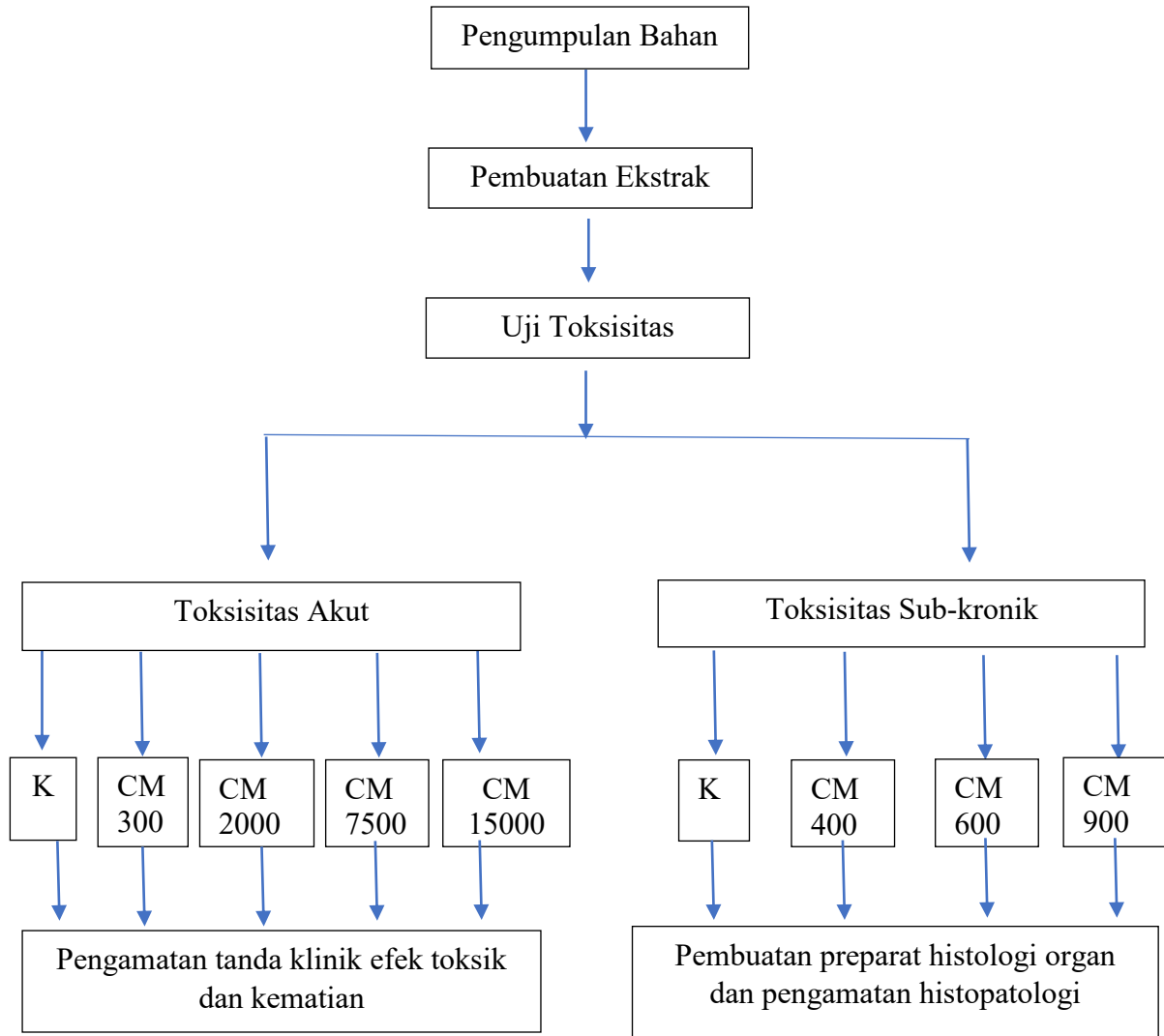
Tabel 4. Penilaian perdarahan

Area peradangan perlapang pandang	Skor
Tidak ada perdarahan	0
Perdarahan <25%	1
Perdarahan 26-50%	2
Perdarahan 51-75%	3
Perdarahan 76-100%	4

Tabel 5. Penilaian PMN

Jumlah PMN	Skor
0	0
1-5	1
6-10	2
11-15	3
16-20	4
Terbentuk Nodulus Limfatikus	5

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari data uji toksisitas akut adalah jumlah kematian hewan uji yang digunakan untuk menentukan LD50.

Untuk uji toksisitas subkronik data yang diperoleh secara kuantitatif berupa jumlah skoring histopatologi untuk skoring lebar perdarahan dan infiltrasi sel radang dengan menghitung jumlah PMN pada preparat histologi lambung menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *Man Withney* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan di antara kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji.