

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Subjek Penelitian

Hewan uji berupa 42 ekor mencit Balb/C jantan, berat badan \pm 20gram, umur 10-12 minggu. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pakan mencit berupa pakan standar BR I.

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 I dan minum *aqua*, setelah 42 mencit diadaptasi selama 1 minggu, kemudian mencit dibagi menjadi 6 kelompok secara *Simple Random Sampling*, masing-masing terdiri dari 7 ekor yaitu kelompok I, II, III, IV, V, dan VI.

Keenam kelompok tersebut diberi perlakuan masing-masing sebagai berikut :

- (1) Kelompok I (kontrol negatif): tanpa diberi perlakuan,
- (2) Kelompok II (perlakuan 1): diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,00 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan ovalbumin (OVA),
- (3) Kelompok III (perlakuan 2): diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,31 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan ovalbumin (OVA),
- (4) Kelompok IV (perlakuan 3) diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,62 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan OVA,
- (5) Kelompok V (perlakuan 4) diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 1,24 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan OVA,
- (6) Kelompok VI (kontrol positif): diberi antihistamin generasi ke-3 peroral dengan dosis 0,02 mg/20 g bb/hari dan disensitisasi dengan OVA.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

- a. Laboratorium Sistematik Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas

- b. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pembuatan ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.).
- c. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk penimbangan obat dan ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) sesuai dosis yang ditentukan.
- d. Laboratorium Histologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pengamatan.
- e. Ruang *Isolation and Identification* Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pembedahan mencit.

2. Waktu

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 10 bulan dimulai pada bulan Agustus 2011 sampai dengan Mei 2012.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

Variabel bebas adalah ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata* L. dosis 0g/kg bb/hari; 0.31g/kg bb/hari; 0.62g/kg bb/hari; dan 1.24g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut. Variabel tergantung adalah infiltrasi sel endang pada mukosa intestinum. Variabel terkontrol adalah mencit

Balb/C jantan, umur 10-12 minggu, berat badan \pm 20 gram yang dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pencahayaan yang sama, pakan standar BR I dan *minumaqua*.

2. Definisi Operasional

Ekstrak etanol umbi *D. alata* diperoleh dengan metode maserasi yaitu proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut diam atau dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Umbi uwi ungu diiris tipis, dikeringkan, dihaluskan dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 80%.

Untuk menentukan **infiltrasi sel radang**, dilakukan dengan *grading* reaksi alergi menurut Chang (2006).

Grade 0	tidak ada infiltrasi sel radang (jaringan normal)
Grade 1	infiltrasi sel radang sampai ke lapisan mukosa
Grade 2	infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel mukosa dan sedikit infiltrasi ke lapisan submukosa
Grade 3	Infiltrasi sel radang sampai ke lapisan submukosa
Grade 4	Infiltrasi sel radang sampai ke lapisan muskularis/transmural

Model Alergi pada Mencit Balb/C

Mencit Balb/C merupakan salah satu galur pengerat yang mudah ditenakkan. Mencit Balb/C jantan disensitisasi dan *dichallenge* secara intraperitoneal dengan ovalbumin (OVA). Mencit diimunisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam Al(OH)₃/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml alumunium 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 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2,5 ml akuades. Mencit dikorbankan 24 jam setelah akhir pemaparan OVA.

E. Alat dan Bahan

Alat penelitian berupa sonde oral, spuit injeksi tuberculin 1 cc, alat bedah, gelas benda, deck glass, seperangkat alat untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE, mikroskop cahaya, kamera.

Bahan penelitian berupa umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.), fexofenadin (antihistamin generasi ke-3), ovalbumin dengan merk SIGMA, Al(OH)₃, akuades, ether, methanol 10%, giemsa, formalin 10%, etanol 80% untuk pembuatan ekstrak umbi *D. Alata*, seperangkat bahan

untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE, bahan mencit

F. Jalannya Penelitian

Pembuatan ekstrak etanolik umbi uwi ungu *Dioscorea alata* L.

a. Identifikasi Tanaman

Identifikasi taksonomi *Dioscorea alata* L. dilakukan di Laboratorium Sistemik Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Identifikasi dan determinasi dilakukan untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam pengambilan obyek uji.

b. Pembuatan ekstrak etanolik umbi *Dioscorea alata* L.

Ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata* L. dibuat ekstrak etanol menurut penelitian sebelumnya dengan cara sebagai berikut :

- 1) Umbi *Dioscorea alata* L. disiapkan sebanyak 750g, dipotong kecil-kecil, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60-70°C hingga kering.
- 2) Umbi *Dioscorea alata* L. yang sudah kering dihaluskan dengan blender menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring.
- 6) Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam *water bath* menggunakan *vacum pump evaporator*. Hasil penguapan berupa ekstrak kental yang ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya.

Standarisasi ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata* L.

Standarisasi terhadap ekstrak dilakukan dengan cara menganalisa kandungan kimia ekstrak dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Gas spektroskopi massa (GC-MS). KLT dilakukan dengan berbagai sistem untuk mengamati adanya golongan senyawa, yakni flavonoid dan saponin. Ekstrak etanol paket ditimbang 25mg dan dilarutkan dalam 10ml etanol 80%, kemudian ditotolkan pada fase diam yang sesuai untuk tiap kandungan yang akan diperiksa dan dielusi dengan fase gerak yang sesuai.

a. Uji flavonoid

Digunakan fase diam selulosa dan fase gerak BAW (n-butanol-acetic acid-water) (fase atas) (4:1:5) v/v, dan gel GF254 dengan

v/v. Deteksi dilakukan dengan sinar uv 254, uv 366, uap amoniak dan penyemprot sitroborat. Sebagai pembanding digunakan rutin.

b. Uji saponin

Digunakan fase diam silika gel GF254, fase gerak kloroform-metanol-air (65:50:10). Bercak yang terelusi dideteksi dengan uv 254, uv 366 dan penyemprotan dengan anisalhedih-asam sulfat.

Uji efek antialergi dengan model alergi ovalbumin (OVA) pada mencit Balb/C

a. **Persiapan dan pengelompokkan subyek uji**

Empatpuluhdua mencit jantan Balb/C umur 10-12 minggu dikandangan dalam kandang plastik yang ditutup dengan anyaman kawat. Mencit dipelihara dengan kondisi dan pakan yang sama. Sebelum digunakan untuk penelitian mencit diadaptasikan selama 1 minggu di kandang pemeliharaan. Selama penelitian mencit ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Mencit dibagi 6 kelompok yaitu :

- (1) Kelompok I (kontrol negatif): tanpa diberi perlakuan,
- (2) Kelompok II (perlakuan 1): diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,00 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan ovalbumin (OVA),
- (3) Kelompok III (perlakuan 2): diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,31 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan ovalbumin (OVA)

- (4) Kelompok IV (perlakuan 3) diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 0,62 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan OVA,
- (5) Kelompok V (perlakuan 4) diberi ekstrak etanol umbi *D. alata* peroral dengan dosis 1,24 g/kg bb/hari selama 28 hari berturut-turut dan disensitisasi dengan OVA,
- (6) Kelompok VI (kontrol positif): diberi antihistamin generasi ke-3 peroral dengan dosis 0,02 mg/20 g bb/hari dan disensitisasi dengan OVA.

Model alergi ovalbumin (OVA) pada mencit Balb/C

Mencit Balb/C jantan disensitisasi dan *dichallenge* secara intraperitoneal dengan ovalbumin (OVA). Mencit diimunisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam Al(OH)₃/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml alumunium 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 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2,5 ml akuades. Mencit dikorbankan 24 jam setelah akhir pemaparan OVA.

Pembedahan mencit

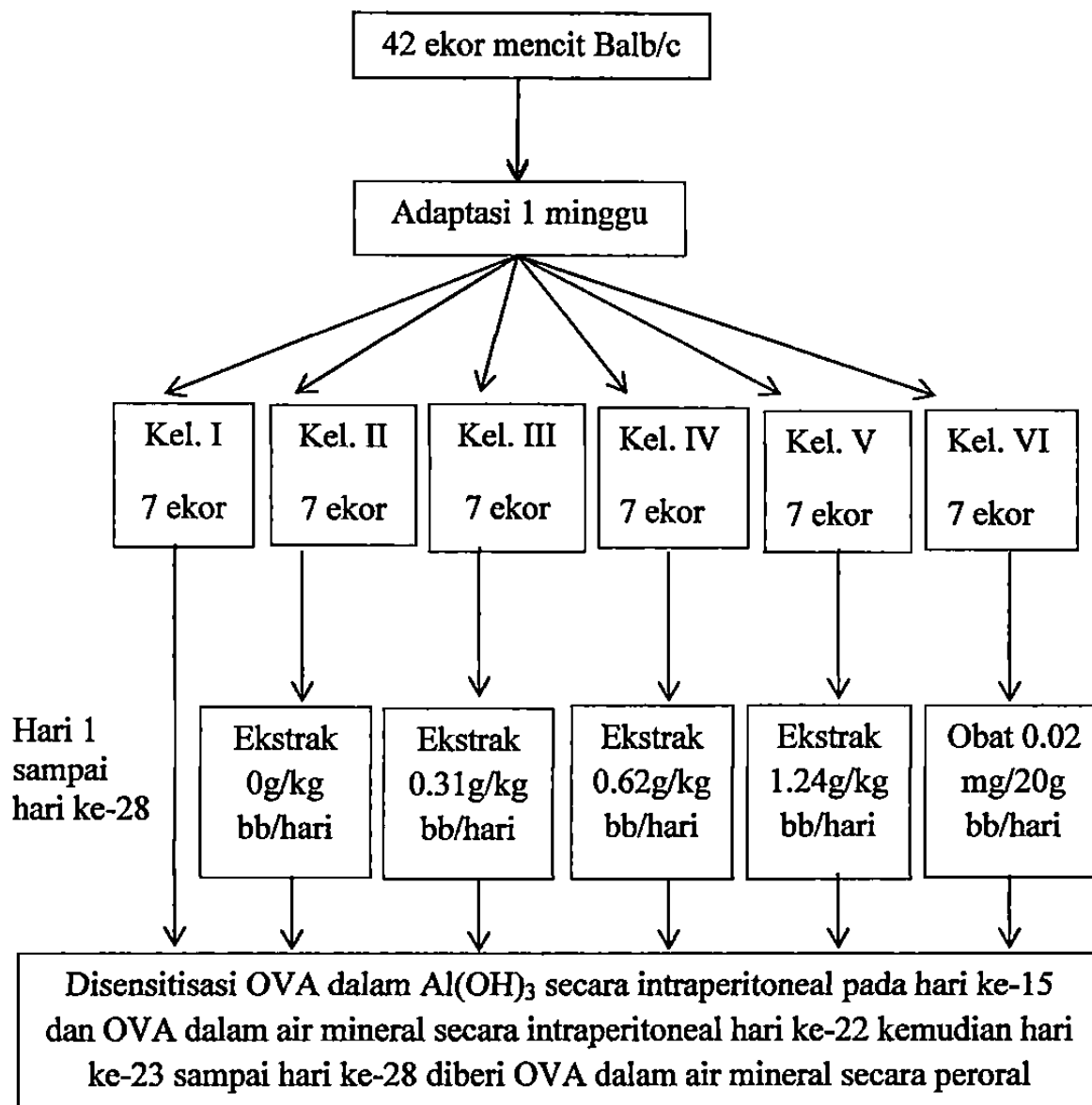
- a. Mencit ditaruh di toples yang berisi kloroform sampai mencit tidak sadar,
- b. Mencit diletakkan terlentang pada gebus yang dilapisi aluminium foil

- c. Kulit bagian perut didesinfeksi dengan alkohol 70%, lalu kulit abdomen dibuka dengan gunting steril, sehingga tampak lapisan mesenterium dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat dengan jelas.

Pembuatan preparat

Setelah mencit dikorbankan, dibuat slide dan dilakukan pengecatan menggunakan hematoxylin and eosin (H&E) untuk melihat infiltrasi sel

Cara kerja penelitian ini digambarkan secara sistematis pada bagan berikut :



G. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas :

- a. Alat yang digunakan sesuai standar,
- b. Metode penelitian sesuai prosedur,

Uji reliabilitas : dilakukan dengan cara pengulangan pengamatan preparat setiap sampel sebanyak 10 kali.

H. Analisis Data

Data yang didapatkan 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*.