

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Ilmu Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Waktu penelitian akan dilaksanakan mulai pada bulan Maret – April 2023.

3.2 Materi

3.2.1 Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat antara lain tempat makan dan minum, kandang tikus, masker, sarung tangan, alat tulis, kamera, timbangan, Alat bedah hewan percobaan (scapel, pinset, gunting bedah, spuit 1 ml, blade, sonde oral, nampan, mikroskop Olympus CX 33).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan pembuatan ekstrak yaitu daun mint (*Mentha Arvensis L.*), ethanol 500ml, dan Natrium Carboxymethyl Cellulose (CMC-Na). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Tikus putih dengan galur *Spargue dawley* jantan dengan berat badan 200 gram yang berumur 3 bulan, makanan hewan percobaan (pelet), minuman tikus, ekstrak Daun Mint 100% (*Mentha Arvensis L.*) sebanyak 1kg, Natrium Carboxymethyl Cellulose (CMC-Na), larutan netral buffer formalin 10% untuk fiksasi, bahan untuk membuat preparat histologi seperti alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, xylol, paraffin, lithium karbonat dan hemaktosilin-eosin (HE).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), Penelitian merupakan Langkah awal untuk mengetahui

toksisitas pada lambung tikus yang akan dilakukan penelitian dengan pemberian ekstrak buah daun mint (*Mentha Arvensis L.*) menggunakan 24 ekor tikus putih (*Spargue-dawley*) dengan 4 perlakuan menggunakan rumus Federer.

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

Keterangan :

n : besar sampel tiap kelompok

t : banyak kelompok

Besar sampel yang dibutuhkan untuk setiap kelompok :

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$4n \geq 20$$

$$4n \geq 20$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka dalam percobaan ini setiap kelompok perlakuan digunakan ulangan sebanyak 6 ekor tikus putih dengan galur (*Spargue-dawley*), dengan jumlah total sampel yang digunakan adalah 24 ekor tikus putih, setiap kelompok perlakuan dibutuhkan cadangan sebanyak satu ekor tikus putih. Sehingga penelitian menggunakan 24 ekor tikus putih dengan galur (*Spargue-dawley*). Tikus yang digunakan berumur tiga bulan yang dikelompokkan dengan teknik pengacakan menjadi 4 kelompok.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian, terdiri dari :

1. Variabel bebas : Ekstrak Daun Mint 100% (*Mentha Arvensis*) dan dosis
2. Variabel terikat : Histopatologi limpa tikus putih (*Spargue Dawley*) dengan parameter inflamasi, nekrosis, hemoragi dan degenerasi.
3. Variabel terkontrol : umur, berat tikus, jenis kelamin tikus.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini akan dilakukan pengambilan sampel secara post-test pada akhir penelitian.

3.3.3.2 Sampel Ekstrak Daun Mint (*Mentha Arvensis L.*)

Pengambilan sampel daun mint (*Mentha Arvensis L.*) akan dilakukan pada daerah Dukuh Kupang Surabaya sebanyak 1 kg kemudian dilakukan proses ekstraksi sebesar 100% di Laboratorium Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

3.3.3.3 Sediaan Histopatologi Limpa Tikus Putih (*Spargue Dawley*)

Pada pembuatan sediaan histopatologi, 4 kelompok tikus yang diberikan perlakuan selama 2 minggu akan diambil organ limpanya untuk selanjutnya dilakukan pembuatan preparat dengan metode pewarnaan hematoxylin-eosin (HE) yang dilakukan di Laboratorium Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

3.3.4 Prosedur Penelitian

3.3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Mint (*Mentha Arvensis L.*)

Ekstraksi daun mint (*Mentha Arvensis L.*) akan dilakukan pada tempat yaitu Laboratorium Ilmu Kesehatan Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Dosis

dengan mengacu pada BPOM RI (Badan POM, 2014), dengan variasi dosis 0 mg/kg berat badan sebagai kontrol, 1250 mg/kg berat badan, 2500 mg/kg berat badan, dan 5000 mg/kg berat badan.

Penelitian ini menggunakan daun mint sebanyak 1 kg. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara daun mint dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan suhu 60°C selama 1 jam. Daun mint yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

Bahan yang sudah halus direndam menggunakan pelarut ethanol 96% selama kurang lebih 8-12 jam. Larutan yang telah direndam kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kain kasa. Prosedur penyaringan diulang hingga hasil filter mendekati warna pelarut (tersaring dengan sempurna) menggunakan labu pemisah (corong). Filtrae yang sudah siap kemudian di ekstraksi menggunakan alat rotary evaporator dengan suhu 40-600°C selama pelarut tidak tertinggal dalam sampel, dan jika masi tercium aroma bau pelarut maka proses rotary evaporator dilakukan kembali, ekstrak yang sudah mengental kemudian dimasukkan kedalam wadah, kemudian ekstrak daun mint yang diperoleh diberikan secara oral kepada tikus.

3.3.4.2 Perlakuan Pada Hewan Coba

Tikus putih dengan galur (*Spargue dawley*) sebanyak 24 ekor dimana terdapat 4 perlakuan dan 6 ulangan, tikus dipilih secara acak dalam 1 kandang terdapat 2 ekor tikus dengan galur (*Spargue dawley*) dengan ukuran kandang 45 x 20 x 30 yang beralaskan sekam kayu setebal 5cm. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 14 hari dan tikus diberi makan dan minum secara Ad libitium, 24 ekor tikus putih akan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak yang terdiri dari perlakuan 0 (0 mg/kg berat badan peroral) sebagai kontrol, Perlakuan 1 (1250 mg/kg berat badan peroral), Perlakuan 2 (2500 mg/kg berat badan peroral) dan Perlakuan 3 (5000

mg/kg berat badan peroral), perlakuan ini masing-masing diberikan satu kali sehari selama 2 minggu.

Perlakuan 0 : Tikus tanpa pemberian ekstrak daun mint (*Mentha Arvensis*) dengan dosis 0 mg/kg berat badan.

Perlakuan 1 : Tikus dengan pemberian ekstrak daun mint (*Mentha Arvensis*) dengan dosis 1250 mg/kg berat badan.

Perlakuan 2 : Tikus dengan pemberian ekstrak daun mint (*Mentha Arvensis*) dengan dosis 2500 mg/kg berat badan.

Perlakuan 3 : Tikus dengan pemberian ekstrak daun mint (*Mentha Arvensis*) dengan dosis 5000 mg/kg berat badan.

3.3.4.3 Proses Nekropsi

Pada hari ke-14 semua tikus putih dengan galur (*Spargue dawley*) dilakukan euthanasia dengan cara dislokasi cervical pada ruangan terminasi kemudian dilakukan pembambilan organ limpa untuk dilakukan pembuatan preparat.

3.3.4.4 Pembuatan Histopatologi

Pada pembuatan sediaan histopatologi, 4 kelompok tikus putih yang telah diberikan perlakuan selama 2 minggu akan diambil organ limpanya untuk selanjutnya dilakukan 4 pembuatan preparat dengan metode pewarnaan hematoksilin-eosin (HE). Sampel organ limpa tersebut diambil dan dipotong 1x1x1 cm, kemudian direndam dalam larutan neutral buffer formalin (NBF) 10%. Sampel organ selanjutnya diperkecil lagi dengan irisan tipis untuk disimpan dalam tissue cassette dan dilakukan fiksasi dalam larutan neutral buffer formalin (NBF).

Setelah di fiksasi kemudian dilakukan proses dehidrasi dan clearing dengan satu sesi larutan yang terdiri dari : alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol absolut, toluene dan paraffin, secara bertahap dalam waktu satu hari. Sampel di organ blocking dengan embedding set yang dituangi paraffin cair kemudian didinginkan. Blok yang sudah dingin di sectioning menggunakan microtome dengan ketebalan 4-5 mikron. Proses terakhir adalah pewarnaan dengan metode Harris Hematoxylyin-Eosin dan mounting media, refrensi prosedur pembuatan preparat yaitu pertama fiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam, kedua yaitu trimming pemotongan kecil dengan tebal 0,5 mm kemudian dimasukkan kedalam kaset, ketiga dehidrasi yaitu dengan menggunakan alkohol bertingkat, keempat yaitu clearing dengan menggunakan xylol bertingkat sebanyak 3 kali, kelima yaitu embedding dengan paraffin cair suhu 62°C selama 4 jam, keenam yaitu bloking yaitu di blok dengan paraffin cair suhu 40°C dibiarkan hingga keras, ketujuh yaitu cutting dengan menggunakan microtome tebal 0,3-0,5 μm dan ditempel pada object glass, proses pengecatan dengan hemaktosilin-eosin (HE) pertama yaitu clearing dengan menggunakan xylol sebanyak 3 kali dan masing-masing selama 3 menit, kedua yaitu dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%,90% dengan masing-masing 3 menit, ketiga yaitu dengan menggunakan alkohol absolut 3 kali dengan masing-masing 3 menit, keempat menggunakan air mengalir dengan tap water selama 5 menit, kelima yaitu dengan hematoxylin mayer 5 menit, keenam yaitu dengan menggunakan air mengalir dengan tap water lagi selama 5 menit, ketujuh yaitu menggunakan eosin selama 3 menit, setelah itu diulang kembali dengan proses alkohol absolut sebanyak 3 kali selama 3 menit, kemudian alkohol 70%,80%,90% dengan masing-masing 3 menit, terakhir proses mounting yaitu menutup entelan dan cover glass setelah itu baru bisa diamati dibawah mikroskop (Yulianti, 2014).

3.3.4.5 Pegamatan Histopatologi

Pengamatan Perubahan pada Histopatologi dilihat dari inflamasi, nekrosis, hemoragi dan degenerasi. Penilaian dapat dilakukan dengan menggunakan sistem penilaian semi kuantitatif dari 0 hingga 4 sebagai berikut :

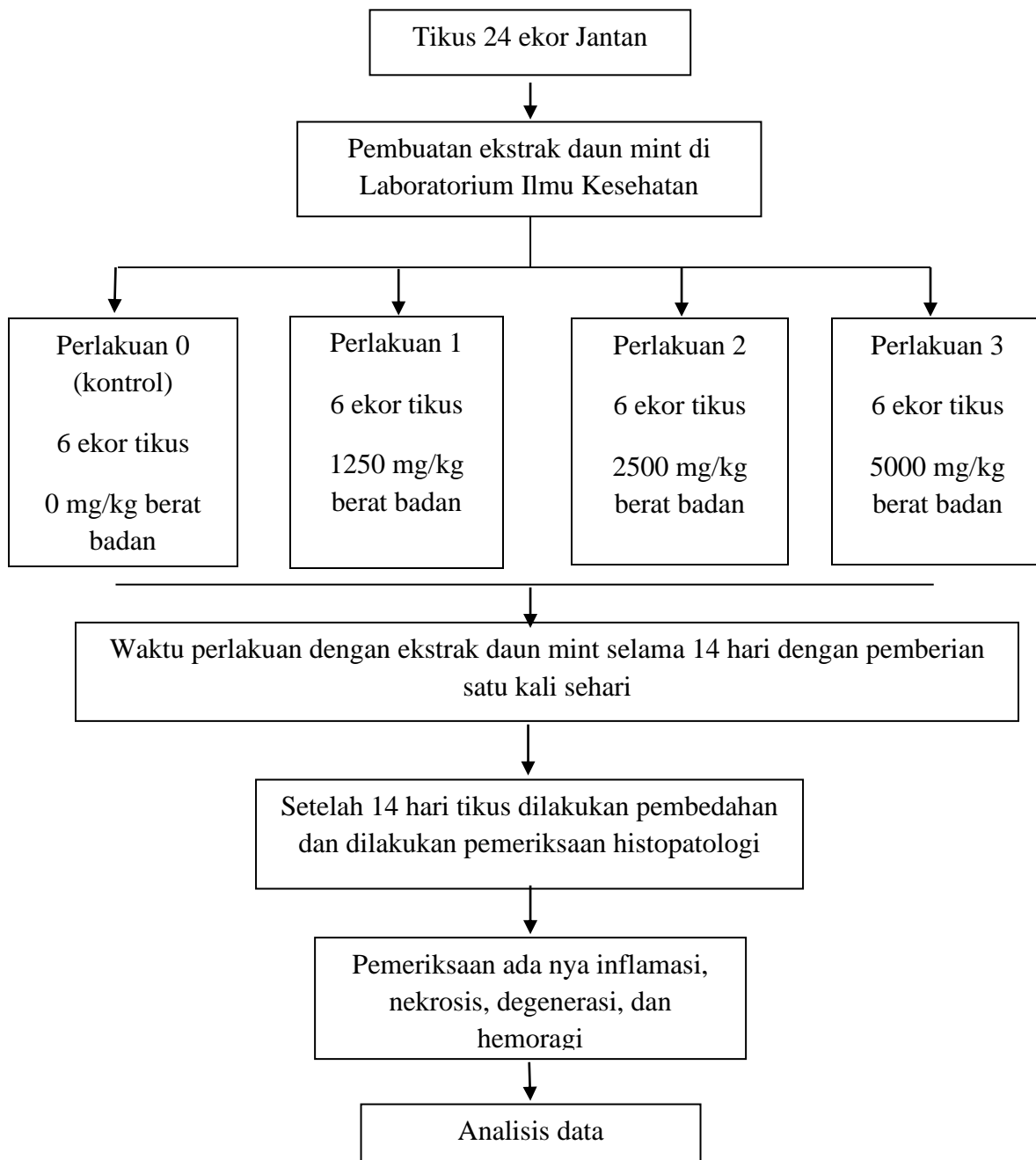
(0) tidak ada ; (1) ringan ; (2) sedang ; (3) berat ; (4) sangat berat.

Tabel 3.1 Score penilaian Histopatologi

Score 0	Tidak ada perubahan
Score 1	Jika jumlah sel antara 1-25% dari seluruh lapang pandang
Score 2	Jika jumlah sel antara 26-50% dari seluruh lapang pandang
Score 3	Jika jumlah sel antara 51-75% dari seluruh lapang pandang
Score 4	Jika jumlah sel antara 76-100% dari seluruh lapang pandang

(Prakoso *et al*, 2018).

3.4 Kerangka Penelitian



3.5 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan uji non parametrik yaitu Kruskal-Wallis untuk mengetahui apakah terjadi inflamasi, nekrosis, degenerasi dan hemoragi terhadap organ limfa yang telah diberikan ekstrak daun mint (*Mentha Arvensis*).