

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yakni penelitian eksperimental. Berdasarkan pernyataan Sugiyono (2011) bahwa tujuan penelitian eksperimental ialah mengetahui pengaruh dari beberapa perlakuan terhadap lainnya pada keadaan terkontrol. Metode eksperimen dipakai untuk tujuan penelitian yang tujuannya ialah memahami dampak manipulasi variabel pada satu bahkan lebih kelompok eksperimen serta membandingkan hasilnya pada kelompok kontrol yang tidak terjadi manipulasi (Payadnya & Jayantika, 2018). Metode eksperimental ini pada dasarnya ialah metode yang bisa menguji dengan benar hipotesis tentang hubungan sebab akibat maupun kausal (Gay, 1981).

3.2. Desain Penelitian

Penelitian berikut menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penempatan mencit di masing-masing kelompok dilakukan dengan acak. Rancangan penelitian ini, mencit dibagi ke dalam lima kelompok meliputi kontrol negatif dan kontrol positif, pemberian dosis ekstrak biji semangka 100 mg/kg, dosis 200 mg/kg, dan dosis 300 mg/kg (Nwachoko & Oghale, 2017) atau dapat dikonversi ke dosis mencit menjadi dosis 0,26 mg/kg, dosis 0,52 mg/kg, dan dosis 0,78 mg/kg. Masing-masing kelompok diberi perlakuan yang berbeda selama 24 jam. Bersumber pada persamaan Federer (2015), mencit jantan yang digunakan sejumlah 25 ekor, berikut ialah cara menghitungnya:

$$\begin{aligned}(n-1)(t-1) &\geq 15 \\(n-1)(5-1) &\geq 15 \\4n-4 &\geq 15 \\4n &\geq 19 \\n &\geq 4,75 \text{ (dibulatkan jadi 5)}\end{aligned}$$

Keterangan:

t = total perlakuan n = total pengulangan

Bersumber hasil perhitungan tersebut diketahui bahwa total pengulangan yang diperlukan pada tiap kelompok perlakuan ialah lima, sehingga apabila dikalikan dengan total kelompok perlakuan maka total sampel yang diperlukan pada penelitian berikut ialah 25 ekor mencit (*Mus musculus*).

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian berikut terdiri dari mencit jantan berumur tiga bulan dimana memiliki bobot badan sekitar 25-30 gram. Parameter penelitian yang diukur yaitu berat badan awal serta berat badan akhir pada mencit, kadar glukosa darah awal serta kadar glukosa darah akhir pada mencit, waktu kesembuhan pada mencit, dan hasil perbandingan bentuk feses pada mencit sebelum dan setelah diberi perlakuan ekstrak biji semangka dan obat loperamide.

3.4. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan dalam penelitian berikut berlangsung dalam waktu sekitar empat bulan yaitu mulai dari Februari hingga Mei 2023. Lokasi penelitian dilaksanakan di dua lokasi yaitu Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, dan Rumah Mencit Botani, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Kegiatan yang dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, di antaranya persiapan alat bahan dan pembuatan ekstrak biji semangka, dan pencairan obat loperamide. Jika kegiatan yang dilakukan di Rumah Mencit Botani UPI, di antaranya aklimatisasi hewan uji selama 7 hari, perlakuan pada hewan uji, dan pengumpulan data serta sampel.

3.5. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dipakai dalam pembuatan ekstrak biji semangka yaitu peralatan serta bahan yang dapat diperoleh di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (Lampiran 2). Jika peralatan serta bahan yang dipakai pada aklimatisasi hewan dan pengecekan hewan uji adalah alat dan bahan yang terdapat di Rumah Mencit Botani, Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran 2).

3.6. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian berikut tersusun atas sejumlah tahapan sebagai berikut:

3.6.1. Persiapan Alat dan Bahan

Semua peralatan serta bahan yang dipakai dalam penelitian dipersiapkan dan pastikan tidak ada kekurangan. Semua peralatan serta bahan yang sudah lengkap selanjutnya dibersihkan kemudian bungkus memakai kertas untuk disterilisasi memakai autoklaf sekitar 20 menit bertekanan 1,5 atm serta bersuhu 120°C. Sterilisasi alat dan bahan sebelum digunakan bertujuan agar tetap steril ketika digunakan dan tidak terjadi kontaminasi saat penelitian.

3.6.2. Ekstraksi Biji Semangka

Buah semangka yang didapatkan dari Pasar Geger Kalong dipisahkan dengan bijinya secara manual. Biji dicuci bersih menggunakan air, dikeringkan di udara dengan suhu ruang untuk menghilangkan kelembapan dan memastikan agar kualitasnya tetap baik, biji dikupas dan digiling menggunakan blender untuk mendapatkan luas permukaan yang halus. Selanjutnya biji semangka ditimbang hingga 40 gram dalam timbangan analitik serta dimasukkan pada labu Erlenmeyer. Ekstrak biji yang didapatkan kemudian dilanjutkan menggunakan metode maserasi. Dimana metode tersebut ialah metode ekstraksi yang sederhana memakai alat yang sederhana serta bisa dipakai untuk mengekstraksi bahan yang terdapat banyak bahan aktif.

Selanjutnya masukkan ekstraksi pelarut etanol 70 % sebanyak 400 ml, lalu di shaker ekstrak biji semangka tersebut menggunakan alat digital selama 1 x 24 jam, diselingi pengadukan setiap 6 jam untuk mendapatkan hasil yang homogen. Ekstrak didiamkan selama 24 jam selanjutnya disaring supaya memperoleh hasil ekstrak maserasi. Berikutnya dilaksanakan remaserasi sebanyak dua kali melalui cara merendam sisa penyaringan dalam pelarut yang baru hingga maserasi yang dihasilkan menjadi bening, yang merupakan ciri bahwa seluruh senyawa tertarik semua (Sanjaya *et al.*, 2020). Ekstrak hasil maserasi dan hasil remaserasi selanjutnya dicampur dan disaring memakai kertas saring, hasil filtratnya diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C serta bertekanan 175 atm selama 5 jam berfungsi sebagai menguapkan pelarut dan mendapatkan ekstrak kental (Mangindaan *et al.*, 2014).

Ekstrak biji semangka untuk mencit bisa dibuat melalui proses penimbangan ekstrak biji semangka kental berdasarkan ketentuan dosis yang ditetapkan, selanjutnya diencerkan menggunakan larutan NaCMC 1% yang sesuai di dalam perut mencit yakni 0,5 ml (Hasmono *et al.*, 2016). Dalam menghitung dosis ekstrak biji semangka bisa ditunjukkan melalui (Lampiran 3).

3.6.3. Penentuan Dosis

Ekstrak biji semangka yang sudah dikonversi lalu diberikan pada mencit dengan dosis 0,26 mg/kg, 0,52 mg/kg, dan 0,78 mg/kg. Dosis yang digunakan didukung oleh penelitian Nwachoko & Oghale (2017). Pemberian ekstrak biji semangka yang diberikan pada mencit sebanyak 0,5 ml, karena kapasitas maksimal volume lambung mencit yaitu 1 ml (Mulyatmo & Hariyatmi, 2015). Perhitungan ekstrak biji semangka bisa ditinjau melalui Lampiran 3. Perhitungan dosis ekstrak pada mencit dibuat memakai rumus sebagai berikut:

$$\text{Dosis untuk mencit} = \text{dosis manusia} \times \text{Nilai faktor konversi mencit-manusia}$$

3.6.4. Pembuatan Suspensi Loperamid HCl

Pembuatan suspensi loperamid dibutuhkan sebagai obat pembanding antidiare pada mencit. Sediaan suspensi *loperamide* HCl terdiri dari 1 tablet lopamid® yang terdapat 2 mg *Loperamid HCl*. *Loperamide* HCl dengan dosis 2 mg/60 kg bobot manusia = 0.03 mg/kg bobot tubuh. Jika dikonversi ke dosis hewan, maka dosis manusia (0.03 mg/kgBB) dikali dengan faktor *km* manusia serta dibagi *km* faktor hewan mencit, dengan demikian akan menghasilkan 0.41 mg/kg. Lewat dosis tersebut selanjutnya dapat didapatkan dosis pada setiap ekor mencit yang memiliki bobot 25 gram ialah 0.01 mg, serta dilarutkan dalam CMC 1% sejumlah 0.40 ml, maka dapat memperoleh konsentrasi 0.03 mg/ml. Agar pengenceran yang lebih mudah, maka 1 tablet lopamid® dihaluskan dan ditambahkan CMC 1% sebanyak 80 ml, selanjutnya diinduksikan hingga 0.40 ml per ekor mencit (Purwaningdyah *et al.*, 2015).

3.6.5. Persiapan Hewan Uji

Sebelum diberikan perlakuan pada mencit, 25 ekor mencit dan setiap masing-masing kandangnya terlebih dahulu di aklimatisasi dengan lingkungan barunya selama

tujuh hari, dengan suhu 25°-26°C, dan kelembaban 50-55%. Mencit diberi makan serta minum secara *ad libitum*. Mencit diukur berat badan awal, diukur kadar glukosa darah awal dan bentuk feses mencit dengan keseluruhan. Data tersebut digunakan untuk perbandingan dengan mencit yang sudah diberi perlakuan.

3.6.6. Perlakuan Hewan Uji

Mencit pada semua kelompok perlakuan yang telah diaklimatisasi dan diadaptasikan pada lingkungan barunya, dilakukan penelitian selanjutnya yang dimana mencit dipuasakan selama 18 jam sebelum pengujian, selanjutnya berikan 0,5 ml minyak jarak secara oral memakai jarum *gavage*, satu kali selama 24 jam (Fajrin, 2012). Fungsi dari minyak jarak ini untuk dijadikan induksi diare pada mencit. Setelah 24 jam lalu ditimbang kembali berat badan pada mencit, kadar glukosa darah mencit, dan bentuk feses mencit, apakah mencit mengalami reaksi diare setelah diberikan minyak jarak tersebut. Kemudian berikan ekstrak biji semangka pada mencit dikelompokkan secara acak menjadi lima kelompok, setiap kelompok diulang sebanyak lima kali pengulangan yaitu:

1. Kelompok K0: Kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun terdapat lima ekor mencit.
2. Kelompok K1: Kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan Loperamide 5 mg/kg terdapat lima ekor mencit.
3. Kelompok P1: Kelompok perlakuan yang diberi dosis ekstrak biji semangka 0,26 mg/kg terdapat lima ekor mencit.
4. Kelompok P2: Kelompok perlakuan yang diberi dosis ekstrak biji semangka 0,52 mg/kg terdapat lima ekor mencit.
5. Kelompok P3: Kelompok perlakuan yang diberi dosis ekstrak biji semangka 0,78 mg/kg terdapat lima ekor mencit.

Setelah tiga jam diberi perlakuan, mencit diukur dan diamati sesuai parameter penelitian yaitu berat badan akhir, kadar glukosa darah, dan pengecekan waktu kesembuhan pada setiap ekor mencit dilakukan setiap hari selama 24 jam sekali. Maka pada hasil akhir ditemukan perbandingan pengaruh ekstrak biji semangka dan obat diare (*loperamide*) pada mencit.

3.6.7. Pengukuran Berat Badan Mencit

Metode pengukuran berat badan setiap ekor mencit dilaksanakan dengan cara wadah plastik yang ringan ditimbang oleh timbangan digital, namun timbangan tersebut harus menunjukkan angka 0. Lalu setiap ekor mencit yang akan ditimbang dan diukur, kemudian masukkan satu persatu mencit kedalam wadah plastik tersebut, fungsinya agar saat pengukuran berat badan mencit tidak bergerak aktif atau lari sehingga hasil yang didapatkan akurat dan tidak berubah-ubah, untuk pengukuran berat badan mencit ini dilakukan sebelum dan setelah diberikan perlakuan.

3.6.8. Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Kadar glukosa darah mencit diukur melalui metode toleransi glukosa oral berdasarkan prinsip glukometer. Prinsip kerja dari glukometer memakai teknik biosensor glukosa oksidase. Glukosa dalam bahan tes darah bereaksi pada enzim oksidase glukosa pada strip tes. Reaksi enzimatik ini bisa memproduksi elektron yang ditangkap oleh elektroda di glukometer (Sacks, 2006). Keuntungan dari alat biosensor ini memiliki desain yang sederhana, sistem sensor yang nyaman, alat tindakan cepat untuk mendeteksi sampel dengan sensitivitas sangat baik, selektif dan reproduktif (Ertek *et al.*, 2016).

Sebelum pengujian serta pengukuran glukosa darah mencit, langkah pertama yaitu hewan uji dipuasakan kurang lebih 18 jam, akan tetapi masih diberi minum. Tujuan dipuasakan ialah supaya tidak terdapat makanan yang bisa menghambat pengujian. Kadar glukosa darah diukur melalui proses mendisinfeksi ujung ekor mencit memakai alkohol, selanjutnya melukai ujung ekor tersebut, digunakan untuk menyentuh darah yang menetes keluar memakai strip tes glukometer (Autocheck). Sesudahnya, hasil bisa terbaca melalui layar sekitar 10 detik. Nilai yang tercetak dalam peralatan tersebut ialah nilai konsentrasi kadar glukosa darah pada satuan mg/dL (Hikmah *et al.*, 2016).

3.7. Analisis Data

Data yang didapat melalui pengujian selanjutnya dilakukan analisis untuk data statistiknya menggunakan perangkat lunak *IBM SPSS 23 for Windows*. Langkah pertama dari analisis data adalah uji normalitas (*Shapiro Wilk*) yang bertujuan untuk

mengetahui data yang diperoleh tersebut berdistribusi normal maupun tidak. Data yang diperoleh distribusinya normal selanjutnya diteruskan melalui proses analisis menggunakan pengujian variasi homogenitas (*levene test*). Selain itu, data yang berdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis memakai uji *One-Way ANOVA* untuk menentukan nilai signifikan pada setiap perlakuan data. Jika hasil signifikan di bawah taraf nyata yakni ($P < 0.05$) maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* atau pengujian lanjut digunakan untuk menentukan kelompok mana yang memperlihatkan perbandingan atau perbedaan.

3.8. Alur Penelitian

Alur pada penelitian berikut diawali melalui tahapan persiapan alat dan bahan, kemudian ekstraksi biji buah semangka, selanjutnya pemeliharaan hewan uji, hewan uji diberi perlakuan, pengambilan sampel pengujian, serta analisis data yang dilanjutkan untuk proses pengolahan dan menyusun skripsi. Maka alur dari penelitian berikut bisa ditinjau melalui Gambar 3.1.

Gambar 3.1. Alur Penelitian

