

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

4.2.3 Kriteria inklusi

1. Jenis tikus adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.
2. Jenis kelamin jantan.
3. Berat badan 150-250 gram.
4. Usia 2-3 bulan (dewasa)
5. Sehat, pada pemeriksaan fisik ditandai dengan mata jernih, bulu mengkilap, putih, dan tebal, gerakan aktif atau lincah, dan feses tidak lembek.

4.2.4 Cara Perhitungan Sampel

Sampel dipilih dari populasi dengan menggunakan teknik *simple random sampling*. Besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus Federer (Indra, 1999) :

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

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel pada tiap kelompok

Pada penelitian ini jumlah perlakuan adalah 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yaitu 200,300,400mg/kgBB. Sehingga didapatkan sampel sebanyak :

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$n-1 \geq 15/4$$

$$n-1 \geq 4$$

$$n \geq 5$$

Jadi jumlah sampel minimal dalam penelitian ini adalah 5 ekor tikus pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 25 tikus galur Wistar. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out*, diberikan 1 tikus tambahan untuk setiap kelompok. Sehingga, total tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor tikus galur wistar.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens L*) dengan pemberian 200, 300, 400 mg/kg/hari.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penyembuhan ulkus lambung dengan indikator untuk penyembuhan ulkus lambung adalah penurunan jumlah lesi perdarahan ulkus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang selama 14 hari.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstraksi

- | | |
|--|-------------|
| A. Daun seledri (<i>Apium graveolens L.</i>) | |
| B. Etanol 96% | |
| C. Aquades | 1 botol |
| D. Botol hasil ekstrak | 1 botol, 1L |
| E. Oven | 1 buah |
| F. Blender | 1 buah |
| G. Timbangan | 1 buah |
| H. Gelas Erlenmeyer | 2 buah |
| I. Corong gelas | 1 buah |
| J. Kertas saring | 1 buah |
| K. Labu evaporator | 1 buah |

- L. Labu penampung etanol 1 buah
- M. Evaporator 1 buah
- N. Pendingin *spiral* atau *rotary evaporator* 1 buah
- O. Selang *water pump* 1 buah
- P. *Water pump*
- Q. *Water bath*
- R. *Vacum pump* 1buah

(Sulastri, 2009)

4.5.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ulkus Lambung

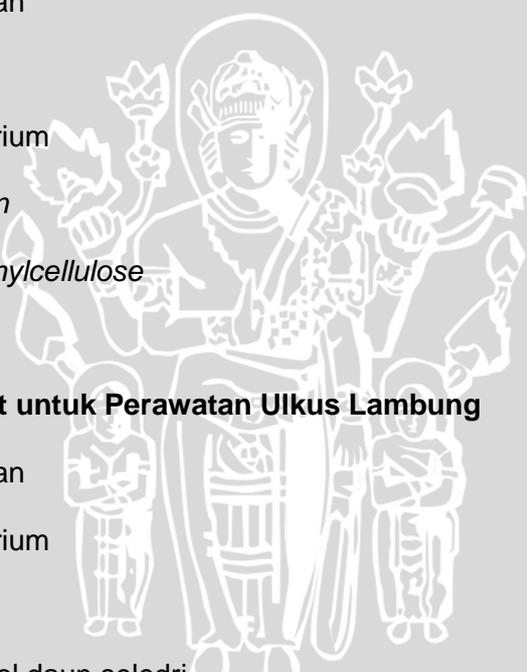
- A. Sarung tangan 1 pasang
- B. Sonde 1 buah
- C. Jas laboratorium 1 buah
- D. *Indometachin* 30 mg/kgBB
- E. *Carboxymethylcellulose* 0,5%

4.5.3 Bahan dan Alat untuk Perawatan Ulkus Lambung

- A. Sarung tangan 1 pasang
- B. Jas laboratorium 1 buah
- C. Sonde 1 buah
- D. Ekstrak etanol daun seledri 300 mg

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Jumlah Lesi

- A. Wadah organ 1 buah
- B. Alas kaca
- C. Camera 1 buah
- D. Air



4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala ukur
Variabel Independen : Pemberian Ekstrak etanol daun seledri (<i>Apium graveolens</i> L)	Ekstrak etanol daun seledri (<i>Apium graveolens</i> L) dalam bentuk ekstrak kasar dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Prosedur ekstraksi daun seledri (<i>Apium graveolens</i> L) ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ekstrak etanol seledri diberikan per sonde sebanyak 200, 300, 400 mg/kgBB pada hari ke-1 selama 5 hari sebelum pemberian indometasin.	mg	timbangan	rasio
Variabel Dependen : Jumlah titik perdarahan ulkus	Lesi perdarahan adalah jumlah lesi (perdarahan) pada lambung tikus. Indikator ini ditentukan dengan pemeriksaan makroskopis. Secara makroskopis ditandai dengan eritrosit di luar pembuluh darah dan di dalam jaringan. Pemeriksaan lesi dilakukan dengan membilas lambung dengan air mengalir, kemudian di letakkan pada tempat kaca dan dilakukan pengambilan gambar dengan camera (canon 650D). Setelah itu dilakukan penghitungan jumlah lesi penghitungan.	angka	Camera canon 650D	rasio
Pembuatan Ulkus Lambung pada Tikus	indometachin adalah anti inflamasi non steroid, dosis indometasin berasal dari penelitian sebelumnya sebesar 30 mg/kgBB. Dengan menyesuaikan berat tikus yang rata-rata 200 g maka indometasin yang digunakan sebesar 6gr dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran akuades hingga 10 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah = $30 \text{ mg}/150 \text{ mg} \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$ per pemberian oral (sonde). Diberikan dihari ke-6	ml	Gelas ukur	rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Seledri

A. Proses Pengeringan

Daun seledri (*Apium graveolens L*) dicuci dengan air mengalir sampai bersih, lalu dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan oven 40°C atau dijemur tanpa sinar matahari. Setelah daun seledri kering dilakukan proses penghalusan menggunakan *blender* sehingga menjadi bentuk serbuk.

B. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar ekstraksi di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya.

1. Timbang serbuk daun seledri sebanyak 500 gram
2. Masukkan serbuk daun seledri 500 gram ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter
3. Rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
4. Kocok hingga daun seledri dan etanol tercampur
5. Diamkan selama 24 jam hingga menguap

C. Proses Evaporasi

1. Pengambilan lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif
2. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter
3. Pasang labu evaporasi pada evaporator
4. Isi *water bath* dengan air sampai penuh

5. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur suhu pada 70°C – 80°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik
6. Diamkan agar larutan etanol mendidih lalu memisah ke dalam labu penampung
7. Tunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ jam hingga 2 jam)
8. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol ekstrak
9. Simpan hasil ekstraksi ke dalam *freezer*

4.7.2 Pembuatan Dosis

4.7.2.1 Pembuatan Dosis Ekstrak Etanol Daun Seledri

Dosis pertama ekstrak etanol daun seledri adalah 200 mg/kgBB. Dosis kg/bb tikus = $200\text{mg} \times 200\text{ g} / 1000\text{ g} = 40\text{ mg/kg bb}$. Kemudian timbang 40 mg ekstrak etanol seledri dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran akuades 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral.

Dosis kedua ekstrak etanol daun seledri adalah 300 mg/kgBB. Dosis kg/bb tikus = $300\text{ mg} \times 200\text{ g} / 1000\text{ g} = 60\text{ mg/kg bb}$. Kemudian timbang 60 mg ekstrak etanol seledri dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran akuades 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral.

Dosis ketiga ekstrak etanol daun seledri adalah 400 mg/kgBB. Dosis kg/bb tikus = $400\text{ mg} \times 200\text{g} / 1000\text{ g} = 80\text{ gr/kg bb}$. Kemudian timbang 2g ekstrak etanol seledri dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran

akuades 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral.

4.7.2.2 Pembuatan Dosis Indometasin

Dosis efektif indometachin adalah 30 mg/kgBB. (Indaryani, 2007) Dosis kg/bb tikus = $30 \text{ mg} \times 200 \text{ g} / 1000 \text{ g} = 6 \text{ gr/kgBB}$. Kemudian timbang 6 g indometachin dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran akuades 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral (sonde).

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

A. Sebelum Penelitian

1. Hewan coba diseleksi sesuai kriteria inklusi.
2. Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, pakan.
3. Hewan coba diaklimatisasi di dalam laboratorium farmakologi selama 7 hari dan dibagi 5 kelompok.
4. Hewan coba diberi makan dan minum standar laboratorium dan dilakukan penimbangan berat badan di awal dan di akhir untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan.

B. Selama Penelitian

1. Prosedur induksi ulkus lambung

Setelah adaptasi dengan lingkungan sekitar dan pemberian diet standar tikus, kemudian diberikan terapi preventif selama 5 hari dengan ekstrak etanol daun seledri (Agrawal *et al*, 2012), pada hari ke 6 yang akan dilakukan induksi ulkus lambung, tikus dipuaskan 18 jam

tetapi tetap diberi air minum. Setelah itu, Indometasin 30 mg/kgBB dilarutkan dengan suspensi CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,5% lalu diberikan secara oral melalui sonde (Rujjanawate, 2005).

2. Perawatan Ulkus lambung

- a. Pada tikus kontrol negatif, tikus sehat tanpa diberikan perlakuan.
- b. Pada tikus kontrol positif, tikus di induksi Indomethacin 30 mg/kgBB tanpa diberikan perlakuan.
- c. Pada tikus perlakuan I, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 200mg/kgBB lalu di induksi Indomethacin 30 mg/kgBB .
- d. Pada tikus perlakuan II, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 300mg/kgBB lalu di induksi Indomethacin 30 mg/kgBB.
- e. Pada tikus perlakuan III, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 400mg/kgBB lalu di induksi Indomethacin 30 mg/kgBB.

C. Sesudah Penelitian

1. Pembedahan dilakukan pada hari ke 7 atau setelah 12 jam diinduksi indometasin dengan mematikan tikus dengan menggunakan anestesi dengan cara memasukan tikus ke dalam wadah tertutup rapat berisi klorofom berlebihan.
2. Pengambilan organ lambung untuk menganalisa jumlah lesi perdarahan ulkus dengan dibuka sepanjang kurvatura mayor dan dicuci dengan air mengalir kemudian di ambil gambar dengan camera canon 650D.

3. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70% kemudian di autoklaf dan dikubur dengan baik.
4. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dikeringkan dan disterilkan dengan autoklaf (Agrawal *et.al*, 2012).

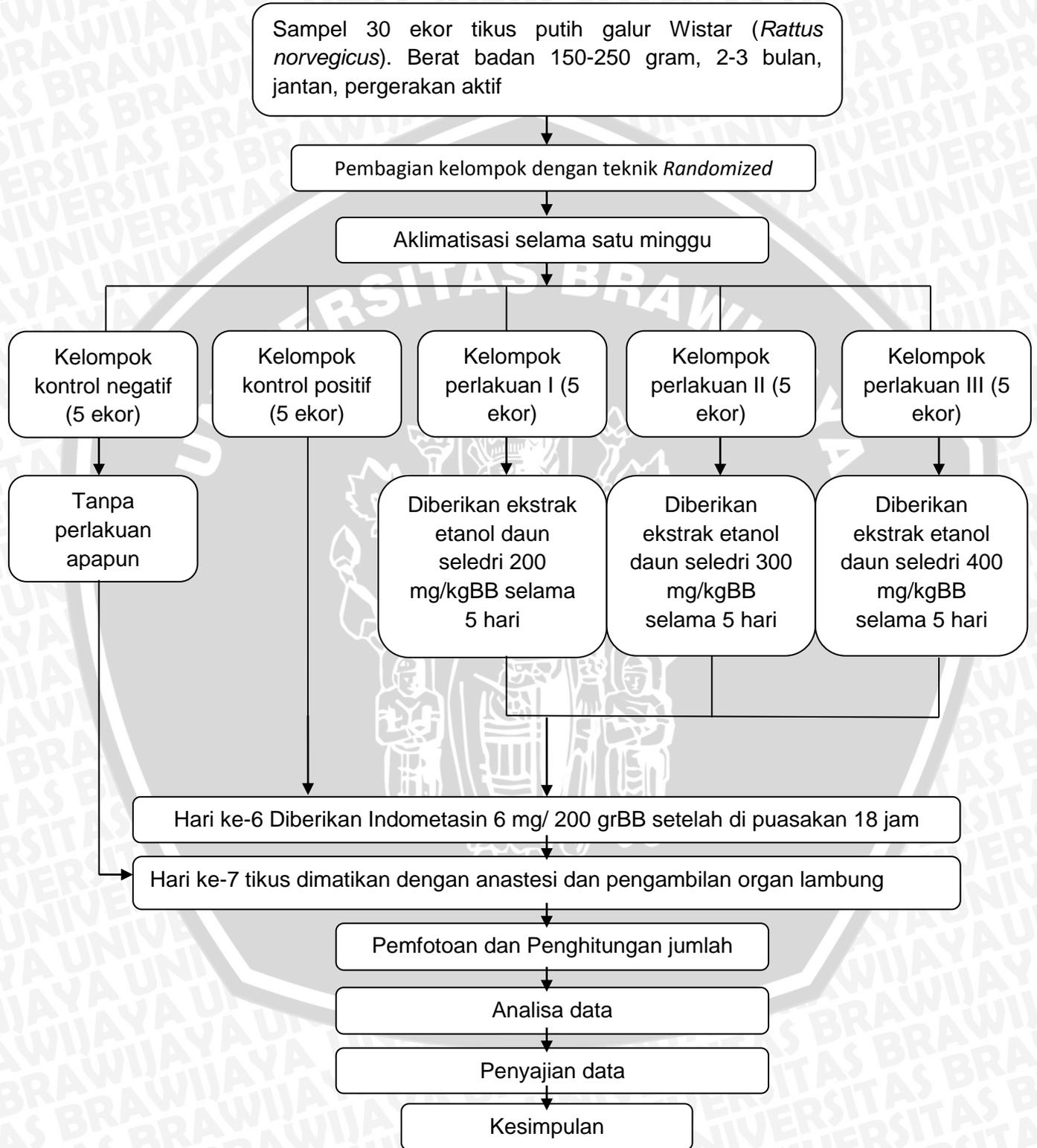
4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Jumlah Lesi Perdarahan

Pengukuran ini menggunakan camera digital. Pengukuran jumlah lesi perdarahan melalui prosedur sebagai berikut :

1. Lambung yang diambil, lalu dibuka dimulai dari bagian lengkung yang lebih besar
2. Lambung dibilas menggunakan *PBS (Phospate Buffered Saline)* untuk menghilangkan darah dan cairan yang ada
3. Lambung yang telah dibuka diletakkan di atas sterofom berwarna hitam di bawah lampu 8 watt
4. Pemotretan dilakukan dengan menggunakan kamera Canon 650D 18 megapixel yang berjarak 30 cm dari objek untuk bahan dokumentasi
5. Melakukan penghitungan jumlah lesi ulkus secara langsung pada lambung di setiap kelompok tikus
(Ashish *et al*, 2012; Wang *et al*, 2011)

4.8 Alur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.8.1 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat dan tidak diberikan perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus di induksi *indomethacin* 30 mg/kgBB dan tidak diberikan ekstrak etanol daun seledri), dan 3 kelompok perlakuan (tikus di induksi *indomethacin* 30 mg/kgBB dan diberikan ekstrak etanol daun seledri sebanyak satu kali dalam sehari, dua kali dalam sehari, dan dua hari sekali). Pengamatan jumlah lesi perdarahan ulkus dilakukan sesudah pemberian perlakuan, lalu hasilnya dimasukkan dalam instrumen penelitian.

4.9 Analisis Data

4.9.1 Uji *One Way ANOVA*

Data yang diperoleh ditabulasi sesuai dengan kelompok kemudian dianalisa statistik dengan metode *One Way ANOVA (Analysis of Variant)* menggunakan program *SPSS 17 for Windows* dan dilanjutkan dengan uji *Posthoc Test*. Apabila nilai yang diperoleh $p > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya bila nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

5. Etik Penelitian

Bedasarkan salah satu prinsip etika penelitian 3R yaitu :

1. *replacement* populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena memiliki struktur anatomi dan fisiologi lambung yang mirip dengan lambung manusia, untuk menghindari faktor-faktor yang dapat menyebabkan bias pada pengamatan ulkus

lambung, maka ditentukan kriteria inklusi untuk menghomogenkan sampel (Wibawanto, 2011)

2. *reduction* yang diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil optimal. Pada penelitian ini jumlah tikus yang digunakan adalah 25 tikus yang dibagi menjadi lima kelompok.
3. *refinement* yang berarti memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, maka dilakukan perlakuan sebagai berikut:
 - a. Hewan coba dipilih sesuai kriteria inklusi.
 - b. Melakukan persiapan untuk memelihara hewan coba mulai dari kandang untuk hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan dan pakan.

Prinsip etika 5F yaitu

1. Bebas dari rasa takut dan stress maka dilakukan aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) selama tujuh hari di Laboratorium Faal FKUB
2. Bebas dari rasa tidak nyaman dan bebas mengekspresikan diri maka, masing-masing kandang di isi 2-3 ekor tikus dengan kondisi bersih, dibersihkan dan diganti sekam setiap 3 hari sekali dan di berikan serutan kayu di dasar kandang.
3. Bebas dari rasa lapar dan haus serta bebas mengekspresikan diri, hewan coba diberi makanan dan minuman yang *ad libitum* dan memberi kemudahan mengakses pakan dan minum kapanpun mereka menghendaki.
4. Bebas dari rasa sakit maka, *Sacrificed* dilakukan dengan cara memasukan tikus ke dalam wadah tertutup rapat berisi kloroform berlebihan karena tikus tidak akan merasakan rasa sakit. Tanda tikus percobaan sudah mati adalah yaitu tidak adanya pergerakan nafas,

denyut jantung (palpasi dada atau gunakan stetoskop), serta kehilangan reflex palpebral dan kornea (reflex kornea positif apabila bola mata disentuh dan reflex papebral positif ketika kelopak mata diusap. Kematian ditandai dengan mata yang tetap terbuka dan kelopak mata tidak bergerak).

