

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Desain *true experimental* bertujuan untuk menyelidiki kemungkinan hubungan sebab-akibat dengan desain yang terdapat kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, yang kemudian membandingkan hasil dari masing-masing kelompok perlakuan dengan kontrol (Suryabrata, 1990).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

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

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Kriteria Inklusi yang digunakan :

- Jenis tikus adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar
- Jenis kelamin jantan
- Berat badan 150 - 250 gram
- Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, tidak ada luka
- Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya

Sampel diambil secara acak (*simple random sampling*) dengan menggunakan bilangan random yang selanjutnya dikelompokkan dalam masing-masing kelompok kontrol atau kelompok perlakuan. Besar sampel dalam

penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku dalam penetapan jumlah sampel yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan.

Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus :

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

Keterangan:

t = banyak perlakuan

r = banyak sampel pada tiap kelompok

Pada penelitian ini besar "t" adalah 5 (2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), sehingga didapatkan nilai "r" sebagai berikut:

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Jadi jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 5 ekor tikus pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 25 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Untuk mengantisipasi kemungkinan adanya *drop out*, diberikan 1 tikus tambahan setiap kelompok. Jadi, pada penelitian ini digunakan 30 ekor tikus jantan galur wistar

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang selama 14 hari terhitung mulai Februari 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dengan dosis pemberian 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penurunan indeks ulkus.

4.5 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Independen: Pemberian ekstrak etanol daun seledri (<i>Apium graveolans</i>)	Pemberian ekstrak etanol daun seledri adalah pemberian daun seledri yang dibuat menjadi dalam bentuk ekstrak kasar yang diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, dan 3 secara oral dengan dosis 200, 300, dan 400 mg/kgBB. Seledri yang digunakan ialah jenis <i>Apium graveolans</i> yang didapat dari UPT Materia Medica. Ekstrak daun seledri dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96%.	-	-	Nominal
Variabel Dependen: Indeks ulkus	Indeks ulkus ialah hasil kalkulasi dari jumlah lesi ulkus, skor keparahan, dan persentase tikus dengan kejadian ulkus di masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol. Pengukuran	-	Hasil hitung berupa angka	Rasio

indeks ulkus dilakukan dengan menghitung jumlah lesi ulkus di setiap lambung tikus setelah dibedah lalu dihitung menggunakan rumus indeks ulkus			
---	--	--	--

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstraksi

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol daun seledri ialah daun seledri (*Apium graveolens L.*), etanol 96%, aquades, timbangan, oven, blender, gelas elemenyer 1L, labu evaporasi, evaporator, waterbath, rotary evaporator, pemanas waterbath, wadah penampung, botol plastik, freezer

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ulkus Lambung

Alat dan bahan dalam membuat ulkus lambung antara lain Indomethacin 30mg/kgBB, dan CMC 0,5%

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Prevensi Ulkus Lambung

Alat dan bahan yang digunakan untuk proteksi / prevensi dari ulkus lambung ialah ekstrak etanol seledri 200 mg/kgBB, 300mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB, sarung tangan, spuit sonde.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Indeks Ulkus

Alat dan bahan untuk mengukur indeks ulkus ialah lambung tikus, kamera Canon 650D 18 megapixel lampu 8 watt, styrofoam, jarum, kertas hitam (Santosa, 2011).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Seledri

A. Proses Pengeringan

Daun seledri (*Apium graveolens L*) dicuci dengan air sampai bersih, lalu dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 40°C.

B. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar ekstraksi di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Dengan prosedur sebagai berikut, daun seledri yang sudah dikeringkan lalu diblender sampai halus (serbuk), lalu timbang serbuk daun seledri sebanyak 200 gram dan masukkan serbuk daun seledri 200 gram ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter, kemudian rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml, lalu kocok sampai benar-benar tercampur dan diamkan selama 24 atau 1 malam sampai mengendap. Sediaan seledri basah ialah 2 kg, dan dijadikan bentuk sediaan kering menjadi 200 gr.

C. Proses Evaporasi

Proses evaporasi dimulai dengan mengambil lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif dan dimasukkan dalam labu evaporasi dalam evaporator, lalu isi *water bath* dengan air sampai penuh dan pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas waterbath lalu sambungkan dengan aliran listrik lalu biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif. Tunggu

hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung lalu masukkan hasil ekstraksi dalam botol dan simpan hasil ekstraksi ke dalam *freezer*

4.7.2 Pembuatan Dosis

Sediaan kering seledri yang dibutuhkan kurang lebih 100 gram untuk membuat ekstraksi yang akan diberikan pada tikus selama 5 hari. 100 gram sediaan kering seledri didapatkan dari 1 kg seledri basah.

Dosis ekstrak etanol daun seledri untuk tikus yang pertama pada penelitian ini adalah 200 mg/kgBB. Dosis ini kemudian dikonversikan dengan dosis untuk tikus yang memiliki berat badan 200 gr, maka = $200 \text{ mg} \times 200 \text{ gr} / 1000 \text{ gr} = 40 \text{ mg}$. Kemudian timbang 200 mg ekstrak etanol seledri dan masukkan ke dalam wadah dengan campuran akuades hingga 10 ml, larutkan hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus dengan berat badan 200 gr adalah = $40 / 200 \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$ per pemberian oral.

Dosis ekstrak etanol daun seledri untuk tikus yang kedua pada penelitian ini adalah 300 mg/kgBB. Dosis ini kemudian dikonversikan dengan dosis untuk tikus yang memiliki berat badan 200 gr, maka = $300 \text{ mg} \times 200 \text{ gr} / 1000 \text{ gr} = 60 \text{ mg}$. Kemudian timbang 300 mg ekstrak etanol seledri dan masukkan ke dalam wadah dengan campuran akuades hingga 10 ml, larutkan hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus dengan berat badan 200 gr adalah = $60 / 300 \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$ per pemberian oral.

Dosis ekstrak etanol daun seledri yang ketiga pada penelitian ini adalah 400 mg/kgBB. Dosis ini kemudian dikonversikan dengan dosis untuk tikus yang memiliki berat badan 200 gr, maka = $400 \text{ mg} \times 200 \text{ gr} / 1000 \text{ gr} = 80 \text{ mg}$.

Kemudian timbang 400 mg ekstrak etanol seledri dan masukkan ke dalam wadah dengan campuran akuades hingga 10 ml, larutkan hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus dengan berat badan 200 gr adalah $= 80/400 \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$ per pemberian oral.

Jumlah kebutuhan ekstrak etanol seledri di semua kelompok perlakuan ialah sebagai berikut :

$$\text{Kelompok perlakuan 1} = 6 \times 5 \times 200 \text{ mg} = 6000 \text{ mg}$$

$$\text{Kelompok perlakuan 2} = 6 \times 5 \times 300 \text{ mg} = 9000 \text{ mg}$$

$$\text{Kelompok perlakuan 3} = 6 \times 5 \times 400 \text{ mg} = 12000 \text{ mg}$$

Maka jumlah keseluruhannya ialah, $6000 + 9000 + 12000 = 27000 \text{ mg} = 27 \text{ gr}$.

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

A. Sebelum Penelitian

1. Hewan coba diseleksi sesuai criteria inklusi
2. Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, pakan
3. Hewan coba diadaptasikan di dalam Laboratorium Fisiologi selama 7 hari dan dibagi 5 kelompok.
4. Tikus diberi makan dan minum standart laboratorium secara ad libitum.

Makanan tikus terdiri dari : jagung, katul, *pollard*, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral dan dibentuk bulatan.

B. Selama Penelitian

1. Prosedur perawatan preventif

Setelah 7 hari aklimatisasi dengan lingkungan sekitar dan pemberian diet standar tikus, tikus akan diberikan perawatan sesuai dengan metode dari Sharma *et.al*, 2012, yaitu sebagai berikut :

- a. Pada tikus kontrol negatif, tikus sehat tanpa diberikan perlakuan
- b. Pada tikus kontrol positif, tikus di induksi Indometasin 6 mg di hari ke 6 tanpa diberikan perlakuan
- c. Pada tikus perlakuan I, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri 40 mg melalui oral (sonde) di hari ke 1-5 lalu diinduksi Indometasin 6 mg dihari ke 6
- d. Pada tikus perlakuan II, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri 60 mg melalui oral (sonde) dihari ke 1-5 lalu diinduksi Indometasin 6 mg dihari ke 6
- e. Pada tikus perlakuan III, tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri 80 mg melalui oral (sonde) dihari ke 1-5 lalu diinduksi Indometasin 6 mg dihari ke 6

2. Prosedur induksi ulkus lambung

Setelah 5 hari diberikan terapi preventif ekstrak etanol daun seledri, pada hari ke 6 akan dilakukan induksi ulkus lambung. Prosedur induksi dilakukan sebagai berikut : tikus dipuasakan 18 jam tetapi tetap diberi air minum selanjutnya Indometachin 30 mg/kgBB dilarutkan dengan suspensi CMC 0,5% lalu diberikan pada tikus secara oral melalui sonde.

C. Sesudah Penelitian

1. Pembedahan dilakukan pada hari ke 7 atau setelah 12 jam diinduksi indometasin dengan mematikan tikus menggunakan anestesi kloroform. Tikus-tikus dieutanasia dengan menempatkannya di dalam toples yang tertutup dan di dalamnya terdapat kapas yang dibasahi dengan anestesi kloroform (Kusemiju, 2012).
2. Memastikan tikus benar-benar mati dengan melihat tanda-tanda seperti, tidak bernafas, tidak bergerak, tidak terdapat denyut jantung.
3. Mengambil bagian organ lambung tikus
4. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70% kemudian di autoklaf dan dikubur dengan baik.
5. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dikeringkan dan disterilkan dengan autoklaf

4.7.4. Prosedur Pengukuran Indeks Ulkus

Pengukuran indeks ulkus melalui prosedur sebagai berikut :

1. Lambung yang diambil, lalu dibuka dimulai dari bagian lengkung yang lebih besar
2. Lambung dibilas menggunakan *PBS (Phosphate Buffered Saline)* untuk menghilangkan darah dan cairan yang ada
3. Lambung yang telah dibuka diletakkan di atas sterofoam 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

6. Menentukan skor keparahan berdasarkan kriteria skoring dari Ashok *et.al*, 2006, yaitu :
 - 0 = warna lambung normal
 - 0,5 = berwarna kemerahan
 - 1 = terdapat spot ulkus
 - 1,5 = bercak-bercak perdarahan
 - 2 = jumlah lesi ulkus > 3 tetapi < 5
 - 3 = jumlah lesi ulkus > 5
7. Menghitung persentase tikus dengan kejadian ulkus di setiap kelompok
8. Melakukan kalkulasi dengan menggunakan rumus indeks ulkus yang dihitung menggunakan kalkulator Casio

4.8 Prosedur Pengumpulan Data

4.8.1 Teknik Pengumpulan Data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat, tidak diberikan perlakuan), kelompok kontrol positif (tikus di induksi Indometacin 30 mg/kgBB), dan 3 kelompok perlakuan (tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri 200, 300, 400 mg/kgBB lalu diinduksi Indometacin 30 mg/kgBB). Pengukuran indeks ulkus dilakukan sesudah pemberian perlakuan, lalu hasilnya dimasukkan dalam instrumen penelitian.

4.9 Analisis Data

4.9.1 Uji *One Way ANOVA*

Data penelitian berupa angka indeks ulkus tikus putih yang dianalisis statistika dengan uji *one way analysis of variant* (ANOVA) menggunakan program SPSS 20 for Windows. Pengujian One-Way ANOVA dilakukan pada selang kepercayaan 95% dan taraf kesalahan 5% ($\alpha = 0,05$), dengan hipotesis yang diajukan sebagai berikut :

1. H_0 : Tidak terdapat perbedaan angka indeks ulkus pada semua kelompok
2. H_a : Terdapat perbedaan angka indeks ulkus pada semua kelompok

dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut :

1. H_0 gagal ditolak apabila nilai signifikansi $P > 0,05$
2. H_0 ditolak apabila nilai signifikansi $P < 0,05$

Nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan. Apabila terdapat perbedaan nyata dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*).

4.10 Etika Penelitian

Prinsip 3R :

1. *Refinement*, yaitu perbaikan semua aspek dari hewan untuk mengurangi penderitaan dan meningkatkan kesejahteraan. (ex. Meminimalkan prosedur invasif). Penelitian ini dalam memberikan perlakuan pada hewan coba menggunakan prosedur secara oral atau sonde, makadari itu tidak akan terjadi prosedur invasif pada hewan. Meningkatkan kesejahteraan

tikus dengan menempatkannya di kandang yang berukuran 15x30x42 cm dan berisi hanya 3 ekor tikus. Kandang dan sekam juga dibersihkan 3 kali sehari.

2. *Reduction*, yaitu penggunaan hewan coba seminimal mungkin tanpa mengganggu *output* penelitian yang diinginkan (ex. Jumlah sampel). Penelitian ini menggunakan 25 ekor hewan coba yang dibagi ke dalam 5 kelompok. Ditambahkan 1 ekor di masing-masing kelompok untuk mengantisipasi adanya kemungkinan *drop out*, maka total keseluruhan terdapat 30 ekor tikus yang dibagi ke dalam 5 kelompok.
3. *Replacement*, dalam penelitian ini digunakan populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan berat badan 150-250 gram dan berusia 2-3 bulan.

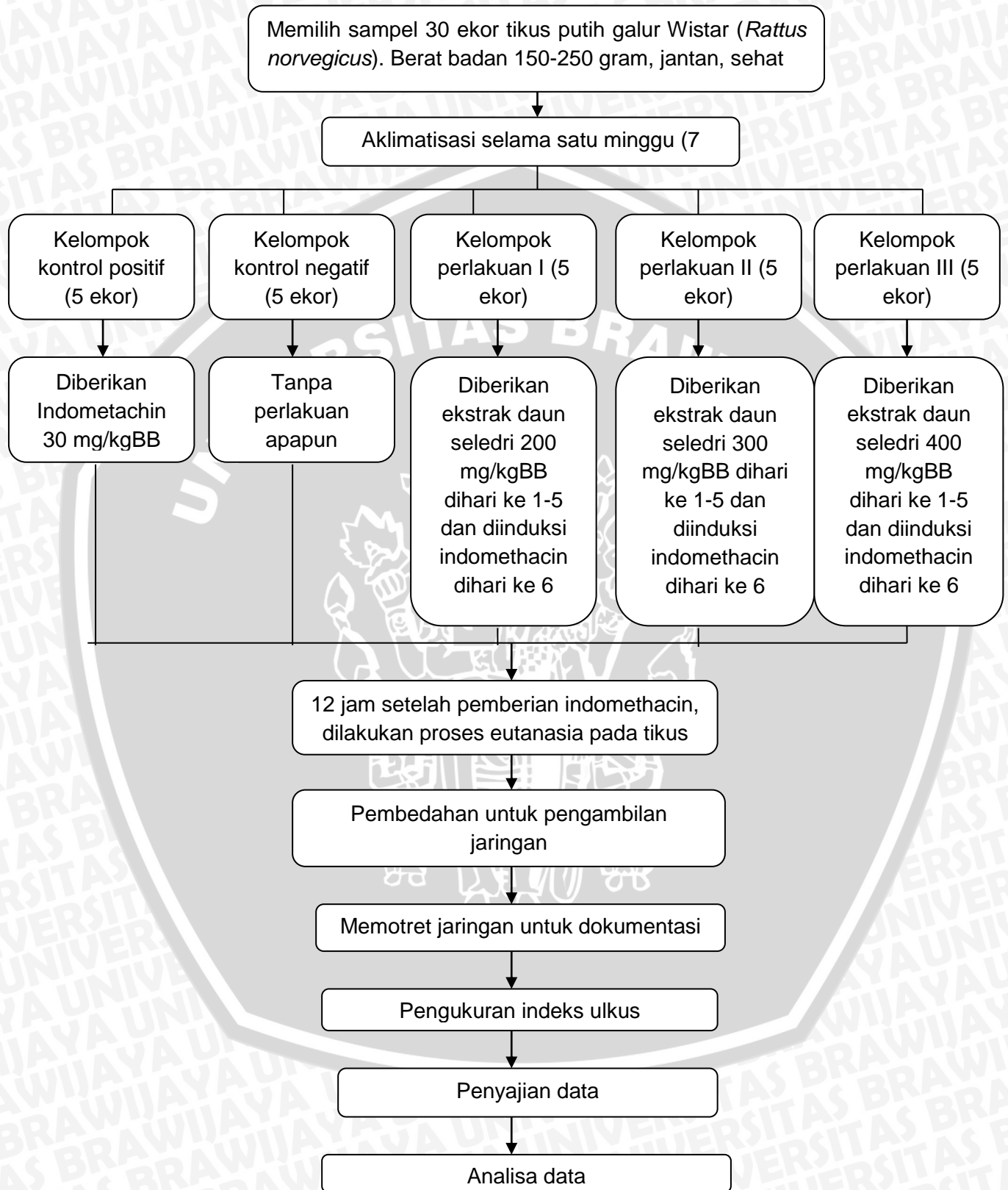
Prinsip 5F :

1. *Freedom from hunger and thirst*, hewan coba dalam penelitian ini diberikan makanan sesuai standar dari laboratorium dan diberikan akses bebas untuk minum secara *ad libitum*.
2. *Freedom from discomfort*, hewan coba ditempatkan di kandang yang ditutup jaring kawat dan dialasi dengan sekam. Setiap kandang berjumlah 3 ekor hewan coba serta kandang dibersihkan 3 kali sehari untuk menghindari rasa tidak nyaman.
3. *Freedom from pain, injury, and disease*, hewan coba diberikan perlakuan secara oral atau sonde, bukan secara invasif. Kandang pemeliharaan dibersihkan 3 kali sehari untuk menghindarkan hewan coba dari penyakit. Proses mematikan tikus dengan cara tikus dimasukkan di dalam toples

tertutup yang berisi kapas yang dibasahi dengan anestesi kloroform (Kusemiju, 2012).

4. *Freedom to express normal behaviour*, yaitu dapat diupayakan melalui penyediaan luas kandang yang cukup agar tikus dapat berperilaku secara normal, kualitas kandang yang baik, dan teman dari hewan yang sejenis.
5. *Freedom from fear and distress*, yaitu memberikan masa transisi dan adaptasi pada tikus terhadap lingkungan yang baru. Tikus dalam penelitian ini dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari sebelum dilakukan perlakuan.





Gambar 4.1 Alur Penelitian