

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Pada desain penelitian ini, tikus di bagi dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dimana kelompok perlakuan merupakan kelompok yang di manipulasi, sedangkan kelompok kontrol merupakan kelompok tanpa perlakuan. Pengambilan data pada kedua kelompok ini tidak diawali dengan pra-tes, namun hanya dilakukan setelah perlakuan selesai diberikan kepada tikus (Nursalam, 2008).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

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).

4.2.2 Sampel

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

4.2.3 Kriteria Inklusi

Criteria inklusi sampel dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

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(usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.
5. Kondisi sehat, ditandai dengan pergerakan aktif; jinak; berbulu licin, mengkilat, dan bersih; rambut tebal dan tidak kusam; badan tegap; tidak ada luka; tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga; tidak terlalu banyak ludah; tidak diare; dan pernapasan tenang.
6. Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya.

4.2.4 Cara Perhitungan Sampel

Sampel dipilih dari populasi dengan cara teknik *simple random sampling* (acak sederhana). Besar sampel ditetapkan berdasarkan prosedur baku yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus Federer sebagai berikut (Dewi, 2013):

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

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel pada tiap kelompok

Pada penelitian ini jumlah perlakuan di bagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, Sehingga didapatkan sampel sebanyak :

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

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

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

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

$$n-1 \geq 4$$

$$n \geq 5$$

Jumlah sampel minimal dalam penelitian ini menurut hasil perhitungan diatas adalah 5 ekor tikus pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 25 tikus galur Wistar. Untuk mengantisipasi kemungkinan terjadinya *drop out*, perlu diberikan 1 tikus tambahan untuk setiap kelompok, Sehingga, total tikus putih jantan yang digunakan dalam penelitian ini adalah berjumlah 30 ekor tikus. Kriteria *drop out* adalah tikus yang tidak mau makan selama penelitian dan tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens L*) dengan dosis 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penurunan kedalaman erosi lambung, karena kedalaman erosi merupakan salah satu tanda dari keparahan ulkus lambung yang terjadi.

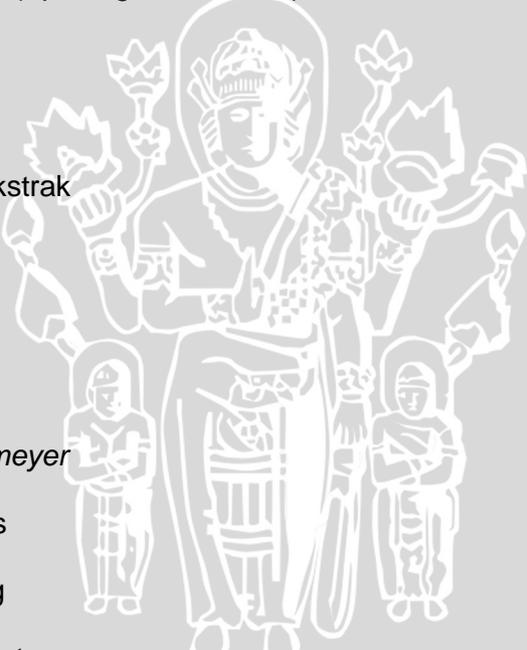
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat ekstraksi daun seledri adalah sebagai berikut:

- | | |
|--|-------------|
| 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* 1 buah
(Sulastri, 2009)

4.5.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ulkus Lambung

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan ulkus lambung adalah sebagai berikut:

- | | | |
|----|-------------------------------|------------|
| A. | Sarung tangan | 1 pasang |
| B. | Sonde | 1 buah |
| C. | Jas laboratorium | 1 buah |
| D. | <i>Indometachin</i> | 30 mg/kgBB |
| E. | <i>Carboxymethylcellulose</i> | 0,5% |
| F. | Lumpang | 1 buah |
| G. | Gelas ukur | 1 buah |

4.5.3 Bahan dan Alat untuk Perawatan Ulkus Lambung

Alat dan bahan yang digunakan untuk perawatan ulkus lambung adalah sebagai berikut:

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

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan Kedalaman Erosi Mukosa Lambung

Alat dan bahan yang digunakan untuk pemeriksaan kedalaman erosi adalah sebagai berikut:

- A. Mikrotom
 - B. Bufer formalin 10%
 - C. Larutan aseton
 - D. Xylol
 - E. Parafin cair
 - F. Alkohol absolut
 - G. Alkohol asam 0,4%
 - H. Hematoksilin
 - I. Lithium carbonatjenuh
 - J. Eosin
 - K. Canada balsam
 - L. Objek glas dan deck glas
 - M. Mikroskop
- (Dja'man,2008)



4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat ukur	Skala Ukur
Variabel Independen: Ekstrak etanol daun seledri (<i>Apium graveolens</i> L)	Ekstrak etanol daun seledri adalah daun seledri yang telah di ekstraks melalui prosedur ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Cara ekstrak daun seledri melalui 3 cara yaitu pengeringan, ekstraksi dan evaporas. Prosedur ini dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang, kemudian hasil ekstraksi etanol daun seledri sebanyak 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB diberikan sesuai kelompok perlakuan tikus pada hari pertama sampai hari ke-5 perlakuan.	mg	Timbangan	Rasio
Variabel Dependen: Kedalaman erosi lambung	Erosi lambung adalah hilangnya sebagian dari ketebalan dinding lambung. Cara menilai kedalaman erosi adalah dengan melakukan pembedahan pada hari ke-7 kemudian membuat sediaan histopatologik yang di potong melintang dan di beri pewarnaan dengan HE. Pemeriksaan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali kemudian erosi lambung di nilai dengan skor erosi lambung. Masing-masing kelompok mendapat lima skor, kemudian diambil nilai median dan/atau rata-rata dari data skor kerusakan lambung. Prosedur penilaian kedalaman erosi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penilaian dilakukan oleh 2 orang yang tidak mengetahui kelompok mana yang kontrol dan kelompok mana yang perlakuan.	Mukosa normal: skor 1 Erosi hanya pada epitel permukaan saja: skor 2 Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar atas: skor 3 Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar tengah: skor 4 Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar bawah: skor 5 Erosi mencapai muskularis mukosa: skor 6 (gambar terlampir pada halaman 44)	mikroskop cahaya <i>Olympus EX51</i> , pembesaran 40x High per Field (HPF) pandang dan <i>OptiLab Camera Microscope tipe Olympus XC10</i>	Ordinal
Pembuatan Ulkus Lambung pada Tikus	Ulkus lambung adalah peradangan atau perlukaan yang terjadi di lambung yang disebabkan oleh penggunaan NSAID. Pembuatan ulkus lambung pada tikus di lakukan dengan cara memberikan NSAID yaitu indometachin. dosis indometasin efektif adalah 30 mg/kgBB. Dengan menyesuaikan berat tikus yang rata-rata 200 g maka indometasin yang digunakan sebesar 6 gr dan campurkan akuades hingga 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 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

4.7.1.1 Proses Pengeringan

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

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi daun seledri (*Apium graveolens*) mengikuti standar ekstraksi laboratorium farmakologi adalah sebagai berikut:

1. Timbang serbuk daun seledri sehingga mencapai berat 200 gram.
2. Masukkan serbuk daun seledri seberat 200 gram ke dalam gelas Erlenmeyer 1 liter.
3. Rendam seledri dengan etanol sampai volume 1000 ml
4. Kocok daun seledri dan etanol sampai tercampur rata.
5. Diamkan selama 24 jam hingga menguap.

4.7.1.2 Proses Evaporasi

Prose evaporasi daun seledri adalah sebagai berikut:

1. pengambilan lapisan atas campuran etanol dan seledri yang mengandung zat aktif
2. Masukkan campuran tersebut dalam labu evaporasi 1 liter
3. Pasangkan labu evaporasi pada evaporator
4. Isi penuh *water bath* dengan air

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 larutan etanol mendidih agar memisah ke dalam labu penampung
7. Tunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 jam hingga 2 jam)
8. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol ekstrak
9. Hasil ekstraksi di simpan ke dalam *freezer*.

4.7.2 Pembuatan Dosis

4.7.2.1 Pembuatan Dosis Ekstrak Etanol Daun Seledri

Bedasarkan penelitian Baananou *et al*, 2012 dosis efektif seledri adalah 300 mg/kgbb kemudian kelompok perlakuan di bagi menjadi tiga dengan dosis masing-masing perlakuan sebagai berikut:

1. Dosis ekstrak etanol seledri yang pertama adalah 200 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gr = $200 \text{ mg} \times 200 \text{ gr}/1000 \text{ gr} = 40 \text{ mg}$. Timbang 40 mg ekstrak etanol seledri Kemudian diencerkan menggunakan aquades sesuai dengan kapasitas lambung tikus yaitu sebanyak 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral melalui sonde.
2. Dosis ekstrak etanol seledri yang kedua adalah 300 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gr = $300 \text{ mg} \times 200 \text{ gr}/1000 \text{ gr} = 60 \text{ mg}$. Timbang 60 mg ekstrak etanol seledri Kemudian diencerkan menggunakan

aquades sesuai dengan kapasitas lambung tikus yaitu sebanyak 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral melalui sonde.

3. Dosis ekstrak etanol seledri yang ketiga adalah 400 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gr = $400 \text{ mg} \times 200 \text{ gr}/1000 \text{ gr} = 80 \text{ mg}$. Timbang 80 mg ekstrak etanol seledri Kemudian diencerkan menggunakan aquades sesuai dengan kapasitas lambung tikus yaitu sebanyak 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral melalui sonde.

4.7.2.2 Pembuatan Dosis Indometachin

Menurut Rujjanawate *et al*, 2005 Dosis *indometachin* untuk pembuatan ulkus lambung adalah 30 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gr = $30 \text{ mg} \times 200 \text{ gr}/1000 \text{ gr} = 6 \text{ mg}$. Timbang 6 mg indometachin Kemudian diencerkan menggunakan aquades sesuai dengan kapasitas lambung tikus yaitu sebanyak 2 ml, kocok hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah 2 ml per pemberian oral melalui sonde.

4.7.3 Perlakuan Hewan Coba

4.7.3.1 Sebelum Penelitian

1. Hewan coba dipilih sesuai kriteria inklusi.
2. Melakukan persiapan untuk memelihara hewan coba mulai dari kandang untuk hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan dan pakan.
3. Aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) dilakukan selama tujuh hari di Laboratorium Faal FKUB

4. Kandang tikus yang berbentuk balok ditutup dengan kotak yang terbuat dari jaring kawat dan di beri pemberat di atasnya untuk mencegah tikus keluar dari kandang. Kandang berukuran 900 cm², dilapisi dengan sekam pada bagian bawahnya dan diganti 3 hari sekali agar tetap kering. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38°C (sedang). Masing-masing kandang diisi dengan 2-3 ekor tikus.
5. Hewan coba diberi makanan dan minuman yang sesuai standar laboratorium kemudian melakukan penimbangan berat badan di awal dan di akhir untuk mengetahui kenaikan atau penurunan berat badan.

4.7.3.2 Selama Penelitian

4.7.3.2.1 Prosedur Induksi Ulkus Lambung

Setelah 7 hari aklimatisasi dengan lingkungan sekitar dan pemberian makan dan minum sesuai standar tikus, setelah itu, tikus di beri terapi preventif dengan ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens L*) selama 5 hari (Sharma *et al*, 2012), tikus dipuaskan selama 18 jam tetapi tetap diberi air minum sebelum proses induksi ulkus lambung. Setelah itu pada hari ke-6, *indomethacin* dengan dosis 6 mg/200 grBB dilarutkan dengan suspensi CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,5% atau aquades lalu diberikan secara oral (sonde) (Rujjanawate, 2005).

4.7.3.2.2 Perawatan Ulkus lambung

Prosedur perawatan ulkus lambung di bagi berdasarkan kelompok adalah sebagai berikut:

- a. Pada tikus kontrol negatif, tikus sehat tidak diberikan perlakuan.
- b. Pada tikus kontrol positif, tikus di induksi ulkus lambung dengan Indomethacin 30 mg/kgBB tanpa diberikan seledri.

- c. Pada tikus perlakuan I, Tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 40 mg selama 5 hari , kemudian tikus di induksi ulkus lambung dengan Indomethacin 30 mg/kgBB.
- d. Pada tikus perlakuan II, Tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 60 mg selama 5 hari, kemudian tikus di induksi ulkus lambung dengan Indomethacin 30 mg/kgBB.
- e. Pada tikus perlakuan III, Tikus diberikan ekstrak etanol daun seledri melalui oral (sonde) 80 mg selama 5 hari, kemudian tikus di induksi ulkus lambung dengan Indomethacin 30 mg/kgBB.

4.7.3.3 Sesudah Penelitian

1. Pada hari ke-7 dilakukan pembedahan dengan mematikan tikus (*sacrificed*)
2. *Sacraficed* dilakukan dengan cara memasukan tikus ke dalam wadah tertutup rapat berisi klorofom berlebihan. 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).
3. Pengambilan organ lambung sebagai sampel untuk melihat kedalaman erosi lambung + fiksasi dalam larutan formalin
4. Setelah pengambilan specimen, Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70% kemudian di autoklaf dan dikubur dengan baik.

5. Pembuatan preparat histopatologi jaringan lambung pada tikus
6. Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk melihat kedalaman erosi.
7. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dikeringkan dan disterilkan dengan autoklaf (Sharma *et.al*, 2012).

4.7.4 Prosedur Pengamatan Kedalaman Erosi lambung

4.7.4.1 Persiapan

Lambung yang telah dipisahkan dicuci dengan larutan NaCl fisiologis untuk dibuat sediaan histopatologik dengan pewarna Hematoksilin Eosin. Keadaan jaringan yang diamati adalah kedalaman erosi yang ditandai dengan terlepasnya sebagian daerah mukosa lambung. Pemotongan lambung untuk sediaan HE dilakukan memanjang mulai dari perbatasan dengan oesofagus sampai ke perbatasan dengan duodenum (Dja'man,2008).

4.7.4.2 Pelaksanaan

4.7.4.2.1 Prosesing Jaringan

Prosedur prosesing jaringan mukosa lambung adalah sebagai berikut:

1. Jaringan mukosa lambung masing-masing perlakuan diambil dan difiksasi dalam buffer formalin 10 % selama 24 jam.
2. Jaringan di dehidrasi menggunakan larutan aseton selama setengah jam sebanyak 3 kali
3. Di clearing dengan xylol/benzen selama seperempat–setengah jam

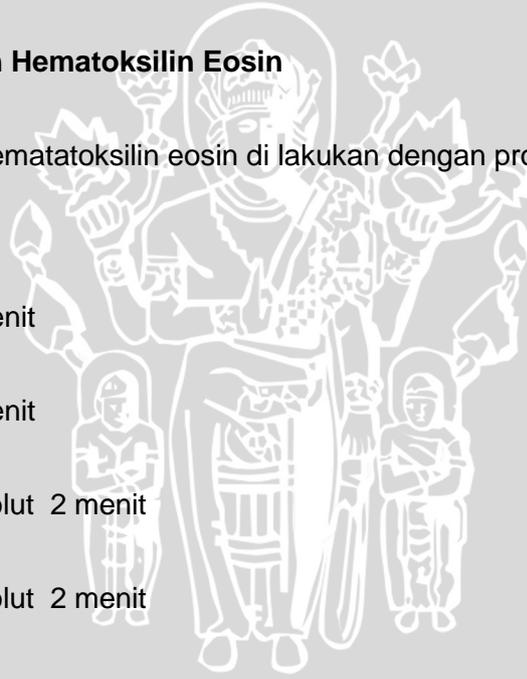
4. Impregnating yaitu jaringan dimasukkan kedalam media berisi parafin cair selama 90 menit
5. Embeding yaitu dibuat blok parafin
6. Jaringan dipotong dengan mikrotom setebal 4 μ dan diletakkan di kaca obyek.
7. Jaringan siap diwarnai

(Dja'man,2008)

4.7.4.2.2 Pengecatan Hematoksilin Eosin

Pengecatan Hematoksilin eosin di lakukan dengan prosedur sebagai berikut:

1. Xylol 1 5 menit
2. Xylol 2 5 menit
3. Alkohol absolut 2 menit
4. Alkohol absolut 2 menit
5. Alkohol absolut 2 menit
6. Air mengalir 2 menit
7. Hematoksilin Eosin 5 menit
8. Air mengalir 2 menit
9. Alkohol asam 0,4% 2-3 celup



10. Air mengalir 2 menit
11. Lithium carbonat jenuh 2-3 celup
12. Air mengalir 2 menit
13. Eosin 1 menit
14. Alkohol absolut 2 menit
15. Alkohol absolut 2 menit
16. Alkohol absolut 2 menit
17. Xylol 5 menit
18. Xylol 5 menit
19. Xylol 5 menit
20. Canada balsam, tutup dengan deck gelas
21. Siap untuk diperiksa dibawah mikroskop

(Dja'man, 2008)

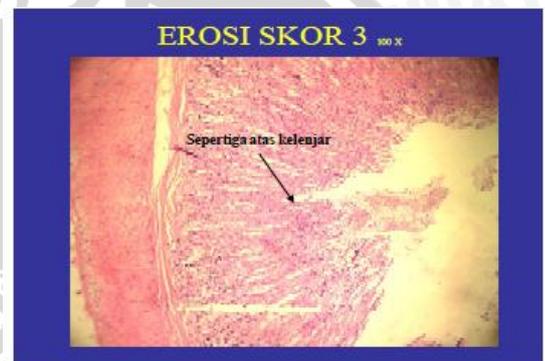
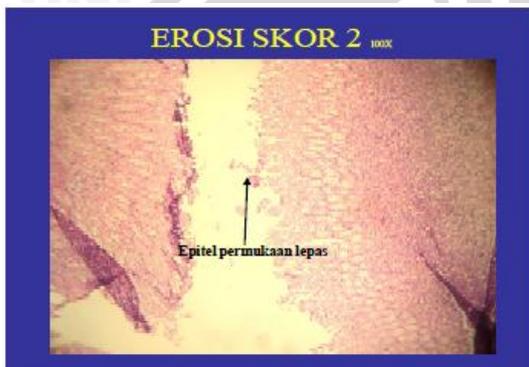
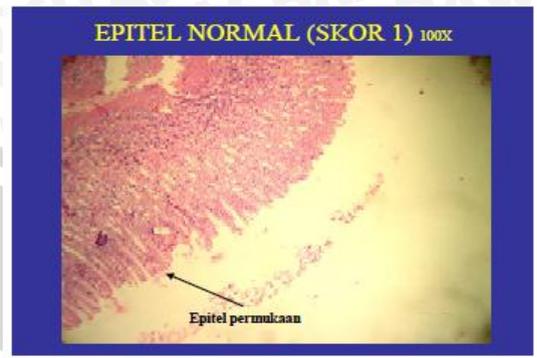
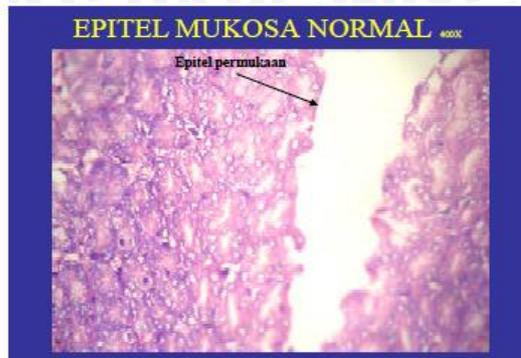
4.7.4.2.3 Pembacaan Preparat Histopatologik

Daerah mukosa lambung mulai dari sel-sel epitel permukaan sampai lapisan muskularis mukosa yang di antaranya terdapat kelenjar-kelenjar lambung yang dibagi menjadi tiga bagian untuk keperluan penilaian kerusakan mukosa lambung. Bagian tersebut yaitu sepertiga kelenjar bagian atas, sepertiga kelenjar bagian tengah dan sepertiga kelenjar bagian bawah. Skor erosi dinilai dengan cara mewarnai lambung dengan HE kemudian dilihat dengan menggunakan

mikroskop *Dotslide Digital Virtual Microscope System*, dengan mikroskop cahaya *Olympus EX51*, pembesaran 40x High per Field (HPF) pandang dan *OptiLab Camera Microscope tipe Olympus XC10* yang tersedia di lab kemudian dinilai berdasarkan skala dari penelitian Dja'man,2008 sebagai berikut:

1. Ž Mukosa normal: skor 1
2. Ž Erosi hanya pada epitel permukaan saja: skor 2
3. Ž Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar atas: skor 3
4. Ž Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar tengah: skor 4
5. Ž Erosi sampai kedalaman sepertiga kelenjar bawah: skor 5
6. Ž Erosi mencapai muskularis mukosa: skor 6

kemudian erosi lambung di nilai dengan skor erosi lambung. Masing-masing kelompok mendapat lima skor, kemudian diambil nilai median dan/atau rata-rata dari data skor kerusakan lambung (Dja'man,2008). Penilaian dilakukan oleh 2 orang yang tidak mengetahui kelompok mana yang kontrol dan kelompok mana yang perlakuan.



Gambar 4.1 Gambar skor erosi lambung dengan pewarnaan HE serta pembesaran mikroskop 100x (Dja'man,2008)

4.8 Posedur Pengumpulan dan Analisa Data

4.8.1 Teknik Pengumpulan Data

Data didapatkan dari 5 kelompok sampel, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat tanpa diberikan perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus di induksi *indomethacin* 6 mg dan tidak diberikan ekstrak etanol daun seledri), dan 3 kelompok perlakuan (tikus di diberikan ekstrak etanol daun seledri sebanyak 40 mg, 60 mg/kgBB, dan 80 mg dan induksi *indomethacin* 6 mg). Pengamatan penurunan kedalaman erosi dilakukan sesudah pemberian perlakuan. Data hasil penelitian yang telah diperoleh, tidak bisa langsung diolah melainkan harus melewati dahulu tahap persiapan sebelum dilakukan analisis. Pada tahap ini, ada tiga langkah yang harus dipenuhi yaitu editing dan koding. Tahap editing, data yang telah dikumpulkan dipilah dan dipilih data-data penting yang nantinya perlu untuk dilakukan analisis. Selain itu data juga dibersihkan dari kemungkinan adanya kesalahan peneliti sebagai pengumpul data (*human error*). Tahap koding (pemberian kode), data yang telah dipilah dan dipilih diberi kode berupa angka-angka (misal angka 1, 2, 3) dan selanjutnya dilakukan tahap tabulasi dengan tujuan untuk mempermudah proses analisa data yang dilakukan.

4.8.2 Uji Kruskal-Wallis

Uji kruskal-wallis merupakan uji non-parametrik untuk membandingkan lebih dari dua kelompok perlakuan. Salah satu data yang di dapat dalam penelitian ini adalah ordinal yaitu skor kedalaman erosi yang hanya bisa diolah dengan statistik non-parametrik, maka uji Kruskal-Wallis yang pada perbandingannya dengan uji Anova pada statistic parametric adalah sama kegunaannya, maka uji Kruskal-Wallis dianggap sesuai untuk menganalisa data

yang diperoleh. Uji kruskal-Wallis akan menampilkan nilai mean atau/dan median

4.8.2 Uji Mann-Whitney

Untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna, maka harus dilakukan uji mann-whitney antara 2 kelompok percobaan pada masing kelompok percobaan, misalnya kelompok percobaan I dibandingkan dengan kelompok percobaan II, kemudian kelompok percobaan I dibandingkan dengan kelompok percobaan III begitu seterusnya sampai semua kelompok percobaan di bandingkan dengan masing-masing kelompok percobaan lainnya untuk melihat apakah ada perbedaan bermakna dari kelompok yang dibandingkan, yang terlihat dari nilai $p < 0,05$ dalam nilai median dan/atau mean skor kerusakan lambung atau tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam nilai median dan/atau mean skor kerusakan lambung yang ditunjukkan dengan $p > 0,05$.

4.9 Etik Penelitian

Dalam penelitian ini diterapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement* ialah menghindari sebisa mungkin penggunaan hewan dalam penelitian atau menggunakan hewan yang lebih rendah ordonya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena memiliki struktur anatomi dan fisiologi lambung yang mirip dengan lambung manusia dan telah banyak digunakan dalam penelitian-penelitian terdahulu serta dengan pertimbangan tikus putih mempunyai tingkat reproduksi yang tinggi dibandingkan hewan coba yang lain.

2. *Reduction* yang diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil optimal. Pada penelitian ini sesuai dengan rumus federer yaitu $(t-1)(n-1) > 15$, dengan t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah hewan yang di perlukan. Pada penelitian ini besar t adalah 5 (2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), Sehingga didapatkan nilai n sebanyak 5 jadi, Jumlah sampel minimal dalam penelitian ini menurut hasil perhitungan diatas adalah 5 ekor tikus pada setiap kelompok dan Untuk mengantisipasi kemungkinan terjadinya *drop out*, perlu diberikan 1 tikus tambahan untuk setiap kelompok, Sehingga, total tikus putih jantan yang digunakan dalam penelitian ini adalah berjumlah 30 ekor tikus.

3. *refinement* yang berarti memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, maka pada penelitian ini dilakukan pemeliharaan hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir

Dalam penelitian yang menggunakan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus). Pada penelitian ini tikus diberi makan 1 x sehari dengan makanan dan minuman yang diberikan secara *da libitum*. Makanan tikus terdiri dari jagung, katul, *pollard*, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 dan dibentuk bulatan dengan masing-masing tikus mendapat 40 gram makanan. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

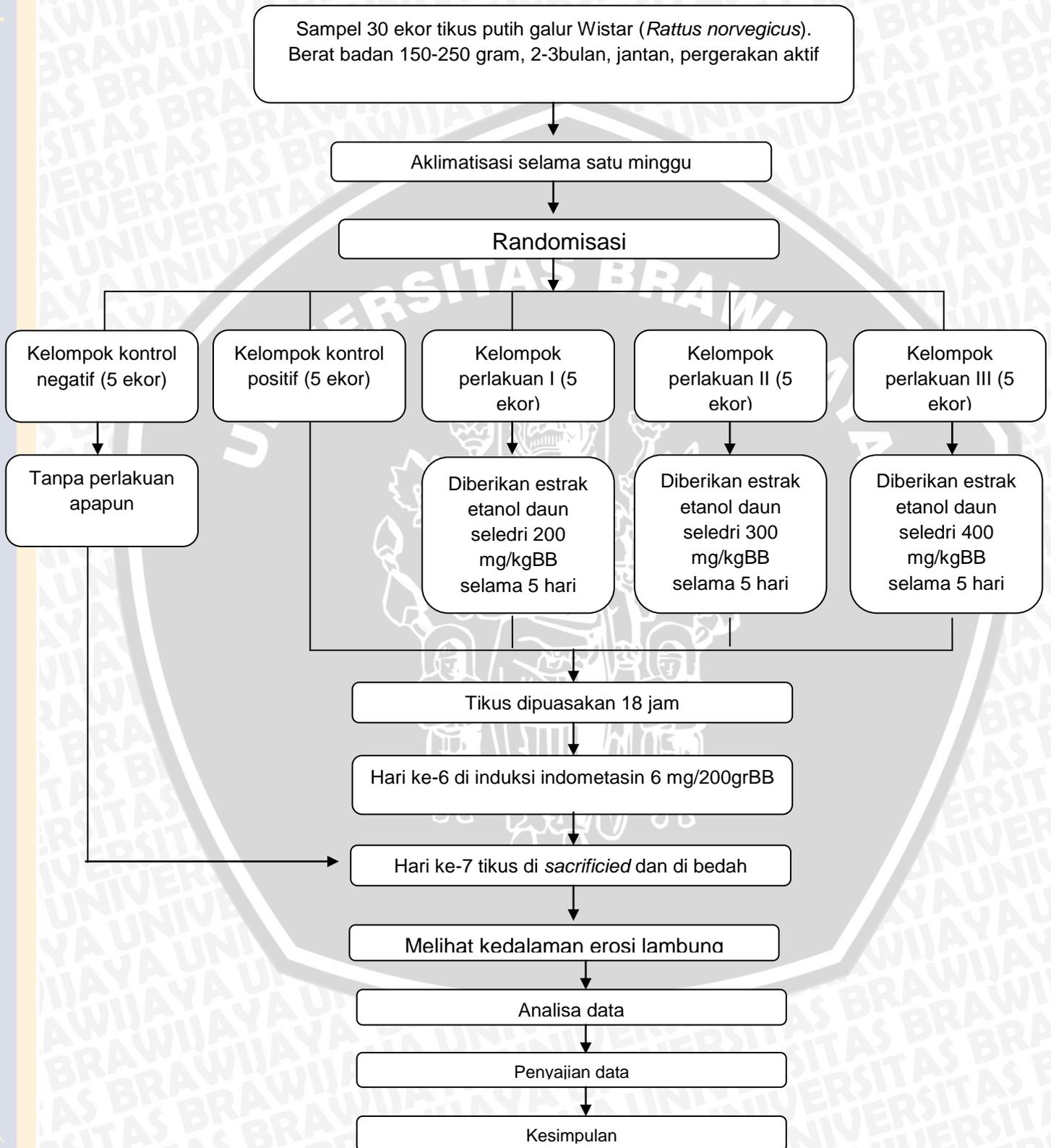
Pakan dan minum diberikan dengan jumlah dan waktu yang sama secara adil.

2. *Freedom from discomfort* (bebas dari ketidaknyamanan). Pada penelitian ini, Kandang hewan coba berbentuk balok berukuran 900 cm² dengan bagian atas terbuka dan ditutup dengan jaring kawat berbentuk kotak dan masing-masing kandang di isi 2-3 ekor tikus dengan kondisi bersih, Kandang dibersihkan dan diganti sekam 3 hari sekali atau ketika sekam dalam kandang sudah basah. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38^oC.
3. *Freedom from pain, injury, and disease* (bebas dari rasa sakit, trauma, dan penyakit). Pada penelitian ini *Sacrificed* dilakukan dengan cara memasukan tikus ke dalam wadah tertutup rapat berisi klorofom 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).
4. *Freedom from fear and distress* (bebas dari ketakutan dan stress jangka panjang). Pada penelitian ini, stres yang dirasakan tikus diminimalisir dengan menempatkan tikus secara berkelompok dalam 1 kandang sesuai dengan habitat aslinya dan tikus di aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) selama tujuh hari di Laboratorrium Faal FKUB untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan baru.

5. *Freedom to express natural behavior* (bebas mengekspresikan tingkah laku alami). Pada penelitian ini tikus di tempatkan berkelompok dalam 1 kandang supaya tikus dapat bersosialisasi dan di beri kemudahan untuk mengakses makanan dan minuman.



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian