

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen dengan desain *post test control group design* menggunakan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) untuk menghitung jumlah sel leukosit pada sediaan histopatologi mukosa lambungtikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diinduksi dengan indometasin. Penghitungan jumlah sel leukosit dilakukan pada semua sediaan histopatologi lambungtikus putih yang telah dibagi dalam 5 kelompok perlakuan.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan waktu pelaksanaan bulan Agustus 2015 dan pengamatan sediaan histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2015.

#### 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.3.1 Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, bulu

mengkilap dan *faeces* tidak lembek. Hewan coba diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dosis I (100 mg/kgBB), dosis II (200 mg/kgBB) dan dosis III (400 mg/kgBB). Estimasi besar sampel perkelompok diperoleh berdasarkan rumus (Solimun, 2001):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

$p$  = jumlah perlakuan

$n$  = besar sampel (jumlah sampel per kelompok)

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, didapatkan jumlah sampel minimal perkelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus. Untuk mengantisipasi kejadian tidak diinginkan seperti hewan coba yang sakit, peneliti menambah jumlah hewan cobanya menjadi  $n + 1$ . Jadi, jumlah hewan coba yang digunakandalam penelitian ini adalah  $5(n+1) = 5(4+1) = 25$  ekor tikus.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Ekstrak daunwaru dalam berbagai dosis yang diberikan pada tikus

##### 4.4.2 Variabel Dependen (Terikat)

Jumlah sel leukosit pada sediaan histopatologi mukosa lambung tikus.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Daun waru yang dipilih adalah yang dipetik langsung dari pohon waru dan diperoleh di Institusi *Materia Medica* di kota Batu, Jawa Timur.
2. Ekstrak daun waru merupakan bahan yang diperoleh dengan cara menghaluskan daun waru, lalu direndam dalam larutan etanol hingga didapatkan zat aktif daun waru.
3. Suspensi indometasin adalah larutan yang berisi serbuk indometasin dari kemasan botol 25 gr yang diproduksi oleh *Sigma-Aldrich Co. LLC* dengan kode I-7378 dan didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
4. Sel leukosit adalah sel yang meningkat jumlahnya pada kondisi peradangan, terdiri dari neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit dan histiosit (Dorland, 2015); yang diamati pada sediaan histopatologi mukosa lambung tikus dengan perbesaran 1000x sebanyak 20 lapang pandang per sediaan dengan pengecatan *Hematoxylin-Eosin (HE)*
5. Efek ekstrak daun waru diamati dengan mencari hubungan antara dosis (mg/kgBB) dengan penurunan hitung jumlah leukosit pada sediaan histopatologi mukosa lambung tikus.

## 4.6 Proses Pembuatan Ekstrak

### 4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- Serbuk daunwaru (*Hibiscus tiliaceus*)
- Aquadest
- Ethanol 96% (pelarut)
- Suspensi indometasin

### 4.6.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- Oven
- Blender
- Timbangan (1)
- Gelas Erlenmeyer (2)
- Corong gelas (1)
- Kertas saring (1)
- Labu evaporator (1)
- Labu penampung etanol (1)
- Evaporator (1)
- Pendingin spiral / rotary evaporator (1)
- Water pump
- Water bath
- Vacuum pump (1)
- Botol hasil ekstrak

## 4.6.2 Cara Pembuatan Ekstrak

### 4.6.2.1 Proses Pengeringan dan Ekstraksi

1. Timbang serbuk daun waru sebanyak 100 gram
2. Masukkan 100 gram daun waru ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 l
3. Rendam dengan etanol 900 ml sehingga menjadi 1 liter
4. Kocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit)
5. Diamkan sekitar 1 malam hingga mengendap
6. Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah tercampur menggunakan kertas saring
7. Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali.

### 4.6.2.2 Proses Evaporasi

1. Masukkan ke dalam labu evaporasi ukuran 1 l dan pasang labu pada evaporator
2. Isi *water bath* dengan air sampai penuh
3. Pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90 °C atau sesuai dengan titik didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik
4. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
5. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (+ 1.5 sampai 2 jam untuk 1 labu)  $\pm$ 900 ml
6. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/5 dari 100 gram atau 20 gram ekstrak daun waru Simpan hasil ekstraksi dalam botol kaca di dalam *freezer*.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Waru

Metode pembuatan ekstrak daun waru melalui 3 tahap, yaitu proses pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi. Hasil yang akan diperoleh kira-kira 1/3 hingga 1/5 dari serbuk daun waru.

### 4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan penyeleksian hewan coba berdasarkan ketentuan sampel, yaitu tikus Wistar jantan, usia 2.5 – 3 bulan, berat badan 150 – 250 gram dan sehat pada pemeriksaan fisik, yang ditandai dengan mata jernih, bulu mengkilap, gerakan aktif atau lincah dan *faeces* tidak lembek.

### 4.7.3 Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang telah diseleksi, dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium Farmakologi selama 6 hari pada temperatur ruangan konstan (20 – 25 °C). Untuk tempat pemeliharaan digunakan kotak plastik berukuran 42 x 30 x 15 cm, masing-masing untuk 5 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam.

### 4.7.4 Randomisasi menjadi 5 Kelompok Penelitian

Sampel dibagi dalam lima kelompok perlakuan, yaitu:

- a. Perlakuan I, yaitu kelompok kontrol negatif: tidak diberikan indometasin atau pun ekstrak daun waru.
- b. Perlakuan II, yaitu kelompok kontrol positif: diberikan indometasin 30 mg/kgBB saja.

- c. Perlakuan III, yaitu kelompok dosis I: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 100 mg/kgBB
- d. Perlakuan IV, yaitu kelompok dosis II: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 200 mg/kgBB
- e. Perlakuan V, yaitu kelompok dosis III: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 400 mg/kgBB.

#### **4.7.5 Penelitian Pendahuluan**

Sebelum dilaksanakan penelitian yang sebenarnya, peneliti akan melakukan penelitian pendahuluan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji dosis ekstrak daun waru yang dapat mengurangi peradangan lambung akibat indometasin. Sampel yang digunakan terdiri dari 2 hewan coba setiap kelompoknya dengan dosis bertingkat 100mg/kgBB, 200mg/kgBB dan 400mg/kgBB yang didapatkan dari literatur menggunakan kulit kayu dari pohon waru (Borhade, et al, 2012)

#### **4.7.6 Pembuatan Larutan Indometasin 10%**

1. Indometasin ditimbang sebanyak yang dibutuhkan (115,98 mg)
2. Indometasin dilarutkan dengan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 mmol hingga mencapai volume 11.5 ml dalam keadaan hangat (40 °C).

#### **4.7.7 Pemberian Indometasin**

Indometasin dengan dosis 30 mg/kgBB diberikan secara peroral menggunakan sonde untuk kelompok perlakuan II – V. Tiap ekor tikus dengan berat rata-rata 200 gram diberikan Indometasin sebanyak

$$30 \times 200/1000 = 6 \text{ mg.}$$

#### 4.7.8 Pemberian Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.)

Ekstrak daun waru diberikan secara peroral (sonde) satu jam setelah pemberian indometasin kepada kelompok perlakuan III – V dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB berturutan. Perhitungan besar ekstrak daun waru tiap dosis per ekor tikus dengan berat badan rata-rata 200 gram yaitu:

a) Dosis I (100 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah  $100 \times 200/1000 = 20$  mg

b) Dosis II (200 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah  $200 \times 200/1000 = 40$  mg

c) Dosis III (400 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah  $400 \times 200/1000 = 80$  mg

#### 4.7.9 Pembedahan tikus dan pengambilan organ lambung

Waktu antara pemberian indometasin dan pembedahan pada penelitian ini adalah 8 jam, dengan harapan agar indometasin dapat mencetuskan peradangan lambung secara maksimal (Vogel, 2002)

#### 4.7.10 Pembuatan preparat histologis lambung (metode blok paraffin)

a) Irisan lambung difiksasi dengan larutan formalin 10% selama satu hari

b) Dilakukan dehidrasi pada organ lambung dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu pada konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% dan 2 kali alkohol absolut (100%), masing-masing 30 menit.

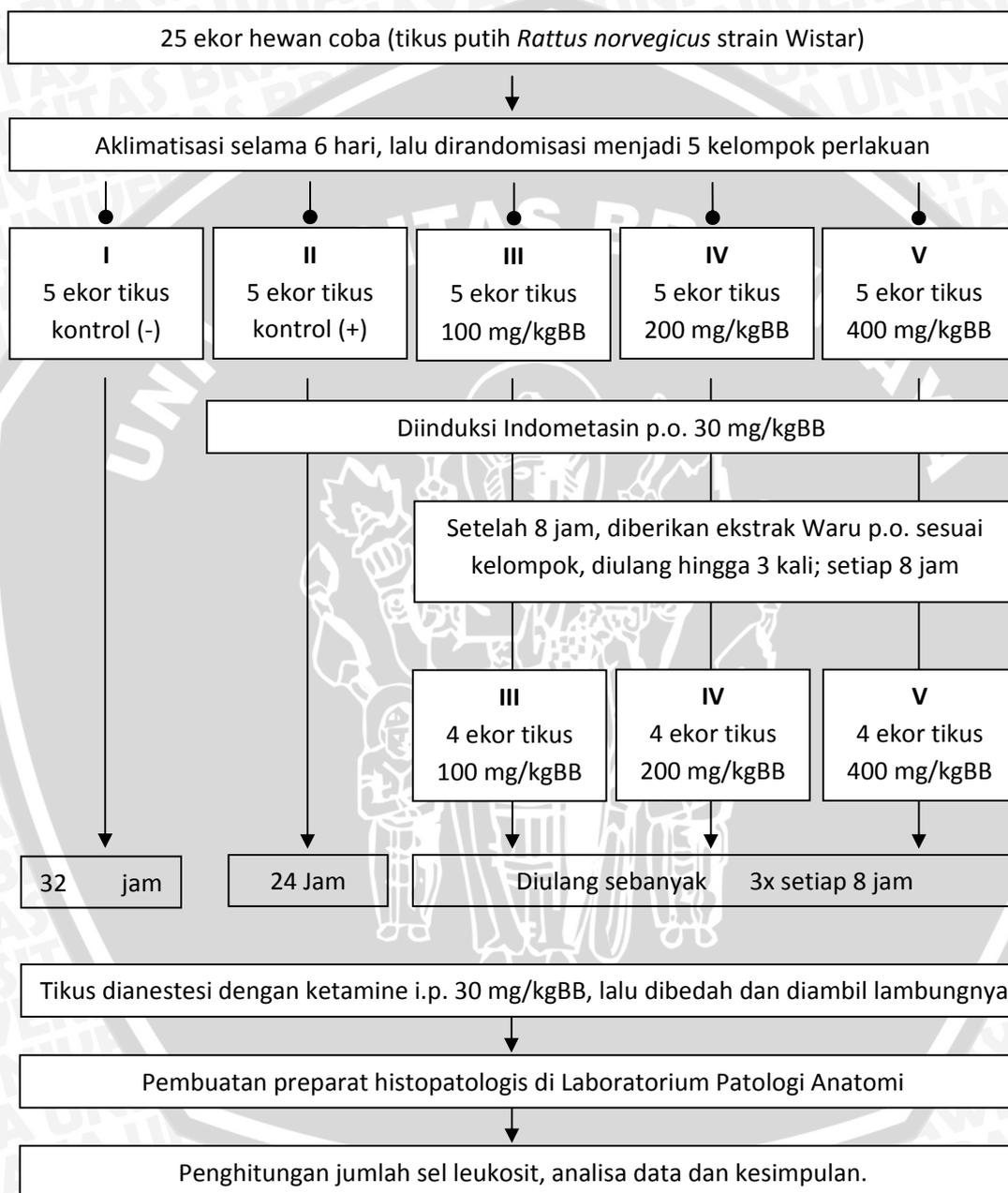
c) Dilakukan clearing dengan xilol 2 kali selama 1 jam.

- d) Dilakukan proses infiltrasi dengan paraffin lunak pada suhu 42 – 46 °C selama 1 jam.
- e) Dilakukan *embedding* dengan parafin keras pada suhu 46 – 52 °C selama 1 jam.
- f) Dilakukan pemotongan pada rotari mikrotom dengan ketebalan 5 mikrometer, lalu dipanaskan 60 °C.
- g) Dilakukan deparafinisasi, yaitu dengan perendaman dengan xilol 2 kali selama 5 menit, kemudian pada alkohol bertingkat dengan urutan: 2 kali alkohol absolut (100%), 95%, 85%, 70%, 50%, 30% masing-masing selama 3 menit.
- h) Dilakukan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)

#### 4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji *one way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0.05$ , untuk pengujian lebih dari dua kelompok dan melihat perbedaan efek tiap dosis ekstrak daun waru terhadap efek inflamasi. Selanjutnya, data yang telah diperoleh akan dianalisis menggunakan *software SPSS 21 for Windows*.

#### 4.9 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian