

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental dan rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test control group design*, menggunakan ekstrak binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diberikan pada tikus wistar (*Rattus novergicusstrain* wistar) yang diinduksi indometasin dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping kelompok perlakuan dan di amati dengan mikroskopis.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus wistar (*Rattus novergicusstrain* wistar) karena memiliki struktur anatomi dan fisiologi lambung yang mirip dengan lambung manusia.usia tikus 2-3 bulan, jenis kelamin jantan, dengan berat badan 125-150 gram dengan kondisi sehat. hewan coba diperoleh dari laboratorium Farmakologi FKUB.

4.2.2 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu satu kelompok kontrol negatif (tikus normal), satu kelompok kontrol positif (tikus diinduksi indometasin), 3 kelompok yang mendapatkan perlakuan (tikus yang diinduksi indometasin dan ekstrak Binahong dengan 3 dosis yang berbeda)

Perhitungan besar sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus seperti dibawah ini (Hannan,2012) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan : n = Jumlah sampel yang diperlukan

P = Jumlah kelompok

Berdasarkan hasil perhitungan diatas didapat jumlah sampel minimal perkelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk tiap kelompok sehingga total 25 ekor. Hal ini dilakukan untuk memperkecil bias dan mengantisipasi kemungkinan bila ada tikus yang mati sebelum pembedahan. Teknik pengambilan sampel dengan *simple random sampling* yaitu melalui cara pengundian.

4.2.3 Karakteristik Sampel Penelitian

Kriteria inklusi :

1. Tikus strain wistar berjenis kelamin jantan
2. Berat 125-150 gram.
3. Umur 2-3 bulan.
4. Sehat, pada pemeriksaan fisik ditandai dengan mata yang jernih, bulu mengkilap, putih, bersih dan tebal, gerakan yang lincah, serta feses yang tidak lembek atau berair.

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama adaptasi tidak mau makan.
2. Tikus yang kondisinya menurun selama adaptasi.
3. Tikus yang mati sebelum pembedahan

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Farmakologi FKUB, mulai Juni 2015 sampai dengan Desember 2015. Penelitian Pendahuluan sudah dilakukan pada Februari 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Ekstrak Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dalam berbagai dosis yang diberikan pada tikus.

4.4.2 Variabel Dependen (Terkait)

Perubahan integritas sel epitel mukosa pada lambung tikus *Rattus novergicus* strain wistar

4.5 Definisi Operasional

1. Binahong yang di peroleh dari Pasar Besar Malang dijadikan Ekstrak Binahong melalui ekstraksi Binahong dengan etanol. Ekstrak Binahong dalam bentuk pasta yang kemudian diencerkan menggunakan aquades. Ekstrak binahong ini bersifat Alkali (basa) dan tidak tahan panas (karena dapat merusak komponennya). Ekstrak Binahong merupakan elemen terpenting dalam penelitian ini.
2. Indometasin adalah salah satu obat NSAID. Indometasin ini dalam bentuk serbuk yang kemudian diencerkan dengan aquades. Indometasin dosis 30 mg/kgBB peroral dapat menginduksi terbentuknya pendarahan di lambung tikus dalam waktu 8 jam. Dosis Indometasin berasal dari penelitian sebelumnya sebesar 30 mg/kgBB (Purnamawati, 2009) yang kemudian diujikan dalam penelitian pendahuluan

3. Kerusakan sel lambung tikus adalah kerusakan yang terjadi mulai dari diinduksinya indometasin sampai diberikannya ekstrak daun binahong kemudian dilakukan pembedahan dan diamati secara histopatologi dengan berbagai jenis lesi yang timbul.
4. Ulserasi epitel mukosa lambung
Disebut ulserasi jika terdapat gap >10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada pembesaran 400x.
5. Erosi permukaan epitel mukosa lambung
Disebut sebagai erosi jika terdapat gap 1-10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 Lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400x.
6. Deskuamasi epitel
Jika terjadi kerusakan atau pengangkatan sedikit pada lesi mukosa lambung berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada pembesaran mikroskop 400x.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Binahong
2. Indometasin
3. Aquades
4. Etanol 96% (C_2H_6O)
5. Ketamine untuk anastesi
6. Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK I (2 bagian) dengan tepung terigu (1 bagian) kemudian dibuat pellet

4.6.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah

A. alat pemeliharaan tikus

- Kandang tikus dengan ukuran 40 x30 x 20 cm
- Penutup kandang tikus dari kawat
- Botol air
- Serbuk kayu
- Timbangan Neraca Analitic

B. Alat pembuatan ekstrak Binahong

- oven
- Blender
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Corong gelas
- Kertas saring

- Labu evaporator
- Pendingin spiral
- Selang *water pump*
- *Water pump*
- *Water bath*
- *Vacum pump*
- Botol hasil ekstrak

C. Alat pembedahan tikus

- Papan dan nampan bedah
- Alat bedah minor (pinset, *Scalpel*, gunting)
- Tempat organ
- Handscoen

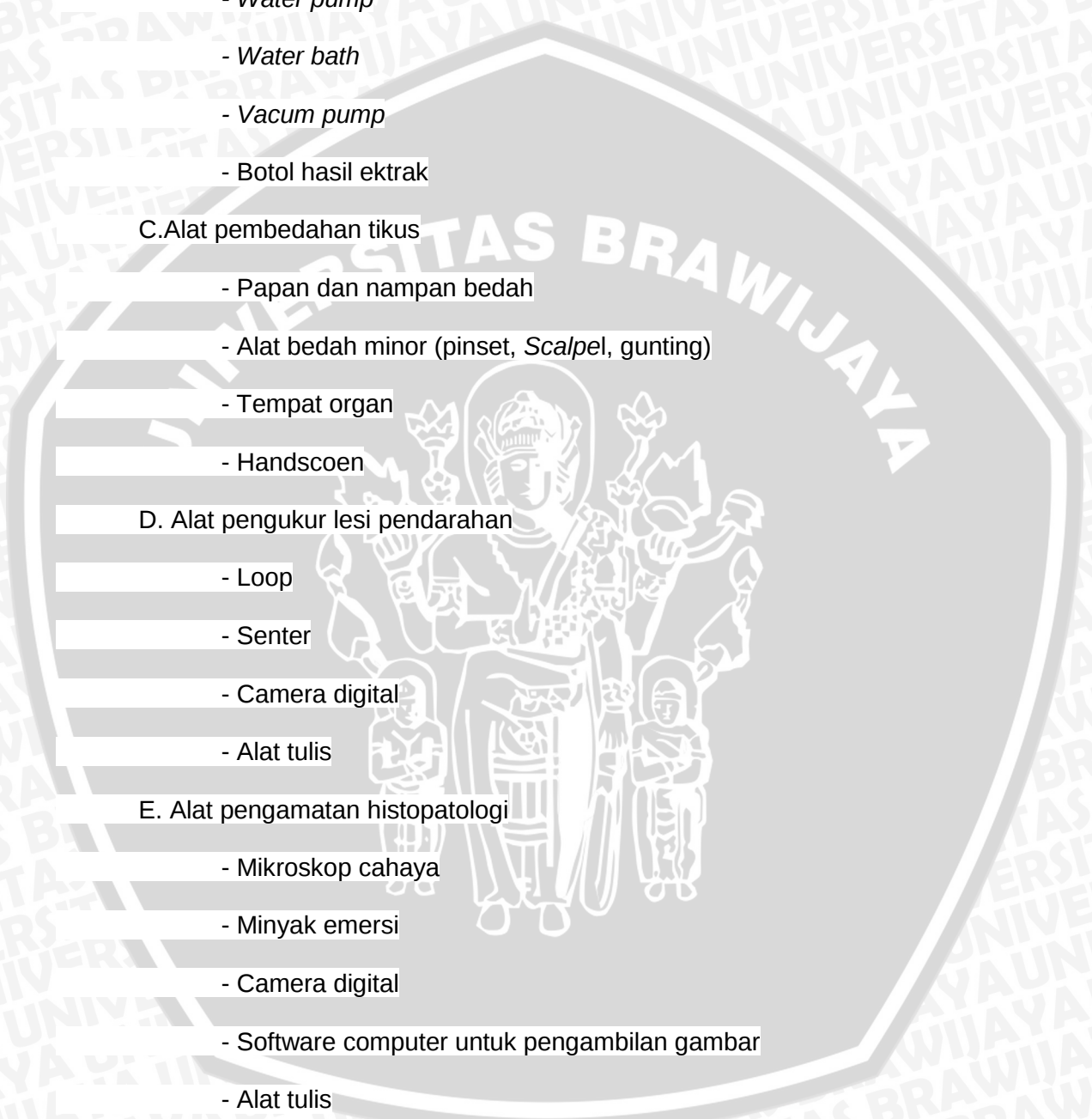
D. Alat pengukur lesi pendarahan

- Loop
- Senter
- Camera digital
- Alat tulis

E. Alat pengamatan histopatologi

- Mikroskop cahaya
- Minyak emersi
- Camera digital
- Software computer untuk pengambilan gambar
- Alat tulis

F. Alat lain : Sonde



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Proses Adaptasi

Tikus diadaptasikan di dalam kandang yang diletakkan di laboratorium Farmakologi FKUB selama 6 hari.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Binahong

- Proses pengeringan

1. Binahong (sampel basah) 1kg yang akan di keringkan di cuci bersih.
2. Dipotong kecil kecil.
3. Dimasukkan kedalam oven dengan suhu 60-70°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air).

- Proses ekstraksi

1. Binahong dihaluskan dengan blender hingga menyerupai bubuk.
2. Ditimbang sebanyak 100 gr (sampel kering).
3. 100 gr sampel kering dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer ukuran $\pm 1L$.
4. Direndam dengan etanol menjadi 1 L.
5. Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
6. Didiamkan 1 malam sampai mengendap.
7. Lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur diambil (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).
8. Proses penyaringan dilakukan selama 3 kali.

- Proses Evaporasi

1. Masukkan dalam labu evaporasi 1L dan pasang ke 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 evaporator.
5. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL.
6. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{5}$ dari bahan alam kering (100 gram bahan alam menjadi ± 20 gram ekstrak bentuk pasta).
7. Masukkan hasil ekstraksi kedalam botol kaca.
8. Simpan dalam freezer (Remington, 2000).

4.7.3 Pemeriksaan Mikroskopis

4.7.3.1 Prosedur Identifikasi Lesi Mukosa Lambung Tikus

Lambung tikus yang sudah di ambil, di amati secara makroskopis kerusakannya Menggunakan lup dan dicatat untuk penentuan lokasi pembuatan histopatologi.

4.7.3.2 Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi (Muhartono, 2013):

1. Organ lambung yang telah diambil dan sudah difiksasi formalin 10% selama 3 jam kemudian di potong dibagian pilorik
2. Bilas organ dengan air mengalir sebanyak 3-5kali

3. Dehidrasi organ lambung dengan : alkohol 70%, selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam. alkohol 96% selama 0,5 jam. alkohol 96% selama 0,5jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam.
4. Clearing : xylol selama 1 jam
5. Impregnansi dengan perafin selama 1 jam dalam oven suhu 65%
6. Blok paraffin didinginkan dalam lemari es sebelum di potong, pemotongan menggunakan rotary microtome dengan menggunakan disposable knife. Pita paraffin di mekarkan pada water bath dengan suhu 60°C
7. Setelah preparat jadi, kemudian dilakukan pengecatan jaringan lambung tikus menggunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).
8. Prosedur pulasan HE:
 - a. Dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit. Larutan xylol II selama 5 menit , etanol absolut selama 1 jam
 - b. Hydrasi dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70%selama 2 menit , air selama 10 menit
 - c. Pulasan inti dengan harris hematoksilin selama 15 menit , air mengalir , eosin selama maksimal 1 menit
 - d. Dehidrasi : alkohol 70% selama 2 menit, xylol II selama 2 menit ; (6) Mounting dengan entelan dan tutup dengan black glass.

4.7.4 Identifikasi Lesi Mukosa Lambung secara Histopatologi

Pengamatan dan pengumpulan data dilakukan dengan mengamati di bawah mikroskopis terhadap 25 preparat histopatologi mukosa lambung tikus dengan pembesaran 400x . Setiap preparat dipilih 5 lapang pandang untuk dilihat integritas epitelnya berdasarkan modifikasi skor integritas sel epitel (Manja,2003). Lapang pandang dipilih secara *random*.

4.7.5 Alur Kerja

Alur kerja dibagi dalam 2 tahap, yaitu :

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan

Penelitian Pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui dosis ekstrak Binahong yang tepat yang dapat mengurangi pendarahan akibat induksi indometasin sebelumnya, dan untuk menentukan waktu pemberian ekstrak binahong setelah tikus diinduksi indometasin sebelumnya.

A. Penentuan dosis Indometasin dan waktu percobaan

Pada penelitian sebelumnya, dosis indometasin yang dapat menimbulkan pendarahan pada lambung adalah pada dosis 30 mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Pada penelitian pendahuluan ini, pembedahan lambung tikus dilakukan setelah dipuasakan selama 8 jam, lalu diberi indometasin, 8 jam berikutnya diberi perlakuan 3 kali 24 jam, dan 8 jam setelah perlakuan terakhir. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui faktor *Self Healing* pada tikus dalam mengurangi kerusakan sel lambung.

B. Penentuan Dosis Binahong

Dosis ekstrak Binahong yang digunakan pada penelitian pendahuluan ini adalah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB, yang diberikan peroral pada tikus setiap 8 jam sekali dalam 24 jam. Dari ketiga dosis tersebut dicari dosis yang menunjukkan efek pengurangan kerusakan sel lambung tikus yang kemudian dijadikan 3 dosis baru diantara dosis yang menunjukkan efek pengurangan kerusakan sel lambung. Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan hasil skoring keparahan tukak secara makroskopis : (Gusdinar ,et al.,2009)

- Skor lesi pada tikus kontrol (+) adalah 6
- Skor lesi pada tikus dosis 100 mg/kgBB adalah 3

- Skor lesi pada tikus dosis 200 mg/kgBB adalah 2
- Skor lesi pada tikus dosis 300 mg/kgBB adalah 1

Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada dosis 100 mg/kgBB sudah menunjukkan efek pengurangan kerusakan sel epitel lambung. Berdasarkan hasil tersebut, dosis yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB, yang diberikan peroral pada tikus tiap 8 jam sekali dalam 24 jam.

C. Penentuan waktu pemberian Binahong

Ekstrak binahong diberikan peroral setelah 8 jam pemberian Indometasin. Indometasin memiliki waktu paruh 4 jam, jadi diharapkan efeknya habis setelah 8 jam.

2. Tahap 2 : Penelitian sesungguhnya

Setelah penelitian pendahuluan, telah ditentukan bahwa dosis Indometasin adalah 30 mg/kgBB dan dosis Binahong adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Sampel Penelitian dibagi dalam 5 perlakuan yaitu :

- A. Kontrol +, yaitu kelompok kontrol positif : dipuasakan selama 8jam, diberi Indometasin 30 mg/kgBB tanpa diberi Ekstrak Binahong
- B. Kelompok 2, yaitu kelompok dosis 1 : dipuasakan selama 8jam, diberi Indometasin 30 mg/kgBB, 8 jam kemudian diberi Ekstrak Binahong dosis I yaitu sebesar 50 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam
- C. Kelompok 3, yaitu kelompok dosis 2 : dipuasakan selama 8jam, diberi Indometasin 30 mg/kgBB, 8 jam kemudian diberi Ekstrak Binahong dosis II yaitu sebesar 100 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam

D. Kelompok 4, yaitu kelompok dosis 3 : dipuasakan selama 8jam, diberi Indometasin 30 mg/kgBB, 8 jam kemudian diberi Ekstrak Binahong dosis III yaitu sebesar 200 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam

E. Kontrol -, yaitu kelompok kontrol negatif : tidak diberi Indometasin maupun Ekstrak Binahong

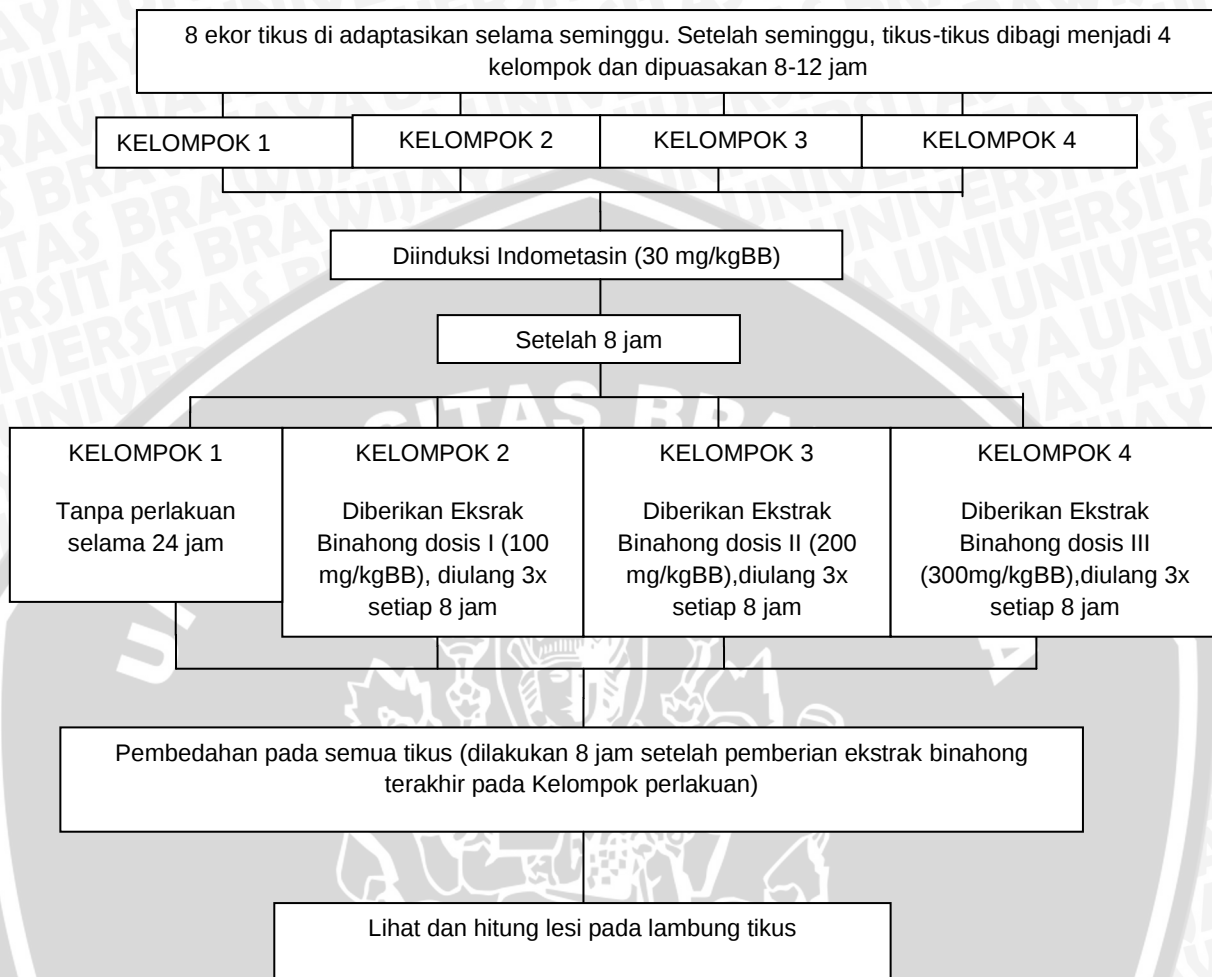
Pembedahan semua tikus dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir ekstrak Binahong.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



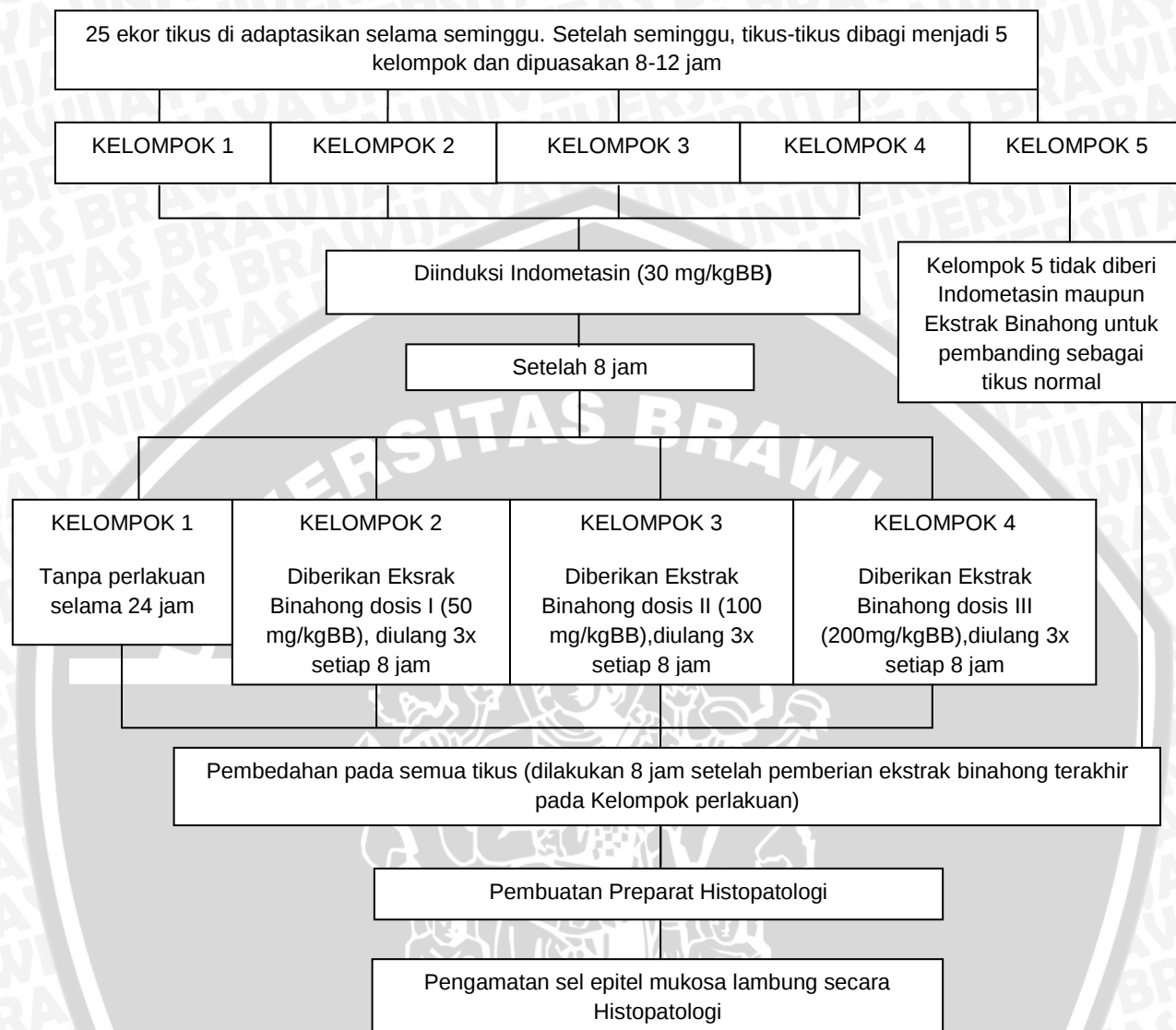
4.7.6 Skema Alur Kerja

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan



Hasil : Menunjukkan bahwa pada dosis 100 mg/kgBB ekstrak daun binahong sudah mengurangi kerusakan lesi lambung. Jadi dosis ekstrak yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB, yang diberikan peroral pada tikus tiap 8 jam sekali dalam 24 jam.

2. Tahap 2 : Penelitian sesungguhnya



4.8 Analisis Data

Data yang diakses pada penelitian ini adalah data dosis Binahong dan skoring integritas epitel mukosa pada lambung. Data dianalisis dengan uji ANOVA satu arah dan Korelasi Pearson. Uji ANOVA satu arah digunakan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan rata-rata kerusakan epitel pada lambung tikus diantara 5 kelompok tersebut, dengan tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$. Korelasi Pearson untuk mencari kekuatan hubungan antara 2 variabel. semua uji analisis statistik menggunakan software *SPSS for Windows* versi 17.

Rancangan pada penelitian ini memakai *Post Test Control Group* dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena pengukuran kerusakan epitel lambung pada tikus hanya mungkin dilakukan setelah tikus dibedah. pengukuran berkurangnya tingkat kerusakan lesi mukosa lambung didasarkan pada keberadaan kelompok kontrol negatif sebagai kelompok yang menggambarkan kondisi lambung normal (tanpa kerusakan epitel lambung).