

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah “*The Post Test Control Group Design*”, untuk membandingkan secara mikroskopis pemberian hidrolisat protein kepala udang Vaname pada lambung tikus (*Rattus norvergicus*) strain Wistar yang diinduksi indometasin dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping kelompok perlakuan yang akan dipilih dengan menggunakan metode *simple random sampling*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih jantan *Rattus novergicus* strain wistar.

4.2.2 Sampel

4.2.2.1 Cara Pemilihan dan Jumlah Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan metode *simple random sampling*. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok sampel: kelompok I kontrol negatif (K(-)) pakan standar, kelompok II kontrol positif (K(+)) indometasin 30 mg/Kg p.o,

kelompok III perlakuan 1 (P(1)) indometasin 30 mg/Kg p.o + protein hidrolisat kepala udang vanamae 0,005 gr/gr BB, kelompok IV perlakuan 2 (P(2)) indometasin 30 mg/Kg p.o + protein hidrolisat kepala udang vanamae 0,01 gr/gr BB, kelompok V perlakuan 3 (P(3)) indometasin 30 mg/Kg p.o + protein hidrolisat kepala udang vanamae 0,02 gr/gr BB.

Estimasi besar sampel dihitung berdasar rumus:

$$n = (15 + p) : p \text{ (Indra, 1999)}$$

$$n = (15 + 5) : 5$$

$$n = 4$$

keterangan: p = perlakuan (5 perlakuan)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Untuk perlakuan sejumlah 5 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan sehingga jumlah total = 20 ekor. Akan tetapi diperlukan penambahan pengulangan pada setiap perlakuan sebagai cadangan dan ditetapkan sejumlah 1 kali pengulangan untuk menghindari bias dan kemungkinan tikus mati sebelum pembedahan. Sehingga total sampel yang dibutuhkan 25 ekor tikus dengan rincian 5 ekor tikus untuk masing-masing perlakuan. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling* yaitu pengundian.

4.2.2.2 Kriteria Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan *Rattus novergicus strain wistar* yang memenuhi criteria sebagai berikut:

- Umur \pm 2 bulan
- Berat badan tikus rata-rata 150-200 gram
- Sehat, ditandai dengan bulu bersih, gerakan aktif, dan mata jernih
- Nafsu makan dan minum tikus yang tetap normal

4.2.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jantan sehat, berbulu putih dan tampak aktif
- Umur \pm 2 bulan (6-8 minggu)
- Berat badan 150 – 200 gram
- Tikus 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.

4.2.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
- Tikus sakit selama masa adaptasi

4.3 Variabel Penelitian

Variabel Independen (variabel bebas): Dosis pemberian hidrolisat protein udang Vaname.

Variable dependen (variable terikat): Gambaran mikroskopis kedalaman lesi mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* Strain Wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Alat dan Bahan

1. Pemeliharaan hewan coba:

- Hewan coba adalah *Rattus norvegicus strain wistar*, jenis kelamin jantan, umur \pm 2 bulan.
- Kandang tikus ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm
- Timbangan Sartorius 1103
- Botol air untuk minum tikus

2. Alat dan bahan pemberian hidrolisat protein:

- Spuit dan sonde
- Hidrolisat protein
- Timbangan Mettler H31AR

3. Alat dan bahan pembuatan ulkus peptikum

- Indomethacin 30mg/KgBB
 - Pelarut indometasin
 - Aquabides
 - Sonde
4. Alat pembedahan tikus
 - Papan dan nampan bedah
 - Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (scaple), gunting
 - Tempat organ
 - *Hands coon*
 5. Alat pengukur lesi perdarahan (Makroskopis)
 - Mikrometer, penggaris
 - Loop / kaca pembesar
 - Pencahayaan tambahan (senter)
 - Kamera digital
 6. Alat pengukur kedalaman lesi perdarahan (Mikroskopis)
 - Preparat Lambung tikus yang telah di *scan*
 - *Software Oly-via*

4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Indometasin

Indometasin adalah obat golongan NSAID yang digunakan sebagai *inducer* perdarahan pada lambung tikus dengan dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Masa optimal perdarahan lambung adalah 6 jam (Vogel, 2002).

2. Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname

Protein yang diberikan berasal dari proses hidrolisat protein Kepala Udang Vaname.

3. Kerusakan sel Lambung

Adalah kerusakan yang terjadi dari setelah diinduksi Indometasin sampai diberikannya hidrolisat kepala Udang Vaname, kemudian dibedah, dan diperiksa secara histopatologis.

4. Ulserasi epitel mukosa lambung

Disebut ulserasi jika terdapat gap > 10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapangan pandang berdasarkan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400 x.

5. Erosi permukaan epitel mukosa lambung

Disebut sebagai erosi jika terdapat gap 1-10 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 perbesaran mikroskop 400 x.

6. Deskuamasi epitel

Jika terdapat kerusakan atau pengangkatan sedikit pada sel epitel mukosa lambung berdasarkan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400 x.

Tabel 4.6.1 Tabel Skoring Integritas Epitel Mukosa berdasarkan Modifikasi Skoring Barthel Manja (Manja, 2003)

SKOR	SKOR INTEGRITAS EPITEL MUKOSA
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel mukosa (gap 1-10 sel epitel / lesi)
3	Ulserasi epitel mukosa (gap > 10 sel epitel / lesi)

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Adaptasi Hewan Coba

Tikus diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.

4.7.2 Pemberian Indometasin

Indometasin diberikan dengan dosis 30mg/KgBB per oral menggunakan sonde (Indaryani, Ery Dwi. 2007).

4.7.3 Pemberian Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein diberikan per oral. Perhitungan dosis yang akan diberikan sebagai berikut:

Menurut Collins dan Schnitzer (2013), pada *how dietary protein intake promotes wound healing Vol. 2 No. 6* mengatakan bahwa kebutuhan asam amino glutamine (bertindak sebagai prekursor untuk sintesa nukleotida, yang penting

untuk mempercepat sel proliferasi selama penyembuhan luka) dan arginin (berperan dalam penyembuhan luka dengan meningkatkan deposisi kolagen, retensi nitrogen, produksi nitric oxide, dan fungsi imun) meningkat selama proses penyembuhan luka tetapi kebutuhan yang spesifik untuk jumlahnya belum ada yang menentukan secara spesifik.

Lalu intake protein direkomendasikan untuk dewasa sehat sebesar 0,8–1 g/kgBB, pada keadaan terluka mereka tidak masuk kedalam kategori sehat karena kebutuhan protein meningkat. Peran protein sangat krusial pada proses penyembuhan, tetapi masih belum diketahui jumlah pasti yang dianjurkan. Setelah operasi 1 - 1,5 gr/kg BB tetapi ini bisa berubah tergantung jenis panjang luka operasi. *Pressure ulcer* 1 – 1,5 gr/kg BB, *deep ulcer* atau *multiple pressure ulcer* butuh 1,5 – 2 gr/kg BB. untuk pasien korban terbakar, kebutuhan proteinnya sebesar 1,5 – 3 gr/kg BB untuk megimbangi protein yang keluar melalui urin dan eksudat luka bakar (Collins & Schnitzer, 2013).

Berdasar uraian diatas kebutuhan protein minimal pada keadaan manusia terluka diambil sebesar 1,5 gr/kg BB. Konversi ke dosis tikus dengan dikalikan 7. $1,5 \text{ gr/kg BB} \times 7 = 10,5 \text{ gr}$ untuk BB 1 kg atau 1000 gr. Selanjutnya diubah untuk tiap BB 1 gramnya, diperoleh hasil dari persamaan 0,01 gr/gr BB (Derelanko, 2000).

Tabel 4.7.3 Tabel Konversi (Derelanko, 2000)

		TO				
		Mouse (20 g)	Rat (150 g)	Monkey (3 kg)	Dog (8 kg)	Human (60 kg)
F	Mouse	1	1/2	1/4	1/6	1/12
	Rat	2	1	1/2	1/3	1/6
R	Monkey	4	2	1	3/5	1/3
O	Dog	6	4	3/2	1	1/2
M	Man	12	7	3	2	1

Pemberian Hidrolisat protein Kepala Udang Vaname diberikan dengan cara satu dosis dibagi menjadi 3 kali pemberian karena volume normal lambung tikus adalah 3-5 ml. Jika volume hidrolisat melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006). Waktu pengosongan lambung normal adalah 60 menit. Jadi, sebaiknya pemberian hidrolisat kepala udang diberikan dengan jeda waktu 60 menit. Tetapi berdasarkan penelitian pendahuluan (eksplorasi), tikus tetap dapat mencerna makanan walaupun dengan jeda waktu 30 menit, akhirnya pada penelitian ini dilakukan pemberian Hidrolisat Protein Udang dengan 1 dosis dibagi menjadi 3 kali pemberian dengan jeda waktu 30 menit agar sesuai dengan kapasitas lambung.

4.8 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan teknik observasi eksperimental yang dilakukan secara langsung oleh peneliti. Dalam menggunakan metode observasi cara yang paling efektif adalah melengkapinya dengan format pengamatan sebagai instrumen (Arikunto, 2002). Pengumpulan data dilakukan pada akhir perlakuan (setelah pembuatan preparat) pada tempat dan waktu yang sama.

4.9 Analisis Data

Rancangan pada penelitian ini menggunakan "*The Post Test Control Group Design*" dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena penilaian mikroskopis lesi mukosa lambung pada tikus hanya mungkin dilakukan pada hewan coba yang sudah dibedah (dimatikan

dulu). Pengukuran kedalaman lesi mukosa didasarkan pada keberadaan kelompok kontrol negatif sebagai kelompok yang menggambarkan kondisi lambung normal (tanpa kerusakan pada mukosa).

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data dosis hidrolisat protein kepala udang vanamae dan skor integritas epitel pada lambung secara mikroskopis. Kemudian hasil penelitian dianalisis dengan cara:

1. Uji normalitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov Test untuk menilai distribusi normal.
2. Uji One Way ANOVA digunakan untuk mengidentifikasi apakah ada perbedaan yang signifikan dari kerusakan epitel dari lima kelompok.
3. Uji beda Pos Hoc Tukey dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan integritas epitel antara 2 kelompok perlakuan.
4. Dilanjutkan dengan uji Korelasi Pearson untuk mengetahui korelasi hasil skoring terhadap dosis hidrolisat protein kepala udang vanamae.
5. Uji regresi digunakan untuk menganalisa besarnya pengaruh variabel independen (hidrolisat protein kepala udang vaname) terhadap variabel dependen (skor integritas epitel), jika dibandingkan dengan faktor eksternal.

Hipotesis akan dianggap bermakna bila pada uji Kolmogorov-Smirnov nilai $p > 0,05$ dan *one way* ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc Turkey* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan, uji korelasi Pearson, dan uji linear regresi (Muhartono, 2013). Semua uji analisis statistik menggunakan *software SPSS for windows versi 20*.

4.9 Alur kerja

