

**BAB 4****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 ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) pada lambung tikus (*Rattus norvegicus* 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 Penelitian**

Populasi penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

**4.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi :

- a. Jenis kelamin : jantan
- b. Usia : 2-3 bulan
- c. Berat badan : 150-250 gram
- d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif

kriteria eksklusi :

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

Cara pengambilan sampling dengan metode *simple random sampling* (sampel diambil random) dari populasi yang kemudian dikelompokkan kedalam masing-masing kelompok control dan perlakuan. Banyaknya sampel pada penelitian ini ditetapkan berdasarkan standar prosedur baku. Untuk menentukan jumlah sampel digunakan 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 ekor = 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.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel independen (variable bebas): pemberian ekstrak daun sirsak.

Variabel dependen (variable terikat): gambaran mikroskopis lesi pada mukosa lambung tikus *Rattus novvergicus*.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Mulai 30 April 2016 sampai dengan 21 Mei 2016.

### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 4.5.1.1 Bahan Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama pemeliharaan *Rattus novvergicus* strain wistar adalah :

- a. sekam
- b. Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK 1 dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 kemudian dibuat pelet.

##### 4.6.1.2 Bahan Untuk Perlakuan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama perlakuan pada *Rattus novvergicus* strain wistar adalah :

- a. Indometasin 30mg/KgBB
- b. Aquades sebagai Pelarut Indometasin

- c. Ekstrak daun sirsak
- d. Akuades

#### 4.5.1.3 Bahan Untuk Pengambilan Organ

- a. Kloroform
- b. Air untuk mencuci kotoran

#### 4.5.1.4 Bahan Untuk Pembuatan Preparat

- a. Lambung tikus
- b. Formalin 10%
- c. Alkohol 80%, 95%, 96%, dan 100%
- d. Alkohol asam
- e. Parafin
- f. Xylol
- g. Counter staining
- h. *Canadian balsem* atau *Entellan*
- i. Putih telur
- j. Air
- k. Cat Hematoksilin-Eosin (Haris Hematoxilen)

#### 4.5.2 Alat Penelitian

##### 4.5.2.1 Alat Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus berupa kotak plastik yang diisi sekam dan ditutup dengan kawat. Ukuran kandang 15cm x 30 cm x 42 cm, masing masing kandang berisi 5 ekor tikus

- b. Wadah air minum tikus
- c. Spidol untuk memberi identitas pada tikus

#### 4.5.2.2 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Timbangan

#### 4.5.2.3 Alat Untuk Pemberian Indometasin dan Ekstrak Daun Sirsak

- a. Sonde
- b. Spuit 1 cc
- c. Spuit 3 cc

#### 4.5.2.4 Alat Untuk Pengambilan Organ

- a. *Handsoen*
- b. Papan dan nampan bedah
- c. Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (*scaple*), gunting
- d. Tempat organ berupa tabung plastik untuk pemeriksaan histopatologi

#### 4.6.2.6 Alat Untuk Pembuatan Preparat

- a. *Rotatory microtome*
- b. *Object glass*
- c. *Cover glass*

#### 4.6.2.7 Alat Penilaian Mikroskopis Lesi Mukosa Lambung Tikus

- Mikroskop cahaya
- Minyak imersi

- Camera digital
- Software komputer untuk pengambilan gambar
- Alat tulis

#### 4.6 Defenisi Operasional Variabel

##### 1. Indometasin

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

##### 2. Ekstrak daun sirsak

Ekstrak daun sirsak diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, dan 3 per oral dengan dosis 200, 300, dan 400 mg/kgBB. Ekstrak daun sirsak diberikan sebanyak 3 kali dengan dosis yang sama secara per oral menggunakan sonde.

##### 3. Kerusakan sel lambung

Kerusakan sel lambung tikus adalah kerusakan yang terjadi mulai dari diinduksikannya indometasin sampai diberikannya ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*); kemudian dilakukan pembedahan dan diamati secara histopatologi.

##### 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 perbesaran mikroskop 400x.

#### 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 400x.

#### 6. Deskuamasi epitel

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

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pembuatan Model Hewan Gastritis

- 1) Tikus dipuasakan sehari, kemudian diinduksi indometasin 30 mg/kgBB per oral (Purnamawati, 2009).
- 2) Setelah 8 jam pasca induksi indometasin, dilakukan pembedahan pada kelompok kontrol positif dan negatif.
- 3) Hasil lambung yang dibedah segera diamati secara makroskopis, kemudian di awetkan dalam formalin 10% untuk persiapan pembuatan preparat histopatologi.

#### 4.7.2 Pemberian Ekstrak Daun Sirsak dan Pembedahan Kelompok

##### Perlakuan

- 1) Ekstrak daun sirsak diberikan sebanyak 3 dosis (200mg/kgBB, 300mg/kgBB, 400mg/kgBB) setiap 8 jam, kemudian dilakukan

pembedahan serta diamati secara makroskopis dan di awetkan dalam formalin 10% untuk persiapan pembuatan preparat histopatologi.

#### 4.7.3 Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi (Muhartono, 2013)

1. Organ lambung yang telah diambil dan sudah difiksasi formalin 10% 3 jam kemudian dipotong secara representatif (perwakilan jaringan lambung tikus dari masing-masing kelompok)
2. Bilas organ tersebut dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali
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 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam
4. *Clearing*: xylol selama 1 jam, xylol selama 1 jam
5. Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C
6. Blok parafin didinginkan dalam lemari es sebelum dipotong, pemotongan menggunakan *rotary microtome* dengan menggunakan *disposable knife*. Pita parafin dimekarkan pada *water bath* dengan suhu 60°C
7. Setelah preparat jadi, kemudian dilakukan pengecatan jaringan lambung tikus menggunakan pewarna Hematoxylin Eosin (HE).
8. Prosedur pulasan HE:
  - a. Dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit, larutan xylol 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 haris hematoksilin selama 15 menit, air mengalir, eosin selama maksimal 1 menit
- d. Dehidrasi: alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol absolut 2 menit
- e. Penjernihan: *xylo* selama 2 menit, *xylo* selama 2 menit; *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan deck glass.

#### 4.7.4. Identifikasi Lesi Mukosa Lambung secara Histopatologis

Pengamatan dan pengumpulan data dilakukan dengan mengamati dibawah mikroskop 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 Barthel Manja (Manja, 2003). Lapangan pandang dipilih secara *random*.

#### 4.7.5 Persiapan Hewan Coba

##### A. Sebelum penelitian

1. Hewan coba diseleksi sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditentukan.
2. Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang yang sudah dibersihkan, rak tempat kandang yang sudah dibersihkan, anyaman kawat, sekam, botol minum yang tidak bocor, timbangan dalam gram, wadah makanan minum dan pakan.
3. Hewan coba diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari.

4. Masing-masing kandang berisi 5 ekor hewan coba dalam keadaan kandang bersih dan penggantian sekam dilakukan 3 hari sekali.
5. Hewan coba tikus putih diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium, kemudian dilakukan juga penimbangan berat badan diawal dan diakhir adaptasi untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan sebagai standar pemberian ekstrak daun sirsak dan indometasin.

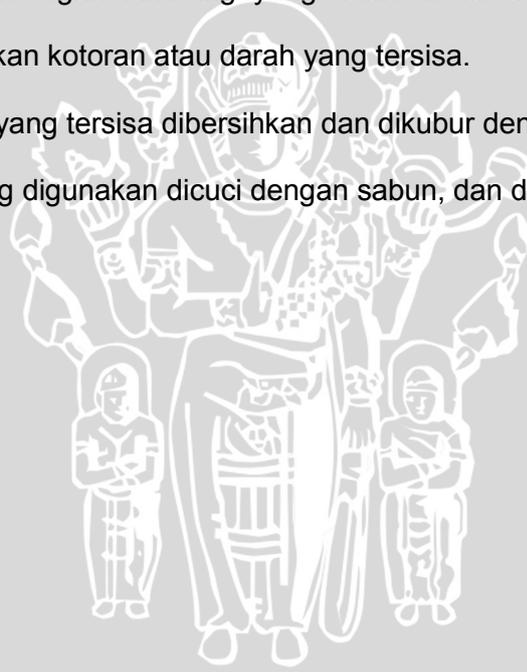
## **B. Selama Penelitian**

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, tikus pada perlakuan control negatif tetap diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium, pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan I, II, dan III akan diinduksi indometasin per oral pada hari pertama. Untuk tikus pada perlakuan I, II, dan III 8 jam setelah diinduksi indometasin, masing-masing akan diberikan ekstrak sirsak per oral dengan dosis 40mg/200grBB, 60mg/200grBB, dan 80mg/200grBB selama 3 kali dengan selang waktu 8 jam setiap kali pemberian ekstrak daun sirsak tersebut.

Pembedahan dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir ekstrak daun sirsak. Prosedur ini dilakukan dengan anestesi perinhalasi yaitu dengan memasukan tikus kedalam wadah tertutup rapat berisi *chloroform* hingga tidak adanya pergerakan nafas dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada, dan hilangnya reflex korneal (kelopak mata tidak bergerak). Setelah itu, pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.

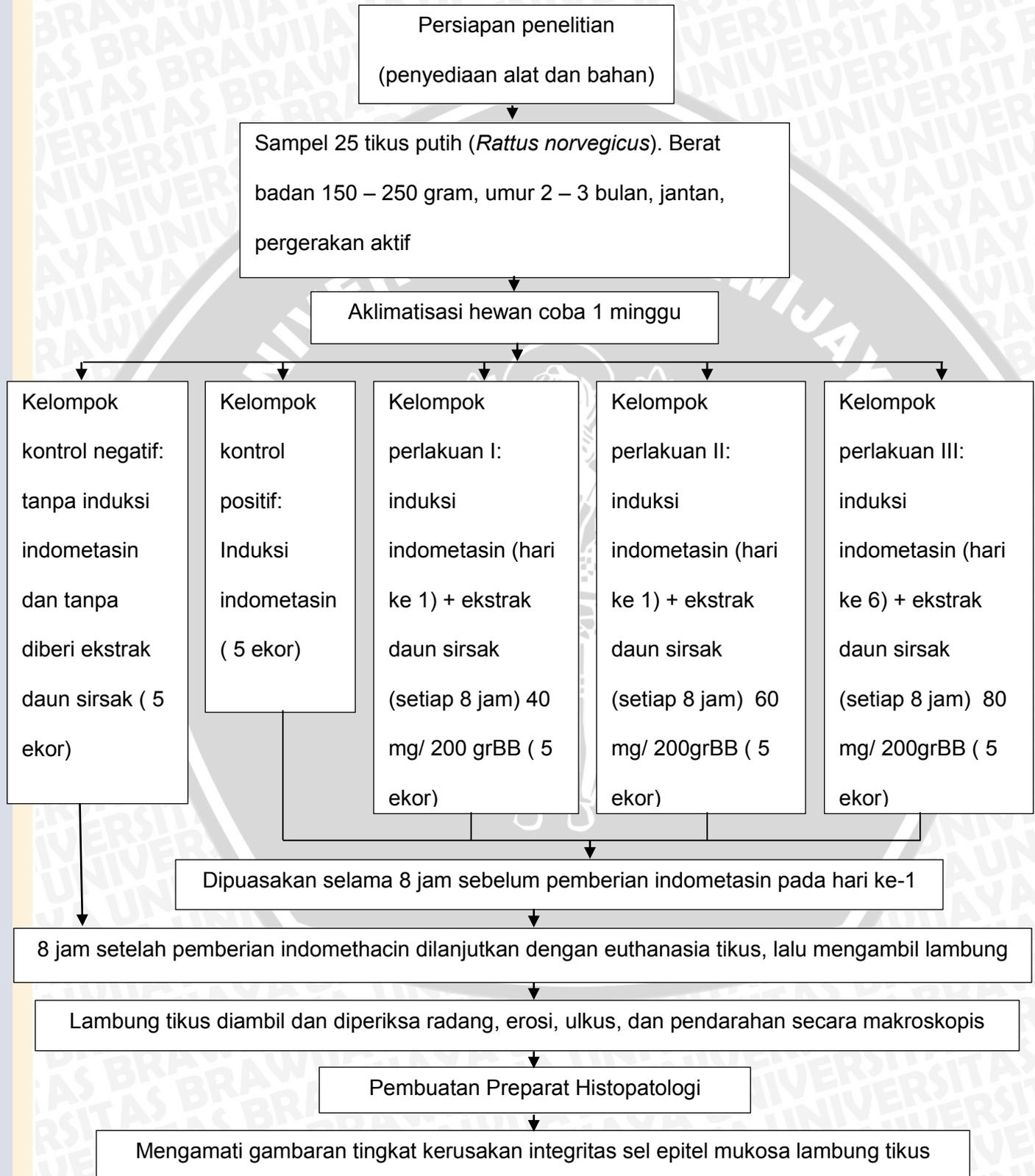
### C. Sesudah Penelitian

1. Pembedahan dilakukan pada hari ke-7 atau setelah 12 jam induksi indometasin. Prosedur ini dilakukan dengan anestesi perinhalasi yaitu dengan memasukan tikus kedalam wadah tertutup rapat berisi *chloroform*. Tanda hewan coba sudah mati adalah tidak adanya pergerakan nafas dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada atau dengan stetoskopp, dan hilangnya reflex korneal (kelopak mata tidak bergerak).
2. Pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.
3. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dikubur dengan baik.
4. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dan dikeringkan.



#### 4.8 Alur Penelitian dan Pengumpulan Data

##### 4.1 Alur Penelitian



#### 4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat dan tidak diberi perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus hanya diinduksi indometasin 6 mg/200 grBB), dan 3 kelompok perlakuan (tikus diberikan ekstrak daun sirsak dengan dosis 40 mg/200 gr BB, 60 mg/200 gr BB, 80 mg/200 gr BB kemudian diinduksi indometasin 6 mg/200 gr BB). Pengamatan penurunan skor epitel dilakukan sesudah pemberian perlakuan, kemudian melakukan analisa data.

#### 4.9 Analisis Data

##### 4.9.1 Uji *One Way ANOVA*

Data yang diperoleh ditabulasi sesuai dengan kelompok kemudian dianalisa statistik dengan metode *One Way ANOVA (Analysis of Variant)* menggunakan program *SPSS 20 for Windows* dengan hipotesis yang diajukan adalah :

1.  $H_0$  : Tidak terdapat perbedaan skor epitel lambung pada setiap kelompok perlakuan.
2.  $H_a$  : Terdapat perbedaan skor epitel lambung pada setiap kelompok perlakuan

Apabila nilai yang diperoleh  $p > 0.05$  artinya tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya bila  $p < 0.05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Kemudian apabila terdapat perbedaan nyata dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*).

#### 4.10 Jadwal Kegiatan

Berikut adalah jadwal kegiatan penelitian ini :

1. Persiapan : 16 Maret – 29 April 2016
  - 16 Maret 2016 : Mendaftar Tugas Akhir
  - 17 Maret 2016 : Pengajuan Etik
  - 29 Maret 2016 : Kelaikan Etik
  - 25 April 2016 : Pendaftaran penelitian di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pemesanan tikus serta ekstrak sirsak
  - 29 April 2016 : Tikus siap digunakan penelitian
2. Pelaksanaan : 19 April 2016 – 18 Mei 2016
  - 30 April-6 Mei 2016 : Adaptasi tikus dalam lingkungan laboratorium
  - 6 Mei 2016 : Timbang tikus, bagi kelompok, dan tikus mulai dipuasakan untuk penelitian pendahuluan
  - 7 Mei-9 Mei 2016 : Penelitian pendahuluan
  - 10 Mei 2016 : Timbang tikus, bagi kelompok, dan tikus dipuasakan untuk penelitian sebenarnya
  - 11-12 Mei 2016 : Penelitian efek ekstrak daun sirsak pada lesi mukosa lambung tikus
  - 13 Mei 2016 : Pembuatan preparat histopatologi
  - 21 Mei 2016 : Pembacaan hasil preparat dengan menggunakan mikroskop

### 3. Pengolahan dan pelaporan : 21 Mei – 3 Juni 2016

- Mengerjakan statistika terhadap hasil skor integritas epitel mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* strain wistar
- Pembuatan bab 5-7

#### 4.11 Etika Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini diaklimatisasi selama 7 hari dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kandang yang terbuat dari plastik dan ditutup dengan kawat serta diberi sekam pada bagian bawahnya dan diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu ruangan sekitar 25-28°C. Masing-masing kandang diisi dengan 5 ekor tikus. Berdasarkan prinsip etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan dapat dijelaskan sebagai berikut (Ridwan, 2013) :

1. *Replacement* diartikan sebagai keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan dengan seksama. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan berat badan 150-250 gram, jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan. Tikus merupakan hewan coba yang mempunyai kondisi biologis mirip dengan manusia dan sudah banyak digunakan dalam penelitian hewan coba dengan ulkus lambung.
2. *Reduction* diartikan sebagai penggunaan hewan coba dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok (1 kontrol negatif, 1 kontrol positif, 3 kelompok

perlakuan) masing-masing berjumlah 4 ekor tikus. Kemudian ditambahkan 1 ekor tikus pada setiap kelompok untuk mengantisipasi kemungkinan *dropout*. Jumlah hewan coba dihitung menggunakan rumus Indra tahun 1999 yaitu  $n = (15+p) : p$ , dengan p adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah hewan coba yang diperlukan.

3. *Refinement* diartikan sebagai perlakuan hewan coba secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Dalam penelitian ini, hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari serta diberikan makan dan minum *ad libitum*. Masing-masing kandang diisi dengan 5 ekor tikus. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 25-28°C. Euthanasia dilakukan dengan dengan anestesi perinhalasi.

Prinsip 5F :

1. *Freedom from hunger and thirst*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan makanan dan minuman *ad libitum*
2. *Freedom from discomfort*. Dalam penelitian ini hewan coba diletakan pada kandang dan hanya diisi 5 ekor tikus pada setiap kandang untuk menyediakan kebebasan dalam bergerak. Kandang terbuat dari plastic dan diberi penutup jaring kawat untuk akses keluar masuknya udara. Kandang dialasi dengan sekam, diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih.
3. *Freedom from pain, injury, and disease*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan perlakuan per oral untuk meminimalisasi nyeri dari prosedur invasif. Berikutnya, hewan coba harus bebas dari penyakit dengan dilakukan pemantauan secara rutin. Proses euthanasia tikus dengan anestesi

perinhalasi. Hewan coba diletakan pada wadah tertutup yang berisi kapas yang dibasahi dengan *chloroform*.

4. *Freedom to express normal behavior*. Dalam penelitian ini hewan coba diperbolehkan mengekspresikan tingkah laku alami dengan memberikan kualitas kandang yang baik dan cukup luas agar bebas bergerak.
5. *Freedom from fear and distress*. Dalam penelitian ini hewan coba aklimatisasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang dapat mencegah terjadinya stress.

