

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode *true eksperimental post test only, control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *patchouli alcohol* dari *Pogostemon cablin* sebagai efek penyembuhan terhadap mukosa lambung tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan sistem randomisasi dalam penentuan sampel. Metode yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Tikus pada grup kontrol tidak akan diberi *patchouli alcohol*, sedangkan pada grup yang lainnya akan diberikan *patchouli alcohol* dengan dosis yang berbeda-beda. Setelah 8 jam induksi indometasin pada tikus, *patchouli alcohol* akan diberikan sebanyak 3 kali dengan jeda masing-masing 8 jam.

4.2 Populasi pada Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan jenis *Rattus norvegicus* *Wistar Race*

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dipilih menggunakan teknik *simple random sampling*. Dimana sampel akan diambil secara acak dan setiap populasi memiliki kemungkinan yang sama untuk menjadi sampel. Jumlah sampel dalam penelitian ini berjumlah

20 ekor tikus dengan ciri-ciri berat badan 150-200 gr, usia 2-3 bulan, dan pergerakan aktif. Tikus yang dipilih adalah tikus jantan selain karena tidak ada perbedaan antara tikus jantan dan betina, tikus jantan lebih mudah ditemukan.

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan, maka jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus $n=(15+p)/p$ (Indra, 1999) dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan, p = jumlah perlakuan. Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%.

$$N= (15+p)/p$$

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

$$n = 20 / 5$$

$$n = 4$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap perlakuan adalah 4 (Indra, 1999).

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel sebanyak 4 ekor tikus pada masing-masing kelompok perlakuan. Total jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 20 ekor tikus dengan perincian sebagai berikut :

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok dan Perlakuan untuk Masing-masing Kelompok

Kelompok	Perlakuan	Jumlah tikus
Kontrol negatif (N)	Minyak jagung	4
Kontrol positif (K)	Diinduksi indometasin	4
Kelompok perlakuan 1	Diinduksi indometasin + <i>patchouli alcohol</i> mg/kgBB	4 10
Kelompok perlakuan 2	Diinduksi indometasin + <i>patchouli alcohol</i> mg/kgBB	4 20
Kelompok perlakuan 3	Diinduksi indometasin + <i>patchouli alcohol</i> mg/kgBB	4 40

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus berjenis kelamin jantan, berbulu putih, dan tampak aktif
- Umur 2-3 bulan (8-12 minggu)
- Berat badan sekitar 150-200 gram
- Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomik ditandai dengan mata yang jernih, bulu mengkilap, putih, bersih dan tebal, gerakan yang lincah, serta feses yang tidak lembek atau berair

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk dan/atau mengalami penurunan berat badan
- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- Tikus yang sakit dan mati selama masa perlakuan

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus dinyatakan *drop out* apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *patchouli alcohol* dari *Pogostemon cablin* sebanyak 10 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 1, 20 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 2, dan 40 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 3.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah skor derajat keparahan lesi dan indeks ulkus pada tikus yang diinduksi dengan indometasin.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 minggu, yaitu pada bulan juni hingga bulan juli.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Penelitian

1. Pemeliharaan hewan coba:

- a. Hewan coba adalah *Rattus norvegicus* jenis wistar, jenis kelamin jantan
 - b. Umur antara 2 – 3 bulan
 - c. Kandang tikus ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm
 - d. Timbangan sartorius 1103
 - e. Botol air untuk minum tikus
2. Alat dan bahan pemberian *patchouli alcohol* :
- a. Spuit dan sonde
 - b. Sarung tangan
 - c. Ekstrak *patchouli alcohol* dengan dosis 10 mg/KgBB, 20 mg/KgBB, dan 40mg/KgBB didapatkan dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Brawijaya
3. Alat dan bahan pembuatan ulkus lambung
- a. Sonde
 - b. Indometasin dengan dosis 30 mg/kgBB (Sabiou *et al.*, 2016)
 - c. Akuades
4. Alat dan bahan untuk pembedahan hewan coba
- a. Papan dan nampan bedah
 - b. Alat bedah minor berupa pinset, pisau bedah (*scalpel*), gunting, pinset
 - c. Tabung sebagai tempat penyimpanan organ sementara
 - d. *Handscoon*
 - e. Kapas
 - f. *Chloroform*

5. Alat dan bahan untuk pengukuran panjang lesi ulkus

- a. Alas *styrofoam* yang dilapisi kain
- b. Jarum pentul
- c. Jangka sorong
- d. Kamera 24mp dengan resolusi 5192 x 3648

4.6 Definisi Operasional

a. *Patchouli alcohol* berasal dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang didapat dari proses fraksinasi bertingkat minyak nilam hingga mendapat senyawa tunggal kemudian dilakukan *fresh drying*. Minyak nilam ini sendiri merupakan hasil dari distilasi uap air tanaman nilam. Sebelum diberikan kepada tikus, *patchouli alcohol* akan dilarutkan dalam minyak jagung.

b. Diet normal berupa pakan standar yang terdiri tepung jagung, gula pasir, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral, air, pewarna, dan esens keju (Handayani *et al.*, 2011).

c. Ulkus yang diukur adalah ulkus yang tampak pada lambung tikus sesudah di bedah (Adinortey *et al.*, 2013).

d. Skor derajat keparahan lesi lambung diukur berdasarkan kriteria Adinortey *et al.* (Adinortey *et al.*, 2013).

d. Indeks ulkus didapat dengan perhitungan skor ulkus dibagi dengan jumlah hewan yang mengalami ulserasi (Adinortey *et al.*, 2013).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba akan dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri atas 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Rincian kelompok adalah sebagai berikut :

- a. Kelompok kontrol negatif : Tanpa diberi indometasin, diberi minyak jagung
- b. Kelompok kontrol positif : Indometasin 30mg/KgBB, tanpa *patchouli alcohol*
- c. Kelompok perlakuan 1 : Indometasin 30mg/KgBB, dengan *patchouli alcohol* 10 mg/KgBB
- d. Kelompok perlakuan 2 : Indometasin 30mg/KgBB, dengan *patchouli alcohol* 20 mg/KgBB
- e. Kelompok perlakuan 3 : Indometasin 30mg/KgBB, dengan *patchouli alcohol* 40 mg/KgBB

4.7.2 Proses Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi dilakukan agar hewan coba terbiasa dengan kondisi laboratorium, makanan, dan air. Tikus diaklimatisasikan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 10 hari. Jenis makanan dan minuman yang diberikan pada tikus sama.

4.7.3 Pembuatan Larutan Indometasin

- a. Berat badan tikus yang akan diberi perlakuan ditimbang, berat badan tiap kelompok dihitung rata-ratanya, kemudian berat rata-rata setiap kelompok dijumlahkan
- b. Menghitung total dosis keseluruhan indometasin untuk 4 kelompok tikus dengan cara mengalikan dosis indometasin dengan total berat badan seluruh tikus
- c. Melarutkan indometasin dalam 100cc air dalam suhu 40°C dan menambahkan Na₂CO₃ sebanyak 0,05 mmol (sebagai emulgator atau pelarut indometasin)

4.7.4 Pembuatan Larutan *Patchouli Alcohol*

Dosis *patchouli alcohol* yang digunakan adalah 10 mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 1, 20 mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 2, 40 mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 3. *Patchouli alcohol* dilarutkan dalam minyak jagung sebagai pelarutnya sebelum di sondekan kepada tikus.

4.7.5 Prosedur Pemberian Indometasin dan *Patchouli Alcohol*

- a. *Patchouli alcohol* dan larutan indometasin dibuat, serta jumlah yang diberikan pada masing-masing tikus telah dihitung
- b. Tikus dipuasakan selama 8 jam pada hari pertama, kemudian pada hari ke-2 (pukul 05.00) tikus di sondekan indometasin sesuai dengan dosis yang telah ditentukan
- c. Delapan Jam berikutnya (Sebanyak 3x, yaitu pada pukul 13.00, 21.00 di hari ke-2 dan 05.00 di hari ke-3) pada tikus kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 diberikan *patchouli alcohol* sesuai dengan dosis masing-masing

4.7.6 Prosedur Pengambilan Organ

- a. Seluruh tikus akan dibedah 8 jam setelah pemberian *patchouli alcohol* yang terakhir, yaitu pada pukul 13.00 hari ke-3
- b. Tikus akan di euthanasia secara perinhalasi yaitu dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup berisi *chloroform*. Hewan coba akan dibedah ketika tidak ada pergerakan dinding dada dan tidak ada tanda-tanda pernafasan dari hewan coba
- c. Setelah tikus dipastikan mati, kemudian abdomen dibedah dengan menggunakan gunting. Lambung diangkat dan dibuka mulai dari kardiak sampai

kurvatura mayor. Kemudian lambung dibilas dengan air untuk menghilangkan kotoran yang ada di dalamnya

d. Sisa tubuh tikus akan dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70%, kemudian dikubur dengan layak ditempat yang telah ditentukan

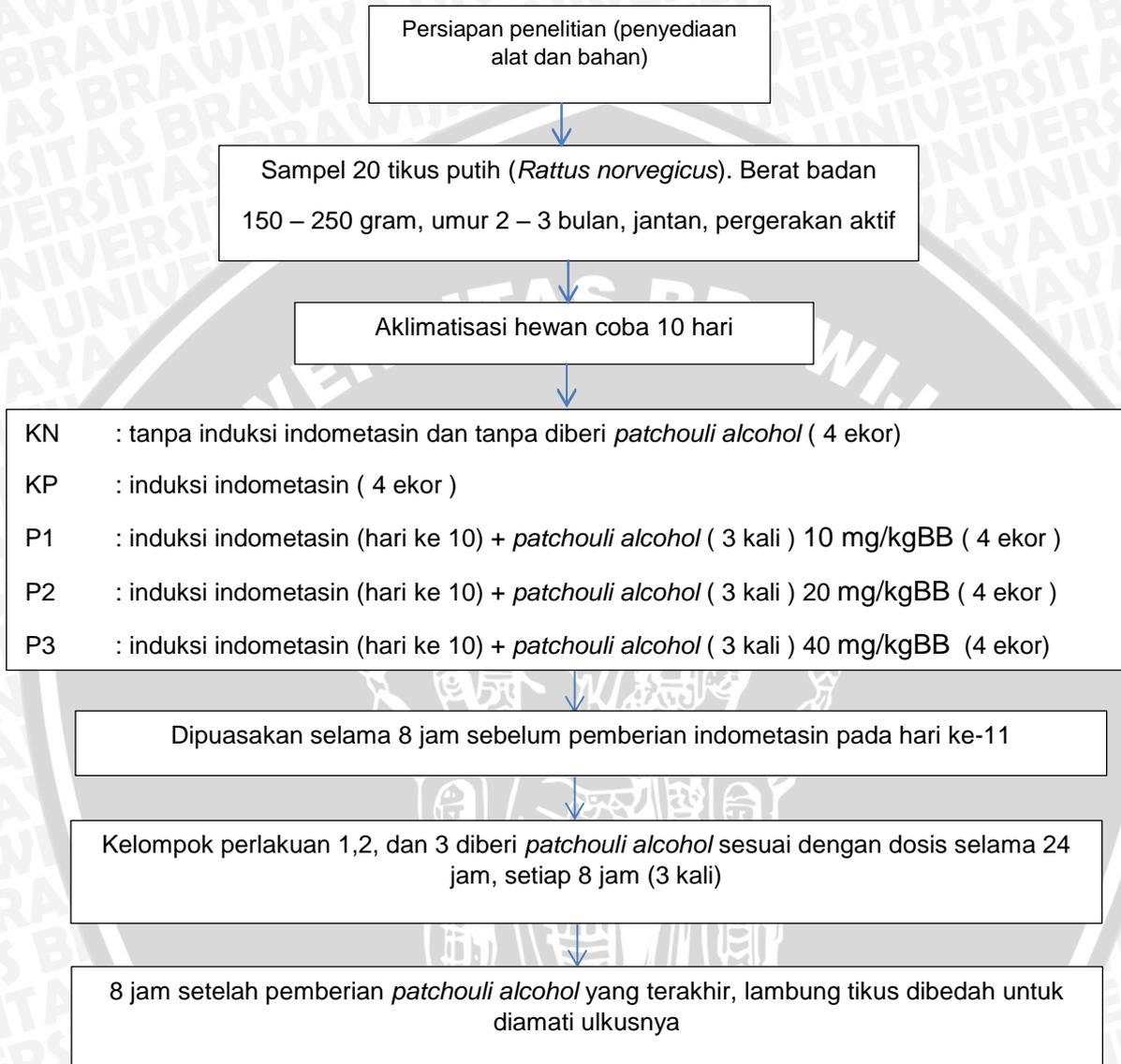
e. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dikeringkan, dan disterilkan dengan autoklaf

4.7.7 Proses Perhitungan Skor Derajat Keparahan Lesi dan Indeks Ulkus

Pengukuran skor lesi melalui prosedur sebagai berikut :

- a. Lambung diletakkan di atas *styrofoam* berwarna putih
- b. Pengambilan gambar dengan menggunakan kamera 24mp resolusi 5192 x 3648 piksel untuk bahan dokumentasi
- c. Melakukan penghitungan jumlah lesi ulkus secara langsung pada lambung di setiap kelompok tikus
- d. Menentukan skor keparahan berdasarkan kriteria skoring yaitu : (Adinortey *et al.*, 2013)
 - 0 = Normal
 - 1 = Darah pada lumen
 - 2 = Lesi titik
 - 3 = 1-5 lesi erosi berukuran < 2mm
 - 4 = >5 lesi erosi berukuran < 2mm
 - 5 = 1-3 lesi erosi berukuran > 2mm
 - 6 = >3 lesi erosi berukuran > 2mm
- e. Melakukan kalkulasi dengan rumus indeks ulkus (Adinortey *et al.*, 2013)

4.7.8 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan alur penelitian

4.8 Uji Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data dosis *patchouli alcohol* dan skor lesi serta indeks ulkus pada lambung secara makroskopis, Kemudian hasil penelitian dianalisis dengan cara :

a. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test*

- b. Uji homogenitas menggunakan uji Levene
- c. Uji *One Way* ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dari skor derajat keparahan lesi
- d. Uji beda *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan skor derajat keparahan lesi lambung antara 2 kelompok perlakuan
- e. Uji *Kruskal-Wallis* pada parameter indeks ulkus
- f. Uji *Mann-Whitney* pada parameter indeks ulkus

