

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental dan rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Posttest Control Group Design*, menggunakan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.*) yang diberikan pada tikus (*Rattus novergicus strain wistar*) yang diinduksi dengan Indometasin dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping kelompok perlakuan yang dipilih dengan menggunakan teknik random.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Pemilihan Sampel**

Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) karena memiliki struktur anatomi dan fisiologi lambung yang mirip dengan lambung manusia. Usia tikus 2-3 bulan, jenis kelamin jantan, dengan berat badan 150-250 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu satu kelompok kontrol negatif, satu kontrol positif (tikus yang diinduksi indometasin) dan tiga kelompok yang mendapatkan perlakuan (tikus yang diinduksi indometasin dan ekstrak jintan hitam dengan tiga dosis yang berbeda).

Perhitungan besar sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus seperti di bawah ini (Hannan, 2012).

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel setiap perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas didapat jumlah sampel minimal perkelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk masing-masing kelompok sehingga total sampel yang digunakan adalah 25. Hal ini dilakukan untuk memperkecil bias dan mengantisipasi kemungkinan apabila ada tikus yang mati sebelum waktu 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 150-250 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 proses adaptasi
3. Tikus yang mati sebelum pembedahan

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, mulai 9 Juli 2014 sampai dengan 23 Juli 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.*) dalam berbagai dosis yang diberikan pada tikus.

4.4.2 Variabel Dependen (Terkait)

Jumlah dan jenis lesi pada lambung tikus *Rattus novergicus strain wistar*.

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak jintan hitam yang didapat dari ekstraksi dengan etanol
2. Ulkus adalah suatu kondisi dimana terjadi kerusakan dinding lambung mulai dari lapisan mukosa sampai lapisan muskularis mukosa yang diikuti oleh proses inflamasi. Perdarahan merupakan salah satu manifestasi klinis pada ulkus, sehingga lesi harus dipertimbangkan secara khusus jika ciri khas ulkus tidak ditemukan.
3. Perdarahan pada lambung oleh induksi indometasin berupa titik-titik merah kehitaman pada mukosa lambung.
4. Indometasin dosis 30 mg/kgBB per oral dapat menginduksi terbentuknya perdarahan di lambung tikus dengan waktu pembedahan 8 jam. Waktu pembedahan adalah waktu antara pemberian Indometasin dengan pembedahan lambung. Dosis Indometasin berasal dari penelitian sebelumnya sebesar 30 mg/kgBB

(Indraswari, 2004) yang kemudian diujikan dalam penelitian pendahuluan.

5. Indikator yang diperiksa adalah skor lesi (perdarahan) pada lambung tikus. Indikator ini ditentukan dengan pemeriksaan makroskopik.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

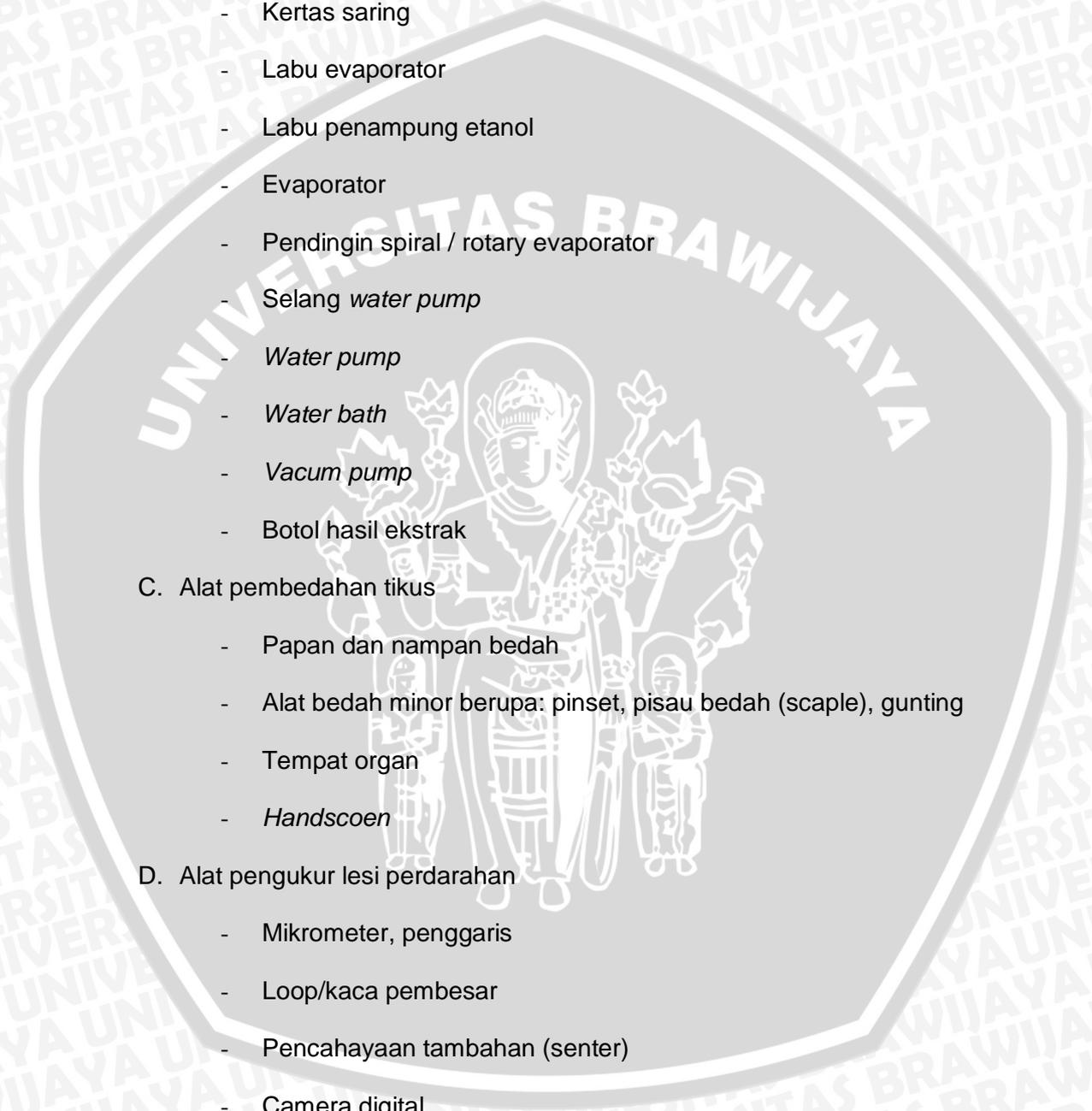
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Jintan hitam
2. Indometasin
3. Aquades
4. Etanol 96% sebagai Pelarut Indometasin dan jintan hitam (Na_2CO_3)
5. Chloroform
6. Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK 1 (2 bagian) dengan tepung terigu (1 bagian) kemudian dibuat pelet

4.6.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah

- A. Alat pemeliharaan tikus
 - Kandang tikus
 - Penutup kandang tikus dari kawat
 - Botol air
 - Timbangan
- B. Alat pembuatan ekstrak jintan hitam
 - Oven
 - Blender

- 
- Timbangan
 - Gelas Erlenmeyer
 - Corong gelas
 - Kertas saring
 - Labu evaporator
 - Labu penampung etanol
 - Evaporator
 - Pendingin spiral / rotary evaporator
 - Selang *water pump*
 - *Water pump*
 - *Water bath*
 - *Vacum pump*
 - Botol hasil ekstrak
- C. Alat pembedahan tikus
- Papan dan nampan bedah
 - Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (*scaple*), gunting
 - Tempat organ
 - *Handscoen*
- D. Alat pengukur lesi perdarahan
- Mikrometer, penggaris
 - Loop/kaca pembesar
 - Pencahayaan tambahan (*senter*)
 - Camera digital
 - Alat tulis
- E. Alat lain : Sonde

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Proses Adaptasi

Tikus diadaptasikan di dalam kandang yang diletakkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama 6 hari.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Jintan Hitam

- Proses Pengeringan

- 1) Jintan hitam (sample basah) yang akan dikeringkan dicuci bersih
- 2) Dipotong kecil-kecil
- 3) Dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40-60° atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)

- Proses Ekstraksi

- 1) Jintan hitam dihaluskan dengan blender hingga menyerupai bubuk
- 2) Ditimbang sebanyak 100 gram (sample kering)
- 3) 100 gram sample kering dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L
- 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 perendaman dilakukan sampai 3 kali

- Proses Evaporasi

- 1) Masukkan dalam labu evaporasi 1 L
- 2) Pasang labu evaporasi pada evaporator
- 3) Isi *water bath* dengan air sampai penuh

- 4) Pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C atau sesuai dengan titik didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik
 - 5) Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
 - 6) Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL
 - 7) Hasil yang diperoleh kira-kira $1/5$ dari bahan alam kering (100 gram bahan alam menjadi ± 250 gram ekstrak)
 - 8) Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik kaca
 - 9) Kemudian simpan dalam freezer
- (Remington, 2000).

4.7.3 Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopis lambung dilakukan dengan pembedahan pada lambung tikus yang telah diberi perlakuan. Sebelum dibedah tikus dibius dengan *chloroform*. Lambung dibuka, dibentangkan pada permukaan datar dan diamati secara makroskopis untuk diperiksa adanya ulkus pada lambung. Ulkus lambung dihitung dan diklasifikasikan berdasarkan jenis lesi yang timbul (Ashok *et al*, 2006).

Tabel 4.7 Skor Ulkus Berdasarkan Jenis Lesi yang Timbul

Macam Lesi	Skor
Lambung berwarna normal	0
Warna kemerahan (petechiae)	0,5
Noda atau bekas ulcer	1
Perdarahan atau ulcer <3	1,5
Ulcer ≥ 3 tetapi ≤ 5	2
Ulcer >5	3

(Ashok *et al.*, 2006)

4.7.4 Alur Kerja

Alur kerja dibagi dalam dua tahap, yaitu:

1. Tahap I: Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui dosis Indometasin yang akan digunakan pada penelitian yang sesungguhnya, mengetahui dosis ekstrak jintan hitam yang dapat mengurangi lesi perdarahan akibat induksi Indometasin sebelumnya, dan untuk menentukan waktu pemberian ekstrak jintan hitam setelah tikus diinduksi oleh indometasin sebelumnya.

A. Penentuan Dosis Indometasin dan Waktu Percobaan

Pada penelitian sebelumnya, dosis Indometasin yang dapat menimbulkan perdarahan sebagai tanda adanya ulkus adalah pada dosis 30 mg/kgBB (Indraswari, 2004). Pada penelitian pendahuluan ini, pembedahan lambung tikus dilakukan setelah 8 jam, berdasarkan waktu paruh Indometasin adalah 4 jam, diharapkan setelah 8 jam efek obat sudah habis.

B. Penentuan Dosis Ekstrak Jintan Hitam

Dosis ekstrak jintan hitam yang digunakan pada penelitian pendahuluan 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kg, yang

disondekan pada tikus setiap 8 jam sekali dalam 24 jam. Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan hasil:

- Skor lesi pada tikus kontrol (+) adalah 3
- Skor lesi pada tikus dosis 125 mg/kgBB adalah 1,5
- Skor lesi pada tikus dosis 250 mg/kgBB adalah 0
- Skor lesi pada tikus dosis 500 mg/kgBB adalah 0

Hasil tersebut menunjukkan dosis 125 mg/kgBB jintan hitam sudah menunjukkan efek pengurangan ulkus lambung tikus. Berdasarkan hasil tersebut, dosis yang digunakan pada penelitian sesungguhnya ialah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 300 mg/kg, yang diberikan peroral pada tikus setiap 8 jam sekali dalam 24 jam.

Penghitungan jumlah ekstrak jintan hitam dengan berat badan untuk setiap dosis yaitu:

1) Dosis I (125 mg/kgBB)

Tikus 1: $1,72 \text{ kg} * 125 \text{ mg kg/BB} = 21,5 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(21,5/50) * 1 \text{ cc} = 0,43 \text{ cc}$

Tikus 2: $1,98 \text{ kg} * 125 \text{ mg kg/BB} = 24,75 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(24,75/50) * 1 \text{ cc} = 0,5 \text{ cc}$

2) Dosis II (250 mg/kgBB)

Tikus 3: $1,73 \text{ kg} * 250 \text{ mg kg/BB} = 43,25 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(43,25/50) * 1 \text{ cc} = 0,865 \text{ cc}$

Tikus 4: $2,13 \text{ kg} * 250 \text{ mg kg/BB} = 53,25 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(53,25/50) * 1 \text{ cc} = 1,065 \text{ cc}$

3) Dosis III (500 mg/kgBB)

Tikus 5: $1,8 \text{ kg} * 500 \text{ mg/kgBB} = 90 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(90/50) * 1 \text{ cc} = 1,8 \text{ cc}$

Tikus 6: $1,62 \text{ kg} * 500 \text{ mg/kgBB} = 81 \text{ mg}$

Sediaan larut yang dibuat adalah 50 mg/cc

Jadi ekstrak jintan hitam yang disondekan $(81/50) * 1 \text{ cc} = 1,62 \text{ cc}$

C. Penentuan Waktu Pemberian Ekstrak Jintan Hitam

Ekstrak jintan hitam disondekan 8 jam setelah pemberian Indometasin. Indometasin mempunyai waktu paruh 4 jam, diharapkan setelah 8 jam efek dari Indometasin sudah habis.

2. Penelitian Sesungguhnya

Sampel penelitian dibagi dalam 4 perlakuan yaitu:

- A. Kelompok 2, yaitu kelompok kontrol positif: mendapatkan Indometasin 30 mg/kgBB
- B. Kelompok 3, yaitu kelompok dosis I: Indometasin 30 mg/kgBB + ekstrak jintan hitam 100 mg/kgBB
- C. Kelompok 4, yaitu kelompok dosis II: Indometasin 30 mg/kgBB + ekstrak jintan hitam 200 mg/kgBB
- D. Kelompok 5, yaitu kelompok dosis III: Indometasin 30 mg/kgBB + ekstrak jintan hitam 300 mg/kgBB

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data dosis ekstrak jintan hitam dan skor ulkus peptikum pada lambung. Data dianalisis dengan uji ANOVA satu arah (*One Way ANOVA*), *Korelasi Pearson* dan *Regresi Linear*. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan rata-rata ulkus peptikum pada lambung tikus diantara 5 kelompok perlakuan, dengan tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha=0,05$. *Korelasi Pearson* untuk mencari kekuatan hubungan antara dua variabel dan *Regresi Linear* untuk mencari persamaan linear yang menggambarkan hubungan kedua variabel. Semua uji analisis statistik menggunakan *software SPSS for windows* versi 17.

Rancangan pada penelitian ini menggunakan *the posttest control group desain* dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena pengukuran ulkus peptikum pada tikus hanya mungkin dilakukan pada hewan coba yang sudah dibedah (dimatikan dulu). Pengukuran berkurangnya jumlah ulkus peptikum didasarkan pada keberadaan kelompok kontrol negatif sebagai kelompok yang menggambarkan kondisi lambung normal (tanpa ulkus peptikum).

4.9 Jadwal Kegiatan

9 Juli 2014 – 21 Juli 2014 : Tikus mulai diadaptasikan

22 Juli 2014 : Tikus dipuasakan

23 Juli 2014

- 08.00 : Pemberian sonde Indometasin pada keempat kelompok perlakuan

- 16.00 :
 - Kelompok 2 dibedah dan dihitung jumlah lesi lambungnya
 - Pemberian sonde ekstrak jintan hitam pada kelompok 3, 4, dan 5 sesuai dosis masing-masing
- 24.00 : Pemberian sonde ekstrak jintan hitam pada kelompok 3, 4, dan 5 sesuai dosis masing-masing

24 Juli 2014

- 08.00 : Pemberian sonde ekstrak jintan hitam pada kelompok 3, 4, dan 5 sesuai dosis masing-masing
- 16.00 : Kelompok kelompok 3, 4, dan 5 dibedah dan dihitung jumlah lesi (perdarahan) pada lambungnya

