

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratorium dengan desain *post test control group design* menggunakan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) untuk mengetahui derajat erosi pada gambaran histopatologi mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* jantan yang diinduksi dengan indometasin. Perhitungan derajat erosi dilakukan pada semua histopatologi lambung tikus yang telah dibagi dalam 5 kelompok perlakuan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan waktu pelaksanaan bulan Desember 2015 dan pengamatan histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi pada bulan Desember 2015.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* jenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, bulu mengkilap dan *faeces* tidak lembek. Hewan coba diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dosis I (100 mg/kgBB), dosis II (200 mg/kgBB) dan dosis III (400 mg/kgBB). Estimasi besar sampel berkelompok diperoleh berdasarkan rumus (Solimun, 2001):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = besar sampel (jumlah sampel per kelompok)

Berdasarkan hasil perhitungan diatas didapatkan jumlah sampel minimal perkelompok perlakuan adalah 4 ekor tikus. Untuk mengantisipasi kejadian yang tidak diinginkan seperti hewan coba yang sakit, peneliti memutuskan untuk menambah jumlahnya menjadi $n + 1$. Jadi, jumlah hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $5(n+1) = 5(4+1) = 25$ ekor tikus.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Ekstrak daun waru dalam berbagai dosis yang diberikan pada tikus.

4.4.2 Variabel Dependen (Terikat)

Derajat erosi pada potongan histopatologi lambung tikus.

4.5 Definisi Operasional

- 1) Daun waru yang dipilih adalah yang dipetik langsung dari pohon waru dan diperoleh di Institusi *Materia Medica* di kota Batu, Jawa Timur.
- 2) Ekstrak daun waru merupakan bahan yang diperoleh dengan cara menghaluskan daun waru, lalu direndam dalam larutan etanol hingga didapatkan zat aktif daun waru.
- 3) Suspensi indometasin sebesar 30 mg/kgBB diberikan secara peroral pada tikus untuk menginduksi erosi pada lambung.
- 4) Derajat erosi mukosa lambung ditentukan berdasarkan modifikasi dari penilaian yang telah ditentukan oleh (Manja, 2003) dalam menghitung derajat erosi mukosa lambung tikus dengan menggunakan kriteria 0 = tidak ada perubahan patologis, 1 = deskuamasi epitel, 2 = erosi pada permukaan epitel (gap antara 1-10 sel epitelial/lesi), 3 = ulserasi epitel (gap antara 1-10 sel epitel/lesi). Penilaian derajat erosi ini dilihat dalam 5 lapang pandang besar dengan pembesaran 400x (Manja, 2003).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Percobaan

1. Kandang tikus
2. Tempat minum
3. Timbangan
4. Pakan

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Hewan Percobaan

1. Ekstrak daun waru

2. Aquades
3. Indometasin
4. Sonde

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Organ

1. Diethyleter
2. Formalin 10%
4. Gunting
5. Jarum pentul
6. Alas kayu
7. Tabung sebagai tempat penyimpanan organ

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Waru

1. Gelas ekstraksi
2. Seperangkat evaporator vakum
 - Alat memanaskan air
 - Labu penampung hasil evaporasi
 - Rotary evaporator
 - Tabung pendinginan dan alat pompa sirkulasi air dingin
 - Bak penampung air dingin
 - Pipa plastik
 - Pompa vakum
 - Tabung penampung etanol
 - Cawan penguap
3. Neraca analitik

4.7 Cara Pembuatan Ekstrak

4.7.1 Proses Pengeringan dan Ekstraksi

- 1) Timbang serbuk daun waru sebanyak 100 gram
- 2) Masukkan 100 gram daun waru ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L
- 3) Rendam dengan etanol 900 ml sehingga menjadi 1 liter
- 4) Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
- 5) Diamkan sekitar 1 malam hingga mengendap
- 6) Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah tercampur menggunakan kertas saring
- 7) Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali.

4.7.2 Proses Evaporasi

- 1) Masukkan ke dalam labu evaporasi 1L dan pasang labu pada 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 evaporasi
- 5) Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (+ 1.5 sampai 2 jam untuk 1 labu) \pm 900 ml
- 6) Hasil yang diperoleh kira-kira 1/5 dari 100 gram atau 20 gram ekstrak daun waru.
- 7) Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol kaca dan simpan dalam *freezer*.

4.8 Persiapan Penelitian

4.8.1 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dilaksanakan penelitian yang sebenarnya, peneliti akan melakukan penelitian pendahuluan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji dosis ekstrak daun waru yang dapat mengurangi peradangan lambung akibat indometasin. Sampel yang digunakan terdiri dari empat sampel tikus, yaitu kontrol positif (diberikan indometasin 30 mg/kgBB) dan tiga perlakuan (diberi indometasin 30 mg/kgBB dan ekstrak daun waru 100mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB). Dosis didapatkan dari literatur yang menggunakan kulit kayu dari pohon waru (Borhade *dkk*, 2012)

4.8.2 Alur Penelitian

1) Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus *Rattus norvegicus* jantan yang telah diseleksi, dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium Farmakologi selama 6 hari pada temperatur ruangan konstan (20 - 25 °C). Untuk tempat pemeliharaan digunakan kotak plastic berukuran 42 x 30 x 15 cm, masing-masing untuk 5 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam.

2) Randomisasi menjadi 5 kelompok perlakuan

Sampel dibagi dalam lima kelompok perlakuan, yaitu:

- a) Kelompok kontrol negatif: tidak diberikan indometasin dan ekstrak daun waru.
- b) Kelompok kontrol positif: hanya diberikan indometasin 30 mg/kgBB.

- c) Waru 1, yaitu kelompok dosis I: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 100 mg/kgBB
- d) Waru 2, yaitu kelompok dosis II: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 200 mg/kgBB
- e) Waru 3, yaitu kelompok dosis III: diberikan indometasin 30mg/kgBB dan ekstrak daun waru 400 mg/kgBB.

3) Pemberian Indometasin

Indometasin dengan dosis 30 mg/kgBB diberikan secara peroral menggunakan sonde untuk kelompok perlakuan dosis ekstrak daun waru. Tiap ekor tikus dengan berat rata-rata 200 gram diberikan Indometasin sebanyak $30 \times 200/1000 = 6$ mg.

4) Pemberian ekstrak daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.)

Ekstrak daun waru diberikan secara peroral (sonde) setelah delapan jam pemberian indometasin kepada kelompok perlakuan dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB berurutan. Perhitungan besar ekstrak daun waru tiap dosis per ekor tikus dengan berat badan rata-rata 200 gram yaitu:

a) Dosis I (100 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah $100 \times 200/1000 = 20$ mg

b) Dosis II (200 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah $200 \times 200/1000 = 40$ mg

c) Dosis III (400 mg/kgBB)

Jumlah rata-rata untuk satu ekor tikus adalah $400 \times 200/1000 = 80$ mg

5) Pembedahan tikus dan pengambilan organ lambung

Waktu antara pemberian indometasin dan pembedahan pada penelitian ini adalah 8 jam, dengan harapan agar indometasin dapat mencetuskan peradangan lambung secara maksimal (Vogel, 2002)

6) Pembuatan preparat histologis lambung (metode blok paraffin)

- a) Irisan lambung difiksasi dengan larutan formalin 10% selama satu hari
- b) Dilakukan dehidrasi pada organ lambung dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu pada konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% dan 2 kali alkohol absolut (100%), masing-masing 30 menit.
- c) Dilakukan clearing dengan xilol 2 kali selama 1 jam.
- d) Dilakukan proses infiltrasi dengan paraffin lunak pada suhu 42 – 46 °C selama 1 jam.
- e) Dilakukan blocking dengan paraffin keras pada suhu 46 – 52 °C selama 1 jam.
- f) Dilakukan *sliding* pada rotari mikrotom, dipanaskan 60 °C.
- g) Dilakukan deparafinisasi, yaitu dengan perendaman dengan xilol 2 kali selama 5 menit, kemudian pada alkohol bertingkat dengan urutan: 2 kali alkohol absolut (100%), 95%, 85%, 70%, 50%, 30% masing-masing selama 3 menit.
- h) Dilakukan pewarnaan Hematoxillin-Eosin (HE)

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji *one way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha = 0.05$, untuk pengujian lebih dari dua kelompok dan melihat perbedaan efek tiap dosis ekstrak daun waru terhadap efek inflamasi. Selanjutnya data yang telah diperoleh akan dianalisis menggunakan *software* SPSS 21 for Windows.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.10 Skema Rancangan Penelitian

