

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan yang digunakan adalah "*The Post Test Control Group Design*", untuk membandingkan secara makroskopis pemberian VCO 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 norvergicus*) strain wistar karena tikus tersebut memiliki struktur anatomi dan fisiologi lambung yang mirip dengan lambung manusia yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Cara Pemilihan dan Jumlah Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan metode *simple random sampling*. Pada tahap penelitian pendahuluan dosis mengacu pada zakaria *et al* yaitu 1 ml/kgBB, 5 ml/kgBB, dan 10 ml/kgBB. Setelah dilakukan eksplorasi didapatkan hasil kematian pada tikus pada dosis 10 ml/kgBB sehingga dosis yang ditentukan pada penelitian sesungguhnya adalah 1,25 ml/kgBB, 2,5 ml/kgBB, 5 ml/kgBB. Terdapat 5 kelompok sampel: kelompok I kontrol negatif (K(-)) tanpa induksi indometasin, kelompok II kontrol positif (K(+)) indometasin 30 mg/Kg p.o, kelompok III perlakuan 1 (P(1)) indometasin 30 mg/Kg p.o + VCO (*Virgin Coconut Oil*) 1,25 mL/kg BB, kelompok IV perlakuan 2 (P(2)) indometasin 30 mg/Kg p.o + VCO (*Virgin Coconut Oil*) 2,5 mL/kg

BB, kelompok V perlakuan 3 (P(3)) indometasin 30 mg/Kg p.o + VCO (*Virgin Coconut Oil*) 5 mL/kg BB.

Estimasi besar sampel dihitung berdasar rumus:

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

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

$$n = 4$$

keterangan: p = perlakuan (5 perlakuan)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta (Indra,1999)

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.

4.2.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

4.2.2.2 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.

4.2.2.3 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Independen (variabel bebas):

Dosis pemberian VCO (*Virgin Coconut Oil*)

4.3.2 Variable dependen (variable terikat):

Gambaran makroskopis skor keparahan ulkus lambung tikus *Rattus norvegicus strain wistar*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang mulai Februari 2017 – Juli 2017.

4.5 Alat dan Bahan

1. Alat dan Bahan
2. 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 berjumlah 5 buah, masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus
 - Timbangan Sartorius 1103
 - Botol air untuk minum tikus
 - Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK 1 (2 bagian) dengan tepung terigu (1 bagian) kemudian dibuat pelet.
 - Penutup kandang tikus
 - Serbuk kayu/sekam
3. Alat dan bahan pemberian VCO (*Virgin Coconut Oil*)
- S spuit dan sonde
 - VCO (*Virgin Coconut Oil*) didapat dari CV. Herba Bagoes Indonesia.
4. Alat dan bahan pembuatan ulkus peptikum
- Indometasin 30mg/KgBB
 - Pelarut indometasin
 - Aquades
 - Sonde
5. Alat pembedahan tikus
- Papan dan nampan bedah
 - Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (*scaple*), gunting
 - Tempat organ
 - *Handscoon*
6. Alat pengukur skor ulkus (Makroskopis)
- Mikrometer, penggaris, jangka sorong
 - Loop / kaca pembesar
 - Pencahayaan tambahan (*senter*)

- Kamera digital
- Alat tulis

4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Indometasin

Indometasin adalah obat golongan OAINS yang digunakan sebagai *inducer* perdarahan pada lambung tikus dengan dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Masa optimal perdarahan lambung adalah 6 jam (Vogel, 2002). Indometasin yang digunakan dalam penelitian adalah merek SIGMA® dalam bentuk serbuk yang kemudian diencerkan dengan aquades.

2. VCO (*Virgin Coconut Oil*)

VCO (*Virgin Coconut Oil*) diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, 3 per oral dosis 1,25 mL/kgBB, 2,5 mL/kgBB, 5 mL/kgBB. Diberikan sebanyak 3 kali. VCO (*Virgin Coconut Oil*) didapat dari CV. Herba Bagoes Indonesia.

3. Indikator yang diperiksa adalah skor ulkus sesuai kriteria Gusdinar,2009 pada lambung tikus (*Rattus norvegicus*). Indikator ini ditentukan dengan pemeriksaan makroskopis menggunakan loop.

4. Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Ulkus

Tikus (*Rattus norvegicus*) diberi indometasin sebagai *inducer* pendaraan pada lambung tikus dengan dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009).

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

1. Tikus dipuasakan 6-8 jam kemudian Indometasin diberikan dengan dosis 30mg/KgBB per oral menggunakan sonde.
2. Setelah 8 jam pasca induksi indometasin, dilakukan pembedahan pada kelompok kontrol positif, negatif, dan perlakuan.
3. hasil lambung yang dibedah segera diamati secara makroskopis.

4.7.3 Pemberian VCO (*Virgin Coconut Oil*)

VCO (*Virgin Coconut Oil*) diberikan per oral. Dosis didapatkan dari penelitian Zakaria *et al* diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, 3 per oral dengan dosis 1,25 mL/kgBB, 2,5 mL/kgBB, 5 mL/kgBB.

4.7.4 Pemeriksaan makroskopis dan pengukuran skor keparahan ulkus

Pemeriksaan makroskopis lambung dilakukan dengan pembedahan pada lambung tikus yang telah diberi perlakuan. Sebelum dibedah tikus dibius dengan ketamine. Lalu lambung dibuka, dibentangkan pada permukaan datar dan diamati secara makroskopis dengan menggunakan jangka sorong untuk diperiksa adanya ulkus pada lambung dihitung dan diukur berdasarkan lesi yang timbul (Gusdinar *et al.*, 2009).

Tabel 4.1 Skor keparahan ulkus (Gusdinar *et al.*, 2009)

Tabel I. Skoring keparahan tukak (Gusdinar *et al.*, 2009)

Jumlah Tukak	Kondisi Luka	Skor
Lambung Normal	Lambung Normal	1
Bintik Berdarah	Bintik Berdarah	2
Jumlah Tukak 1-3 Buah	Diameter Tukak 0,5-1,5 mm	3
Jumlah Tukak 4-6 Buah	Diameter Tukak 1,6-4,0 mm	4
Jumlah Tukak 7-9 Buah	Diameter Tukak > 4,0 mm	5
Jumlah Tukak >9 Buah	Perforasi	6

semakin tinggi skor ulkusnya, maka tingkat keparahan ulkus peptikum semakin tinggi. Sebaliknya semakin rendah skor ulkusnya, tingkat keparahan ulkus peptikum semakin rendah.

Pengukuran skor keparahan ulkus melalui prosedur sebagai berikut :

1. Organ lambung pada tikus diambil dan dibelah di bagian kurvatura mayor.
2. Lambung diletakan diatas sterofoam.
3. Pengambilan gambar dengan menggunakan kamera digital berjarak 20 cm dari objek untuk bahan dokumentasi.

4.8 Alur Kerja

Alur kerja dibagi menjadi 2 tahap

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan (eksplorasi)

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui dosis indometasin yang perlu digunakan pada penelitian sesungguhnya, mengetahui dosis VCO yang tepat yang dapat mengurangi pendarahan akibat induksi indometasin sebelumnya.

- A. Penentuan dosis Indometasin dan waktu percobaan

Pada penelitian sebelumnya, dosis indometasin yang dapat menimbulkan pendarahan sebagai tanda adanya ulkus adalah pada dosis 30 mg/kgBB (Purnamawati, 2009).

- B. Penentuan Dosis VCO

6 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan masing-masing 2 ekor tikus. Dengan dosis yang mengacu pada penelitian zakaria *et al*/ yaitu, 1 mL/kgBB, 5 mL/kgBB, 10 mL/kgBB yang diberikan peroral pada tikus setiap 8 jam sekali dalam 24 jam. Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan hasil tikus mati pada dosis 10 mL/kgBB. Sehingga dosis yang ditentukan pada penelitian sesungguhnya adalah 1,25 ml/kgBB, 2,5 ml/kgBB, 5 ml/kgBB

2. Tahap 2 : Penelitian sesungguhnya

Setelah melakukan penelitian pendahuluan, telah ditentukan bahwa dosis Indometasin adalah 30 mg/kgBB dan dosis VCO adalah 1,25 ml/kgBB, 2,5 ml/kgBB, dan 5 ml/kgBB.

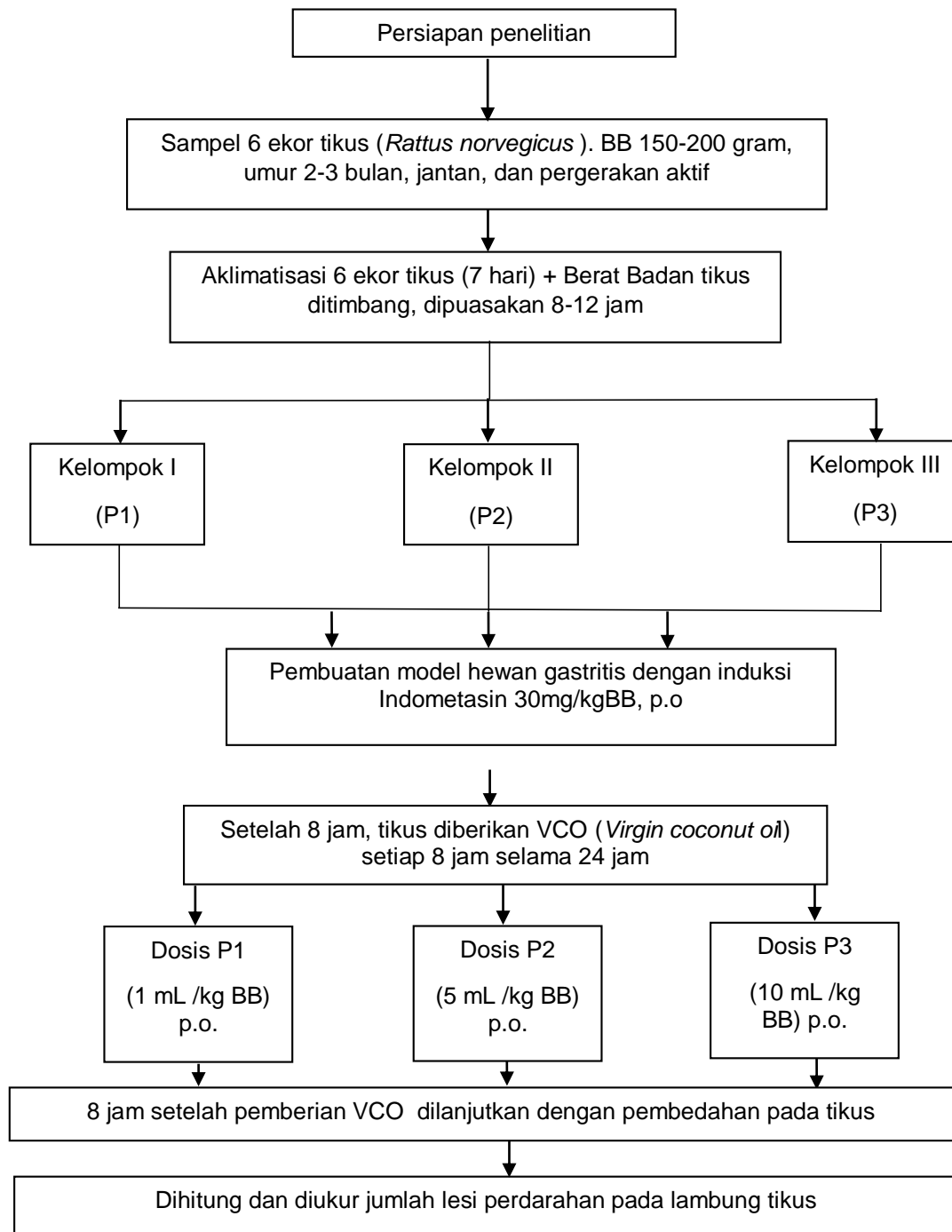
Sampel Penelitian dibagi dalam 5 perlakuan yaitu:

- A. Kelompok 1, yaitu kelompok kontrol negatif : tidak diberi indometasin maupun VCO.
- B. Kelompok 2, yaitu kelompok kontrol positif : diberi indometasin 30 mg/kgBB tanpa induksi VCO.
- C. Kelompok 3, yaitu kelompok perlakuan 1 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 1 yaitu 1,25 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
- D. Kelompok 4, yaitu kelompok perlakuan 2 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 2 yaitu 2,5 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
- E. Kelompok 5, yaitu kelompok perlakuan 3 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 3 yaitu 5 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.

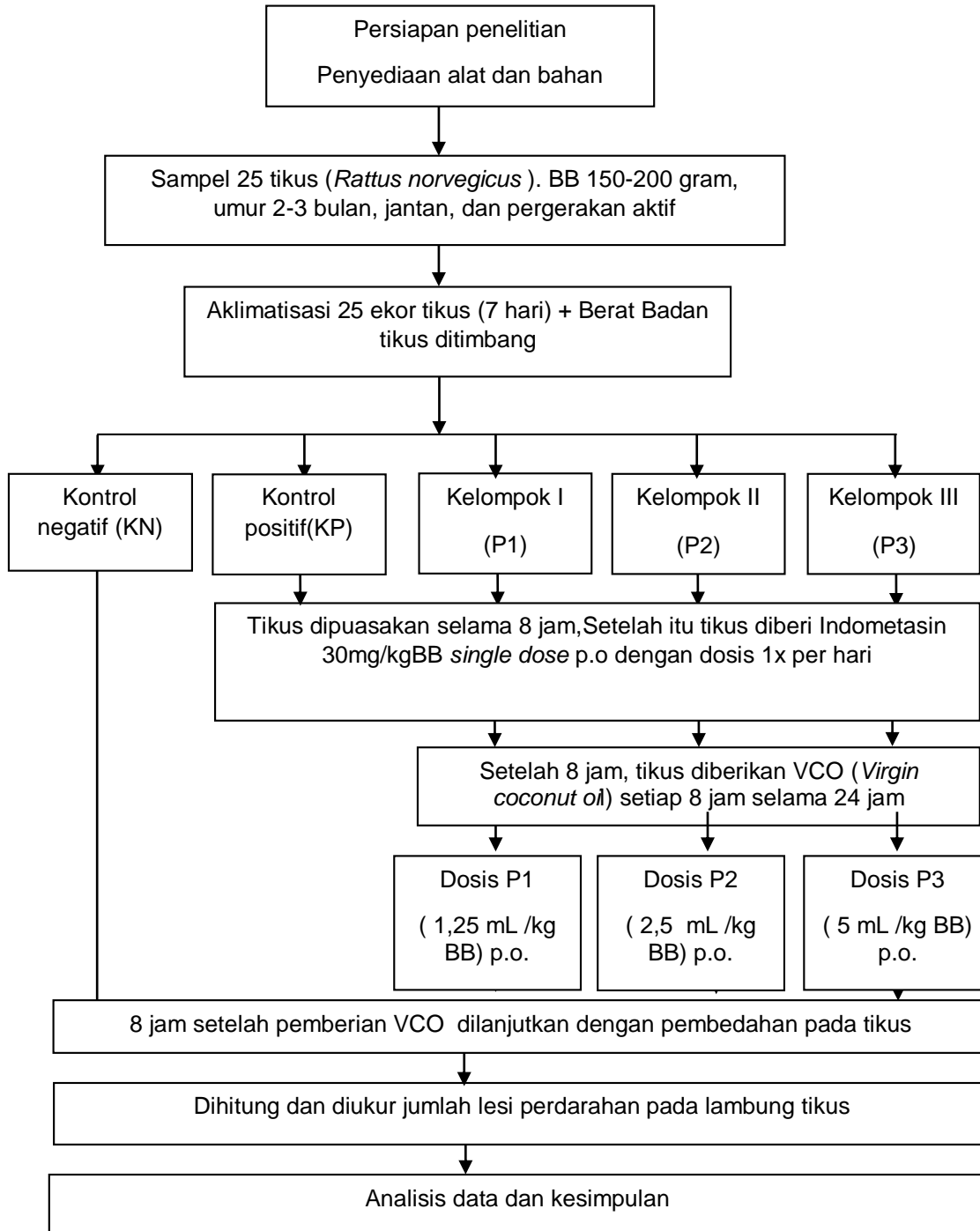
Pembedahan semua tikus dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir VCO.

4.9 Alur Kerja

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan



2. Tahap 2 : Penelitian sesungguhnya



4.9 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini adalah dengan Pengumpulan data dilakukan pada akhir perlakuan (setelah pembuatan preparat) pada tempat dan waktu yang sama dalam bentuk rerata skor ulkus \pm SD. Data ini lalu dianalisis dengan *software SPSS for windows versi 17*.

4.10 Analisis Data

Rancangan pada penelitian ini menggunakan “*The Post Test Control Group Design*” dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena penilaian makroskopis 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 skor ulkus lambung tikus secara makroskopis pada masing-masing kelompok perlakuan. Data hasil penelitian tersebut akan diuji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov* (nilai $p > 0.05$ merepresentasikan data normal) dan homogenitas data dengan *Levene* statistik (nilai $p < 0.05$ mempresentasikan data homogen). Jika data normal dan homogen maka data tersebut akan diuji dengan ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan skor ulkus yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Jika *One Way ANOVA* menunjukkan $p < 0.05$, maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post-hoc tukey* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Setelah itu dilanjutkan dengan uji korelasi *Pearson*, dan uji linear regresi untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan, yang telah ditentukan sebelumnya dengan hasil uji *post-hoc tukey* (Muhartono, 2013). Semua uji analisis statistik menggunakan *software SPSS for windows versi 24*.

4.11 Jadwal Penelitian

Berikut adalah jadwal kegiatan penelitian ini:

Tabel 4.2 Jadwal Penelitian

Tahap Persiapan									
No.	Kegiatan	Maret				April			
1.	Perizinan laboratorium Biomedik dan Farmakologi	■							
2.	Persiapan <i>ethical clearance</i>		■	■	■				
3.	Persiapan alat dan bahan penelitian					■	■	■	■
Tahap Pengerjaan dan Penyelesaian									
No.	Kegiatan	Mei				Juli			
1.	Aklimatisasi <i>Rattus norvegicus</i>	■	■	■	■				
2.	Penelitian (perlakuan+pemberian VCO+ Pembedahan)				■				
3.	Analisis Data						■	■	
4.	Penyusunan laporan								■

4.12 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 dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Dalam penelitian ini, hewan coba diaklimatisasi 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 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 diletakkan pada kandang dan hanya diisi 5 ekor tikus pada setiap kandang untuk menyediakan kebebasan dalam bergerak. Kandang terbuat dari plastik 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 dengan anestesi perinhalasi. Hewan coba diletakkan 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 for fear and distress.* Dalam penelitian ini hewan coba aklimatisasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang dapat mencegah terjadinya stress.