

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

4.1.1. Studi *In Vivo*

Rancangan penelitian ini merupakan *Randomized Pre-Clinical Trial* yang bersifat eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2. Subjek Penelitian

4.2.1. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novvergicus*) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel penelitian adalah 30 ekor tikus (*Rattus novvergicus*) dengan kriteria inklusi:

- a. Jenis kelamin : jantan
- b. Usia : 2-3 bulan
- c. Berat badan : 150-200 gram
- d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif dan bulu yang halus

Kriteria eksklusi :

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

Cara pengambilan sampel dengan metode *simple random sampling* (sampel diambil random) dari populasi yang kemudian dikelompokkan kedalam masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.

4.2.2. Perhitungan Besar Subjek Penelitian

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Federer, 2012):

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

t: jumlah perlakuan, r: jumlah ulangan

Pada penelitian ini $t = 6$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(6-1) (r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 3$$

$$r \geq 4$$

jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 4

Berdasarkan perhitungan, sampel penelitian ini berjumlah 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan sehingga setiap kelompok berisikan 4 ekor tikus. Dilakukan penambahan 1 ekor dari jumlah minimal pengulangan sebagai cadangan

apabila terjadi hal-hal yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung. Sehingga total sampel penelitian ini berjumlah 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan sehingga jumlah tikus setiap kelompok berisikan 5 ekor tikus.

4.3. Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2017 sampai Oktober 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak alga cokelat (*Sargassum sp*).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah skor integritas mukosa lambung tikus yang diamati secara mikroskopis lambung tikus.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Indometasin

Indometasin adalah obat golongan *Non-Steroid Antiinflammatory Drugs* (NSAIDs) yang digunakan sebagai inducer perdarahan pada lambung tikus dengan

dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Indometasin dengan merek SIGMA, disediakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5.2 Alga Cokelat (*Sargassum sp.*)

4.5.2.1 Alga Cokelat

Alga cokelat yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis *Sargassum sp* yang dihasilkan oleh para petani di Madura.

4.5.2.2 Ekstrak Alga Cokelat

Proses ekstraksi alga cokelat diawali dengan pengeringan dan penggilingan. Setelah itu bubuk alga akan dicampur dengan larutan MeOH-CHCl₃-H₂O (4:2:1). Proses dilanjutkan dengan melarutkan alga dengan HCl dan *ultasonic extraction* (amplitudo 80%, 15 menit). Lalu dilakukan ekstraksi menggunakan *waterbath* pada suhu 70-90°C selama 3-5 jam. Proses selanjutnya adalah filtrasi dan presipitasi dengan 1 M CaCl₂ pada suhu 4°C semalaman. Larutan difiltrasi kemudian dicampurkan dengan etanol absolut (3 volume) pada suhu 4°C selama 8 jam. Pada tahapan akhir ekstrak kemudian dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) pada suhu 4°C.

4.5.3 Tikus Model Gastritis

Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan berat 150-200gram yang dibuat model ulkus dengan diinduksi indometasin per oral dengan dosis 30 mg/kgBB.

4.5.4 Gambaran Pendarahan Secara Mikroskopis

Pengukuran hasil gambaran mikroskopis berupa kedalaman ulkus adalah kerusakan yang terjadi mulai dari diinduksinya indometasin sampai diberikannya *Sargassum sp.*, kemudian dilakukan pembedahan, pengecatan HE, dan diamati secara histopatologi, klasifikasi dari kerusakan sel adalah:

a. 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.

b. 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.

c. 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.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

4.6.1.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

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

- a. Indometacin 30mg/KgBB
- b. Aquades sebagai Pelarut Indometasin
- c. Ekstrak *Sargassum sp.* 150 mg/KgBB, 300 mg/KgBB, dan 600 mg/KgBB
- d. Misoprostol 90 mcg/KgBB
- e. Aquades

4.6.1.3 Bahan Untuk Pengambilan Organ

- a. Air untuk mencuci kotoran

4.6.1.4 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 (Harris Hematoxilen)*

4.6.2 Alat Penelitian

4.6.2.1 Alat Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus berupa kotak plastik yang diisi sekam dan ditutup dengan kawat. Ukuran kandang 15cm x 30cm x 42 cm, masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus
- b. Wadah air minum tikus
- c. Spidol untuk memberi identitas pada tikus

4.6.2.2 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Timbangan

4.6.2.3 Alat Untuk Pemberian Indometasin, Ekstrak *Sargassum sp*, dan *Misoprostol*

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

4.6.2.4 Alat untuk Pengambilan Organ

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

4.6.2.5 Alat untuk Pembuatan Preparat

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

4.6.2.6 Alat Penilaian Mikroskopis Lesi Mukosa Lambung Tikus

- a. Mikroskop cahaya
- b. Minyak imersi
- c. Camera digital
- d. Software komputer untuk pengambilan gambar
- e. Alat tulis

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Model Hewan Gastritis

- a. Tikus dipuaskan sehari, kemudian diinduksi indometasin 30mg/kgBB per oral (Purnamawati, 2009)
- b. Setelah 8 jam pasca induksi indometasin, dilakukan pembedahan.
- c. Hasil lambung yang dibedah segera diamati secara mikroskopis.

4.7.2 Pemberian Ekstrak Alga Cokelat dan Pembedahan Kelompok Perlakuan

Pemberian ekstrak *Sargassum sp* dilakukan per oral dengan menggunakan sonde. Diberikan pada kelompok hewan D1, D2, D3 secara berurutan sebanyak 150 mg/kgbb, 300 mg/kgbb, dan 600 mg/kgbb selama 3 hari dan 1 jam sebelum induksi indometasin.

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 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 waterbath 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 alrutan *xylo/* selama 5 menit, larutan *xylo/* 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, *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 30 preparat histopatologi mukosa lambung tikus dengan pembesaran 400x. Setiap preparat dipilih 6 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

4.7.5.1 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 pekan.
3. Hewan coba diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari.

4. Masing-masing kandang berisi 6 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 standart laboratorium, kemudian dilakukan juga penimbangan berat badan diawal dan diakhir adaptasi untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan sebagai standar pemberian ekstrak alga cokelat dan indometasin.

4.7.5.2 Selama Penelitian

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, tikus pada perlakuan control negatif tetap diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium. Untuk tikus pada kelompok D1, D2, dan D3 masing-masing akan diberikan ekstrak alga cokelat per oral dengan dosis 150 mg/kgbb, 300 mg/kgbb, dan 600 mg/kgbb selama 4 hari. Satu jam kemudian pada kelompok control positif dan kelompok D1, D2, dan D3 akan diinduksi indometasin per oral pada hari ke empat.

Pembedahan dilakukan 8 jam setelah pemberian indometasin. Prosedur ini diawali dengan dilakukannya dislokasi *cervical* pada tikus oleh orang yang telah berpengalaman. Setelah itu, pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan NaCl0,9% untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.

4.7.5.3 Sesudah Penelitian

1. Pembedahan dilakukan pada hari ke-4 atau setelah 8 jam induksi indometasin. Prosedur ini diawali dengan dilakukannya dislokasi *cervical* pada tikus oleh orang yang telah berpengalaman.

2. Pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan NaCl 0,9% 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.

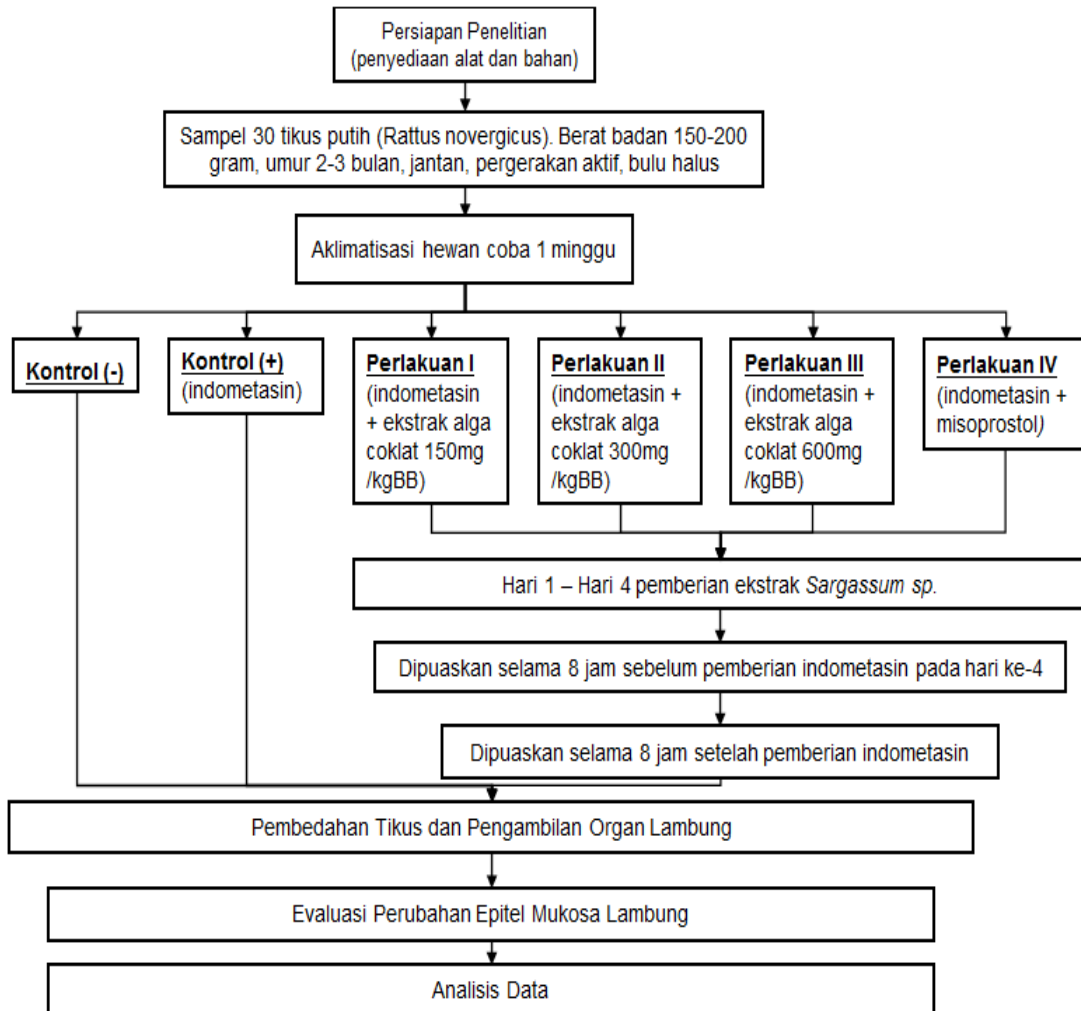
4.8 Alur Penelitian dan Pengumpulan Data

Telah ditentukan bahwa dosis Indometasin adalah 30 mg/kgBB dan dosis ekstrak alga cokelat adalah 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB, serta misoprostol 90mcg/KgBB. Sampel Penelitian dibagi dalam 6 perlakuan yaitu:

- A. Kelompok 1, yaitu kelompok kontrol negatif: tidak diinduksi indometasin maupun diberi ekstrak alga cokelat.
- B. Kelompok 2, yaitu kelompok kontrol positif: diinduksi indometasin 30 mg/kgbb tanpa tanpa ekstrak alga cokelat.
- C. Kelompok 3, yaitu kelompok dosis 1: diberi ekstrak alga cokelat dosis 1 yaitu 150 mg/kgbb selama 4 hari, kemudian diinduksi indometasin 30 mg/kgbb satu jam kemudian.
- D. Kelompok 4, yaitu kelompok dosis 2: diberi ekstrak alga cokelat dosis 2 yaitu 300 mg/kgbb selama 4 hari, kemudian diinduksi indometasin 30 mg/kgbb satu jam kemudian.
- E. Kelompok 5, yaitu kelompok dosis 3: diberi ekstrak alga cokelat dosis 3 yaitu 600 mg/kgbb selama 4 hari, kemudian diinduksi indometasin 30 mg/kgbb satu jam kemudian.

F. Kelompok misoprostol: diberi misoprostol 90mcg/KgBB selama 4 hari, kemudian diinduksi indometasin 30 mg/kgbb satu jam kemudian.

4.8.1 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dalam bentuk rerata skor integritas mukosa lambung yang didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat dan tidak diberi perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus hanya diinduksi indometasin 30 mg/kgBB), 3 kelompok perlakuan (tikus diberikan ekstrak Alga coklat dengan dosis 150mg/kgBB, 300mg/kgBB, dan 600mg/kgBB setelah diinduksi indometasin 30mg/kgBB), dan 1 kelompok misoprostol. Pengamatan penurunan skor perdarahan secara mikroskopis dilakukan sesudah pemberian perlakuan, kemudian melakukan analisa data.

4.9 Analisis Data

Rancangan pada penelitian ini menggunakan “*The Post Test Control Group Design*” dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena penilaian mikroskopis skor integritas mukosa lambung pada tikus hanya mungkin dilakukan pada hewan coba yang sudah dibedah (dimatikan dulu). Perhitungan skor integritas mukosa lambung 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 integritas mukosa lambung tikus secara mikroskopis 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 integritas mukosa lambung yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Jika One-way ANOVA menyatakan $P < 0.05$ maka analisis selanjutnya menggunakan analisis post hoc Tuckey untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan, uji korelasi Pearson, dan uji linear regresi (Muhartono, 2013). Semua uji analisis statistik menggunakan software *SPSS for windows versi 23*.

4.10 Jadwal Kegiatan

Berikut adalah jadwal kegiatan penelitian ini :

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan1				Bulan2			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Tahap Persiapan									
1.	Mengurus ethical clearance	■							
2.	Mengurus perijinan laboratorium	■							
3.	Belanja alat dan bahan penelitian	■							
4.	Aklimatisasi Tikus		■						
5.	Pembuatan ekstrak kasar <i>Sargassum sp</i>	■	■						
Tahap Pelaksanaan									
1.	Pemberian ekstrak kasar <i>Sargassum</i>			■	■				
2.	Penginduksian indometasin				■				
5.	Pembedahan tikus				■				
Tahap Penyelesaian									
1.	Analisa data					■	■		
2.	Penyusunan Laporan akhir					■	■	■	