III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penlitian ini merupakan penelitian penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di *Animal House* FK Unila dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hewan coba akan dipelihara di *Animal House* FK Unila dari masa adaptasi, perlakuan, hingga terminasi. Sedangkan pembuatan preparat gaster hewan coba dan pemeriksaan histopatologi akan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini akan dilakukan kurang lebih selama 6 bulan (Juli–Desember 2015).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Penelitian

Alat–alat yang digunakan untuk penelitian ini diantaranya:

a. Neraca Elektronik dengan kapasitas/daya baca 3000g/0,1g untuk menimbang berat tikus,
b. Kandang tikus
c. Botol minum tikus
d. Tempat makan tikus
e. Sonde lambung
f. Spuit
g. Object glass
h. *Cover glass*
i. *Slicer* preparat
j. Mikroskop cahaya berkamera
k. Laptop

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan–bahan yang digunakan untuk penelitian ini diantaranya:

a. Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* dewasa jantan galur *Sprague dawley*
b. Ibuprofen suspensi (tiap 5 ml mengandung 100 mg ibuprofen)
c. Madu *Bee pollen* dengan nama dagang *Bee pollen Plus*
d. Sekam untuk kandang tikus

e. Pakan tikus

f. Air untuk minum tikus

g. *Handscoon*, masker

h. Formaldehid 10% (metanal atau formalin)

i. Hematoksilin eosin

j. Minyak emersi

3.4 Subyek Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley* berumur 3−4 bulan dengan berat antara 150−250 gram yang diperoleh dari Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor .

3.4.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah organ gaster tikus putih galur *Sprague dawley* yang telah diberi perlakuan dengan dosis dan dalam kurun waktu tertentu. Besar sampel dihitung dengan metode rancangan acak lengkap dapat menggunakan rumus Frederer yaitu $(t–1)(r–1)>15$, t adalah jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok (Supranto, 2000).

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

t = Kelompok perlakuan

n = Jumlah sampel untuk 1 kelompok perlakuan

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Besar sampel (N) = txn

= 4x6

= **24 ekor tikus**

Jadi dalam penelitian ini, dibutuhkan 24 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang terbagi dalam 4 kelompok masing–masing kelompok terdiri dari 6 ekor, yaitu:

a. Kelompok normal (A) yaitu tikus yang tidak diberikan ibuprofen suspensi maupun madu *Bee pollen*. Hanya diberikan pakan biasa dengan ukuran sama seperti 3 kelompok lainnya.
b. Kelompok kontrol negatif (B) hanya diberikan Ibuprofen suspensi (tiap 5 ml mengandung 100 mg ibuprofen). Dosis pemberian ibuprofen suspense untuk setiap kali pemberian adalah 6 ml/kgBB/kali pemberian.

Pemberian ibuprofen dilakukan sebanyak 3 kali dalam sehari selama 7 hari (Febrianti *et al*., 2013).

c. Kelompok C diberikan Ibuprofen suspensi (tiap 5 ml mengandung 100 mg ibuprofen). Dosis pemberian ibuprofen suspense untuk setiap kali pemberian adalah 6 ml/kgBB/kali pemberian. Pemberian ibuprofen dilakukan sebanyak 3 kali dalam sehari selama 7 hari dan 7 hari berikutnya diberikan madu *Bee pollen* yang tersertifikasi oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia dengan merek dagang *Bee pollen Plus*. Dosis yang digunakan dalam perlakuan adalah setengah dari dosis anjuran yaitu 0.77 ml/Kg BB tikus. Dilanjutkan dengan metode pengenceran dengan perbandingan 1:3 dengan aquades untuk mempermudah administrasi madu secara peroral.

d. Kelompok D diberikan Ibuprofen suspensi (tiap 5 ml mengandung 100 mg ibuprofen). Dosis pemberian ibuprofen suspense untuk setiap kali pemberian adalah 6 ml/kgBB/kali pemberian. Pemberian ibuprofen dilakukan sebanyak 3 kali dalam sehari selama 7 hari dan 7 hari berikutnya diberikan madu *Bee pollen* yang tersertifikasi oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia dengan merek dagang *Bee pollen Plus*. Dosis yang digunakan dalam perlakuan adalah 1,54 ml/Kg BB tikus. Dilanjutkan dengan metode pengenceran dengan perbandingan 1:3 dengan aquades untuk mempermudah administrasi madu secara peroral.

3.4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.4.3.1 Kriteria Inklusi :

a. Sehat (tikus dengan bulu yang tidak kusam, bergerak aktif, konsumsi pakan dalam jumlah normal).
b. Memiliki berat badan sekitar 150–250 gram.
c. Berjenis kelamin jantan.
d. Berusia sekitar 3−4 bulan.

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi :

a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
b. Sakit (tampakan tikus dengan rambut kusam, rontok dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluar eksudat yang abnormal dari mata, mulut, anus, genital).
c. Tikus Mati

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah Madu *Bee pollen*

3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent variable*)

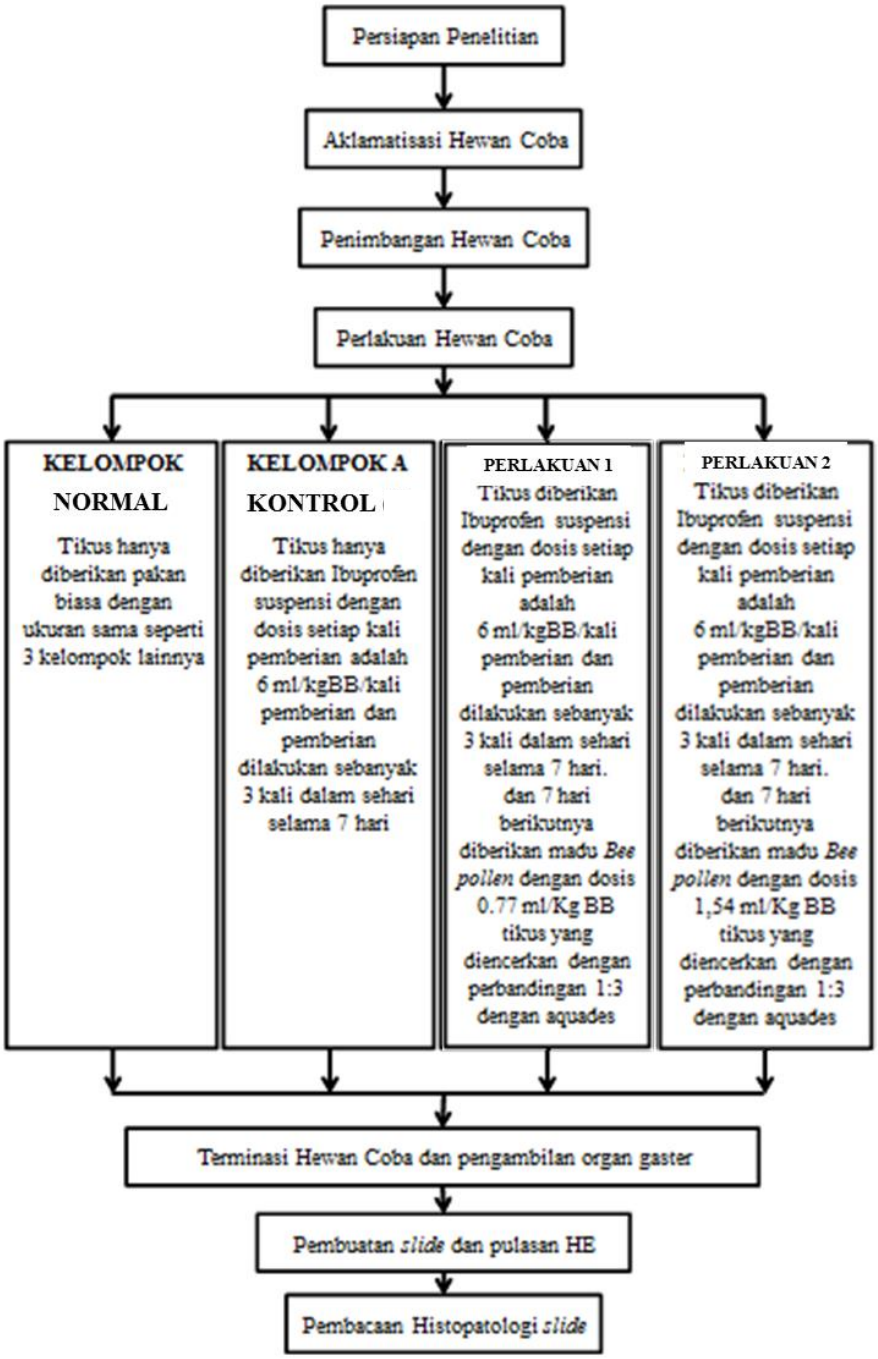
Histopatologi mukosa gaster tikus putih galur *Sprague dawley* yang diinduksi ibuprofen suspensi.

3.5.3 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala Ukur
Lama Pemberian Ibuprofen	Diberikan Ibuprofen suspensi (tiap 5 ml mengandung 100 mg ibuprofen). Dosis pemberian ibuprofen suspense untuk setiap kali pemberian adalah 6 ml/kgBB/kali pemberian Pemberian ibuprofen dilakukan sebanyak 3 kali dalam sehari selama 7 hari (Febrianti *et al*., 2013).	Numerik
Lama pemberian madu	Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu *Bee pollen* yang tersertifikasi oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia dengan merek dagang *Bee pollen Plus*. Dosis yang digunakan dalam perlakuan menggunakan dosis madu yang biasa diberikan kepada manusia dan dikonversi menjadi dosis hewan. Dosis madu yang dianjurkan untuk manusia dengan BB 60 kg (BB standar manusia) sebesar 15 ml dan dikonversi menjadi dosis hewan coba melalui rumus *Body Surface Area* sehingga didapatkan dosis madu yang digunakan sebesar 1,54 ml/Kg BB tikus. Dilanjutkan dengan metode pengenceran dengan perbandingan 1:3 dengan aquades untuk mempermudah administrasi madu secara peroral. Dosis pemberian madu akan terbagi dalam 2 dosis yaitu: • Dosis 1 adalah setengah dari dosis anjuran madu *Bee pollen* yaitu 0.77 ml/KgBBtikus/ pemberian. • Dosis 2 adalah dosis anjuran madu *Bee pollen* yaitu 1,54 ml/KgBBtikus/pemberian (Reagan–Shaw *et al*., 2008).	Numerik
Gambaran histopatologi mukosa gaster tikus	Sediaan histopatologi dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x dalam 5 lapang pandang, dengan interpretasi: 0: Tidak ada nekrosis dan tidak ada sel radang 1: Terdapat nekrosis setempat (fokal) dan terdapat sel radang ringan 2: Nekrosis merata (difusa) dan sel radang menyebar (multifokal) 3: Perforasi (Mustaba *et al*., 2012).	Ordinal

3.6 Diagram Alir



Gambar 11. Diagram alir.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Aklamatisasi Hewan Coba

Aklamatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang berusia 3–4 bulan dengan berat antara 150–250 gr yang akan menjalani masa adaptasi selama 1 minggu di tempat pemeliharaan untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum diberikan perlakuan. Tikus ditempatkan dalam kandang dengan tutup terbuat dari kawat dan dialasi sekam, makanan tikus berupa pelet (Ridwan, 2013).

Pemberian makanan dan minuman diberikan *ad libitum*. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, suhu kandang dijaga sekitar 25°C, dan diberikan pencahayaan yang cukup. Masing–masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan disekat sehingga tidak saling berinteraksi. Kesehatan tikus dipantau setiap hari hingga akhirnya diterminasi (Febrianti *et al*., 2013).

3.7.2 Pembuatan Larutan Madu *Bee pollen*

Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu *Bee pollen* yang terstandar sesuai dengan Departemen Kesehatan Republik Indonesia dengan merek dagang *Bee pollen Plus*. Dosis yang digunakan dalam perlakuan menggunakan dosis madu yang biasa diberikan kepada manusia dan dikonversi menjadi dosis hewan. Dosis madu yang dianjurkan untuk manusia dengan BB 60 kg (BB standar manusia) sebesar 15 ml dan

dikonversi menjadi dosis hewan coba melalui rumus *Body Surface Area* (BSA) yang terangkum dibawah ini:

$$\text{HED}\left(\frac{\text{mg atau ml}}{\text{Kg}}\right) = \text{dosis hewan coba} \times \frac{Km\ \text{hewan coba}}{Km\ \text{manusia}}$$

Keterangan :

HED : *Human Equivalent Dose*

Km : Konstanta konversi

HED madu didapat sebesar 15 ml untuk 60 kg. sehingga didapat sebesar 0,25 ml/kg BB manusia. HED lalu dikonversikan menjadi dosis hewan coba tikus menggunakan rumus BSA, dibawah ini:

$$\text{HED}\left(\frac{\text{mg atau ml}}{\text{Kg}}\right) = \text{dosis hewan coba} \times \frac{Km\ \text{hewan coba}}{Km\ \text{manusia}}$$

$$0{,}25\,\frac{\text{ml}}{\text{Kg}} = \text{dosis hewan coba} \times \frac{6}{37}$$

$$\text{dosis hewan coba} = \frac{37}{6} \times 0.25$$

dosis hewan coba sebesar = 1,54 ml/kg BB tikus

Jadi dosis madu yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 1,54 ml/kg BB tikus. Dilanjutkan dengan metode pengenceran dengan perbandingan 1:3 dengan aquades untuk menpermudah administrasi madu secara peroral. Dosis pemberian madu akan terbagi dalam 2 dosis yaitu:

a. Dosis A adalah dosis anjuran madu *Bee pollen* yaitu 1,54 ml/KgBBtikus/pemberian

b. Dosis B adalah setengah dari dosis anjuran madu *Bee pollen* yaitu 0.77 ml/KgBBtikus/ pemberian (Reagan–Shaw *et al*., 2008).

3.7.3 Induksi Ibuprofen Suspensi

Ibuprofen yang digunakan dalam penelitian ini berupa sediaan suspensi yang didapat dari apotek di Bandar Lampung. Dosis yang digunakan sebesar 360 mg/kgBB/hari, dimana pada penelitian sebelumnya, dosis ini dapat memberikan efek yang bermakna pada gaster tikus (Febrianti *et al*., 2013).

Dosis pemberian ibuprofen suspensi untuk setiap kali pemberian adalah:

360mg/kgBBxBB tikus

$$\frac{5\ ml/kgBB}{100\ mg} = \frac{jumlah\ ibuprofen\ (ml)}{360\ mg/kgBB}$$

Jumlah ibuprofen (ml/kg bb) = $\frac{360x5}{100}$

Jumlah ibuprofen (ml/kg bb) = 18 mL

Jumlah ibuprofen (ml/kg bb) = 18ml/kgBB/3 kali pemberian/hari

Jumlah ibuprofen (ml/kg bb) = 6 ml/kgBB/kali pemberian

Jadi, ibuprofen yang diberikan pada tikus setiap kali pemberian adalah 6 ml/kgBB/kali pemberian.

Pemberian ibuprofen dilakukan sebanyak 3 kali dalam sehari selama 7 hari. Prosedur pemberian ibuprofen adalah sebagai berikut:

a. Cuci tangan WHO
b. Gunakan *handscoon* dan masker
c. Pasang sonde lambung ke ujung spuit
d. Siapkan ibuprofen suspensi, dan masukkan kedalam spuit
e. Ambil tikus secara perlahan, lalu fiksasi bagian mulut dan leher tikus
f. Berikan ibuprofen peroral sesuai dengan dosis yang ditentukan
g. Kembalikan tikus ke dalam kandang

3.7.4 Induksi Larutan Madu *Bee pollen*

Setelah pemberian ibuprofen suspensi selama 7 hari, 2 kelompok tikus akan di berikan madu *Bee pollen* secara peroral dengan 2 dosis yang berbeda menggunakan sonde lambung selama 7 hari, sebanyak 2 kali sehari.

a. Cuci tangan WHO.
b. Pakai *handscoon* dan masker.
c. Pasang sonde lambung ke ujung spuit.
d. Siapkan madu *Bee pollen* yang sudah diencerkan dan masukkan kedalam spuit.
e. Ambil tikus secara perlahan, lalu fiksasi mulut dan leher tikus.

f. Berikan madu *Bee pollen* yang dengan dosis 1ml/200mgBB dengan menggunakan sonde lambung lambung sesuai dengan dosis yang ditentukan.

g. Kembalikan tikus ke dalam kandang.

Setelah perlakuan selesai dilakukan selama 7 hari. Tikus diterminasi sesuai dengan cara yang diatur dalam kode etik penggunaan hewan coba. Yaitu dengan di anastesi dan selanjutnya dipatahkan leher dari tikus. Setelah itu, tikus di buka dan diambil gasternya untuk dibuat sediaan/*slide* (Mustaba *et al*., 2012).

3.7.5 Terminasi Hewan Coba

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75–100mg/kg : 5–10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara IP, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation*. Pemberian *ketamine:xylazine* merupakan euthanasia metode noninhalasi dan biasa digunakan sebagai langkah pertama dari metode euthanasia dua langkah yang dapat menghilangkan kesadaran dengan cepat, yaitu sekitar tiga sampai lima detik setelah injeksi. Sementara *cervical dislocation* merupakan euthanasia metode fisik yang dapat digunakan pada tikus dengan berat badan ≤ 250 gr, karena jika berat badan tikus lebih berat maka akan terdapat massa otot yang besar di area servikal sehingga menyulitkan dislokasi servikal. Cara melakukan dislokasi servikal pada tikus yaitu

dengan meletakkan ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher pada dasar tengkorak untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor lalu ditarik dengan cepat sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak (Ridwan, 2013).

Setelah itu tikus dibedah dan diambil gasternya. Dilanjutkan dengan memasukkan jaringan gaster ke dalam tabung penyimpanan organ dan di masukkan dalam lemari es dengan suhu sebesar -4^0C selama 1 hari, setelah itu masukkan dalam *upright freezer* pada suhu -80^0C (Atmaja, 2008).

3.7.6 Prosedur pembuatan *slide*

a. *Fixation*

1. Memfiksasi spesimen berupa potongan organ gaster yang dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%
2. Mencuci dengan air mengalir

b. *Trimming*

1. Mengecilkan organ menjadi 3 mm.
2. Memasukan potongan organ gaster ke dalam *embeding cassette*.

c. Dehidrasi

1. Mengurangi kadar air dengan meletakan *embeding cassete* pada kertas tisu.

2. Berturut–turut melakukan perendaman organ gaster dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing–masing selama 1 jam.

d. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan xilol I, II, III masing–masing selama 1 jam.

e. Impregnasi

Impregnasi dengan menggunakan parafin I, II, III masing–masing selama 2 jam

f. *Embeding*

1. Membersihkan sisa parafin yang ada dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan usap dengan kapas.
2. Menyiapkan parafin cair dengan memasukkan parafin ke dalam cangkir logam dan memasukan ke dalam oven dengan suhu diatas 58°C.
3. Menuangkan parrafin ke dalam cairan pan.
4. Memidahkan satu–persatu dari embeding cassete ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan lainnya.
5. Memasukan pan ke dalam air.
6. Melepaskan parafin yang berisi potongan gaster dari pan dengan memasukan ke dalam suhu 4–6°C beberapa saat.
7. Memotong parafin sesuai dengan letak jaringan yang ada menggunakan scapel hangat.

8. Meletakan pada blok kayu, ratakan pinggirnya dan buat sedikit meruncing.
9. Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom

g. *Cutting*

1. Melakukan pemotongan pada ruangan dingin.
2. Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
3. Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5µm.
4. Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunkan kuas runcing.
5. Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
6. Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkankan di tengah atau sepertiga bawah atau atas, jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.
7. Menempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator suhu 37 derajat C selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna (Wibhisono *et al.*, 2014).

3.7.7 Prosedur pulasan Hematoksilin Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, pilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing–masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan adalah alkohol absolut I, II, III masing–masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga yaitu aquades selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukan ke dalam zat warna Harris Hematoksilin Eosin selama 20 menit (Freitas *et al.*, 2011).

Kemudian memasukan potongan organ gaster ke dalam NaCl selama 1 menit dengan sedikit menggoyang–goyangkan organ, dan ditekan sedikit agar isi lambungnya keluar. Keenam, mencelupkan organ ke dalam asam alkohol 2–3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dengan aquades bertingkat masing–masing 1 dan 15 menit. Kedelapan, memasukan organ ke dalam eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing–masing selama 3 menit. Terakhir memasukan kedalam xilol IV dan V masing–masing selama 5 menit (Febrianti *et al*., 2013).

a. *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempelkan *slide* diatas kertas tisu pada tempat datar, menetesi dengan bahan mounting yaitu kanada balsam dan ditutup dengan cover glass, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara

b. Membaca *slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Metode yang digunakan dalam melihat preparat dalam prosedur double blinded dan *slide* akan dibaca oleh dr. Muhartono, M.Kes, Sp.PA.

3.8 Analisis Data

a. Uji Normalitas dan Homogenitas (p>0,05)

Hasil penelitian dianalisis apakah data terdistribusi normal atau tidak secara statistik dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro–Wilk*. Uji ini digunakan untuk menguji data yang berjumlah ≤50. Kemudian dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak.

b. Uji Parametrik

Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil data tidak normal dan homogen. Maka dari itu digunakan uji nonparametrik dengan *Kruskal-Wallis*.

c. Uji *Post–hoc*

Analisis *Post–Hoc* menggunakan uji *Mann–Whitney*, dikarenakan pada uji nonparametric menggunakan *Kruskal–Wallis*

3.9 *Ethical clearance*

Ethical clearance penelitian ini didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini telah lulus kaji etik dan mendapatkan surat persetujuan etik nomor 2561/UN26/8/DT/2015.