

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group*. Dilakukan dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimental dan kontrol. Subjek penelitian yang akan digunakan adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley*, sehat, umur 3 sampai 4 bulan dengan berat badan 150 sampai 200 gram yang dibeli dari Institut Pertanian Bogor dan dikelompokkan secara randomisasi ke dalam 5 kelompok.

Pada penelitian ini digunakan tikus karena secara anatomi dan histologi struktur lambung tikus mirip dengan manusia sehingga perubahan yang terjadi akibat pengaruh aspirin akan dapat dipakai sebagai model pada manusia (Travillian *et al.*, 2003). Inilah yang menjadi salah satu alasan mengapa tikus digunakan sebagai hewan percobaan

#### **B. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Unila dan pembuatan preparat histologi di laboratorium bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Waktu Penelitian selama 14 hari karena

aspirin dapat menginduksi kerusakan lambung pada minggu-minggu pertama pemakaian obat ( Brunton *et al.*, 2006).

### C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague dawley*, umur 3-4 bulan, berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor dipilih secara acak dan dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan sesuai dengan rumus Frederer (Kurrahman, 2012).

Menurut rumus Frederer, rumus penentuan besar sampel untuk uji eksperimental yakni  $t(n-1) > 15$ . Dimana  $t$  merupakan kelompok perlakuan dan  $n$  adalah besar sampel setiap kelompok.

$$5(n-1) > 15$$

$$5n - 5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ( $n > 4$ ) dan jumlah kelompok yang akan digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini akan menggunakan 25 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

Kriteria inklusi:

- a. Sehat (rambut tidak kusam, rontok, botak, dan aktif).
- b. Memiliki berat badan 150-200 gram.

- c. Berjenis kelamin jantan.
- d. Berusia sekitar 3-4 bulan.

Kriteria eksklusi :

- a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif).
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- c. Mati selama masa pemberian perlakuan.

#### **D. Bahan dan Alat Penelitian**

##### 1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu aspirin dengan aspirin 90 mg, dekok temulawak dengan dosis 1,3g/kgBB, 2,6g/kgBB dan 5,2g/kgBB, aquadest, alkohol 96%, tikus putih jantan dewasa galur *Sprague dawley*, pakan dan minum tikus.

##### 2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk membuat preparat histologis dengan metode paraffin meliputi: larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna Hematoksisilin dan Eosin, dan entelan (Unila, 2011).

##### 3. Alat Penelitian

- a. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah neraca analitik metler toledo, dengan tingkat ketelitian 0,01 gram untuk menimbang berat tikus, spuit oral 1cc dan 5cc, minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi), kandang tikus, botol minum tikus, mikroskop cahaya, gelas ukur dan pengaduk, dan kamera digital.

b. Alat pembuat preparat histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah object glass, deck glass, tissue cassette, rotary microtome, oven, waterbath, platening table, autotechnicome processor, staining jar, staining rack, kertas saring, histoplast, dan paraffin dispenser.

## E. Prosedur Penelitian

### 1. Prosedur Pemberian Dosis Aspirin

Penentuan dosis yang diberikan berdasarkan hasil konversi dari manusia berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram (Ngatidjan, 2006). Angka konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018. Dosis aspirin pada manusia dewasa dengan berat badan 70 kg adalah 5 g/hari. Berdasarkan Brunton *et al.*, (2006) pemakaian dosis harian aspirin sebesar 4-5 gram dapat menimbulkan kerusakan lambung dari dispepsia ringan, nyeri ulu hati sampai ulser lambung dan duodenum dalam minggu-minggu pertama pemakaian. Sehingga, dosis aspirin yang diberikan pada tikus dengan berat 200 gram adalah  $0,018 \times 5.000$

mg = 90 mg. Sediaan aspirin yang digunakan adalah aspirin tablet 500 mg. Aspirin tersebut digerus dan dilarutkan dalam 5,5 ml aquadest. Jadi dalam 1 ml larutan terdapat 90 mg aspirin. Diberikan peroral satu kali sehari pada pagi hari sebelum pemberian pakan standart.

## 2. Prosedur Pemberian Dosis Temulawak

### a. Cara perhitungan dosis dekok temulawak

Menurut hasil penelitian terdahulu (Indraswari, 2004), dosis temulawak yang efektif digunakan adalah 2,6 g/kgBB. Hasil penelitian inilah yang mendasari penggunaan 3 dosis temulawak yaitu 1,3 g/kgBB, 2,6 g/kgBB dan 5,2 g/kgBB.

Jadi perhitungan dosis untuk tikus dengan berat 200 gram adalah

200gr berat tikus = 0,2 kg

Dosis pertama : 1,3gram/kgBB X 0,2 kg = 0,26 gram.

Dosis kedua : 2,6 gram/kgBB X 0,2 kg = 0,52 gram.

Dosisi ketiga : 5,2 gram/kgBB X 0,2 kg = 1.04 gram.

### b. Cara pembuatan dekok temulawak

Irisan rimpang dibuat setipis dan sekecil mungkin agar proses pembuatan dekok lebih mudah. 130 gram temulawak berat basah yang sudah dipotong tipis dan kecil dipanaskan dalam 250 cc air dengan suhu 100<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah dipanaskan selama 15 menit kemudian didinginkan sampai suhu 40<sup>0</sup>C kemudian disaring dan ditambahkan air sampai volume 250 cc.

Didalam 1cc dekok terkandung 0,52 gram temulawak (dosis kedua), untuk dosis pertama diberikan 0,5cc (mengandung 0,26 gram temulawak), sedangkan untuk dosis ketiga diberikan 2cc (mengandung 1,04 gram temulawak) (Indaswari, 2004).

### 3. Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 25 ekor dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok kontrol normal, dimana hanya akan diberi akuades. Kelompok II sebagai kontrol positif, dimana diberikan aspirin dengan dosis 90 mg. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian dekok temulawak dosis 1,3g/kgBB, kelompok IV diberikan dekok temulawak dengan dosis 2.6g/kgBB, dan kelompok V diberikan dekok temulawak dengan dosis 5,2g/kgBB. Dekok temulawak diberikan setelah 2 jam induksi aspirin dosis 90 mg. Masing-masing diberikan secara per oral selama 14 hari. Selama 1 minggu tiap-tiap kelompok tikus diadaptasikan sebelum diberi perlakuan.
- b. Mengukur berat badan tikus sebelum perlakuan.
- c. Mencekoki tikus dengan aspirin dan dekok temulawak selama 14 hari. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.

- d. Setelah dihentikan, 5 tikus jantan dari tiap kelompok dianastesi dengan *Ketamine-xylazine* 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan Institutional animal *Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode cervical dislocation dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013).
- e. Setelah tikus dipastikan mati, dilakukan laparotomi, lambung tikus diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan HE.
- f. Sampel lambung difiksasi dengan formalin 10%
- g. Metode teknik pembuatan preparat histopatologi
  1. *Fixation*
    - a. Menfiksasi spesimen berupa potongan organ lambung yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.
    - b. Mencuci dengan air mengalir.
  2. *Trimming*
    - a. Mengecilkan organ  $\pm$  3 mm.
    - b. Memasukkan potongan organ lambung tersebut ke dalam embedding cassette.
  3. *Dehidrasi*

- a. Menuntaskan air dengan meletakkan embedding cassette pada kertas tisu.
- b. Berturut-turut melakukan perendaman organ lambung dalam alkohol bertingkat 70%, 96%, alkohol absolute I, II, III masing-masing selama 1 jam.

#### 4. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing-masing 30 menit.

#### 5. *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu  $65,1^{\circ}\text{C}$ .

#### 6. *Embedding*

- a. Menuangkan paraffin cair dalam pan.
- b. Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan.
- c. Melepaskan paraffin yang berisi potongan lambung dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu  $4-6^{\circ}\text{C}$  beberapa saat.
- d. Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel/pisau hangat.
- e. Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- f. Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

#### 7. *Cutting*



- a. Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- b. Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- c. 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 menggunakan kuas runcing.
- d. Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- e. Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.
- f. Mengeringkan slide. Jika sudah kering, slide dipanaskan untuk meretakkan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan.
- g. Pewarnaan dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, memilih slide yang terbaik selanjutnya secara brurutan memasukkan kedalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut :

Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xylol I,II,III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang

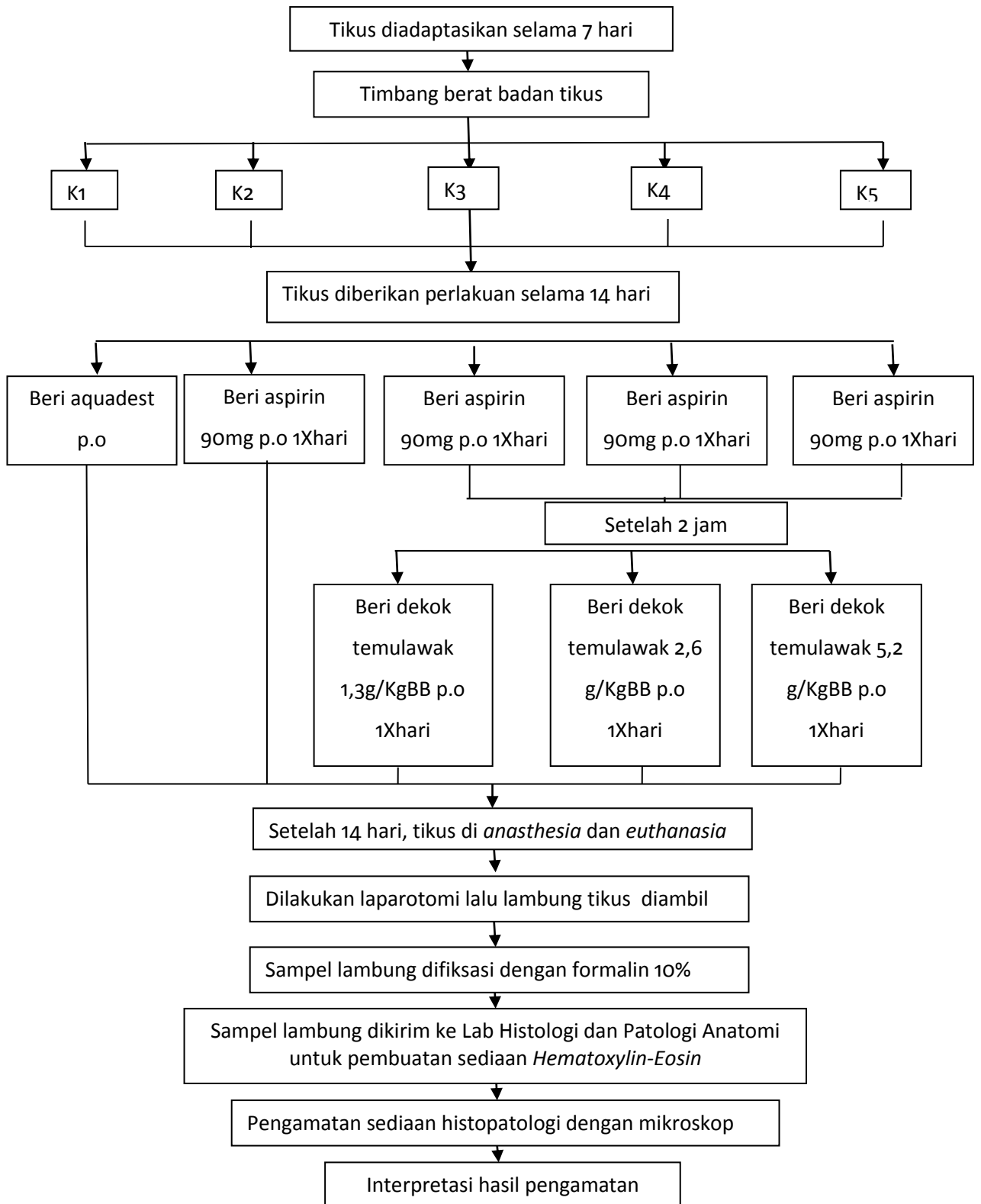
digunakan alkohol absolut I,II,III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan kedalam zat warna harris hematoxylin selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ hati dalam aquadest selama 1 menit dengan sedikit menggoyang-goyangkan organ. Keenam, mencelupkan organ dalam asam alkohol 2-3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dalam aquadest bertingkat masing-masing 1 dan 15 menit. Kedelapan, memasukkan potongan organ dalam eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan kedalam Xylol IV dan V masing-masing selama 5 menit.

#### 8. Mounting.

Setelah pewarnaan selesai menempatkan slide diatas kertas tissue pada tempat datar, meneteskan dengan bahan mounting yaitu kanada balsam dan ditutup dengan cover glass, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

#### 9. Membaca *slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X. Metode yang digunakan dalam melihat preparat adalah prosedur double blinded.



**Gambar 10.** Bagan alur penelitian.

## F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

### 1. Identifikasi Variabel

#### a. Variabel Independen.

- 1) Perlakuan coba : pemberian dekok temulawak dan aspirin.
- 2) Perlakuan kontrol negatif : pemberian aspirin tanpa pemberian dekok temulawak.

#### b. Variabel Dependen.

Variabel dependen adalah kerusakan mukosa lambung.

### 2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada tabel 1.

**Tabel 1.** Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Dosis dekok rimpang temulawak	Temulawak direbus dengan air 100 <sup>0</sup> C selama 15 menit lalu disaring. Diberikan secara oral menggunakan sonde. Dosis efektif temulawak pada penelitian sebelumnya adalah 1,3 g/KgBB, 2,6 g/kgBB, dan 5,2 g/KgBB.	Kategorik
Kerusakan lambung tikus	Sediaan histopatologi dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x dalam 1 lapang pandang. <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Skor 0. Tidak ada tanda gastritis ataupun ulkus.</li> <li>b. Skor 1.</li> </ol>	Numerik

Ditemukan tanda-tanda peradangan mukosa lambung :  
Edema, sekukan sel radang neutrofil pada lamina propia.

- c. Skor 2. Sudah terdapat pelepasan atau erosi 1/3 lapisan mukosa lambung.
  - d. Skor 3. Ditandai dengan erosi 2/3 lapisan mukosa lambung.
  - e. Skor 4. Erosi sudah mencapai  $> 2/3$  lapisan mukosa lambung.
- 

## **G. Analisis Data**

Analisis data penelitian diproses dengan aplikasi pengolahan data. Dengan tingkat signifikansi  $p= 0,05$ . Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data (Saphiro-Wilk). Setelah itu dilakukan uji homogenitas dengan uji Levene. Jika varian data distribusi normal serta homogen maka dilanjutkan dengan metode One Way ANNOVA. Jika varian data tidak berdistribusi normal maka alternatifnya dipilih uji Kruskal-Wallis. Hipotesis akan dianggap bermakna bila  $p<0.05$ . Jika pada uji ANNOVA menghasilkan nilai  $p<0,05$  maka dilanjutkan dengan analisis post hoc test.

## H. *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Freederer yaitu  $(n-1)(t-1) \geq 15$ , dengan n adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
  - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25<sup>0</sup> C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktifitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.

- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta euthanasia dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba dengan IACUC (Ridwan, 2013).