

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Menggunakan 25 ekor tikus putih galur *Sprague dawley* jantan berumur 8-12 minggu yang dipilih secara *random* dan dibagi menjadi 5 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Pembuatan ekstrak binahong yang akan digunakan pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sedangkan untuk pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Periode penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 1 bulan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih galur *Sprague dawley* jantan berumur 8-12 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan kriteria sampel WHO yaitu minimal 5 ekor (WHO,1993). Pada penelitian ini digunakan sampel sebanyak 25ekor. Untuk keperluan penelitian ini

digunakan 5 kelompok tikus dengan masing-masing kelompok terdiri dari 7 tikus galur *Sprague Dawley*.

Adapun tikus yang digunakan pada penelitian ini memenuhi criteria inklusi sebagai berikut :

- Sehat
- Memiliki berat badan antara 180-200 gram
- Jenis kelamin jantan
- Berusia sekitar 8-12 minggu (dewasa)

Kriteria eksklusi pada penelitian ini diantaranya :

- Penampakan rambut kusam, rontok, botak dan aktivitas kurang / tidak aktif
- Keluarnya eksudat yang tidak normal darimata, mulut, anus, genital setelah masa adaptasi
- Terdapat penurunan berat badan > 10 % setelah masa adaptasi selama di laboratorium

Cara pengambilan sampel untuk penelitian eksperimental, dengan menggunakan rumus federer (Dahlan, 2013) :

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

t : jumlah kelompok

n : jumlah sampel

Pada penelitian kali ini terdapat 4 kelompok, sehingga :

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

$$4(n-1) 15$$

$$(n-1) 3,75$$

$$n 4,75$$

Sehingga jumlah sampel yang diambil adalah 5

D. Alat dan Bahan

Untuk mendukung terlaksananya penelitian ini, penulis menggunakan alat dan bahan, sebagai berikut :

1. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu:

- a. Etanol 10ml/kgBB.
- b. Ekstrak Binahong (50mg/kgBB, 100mg/kgBB, 200mg/kgBB).

Bahan pembuatan preparat yang digunakan yaitu:

- a. Larutan Formalin 10%
- b. Garam Fisiologis NaCl (0,9%)
- c. Alkohol teknis
- d. Pewarnaan Haematoxylin
- e. Akuades
- f. Meyer's Albumin
- g. Enthelen

2. Alat penelitian

- a. Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g untuk menimbang berat tikus
- b. S spuit oral 1 cc
- c. Gunting minor set, untuk membedah tikus
- d. Kapas alkohol
- e. Mikrotom
- f. Tabung *erlemeyer*
- g. Saringan
- h. Lumpang dan alu

3. Alat pembuat preparat histologi

Adapun alat pembuat preparat histologi adalah mikrotom, *waterbath*, *embedding cassette*, *cover glass* dan kaca preparat.

E. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yakni variabel *dependen* (variabel terikat) dan variabel *independen* (variabel bebas). Adapun variabel penelitian pada penelitian ini adalah:

1. Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun binahong

2. Variabel Terikat

Gambaran histopatologi lambung tikus *Sprague dawley* jantan.

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur pemberian ekstrak daun binahong

a. Cara pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Pembuatan ekstrak dilakukan di laboratorium biologi jurusan matematika dan ilmu pengetahuan Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak diawali dengan menyediakan daun binahong. Masing masing sampel tersebut dicuci bersih kemudian diangin-angikan, selanjutnya dicacah hingga menjadi kecil. Potongan kecil-kecil tersebut diekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut. Etanol yang digunakan sebelumnya telah didestilasi untuk menjaga kemurniannya dari benda-benda pengotor. Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol destilat. Maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia yang menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar) (Depkes, 2000). Perbandingan masa simplisia dan pelarut adalah 1 : 10, artinya 1kg serbuk daun dicampur dengan 10 liter etanol.

Maserasi dilakukan selama 18 jam, sesuai dengan prosedur penelitian pendahuluan. Setelah 18 jam, filtrate hasil maserasi dipisahkan dari ampasnya melalui penyaringan menggunakan kertas saring, dibantu dengan vaccum pump agar lebih cepat. Filtrate yang telah tertampung kemudian dipisahkan dari zat pelarut dengan cara diuapkan, menggunakan alat rotary evaporator. Hasilnya adalah berupa ekstrak kental, kemudian disimpan didalam refrigerator untuk mempertahankan kualitasnya, jika tidak langsung digunakan.

2. Metode teknik pembuatan preparat

a. *Fixation*

- 1) Menfiksasi specimen berupa potongan organ lambung yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%
- 2) Mencuci dengan air mengalir

b. *Trimming/sampling*

- 1) Membuat irisan potongan lambung dengan ketebalan sebesar 3-5mm.
- 2) Memasukkan potongan organ lambung tersebut ke dalam embedding cassette
- 3) Menuntaskan air dengan meletakkan embedding cassette pada kertas tisu.

c. *Dehidration*

Berturut-turut melakukan perendaman organ lambung dalam alkohol bertingkat 80% selama 2 jam, 90% selama 2 jam, 95% selama 1 jam, alkohol absolute I selama 2 jam, alkohol absolute II selama 1 jam.

d. *Clearing*

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

e. *Impregnasi*

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

f. *Embedding*

- 1) Menuangkan paraffin cair dalam pan

- 2) Memindahkan satu persatu dari embedding cassette ke dasar pan
- 3) Melepaskan paraffin yang berisi potongan lambung dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu $4-6^{\circ}$ C beberapa saat.
- 4) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scapel/pisau hangat
- 5) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing
- 6) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom

g. Cutting

- 1) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu
- 2) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- 3) 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.
- 4) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam water bath selama beberapa detik sampai mengembang sempurna
- 5) 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.
- 6) Mengeringkan slide. Jika sudah kering, slide dipanaskan untuk merekatkan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan.

h. *Staining* (pewarnaan) dengan harris Hematoxylin Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, memilih slide yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut :

Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilil I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan dalam zat warna harris Hematoxylin selama 20 menit.

Kemudian memasukkan potongan organ dalam fosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolute III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam xilol IV dan v masing-masing 5 menit.

i. *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan slide diatas kertas tisu pada tempat datar, menetes dengan mounting yaitu kanada balsam dan tutup dengan cover glass cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j. Membaca slide dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop sinar dengan pembesaran 400X dengan 5 lapangan pandang.

3. Prosedur Pemberian Etanol

a. Prosedur Pemberian Etanol

Dosis etanol yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya yang telah terbukti memiliki efek kerusakan signifikan pada hati. Pada penelitian Chen (2010), digunakan etanol dengan dosis 5g/kgBB.

Perhitungan volume pemberian etanol yaitu 1 gram etanol sama dengan 1 mL alkohol 100% . Jadi jika konsentrasi etanol dibuat 50% maka dalam 50% v/v 100 ml terdapat 50 gram etanol.

$$\text{Maka volume etanol } 5\text{g/kgBB} = 5\text{g} / 50\text{g} \times 100\text{mL} = 10\text{ml/kgBB}$$

b. Prosedur pemberian ekstrak daun binahong

Dosis pada penelitian ini di dasarkan atas penelitian sebelumnya yaitu penelitian-penelitian Yulinah pada tahun 2010, 2011, dan 2013. Hasil dari penelitian-penelitian menunjukkan bahwa ekstrak binahong pada dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB memiliki efek terapeutik yang signifikan pada tubuh manusia, yaitu dapat menurunkan kadar glukosa darah, menurunkan kadar kreatinin darah yang di akibatkan kerusakan ginjal, memperbaiki gambaran histopatologi kerusakan pankreas, dan juga memperbaiki gambaran histopatologis kerusakan ginjal.

Tikus yang di gunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* berumur 8 – 12 minggu dengan berat 180g – 200g, untuk itu dilakukan penyesuaian dosis untuk sebagai berikut :

Konversi dosis 50mg/kgBB ke tikus dengan berat 180g dan 250g =

$$180g = 50mg : 5 = 10mg/180gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

$$200g = 50mg : 4 = 12,5mg/200gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

Konversi dosis 100mg/kgBB ke tikus dengan berat 180g dan 250g =

$$180g = 100mg : 5 = 20mg/180gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

$$200g = 100mg : 4 = 25mg/200gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

Konversi dosis 200mg/kgBB ke tikus dengan berat 180g dan 250g =

$$180g = 200mg : 5 = 40mg/180gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

$$200g = 200mg : 4 = 50mg/200gBB \text{ tikus (satu ekor)}$$

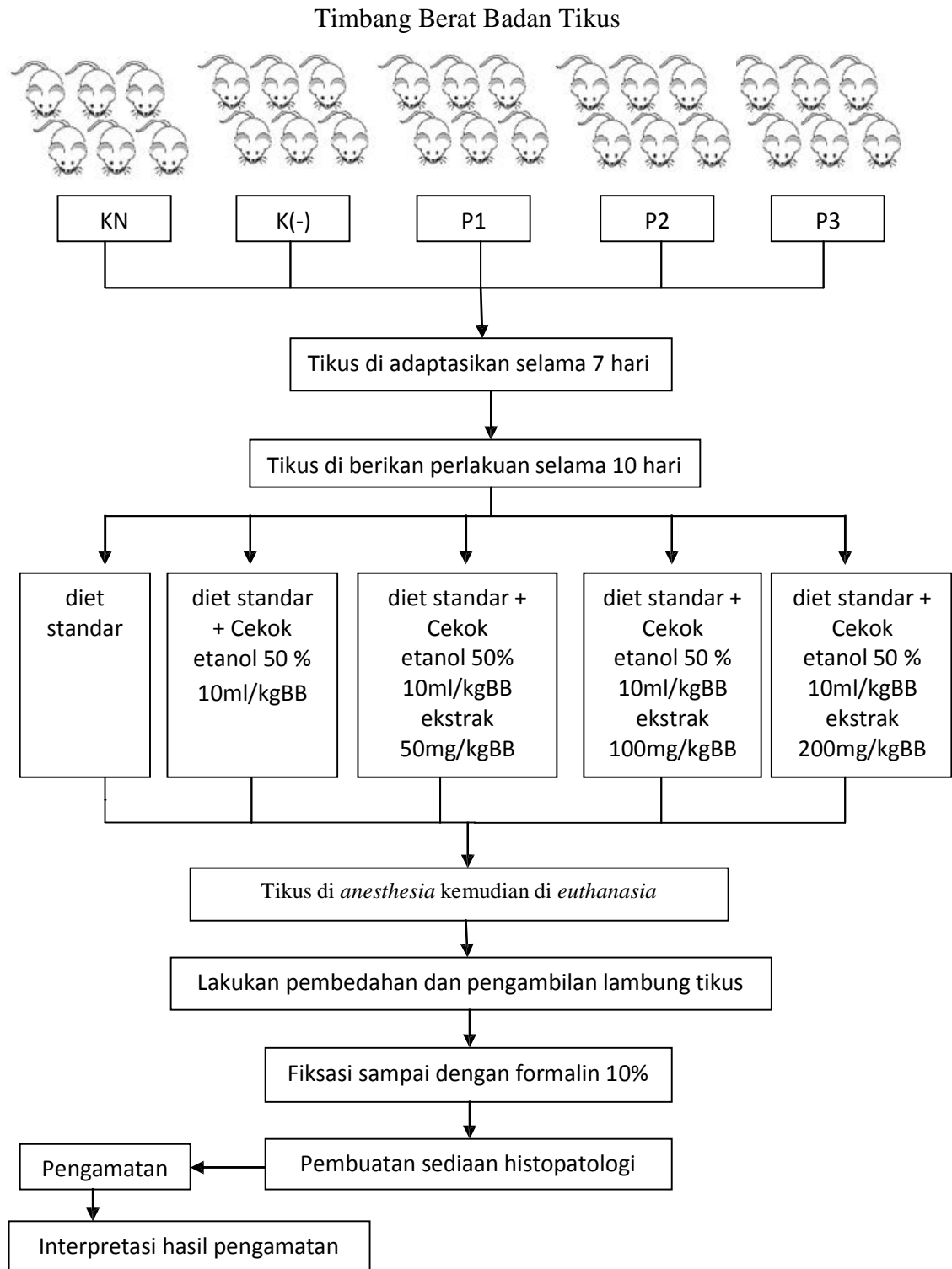
c. Prosedur Perlakuan pada Tikus

- 1) Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok.
- 2) Selama satu minggu tiap-tiap kelompok tikus diadaptasikan sebelum diberi perlakuan.
- 3) Mengukur berat badan tikus sebelum perlakuan.
- 4) Melakukan perlakuan pada masing-masing kelompok :
 - Kontrol normal, diberikan aquades (minum) dan pakan standar.
 - Kontrol negatif, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah etanol dosis 10 ml/ kgBB.
 - Perlakuan coba 1, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 50 mg/kgBB kemudian selang

2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing-masing diberikan peroral selama 10 hari.

- Perlakuan coba 2, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 100 mg/kgBB kemudian selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing-masing diberikan peroral selama 10 hari.
- Perlakuan coba 3, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 200 mg/kgBB kemudian selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing-masing diberikan peroral selama 10 hari.

- 5) Setelah 10 hari , perlakuan diberhentikan.
- 6) Lima tikus jantan dari tiap kelompok di *anesthesia* kemudian di *euthanasia*.
- 7) Dilakukan laparotomi, lambung mencit diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin eosin.
- 8) Sampel lambung difiksasi dengan formalin 10%.



Gambar 7. Diagram Alur Penelitian

G. Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI	SKALA
1	Daun binahong	Daun binahong merupakan daun tunggal, helaian daun memiliki ujung runcing, pangkal berlekuk, tepi rata, permukaan licin, serta daging daun tipis lunak Dosis ekstrak daun binahong Dosis I : 50mg/kgBB/hari Dosis II : 100 mg/kgBB/hari Dosis III : 200mg/kgBB/hari	Numerik
2	Gambaran histopatologi lambung	Gambaran histopatologi lambung tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop Tiap preparat jaringan lambung dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. (Khakim, 2007) a. Normal skor 0. Tidak ada tanda gastritis atau ulkus. b. Kerusakan ringan skor 1. Ditemukan tanda-tanda peradangan mukosa lambung : Hyperemia edema, sebaran sel radang pada lamina propia. c. Kerusakan sedang skor 2. Sudah terdapat pelepasan atau erosi sel epitel superficial. d. Kerusakan berat skor 3. Ditandai pelepasan erosi lebih dari sebagian jaringan mukosa dan jaringan bawah epitel, bahkan seluruh mukosa, atau sampai pada tunika muskularis.	Numerik

H. Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data yaitu uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel < 50 dan homogenitas (Levene). Jika varian data berdistribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan metode statistik *one way ANOVA*. Jika pada uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p > 0,05$ (hipotesis dianggap tidak bermakna), dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Semua distribusi data apabila $p < 0,05$ ataupun uji nya bermakna, maka dilakukan analisis *post hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci.

I. *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 sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus *Frederer* yaitu $(n-1) (t-1) = 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t 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°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas 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 percobaan jika diperlukan, pada penelitian 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 sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).