

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Patologi Anatomi, Histologi, dan Farmakologi.

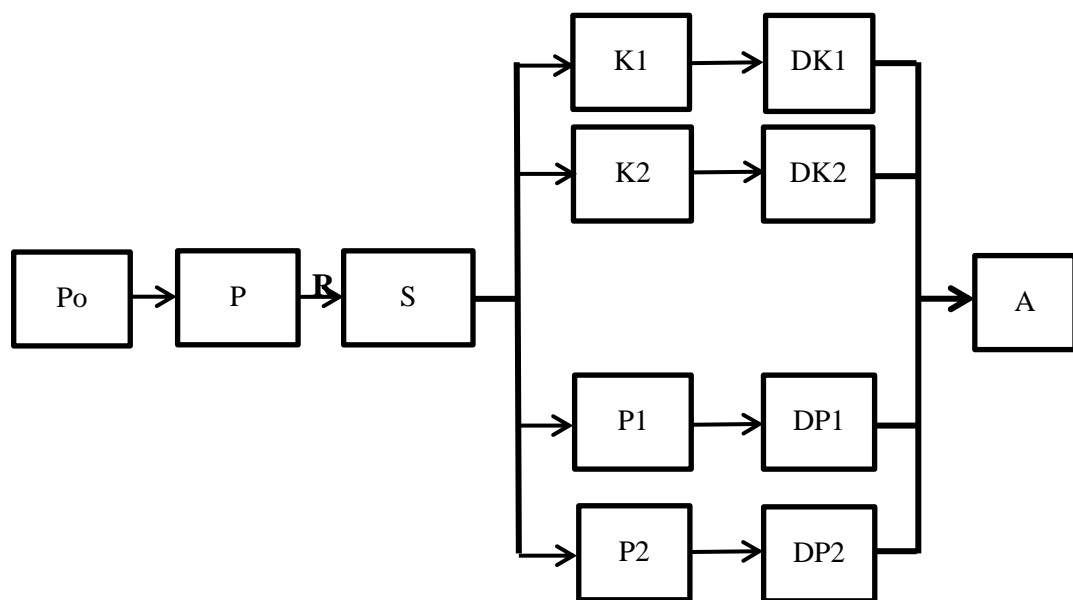
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- 1) Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.
- 2) Pembuatan ekstrak daun kersen dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.
- 3) Pembuatan dan pengamatan preparat esofagus hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- 4) Penelitian dan pengumpulan data berlangsung dari bulan Maret s/d Mei 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Quasi Experimental* dengan metode *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan

coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian ekstrak daun kersen pada tikus wistar jantan yang diberi etanol dan *soft drink* dengan parameter pengukuran variabel integritas mukosa esofagus.



Gambar 5. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Po : Populasi tikus
- P : Pra Eksperimental
- R : Random sampling sederhana
- S : Sampel
- K1 : Kelompok kontrol 1. Tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian akuades per oral ± 10 ml/100grbb tikus secara *ad*

libitum dan pemberian etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/hari *ad libitum*. Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.

- K2 : Kelompok kontrol 2. Tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian akuades per oral ± 10 ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian *soft drink* per oral dengan dosis 50 ml/hari secara *ad libitum*. Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- P1 : Kelompok perlakuan 1. Tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/hari *ad libitum*. Setelah etanol habis, diberikan akuades per oral ± 10 ml/100grbb tikus secara *ad libitum*. Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- P2 : Kelompok perlakuan 2. Tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan *soft drink* per oral dengan dosis 50 ml/hari *ad libitum*. Setelah *soft drink* habis, diberikan akuades per oral ± 10 ml/100grbb tikus secara *ad libitum*. Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- DK1(-), DK2(-), DP1, DP2 : Data hasil pengamatan histopatologi esofagus kelompok K1(-), K2(-), P1, dan P2.
- A : Analisis Data

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak dengan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Tikus wistar jantan umur 2-3 bulan.
- 2) Berat badan rata-rata $200-300 \pm 20$ gram
- 3) Tingkah laku dan aktivitas normal.

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

Tikus sakit dalam masa adaptasi.

3.4.2.3 Kriteria *drop out*

Tikus mati dalam masa penelitian..

3.4.3 Besar Sampel

Penentuan besaran sampel diambil berdasarkan kriteria inklusi, eksklusi dan *drop out*. Tikus wistar yang digunakan 5 ekor pada masing-masing kelompok, dan pada penelitian terdapat 4 kelompok sehingga jumlah yang digunakan dalam

penelitian ini adalah 20 ekor. Untuk mengantisipasi kriteria *drop out*, peneliti memasukkan jumlah persentase *drop-out* sebesar 10%. Maka jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebanyak 6 ekor tikus dalam setiap kelompok ditambah 1 ekor tikus untk uji pra eksperimental, sehingga jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 25 ekor tikus.

3.4.5 Cara Sampling

Pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah berdasarkan kriteria inklusi, eksklusi, dan *drop out*. Kemudian sampel dibagi dalam 4 kelompok yang diambil secara acak sederhana (*simple random sampling*) yang diadaptasikan selama satu minggu.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L*) dengan dosis 500 mg/kgBB.
- 2) Etanol 40% 1,8 ml/hari.
- 3) *Soft drink* 50 ml/hari.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah integritas mukosa esofagus tikus wistar jantan.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasioanal	Skala
Bebas	Ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura L.</i>)	Daun kersen yang sudah matang dan sehat dikumpulkan dari lingkungan FK UNDIP. Daun-daun dikeringkan lalu dibuat bubuk kasar, kemudian di ekstrak dengan etanol. Dosis yang digunakan adalah 500 mg/kgBB jenis ekstrak EEMC, yang diberikan secara oral 60 menit sebelum pemberian minuman beralkohol 40% dan <i>soft drink</i> .	Nominal
	Etanol 40%	Minuman beralkohol jenis <i>whisky</i> yang mengandung etanol 40% dengan dosis 1,8 ml/200 gr tikus.	Nominal
	<i>Soft drink</i>	<i>Soft drink</i> botol 250 ml dengan menggunakan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu 50 ml/tikus/hari yang diletakkan di tempat minum, diberikan pada jam 4 sore – 8 pagi.	Nominal

Tabel 2. Definisi operasional variabel (lanjutan)

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasioanal	Skala
Terikat	Integritas mukosa esofagus tikus wistar jantan	<p>Gambaran mikroskopis esofagus tikus wistar jantan yang diamati dibawah mikroskop mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400x dibaca dalam 5 lapangan pandang dengan menilai derajat kerusakan mukosa esofagus yang paling tinggi. Penilaian kerusakan mukosa esofagus dilihat dengan sistem skor integritas mukosa berdasarkan modifikasi Barthel Manja, dengan skor sebagai berikut²⁶:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Skor 0, yaitu normal, tidak terdapat perubahan patologis. b. Skor 1, terdapat deskuamasi epitel berupa kerusakan ringan epitel tanda adanya celah. c. Skor 2, terdapat erosi permukaan epitel berupa celah (1-10 sel epitel / lesi). d. Skor 3, terdapat ulserasi ditandai dengan adanya gap > 10 sel epitel / lesi, dan biasanya terdapat jaringan granulasi dibawah epitel 	Ordinal

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Makanan dan minuman standar hewan percobaan
- 3) Bahan pengecatan preparat histologi dengan pengecatan HE
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Paraffin
 - c. Albumin
 - d. Hematoksilin Eosin
 - e. Asam asetat
 - f. Larutan xylol
 - g. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - h. Aquadest
- 5) Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*)
- 6) Etanol 40%
- 7) *Soft drink* dengan kadar 250 ml

3.7.2 Alat

- 1) Kandang tikus wistar
- 2) Timbangan duduk dan neraca analitik *Metler Toleda* dengan tingkat ketelitian 0,01 gram untuk menimbang berat tikus
- 3) Sonde lambung

- 4) Alat bedah hewan percobaan : scapel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin
- 5) Alat untuk pembuatan preparat histologi : mikrotom, oven, dan cetakan parafin
- 6) Alat untuk melihat histopatologik esofagus : deck glass, object glass, dan mikroskop cahaya
- 7) Gelas ukur dan pengaduk
- 8) Pemanas dan alat pemotong

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan adalah data yang bersumber dari pemeriksaan mikroskopis terhadap integritas mukosa esofagus tikus wistar.

3.7.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian ini meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

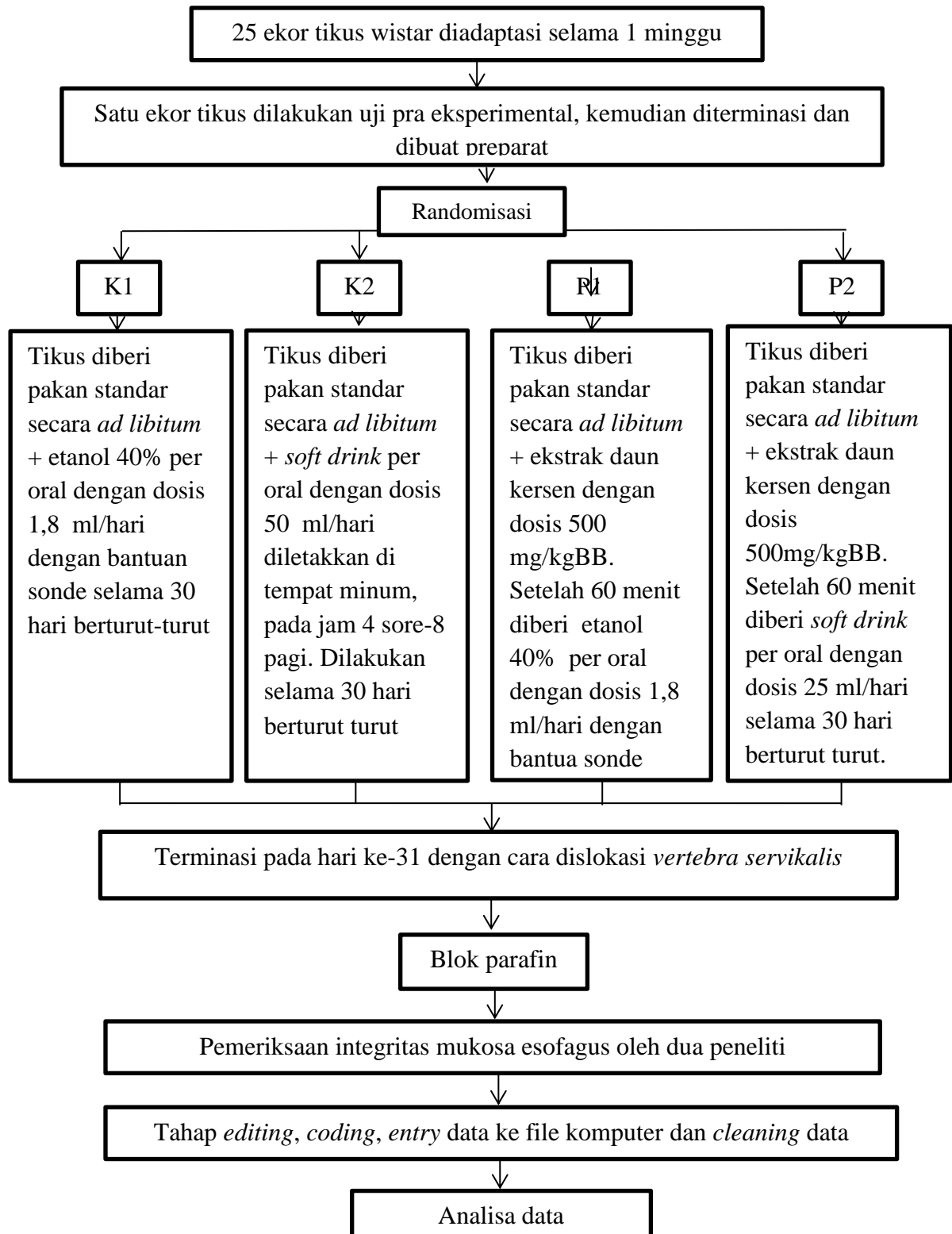
- 1) Sampel diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- 2) Satu ekor tikus dilakukan uji pra eksperimental kemudian diterminasi dan diambil organ esofagus untuk dibuat preparat.

- 3) Sampel dipilih berdasarkan *simple random sampling*, 24 ekor tikus strain wistar jantan dibagi dalam empat kelompok.
- 4) Kelompok kontrol pertama, tikus wistar diberi pakan standar dan minuman beralkohol 40% per oral dosis 1,8 ml/hari dengan bantuan sonde selama 30 hari berturut-turut.⁴⁹
- 5) Kelompok kontrol kedua, tikus wistar di beri pakan standar dan *soft drink* per oral dengan dosis 50 ml/hari secara *ad libitum* selama 30 hari berturut-turut.
- 6) Kelompok perlakuan pertama, Tikus wistar yang diberi pakan standar secara *ad libitum*. Setelah itu diberikan ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB dan 60 menit kemudian diberikan minuman beralkohol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/tikus/hari dengan bantuan sonde.¹¹ Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- 7) Kelompok perlakuan kedua, tikus wistar diberi pakan standar secara *ad libitum* dan diberikan ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB.⁵³ Setelah 60 menit, diberikan *soft drink* per oral dengan dosis 50 ml/tikus/hari yang diletakkan di tempat minum di dalam kandang, pada jam 4 sore – 8 pagi. Setelah jam 8 pagi, digantikan dengan minum standar. Perlakuan dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- 8) Pada hari ke- 31 setelah perlakuan selesai diberikan, semua hewan percobaan dimatikan dengan cara dislokasi *vertebra servikalis*, kemudian organ esofagus diambil untuk selanjutnya dibuat preperat

histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE. Hal ini dilakukan pada hari ke- 31 agar efek perlakuan tampak nyata.

- 9) Pemeriksaa histopatologi jaringan mukosa esofagus meliputi *processing* dengan pengambilan jaringan dan fiksasi, pemotongan blok, dan pengecatan HE. Dari setiap sampel dibuat preparat jaringan esofagus dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x serta dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk dinilai integritas mukosanya. Pengamatan dilakukan oleh peneliti dan ahli secara *blind* dalam rangka penghindaran subjektivitas

3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh akan diolah terlebih dahulu melalui proses *editing, coding, entrying, dan cleaning* data, lalu data dianalisis secara statistik dengan program komputer. Dilakukan uji Kappa untuk menilai keandalan pengukuran variabel berskala nominal. Tingkat kesepakatan data hasil pengamatan dianggap baik jika nilai *Kappa* $>0,60$. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif setelah sebelumnya dilakukan uji kesepakatan data menggunakan uji *Kappa*, dilanjutkan dengan uji statistik *Kruskal Wallis*, jika didapatkan $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc* untuk uji *Kruskal-Wallis* yaitu uji *Mann Whitney*.

- a. Jika $p \leq 0,05$, terdapat perbedaan bermakna
- b. Jika $p > 0,05$, tidak terdapat perbedaan bermakna

3.10 Etika Penelitian

Sebelum dilakukannya penelitian terhadap hewan coba tikus wistar pada percobaan ini, maka terlebih dahulu telah dimintakan perihal *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi, Semarang

