

BAB III
MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

III.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Kegiatan penelitian dimulai pada tanggal 15 Januari 2002 dan selesai pada tanggal 28 Februari 2002.

III.2 Materi Penelitian

III.2.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor tikus putih lepas sapih usia 30 hari dengan berat badan rata-rata 100 gram. Tikus putih sejumlah 24 ekor tersebut diperoleh dari Pusvetma. Digunakan hewan coba berupa tikus putih lepas sapih dimaksudkan karena usia muda (anak-anak) peka terhadap kafein (Sunaryo, 1998), disamping itu tikus merupakan spesies ideal untuk penelitian, lebih mudah dipegang dan dikendalikan, pemberian materi lebih mudah dilakukan dengan berbagai route, mudah dipelihara di laboratorium, lama hidup relatif singkat dan fisiologi tikus diperkirakan sesuai (identik) dengan manusia (Kusumawati 1999).

III.2.2 Alat dan Bahan Penelitian

A. Alat-alat penelitian

Alat- alat yang dipakai dalam penelitian ini antara lain : sangkar percobaan beserta perlengkapannya, scalpel, pinset, gunting, pot

obat, tabung suntik 6 ml, timbangan mikro, mikroskop, dan gelas ukur.

B. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang dipakai yaitu : kafein dari Laboratorium Bio Analitika Surabaya, pakan ayam broiler Br.2 dengan merk dagang Comfeed , aquades, formalin 10 persen, khloroform, alkohol 70 persen, alkohol 80 persen, alkohol 90 persen, alkohol 96 persen, alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol absolut III, alkohol asam, xylol I, xylol II, parafin I, parafin II, hemathoxylin eosin, kanada balsem, gelas obyek dan gelas penutup.

III.3 Metode Penelitian

III.3.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih sebanyak 24 ekor dibagi secara acak menjadi empat kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berisi 6 ekor tikus putih. Tikus putih diadaptasikan selama 14 hari sebelum dimulai perlakuan.

III.3.2 Perlakuan Hewan Coba

Diberikan 4 perlakuan pada 24 ekor tikus yaitu :

1. P0 (kontrol) tidak diberi kafein
2. P1 (perlakuan 1) pemberian kafein *per oral* dengan dosis 0,89 mg / 100 g berat badan dalam satu hari.
3. P2 (perlakuan 2) pemberian kafein *per oral* dengan dosis 2,67 mg / 100 g berat badan dalam satu hari.

4. P3 (perlakuan 3) pemberian kafein *per oral* dengan dosis 4,46 mg / 100 g berat badan dalam satu hari.

Konversi penghitungan terdapat dalam lampiran.

P1 merupakan dosis sedang, P2 merupakan dosis terapi terendah *per oral* dan P3 merupakan dosis terapi tertinggi *per oral* (Witter dan Jones, 1975;). Dosis terapi adalah sejumlah obat yang memberikan efek terapeutik (Joenoos, 1998). Tiap-tiap perlakuan, pemberian kafein *per oral* dengan mencampur kafein ke dalam 1 ml aquades. Cara pemberian tiap-tiap perlakuan memakai sonde. Perlakuan dilakukan selama 30 hari secara rutin. Selanjutnya tikus dikorbankan dengan melakukan pembiusan memakai khloroform sampai mati. Masing-masing tikus dibedah pada bagian perut untuk dilakukan pengambilan lambung pada hari ke-31 yang selanjutnya dilakukan pemeriksaan histopatologis.

III.3.3 Pengambilan Sampel

Setelah perlakuan berlangsung selama 30 hari, semua tikus dimatikan dengan khloroform, bagian ventral disayat kemudian lambungnya diambil dan diamati secara makroskopik. Selanjutnya organ lambung dimasukkan ke dalam formalin 10 persen untuk diproses menjadi sediaan histologis.

III.3.4 Pembuatan Sediaan Histologis

Pembuatan preparat histologis dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Cara pembuatan sediaan histologis adalah sebagai berikut :

- a. Fiksasi dan Pencucian
- b. Dehidrasi dan Clearing
- c. Infiltrasi
- d. Pembuatan Blok Parafin
- e. Pengirisan dengan Mikrotom
- f. Pewarnaan
- g. Penutupan dengan *Cover Glass*

a. Fiksasi dan Pencucian

Cara kerja :

Setelah hewan percobaan dimatikan dengan khloroform kemudian disayat pada bagian ventral untuk pengambilan lambung. Lambung yang diambil dimasukkan ke dalam formalin 10 persen sekurang-kurangnya 24 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air kran.

b. Dehidrasi dan Clearing

Cara kerja :

Lambung yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 70 persen, alkohol 80 persen, alkohol 95 persen, alkohol 96 persen, alkohol absolut I, II, III, Xilol I dan Xilol II masing-masing selama 30 menit.

c. Infiltrasi

Cara kerja :

Jaringan dimasukkan kedalam parafin I yang mencair kemudian dimasukkan kedalam oven selama 30 menit, dimasukkan kedalam parafin II lalu dimasukkan kedalam oven lagi selama 30 menit dengan suhu 60 °C.

d. Pembuatan Blok Parafin

Cara kerja :

Disediakan beberapa cetakan besi yang telah diolesi gliserin dengan tujuan mencegah lekatnya parafin dan cetakan kemudian lambung dimasukkan ke dalam parafin dengan menggunakan pinset dan ditunggu sampai parafin membeku.

e. Pengirisan tipis

Cara kerja :

Pemotongan dilakukan secara random yaitu tiap 15 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan empat sampai tujuh mikron, kemudian dicelupkan kedalam air hangat dengan suhu 20 sampai 30 °C hingga jaringan mengembang dengan baik. Jaringan yang telah mengembang dengan baik kemudian diletakkan pada *obyek*

glass yang sebelumnya diolesi dengan Egg albumin, lalu dikeringkan dengan *hot plate*.

f. Pewarnaan

Cara kerja :

Pewarnaan Hematoxylin Eosin dilakukan dengan metode Harris, yaitu jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan dalam xilol I selama tiga menit dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xilol II, lalu pada alkohol absolut I, II, alkohol 96 persen, 80 persen, 70 persen dan air kran selama satu menit. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam zat warna Harris selama lima sampai sepuluh menit, air kran selama dua sampai lima menit, Acid Alkohol tiga sampai sepuluh rendaman, air kran empat sampai tujuh rendaman, amonia enam rendaman, aquades secukupnya, zat warna Eosin selama seperempat menit lalu dimasukkan lagi dalam aquades secukupnya. Kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 70 persen, 80 persen masing-masing selama setengah menit. Terakhir dimasukkan ke dalam xilol I dan II masing-masing selama satu sampai dua menit selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa pewarnaan.

g. Mounting

Penutupan obyek glass dengan cover glass yang sebelumnya telah ditetesi dengan Kanada Balsam.

III.3.5 Pengumpulan Data

Data penelitian diperoleh dengan cara melakukan pemeriksaan pada tiap-tiap preparat di bawah mikroskop. Menurut Sarmanu (1988) pengamatan secara mikroskopis ditujukan pada perubahan seluler yaitu berdasarkan derajat kerusakan lapisan-lapisan dinding organ lambung. Tiap kerusakan mempunyai nilai yang berbeda-beda. Pada penelitian ini, kerusakan dibagi menjadi tiga yaitu erosi, hemorhagi dan ulserasi. Erosi adalah kerusakan lambung yang terbatas pada lapisan mukosa, hemorhagi adalah adanya darah di antara lipatan-lipatan mukosa dan sub mukosa lambung sedangkan ulserasi adalah kerusakan lambung pada lapisan mukosa dan lapisan di bawah mukosa. Pemberian nilai :

Tidak terdapat kerusakan lambung	Nilai :0
A. Erosi	Nilai :1
B. Hemorhagi	Nilai :2
C. Ulserasi	Nilai :3

Perubahan-perubahan yang terjadi dicatat dan dikumpulkan sebagai data hasil penelitian, dengan asumsi bahwa makin tinggi jumlah nilainya, makin berat kerusakannya.

Cara menghitung nilai masing-masing skor :

Pemeriksaan dilakukan dengan melihat lima lapangan pandang. Jika di antara kelima lapangan pandang tersebut terdapat erosi lebih dari 50 persen maka diberi nilai satu, jika terdapat hemorhagi lebih dari 50 persen diberi nilai dua, dan jika terdapat ulserasi lebih dari 50 persen diberi nilai tiga. Tapi jika tidak ada perubahan diberi nilai nol (Chao, 1974).

III.4 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat macam perlakuan dan satu sebagai kontrol, masing-masing perlakuan terdiri dari enam ulangan. Adapun parameter yang diamati adalah tingkat kerusakan dari jaringan lambung (Kusriningrum , 1990).

III.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa skor nilai tingkat keparahan histologis lambung, disusun dalam bentuk tabel lalu dianalisis. Untuk mengetahui perbedaan kerusakan akibat pemberian kafein dilakukan analisis statistik non parametrik dengan menggunakan uji Kruskal Wallis, derajat kerusakannya diolah dengan penilaian peringkat (*rank*) dan bila terjadi perbedaan dilanjutkan dengan uji pasangan berganda (Siegel, 1990).