

III. Materi Dan Metode

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini baik perlakuan serta pembuatan histopatologi dilakukan di Laboratorium Ilmu Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juni 2023.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang pemeliharaan tikus putih, wadah makan dan minum, spuit 1 ml, scapel, blade, gunting bedah, pot steril, sonde oral, pinset, container organ nampan, Gelas objek tissue processor, rotary microtom, mikroskop Olympus DP20, glove karet dan timbangan digital.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan *Sptague dawley*, pakan hewan coba (*Voer 551*), sekam kayu, ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*) sebanyak 1 kg, aquades, alkohol, larutan *Neutral Buffer Formalin* 10% untuk fiksasi, bahan pembuatan preparat histopatologi seperti alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, xylon, paraffin, gliserin, chloroform, CMC Na 1%, Lithium karbonat dan Hematoksin Eosin (HE). Bahan pembuatan ekstrak yaitu daun mint (*Mentha arvensis L*), CMC Na 1% n-heksan 300 ml, ethanol 500 ml, dan aquades.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengambilan sampel secara acak dari 4 kelompok perlakuan dengan 6 kali ulangan untuk masing masing perlakuan.

3.3.2 Sampel

Penelitian ini sampel yang digunakan adalah tikus putih jantan *Sprague dawley* berumur sekitar 3 bulan dengan berat badan ± 200 gram yang diperoleh dari laboratorium hewan coba.

3.3.3 Besaran Sampel

Besaran sampel dihitung berdasarkan jumlah kelompok dalam penelitian induk karena terdapat empat kelompok dengan menggunakan rumus Federer yaitu:

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

Keterangan:

t= jumlah perlakuan

n= jumlah ulangan

Dengan t=4, maka dapat

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

Dari hasil perhitungan di atas maka didapatkan jumlah sampel sebanyak 6 ekor tikus untuk setiap perlakuan. Jadi besar sampel keseluruhan yang digunakan sebanyak $4 \times 6 = 24$ ekor tikus. Menghindari kematian pada sampel maka pada penelitian ini besar sampel akan ditambah 20% dari besar sampel minimum, sehingga besar sampel yang dibutuhkan yaitu 30 ekor tikus.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini akan dilakukan dengan teknik pengambilan sampel secara post test pada akhir penelitian.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga jenis yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kendali.

1. Variabel Bebas : Dosis ekstrak mint (*Mentha arvensis L*) dan lama perlakuan.
2. Variabel Tergantung : Histopatologi lambung tikus (*Sprague dawley*) dengan parameter antara lain Inflamasi, degenerasi ,nekrosis, hemoragi
3. Variabel Kendali : Umur, berat tikus, jenis kelamin dan ras.

3.6 Pembuatan Ekstrak Daun Mint (*Mentha arvensis L*)

Ekstraksi daun mint (*Mentha arvensis L*) dilakukan di Laboratorium Ilmu Kesehatan, Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Ekstraksi dengan metode maserasi bergerak dengan pelarut etanol 96%. Daun dicuci bersih dan diangin anginkan semalaman. Setelah itu ditimbang dan dipotong tipis tipis dan dikeringkan. Hindari sinar matahari langsung, selama proses pembuatan ekstrak

memakan waktu sekitar 2 minggu. Setelah kering, digiling untuk dijadikan serbuk, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% pada suhu 60°C, disaring dan difiltrat yang diperoleh diuapkan dengan dievaporasi putar hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian diukur dan diencerkan dengan CMC Na 1% (Putra dkk., 2014).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan sampel, yang digunakan adalah tikus putih jantan *Sprague dawley* berumur sekitar 3 bulan dengan berat badan ± 200 gram yang diperoleh dari laboratorium hewan coba. Hewan coba diadaptasikan dalam kandang yang berisi 2 ekor tikus putih perkandang yang berukuran 30 x 60 x 30 cm yang beralaskan sekam kayu setebal 5 cm selama tujuh hari untuk menghindari stress. Tempat makan dan minum setiap hari diisi ulang untuk menghindari timbulnya penyakit. Tikus diberikan makan dan minum secara rutin dua kali sehari. Jumlah pakan yang diberikan 10% dari bobot badan tikus. Aquadest diberikan secara ad libitum yang dimasukkan dalam nipple yang diletakkan di atas sangkar. Kotoran tikus dibersihkan setiap sehari sekali untuk menghindari stress.

3.7.2 Perlakuan Pada Hewan Coba

Dua puluh empat ekor tikus putih jantan *Sprague dawley* berumur sekitar 3 bulan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak yang terdiri dari P0 (0 mg/kg BB peroral) sebagai kontrol, P1 (50 mg/kg BB peroral), P2 (500 mg/kg BB peroral), P3 (5000 mg/kg BB peroral), perlakuan ini masing-masing diberikan satu kali sehari selama 14 hari. Kelompok tikus perlakuan yang dipakai dalam penelitian ini dapat digambarkan sebagai

berikut:

- P0 : Sebanyak 6 ekor tikus tidak diberikan ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*)
- P1 : Sebanyak 6 ekor tikus diberikan ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*) dengan dosis 50 mg/kg BB
- P2 : Sebanyak 6 ekor tikus diberikan ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*) dengan dosis 500 mg/kg BB
- P3 : Sebanyak 6 ekor tikus diberikan ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*) dengan dosis 5000 mg/kg BB.

Pemberian ekstrak daun mint (*Mentha arvensis L*) pada tikus putih dilakukan secara per oral menggunakan spuit dengan memakai gloves yang dilakukan sehari satu kali pada siang hari.

Dosis Ekstrak Mint (*Mentha arvensis L*)

Dosis P1

50mg/kgBB Dikonversikan dengan BB 200g = 0,2 kg

$0,2 \times 50 \text{ mg/kg BB} = 10 \text{ mg/kg BB}$

Maka : $10 \text{ mg/ekor} = 0,01 \text{ gr} = 0,01\text{ml} + 4,95 \text{ ml} = 4,96 \text{ ml}$

Dosis P2 : 4,6 ml

Dosis P3 : 5 ml

3.7.3 Nekropsi

Pada hari ke-14, seluruh tikus dilakukan euthanasia menggunakan metode *dislokasi cervical*. Organ Lambung kemudian di ambil untuk membuat preparat histopatologi.

3.8 Pembuatan Preparat Histopatologi

Menurut Yawuli *et al.*, (2018) pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan tahapan yaitu organ yang telah diambil kemudian difikasi menggunakan larutan *Neutral Buffer Formalin* 10% selama 24 jam. Kemudian dilakukan trimming jaringan dipotong kecil dengan ketebalan 0,5 mm dan dimasukkan ke dalam kaset

Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan tingkat konsentrasi alcohol yaitu alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 90%, alcohol absolut I, alcohol absolut II masing masing selama 2 jam. Selanjutnya dibersihkan dengan xylon dan dicetak dengan paraffin dan disimpan dalam penyimpanan pendingin. Selanjutnya blok blok paraffin dimikrotom dalam ketebalan 6-8 μm . agar jaringan tidak terlipat, hasil potongan diambangkan ke dalam air hangat bersuhu 60°C (*waterbath*). Preparat diangkat lalu di tempatkan dalam gelas objek untuk pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (HE).

Slide preparat dilakukan perendaman dengan xylol 1 dan 2 selama dua menit pada masing masing slide agar mengeluarkan perwarnaan HE untuk deparafinasi. Kemudian dilakukan rehidrasi dalam alcohol absolut, alcohol 95%, dan alcohol 80% selama dua menit dengan di rendam kemudian di cuci dengan air mengalir.

Pewarnaan Hematoksilin dilakukan selama 8 menit, kemudian cuci dengan air mengalir, dilanjutkan dengan Lithium karbonat selama 15-30 detik, dibilas dengan air mengalir, dan diwarnai dengan Eosin selama 2-3 menit. Preparat yang diwarnai eosin dicuci di air yang mengalir dan

dikeringkan. Preparat direndam sebanyak 10 kali dalam alkohol 95% dan alcohol absolut selama 2 menit. Kemudian ke dalam xylol 1 selama 1 menit dan xylol 2 selama 2 menit. Preparat kemudian diteteskan dengan perekat permount dan ditutup dengan kaca penutup dan selanjutnya di periksa di bawah mikroskop.

Pemeriksaan preparat histopatologi masing masing organ dilakukan secara lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400x. perubahan histopatologi dalam bentuk inflamasi, nekrosis, degenerasi dan hemoragi sel.

3.9 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan perubahan histopatologi dilihat dari inflamasi, nekrosis, degenerasi, dan hemoragi sel. Penilaian dilakukan dengan menggunakan system penilaian semi kuantitatif dari 0 sampai 4 sebagai berikut : (0) tidak ada; minimal (1);ringan (2);sedang (3); berat (4); sangat berat.

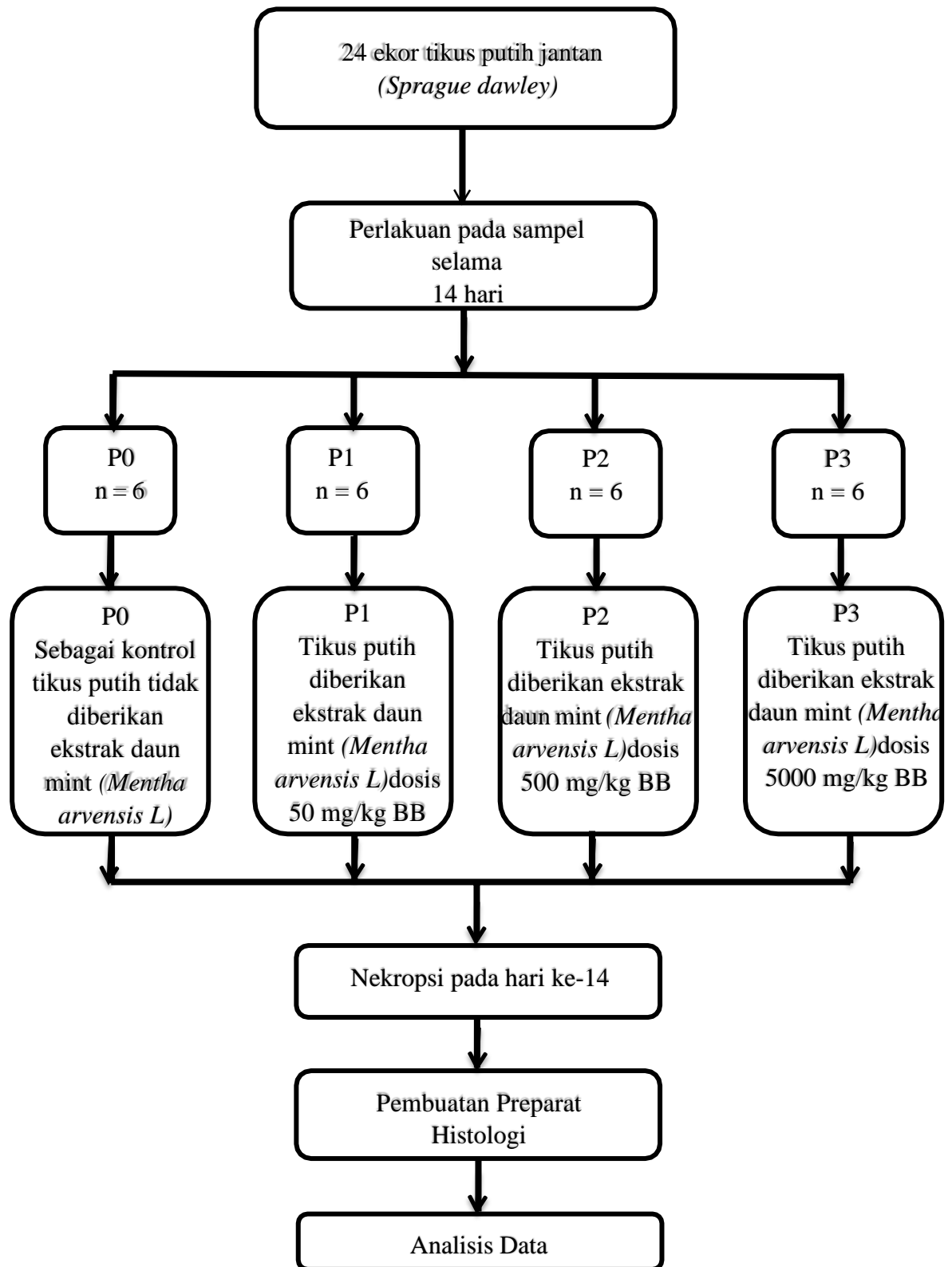
Tabel 3.1 skoring Penilaian Histopatologi

	Tidak ada perubahan
Skor 1	Perubahan sel antara 1-25% dari seluruh (LP)
Skor 2	Perubahan antara 26-50% dari seluruh (LP)
Skor 3	Perubahan antara 51-75% dari seluruh (LP)
Skor 4	Perubahan antara 76-100% dari seluruh (LP)

(Prakoso *et al.*, 2018).

LP (Lapang Pandang)

3.9 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.1.1 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis* untuk membandingkan antar perlakuan dari masing-masing sampel dan pengamatan. Jika ditemukan hasil yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan.

