

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di : Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Desember 2023 - Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain boks papar asap rokok berukuran 40 x 25 x 20 cm dengan dua lubang, untuk memasukkan rokok ke dalam kandang dan sebagai ventilasi, kandang tikus, gunting bedah, scalpel, pinset, sonde, pipet, pot organ, tempat minum, tempat makan hewan, timbangan digital, alat tulis, label penomoran, *smoking pump*, masker, *glove*, *tissue*, kasa steril, *object glass*, *cover glass*, corong *buchner*, *cool box*, kapas, alcohol, mikroskop, ekstraktor *batch*, *termostat*, *waterbath*, evaporator vakum, kertas saring, korek, api bunsen, mikrotom.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: rokok kretek panjang 120 mm dengan diameter 10 mm, alcohol 70 %, NaCl 0.9%, formalin 10%, ketamin, blok paraffin, pewarna *hematoxylin* dan *eosin* (HE). Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak buah mengkudu antara lain: buah mengkudu, etanol pro analisis 96 %, aquadest steril.

3.2.3 Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus *Wistar*, dengan jenis kelamin jantan, kondisi yang sehat dan aktif, berumur 2-3 bulan, mempunyai berat badan berkisar ± 300 gr yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Kemudian tikus diadaptasikan kurang lebih tujuh hari, pemeliharaan tikus harus menjaga kebersihan dan pemberian pakan berupa pur dan air minum.

3.2.4 Sampel Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan yang berumur 2- 3 bulan dengan berat ± 300 gram. Besar sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer , (n) adalah jumlah subjek untuk tiap perlakuan dan (t) adalah jumlah perlakuan.

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18 \quad n \geq 18/3$$

$$n=6$$

Berdasarkan perhitungan di atas, bahwa jumlah subjek yang akan dipakai dalam penelitian adalah 6 ekor tikus *Wistar* jantan untuk tiap kelompoknya. Secara keseluruhan membutuhkan subjek sebanyak 24 ekor tikus *Wistar* jantan.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimentallaboratorik dengan menggunakan hewan coba tikus *Wistar* jantan.

3.3.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Buah mengkudu yang digunakan adalah buah mengkudu pascapanen, berwarna putih kekuningan merata, dan daging buah masih keras. Pembuatan ekstrak buah mengkudu dilakukan dengan menimbang serbuk buah mengkudu sebanyak 15 gram. Kemudian dilakukan pembasahan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 15 mL. Dimasukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam. Pelarut yang ditambahkan sebanyak 150 ml. Kemudian toples ditutup dengan rapat selama 24 jam dan dishaker di atas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm. Dilakukan penyaringan ekstrak cair dengan penyaring kain dan tampung ekstrak dalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair pertama diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 30 menit. Kemudian ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/ diuapkan diatas *water bath* selama 2 jam. Dari 15 gram serbuk buah mengkudu yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 150 mL dihasilkan ekstrak cair sebanyak 10 mL. Kemudian ekstrak yang didapat dilatutkan kembali dengan pelarut *Carboxymethyl Cellulose* (CMCNa) 0,1% untuk memudahkan saat proses pemberian ekstrak saat terapi. Sebanyak 0,1 gram CMCNa dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah aquades sampai volume 100 mL, kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* (Dewi, 2010).

3.3.3 Perlakuan Paparan Asap Rokok dan Ekstrak Buah Mengkudu

Berdasarkan penelitian Murray (2000), dosis aman buah mengkudu pada manusia adalah 500-1000 mg/kg bb. Faktor konversi dari manusia ke tikus dengan berat badan manusia 70 kg dan berat badan tikus 200 g adalah 0,018 mg. Jadi, hasil yang didapatkan yaitu 45-90 mg/kg bb. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis 50mg/kg bb dan 75 mg/kg bb sebagai dosis eksperimental untuk terapi pada tikus yang dipapari asap rokok. Perlakuan yang dilakukan oleh penulis adalah :

1. Kelompok 1 (K-) tanpa perlakuan hanya diberi pakan dan minum.
2. Kelompok 2 (K+) dipapari asap rokok.
3. Kelompok 3 (P1) dipapar asap rokok dan diberi 50mg/kg bb ekstrak buah mengkudu.
4. Kelompok 4 (P2) dipapar asap rokok dan diberi 75mg/kg bb ekstrak buah mengkudu.

Pemberian ekstrak buah mengkudu dilakukan satu jam sebelum pemaparan asap rokok dan diberikan per oral. Pemaparan asap rokok menggunakan satu batang rokok per ekor per hari. Semua perlakuan dilakukan selama 14 hari dan dilakukan euthanasia pada hari ke-15 (Hermawan, 2016).

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Pemberian ekstrak buah mengkudu dan paparan asap rokok.
2. Variable terikat: Gambaran histopatologi Hemoragi, Nekrosis, Infiltrasi sel radang pada organ trakea tikus yang diberi asap rokok dengan ekstrak buah mengkudu.

3. Variabel terkendali: Galur tikus, umur dan berat badan, jenis kelamin, pakan, air minum.

3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan asumsi semua perlakuan dikondisikan sama dari mulai pengambilan persiapan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium. Sampel tikus sebanyak 24 ekor dibagi dalam 4 kelompok secara acak, masing-masing kelompok 6 ekor. Cara melakukan random atau acak dilakukan dengan pengundian.

Pertama buat kertas undian yang berisi nomor 1 sampai 24, dan beri tanda nomor 1 sampai 24 pada tubuh tikus. Buat kertas undian untuk kelompok perlakuan nomor 1 sampai 4. Kertas undian yang berisi nomor 1 sampai 24 diacak, lalu ambil tikus sesuai nomor yang tertera pada kertas undian yang telah diambil. Lalu ambil kertas undian kelompok perlakuan untuk dimasukkan kedalam kelompok yang tertera pada kertas.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Preparat Histopatologi

Hari ke-15 dilakukan pembedahan untuk diambil sampel trakea, kemudian dibersihkan dengan NaCl 0,9% dan difiksasi dengan larutan formalin buffer 10% kedalam pot organ, kemudian dibuat preparat histopatologi trakea pewarnaan HE dengan proses *dehydration, clearing, infiltrasi, embedding, sectioning* dan *staining* untuk pemeriksaan secara mikroskopik. Organ direndam ke dalam *netral buffer formalin* 10% kira-kira $15-20 \times$ volume jaringan dan dibiarkan dalam suhu

kamar selama 24 jam. Selanjutnya jaringan dipotong dengan ukuran $1 \times 1 \times 1$ cm, kemudian dimasukkan dalam *cassette* jaringan. Setelah jaringan selesai difiksasi dan dimasukkan dalam *cassette*, jaringan dipindahkan untuk dehidrasi dengan alkohol secara berturut-turut dengan konsentrasi alkohol 70%, 80%, 90%, 96% dengan lamanya waktu masing-masing perendaman adalah 2 jam.

Tahap selanjutnya adalah *clearing* yaitu dilakukan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dengan merendam jaringan dalam *xylene*. Kemudian, keluarkan jaringan dari *cassette*. Setelah itu jaringan siap untuk dimasukkan ke dalam blok parafin. Selanjutnya dilakukan *embedding* atau impregnasi dan *blocking*, organ ditanam pada blok yang telah disediakan kemudian disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Setelah itu organ dipotong (*cutting*) dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 mikron.

Proses selanjutnya adalah organ diwarnai dengan pewarnaan *Harris-Hematoksin-Eosin*. Preparat diparafinisasi dalam *xylol* selama 3×5 menit. Kemudian di dehidrasi dalam larutan alkohol 100% sebanyak 2 kali dengan durasi masing-masing 5 menit, bilas dengan aquades selama 1 menit. Lalu diinkubasikan dalam larutan *Harris Hematoksillin* selama 15 menit. Kemudian dicelupkan naik turun dalam aquades selama 1 menit, selanjutnya celup dalam campuran asam- alkohol secara cepat 5-7 celup. Cek diferensiasi warna di atas mikroskop, warna tidak boleh sampai pucat. Selanjutnya dibilas dalam aquades selama 1 menit, dan bilas kembali dengan aquades selama 15 menit. Lalu dicelup sebanyak 3-5 kali dalam 17 larutan ammonium atau lithium karbonat hingga potongan berwarna birucerah dan kemudian cuci dalam air mengalir selama 15

menit. Kemudian diinkubasi dalam *Eosin* selama 2 menit Selanjutnya didehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi 96%, 96%, 100%, dan 100%, masing-masing selama 3 menit, lalu diinkubasi dalam xylol selama 2×2 menit. Kemudian dilakukan proses mounting yaitu penutupan preparat dengan *cover glass* dimana digunakan permount dipakai sebagai perekat (Kiernan, 2015).

3.6.2 Skoring Histopatologi

Pemeriksaan preparat histopatologi trakea menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Pengamatan pada lima lapang pandang berbeda dan dicatat perubahan mikroskopis berdasarkan parameter degenerasi sel, nekrosis, ketebalan mukosa. Kemudian menghitung jumlah sel yang nekrosis lalu dirata-rata (Muliarta, *et al.*, 2009). Adapun perubahan pada trakea yang diamati kemudian diskoring (Pinem, *et al.*, 2016).

Skor	Hemoragi	Keterangan
0	Jika tidak teramati hemoragi	Normal
3	Jika terjadi hemoragi <10% dari seluruh lapang pandang	Ringan
5	Jika terjadi hemoragi 11-50% dari seluruh lapang pandang	Sedang
10	Jika terjadi hemoragi >50% dari seluruh lapang pandang	Berat

Tabel 3. 1 Skoring Hemoragi (Solfaine, 2019).

Skor	Nekrosis	Keterangan
0	Skor Jika tidak ditemukan adanya perubahan lesi sel nekrosis	Normal
1	Jika ditemukan jumlah sel nekrosis sebanyak <25% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Ringan
2	Jika ditemukan jumlah sel nekrosis sebanyak 26-70% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Sedang
3	Jika ditemukan jumlah sel nekrosis sebanyak 71-100% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Berat

Tabel 3. 2 Skoring Nekrosis (Solfaine, 2019)

Skor	Infiltrasi sel radang	Keterangan
0	Tidak ada lesi/ perubahan sel radang	Normal
1	Jika ditemukan adanya jumlah sel radang sebanyak <33% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Ringan
2	Jika ditemukan adanya jumlah sel radang sebanyak 34-66% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Sedang
3	Jika ditemukan adanya jumlah sel radang sebanyak 67-100% dari seluruh LP (Lapang Pandang)	Berat

Tabel 3. 3 Skoring Infiltrasi Sel Radang (Baris, *et al.*, 2016)

3.7 Kerangka Penelitian



3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji data non parametrik *Kruskal Wallis Test* dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) untuk mengetahui adanya perbedaan pada kelompok perlakuan. Jika ada pengaruh yang signifikan, uji *Mann-Whitney* dilakukan dengan rancangan acak lengkap.