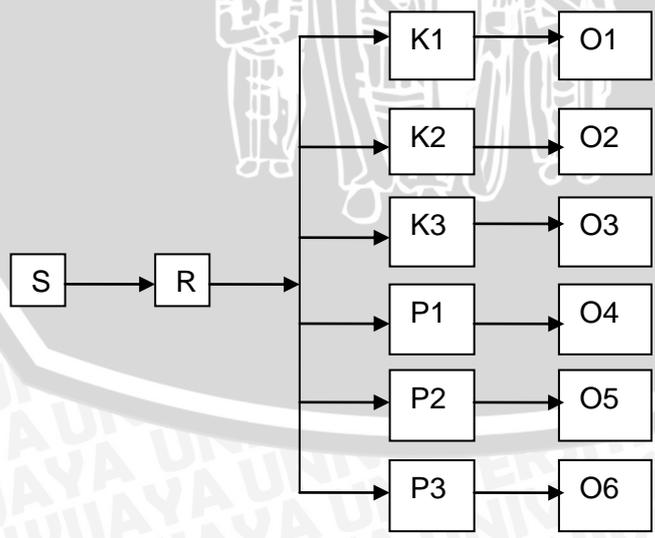


**BAB IV**  
**METODE PENELITIAN**

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan eksperimental murni (*pure experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo*. Dipilih cara ini karena memiliki sampel dan perlakuan bisa terkendali, terukur, dan pengaruh dapat dipercaya (Notoatmodjo, 2002). Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* (rancangan secara acak dengan hanya melihat tes akhir kelompok kontrol). Rancangan ini memiliki ciri terdapat 2 kelompok yakni eksperimental (diberi perlakuan) dan kontrol negatif (tidak diberi perlakuan) yang ditentukan secara acak. Kemudian eksperimen dianalisis dengan uji beda untuk melihat perbedaan signifikan antara 2 kelompok (Sugiono, 2010).

**4.2 Desain Penelitian**



Gambar 4.1 Desain penelitian *randomized post-test only control group design*



**Keterangan:**

- S : sampel  
R : randomisasi  
K1 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 3 hari  
K2 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 5 hari  
K3 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 7 hari  
P1 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 3 hari  
P2 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 5 hari  
P3 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 7 hari  
O1 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 3 hari  
O2 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 5 hari  
O3 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak cacing tanah selama 7 hari  
O4 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 3 hari  
O5 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 5 hari  
O6 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 7 hari

**4.3 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang berumur 10 minggu dengan berat 250-300 gram.

Pada penelitian ini, tikus akan dibagi dalam 6 kelompok, yaitu 3 kontrol negatif dan 3 eksperimen. Jumlah pengulangan penelitian dihitung memakai rumus *Federer* sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) \geq 15 ; \text{ dengan}$$

t= jumlah kelompok

n= jumlah pengulangan penelitian

Pada penelitian ini  $t= 6$ , sehingga jumlah pengulangan penelitian adalah:

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Pada penelitian digunakan minimal 4 tikus putih untuk setiap kelompok, sehingga jika dibagi 6 kelompok perlakuan, tikus yang dibutuhkan sebanyak 24 ekor. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus putih mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih.

Kriteria inklusi

1. Berjenis kelamin jantan
2. Berat badan 250-300 gram
3. Berusia 10 minggu
4. Kondisi sehat dengan ciri-ciri: gerakan yang aktif, mata jernih, bulu tebal, berwarna putih mengkilap, serta tidak ada kelainan anatomik

Kriteria eksklusi

1. Tikus mengalami penurunan berat badan secara drastis pada saat perlakuan berlangsung
2. Tikus mati selama perlakuan berlangsung
3. Tikus tampak sakit

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel bebas

Gel ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*).

##### 4.4.2 Variabel terikat

Jumlah makrofag pada daerah luka.

#### 4.4.3 Variabel kontrol

Variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti antara lain nutrisi yang diberikan pada hewan coba, makanan, minuman, jenis hewan coba, berat badan, umur hewan coba, dan tempat pemeliharaan hewan coba, teknik pembuatan ulkus.

#### 4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian selama  $\pm$  3 bulan dimulai dari bulan Agustus-November 2015.

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.6.1 Bahan dan Alat untuk Ulserasi

Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur wistar umur 10 minggu dengan berat badan 250-300 gram, *Chloretil*, semen stopper dengan diameter  $\pm$  3 mm, bunsen dan spirtus, korek api, *tip applicator*, masker, handscoon.

##### 4.6.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Blender, saringan, timbangan: Neraca Ohaus merk Sartorius, baker glass, toples, water bath, rotary evaporator, shaker, erlenmeyer, *etanol* 70%, kertas saring *whatman* no.40, aquadest, masker, handscoon.

##### 4.6.3 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Gel Ekstrak Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) konsentrasi 100%, carbomer 934 3%, metyl paraben, propilenglikol, NaOH, aquades, gelas ukur,

film, pipet, sendok, kaca arloji, baker glass, batang pengaduk, stamper dan mortir, botol semprot, neraca ohaus, masker, handscoon.

#### 4.6.4 Bahan dan Alat Perlakuan

Tikus putih jantan (*Rattus novvergicus*) umur 10 minggu dengan berat badan 250-300 gram, diberi luka berupa trauma termal sehingga terbentuk ulserasi pada mukosa labial bawahnya, ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*), aquadest, cotton bud, masker, handscoon.

#### 4.6.5 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Scalpel, mikrotom, automatic tissue tex prosesor, kaca objek dan penutup, kaset, paraffin blok, formalin 10%, amonia air, xylo, kuas kecil, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, pewarna *Hematoxylin* dan *Eosin*.

### 4.7 Definisi Operasional

#### 4.7.1 Ulkus Traumatik

Ulkus pada penelitian ini dibuat dengan menempelkan ujung permukaan semen stopper yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus pada bunsen ke mukosa labial bawah tikus selama  $\pm 4$  detik tanpa penekanan. Ulkus traumatik mukosa mulut yang terbentuk ditandai dengan munculnya lesi berupa bercak putih kekuningan, berbentuk bulat atau oval, dengan diameter  $\pm 4$  mm, dan dikelilingi oleh pinggiran yang kemerahan.

#### 4.7.2 Gel Ekstrak Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Ekstrak cacing tanah dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak cacing tanah sebesar 100%. Hasil yang didapat berupa cairan. Agar dapat menempel dengan baik dalam mukosa mulut maka ekstrak tersebut dibuat dalam sediaan gel

menggunakan basis carbomer. Gel ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) diaplikasikan menggunakan *cotton bud* pada daerah ulser 2 kali sehari. Cacing tanah diperoleh di pasar hewan Splendid Kota Malang yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan Jurusan Biologi FMIPA UB.

#### 4.7.3 Jumlah Makrofag

Penghitungan jumlah makrofag adalah penghitungan banyaknya makrofag pada preparat eksisi biopsi jaringan ulser pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 pasca ulserasi, dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Diamati sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OLYVIA (*Vierwer for Imaging Application*) dengan pembesaran 20 kali tiap lapang pandang. Gambaran pada pewarnaan HE makrofag tampak besar, berbentuk oval, umumnya memiliki inti bulat atau berbentuk ginjal yang berwarna keunguan. Inti sel lebih kecil dan lebih heterokromatik dari inti fibroblas dan hanya memiliki beberapa granula.

### 4.8 Prosedur Penelitian

#### 4.8.1 Alur Penelitian

Pada penelitian ini akan dibuat ekstrak cacing tanah konsentrasi 100 mg/ml dengan cara maserasi kemudian agar bisa meresap ke dalam mukosa mulut, ekstrak dibuat dalam sediaan gel. Pada hewan coba akan dilakukan adaptasi selama 7 hari, dirawat dalam kandang serta suasana yang baik dan bersih, diberi pakan dan minum. Kemudian dilakukan prosedur pembentukan luka pada mukosa labial bawah hewan coba, mengelompokkan perlakuan hewan coba dan sampel, pemberian pakan dan aquades pada kelompok kontrol, serta

pemberian pakan, aquades dan ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) pada kelompok eksperimen dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

Hewan coba akan dikelompokkan dalam kandang yang sudah diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada 8 hewan coba yakni 4 tikus kelompok kontrol negatif dan 4 tikus kelompok perlakuan (eksperimen) pada setiap *time series* yaitu pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7. Selanjutnya, dilakukan pembuatan preparat, perhitungan jumlah makrofag, analisis data, dan pembuatan kesimpulan.

#### 4.8.2 Perawatan Hewan Coba

Tikus *Rattus novergicus* dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara dengan suhu ruangan 18°C - 27°C, ventilasi kandang terjaga dengan baik. Satu kandang berisi 2 ekor tikus, pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badan/hari) dan minum serta setiap 2 hari sekali dilakukan penggantian sekam (Smith JB dan Mangkoewidjojo, 2000; Fitzpatrick A, 2003).

#### 4.8.3 Ulserasi pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Sebelum diulserasi, tikus dianestesi lokal menggunakan *Chloretil* terlebih dahulu agar tidak merasakan sakit. Pembentukan ulserasi dalam penelitian ini dibutuhkan hingga menembus lamina propria pada mukosa labial bawah tikus putih (*Rattus novergicus*). Kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan dilukai atau dilakukan ulserasi dengan meletakkan permukaan ujung semen stoper yang telah dipanaskan dengan api dari bunsen selama 10 detik ke mukosa labial bawah tikus tanpa penekanan selama  $\pm 4$  detik sehingga terbentuk ulkus dengan diameter  $\pm 4$  mm.

#### **4.8.4 Pembuatan Ekstrak Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*) konsentrasi 100%**

Cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) segar sebanyak 500 gram ditimbang dan diblender, kemudian dilakukan pembasahan bahan dengan pelarut etanol 70%, bahan yang telah diblender dimasukkan dalam toples lalu ditambahkan pelarut sebanyak 500 ml. Toples ditutup dan dibiarkan selama  $\pm$  24 jam, kemudian dicampur diatas shaker digital 50 rpm. Setelah tercampur, ekstrak cair disaring menggunakan penyaring kain lalu ditampung dalam erlenmeyer. Selanjutnya dilakukan remaserasi pada ampas dengan cara dimasukkan kembali dalam toples dan ditambahkan pelarut sebanyak 500 ml sampai bahan yang diekstrak terendam (minimal 5 cm diatas permukaan bahan yang diekstrak), kemudian dibiarkan selama 24 jam lalu dishaker. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Proses ini membutuhkan waktu selama 2 jam, yakni 1 jam 15 menit untuk menguapkan pelarut dan 45 menit untuk menghilangkan kandungan air. Setelah dipastikan evaporasi selesai menggunakan mesin rotary, ekstrak diuapkan lagi menggunakan menggunakan water bath selama 1 jam.

#### **4.8.5 Pembuatan Gel Ekstrak Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*) konsentrasi 100%**

Ekstrak cacing tanah sebanyak 2,7 gram ditampung dalam sebuah bejana dan dihomogenkan. Metilparaben 0,054 gram dilarutkan kedalam propilenglikol 5,01 gram kemudian *carbomer* 934 3% sebanyak 0,9 gram ditambahkan pada campuran sambil terus diaduk dengan cepat hingga terbentuk sediaan yang liat (gel), lalu disimpan pada temperatur kamar selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan gel ekstrak cacing tanah dan pH diatur sampai mendekati 7 dengan penambahan NaOH 1% sebanyak 12,336 ml. *Aquadest*

ditambahkan sampai volume 30 ml, kemudian dimasukkan dalam *tube*. Fungsi propilen glikol adalah sebagai humektan (Rowe et al, 2012).

Komposisi	Jumlah
Ekstrak cacing tanah ( <i>Pheretima aspergillum</i> )	2,7 gram
Carbomer 934 3%	0,9 gram
Metyl paraben	0,054 gram
Propilenglikol	5,01 gram
NaOH	12,336ml
Auades	30 ml

Tabel 4.1 : Tabel Komposisi Gel Ekstrak Cacing Tanah(Rowe et al, 2012).

#### 4.8.6 Pembedahan dan Sanitasi Hewan Coba

Pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7, hewan coba dibunuh dengan cara mematahkan tulang leher. Semua sisa organ tikus yang sudah tidak terpakai dikumpulkan lalu dikubur dengan baik (Fitzpatrick A, 2003).

#### 4.8.7 Prosedur Eksisi-Biopsi

Pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 pasca perlakuan, semua tikus putih pada keenam kelompok dibunuh dengan mematahkan tulang leher hewan coba, kemudian jaringan ulser dieksisi kemudian dimasukkan dalam formalin 10%.

#### 4.8.8 Prosedur Pembuatan Preparat

##### A. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Gross/sampel jaringan hasil bedah dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% (fiksasi) semalam.
2. Untuk jaringan keras (tulang dan gigi) dilakukan dekalsifikasi (pengembukan) 15 s/d 20 hari menggunakan EDTA.

3. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti.
4. Jaringan dipotong kurang lebih kedalaman 2-3 mm.
5. Jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti.
6. Kaset dicuci dengan air mengalir sebelum dilakukan proses jaringan/dimasukkan ke alat *Tissue Tex Prosesor*.
7. Kaset diproses menggunakan alat mesin *Automatic Tissue Tex Prosesor* (*automatic processing*).
8. Alarm bunyi tanda selesai.

#### **B. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan**

1. Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*.
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan.
3. Jaringan dipotong dengan alat *Microtome* ketebalan 3-5 mikron.

#### **C. Proses Deparafinisasi**

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, kemudian diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80<sup>0</sup> C, lalu masukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi) dan yang terakhir dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.

#### **D. Proses Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*/Auto Stanning**

- |                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| 1. Cat utama Harris Hematoksilin | 10-15 menit |
| 2. Cuci dengan air mengalir      | 15 menit    |
| 3. Alkohol asam 1%               | 2-5 celup   |
| 4. Amonia air                    | 3-5 celup   |
| 5. Cat pembanding Eosin 1%       | 10-15 menit |

**a) Dehidrasi**

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| 1. Alkohol 70%     | 3 menit |
| 2. Alkohol 80%     | 3 menit |
| 3. Alkohol 96%     | 3 menit |
| 4. Alkohol Absolut | 3 menit |

**b) Penjernihan**

- |          |          |
|----------|----------|
| 1. Xylol | 60 menit |
| 2. Xylol | 60 menit |

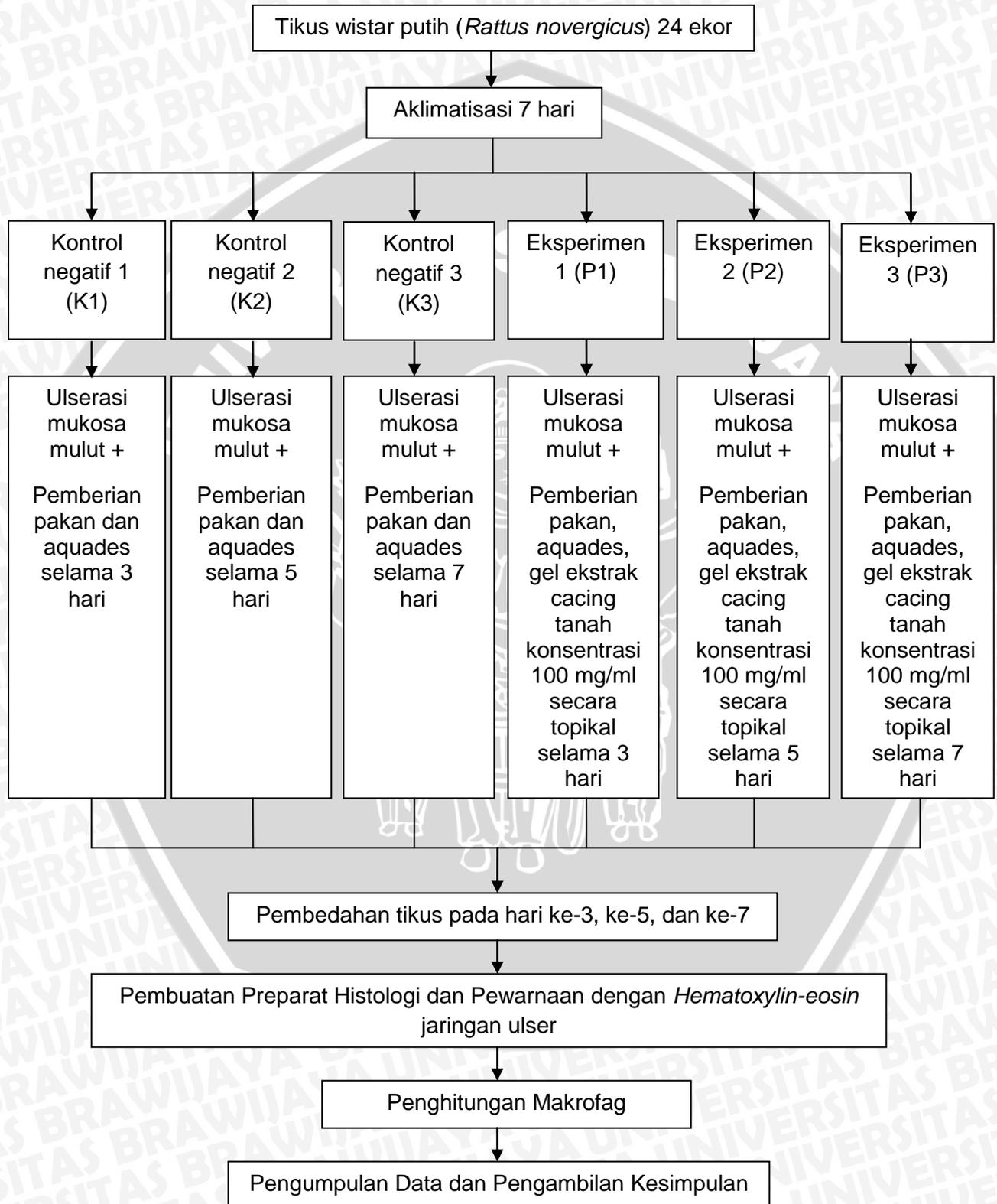
**c) Mounting dengan entelan dan coverglass**

1. Biarkan slide kering pada suhu ruangan.
2. Setelah slide kering siap kering siap untuk diamati.

**4.9 Prosedur Pengumpulan Data**

Data diperoleh dari hasil perhitungan jumlah makrofag pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-3 ke-5, dan ke-7 pasca ulserasi pada kelompok yang diberi perlakuan maupun yang tidak diberi perlakuan memakai pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Pengamatan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OLYVIA (*Viewer for Imaging Application*) dengan pembesaran 20 kali tiap lapang pandang.

#### 4.10 Kerangka Operasional Penelitian



#### 4.11 Analisis Data

Data yang dimiliki peneliti berupa data kualitatif (berdasarkan gambaran klinis) dan data kuantitatif (menggunakan statistik). Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal ( $signifikansi > 0,05$ ) dan varian data homogen ( $p > 0,05$ ), maka digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya. Uji *One Way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel makrofag antara kontrol negatif (K1, K2, K3) dengan perlakuan (P1, P2, P3) pada proses penyembuhan ulser mukosa mulut tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi termal. Apabila data berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One Way Anova* atau uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*.

Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk menunjukkan apakah ada pengaruh pemberian gel ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) secara topikal dengan jumlah makrofag pada proses penyembuhan ulkus karena trauma termal. Untuk mengetahui kekuatan hubungan dari kedua variabel dilakukan uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal atau *Spearman* jika data berdistribusi tidak normal. Jika berdasarkan uji korelasi *Pearson* didapatkan pengaruh antara lamanya hari dengan jumlah sel maka perlu dilakukan uji regresi untuk mengetahui seberapa besar pengaruh kekuatan gel ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) terhadap proses penyembuhan ulkus traumatik tersebut.