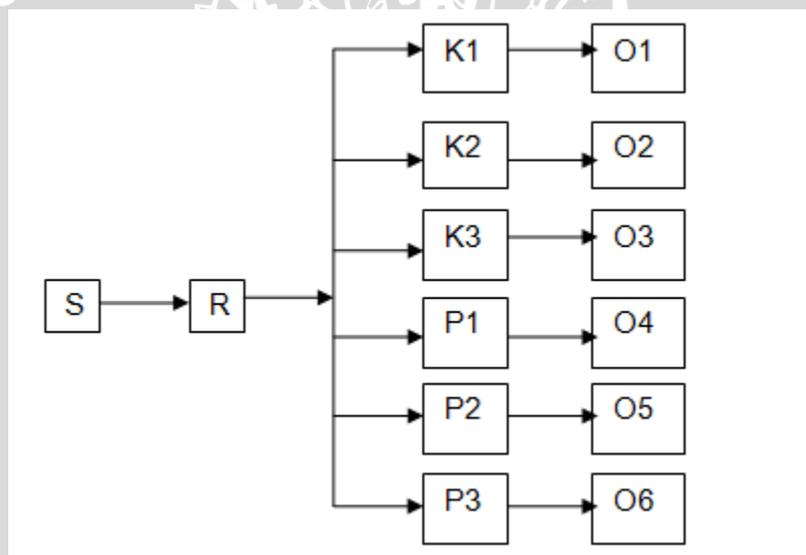


BAB IV  
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Randomized Control Group Design*” di laboratorium secara in-vivo untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) terhadap jumlah fibroblas dalam proses penyembuhan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*).



Gambar 4.1 Desain Penelitian *Randomized Post-Test Only Control Group*

Keterangan:

- S : sampel
- R : randomisasi
- K1 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 3 Hari
- K2 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 5 hari

- K3 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 7 hari
- P1 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 3 hari
- P2 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 5 hari
- P3 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 7 hari
- O1 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 3 hari
- O2 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 5 hari
- O3 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak etanol cacing tanah selama 7 hari
- O4 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 3 hari
- O5 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 5 hari
- O6 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100% selama 7 hari

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih dengan sekam yang diganti setiap hari. Sampel penelitian ini dipilih berdasarkan ketentuan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

Kriteria Inklusi :

1. Tikus putih *strain* wistar
2. Berjenis kelamin jantan
3. Belum pernah digunakan untuk penelitian
4. Umur 10 minggu
5. Berat badan 250-300 gram

Kriteria Ekslusi :

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

Dalam penelitian ini, tikus putih akan dibagi menjadi 6 kelompok yaitu, 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

Jumlah pengulangan penelitian dihitung menggunakan rumus *Federer* adalah 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 ini digunakan minimal 4 tikus putih untuk tiap kelompoknya, sehingga jika dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dibutuhkan 24 ekor tikus putih.

Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 variabel, yaitu:

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima Aspergillum*).

#### 4.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah jumlah sel fibroblas.

#### 4.3.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol terdiri dari nutrisi makanan hewan coba, minuman hewan coba, kebersihan kandang hewan coba, jenis hewan coba, umur hewan coba, dan berat badan hewan coba.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu  $\pm$  3 bulan.

#### 4.5 Bahan dan Alat untuk Penelitian

##### 4.5.1 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.

##### 4.5.2 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.

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

Ekstrak etanol 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.

#### 4.5.4 Bahan dan Alat Perlakuan

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

#### 4.5.5 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*.

### 4.6 Definisi Operasional

#### 1. Ulkus Traumatik

Ulkus pada penelitian ini dibuat dengan menempelkan ujung permukaan *cement stopper* yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus pada bunsen selama  $\pm 10$  detik kemudian diaplikasikan ke mukosa labial bawah tikus selama  $\pm 4$  detik tanpa penekanan. Ulkus traumatik mukosa labial yang terbentuk secara makroskopis ditandai dengan munculnya lesi berupa bercak putih kekuningan, berbentuk bulat atau oval, dengan diameter  $\pm 4$  mm, dan dikelilingi oleh pinggiran yang kemerahan.

#### 2. Gel Ekstrak Etanol Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Gel ekstrak etanol cacing tanah dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak cacing tanah sebesar 100%. Ekstrak tersebut dibuat dalam sediaan gel menggunakan basis carbomer. Cacing tanah diperoleh di pasar hewan Splendid Kota Malang yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan Jurusan Biologi FMIPA UB.

### 3. Jumlah Fibroblas

Penghitungan jumlah fibroblas adalah penghitungan banyaknya fibroblas 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 20x tiap lapang pandang. Gambaran pada pewarnaan HE didapatkan gambaran fibroblas dengan bentuk gelendong atau fusiform. Intinya lonjong dan memanjang dan diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti jelas dan sedikit granula kromatin halus.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Alur Penelitian

Pada penelitian ini akan dibuat ekstrak cacing tanah konsentrasi 100% 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 gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) pada

kelompok perlakuan 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 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 fibroblas, analisis data, dan pembuatan kesimpulan.

#### 4.7.2 Perawatan Hewan Coba

Tikus *Rattus norvegicus* 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).

#### 4.7.3 Ulserasi pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Sebelum diulserasi, tikus dianestesi lokal menggunakan *Chlorethyl* terlebih dahulu agar tidak merasakan sakit. Pembentukan ulserasi dalam penelitian ini dibutuhkan hingga menembus lamina propria pada mukosa labial bawah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dilukai atau dilakukan ulserasi dengan meletakkan permukaan ujung *cement stopper* 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.

#### 4.7.4 Pembuatan Ekstrak Etanol 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.

#### **4.7.5 Pembuatan Gel Ekstrak Etanol 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).

#### 4.7.6 Pembedahan dan Sanitasi Hewan Coba

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

#### 4.7.7 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%.

#### 4.7.8 Prosedur Pembuatan Preparat

##### a) Fiksasi

Pada tahap fiksasi, dilakukan perendaman jaringan ulser pada larutan formalin 10% selama 18-24 jam. Kemudian jaringan dicuci dengan aquadest selama 15 menit.

##### b) *Embedding*

Jaringan ulser dimasukkan pada beberapa cairan yaitu *acetone* selama 1 jam x 3, *xylol* selama ½ jam x 3, *paraffin* cair selama 1 x 3 dan penanaman jaringan ulser pada *paraffin* blok.

##### c) *Slicing*

Blok yang sudah ditanami jaringan ulser diletakkan pada blok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram mikrotom rotary* kemudian sayat jaringan ulser secara vertikal dengan ukuran 4 mikron. Sayatan jaringan ulser yang berbentuk pita diambil dengan menggunakan kuas kecil, kemudian letakkan pada *water bath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C. Setelah sayatan jaringan ulser merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam.

##### d) *Staining*

*Object glass* dimasukkan dalam *Xylol* selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Haematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. *Object glass* dimasukkan pada *Lithium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan

pada pewarna *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *Xylo* selama 15 menit x 3. Dan yang terakhir, preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan*. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop.

#### 4.7.9 Penghitungan Jumlah Sel Fibroblas pada Daerah Luka dan Persentase Penyembuhan Luka

Jumlah sel fibroblas pada daerah luka dapat dihitung dalam beberapa lapangan pandang dengan menggunakan mikroskop. Sementara, presentase percepatan penyembuhan luka didapatkan dari perbandingan antara hitungan hari dan jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

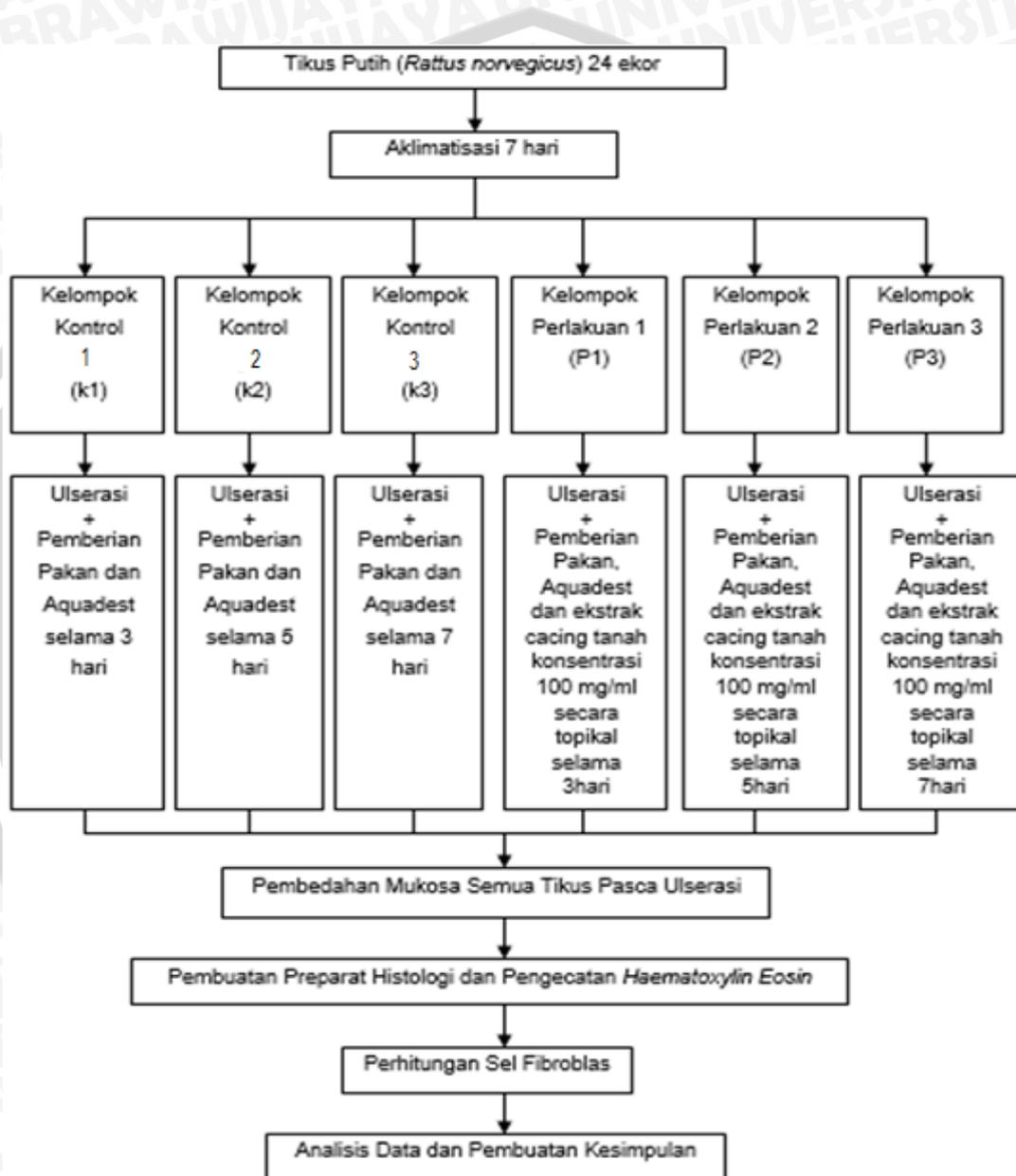
#### 4.8 Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu, 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 fibroblas antara kontrol negatif (K1,K2,K3) dengan eksperimen (P1,P2,P3) pada proses penyembuhan ulkus 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 ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) dengan konsentrasi 100% secara topikal dengan jumlah fibroblas pada proses penyembuhan ulkus traumatik. Untuk mengetahui kekuatan hubungan dari kedua

variabel dilakukan uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal atau *Spearman* jika data berdistribusi tidak normal.

#### 4.9 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Prosedur Penelitian