

## BAB IV

## METODE PENELITIAN

**1.1. Rancangan dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan rancangan penelitian "*Post Test Only Randomized Control Group Design*" di laboratorium secara *invivo* untuk mengetahui pengaruh gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) terhadap jumlah makrofag pada proses penyembuhan ulser traumatik tikus putih (*Rattus norvegicus*).

**1.2. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang berumur 3 bulan dengan berat 180-200 gram.

Jumlah tikus putih tiap kelompok menggunakan rumus *Federer* adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

t : jumlah kelompok, n : jumlah pengulangan penelitian (Dewi, 2010).

Pada penelitian ini, t=3, sehingga jumlah tikus putih tiap kelompok adalah:

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

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Pada penelitian ini digunakan minimal 9 kali pengulangan penelitian. Penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 27 ekor tikus putih. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian, maka jumlah sample ditambah menjadi 30 ekor tikus putih. Jadi, akan ada 10 tikus putih pada setiap kelompok perlakuan.

Kriteria Inklusi :

1. Tikus putih (wistar) keturunan murni
2. Belum pernah digunakan untuk penelitian
3. Umur 3 bulan
4. Berat badan 180-200 gram.

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus sakit selama masa adaptasi 10 hari (tikus tidak bergerak aktif)
2. Tikus mati selama perlakuan berlangsung
3. Terlihat tanda-tanda infeksi disekitar luka

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik "*Simple Random Sampling*"

kemudian ditempatkan dalam 3 kelompok penelitian, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (K (-))

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi perlakuan traumatik pada mukosa labial rahang bawah dengan *sement stopper* yang dipanasi, kemudian tidak diberi perlakuan selama 4 hari.

2. Kelompok kontrol positif (K (+))

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi perlakuan traumatik pada mukosa labial rahang bawah dengan *sement stopper* yang dipanasi, kemudian diaplikasikan *Triamcinolone acetone* 0,1% 2 kali sehari selama 4 hari.

### 3. Kelompok perlakuan (P)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi perlakuan traumatik pada mukosa labial rahang bawah dengan *sement stopper* yang dipanasi, kemudian diaplikasikan gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) 2 kali sehari selama 4 hari.

### 1.3. Variabel Penelitian

#### 1.3.1. Variabel Bebas

Variabel penelitian ini adalah *Triamcinolone acetonide* 0,1 % dan gel lendir bekicot (*Achatina fulica*).

#### 1.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah makrofag.

#### 1.3.3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Genetik tikus
2. Jenis kelamin tikus
3. Umur tikus
4. Berat badan tikus
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi tikus
6. Kemungkinan adanya infeksi
7. Aplikasi gel lendir bekicot (*Achatina fulica*)

### 1.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari-Juli 2014.

## 1.5. Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

### 1.5.1. Bahan dan Alat untuk Ulserasi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram, *chlorethil*, *pinset*, *alcohol swabs*, *sement stopper*, *cotton roll*, *cotton pellet*, Bunsen, masker dan sarung tangan

### 1.5.2. Bahan dan Alat Untuk Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Bekicot (*Achatina fulica*), alkhohol 70 %, tabung steril, masker dan sarung tangan

### 1.5.3. Bahan dan Alat Pembuatan Gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Bejana, *metilparaben*, *propilenglikol*, *carbomer 934* 3%, NaOH 1%, *aquadest*, *tube*, masker dan sarung tangan

### 1.5.4. Bahan dan Alat Perlakuan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram dan terdapat ulser pada mukosa labial rahang bawah, gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*), *Triamcinolone acetone* 0,1 %, *cotton buds*, masker dan sarung tangan

### 1.5.5. Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

*Ether*, *scalpel*, mikrotom, kaca objek dan penutup, *paraffin* blok, *waterbath*, *timer*, formalin 10%, *acetone*, *xylol*, kuas kecil, getalin, alkohol 96%, pewarna *Hematoxylin* dan *Eosin*, *lithium carbonat*

## 1.6. Definisi Operasional

### 1.6.1. Gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) adalah gel yang berasal dari lendir yang diambil dari dalam cangkang bekicot yang telah disterilkan sebelumnya

dengan alkohol 70%. Gel lendir bekicot dibuat dengan cara, lendir bekicot 9 gram dicampur dengan *carbomer* 934 3% sebanyak 3 gram, *carbomer* 934 3% berfungsi sebagai *gelling agent*. Bekicot (*Achatina fulica*) diperoleh dari salah satu peternak bekicot di daerah Soekarno Hatta Malang, tidak ada kriteria khusus tentang umur dan berat bekicot yang digunakan.

### 1.6.2. Jumlah Makrofag

Penghitungan jumlah makrofag adalah penghitungan jumlah makrofag pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-5 pasca ulserasi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosinan* kemudian diamati sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OLYVIA (*Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 20 kali tiap lapang pandangnya.

## 1.7. Prosedur Penelitian

### 1.7.1. Ulserasi Pada Mukosa Labial Rahang Bawah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pertama, dilakukan adaptasi pada sejumlah tikus putih yang akan digunakan untuk penelitian dengan cara dikandangkan secara individual dan diberi pakan selama 10 hari. Setelah masa adaptasi 10 hari, diaplikasikan semen stopper yang ujungnya telah dipanasi dengan nyala api bunsen selama 10 detik pada mukosa labial rahang bawah tikus putih (*Rattus norvegicus*) untuk menciptakan ulser traumatik. Kemudian tikus dimasukkan ke dalam kandang yang telah diberi label kelompok.

- Kelompok kontrol negatif (K(-))
- Kelompok kontrol positif (K(+))
- Kelompok perlakuan (P)

### 1.7.2. Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Bekicot hidup dibersihkan dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Setelah itu cangkang bekicot disterilkan dengan alkohol 70%. Ujung cangkang dipecahkan kemudian lendir yang mengalir ditampung ke dalam wadah steril (Dewi, 2010).

### 1.7.3. Pembuatan Gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) dengan Carbomer 934 sebagai *Gelling Agent*

Lendir bekicot sebanyak 9 gram ditampung dalam sebuah bejana dan dihomogenkan. Metilparaben 0,18 gram dilarutkan kedalam propilenglikol 16,7 gram kemudian *carbomer* 934 3% sebanyak 3 gram ditambahkan pada campuran sambil terus diaduk dengan cepat hingga terbentuk sediaan yang liat (gel), lalu disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan lendir bekicot dan pH diatur sampai mendekati 7 dengan penambahan NaOH 1% sebanyak 10,58 ml. *Aquadest* ditambahkan sampai volume 100 ml, kemudian dimasukkan dalam *tube*. Fungsi propilen glikol adalah sebagai humektan (Sudjono, 2012).

Komposisi	Jumlah
Lendir Bekicot	9 gram
Carbomer 934 3%	3 gram
Metil paraben	0,18 gram
Propilenglikol	16,7 gram
NaOH qs pH 7	10,58 ml
Aquadest ad	100 ml

**Tabel 4.1 : Tabel Komposisi Gel Lendir Bekicot**  
(Sudjono, 2012).

#### 1.7.4. Pengaplikasian Gel Lendir Bekicot dan *Triamcinolone acetone* 0,1%

Setelah dilakukan pembuatan ulserasi, pada kelompok kontrol positif diberi perlakuan dengan pengaplikasian *Triamcinolone acetone* 0,1% pada ulser selama 2 kali sehari. Pada kelompok perlakuan, dilakukan aplikasi gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) pada ulser selama 2 kali sehari. Pada kelompok kontrol negatif, ulser pada tikus tidak diberi perlakuan.

#### 1.7.5. Pembuatan Preparat

##### 1. Prosedur Eksisi-biopsi

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, semua tikus putih pada ketiga kelompok dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether. Setelah tikus putih terbius kemudian pada jaringan ulser diusap dengan alkohol 70% lalu dibuat eksisi-biopsi.

##### 2. 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 *aceton* selama 1 jam x 4, *Xylo* selama ½ jam x 4, *paraffin* cair selama 1 jam x 3, dan penanaman jaringan kulit pada *paraffin* blok.

###### C. *Slicing*

Blok yang sudah tertanam jaringan ulser diletakkan pada balok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram microtom 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.

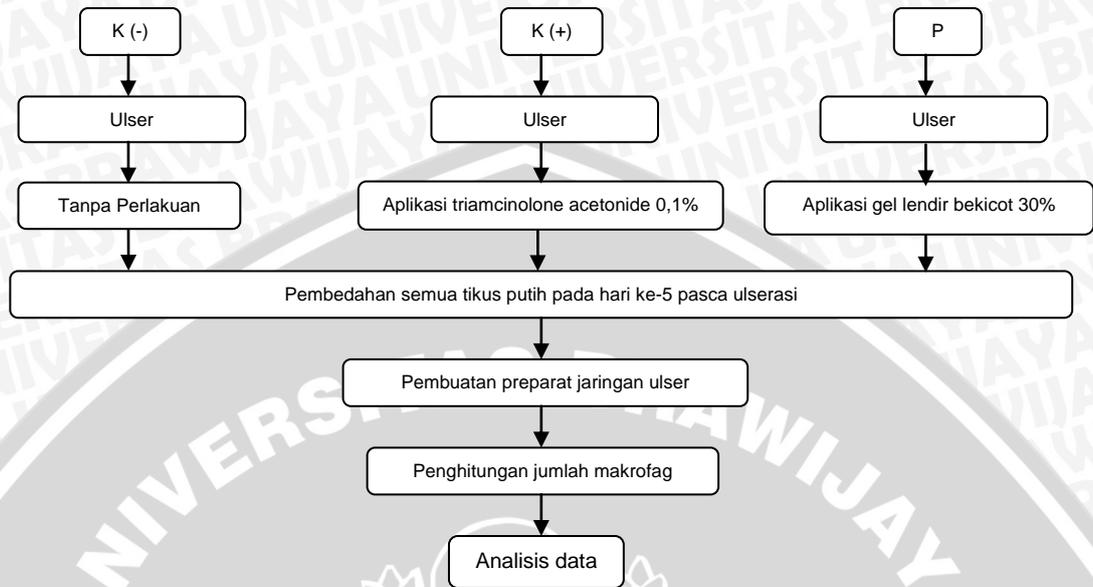
#### **D. Staining**

*Object glass* dimasukkan dalam *Xylo* 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*.

#### **1.8. Prosedur Pengumpulan Data**

Data diperoleh dari hasil penghitungan jumlah makrofag pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-5 pasca ulserasi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Pengamatan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OLYVIA (*Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 20 kali tiap lapang pandangnya.

### 1.9. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

### 1.10. Analisa Data

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 limfosit antara kelompok tanpa perlakuan, aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% dan aplikasi gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) pada proses penyembuhan ulser mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas. 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*.