

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. 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 peningkatan jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan ulser mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang berumur 3 bulan dengan berat 150-200 gram.

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

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

dengan t : jumlah kelompok, n : jumlah pengulangan penelitian 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 150-200 gram.

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus sakit selama masa adaptasi 7 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*" dimana dilakukan penomoran pada sampel-sampel tikus kemudian dilakukan pengundian untuk kemudian ditempatkan dalam 3 kelompok penelitian, yaitu :

1. K (P) : Kelompok perlakuan, tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mukosanya telah diulserasi selama 1 hari, diaplikasikan gel lendir bekicot (*Achatina fulica*) 2 kali sehari.
2. K (+) : Kelompok kontrol positif, tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mukosanya telah diulserasi selama 1 hari, diaplikasikan *triamcinolone acetonide 0,1%* 2 kali sehari.
3. K (-) : Kelompok kontrol negatif, tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mukosanya telah diulserasi selama 1 hari dan tidak diberi perlakuan.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

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

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah.

4.3.3. 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*)

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari-Juli 2014.

4.5. Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

4.5.1. Bahan dan Alat untuk Ulserasi

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 150-200 gram.
2. Cement stopper
3. Bunsen
4. Chloretil
5. Pinset
6. Kapas
7. Masker
8. Sarung tangan

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

1. Bekicot (*Achatina fulica*)
2. Alkohohol 70 %
3. Tabung steril
4. Masker
5. Sarung tangan

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

1. Bejana
2. Metilparaben
3. Propilenglikol
4. *Carbomer* 934 3%
5. NaOH 1%
6. *Aquadest*
7. Tube
8. Masker dan sarung tangan

4.5.4. Bahan dan Alat Perlakuan

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 150-200 gram dan terdapat ulser pada mukosnya.
2. Gel Lendir Bekicot
3. *Triamcinolone acetonide* 0,1%
4. Cotton buds
5. Masker
6. Sarung tangan

4.5.5. Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

1. Ether
2. Scalpel
3. Mikrotom
4. Kaca objek dan pentup
5. Blok paraffin
6. Waterbath
7. Timer
8. Formalin 10%
9. Aceton
10. Xylol
11. Kuaskecil
12. Getalin
13. Alkohol 96%
14. Pewarna Hematoxylin dan Eosin
15. Lithiumcarbonat

4.6. Definisi Operasional

4.6.1. Gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Bekicot (*Achatina fulica*) diperoleh dari salah satu peternak bekicot di daerah Blitar, tidak ada kriteria khusus tentang umur dan berat bekicot yang digunakan untuk penelitian. Lendir bekicot adalah lendir yang diambil dari dalam cangkang bekicot yang telah diseterilkan sebelumnya. Gel lendir bekicot dibuat dengan karbomer 934 3% sebagai *gelling agent*.

4.6.2 Jenis Pembuluh Darah

Pada penelitian ini pembuluh darah yang akan diteliti pada preparat mukosa tikus *Rattus norvegicus* adalah pembuluh darah kapiler karena pembuluh darah yang terdapat pada mukosa adalah pembuluh darah kapiler.

4.6.3. Jumlah Pembuluh Darah

Penghitungan jumlah pembuluh darah adalah penghitungan jumlah pembuluh darah pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-5 pasca ulserasi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Kemudian dilihat secara histologi menggunakan perbesaran 600 kali.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Ulserasi Pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pertama, dilakukan adaptasi pada sejumlah tikus putih yang akan digunakan untuk dengan cara dikandangkan secara individual dan diberi pakan selama 10 hari. Setelah masa adaptasi 10 hari, mukosa labial tikus putih dianestesi dengan *chlorethil*, kemudian diinduksi dengan ujung *cement stopper* kedokteran gigi yang sebelumnya telah dipanaskan dengan bunsen selama 10 detik sehingga terbentuk ulser, kemudian dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi label kelompok kontrol negatif K(-), kelompok kontrol positif K(+), dan kelompok perlakuan (P).

4.7.2. Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

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

4.7.3. 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 ke dalam propilenglikol 16,7 gram, kemudian carbomer 934 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 7 dengan penambahan NaOH 1%. Aquades 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
Propilen glikol	16.7 gram
NaOH qs pH 7	10.58 ml
Aquadest ad	100 ml

Tabel 4.1 Tabel Komposisi Gel Lendir Bekicot

(Sudjono,2012)

4.7.4. Pengaplikasian Gel Lendir Bekicot dan *Triamcinolone Acetonide* 0,1%

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

4.7.5. 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 *acetone* selama 1 jam x 4, *Xylo* selama 1/2 jam x 4, *paraffin* cair selama 1 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,

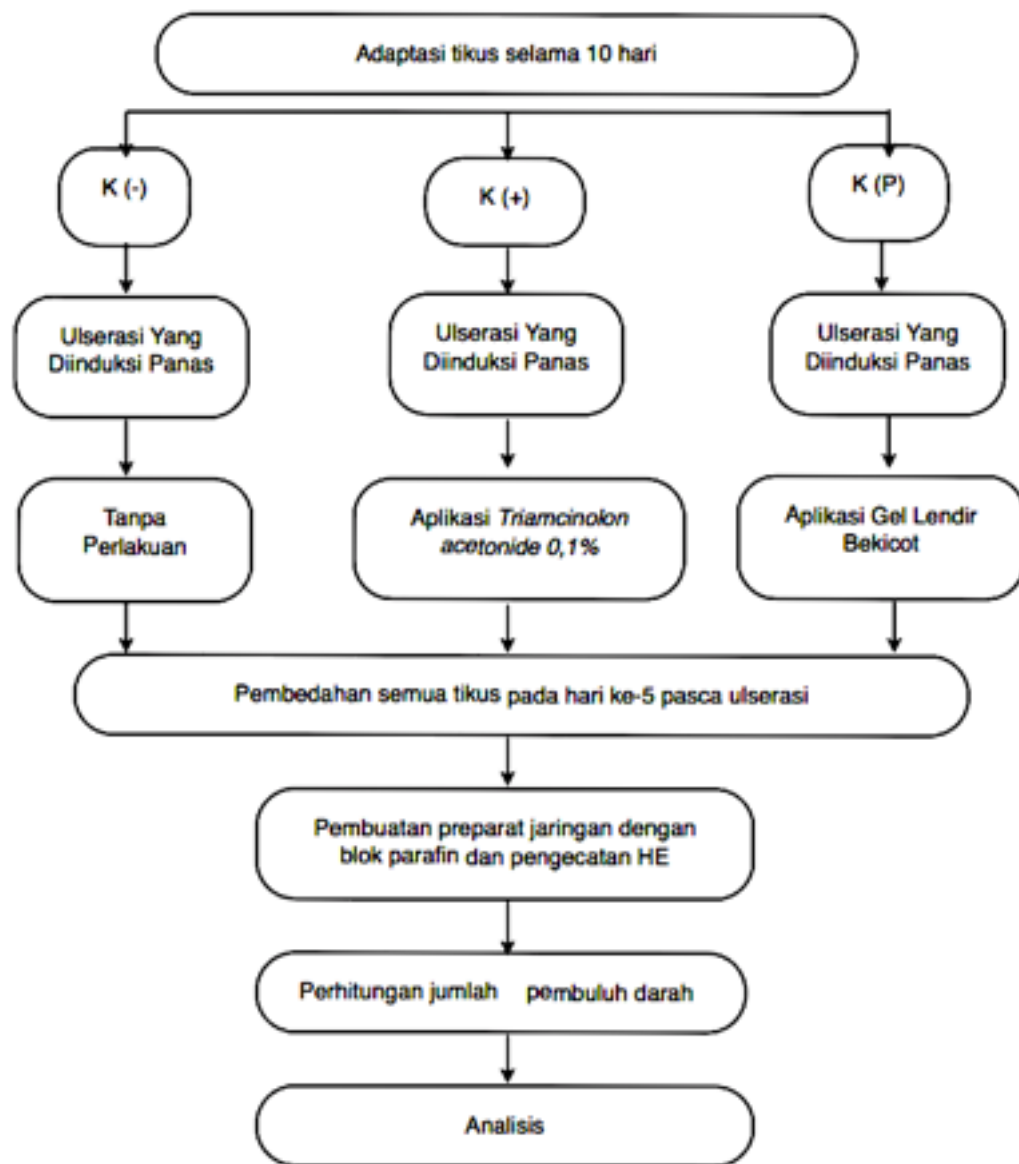
kemudian letakkan pada *water bath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36oC. Setelah sayatan jaringan ulser merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam.

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*.

4.8. Prosedur Pengumpulan Data

Data diperoleh dari hasil penghitungan jumlah pembuluh darah pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-5 pasca ulserasi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Kemudian dilihat secara histologi menggunakan perbesaran 600 kali.



Gambar 4.1 Kerangka operasi penelitian

4.9 Analisis 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 pembuluh darah antara K(-), K(+) dan P 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*.