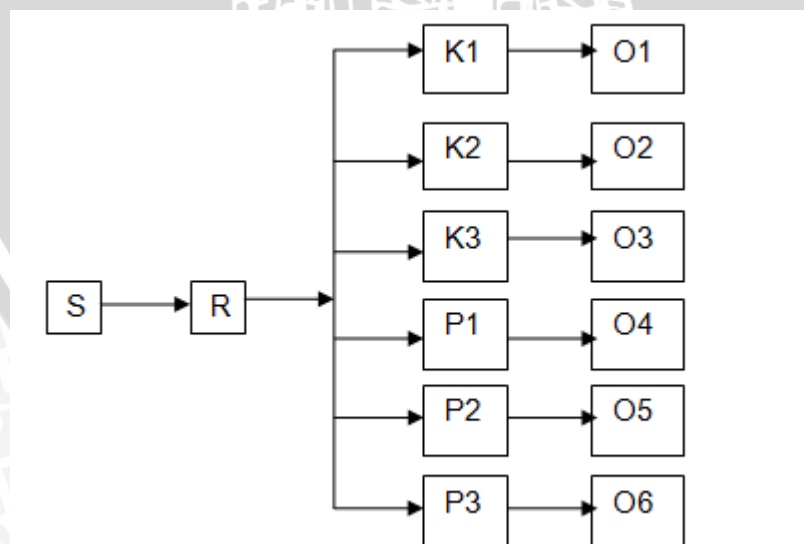


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan *True Experimental* (eksperimental yang murni) dikerjakan di Laboratorium secara *in vivo* dengan desain penelitian menggunakan rancangan *Randomized Post-Test Only Control Group Design* (rancangan secara acak dengan tes akhir dan kelompok kontrol). Rancangan ini memiliki ciri adanya dua kelompok yang ditentukan secara *random* yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Pada desain ini, kelompok eksperimen diberi perlakuan sedangkan kelompok kontrol tidak diberi perlakuan. Dalam penelitian ini, pengaruh eksperimen dianalisis dengan uji beda untuk mengetahui perbedaan signifikan antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol (Sugiyono, 2009).



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

Keterangan:

- S : sampel
R : randomisasi
K1 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi perlakuan selama 3 hari
K2 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi perlakuan selama 5 hari
K3 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi perlakuan selama 7 hari
P1 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 3 hari
P2 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 5 hari
P3 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 7 hari
O1 : hasil pengamatan kelompok hewan kontrol tanpa diberi perlakuan selama 3 hari
O2 : hasil pengamatan kelompok hewan kontrol tanpa diberi perlakuan selama 5 hari
O3 : hasil pengamatan kelompok hewan kontrol tanpa diberi perlakuan selama 7 hari
O4 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 3 hari
O5 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml selama 5 hari
O6 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak etanol cacing tanah dengan konsentrasi 100 mg/ml 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 200 gram

Kriteria Eksklusi :

1. Terdapat kelainan anatomis pada tikus putih

2. Tikus putih sakit selama masa adaptasi 7 hari (tikus putih tidak bergerak aktif)
3. Tikus putih mati selama perlakuan berlangsung

Dalam penelitian ini, tikus putih akan dibagi menjadi 6 kelompok yaitu, 3 kelompok kontrol negatif dan 3 kelompok eksperimen. Setiap tikus akan mendapatkan perlakuan berbeda dalam rongga mulut. Untuk kelompok kontrol negatif, tikus hanya diberi pakan dan aquadest. Sedangkan kelompok eksperimen, tikus diberi pakan, aquadest dan gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) secara topikal dengan metode *time series* yaitu pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7.

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 4 tikus putih untuk tiap kelompoknya, sehingga jika dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dibutuhkan 24 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 limfosit pada ulkus.

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 Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu \pm 2 bulan.

4.5 Bahan dan Alat/Instumen Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Pembentukan Ulkus

Tikus putih (*Rattus novergicus*) umur 10 minggu dengan berat badan 200 gram, *povidon iodine*, *chlor etil*, burnisher kecil dengan diameter \pm 4 mm, bunsen, *cotton buds*, Masker dan sarung tangan.

4.5.2 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Etanol Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Blender, saringan, timbangan, *baker glass*, etanol 70%, kertas saring *whatman* no. 40, oven dan aquadest.

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

Bejana, metilparaben, propilen glikol, carbomer 3%, NaOH 10,58%, aquadest, tube, masker dan sarung tangan.

4.5.4 Bahan dan Alat Perlakuan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 10 minggu dengan berat 200 gram yang diberi luka berupa trauma *thermal* sehingga terdapat ulkus pada mukosanya, gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*), aquadest, *cotton buds*, masker dan sarung tangan.

4.5.5 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Ether, *scalpel*, *microtom*, kaca obyek dan penutup, blok *paraffin*, *waterbath*, tempat pewarnaan dan cucian, kertas saring, *timer*, formalin 10%, *acetonxytol*, kuas kecil, gelatin, alkohol 96%, *lithium carbonat*, pewarna *haematoxylin* dan *eosin*.

4.5.6 Alat dan Bahan Perhitungan Limfosit

Mikroskop OLYMPUS seri XC10 dan minyak emersi.

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak Etanol Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) yang akan digunakan dibeli di Pasar Hewan Splendid Malang, tidak ada kriteria khusus tentang umur dan berat cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) yang digunakan tetapi panjang cacing yang akan dibuat ekstrak dipilih sekitar 14-20 cm. Kemudian cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) diidentifikasi di Laboratorium milik Jurusan Biologi, FMIPA UB. Cacing tanah diekstrak memakai metode maserasi dengan konsentrasi 100 mg/ml kemudian dibuat sediaan gel menggunakan *gelling agent* carbomer. Dipilih sediaan berupa gel yang diaplikasikan secara topikal, karena

berdasarkan studi dan penelitian yang telah dilakukan merupakan medikasi yang efektif untuk jenis lesi vesiko-erosif dan atau lesi ulkus dalam rongga mulut.

2. Ulser Traumatik Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pembentukan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan cara diberi trauma *thermal* menggunakan burnisher panas. Diameter burnisher yang digunakan ± 4 mm. Sebelum dilakukan ulserasi mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dioles antiseptik *povidon iodine* kemudian diberikan chlor etil. Kemudian mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilukai atau diberi trauma ± 3 detik menggunakan burnisher dengan cara ditempelkan yang terlebih dahulu sudah dipanasi menggunakan bunsen selama ± 10 detik.

3. Jumlah Limfosit

Perhitungan jumlah limfosit adalah perhitungan rata-rata jumlah limfosit pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulkus pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 pasca ulserasi dengan pewarnaan *haematoxylin-eosin* dan diamati sebanyak 5 lapang pandang menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OLYVIA (*Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 20x tiap lapang pandang. Limfosit akan terpulas berwarna ungu muda dan terlihat inti sel berbentuk bulatan besar yang berwarna ungu gelap yang dikelilingi oleh pinggiran sitoplasma.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Alur Penelitian

Pada penelitian ini, akan dibuat ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) berupa sediaan gel dengan konsentrasi 100 mg/ml. Pada hewan

coba akan dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Setelah itu dilakukan prosedur pembentukan ulkus pada mukosa hewan coba, pengelompokan perlakuan dan sampel, pemberian pakan dan aquadest pada kelompok kontrol, serta pemberian pakan, aquadest dan gel ekstrak etanol cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) pada kelompok eksperimen dengan konsentrasi yang sudah ditentukan.

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

4.7.2 Perawatan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus novvergicus*) dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik bersih ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara di suhu ruangan yang berkisar antara 18°C - 27°C, ventilasi kandang harus baik. Satu kandang berisi 2 ekor tikus. Setiap hari dilakukan penggantian sekam, pemberian minum dengan air mineral (15-30 ml/hari) dan pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badan/hari).

4.7.3 Pembentukan Ulkus pada Mukosa Tikus Putih (*Rattus novvergicus*)

Dalam penelitian ini, agar terbentuk ulkus hingga mencapai lamina propia, sebelumnya mukosa labial bawah tikus putih (*Rattus novvergicus*) kelompok kontrol dan kelompok eksperimen diberi *povidon iodine* dan *chlor etil*, lalu dilukai

atau diberi trauma ± 3 detik menggunakan burnisher kecil diameter ± 4 mm dengan cara ditempelkan yang sebelumnya telah dipanasi dengan menggunakan bunsen selama ± 10 detik.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) 500 gram dihancurkan dengan cara dihaluskan dengan blender dan disaring untuk memisahkan partikel yang relative besar. Cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) yang sudah dihaluskan yang diperoleh selanjutnya di ekstrak dengan metode maserasi (Chang *et al.*, 2011a). Masukkan ke dalam *baker glass* dan tuangkan pelarut dengan perbandingan (1:3) 1 kg bahan dalam 3 liter pelarut etanol 70%. Rendam bahan dan diamkan pada suhu ruangan selama minimal 2x24 jam kemudian saring bahan menggunakan kertas saring *whatman* no. 40. Evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut. Oven sisa pelarut yang masih tersisa pada suhu 40°C hingga benar-benar tidak mengandung pelarut. Hasil ekstraksi pada penelitian ini berupa cairan seberat 60 ml dengan konsentrasi 100mg/ml.

4.7.5 Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Cacing Tanah (*Pheretima aspergillum*)

Ekstrak etanol cacing tanah 2,7 gram ditampung dalam sebuah bejana dan dihomogenkan. Metil paraben 0,054 gram dilarutkan kedalam propilen glikol 5,01 gram kemudian carbomer 3% sebanyak 0,9 gram ditambahkan pada campuran sambil terus diaduk dengan cepat hingga terbentuk sediaan yang liat (gel), lalu simpan pada temperatur kamar selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan lendir bekicot dan pH diatur sekitar 5-6,5 dengan penambahan

NaOH 10,58% sebanyak 12,336 ml. Aquadest ditambahkan sampai volume 100 ml, kemudian dimasukkan dalam *tube*.

4.7.6 Prosedur Eksisi-Biopsi

Pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7, hewan coba dieuthanasia menggunakan teknik dekapitasi dengan cara mendisloksi leher tikus putih semua kelompok kontrol dan perlakuan. Setelah proses euthanasia selesai, kemudian pada jaringan ulser diusap dengan menggunakan alkohol 70% lalu dibuat eksisi-biopsi untuk dijadikan preparat.

4.7.7 Sanitasi Hewan Coba

Semua sisa organ tikus yang sudah tidak terpakai dimasukkan ke dalam kantong plastik yang ditutup rapat serta dipastikan tidak ada bau yang menyebar. Kantong plastik tersebut diserahkan kebagian Farmakologi untuk dilakukan insinerasi. Sampah dari prosedur pembedahan yang tidak terpakai dibuang dalam satu kantong plastik, sampah medis dipisahkan tersendiri dan diserahkan ke Rumah Sakit Saiful Anwar untuk proses pembuangan (CCRC Farmasi UGM).

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 kulit pada *paraffin* blok.

c) Slicing

Blok yang sudah tertanam 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) Stanning

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 *Xylol* 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 Pengukuran Jumlah Limfosit pada Daerah Luka dan Persentase Penyembuhan Luka

Jumlah limfosit 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 limfosit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

4.8 Analisis Data

Hasil perhitungan jumlah limfosit pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

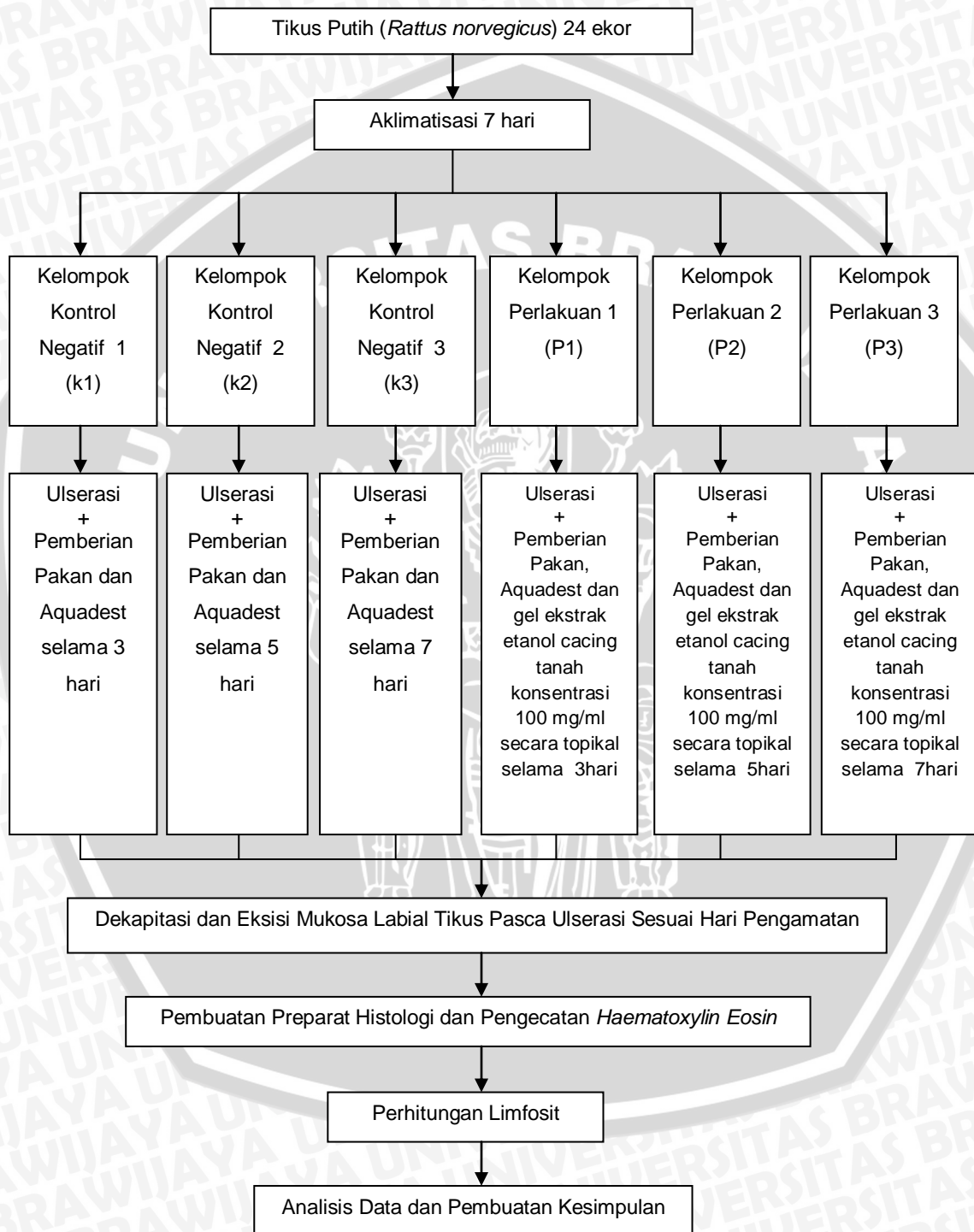
- a) Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka uji digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- b) Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

- c) Uji One-Way ANOVA: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- d) Post Hoc Tes (*Uji Least Significant Difference*): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p=0,05$).
- e) Uji korelasi Pearson: untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji Post Hoc (LSD).

Pada penelitian ini dilakukan uji One-Way Anova sebagai uji hipotesisnya apabila data yang diperoleh berdistribusi normal ($\text{signifikansi} > 0,05$) dan varian data homogen ($p > 0,05$). Jika data yang diperoleh berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Tukey sebagai lanjutan uji One-Way Anova atau uji *Mann Whitney* sebagai lanjutan uji *Kruskal Wallis*.

Selanjutnya untuk menunjukkan apakah ada pengaruh pemberian ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) dengan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus karena trauma termal dan 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

