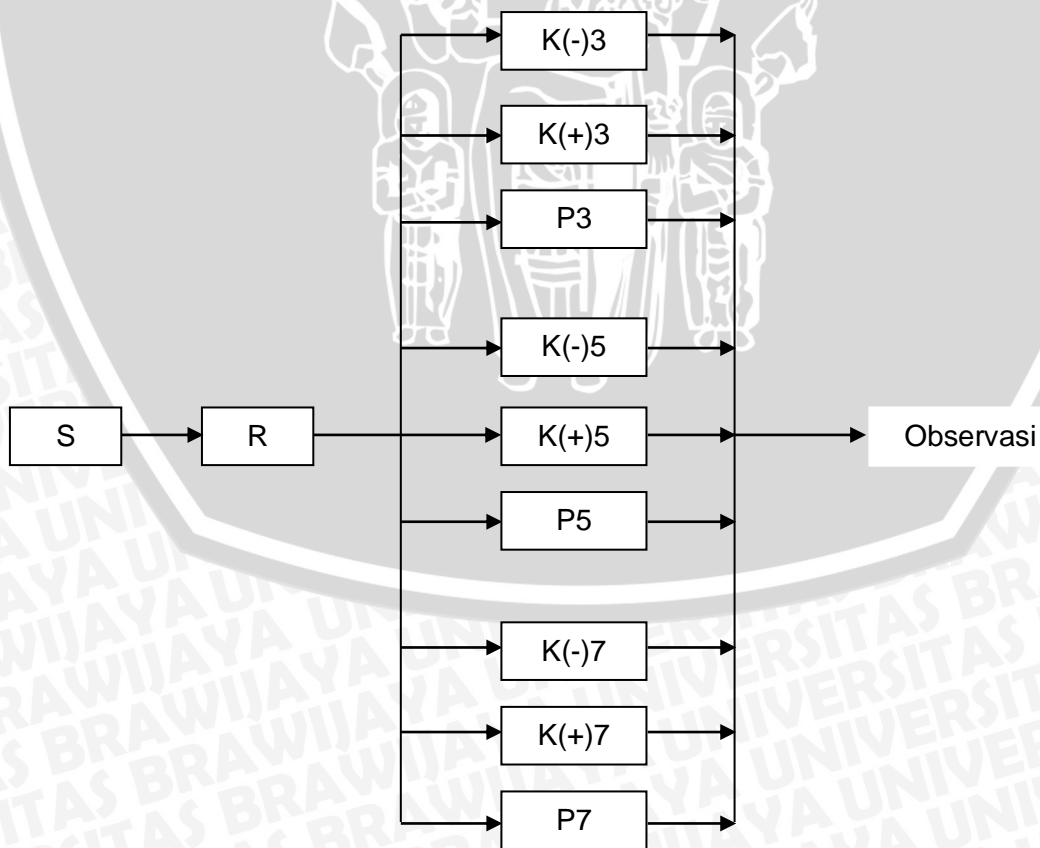


BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah desain eksperimen murni (*True experimental*) dengan menggunakan rancangan penelitian "*Post Test Only Randomized Control Group Design*" di laboratorium secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Notoadmojo, 2005). Penelitian akan dibagi dalam 9 kelompok dengan 3 *time series*. Sampel dipilih dengan menggunakan teknik "*Simple Random Sampling*". Berikut merupakan desain penelitian:



4.1: Kerangka Desain Penelitian



- Keterangan :
- S = Sampel
 - R = Random
 - K(-)3 = Kelompok kontrol negatif tanpa diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) lendir bekicot (*Achatina fulica*) hari ke-3 pasca ulserasi.
 - K(+3) = Kelompok kontrol positif yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 3 hari pasca ulserasi
 - P3 = Kelompok perlakuan yang diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) konsentrasi 100% dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 3 hari pasca ulserasi.
 - K(-)5 = Kelompok kontrol negatif tanpa diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) hari ke-5 pasca ulserasi.
 - K(+5) = Kelompok kontrol positif yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 5 hari pasca ulserasi.
 - P5 = Kelompok perlakuan yang diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) konsentrasi 100% dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 5 hari pasca ulserasi.
 - K(-)7 = Kelompok kontrol negatif tanpa diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) hari ke-7 pasca ulserasi.
 - K(+7) = Kelompok kontrol positif yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 7 hari pasca ulserasi.
 - P7 = Kelompok perlakuan yang diberi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) konsentrasi 100% dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 7 hari pasca ulserasi.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan dalam kandang yang bersih. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan berikut.

4.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi sebagai berikut :

1. Tikus putih galur *Wistar* keturunan murni
2. Berjenis kelamin jantan
3. Belum pernah digunakan untuk penelitian
4. Umur 3 bulan
5. Berat badan 180-200 gram

4.2.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria Eksklusi sebagai berikut :

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

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang lebih cepat, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia serta harganya lebih terjangkau dibandingkan dengan menggunakan marmot (*Cavia cobaya*).

4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel penelitian dihitung menggunakan rumus *Federer* adalah sebagai berikut :

$(n-1)(t-1) \geq 15$; dengan $t =$ jumlah kelompok = 9 ; $n =$ jumlah sampel

$(n-1)(9-1) \geq 15$

$8n - 8 \geq 15$

$n \geq 2,75 = 3$

Pada penelitian ini digunakan minimal 3 tikus putih untuk tiap kelompoknya. Penelitian ini dibagi menjadi sembilan kelompok, sehingga dibutuhkan 27 tikus putih. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus putih mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah makrofag.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Genetik
2. Jenis kelamin
3. Umur
4. Berat badan
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi obyek penelitian
6. Kemungkinan adanya infeksi
7. Aplikasi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*)

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Agustus-November 2016.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

Perawatan tikus menggunakan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam dan penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

Pakan tikus berupa pakan (pelet). Dengan jumlah pakan 30-40 gram setiap tikus.

4.5.2 Bahan dan Alat Untuk Ulserasi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram, *Semen stopper*, *Bunsen*, *Chlorethil*, Pinset, Kapas, Masker, Sarung tangan.

4.5.3 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya

Daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*), Etanol 96%, Kalsium hipoklorit, *Juicer*, Pisau, Kertas saring, *Vacuum dryer*, Tabung steril, Masker, Sarung tangan.

4.5.4 Bahan dan Alat Pengambilan Lendir Bekicot

Bekicot (*Achatina fulica*), Alkohol 70%, Palu, Tabung steril, Masker, Sarung tangan.

4.5.5 Bahan dan Alat Pembuatan Gel Campuran Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya dan Lendir Bekicot

Lendir bekicot, Ekstrak etanol daun lidah buaya, Metil-paraben, Propilen-glikol, *Carbomer 934* 3%, NaOH 1%, *Aquadest*, Tabung Steril, Masker, Sarung Tangan.

4.5.6 Bahan dan Alat Perlakuan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* kedokteran gigi sehingga terdapat ulkus pada mukosanya, Gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) , *Triamcinolone acetone* 0,1%, Spuit, Masker, Sarung tangan.

4.5.7 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Eter, *Scalpel*, *Microtom*, Kaca obyek dan penutup, Blok *paraffin*, *Waterbath*, Tempat pewarnaan dan cucian, Kertas saring, Timer, Formalin 10%,

Aceton , Xylol , Kuas kecil, Gelatin, Alkohol 96%, Pewarna *Haematoxylin* dan *Eosin*, *Lithium carbonat*.

4.5.8 Bahan dan Alat Pengukuran Jumlah Makrofag

Preparat, *Slide Glass*, Mikroskop, Minyak Emersi.

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstrak daun lidah buaya dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Lidah buaya yang digunakan adalah yang berumur 8-12 bulan. Lidah buaya diperoleh dan diidentifikasi di Materia Medika Batu.
2. Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) adalah lendir yang diambil dari badan bekicot yang telah disterilkan sebelumnya dengan alkohol 70%. Bekicot yang digunakan adalah yang memiliki berat ± 35 gram, berumur 5-8 bulan dengan panjang cangkang 8-10 cm. Bekicot diperoleh di daerah Merjosari, Malang yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA UB.
3. Gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan Lendir bekicot (*Achatina fulica*) adalah gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) konsentrasi 100 % dan Lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100 % dengan perbandingan 1:1 yang dicampur dengan *carbomer 934* 3%.
4. Makrofag dalam pewarnaan HE adalah sel yang berbentuk oval, sitoplasma terpusat gelap mengandung granula dan umumnya memiliki inti bulat atau berbentuk ginjal yang berwarna keunguan dengan granul hasil fagositosis berwarna kecoklatan. Inti sel lebih kecil dan lebih heterokromatik dari inti fibroblas (Ross *et al.*, 2011).

5. Penghitungan jumlah makrofag adalah penghitungan jumlah sel makrofag 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 *software OIYVIA (Olympus Viewer for Imaging Applications)* dengan perbesaran 20 kali tiap lapang pandangnya.
6. Ulkus traumatik adalah peradangan mukosa mulut yang ditandai dengan lesi berupa bercak putih kekuningan atau putih pucat, bentuk bulat atau oval, dikelilingi oleh pinggiran kemerahan dan batasnya tidak lebih tinggi dari permukaan mukosa dan merupakan lesi yang dangkal. Pada penelitian ini pembuatan lesi dengan cara tikus di anestesi menggunakan ketamin terlebih dahulu, lalu *cement stopper* dipanaskan hingga warna *cement stopper* berubah merah lalu dilakukan induksi *cement stopper* ke mukosa labial tikus dengan kedalaman mencapai $\pm 0,5$ mm selama 2 detik (Setianingtyas, 2012).

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Ulkus Traumatik pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Panas dengan Ujung *Cement Stopper*

Penelitian ini memakai 27 ekor tikus putih jantan umur 3 bulan yang dibagi dalam K(-)3, K(+3), P3, K(-)5, K(+5), P5, K(-)7, K(+7) dan P7. Kemudian diberikan masa adaptasi di laboratorium dan diberi pakan standar selama 7 hari. Setelah 7 hari masa adaptasi, mukosa labial tikus putih dianastesi dengan ketamin, lesi dibuat dengan diinduksi panas dengan menekan ujung *sement stopper* kedokteran gigi yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus pada mukosa labial tikus sampai kedalaman mencapai $\pm 0,5$ mm selama 2 detik.

Setelah itu tikus putih dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi label yaitu K(-)3, K(-)5, K(-)7, K(+3, K(+5, K(+7, P3, P5 dan P7.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis miller*)

Ekstrak etanol daun lidah buaya diperoleh dengan cara proses ekstraksi-pengendapan. Bahan baku yang digunakan adalah daun lidah buaya yang diperoleh dari tanaman lidah buaya. Selain itu ada beberapa bahan lain yang digunakan yaitu etanol 96% sebagai pengendap polisakarida dan kalsium hipoklorit untuk membuat larutan pencuci lidah buaya.

Setelah daun lidah buaya dipotong dari tanamannya segera dicuci dengan menggunakan larutan kalsium hipoklorit, dikupas dan dipotong kecil kemudian dikeringkan. Proses pencucian ini dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran dan bakteri yang terdapat pada permukaan daun lidah buaya. Daun lidah buaya yang telah dikeringkan ditambahkan dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:4, dalam hal ini 50 gram serbuk daun lidah buaya ditambahkan dengan 200 cc etanol 96%.

Campuran serbuk daun lidah buaya dan etanol tersebut diaduk selama 10 menit pada suhu 30°C, kemudian didiamkan untuk proses pengendapan selama 24 jam pada suhu 10°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari larutannya dengan menggunakan kertas saring, kemudian dioven pada *vaccum* (*vacuum dryer*) dengan suhu 50°C.

4.7.3 Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Pengambilan lendir bekicot yang digunakan pada penelitian ini dengan cara menyentuh badan bekicot hingga badan masuk kedalam cangkang yang sebelumnya dilakukan pencucian terlebih dahulu, cara ini digunakan untuk meminimalisir adanya kandungan senyawa lain yang mungkin saja terbawa saat pengambilan lendir serta untuk memperpanjang masa hidup bekicot. Dilakukan

pengambilan dengan cara memijat atau menekan badan bekicot hingga lendir keluar dengan sendirinya. Lendir yang telah tertampung disaring dan disimpan didalam lemari pendingin (Zakiah dkk., 2015)

4.7.4 Pembuatan Gel Campuran Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Metil-paraben 0,2 gram dilarutkan kedalam propilen-glikol 16,7 gram kemudian ditambahkan *carbomer* 934 3% sebanyak 3 gram sambil terus diaduk dengan cepat hingga terbentuk sediaan yang liat (gel), lalu disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan 9 gram ekstrak etanol daun lidah buaya dan 9 gram lendir bekicot yang telah diolah dan dicampur kemudian pH diatur sampai mendekati 7 dengan penambahan NaOH 1% sebanyak 10,58 ml. *Aquadest* ditambahkan sampai volume 100 ml, lalu dimasukkan dalam *tube* (Sudjono dkk., 2012).

4.7.5 Pengaplikasian Gel Campuran Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) dan *Triamcinolone acetonide* 0,1%

Pada kelompok perlakuan dilakukan pengaplikasian gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) selama dua kali sehari, pada kelompok kontrol positif dilakukan pengaplikasian *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama dua kali sehari, sedangkan kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan. Pengaplikasian dilakukan satu hari setelah induksi panas dilakukan. Pengaplikasian gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya dan lendir bekicot, dan *triamcinolone acetonide* 0,1% secara topikal menggunakan *cotton bud*. Ketentuan waktu pengaplikasian pada pagi dan sore hari. Dilakukan aplikasi yang sama sampai hari ketujuh. Pada hari ketiga, kelima dan ketujuh tikus putih dari tiap kelompok dikorbankan dan diambil jaringan ulkus untuk pembuatan preparat.

4.7.6 Pembuatan Preparat

1. Prosedur Pengambilan Jaringan

Pada hari ke-3, ke-5, ke-7 paska perlakuan, masing-masing tiga tikus putih pada ketiga kelompok dikorbankan terlebih dahulu dengan menggunakan ketamine. Kemudian pada jaringan ulkus diusap dengan alkohol 70% dan dipastikan tikus tidak lagi bernafas dan bergerak kemudian dilakukan pengambilan jaringan.

2. Prosedur Pembuatan Preparat

a. Fiksasi

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

b. Dehidrasi

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Caranya adalah dengan merendam jaringan yang telah difiksasi dengan Alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi.

c. Pembeningan (Clearing)

Tujuannya adalah menghilangkan alkohol dari jaringan dan mempersiapkan jaringan ke pembedaan Pembuangan alkohol dari jaringan sangat penting oleh karena alkohol dan parafin tidak dapat saling melarutkan dan apabila alkohol tertinggal dalam jaringan akan menyebabkan jaringan sulit dipotong. Pembeningan dilakukan dengan Larutan Xylol I dan Larutan Xylol II selama 30 menit. Larutan Xylol II digunakan untuk mengeluarkan alkohol setelah

pembeningan dengan larutan Xylol I. Bila Clearing dilakukan terlalu lama akan menyebabkan jaringan menghitam. Xylol akan menyebabkan Sitoplasma kosong oleh karena Xylol menarik liquid dari jaringan.

d. Pembenaman (Impregnasi/Embedding)

Setelah cairan ditarik oleh Xylol maka jaringan akan tinggal bagian padatnya sehingga susah dipotong, untuk mengisi bagian yang kosong itu dilakukanlah pembenaman dengan Parafin sehingga jaringan dapat dengan mudah dipotong. Pembenaman memakai 3 wadah parafin yang ditempatkan di dalam oven. Jaringan direndam selama 1 jam setiap wadah. Tujuan dilakukannya 3 wadah adalah agar ada resting dan praktikan tetap terjaga ataupun tidak bosan menunggu 3 jam.

e. Pengecoran (Blocking)

Pengecoran merupakan pembuatan blok preparat menggunakan potongan besi berbentuk L (Leuckhart). 2 buah potongan besi disusun diatas lembaran logam hingga rapat dan membentuk ruang seperti kubus. Di Laboratorium dengan fasilitas lebih memadai pengecoran sudah memakai kaset.

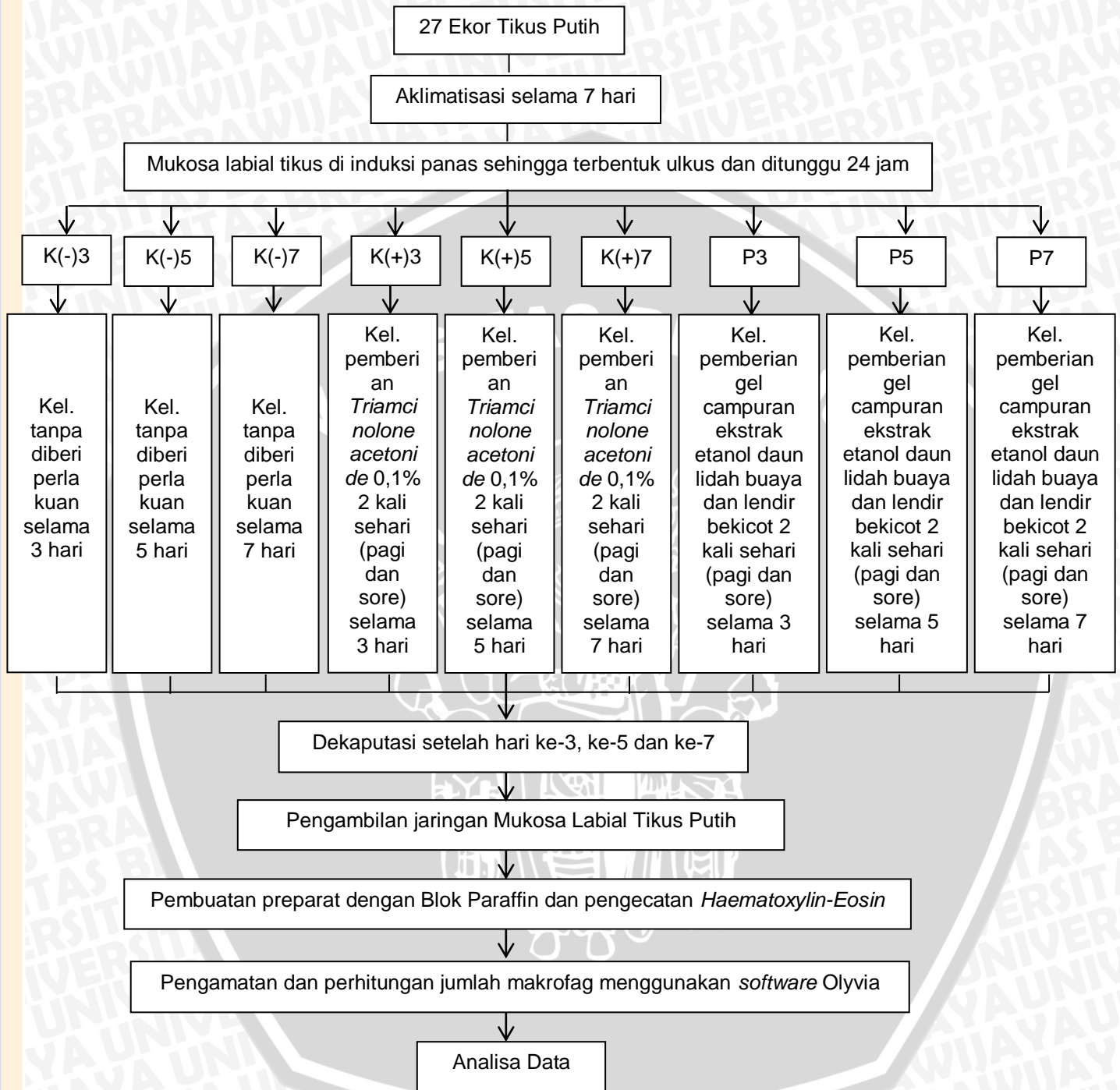
f. Pemotongan jaringan (Slicing)

Pemotongan blok preparat dilakukan dengan mikrotom. Sebaiknya dibuatkan beberapa slide, untuk menghindari hilangnya jaringan saat deparafinisasi.

g. Pewarnaan (Staining)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali / diamati dengan mikroskop. Pewarnaan yang dilakukan adalah pewarnaan HE untuk mewarnai inti menjadi biru dan pewarnaan Eosin untuk mewarnai Sitoplasma menjadi siopilic (Merah)

4.7.7 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

4.8 Analisa Data

Pada penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak digunakan uji normalitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampelnya ≤ 50 . kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test* yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Apabila data berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (*signifikansi* $> 0,05$) dan homogenitas ragam terpenuhi ($p > 0,05$), maka digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya. Uji *one way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah makrofag antara kelompok tanpa perlakuan, aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1%, aplikasi gel campuran ekstrak etanol daun lidah buaya (*Aloe barbadensis miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) pada penyembuhan ulkus traumatik mukosa labial tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas. Lalu dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *one way Anova* atau *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Uji *Post Hoc Tukey* bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA (Dahlan, 2008).