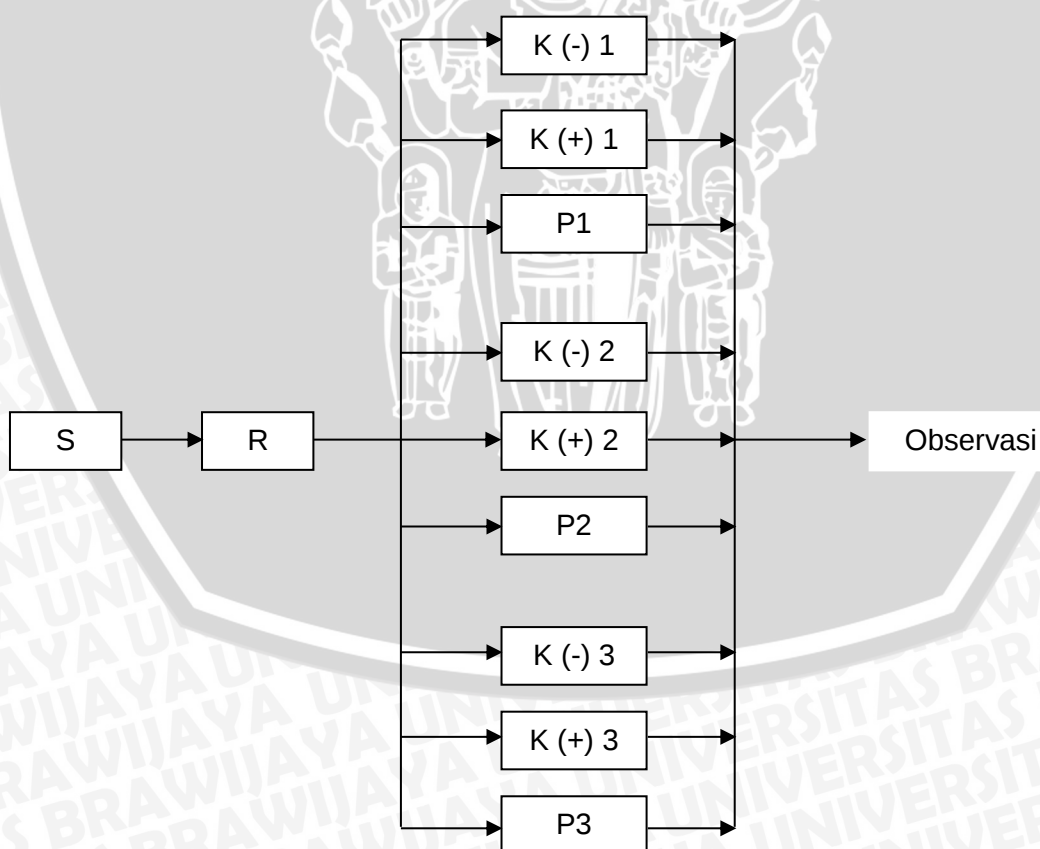


BAB IV

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*” (Purnasari, 2012) di laboratorium secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) terhadap jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Penelitian akan dibagi dalam 3 kelompok dengan 3 *time series*. Sampel dipilih dengan menggunakan teknik “*Simple Random Sampling*”. Berikut merupakan desain penelitian:



4.1: Kerangka Desain Penelitian

Keterangan :

S = Sample

R = Random

K (-) 1 = Kelompok kontrol negatif 1 tanpa diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) hari ke-3 pasca ulserasi.

K (+) 1 = Kelompok kontrol positif 1 yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 3 hari pasca ulserasi

P 1 = Kelompok perlakuan 1 diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 3 hari pasca ulserasi.

K (-) 2 = Kelompok kontrol negatif 2 tanpa diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) hari ke-5 pasca ulserasi.

K (+) 2 = Kelompok kontrol positif 2 yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 5 hari pasca ulserasi.

P 2 = Kelompok perlakuan 2 diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 5 hari pasca ulserasi.

K (-) 3 = Kelompok kontrol negatif 3 tanpa diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) hari ke-7 pasca ulserasi.

K (+) 3 = Kelompok kontrol positif 3 diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 7 hari pasca ulserasi.

P 3 = Kelompok perlakuan 3 diberi gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100% dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe*

Barbadensis Miller)) konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:1 yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 7 hari pasca ulserasi.

4.2 Sampel Penelitian

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

4.2.1 Kriteria inklusi

Kriteria Inklusi menurut Fitria (2014), 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 menurut Fitria (2014), 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 = 3 ; n = jumlah sampel

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

$2n - 2 \geq 15$

$n \geq 17$

$n \geq 8,5 = 9$

Pada penelitian ini digunakan minimal 9 tikus wistar untuk tiap kelompoknya. Penelitian ini dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, 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 wistar.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*).

4.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah limfosit.

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 lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*)

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Farmako 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 pembuatan ulkus

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

4.5.3 Bahan dan alat pengambilan ekstrak etanol lidah buaya

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 lidah buaya dan lendir bekicot

Lendir bekicot, Ekstrak etanol 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 wistar (*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 lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*), *Triamcinolone acetonide* 0,1%, Spuit, Masker, Sarung tangan.

4.5.7 Bahan dan alat pengambilan jaringan dan pembuatan preparat

Ketamin, *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 Limfosit

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

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstrak zat daging lidah buaya yang dibuat menjadi jus sebanyak 9 gram terlebih dahulu kemudian di ekstrak menggunakan etanol 96% yang diperoleh secara maserasi. Lidah buaya yang digunakan adalah yang berumur 8-12 bulan setelah ditanam dengan tinggi ± 30 cm dan tebal daun ± 1 cm (Taufik, 2013). Lidah buaya didapatkan di daerah Mulyoagung, Malang yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Materia Medika Departemen Kesehatan Kota Batu.
2. Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) adalah lendir yang diambil dari dalam cangkang 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 (Yustin, 2014). Bekicot didapatkan di daerah Merjosari, Malang yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA UB.

3. Gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) adalah gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) konsentrasi 100 % dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) konsentrasi 100 % dengan jumlah masing-masing sebanyak 9 gram yang dicampur dengan *carbomer 934 3%* sebanyak 3 gram.
4. Ulkus traumatik adalah peradangan mukosa mulut yang ditandai dengan lesi berupa bercak putih kekuningan atau putih pucat, bentuk bulat atau oval, dengan diameter 1,5 mm, dikelilingi oleh pinggiran kemerahan dan batasnya tidak lebih tinggi dari permukaan mukosa dan merupakan lesi yang dangkal. Pada penelitian ini ulkus dibuat dengan aplikasi anestesi dengan ketamin pada mukosa labial tikus, lalu dilanjutkan dengan menekan *cement stopper* yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus sampai warna *cement stopper* berubah merah, ke mukosa labial tikus selama 2 detik dengan kedalaman mencapai ± 1 mm (Sulistiawati, 2011).
5. Penghitungan jumlah limfosit adalah penghitungan jumlah sel 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 *software OlyVIA (Olympus Viewer for Imaging Applications)* dengan perbesaran 20 kali tiap lapang pandangnya. Dalam pewarnaan HE, sel yang memiliki inti bulat atau oval yang dikelilingi pinggiran sitoplasma sempit berwarna biru (Yasa, 2010).

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Ulkus traumatik pada mukosa labial tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper*

Penelitian ini memakai 27 ekor tikus wistar jantan umur 3 bulan yang dibagi dalam kelompok kontrol negatif (9 ekor), kelompok kontrol positif (9 ekor), kelompok perlakuan (9 ekor), kemudian diberikan masa adaptasi di laboratorium pada 3 kelompok dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama 7 hari. Setelah 7 hari masa adaptasi, mukosa labial tikus wistar

dianastesi dengan ketamin, lesi dibuat dengan diinduksi panas dengan menekan ujung *cement stopper* kedokteran gigi yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus pada mukosa labial tikus selama 2 detik sampai kedalaman mencapai ± 1 mm. Setelah itu tikus wistar dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi label kelompok kontrol negatif 1, 2 dan 3 (K(-)1, K(-)2, K(-)3), kelompok kontrol positif 1, 2 dan 3 (K(+1, K(+2, K(+3), dan kelompok perlakuan 1,2 dan 3 (P1, P2, P3) (Taufik, 2013; Yustin, 2014).

4.7.2 Pengambilan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*)

Ekstrak etanol lidah buaya diperoleh dengan cara proses ekstraksi-pengendapan. Bahan baku yang digunakan adalah lendir 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 lidah buaya dipotong dari tanamannya segera dicuci dengan menggunakan larutan kalsium hipoklorit, dikupas dan dipotong kecil untuk dimasukkan dalam *juicer*. Proses pencucian ini dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran dan bakteri yang terdapat pada permukaan lidah buaya. Jus lidah buaya yang diperoleh diambil untuk kemudian ditambahkan dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:4, dalam hal ini 50 cc jus lidah buaya ditambahkan dengan 200 cc etanol 96%.

Campuran jus lidah buaya dan etanol tersebut diaduk selama 10 menit pada suhu 30°C, kemudian didiamkan untuk proses pengendapan selama 10 jam pada suhu 10°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari larutannya dengan menggunakan kertas saring untuk selanjutnya endapan tersebut dioven pada *vacuum dryer* dengan suhu 50°C (Taufik, 2013)

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 terhadap bekicot yang akan diambil lendirnya. 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 dalam lemari pendingin (Zakiah, 2015).

4.7.4 Pembuatan gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis* Miller)

Metil-paraben 0,2 gram dilarutkan kedalam propilen-glikol 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 9 gram lendir bekicot dan 9 gram ekstrak lidah buaya yang telah diolah dan dicampur kemudian pH diatur sampai mendekati 7 dengan penambahan NaOH 1% sebanyak 10,58 ml. *Aquades*t ditambahkan sampai volume 100 ml, lalu dimasukkan dalam *tube* (Taufik, 2013; Yustin, 2014).

4.7.5 Pengaplikasian gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis* Miller) dan *triamcinolone acetonide* 0,1%

Setelah satu hari ulserasi, pada kelompok perlakuan dilakukan pengaplikasian gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis* Miller) 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 setelah peradangan terbentuk. Pengaplikasian gel campuran lendir bekicot (*Achatina fulica*) dan ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis* Miller), dan *triamcinolone acetonide* 0,1% secara topikal sebanyak 0,5 ml yang cara pengukurannya menggunakan spuit. Ketentuan waktu pengaplikasian pada pukul 07.00 WIB dan pada pukul 17.00 WIB. Dilakukan aplikasi yang sama hingga hari ketujuh. Pada hari ketiga, kelima dan ketujuh tikus wistar 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 pasca perlakuan, masing-masing tiga tikus putih pada ketiga kelompok dilakukan pembiusan dengan menggunakan ketamin. Setelah tikus putih terbius kemudian pada jaringan ulkus diusap dengan alkohol 70% lalu dilakukan pengambilan jaringan ulkus pada mukosa labial tikus wistar (Taufik, 2013).

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 (Erna, 2002; Sheldon dan Sommers, 1995).

b. *Embedding*

Jaringan ulkus dimasukkan pada beberapa cairan yaitu *acetone* selama 1 jam x 4, *Xylo*l selama ½ jam x 4, *paraffin* cair selama 1 jam x 3 dan penanaman jaringan kulit pada *paraffin* blok (Erna, 2002; Sheldon dan Sommers, 1995).

c. *Slicing*

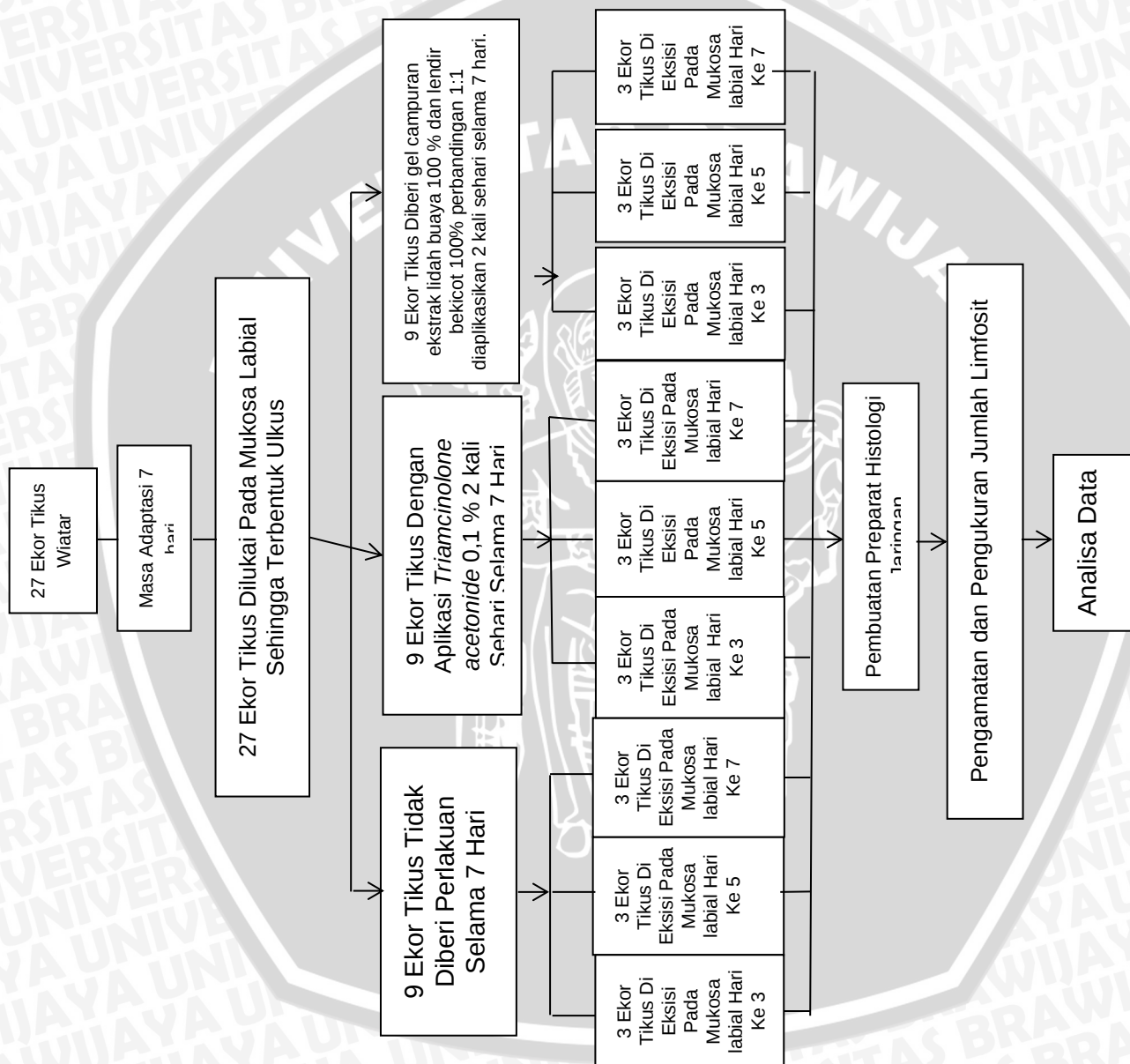
Blok yang sudah tertanam jaringan ulkus diletakkan pada balok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram microtom rotary* kemudian sayat jaringan ulkus secara vertikal dengan ukuran 4 mikron. Sayatan jaringan ulkus yang dibentuk pita diambil dengan menggunakan kuas kecil, kemudian letakkan pada *water bath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C. Setelah sayatan jaringan ulkus merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam (Erna, 2002; Sheldon dan Sommers, 1995).

d. *Staining*

Object glass dimasukkan dalam *Xylo*l 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 *Litium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15

menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarnaan *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* (Erna, 2002; Sheldon dan Sommers, 1995).

4.7.7 Kerangka operasional penelitian



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

4.8 Analisa Data

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

- 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 data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- 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.
- Uji *One-Way ANOVA*: Bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan yang memiliki varian homogen dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- Post Hoc Test* (Uji Least Significant Difference): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Jika hasil uji H_0 diterima (tidak ada perbedaan) maka uji Post Hoc sebagai lanjutan dari *One-Way ANOVA* tidak perlu dilakukan, sebaliknya jika H_0 ditolak (ada perbedaan), uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One-Way ANOVA* dilakukan. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p=0,05$).

Pada penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu, uji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampelnya ≤ 50 kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test*. 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 limfosit antara kelompok tanpa perlakuan, aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1%, aplikasi gel campuran ekstrak etanol lidah buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) pada proses penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar (*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 *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* (Dahlan, 2008)

