

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in vivo* pada tikus putih galur *Wistar* jantan dengan rancangan *post test only control group design*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur *Wistar*.

2. Sampel

Jumlah sampel dihitung dengan rumus Federer, sebagai berikut:

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

keterangan: n = sampel

t = jumlah kelompok

Jumlah kelompok (t) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 kelompok dan masing-masing kelompok akan didekapitasi sebanyak empat kali yaitu pada hari pertama, ketiga, kelima, dan kedelapan untuk mengetahui pola jumlah sel limfosit, maka $t = 3 \times 4 = 12$.

Hasil perhitungan dari rumus Federer tersebut didapatkan jumlah tikus menjadi 3 ekor tikus sampel per kelompok. Jumlah seluruh sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 36 ekor tikus.

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus yang sehat atau aktif.
- 2) Tikus putih galur *Wistar* jantan berumur 2-3 bulan.
- 3) Berat badan tikus putih 200-250 gram.
- 4) Kedalaman luka gingiva hingga batas antara *attch gingiva* dengan tulang alveolar.
- 5) Lebar luka kurang lebih 5 mm.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus yang diketahui sakit atau mati dalam jangka waktu penelitian

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Pembuatan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY), sedangkan pembuatan gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT UGM). Penelitian pada hewan uji dilakukan di laboratorium hewan uji FKIK UMY. Pembuatan preparat dilakukan di laboratorium patologi anatomi Asri Medical Centre (AMC), serta pembacaan preparat dan penghitungan jumlah sel dilakukan di laboratorium histologi FKIK UMY.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai bulan Januari 2017.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

Gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*).

2. Variabel terpengaruh

Jumlah sel neutrofil pada proses penyembuhan luka gingiva tikus *Wistar*.

3. Variabel terkendali

- a. Galur tikus : *Wistar*
- b. Umur tikus : 2-3 bulan
- c. Jenis kelamin : jantan
- d. Berat badan tikus : 200-250 gram
- e. Makanan tikus : pellet tipe broiler-11 dan air mineral
- f. Diameter luka pada tikus : 2,5 mm
- g. Volume, waktu, dan lama aplikasi bahan

4. Variabel tak terkendali

- a. Kondisi sistemik individual tikus
- b. Kondisi rongga mulut individual tikus (pH saliva, volume saliva, mikroorganisme dalam rongga mulut)
- c. Kontaminasi bakteri rongga mulut tikus

E. Definisi Operasional

1. Gel biji jintan hitam adalah suatu sediaan gel berkonsentrasi 10% yang terbuat dari ekstrak etanol 70% biji jintan hitam yang telah dilarutkan dalam aquades sebagai bahan dasar dan serbuk CMC-Na sebagai *gelling agent* kemudian dioleskan di bagian gingiva tikus yang telah diberi perlukaan.
2. Neutrofil adalah sel terbanyak yang terdapat dalam leukosit. Neutrofil memiliki dua tipe bentuk yaitu berbentuk batang dan segmen. Neutrofil akan mengalami kemotaksis pada jaringan yang luka, sehingga pada penelitian ini penghitungan sel neutrofil dilakukan pada jaringan perlukaan dan mencakup neutrofil batang dan neutrofil segmen.
3. Luka gingiva adalah perlukaan pada gingiva tikus yang dibuat dengan menggunakan *scalpel* dengan lebar luka 5 mm sedalam batas *attached gingiva* dengan tulang alveolar insisivus sentralis mandibula.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Alat penyaring ekstrak
 - b. Timbangan
 - c. Lemari pengering
 - d. Alat penyerbuk
 - e. *Scalpel*
 - f. Mikroskop cahaya
 - g. Objek *glass* dan deck *glass*

- h. Pot wadah untuk menyimpan gel
- i. Gunting bedah
- j. Pinset
- k. Kandang tikus diberi kode nomor

2. Bahan Penelitian

- a. Tikus *Wistar* jantan
- b. Biji jintan hitam 2 kg
- c. Aloclair® sebagai kontrol positif
- d. CMC-Na sebagai kontrol negatif
- e. Etanol 70% untuk pelarut ekstrak
- f. Kapas steril
- g. Natrium CMC (CMC-Na) sebagai *gelling agent*
- h. Hematoksilin Eosin (HE)
- i. Eter
- j. *Buffer* formalin 10 %
- k. Mikrotom
- l. *Hot plate*
- m. *Xylol*
- n. *Water bath*
- o. Eter

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

Pembuatan ekstrak etanol biji jintan hitam dilakukan di laboratorium Farmakologi FKIK UMY. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Biji jintan hitam 2 kg dicuci, kemudian dikeringkan selanjutnya biji jintan hitam diblender dan disaring, setelah itu di ambil serbuknya. Serbuk tersebut direndam didalam etanol 70% hingga serbuk tergenang selama 24 jam dan disaring dua kali hingga didapatkan ekstrak kental 100%. Larutan yang diperoleh dipanaskan hingga menguap dan menyisakan ekstrak kental atau pekat.

2. Pembuatan gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

a. Tahap persiapan

Pembuatan gel biji jintan hitam di LPPT UGM. Gel yang dibuat terdiri dari ekstrak dan *gelling agent*. *Gelling agent* menggunakan bahan *Sodium CMC* 3 gram (5%) dan aquades steril 60 ml (10%).

Proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan *gelling agent* yaitu serbuk CMC-Na.
- 2) CMC-Na ditimbang seberat 3 gram, dimasukkan kedalam 3 gelas ukur, masing-masing berisi 1 gram.
- 3) Bahan dasar dilarutkan dengan aquades sebanyak 17 ml untuk gel konsentrasi 10%, lalu diaduk sedikit demi sedikit hingga rata.

- 4) Menambahkan ekstrak biji jintan hitam sebanyak 2 gram untuk mendapatkan gel berkonsentrasi 10%.
- 5) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan menyatukannya dengan serbuk CMC-Na, kemudian diaduk hingga membentuk massa gel.
- 6) Dua puluh gram gel ekstrak biji jintan hitam berkonsentrasi 10% yang menjadi padat didapatkan, kemudian disimpan didalam lemari es bersuhu 4-6°C.

3. Perlakuan pada tikus

a. Tahap persiapan

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan atau diaklimatisasi selama satu minggu. Hewan uji yang berjumlah 36 ekor dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu 12 ekor masuk dalam kelompok I (kontrol positif, diaplikasikan Aloclair), 12 ekor kelompok II (kontrol negatif, diaplikasikan CMC-Na), 12 ekor kelompok III (perlakuan gel biji jintan hitam konsentrasi 10%). Masing-masing kelompok ditempatkan pada kandang yang berbeda dengan lingkungan yang sama.

b. Sterilisasi alat

Sebelum dilakukan perlakuan pada hewan coba, semua alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan alkohol. Tujuan dari sterilisasi ini adalah untuk menghindari adanya kontaminasi patogen yang tidak diinginkan pada penelitian ini.

c. Membuat perlukaan dan aplikasi bahan

Hari ke nol (0), perlukaan dengan menggunakan *scalpel* atau pisau bedah dilakukan pada *attached gingiva* gigi *insisivus sentralis* 36 ekor tikus yang telah dibius menggunakan eter, kemudian diaplikasikan bahan sesuai dengan kelompok perlakuan. Tiga ekor tikus dari masing-masing kelompok dikorbankan pada hari pertama, ketiga, kelima, dan kedelapan untuk didekapitasi dan dibuat preparat. Pengorbanan hewan uji dilakukan pada hari pertama untuk mengetahui jumlah sel neutrofil yang mengalami kemotaksis pada jaringan, hari ketiga dan kelima untuk melihat jumlah sel neutrofil pada fase inflamasi dan peralihan menuju fase proliferasi, dan pada hari kedelapan untuk mengetahui jumlah sel neutrofil pada fase proliferasi.

4. Pembuatan sediaan histopatologi

Jaringan gingiva diambil pada daerah perlukaan kemudian, dibersihkan dengan cairan fisiologis. Jaringan yang diambil difiksasi menggunakan *buffer* formalin 10% maksimum selama 24 jam. Skapel digunakan untuk memotong jaringan setelah fiksasi selesai dan dimasukkan kedalam *automatic tissue processor*, kemudian dehidrasi dengan alkohol 99% secara bertahap untuk membersihkan sisa-sisa fiksatif. Alkohol yang tersisa dibersihkan dengan *clearing xylol* selanjutnya dilakukan prosedur penanaman. Prosedur tersebut dilakukan dengan infiltrasi parafin cair pada suhu 57-59⁰ C kedalam

kotak parafin untuk mengisi rongga dalam jaringan yang ditempati oleh air sehingga terbentuk blok parafin.

Blok parafin dimasukkan kedalam *freezer* untuk didinginkan agar tidak terlalu lunak, kemudian dari setiap blok parafin dilakukan pengirisan jaringan setebal 3-4 μm menggunakan *mikrotom*. Irisan jaringan dimasukkan kedalam *water bath* pada suhu sekitar 50°C , setelah itu diinkubasikan pada *hot plate* suhu $40-50^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit untuk menguapkan air pada jaringan.

Irisan jaringan dideparafinisasi dengan *xylol* diikuti dengan rehidrasi menggunakan alkohol secara bertingkat untuk menghilangkan *xylol*. Sisa-sisa alkohol dibersihkan dengan membasuh preparat dibawah air mengalir lalu mengaplikasikan cat Hematoksin Eosin (HE) yang memberi warna biru pada inti sel, membilas dibawah air mengalir untuk menghilangkan sisa cat, kemudian eosin sebagai bahan *counter stain* memberikan warna merah sebagai kontras. Preparat tersebut dicelupkan kedalam air untuk menghilangkan sisa eosin dan didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat untuk menghilangkan air. Tahap selanjutnya melakukan *clearing xylol* untuk memberikan warna bening pada jaringan dan *mounting* agar preparat awet serta menambah kejernihan.

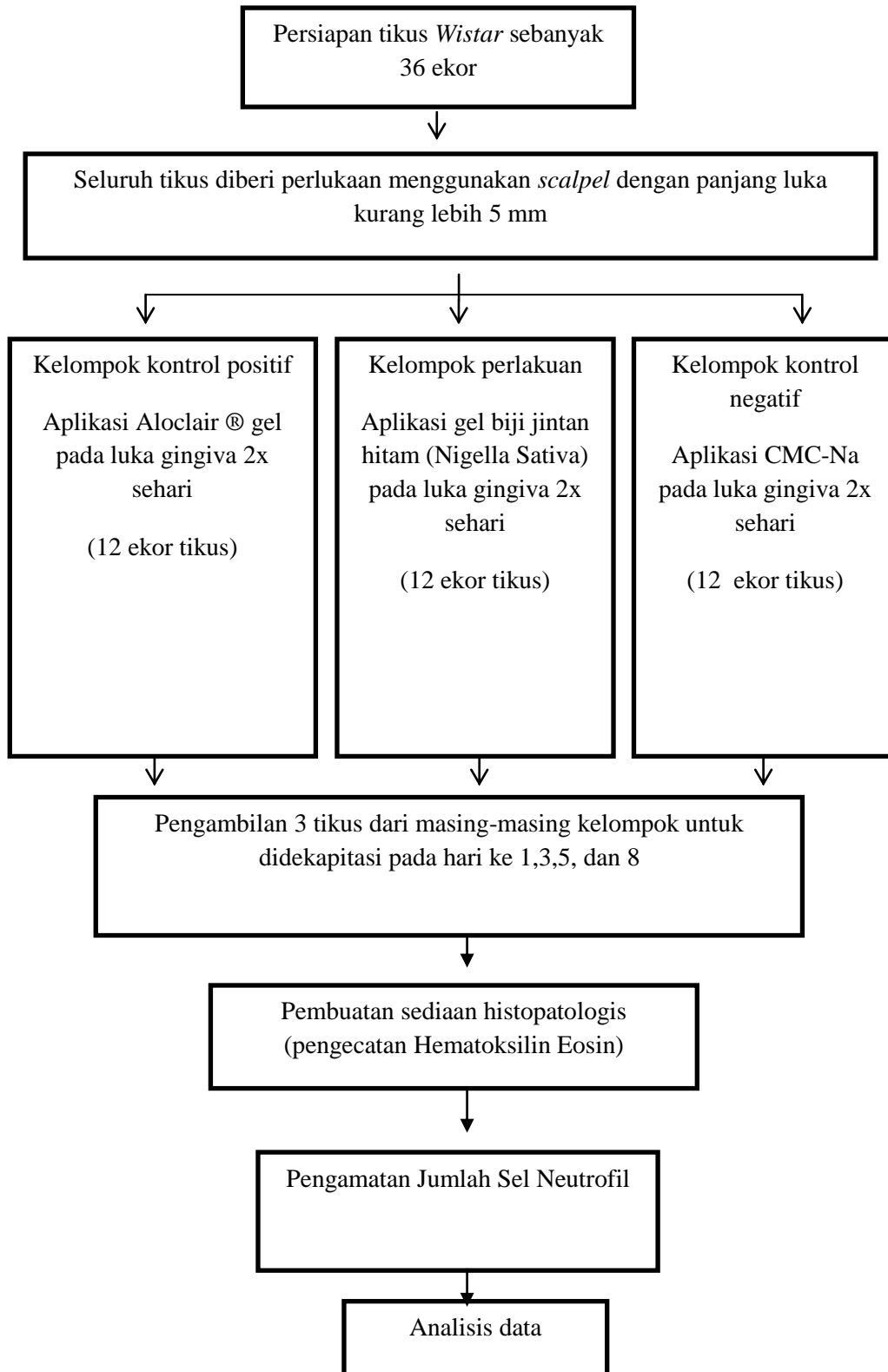
Tahap selanjutnya untuk melihat ada atau tidaknya sel neutrofil pada perlukaan gingiva, maka dilakukan pewarnaan HE. Prosedur pewarnaan HE adalah deparafinisasi dengan menggunakan larutan

xylol dan alkohol. Tahap selanjutnya proses dehidrasi dengan alkohol kemudian dicuci dengan air mengalir dan bilas dengan menggunakan aquades dan dilap. Setelah itu, kaca benda dimasukkan kedalam Hematoksin meyer's dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas aquades. Selanjutnya, proses pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda kedalam eosin serta dibilas menggunakan aquades. Pewarnaan dinilai dibawah mikroskop cahaya. Lanjutkan berikutnya yaitu proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Langkah selanjutnya dimasukkan kedalam larutan *xylol* dan terakhir *objek glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan mikroskop cahaya.

5. Interpretasi hasil

Pengamatan proses penyembuhan luka pada gingiva menggunakan pengamatan histologi dengan metode pengukuran *differential counting*, yaitu mengitung jumlah sel neutrofil pada 10x lapang pandang dengan perbesaran 40 x 10.

6. Alur Penelitian



H. Analisis Data

Analisis data pada penelitian menganalisis perbedaan antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kontrol perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA bila data berdistribusi normal dan variansi data sama, jika tidak maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak, digunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50, sedangkan untuk menguji variansi data sama atau berbeda digunakan uji *Levene*.