

## 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

##### 1. Populasi

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

##### 2. Sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus ferderer sebagai berikut:

Rumus Ferderer :  $(n-1) (t-1) \geq 15$

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 Ferderer tersebut didapatkan jumlah tikus menjadi 3 ekor tikus sampel per kelompok. Jumlah seluruh sampel yang dibutuhkan pada penelitian adalah 36 ekor tikus.

### **C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

#### 1. Kriteria Inklusi

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

#### 2. Kriteria Eksklusi

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

### **D. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### 1. Lokasi

Pembuatan gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan di LPPT unit 1 UGM. Perlakuan pada tikus yaitu perlukaan dan aplikasi bahan dilakukan di Laboratorium Hewan Uji FKIK UMY. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi AMC sedangkan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi UMY.

#### 2. Waktu

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

## **E. Variabel Penelitian**

### 1. Variabel pengaruh

Gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

### 2. Variabel terpengaruh

Jumlah sel limfosit pada proses penyembuhan luka gingiva tikus *Wistar*

### 3. Variabel terkontrol

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.) Panjang luka pada tikus 5 mm, kedalaman sampai tulang alveolar

g.) Volume, waktu, dan lama aplikasi bahan

### 4. Variabel tak terkontrol

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

## **F. 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 (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebagai

*gelling agent* kemudian dioleskan dibagian gingiva tikus yang telah diberi perlukaan.

2. Limfosit adalah agen utama respon imun dalam tubuh. Sel limfosit merupakan sel paling kecil yang terdapat pada jaringan ikat. Sebagian limfosit terbentuk di jaringan ikat dan menetap. Tetapi sel limfosit dapat keluar-masuk sirkulasi. Jika dilakukan pewarnaan dengan menggunakan HE sel ini tampak bulat, ungu, dan inti hampir memenuhi seluruh sel.
3. Luka gingiva adalah perlukaan pada gingiva tikus yang dibuat dengan menggunakan scalpel, sepanjang 5 mm pada daerah *attached gingiva* incisivus sentralis mandibula dan kedalaman sampai menyentuh tulang alveolar.

#### **G. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat Penelitian
  - a.) Timbangan
  - b.) Lemari pengering
  - c.) Alat penyerbuk
  - d.) Alat penyaring ekstrak
  - e.) Pot wadah untuk menyimpan gel
  - f.) Objek *glass* dan deck *glass*
  - g.) Scalpel
  - h.) Gunting bedah
  - i.) Pinset
  - j.) Mikroskop cahaya
  - k.) Kandang tikus diberi kode nomer

## 2. Bahan Penelitian

- a.) Tikus *Wistar* jantan
- b.) Biji jintan hitam 2 kg
- c.) Aloclair gel 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.) *Hematoksin Eosin* (HE)
- i.) Eter
- j.) *Buffer* formalin 10 %
- k.) *Hot plate*
- l.) Mikrotom
- m.) *Clearing xylitol*
- n.) *Water bath*

## H. Jalannya Penelitian

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

Pembuatan ekstrak etanol biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Kedokteran UMY. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Biji jintan hitam 2 kg dibersihkan dengan cara dicuci, kemudian dikeringkan selanjutnya biji jintan hitam diblender dan disaring untuk diambil serbuknya. Serbuk direndam dalam etanol 70% selama 24 jam dan disaring dua kali hingga didapatkan ekstrak kental 100%.

Larutan yang diperoleh dipanaskan pada suhu 80°C hingga menguap dan menyisakan ekstrak kental atau pekat.

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

Pembuatan gel biji jintan hitam di LPPT unit 1 UGM Yogyakarta. Gel yang dibuat terdiri dari ekstrak dan *gelling agent*. *Gelling agent* menggunakan bahan *Sodium CMC* 3 gram (5%) dan aquades 60 ml (10%) steril.

Proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan *gelling agent* yaitu serbuk CMC-Na.
- b. CMC-Na ditimbang seberat 3 gram, dimasukkan kedalam 3 gelas ukur, masing-masing berisi 1 gram.
- c. Bahan dasar dilarutkan dengan aquades sebanyak 17 ml untuk gel konsentrasi 10%, lalu diaduk sedikit demi sedikit hingga rata.
- d. Menambahkan ekstrak biji jintan hitam sebanyak 2 gram untuk mendapatkan gel berkonsentrasi 10%.
- e. Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan menyatukannya dengan serbuk CMC-Na, kemudian diaduk hingga membentuk massa gel.
- f. 20 gram gel ekstrak biji jintan hitam berkonsentrasi 10% yang menjadi padat telah 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), tikus dibius kemudian diberikan perlukaan sepanjang 5 mm dengan menggunakan scalpel pada gingiva 36 ekor tikus, 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 limfosit pada fase hemostasis, hari ketiga dan kelima untuk melihat jumlah sel limfosit pada fase inflamasi dan peralihan menuju fase proliferasi, serta pada hari kedelapan untuk mengetahui jumlah sel limfosit pada fase proliferasi.

4. Pembuatan sediaan histopatologi

Jaringan gingiva diambil pada daerah perlukaan kemudian, dibersihkan dengan cairan fisiologis. Jaringan yang diambil dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan cara fiksasi menggunakan *buffer* formalin 10% maksimum selama 24 jam. Scalpel 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 57-59<sup>0</sup> 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  $\mu\text{m}$  menggunakan *mikrotom*. Irisan jaringan dimasukkan kedalam *water bath* pada suhu sekitar 50<sup>0</sup> C, setelah itu diinkubasikan pada *hot plate* suhu 40-50<sup>0</sup> 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 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 limfosit pada perlukaan gingiva maka dilakukan pewarnaan Hematoksin Eosin (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. Pewarnaan yang dianggap baik dilanjutkan langkah 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 *diferensial counting*, yaitu

menghitung jumlah sel limfosit pada 10x lapang pandang dengan perbesaran 40x10.

### **I. Analisis Data**

Analisis data pada penelitian yaitu menganalisis perbedaan antara kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan, dan kelompok kontrol negatif, dengan menggunakan uji ANOVA bila data berdistribusi normal, sedangkan apabila data tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak, dilakukan pengujian dengan *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari lima puluh.

**J. Alur Penelitian**