

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vivo* pada tikus jantan Sprague-Dawley.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Penelitian ini menggunakan tikus Sprague-Dawley jantan. Tikus ini diperoleh dari Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada. Tikus pada penelitian ini berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram.

2. Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer : $(n-1)(t-1) \geq 15$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

Perhitungan :

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

4,75 adalah jumlah sampel minimal maka pembulatangannya menjadi

$$n = 5$$

jadi jumlah sampel minimal adalah 5 dengan drop out 10% menjadi 6 ekor tikus di tiap kelompoknya.

a. Kriteria inklusi

- 1) Tikus putih galur Sprague-Dawley jantan berumur 2-3 bulan
- 2) Berat badan tikus 200-300 gram, dan tidak boleh ada perbedaan yang jauh antar berat badan tikus sehingga lebih valid
- 3) Tikus dalam keadaan sehat dan aktif

b. Kriteria eksklusi

- 1) Tikus sakit atau mati saat penelitian.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Pembuatan ekstrak daun kelor dilakukan di Laboratorium Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM). Penelitian pada hewan uji coba dilakukan di Laboratorium Farmakoterapi Dan Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM).

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September sampai Oktober 2014.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%.

2. Variabel terpengaruh

Waktu perdarahan gingivitis pada tikus jantan Sprague-Dawley.

3. Variabel terkontrol

- a. Spesies tikus galur Sprague-Dawley
- b. Jenis kelamin tikus jantan
- c. Umur tikus jantan 2-3 bulan
- d. Berat badan tikus Sprague-Dawley jantan 200-300 gram
- e. Konsentrasi ekstrak kelor 5%,10% dan 15%
- f. Makanan standar tikus (pellet)
- g. Konsentrasi bakteri
- h. Tekanan dan kedalaman probing

4. Variabel tak terkontrol

- a. Kondisi sistemik tiap individu tikus jantan Sprague-Dawley.
- b. Kondisi psikologis tikus jantan Sprague-Dawley.
- c. Kontaminasi rongga mulut tikus jantan Sprague-Dawley.

E. Definisi Operasional

1. Gingivitis

Gingivitis pada penelitian ini diperoleh dengan menginjeksi sulkus gingiva tikus dengan bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tikus diinjeksi bakteri dengan konsentrasi 1×10^8 CFU sebanyak 0,02 ml. selama 16 hari dengan ketentuan 3 hari sekali hingga terjadi gingivitis lesi tahap lanjut.

2. Ekstrak Etanol Daun Kelor

Ekstrak etanol daun kelor adalah sediaan zat aktif dalam bentuk serbuk dari daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol. Daun kelor diperoleh di kawasan prambanan. Daun yang diambil adalah daun yang berupa daun kelor yang tua, berwarna hijau pekat, tidak terserang hama, penyakit dan terbebas pengganggu dan pencemar lainnya.

3. Tikus Jantan Sprague-Dawley.

Hewan uji tikus jantan Sprague-Dawley dengan umur 2-3 bulan dan berat 200-300 gram.

4. *Bleeding On Probing*

Pemeriksaan *bleeding on probing* dilakukan dengan memasukkan probe ke dalam poket gingiva dengan tekanan 20-25 gram dan digerakkan ke lateral sepanjang dinding poket gingiva.

5. Waktu Perdarahan Gingivitis

Waktu perdarahan gingivitis adalah waktu yang dihitung sejak darah keluar setelah *probing* hingga darah tidak terserap lagi oleh kassa dan di cek setiap 30 detik sekali.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus yang sudah diberi kode, *stopwatch*, sarung tangan, masker, alat tulis, probe, mesin penyerbuk, corong Bunchner, cawan porselin, cotton bud, timbangan analitik, jarum spuit, *vacuum rotary evaporator*, water bath dan oven.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor, tikus putih galur Sprague-Dawley jantan, kassa, kapas, eter, makanan standar tikus, aquades, feracrylum.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Pembuatan ekstrak daun kelor dilakukan di laboratorium penelitian dan pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pembuatan ekstrak daun kelor dengan cara maserasi. Prosedur pembuatan ekstrak yaitu sampel berupa daun kelor yang tua, bewarna

hijau pekat, tidak terserang hama, penyakit dan terbebas pengganggu dan pencemar lainnya sebanyak 1 kilogram . Daun dibersihkan dibawah air mengalir sebanyak 2 kali, ditiriskan pada nampan yang telah dilapiskan koran lalu dikeringkan dalam oven bersuhu 45°C. Sampel yang sudah kering lalu di giling halus dengan menggunakan mesin penyerbuk hingga menjadi serbuk/tepung. Tepung ini direndam dengan pelarut etanol 70% kemudian diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam, lalu disaring menggunakan corong Bunchner sampai 3x penyaringan. Fungsi penyaringan adalah untuk memisahkan filtrat dengan ampas. Filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*, lalu filtrat dipanaskan dengan water bath dengan suhu 70°C sampai diperoleh filtrat kental dengan konsentrasi 100%. Ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 100% kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 5%, 10% dan 15%.

2. Peradangan Pada Hewan Uji

Hewan uji berupa 30 tikus jantan Sprague-Dawley dibuat peradangan pada bagian gusi tahap tiga atau gingivitis tahap lanjut dengan cara menginjeksi sulkus gingiva dengan bakteri *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* sebanyak 0,02 ml dengan konsentrasi 1×10^8 CFU dilakukan 3 hari sekali dalam waktu 16 hari hingga mencapai gingivitis tahap lanjut.

3. Pengelompokan Hewan Uji

Tikus jantan Sprague-Dawley dimasukkan ke dalam kandang yang telah diberi tanda tiap kelompok, diberi makan standar tikus berbentuk pellet serta air minum dan diadaptasikan selama 7 hari.

Tiga puluh tikus jantan Sprague-Dawley ditimbang terlebih dahulu kemudian dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus.

a. Kelompok I (kontrol negatif)

Tanpa diberikan perlakuan pada daerah yang terjadi perdarahan pasca probing.

b. Kelompok II (kontrol positif)

Diaplikasikan Feracrylum pada daerah yang terjadi perdarahan pasca probing.

c. Kelompok III

Diaplikasikan ekstrak etanol daun kelor 5% pada daerah yang terjadi perdarahan pasca probing.

d. Kelompok IV

Diaplikasikan ekstrak etanol daun kelor 10% pada daerah yang terjadi perdarahan pasca probing.

e. Kelompok V

Diaplikasikan ekstrak etanol daun kelor 15% pada daerah yang terjadi perdarahan pasca probing.

4. Probing Gingiva

Peradangan pada gingiva tikus jantan Sprague-Dawley yang terjadi pada hari ke-17 setelah pemaparan bakteri lalu masukkan probe kedalam poket gingiva lalu gerakkan probe mengelilingi gigi. Lepaskan probe dan tunggu hingga terjadi perdarahan.

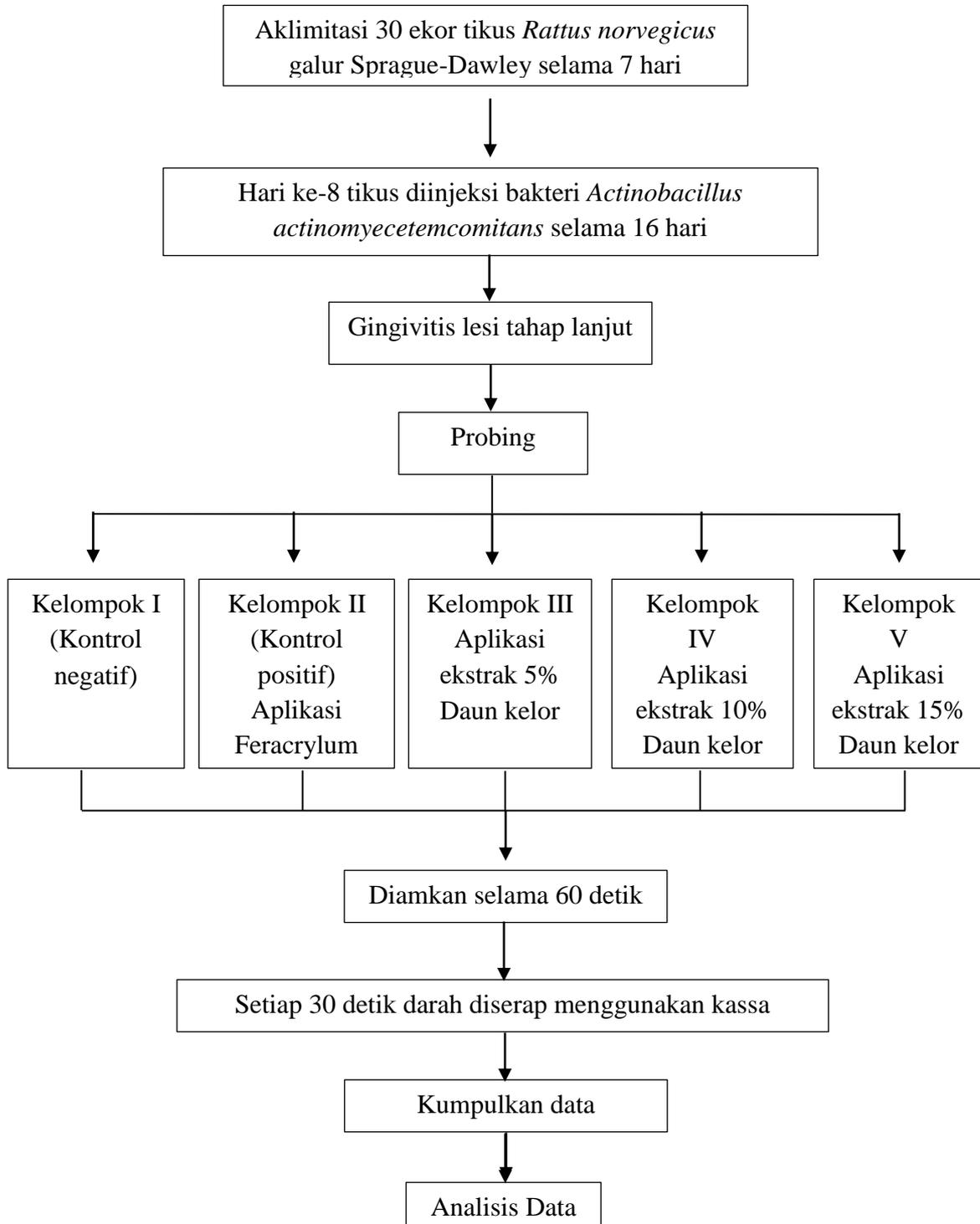
5. Pemberian Perlakuan

Perdarahan yang terjadi pada sulkus gingiva tikus jantan Sprague-Dawley segera lakukan perhitungan menggunakan *stopwatch* dan pada daerah probing diberi perlakuan sesuai kelompoknya. Semua perlakuan diaplikasikan dalam waktu 60 detik pada kelompok I hanya diaplikasikan aquades karena sebagai kontrol negatif dan pada kelompok II diaplikasikan Feracrylum sebagai kontrol positif sedangkan pada kelompok III diaplikasikan ekstrak etanol 5%, kelompok IV diaplikasikan ekstrak etanol kelor 10%, dan kelompok V diaplikasikan ekstrak etanol kelor 15%.

6. Pengamatan dan Pengumpulan Data

Pengaruh ekstrak etanol kelor terhadap waktu perdarahan gingivitis pada tikus jantan Sprague-Dawley dapat dilihat setelah semua kelompok diaplikasikan perlakuannya masing-masing selama 60 detik, waktu perdarahan diukur dengan cara menempelkan kertas saring pada daerah perdarahan gingivitis, tanpa tekanan. Hal ini dilakukan tiap 30 detik sekali. Bila perdarahan telah berhenti segera matikan *stopwatch* dan waktunya dicatat.

H. Alur Penelitian



Gambar 1. Alur penelitian

I. Analisis Data

1. Analisis deskriptif adalah statistik yang digunakan untuk menganalisis data dengan cara menggambarkan atau mendeskripsikan data yang telah didapat tanpa bermaksud membuat kesimpulan yang berlaku untuk umum. Tujuan analisis deskriptif adalah untuk memberikan gambaran (deskripsi) mengenai suatu data agar data yang tersaji menjadi mudah dipahami. Data deskriptif pada penelitian ini adalah hasil rerata waktu perdarahan gingivitis pada tikus Sprague-Dawley.
2. Analisis data analitik yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *one way ANOVA* yang bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan waktu perdarahan gingivitis pada setiap perlakuan pada kelompok yang berbeda. Syarat menggunakan uji *one way ANOVA* adalah data penelitian normal, data penelitian homogen, jumlah kelompok perlakuan >2 dan tidak berpasangan. Uji normalitas yang digunakan adalah uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Syarat menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk* adalah jumlah sampel kurang dari 50. Uji terakhir yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *post hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan. Syarat dilakukan uji *post hoc* LSD adalah bila hasil uji *one way ANOVA* $p < 0,05$.

J. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dan izin dari komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta sebelum penelitian dilaksanakan yaitu tanggal 30 Agustus 2014 (lampiran).