

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian yang bersifat eksperimental. Jenis dari penelitian ini adalah *The Eksperimental Design*. Adapun alasan menggunakan jenis rancangan ini karena pada eksperimen jenis ini hampir semua variabel penelitian dapat dikendalikan, sehingga efek variabel luar (variabel pengacau) tidak akan berpengaruh.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

- a. Pembelian marmut jantan di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM).
- b. Pemeriksaan kelayakan marmut dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Hewan UGM.
- c. Pembuatan ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Farmasi unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- d. Pembuatan gel ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin, Farmasi UMY (Universitas Muhammadiyah Yogyakarta)

- e. Seleksi Hewan uji, pencabutan gigi, dan dekapitulasi rahang marmut (*Cavia cobaya*) jantan di Fakultas Farmasi Unit III Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.
- f. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- g. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- h. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Makrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).

2. Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Juni 2014 sampai dengan Oktober 2014.

C. Subyek dan Sampel Penelitian

1. Subyek penelitian

- a. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah marmut yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang berjumlah 45 ekor. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada marmut dikendalikan.
- b. Bahan uji pada penelitian ini menggunakan ekstrak kulit jengkol (*Pithecellobiumlobatum*) dengan perbandingan konsentrasi 1%, 5%,10%.

2. Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer :

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variable

sehingga didapatkan,

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

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

$$n = 4,75$$

dengan pembulatan maka n = 5

Jumlah sampel minimal yang digunakan adalah 5 ekor marmut (*Cavia cobaya*) jantan. Apabila digunakan sample lebih dari 5 setiap kelompok maka akan lebih baik.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

a. Marmut jantan

- 1) Jenis kelamin : jantan
- 2) Umur : 2-3 bulan
- 3) Berat : 200-400 gram
- 4) Dalam keadaan sehat atau aktif

b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol yang sudah matang, berwarna coklat.

2. Kriteria Eksklusi

Marmut jantan

- a. Diketahui sedang mengalami inflamasi atau infeksi dan cacat fisik
- b. Diketahui mati sebelum perlakuan selesai

E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variable Penelitian

a. Variabel Pengaruh

- 1) Perlakuan coba adalah Gel ekstrak kulit jengkol dengan konsentrasi perbandingan 1%, 5% dan 10%.
- 2) Perlakuan kontrol adalah kontrol positif dengan cara mengaplikasikan *povidone iodine* 10% pada luka bekas pencabutan gigi, dan kontrol negatif yaitu tanpa perlakuan.

b. Variabel Terpengaruh

Angka fibroblas, pembentukan serabut kolagen, dan respon sel makrofag pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi pada marmut (*Cavia cobaya*) jantan.

c. Variabel Terkendali

- 1) Jenis kelamin marmut, jantan
- 2) Berat marmut 200 gram hingga 400 gram
- 3) Umur marmut sekitar 2-3 bulan
- 4) Makanan marmut
- 5) Bahan anastesi, menggunakan eter
- 6) Elemen gigi yang dicabut yaitu incisivus dexter mandibula

- 7) Alat pencabutan gigi yaitu eskavator dan tang cabut
- 8) Pengukuran pembuatan ekstrak dan pengenceran bahan uji
- 9) Pembuatan preparat histologi
- 10) Komplikasi pasca pencabutan gigi

d. Variabel Tidak Terkendali

- 1) Alergi
- 2) Besar perlukaan yang terjadi
- 3) Penyakit sistemik
- 4) Infeksi bakteri
- 5) Penurunan berat badan marmut jantan
- 6) Komplikasi pasca pencabutan

2. Definisi Operasional

a. Pencabutan Gigi

Ekstraksi atau pencabutan gigi adalah proses atau tindakan menarik keluar dan pengambilan gigi dari dalam mulut (Dorlan & Newman, 2002). Gigi dicabut menggunakan tang cabut dan elevator. Elemen gigi yang dicabut adalah gigi insisivus kiri bawah.

b. Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah suatu proses penghilangan debris inflamasi dan sel nekrotik (Chandrasoma dan Taylor, 2005).

c. Fibroblas

Fibroblas adalah salah satu sel yang berperan dalam proses penyembuhan luka, terutama pada fase proliferasi dan maturasi (Richard, 2004).

d. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstrak senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

e. Gel

Gel didefinisikan sebagai suatu sistem setengah padat yang tersusun baik dari partikel anorganik maupun organik dan saling diresapi cairan (Wardani, 2009).

F. Istrumen penelitian

1. Alat – alat

- a. Penyaring, untuk menyaring ekstrak
- b. Timbangan, untuk menimbang bahan
- c. Gelas ukur dan gelas beker, sebagai alat ukur
- d. *Water bath*, pemanas bahan
- e. Cahwan porselin, wadah pemanas bahan
- f. Sendok stenlistil, pengaduk gel

- g. Mortir, tempat pencampuran bahan
 - h. Botol gel, untuk menyimpan gel
 - i. Kaca alroji, untuk uji daya serap
 - j. Sentrifugator, untuk uji konsentrasi
 - k. Eksavator dan klem, untuk pencabutan gigi
 - l. Gunting bedah, untuk dekapitulasi rahang
 - m. Pot wadah, wadah organ
 - n. Mikroskop cahaya, untuk membaca preparat
 - o. *Objek glass* dan *deck glass*, sebagai alas preparat
 - p. Kandang marmut diberi kode nomor
2. Bahan
- a. Kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.)
 - b. *Povidone iodine* 15 ml (10%)
 - c. Etanol 70%, untuk pelarut ekstrak
 - d. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan
 - e. Ketamin 10 ml, untuk anestesi
 - f. Klorofom, untuk dekapitulasi marmut
 - g. *Cotton bud*, untuk pengolesan dalam perlakuan.
 - h. *Sodium CMC* (CMC-Na) 3 gram (5%)
 - i. Aquades 100 ml (10%) steril
 - j. Formalin 600 ml (10%)
 - k. Bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan *Mallory*
 - l. Rumput, untuk bahan pakan marmut

- m. Alkohol 70%
- n. Stik pH universal
- o. *Xylol*
- p. Kapas
- q. Sduit injeksi

G. Cara pengumpulan data

1. Tahap Persiapan

a. Ekstraksi Bahan Uji

Pembuatan ekstrak etanol kulit jengkol dilakukan di Laboratorium Farmasi unit III UGM. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Satu kilogram kulit jengkol dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian di keringkan. Langkah selanjutnya, kulit jengkol dipotong kecil, kemudian diblender dan disaring lalu diambil serbuknya sebesar 100 gram. Rendam di dalam etanol 70% selama 24 jam dan disaring lalu disaring lagi hingga didapatkan ekstrak kental 100%, kemudian larutan yang diperoleh dipanaskan diatas penangas hingga menguap dan menyisahkan ekstrak kental (pekat).

1) Pembuatan Bentuk Sediaan Gel

Pembuatan gel ekstrak kulit jengkol dilakukan pada Laboratorium Fitomedisin Farmasi UMY. Pembuatan gel terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-

bahan seperti *natrium* CMC (CMC-Na) 3 gram (5%) dan aquades 60 gram (10%) steril.

Adapun proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- a) Menyiapkan bahan dasar pembuat gel yaitu serbuk CMC-Na.
- b) Menimbang CMC-Na seberat 3gram, masukkan ke dalam 3 gelas ukur, tiap gelas ukur berisi 1 gram.
- c) Melarutkan bahan dasar dengan aquades sebanyak 18,8 gram untuk gel konsentrasi 1%, aquades 18gram untuk gel konsentrasi 5%, dan aquades 17 gram untuk gel konsentrasi 10%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.
- d) Menambahkan ekstrak kulit buah jengkol 0,2 gram untuk gel konsentrasi 1%, ekstrak kulit buah jengkol 1 gram untuk gel konsentrasi 5%, dan ekstrak kulit buah jengkol 2 gram untuk gel konsentrasi 10%.
- e) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan satukan dengan serbuk CMC-Na, aduk sampai rata sehingga membentuk masa gel.
- f) Setelah bahan menjadi padat akan menghasilkan 20 gram gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1%, 5%, dan 10%. Gel tersebut di masukkan kedalam botol gel dan disimpan didalam lemari es bersuhu 4-6°C.

Lalu dilakukan evaluasi sediaan gel, yaitu dengan cara :

a) Uji homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Caranya, geldioleskan pada kaca transparan dimana sediaan diambil 3 bagian yaitu atas, tengah dan bawah. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar.

b) Uji organoleptik

Uji organoleptik merupakan uji yang dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat.

c) Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk menjamin pemerataan gel saat diaplikasikan pada mukosa yang dilakukan segera setelah gel dibuat. Gel ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian diletakkan ditengah kaca bulat berskala. Di atas gel diletakkan kaca bulat lain atau bahan transparan lain dan pemberat sehingga berat kaca bulat dan pemberat 150 g, didiamkan 1 menit, kemudian dicatat diameter penyebarannya. Daya sebar gel yang baik antara 5-7 cm.

d) Uji konsistensi

Uji konsistensi dilakukan untuk mengetahui stabilitas sediaan gel yang dibuat dengan cara mengamati perubahan konsistensi sediaan setelah disentrifugasi. Uji konsistensi dilakukan dengan cara mekanik menggunakan sentrifugator dengan cara sediaan disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. Perubahan fisik diamati apakah terjadi pemisahan atau *bleeding* antara bahan pembentuk gel dan pembawanya yaitu air dan pengujian hanya dilakukan pada awal evaluasi.

e) Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan gel untuk menjamin sediaan gel tidak menyebabkan iritasi pada kulit. pH sediaan gel diukur dengan menggunakan stik pH universal. Stik pH universal dicelupkan ke dalam sampel gel yang telah diencerkan, diamkan beberapa saat dan hasilnya disesuaikan dengan standar pH universal. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH mukosa yaitu dalam interval 4,5 – 6,5.

2) Cara pengaplikasian gel

- a) Siapkan gel ekstrak kulit jengkol.
- b) Mengambil gel dengan menggunakan kapas dan dimasukkan pada soket luka pasca pencabutan gigi marmut 24 jam sekali.

c) Perlakuan tersebut terus dilakukan dari hari pertama sampai hari ketujuh pasca pencabutan gigi marmut jantan.

3) Persiapan Hewan Uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji yang berjumlah 45 ekor dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif (dengan diberi *povidone iodine 10%*) sebanyak 5 ekor, kelompok negatif (tanpa perlakuan) sebanyak 5 ekor, kelompok pengaplikasian gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 1%) sebanyak 5 ekor, kelompok pengaplikasian gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 5%) sebanyak 5 ekor, dan kelompok pengaplikasian gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 10%) sebanyak 5 ekor. Masing-masing kelompok ditempatkan dikandang yang berbeda dan diletakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

4) Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada setiap kegiatan pengujian diawali dengan proses sterilisasi alat dan bahan dengan menggunakan alkohol. Sedangkan untuk alat-alat pencabutan gigi disterilisasikan terlebih dahulu menggunakan autoklaf.

H. Jalannya Penelitian

1. Pencabutan Gigi Marmut Jantan (*Cavia cobaya*)

Marmut diinjeksikan ketamine dengan aquades sebagai pelarutnya. Dengan perbandingan 1 : 1, yaitu 0,3 ml ketamin + 0,3 ml aquades. Kemudian diinjeksikan pada pangkal paha marmut.

Dilakukan tindakan separasi satu menit kemudian. Tindakan separasi dilakukan dengan memisahkan gusi dan bagian servikal gigi dengan eksavator. Tindakan ekstraksi dimulai dengan klem ditempatkan di sulkus gingival. Gigi digerakkan ke arah labial dan lingual selama beberapa kali gigi kemudian dirotasi atau diputar dalam sumbunya dan klem ditarik ketika jaringan periodontalnya sudah terlepas seluruhnya.

Empat puluh lima ekor marmut dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol positif diaplikasikan *povidone iodine* 10% (kelompok I), kelompok negatif tanpa perlakuan (kelompok II) perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1% (kelompok III), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 5% (kelompok IV), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% (kelompok V).

Pada hari ke nol (0), 45 ekor marmut dicabut giginya, kemudiandiberi perlakuan pada masing-masing kelompok. Hari pertama, ketiga, ketujuh setelah pencabutan gigi, tiga ekor marmut dari masing-masing kelompok dikorbankan. Marmut kemudian di dekapitulasi untuk pengambilan soket mandibula.

2. Pembuatan Preparat

Organ rahang yang telah didekalsifikasi kemudian dimasukkan ke formalin 10% untuk disimpan dan selanjutnya dibuat preparat. Metode pembuatan preparat histopatologi berdasarkan Dirjen Kesehatan Hewan (1999) adalah sebagai berikut:

- a. Spesimen diambil segera setelah hewan mati, jika terlambat akan terjadi autolisis sehingga akan mengacaukan interpretasi.
 - b. Pemotongan jaringan dilakukan untuk spesimen agar berisi jaringan yang mengalami perubahan dari jaringan normal. Penelitian ini menggunakan pemotongan melintang.
 - c. Tebal specimen tidak boleh lebih dari 5 mm untuk mempermudah penetrasi cairan fiksasi.
 - d. Spesimen difiksasi segera dengan formalin 10%
 - e. Perbandingan volume specimen dengan larutan formalin adalah 1:10, agar didapat hasil fiksasi yang sempurna
 - f. Setiap *container* spesimen diberi label yang berisi informasi tentang identitas hewan, tanggal pengambilan specimen, macam specimen dan bahan pengawet yang dipakai.
 - g. Kontainer tersebut harus tertutup rapat dan tidak boleh bocor
 - h. Dihindarkan agar tidak membekukan jaringan yang akan dipilih dengan pemeriksaan histopatologi.
3. Pembacaan Preparat Histopatologi

Pembacaan preparat histopatologi dilakukan oleh ahli Patologi anatomi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Kriteria penilaian histologi fibroblas dibuat berdasarkan jumlah.

I. Analisis Data

Analisis respon sel fibroblas diuji dengan menggunakan *One-way Anova*. Uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro wilk*. Hubungan antara variabel dianalisa menggunakan *Tukey HSD*.

J. Etik Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak sampel selama proses penelitian dengan mendapatkan persetujuan dari komite etik bahwa penelitian dilakukan tidak melanggar kode etik penelitian.

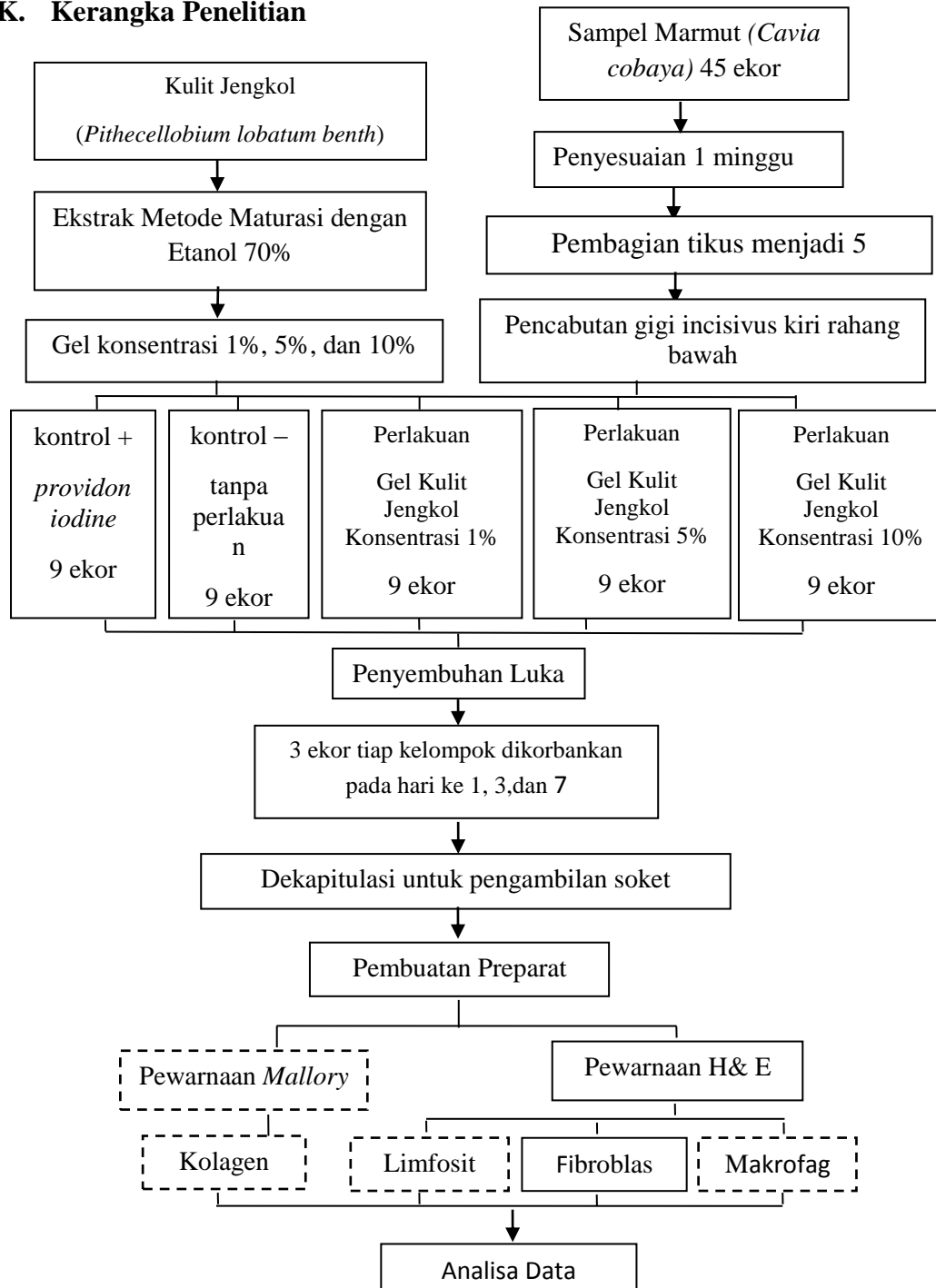
Setiap penelitian yang menggunakan hewan percobaan secara etik harus menerapkan prinsip umum etika penelitian kesehatan dan prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. Pelakuan terhadap hewan percobaan dituangkan secara rinci dalam protokol penelitian sebagai pengganti *informed consent* pada subjek manusia.

1. *Replacement* (penggantian) adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction* (penyempitan) diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum bisa dihitung dengan rumus Frederer. *Refinement* (pengurusan) adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawai (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti

hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakiti sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.

3. Prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus dengan memberikan akses makan dan minum yang sesuai. Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidaknyamanan, disediakan lingkungan bersih dan paling sesuai dengan biologi hewan percobaan yang dipilih. Ketiga, hewan coba harus bebas dari rasa nyeri dan penyakit dengan catatan tidak mengganggu penelitian yang sedang dijalankan. Keempat, saat euthanasia dilakukan dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba.

K. Kerangka Penelitian



Keterangan : Garis lurus (—) = dilakukan penelitian

Garis putus-putus (---) = tidak dilakukan penelitian

Gambar 2. Alur Penelitian