

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in vivo* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Pembuatan bahan gel *Chitosan* 3 % dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (UGM).

Penelitian pada hewan uji ini dilakukan di Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2014 sampai bulan Juli 2014.

C. Variabel Penelitian

1. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* dengan berat kurang lebih 150-200 gram, dan berumur kurang lebih dua bulan yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).

2. Bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah serbuk *chitosan* yang diperoleh dari PT. Biotech Surindo Cirebon Indonesia yang dijadikan bentuk sediaan gel dengan konsentrasi 3%, dan obat kimia Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia) 5 gram yang diperoleh dari salah satu apotik dikota Yogyakarta.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi merupakan karakteristik umum dari keadaan hewan uji yang sehat dan/atau aktif tidak terjangkit penyakit.
2. Kriteria Eksklusi merupakan diketahui bahwa hewan uji terjangkit penyakit dan/atau tidak aktif.

E. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel Pengaruh

Konsentrasi gel *Chitosan* 3%.

b. Variabel Terpengaruh

Lesi *Stomatitis Aphthosa* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

c. Variabel Terkendali

- 1) Jenis kelamin
- 2) Genetis
- 3) berat hewan uji
- 4) Umur hewan uji
- 5) Makanan hewan uji

- 6) Perawatan kandang hewan uji
 - 7) Konsentrasi dan jumlah Hidrogen Peroksida (H_2O_2) 10%
 - 8) Konsentrasi dan jumlah Lidokain 2 %
- d. Variabel Tidak Terkendali
- 1) Kontaminasi rongga mulut hewan uji
 - 2) Penurunan dan/atau kenaikan berat hewan uji pasca induksi *Stomatitis Aphthosa*.

2. Definisi Operasional

a) Gel *Chitosan*

Gel *chitosan* dengan konsentrasi 3% merupakan bahan aktif yang dibuat untuk proses penyembuhan sariawan. *Chitosan* yang digunakan diperoleh dari PT. Biotech Surindo Cirebon Indonesia yang dibuat dalam bentuk sediaan gel dengan menambahkan beberapa bahan seperti asam asetat 1%, aquades, gliserol 50 % dan *methyl paraben sodium salt* 0,1 %, dan Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia)

b) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih yang digunakan dalam penelitian adalah Galur *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY), dengan berat 150-200 gram.

c) Sariawan

Stomatitis Aphthosa atau Lesi pada mukosa hewan uji yang disembuhkan dengan gel *Chitosan* konsentrasi 3%, yang kemudian dilihat gambaran klinis nya secara makroskopis dengan melakukan pengukuran diameter lesi dengan menggunakan jangka sorong dan diamati.

d) Penyembuhan *Stomatitis Aphthosa*

Penyembuhan *Stomatitis Aphthosa* dilihat dan diamati dengan berkurangnya diameter lesi *Stomatitis Aphthosa*. Lesi dinyatakan sembuh apabila ukuran diameter lesinya sudah mencapai 0,0 mm. Secara makroskopis gambaran *Stomatitis Aphthosa* juga ditandai dengan adanya perubahan warna pada mukosanya yaitu seperti warna mukosa sehat.

F. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah serbuk *chitosan* yang diperoleh dari PT. Biotech Surindo Cirebon Indonesia, H₂O₂ 10%, lidokain 2%, asam asetat 1%, *aquades*, gliserol 50%, *methyl paraben sodium salt* 0,1%, serta Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia).

2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah masker, sarung tangan, pinset, spuit, camera, jangka sorong, pot (untuk menyimpan gel) dan *cotton bud* (untuk pengolesan gel dan obat

Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia)), serta kandang tikus.

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Gel *Chitosan* 3%

Sediaan gel *chitosan* dibuat dengan melarutkan serbuk *chitosan* dengan derajat deasetilisasi 90,2% (*medical grade*) dalam air, asam, dan gliserol. Dalam penelitian ini, 3 gram serbuk *chitosan* dilarutkan dalam larutan asam asetat 1% yang ditambahkan aquades, lalu ditambahkan gliserol 50% untuk mendapatkan konsistensi gel yang baik, selanjutnya ditambahkan methyl paraben sodium salt 0,1% sebagai bahan pengawet dan terbentuklah gel *chitosan* dengan konsentrasi 3%.

2. Pengelompokan Hewan uji

Hewan coba yang berjumlah 9 ekor dibagi kedalam 3 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok I : 3 ekor diinduksi *Stomatitis Aphthosa Aphthosa* tanpa diberikan perlakuan (kontrol negatif)
- b. Kelompok II : 3 ekor diinduksi *Stomatitis Aphthosa Aphthosa* diaplikasikan obat kimiawi Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia) (kontrol positif)
- c. Kelompok III : 3 ekor diinduksi *Stomatitis Aphthosa Aphthosa* dan diaplikasikan gel *Chitosan* dengan konsentrasi 3%

Masing –masing kelompok dikandangan dalam kandang yang sama sesuai dengan kelompok dan ditempatkan pada kondisi lingkungan yang sama.

3. Induksi *Stomatitis Aphthosa*

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 9 ekor di hari pertama sesudah adaptasi diberi perlakuan Hidrogen peroksida (H₂O₂) 10% dan lidokain 2% yang kemudian dioleskan ke mukosa hewan coba dengan menggunakan *cotton bud*, selama 3x sehari selama 10 menit agar terjadi radang pada mukosa mulutnya.

4. Pemberian Perlakuan

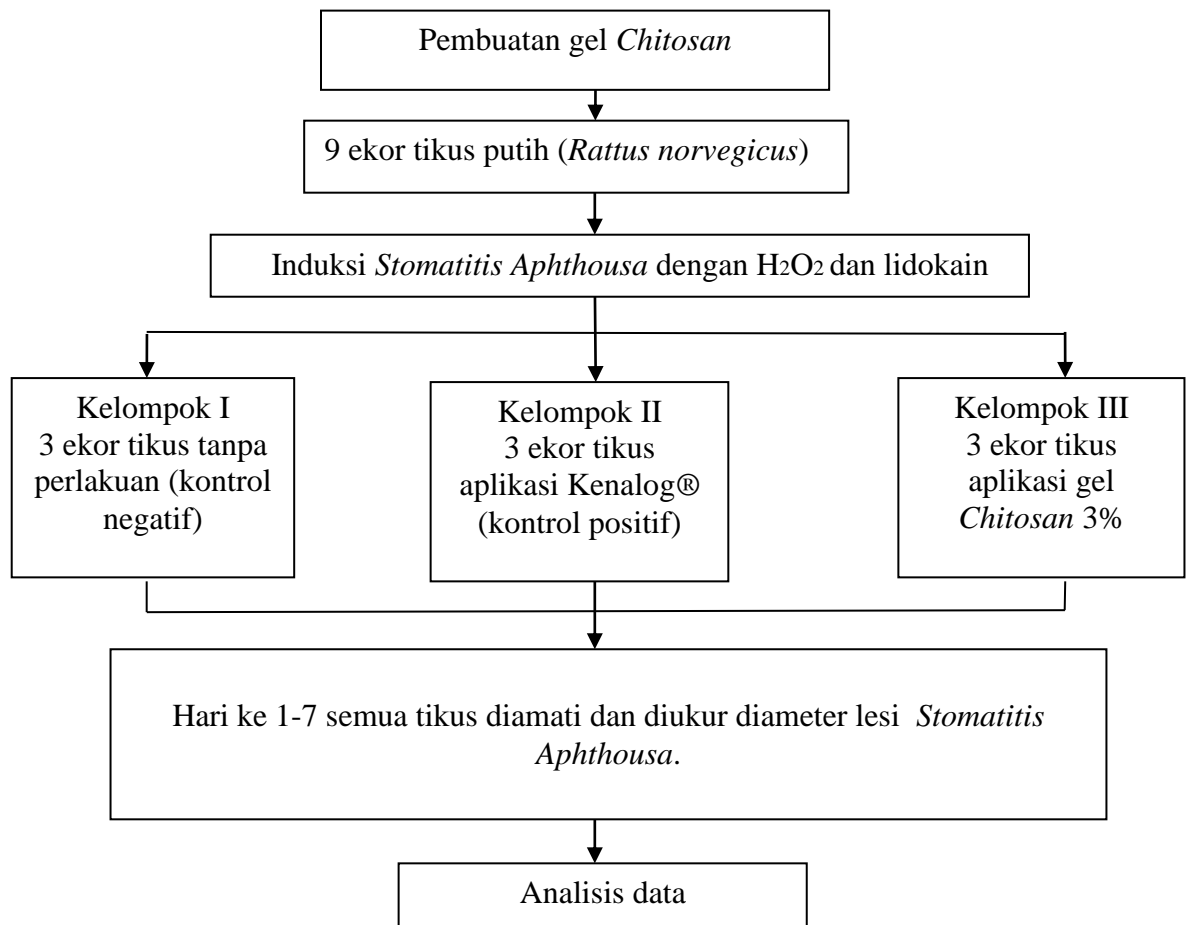
Setelah induksi *Stomatitis Aphthosa*, hari pertama tikus kelompok I (kontrol negatif) tidak diberi perlakuan hanya makan dan minum saja. Tikus kelompok II (kontrol positif) diberi perlakuan dengan Triamsinolon Asetonid (Kenalog in orabase®, Indonesia). Tikus pada kelompok III (kelompok perlakuan) diaplikasikan gel *Chitosan* 3%. Masing-masing kelompok diberi perlakuan tersebut selama 3x5 menit pada hari pertama dan seterusnya.

5. Pengukuran Diameter Lesi

Pada hari ke 1-7 setiap 3 ekor tikus dari kelompok I sampai III diamati secara klinis dan dilakukan pengukuran diameter lesi *Stomatitis Aphthosa* menggunakan jangka sorong. Kemudian keadaan lesi difoto. Pada hari ke 8, semua hewan uji dimatikan menggunakan anestesi *Ether*. Semua hewan uji satu persatu dimasukan kedalam

toples yang berisi anestesi *Ether* untuk membatu membuat hewan uji menjadi lemas kemudian mati. Hal ini bertujuan untuk mengurangi rasa sakit yang berkelanjutan pada hewan uji.

H. Kerangka Penelitian



Gambar 3. Skema Alur penelitian

I. Teknik Pengumpulan dan Analisis data

Pada penelitian ini, teknik pengumpulan data yang digunakan adalah pengukuran diameter lesi *Stomatitis Aphthosa* setiap hari sekali yang diukur dengan menggunakan jangka sorong. Adapun teknik analisis data

yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One Way Anova* (uji parametrik) satu jalur karena sampel lebih dari 2 kelompok, dan uji normalitas data menggunakan *Shaphiro-wilk* karena data kurang dari 50.