

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan eksperimental murni *in vivo*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Kulit buah jengkol diperoleh dari perkebunan jengkol di jalan raya Ngabul Jepara, Jawa Tengah.
- b. Pembuatan ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c. Pembuatan gel ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin, Program Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- d. Seleksi Hewan uji, pencabutan gigi, dan dekapitulasi rahang marmut (*Cavia cobaya*) jantan di Fakultas Farmasi Unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- e. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- f. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

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

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

a. Marmut (*Cavia cobaya*)

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah marmut yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Marmut yang digunakan 45 ekor dengan kriteria: jenis kelamin jantan dengan berat sekitar 200-400 gram dan umur 2-3 bulan. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada marmut dikendalikan.

b. Kulit buah jengkol

Buah jengkol diperoleh dari perkebunan jengkol di jalan raya Ngabul Jepara, Jawa Tengah. Buah jengkol yang sudah matang dengan ciri-ciri konsistensi keras, berwarna coklat dan kulit halus, dikupas kulitnya.

2. Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer (1963) :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

sehingga didapatkan,

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

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

$$n = 4,75$$

dengan pembulatan maka $n=5$ dan asumsi *drop out* 4 tiap kelompok, sehingga jumlah subjek penelitian yang digunakan pada tiap kelompok $n=9$ ekor. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, sehingga total subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 45 ekor marmut (*Cavia cobaya*).

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Subjek penelitian yang digunakan adalah 45 ekor marmut (*Cavia cobaya*) jantan dengan 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 dan aktif

b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol yang sudah matang dengan ciri-ciri konsistensi keras, berwarna coklat, dan kulit halus.

2. Kriteria eksklusi

a. Marmut jantan

- 1) Diketahui terjangkit penyakit atau tidak aktif
- 2) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai

b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol yang belum matang atau busuk, dengan ciri-ciri konsistensi lunak dan kulit kasar.

B. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi variabel penelitian

a. Variabel pengaruh

- 1) Perlakuan coba, yaitu gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1%, 5%, dan 10%.
- 2) Perlakuan kontrol, yaitu penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dikontrol dengan mengaplikasikan *povidone iodine* 10% pada luka pasca pencabutan gigi pada marmut (*Cavia cobaya*) jantan untuk kontrol positif dan tanpa perlakuan untuk kontrol negatif.

b. Variabel terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah peningkatan kepadatan kolagen pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi pada marmut (*Cavia cobaya*) jantan.

c. Variabel terkontrol

- 1) Jenis kelamin marmut, yaitu marmut (*Cavia cobaya*) jantan
- 2) Umur marmut sekitar 2-3 bulan
- 3) Berat marmut 200 gram hingga 400 gram
- 4) Makanan marmut menggunakan rumput
- 5) Bahan anastesi menggunakan ketamin
- 6) Elemen gigi yang dicabut yaitu insisivus kiri bawah
- 7) Alat pencabutan gigi yaitu eskavator dan klem
- 8) Pengukuran pembuatan gel ekstrak
- 9) Pembuatan preparat histologi
- 10) Pembacaan preparat histologi

d. Variabel tidak terkontrol

- 1) Infeksi bakteri
- 2) Penurunan berat badan marmut jantan
- 3) Komplikasi pasca pencabutan gigi

2. Definisi operasional

a. Pencabutan gigi

Pencabutan gigi adalah mengeluarkan seluruh bagian gigi bersama jaringan patologisnya dari dalam soket gigi. Pada pencabutan gigi hewan uji, alat yang digunakan adalah eskavator dan klem. Pertama, tindakan separasi dilakukan dengan memisahkan gusi dan bagian servikal gigi dengan eskavator. 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.

b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol mempunyai kandungan saponin, tanin, dan flavonoid yang berfungsi dalam proses penyembuhan luka. Kulit buah jengkol yang segar adalah kulit jengkol dengan konsistensi keras dan halus.

c. Kepadatan kolagen

Kolagen merupakan bagian utama jaringan ikat yang diperlukan pada proses penyembuhan luka dengan cara mengalami pergantian terus-menerus. Kriteria penilaian serabut kolagen adalah skor 0 menunjukkan tidak tampak gambaran serabut kolagen, skor 1 menunjukkan serabut kolagen terlihat tipis atau sedikit sekali, skor 2 menunjukkan serabut kolagen terlihat menyebar tipis, skor 3 menunjukkan serabut kolagen menyebar tebal, dan skor 4 menunjukkan serabut kolagen terlihat mengumpul tebal.

d. Ekstrak kulit buah jengkol

Ekstrak kulit buah jengkol adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstrak senyawa aktif dari simplisia nabati kulit buah jengkol menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstrak dengan metode maserasi dengan cara merendam di dalam etanol 70% selama 24 jam dan disaring lalu disaring lagi hingga didapatkan ekstrak kental 100%,

kemudian larutan yang diperoleh dipanaskan diatas pemanas hingga menguap dan menyisahkan ekstrak kental (pekat).

e. Gel kulit buah jengkol

Gel merupakan sediaan semi padat digunakan pada kulit, umumnya sediaan tersebut berfungsi sebagai pembawa pada obat-obat topikal, pelunak kulit atau sebagai pelindung. Pembuatan gel ekstrak kulit buah jengkol terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-bahan seperti *natrium* CMC (CMC-Na) 3 gram (5%) dan aquades 60 ml (10%) steril, sehingga diperoleh gel ekstrak kulit buah jengkol 1%, 5%, dan 10%.

C. Instrumen Penelitian

1. Bahan

- a. Kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) 2,5 kg
- b. *Povidone iodine* 15 ml (10%), untuk kontrol positif
- 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. *Natrium* CMC (CMC-Na) 3 gram (5%)
- i. Aquades 100 ml (10%) steril
- j. Formalin 600 ml (10%)
- k. Pewarnaan *Mallory*

- l. *Hematoksin Meyers*
 - m. Rumput, untuk bahan pakan marmut
 - n. Alkohol 70%
 - o. Stik pH universal
 - p. *Xylol*
 - q. Kapas
 - r. Spuit injeksi
2. 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 stainless, pengaduk gel
 - g. Mortil, tempat pencampuran bahan
 - h. Botol flakon, untuk penyimpanan ekstrak
 - i. Kaca alroji, untuk uji daya serap gel
 - j. Sentrifugator, untuk uji konsentrasi
 - k. Eksavator dan klem, untuk pencabutan gigi
 - l. Gunting bedah, untuk dekapitulasi rahang
 - m. Pot wadah, untuk penyimpanan gel dan wadah organ
 - n. Mikroskop cahaya, untuk membaca preparat
 - o. *Objek glass* dan *deck glass*, sebagai alas preparat

- p. Kandang marmut diberi kode nomor

D. Cara Kerja

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%. Kulit jengkol 2,5 kg 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 hingga menguap dan menyisahkan ekstrak kental (pekat).

b. 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 ml (10%) steril.

Adapun proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan bahan dasar pembuat gel yaitu serbuk CMC-Na.
- 2) Menimbang CMC-Na seberat 3 gram, masukkan ke dalam 3 gelas ukur, tiap gelas ukur berisi 1 gram.

- 3) Melarutkan bahan dasar dengan aquades sebanyak 18,8 ml untuk gel konsentrasi 1%, aquades 18 ml untuk gel konsentrasi 5%, dan aquades 17 ml untuk gel konsentrasi 10%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.
- 4) 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%.
- 5) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan satukan dengan serbuk CMC-Na, aduk sampai rata sehingga membentuk massa gel.
- 6) 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.

Evaluasi sediaan gel, dilakukan dengan cara :

- 1) 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 (Ditjen POM, 2000).

- 2) Uji homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Homogen

sediaan gel dapat diketahui dengan mengoleskan sebagian sediaan gel pada serpihan kaca atau bahan transparan lainnya (Muthalib dkk., 2013). Gel dioleskan pada kaca transparan dimana sediaan diambil tiga bagian yaitu atas, tengah, dan bawah. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar (Ditjen POM, 2000).

3) 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. Sediaan yang memenuhi kriteria pH mukosa yaitu dalam interval 4,5–6,5 (Ditjen POM, 2000).

4) 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 gram 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 gram, didiamkan satu menit, kemudian dicatat diameter penyebarannya. Daya sebar gel yang baik antara 5-7cm (Ditjen POM, 2000).

5) 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 lima jam. Perubahan fisik diamati apakah terjadi pemisahan atau *bleeding* antara bahan pembentuk gel dan pembawanya yaitu air dan pengujian hanya dilakukan pada awal evaluasi (Ditjen POM, 2000).

d. Cara pengaplikasian gel

- 1) Menyiapkan gel ekstrak kulit jengkol.
- 2) Mengambil gel dengan menggunakan *cotton but* dan dimasukkan kedalam soket luka pasca pencabutan gigi marmut 24 jam sekali.
- 3) Perlakuan tersebut terus dilakukan dari hari pertama sampai hari ketujuh pasca pencabutan gigi marmut jantan.

e. Persiapan hewan uji

Persiapan sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan (diaklimatisasi) selama 1 minggu. Hewan uji yang berjumlah 45 ekor dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok I (kontrol positif diaplikasikan *povidone iodine* 10%) sebanyak 9 ekor, kelompok II (kontrol negatif tanpa perlakuan) sebanyak 9 ekor, kelompok III (perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1%) sebanyak 9

ekor, kelompok IV (perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 5%) sebanyak 9 ekor, dan kelompok V (perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10%) sebanyak 9 ekor. Masing-masing kelompok di kandang yang berbeda dan di letakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

f. Sterilisasi alat dan bahan

Pada saat kegiatan pengujian diawali dengan proses sterilisasi alat penelitian dengan alkohol.

2. Jalannya penelitian

a. Pencabutan gigi marmut jantan (*Cavia cobaya*)

Marmut dilakukan anestesi dengan pemberian injeksi ketamin dengan aquades sebagai pelarutnya, dengan perbandingan 1 : 1, yaitu 0,3 ml ketamin + 0,3 ml aquades, kemudian diinjeksikan pada pangkal paha marmut. Posisi marmut harus terbalik dan kaki ditarik keluar agar paha bagian belakang terlihat serta posisi jarum sejajar dengan tubuh atau abdomen. Suntikkan tidak boleh terlalu dalam agar tidak terkena pembuluh darah, selanjutnya dilakukan tindakan separasi. 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), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1% (kelompok III), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 5% (kelompok IV), dan kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% (kelompok V).

Hari ke nol (0), 45 ekor marmut dicabut giginya, kemudian diberi perlakuan pada masing-masing kelompok. Pada hari pertama, ketiga, dan ketujuh setelah pencabutan gigi, tiga ekor marmut dari masing-masing kelompok dikorbankan. Pengamatan dalam penelitian ini dilakukan pada hari pertama, ketiga, dan ketujuh, karena pada hari ketiga sudah mulai tampak serabut kolagen pada luka, pada hari ketujuh proliferasi kolagen semakin meningkat dan kolagen yang telah terbentuk menjadi padat, sedangkan hari pertama sebagai pengamatan untuk melihat serabut pada awal fase inflamasi (Alimun, 2008). Marmut kemudian didekapitulasi (pengambilan rahang).

b. 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 :

- 1) Spesimen diambil segera setelah hewan mati, jika terlambat akan terjadi autolisis sehingga akan mengacaukan interpretasi.
- 2) Dilakukan pemotongan jaringan untuk spesimen agar berisi jaringan yang mengalami perubahan dari jaringan normal, penelitian ini menggunakan pemotongan melintang.
- 3) Tebal spesimen tidak boleh lebih dari 5mm untuk mempermudah penetrasi cairan fiksasi.
- 4) Spesimen difiksasi segera dengan formalin 10%.
- 5) Perbandingan volume spesimen dengan larutan formalin adalah 1:10, agar didapat hasil fiksasi yang sempurna.
- 6) Setiap kontainer spesimen diberi label yang berisi informasi tentang identitas hewan, tanggal pengambilan spesimen, macam spesimen dan bahan pengawet yang dipakai.
- 7) Kontainer tersebut harus tertutup rapat dan tidak boleh bocor.
- 8) Dihindarkan agar tidak membekukan jaringan yang akan dipilih dengan pemeriksaan histopatologi.

Untuk melihat serabut kolagen maka digunakan perwarnaan dengan *Mallory*. Jaringan yang akan diberi pewarnaan di parafinisasi dengan menggunakan larutan *Xylo*l dan alkohol yang dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alkohol, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades lalu dilap. Kaca benda kemudian dimasukkan kedalam *Hematoksilin Meyers* dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas dengan aquades. Proses pewarnaan dilanjutkan

dengan memasukkan kaca benda ke dalam *Mallory* untuk pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda ke dalam *Mallory* untuk pewarnaan *Mallory*, lalu pewarnaan dinilai dibawah mikroskop cahaya. Bila pewarnaan telah dianggap baik maka selanjutnya adalah proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap, setelah itu, dimasukkan kedalam larutan *Xylol* dan terakhir *objek glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x.

c. Pembacaan preparat histopatologi

Kriteria penilaian histologi kolagen dibuat berdasarkan kepadatan, karena mengingat bentuk serabut kolagen dalam jaringan ikat adalah tidak beraturan. Dilihat dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x. Menurut Mawardi (2002), kriteria skor penilaian kepadatan serabut kolagen berdasarkan pada :

- 0 : tidak tampak gambaran serabut kolagen
- 1 : serabut kolagen terlihat tipis atau sedikit sekali
- 2 : serabut kolagen terlihat menyebar tipis
- 3 : serabut kolagen menyebar tebal
- 4 : serabut kolagen terlihat mengumpul tebal.

H. Analisi Data

Data kepadatan kolagen merupakan data ordinal. Uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel sebanyak 45 (kurang dari 50) dan uji hipotesis penelitian menggunakan uji *One Way Anova* untuk

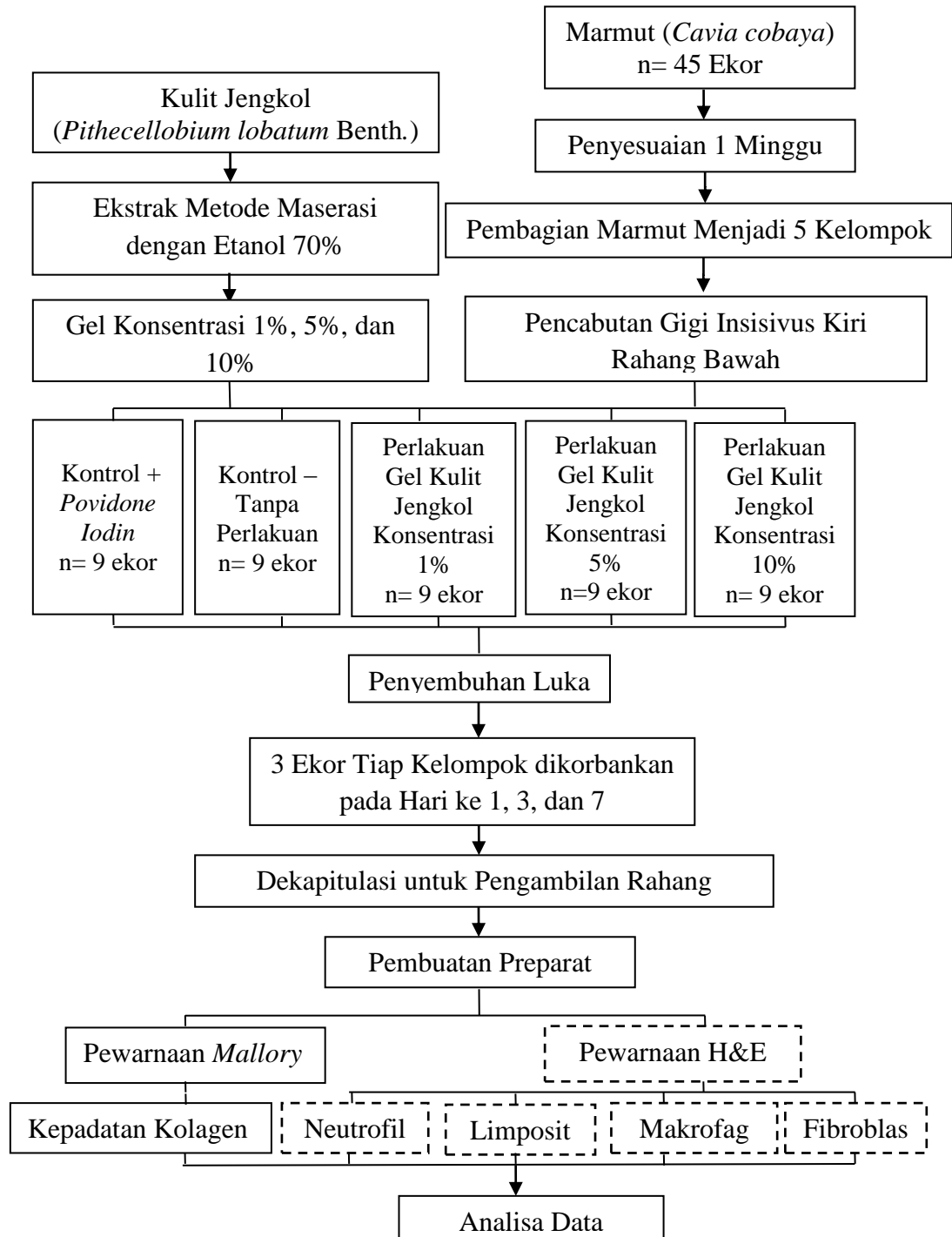
mengetahui ada tidaknya perbedaan pada setiap kelompok, selanjutnya uji lanjutan dengan menggunakan uji *Tukey HSD (Honestly Significant Difference)* untuk mengetahui kelompok yang memiliki nilai signifikan tertinggi terhadap kolagen kepadatan.

I. Etik Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak subjek selama proses penelitian, untuk itu peneliti mengajukan *ethical clearance* dan mendapatkan persetujuan dari Tim Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta bahwa penelitian dilakukan tidak melanggar kode etik penelitian. Hewan coba marmut jantan pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan yaitu diberikan ruang gerak untuk marmut. Marmut tidak dilakukan pembatasan pakan dan air minum. Marmut jantan diberi pakan dan air minum sesuai kebutuhan dengan jenis nutrisi yang sama.

Pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*) jantan, sebelumnya dilakukan anestesi dengan injeksi ketamin untuk mengurangi rasa sakit pada marmut, serta membuat marmut pingsan. Proses dekapitulasi rahang marmut, sebelumnya dilakukan pemberian klorofom agar marmut tidak merasakan kesakitan. Manfaat yang diharapkan adalah untuk membuktikan secara ilmiah tentang efektifitas gel ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) terhadap kepadatan kolagen pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*) jantan.

J. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

Keterangan : Garis lurus (—) = dilakukan penelitian
 Garis putus-putus (---) = tidak dilakukan penelitian