

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris secara *in vivo* dengan menggunakan tikus betina *Sprague Dawley* sebagai hewan uji.

B. Sampel Penelitian

Subyek dari penelitian ini adalah tikus betina Sprague dawley betina yang berumur 3 bulan dengan berat badan \pm 170-200 gram. Tikus yang digunakan berjumlah 20. Subyek penelitian ini akan di bagi menjadi 5 kelompok. Jumlah tikus dalam satu kelompok sebanyak 4 ekor, ditentukan sesuai rumus hitung sampel dari Kumar(1996) yaitu:

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

n = jumlah sampel untuk tiap kelompok

Z = nilai standar untuk α 0,05 (tingkat kepercayaan 95%) dengan nilai Z
1,96

σ = nilai standar deviasi

d = rentang nilai yang diinginkan

Data standar deviasi dari penelitian sebelumnya belum ada, oleh karena itu diasumsikan nilai σ sama dengan d, sehingga perhitungan jumlah sampel yang diinginkan menjadi :

$$n = \frac{1,96^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

atau $n = Z^2 = 1,96^2 = 3,8416$ atau sampel dibulatkan menjadi 4 ekor tikus setiap kelompok.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu:

- a) Pembuatan ekstrak tepung tempe kedelai dilaksanakan di Laboratorium Unit II Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- b) Proses Ovariektomi dan pemeliharaan pada tikus Sprague Dawley betina dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c) Proses pengecekan hormon estrogen dengan ELISA dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- d) Pembuatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- e) Pengamatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Riset MMT FKIK UMY.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 sampai dengan April 2019.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi
 - a) Memiliki berat badan \pm 170-200 gram
 - b) Jenis kelamin betina
 - c) Spesies *Sprague Dawley*
 - d) Tikus berusia 3 bulan
2. Kriteria Eksklusi
 - a) Tikus yang sedang hamil

E. Variable Penelitian

1. Variable bebas
 - a) Ekstrak tepung tempe kedelai
2. Variable terikat
 - b) Jumlah sel makrofag pada proses penyembuhan ulkus traumatik
3. Variabel terkontrol
 - a) Tempe yang digunakan
 - b) Jumlah konsentrasi ekstrak tepung tempe kedelai yang digunakan
 - c) Ulkus traumatik di regio 3 gingiva cekat dekat mukosa
 - d) Makanan yang diberikan untuk tikus yaitu pellet CP511 dan minum air ad libitum
 - e) Spesies tikus yang digunakan: *Sprague Dawley*
 - f) Berat badan tikus: \pm 170-200 gram
 - g) Jenis kelamin tikus: betina

F. Definisi Operasional

1. Ekstrak tepung tempe dibuat dengan melakukan pembuatan tepung tempe terlebih dahulu sebelum pembuatan ekstrak. Ekstrak tepung tempe adalah ekstrak dari tepung tempe yang diperoleh dengan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Tikus menopause didapatkan dengan cara ovariektomi sehingga terjadi defisiensi hormon estrogen. Tikus ovariektomi adalah tikus yang telah dilakukan pembedahan ovarium di bagian linea mediana.
3. Ulkus traumatik diinduksi dengan pembuatan luka dengan metode scraping menggunakan scalpel pada gingiva cekat dekat mukosa region 3 mandibula.
4. Jumlah sel makrofag adalah sel fagositosis yang berperan dalam proses inflamasi. Jumlah sel makrofag diperoleh dengan mengamati preparat histologi pada 4 lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan pewarnaan *hematoksilin eosin* (HE).
5. Hormon estrogen adalah kadar hormon estrogen dalam plasma tikus yang telah diuji dengan ELISA.

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a) Alat ekstraksi tepung tempe kedelai terdiri dari beaker glass 1000ml (Iwaki pyrex), beaker glass 600ml (Iwaki pyrex), beaker glass 200ml (Iwaki pyrex), gelas ukur 100ml, botol scott 100ml (Duran), botol scott 500ml (Duran), corong plastic kecil, pipet tes, spatula, grinder, cawan

porselen 75cc, saringan tepung 70mesh 'Retsch', *Lab Stirrer electricity*, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki stainless steel, baki plastic, pisau, talenan, sendok plastic, spatula, cup kecil.

- b) Alat ovariektomi terdiri papan bedah, *sput injection*, Silet, Pinset (*Yamako*), lampu operasi, jarum sutura nomor 2 (*One Med*), klem arteri (*One Med*), klem *kocher* (*One Med*), *Needle holder* (*One Med*), pinset anatomi (*One Med*), pinset sirugis (*One Med*), gunting *metzenbaum* (*One Med*), gunting balutan (*One Med*), gunting runcing (*One Med*), klem *mosquito* (*One Med*), *gloves* dan masker, kandang tikus.
- c) Alat induksi ulkus traumatik terdiri dari *scalpel*.
- d) Alat pembuatan preparat terdiri dari mikroskop cahaya, *object glass*, *deck glass*, kontainer specimen.
- e) Alat untuk mengukur kadar estrogen terdiri dari ELISA kit.

2. Bahan

- a) Bahan ekstraksi tepung tempe yaitu tempe kedelai, alkohol 70 %, kertas saring, *tissue*, kain saring, larutan fiksatif BPS formalin, NaCl 0,9 %, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut.
- b) Bahan untuk proses ovariektomi terdiri dari ketamin 50mg/ml, benang silk nomor 3 (*One med*), benang *catgut* nomor 3 (*One med*), sekam padi steril, serbuk gergaji kayu steril, *betadine* (*Povidone Iodine*) 10%, Alkohol 70% (*Mediss*), antibiotik (*Ciprofloxacin*), cairan infus 0,9%, *Sodium Chloride*' (*Cotsu-NS*), kasa steril (*OneMed*), *tissue*,

- c) Bahan pembuatan preparat terdiri dari *Formalin Buffer 10%* untuk fiksasi rahang, larutan *Xylo*, alkohol, air mengalir, aquades, bahan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin (HE)*.
- d) Bahan yang diaplikasikan pada ulkus traumatik terdiri dari gel kenalog

H. Cara Kerja Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Pembuatan ekstrak tepung kedelai dimulai dari pembuatan simplisia serbuk terlebih dahulu. Tempe kedelai murni dipotong kecil kemudian ditimbang berat basah dan dioven pada suhu $+50^{\circ}\text{C}$ selama 2 hari kemudian digiling menggunakan grinder sampai menjadi tepung. Dilakukan pengayakan 70 mesh untuk mendapatkan tekstur tepung tempe yang halus, selanjutnya tepung tempe tersebut direndam dengan pelarut alkohol 70% dengan perbandingan 1:4.

Menggunakan *stirrer electric* larutan dihomogenkan dengan kecepatan 500rpm dan dilakukan maserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat di *waterbath* selama ± 8 jam untuk mendapatkan filtrat murni berbentuk pasta.

2. Pengelompokkan Hewan Uji

Sebelum mendapat perlakuan, hewan uji diadaptasikan selama 7 hari. Hewan uji pada penelitian ini yaitu tikus *Sprague-Dawley* sebanyak

20 ekor. Tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok 1 (tanpa ovariektomi, induksi ulkus traumatik, diberi kenalog, tanpa diberi ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok 2 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, diberi kenalog dan tanpa ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok 3 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog dan diberi ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok 4 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog, tanpa ekstrak tepung tempe kedelai) dan kelompok 5 (tanpa ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa diberi kenalog dan tanpa ekstrak tepung tempe kedelai) sebagai kelompok kontrol. Tikus diberi pakan dan air minum *ad libitum*.

3. Ovariektomi Tikus

Ovariektomi dilakukan pada hari ke-8 setelah masa adaptasi. Sebelum ovariektomi, tikus dianestesi dengan menggunakan ketamine hcl 10% dengan dosis 40 mg/kg BB secara intra muskular. Tikus difiksasi dimeja operasi, rambut tikus di area perut dicukur, kemudian di insisi pada bagian perut (linea mediana) yang akan dibedah, dilanjutkan dengan ligasi pembuluh darah dan pematangan ovarium. Daerah yang diinsisi dijahit kembali serta disemprotkan *antibiotic ciprofloxacin* sebelumnya setelah itu luka jahitan diolesi *povidon iodine*. Setelah prosedur selesai hewan uji ditunggu selama 7 hari untuk proses penyembuhan.

4. Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Setelah penyembuhan luka ovariektomi dan penyesuaian hormon estrogen selama 7 hari, pada hari ke-16 tikus diberikan ekstrak tepung tempe kedelai. Penentuan dosis didapatkan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu sebesar 0,63 g/ml. Ekstrak tepung tempe kedelai diberikan setiap hari pada siang hari yang dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung sesuai dengan dosis satu kali sehari selama 30 hari.

5. Induksi Ulkus Traumatik

Setelah pemberian ekstrak tepung tempe kedelai, pada hari ke-47 dilakukan induksi ulkus traumatik pada semua kelompok. Pertama-tama tikus diberi larutan anestesi ketamin hcl intramuskular kemudian gingiva regio 3 mandibula tersebut dibuat luka dengan metode scrapung menggunakan scalpel agar terjadi ulkus traumatik.

6. Pengolesan Gel Kenalog

Setelah induksi ulkus traumatik, pada hari itu juga kelompok 1 dan 2 pada bagian gingiva tikus yang terluka dioleskan gel kenalog.

7. Pengambilan Sampel Gingiva

Sebelum pengambilan sampel gingiva dengan pengambilan mandibula, dilakukan eutanasia. Sampel gingiva diambil pada hari ke-48, 50, 52, 54 setelah pemberian ekstrak tepung tempe kedelai atau diambil pada hari ke-1, 3, 5, dan 7 setelah induksi ulkus traumatik.

8. Pengambilan dan Analisis Kadar Hormone Estrogen

Pengambilan darah tikus dilakukan pada hari ke-8 setelah satu minggu masa adaptasi, yaitu saat melakukan ovariektomi. Pengambilan darah hari ke-8 dilakukan pada semua kelompok tikus. Pengambilan darah tikus dilanjutkan pada hari ke- 16 untuk tiga kelompok tikus yang diberi perlakuan ovariektomi, bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perubahan kadar hormon estrogen.

Pengambilan darah selanjutnya dilakukan pada hari ke-47 pada semua kelompok tikus untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak tepung tempe kedelai pada kadar hormon dalam darah tikus. Plasma dari darah tikus dipisahkan dengan *centrifuge* kemudian disimpan dalam *freezer* pada suhu -80°C hingga semua serum yang dibutuhkan terkumpul, kemudian dilakukan pengukuran kadar hormone estrogen dengan menggunakan ELISA.

9. Pembuatan Preparat Histologi

Sampel gingiva yang telah diambil dibuat preparat histologi dengan tahapan sebagai berikut :

a) Fiksasi jaringan gingiva

Jaringan gingiva dicuci dengan garam fisiologis (NaCl 0,9%), kemudian jaringan dimasukkan dalam botol yang berisi larutan formalin buffer 10% dan dibiarkan selama 24 jam.

b) Dehidrasi

Proses dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat yaitu alkohol 70% sampai 100%.

c) Clearing

Pada proses clearing, jaringan gingiva dijernihkan dengan *xylol* yang memberikan warna bening pada jaringan dan sebagai zat perantara masuknya kedalam paraffin.

d) Infiltrasi dan penanaman (embedding)

Sebelum penanaman, dilakukan infiltrasi dahulu dengan cara menggunakan paraffin cair dengan suhu 57-59°C. Setelah itu, jaringan yang telah di infiltrasi dimasukkan ke dalam cetakan blok yang sudah diisi dengan paraffin cair. Lalu, cetakan dilepas ± 20 menit apabila sudah mengeras.

e) Pemotongan dengan mikrotom

Sebelum dilakukan pemotongan, blok didinginkan dengan cara diberikan es batu atau dimasukkan ke dalam plastik yang sudah berisi air kemudian di masukkan kedalam freezer ± 15 menit. Blok dijepit kan pada mikrotom lalu dipotong menggunakan pisau mikrotom dengan kemiringan ± 30 terhadap blok paraffin setebal ± 2-5 mikron dan hasil potongan tersebut dimasukkan kedalam waterbath yang berisi air yang dihangatkan dengan suhu ± 50 °C. Kemudian, diambil menggunakan objek glass dan diberi nomor dengan pensil kaca dan dibiarkan selama ± 5 menit.

f) Inkubasi

Preparat diinkubasi diatas hot plate dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama ± 15 menit.

g) Pengecatan

Proses pengecatan pada penelitian ini menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE). Proses pengecatan sebagai berikut:

- a. Deparafinisasi yaitu preparat dimasukkan ke dalam xylol I, II, III, masing-masing selama tiga menit.
- b. Rehidrasi yaitu dengan memasukkan preparat ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70%, masing-masing selama dua menit.
- c. Preparat dimasukkan ke air mengalir
- d. Pengecatan inti yaitu preparat dimasukkan ke larutan MayerHematoksilin selama tujuh menit.
- e. Preparat dimasukkan ke air mengalir.
- f. Counter Stain yaitu preparat dimasukkan ke larutan eosin ± 30 detik.
- g. Preparat masuk ke air wadah I, II, III, masing-masing tiga kali celup.
- h. Dehidrasi yaitu dengan memasukkan preparat ke alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, masing-masing tiga kali celup

- i. Clearing yaitu preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I dan II.

10. Pemusnahan Hewan Uji

Setelah dilakukan euthanasia dan pengambilan mandibula, tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran ditempat khusus, yaitu insulator.

11. Pengamatan Jumlah Sel Makrofag

Pengamatan sel makrofag dilakukan pada 3 lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Perhitungan dilakukan dengan menghitung sel makrofag atau sel raksasa yang tercatung tua pada pewarnaan HE yang mempunyai inti bulat dan berbentuk tidak teratur serta dapat bergabung dengan sel makrofag lainnya.

I. Analisis Data

Pada penelitian ini, analisis data menggunakan aplikasi SPSS. Uji normalitas yang digunakan adalah Saphiro-wilk karena sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50. Jika persebaran data normal, maka data dianalisis dengan one way ANOVA karena jenis hipotesis dari penelitian ini adalah comparative tidak berpasangan dengan kelompok sampel >2. Jika data memiliki persebaran tidak normal, maka analisis data yang digunakan adalah *kruskall wallis*.

J. Alur penelitian