

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian laboratorium yang bersifat ekperimental.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat yaitu:

- a. Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pembuatan ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*).
- b. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*) jantan dan pemberian ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) secara topikal.
- c. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pembuatan preparat histologi.
- d. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pembacaan preparat histologi.

2. Waktu

Penelitian ini akan dilakukan dari bulan Juni sampai dengan bulan September 2011

C. Subyek Penelitian

- a. Hewan uji pada penelitian ini adalah marmut (*Cavia cobaya*) jantan yang diperoleh dari Pasar Satwa dan Tanaman Hias Yogyakarta (PASTY) sebanyak 27 ekor.
- b. Bahan uji pada penelitian ini adalah ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 100%.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan
- b. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan dengan berat 250-500 gram
- c. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan berusia 4-5 bulan
- d. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan yang memiliki kondisi fisik baik.

2. Kriteria Eksklusi

Marmut (*Cavia cobaya*) jantan yang sedang mengalami infeksi atau inflamasi dan memiliki cacat fisik.

E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel Pengaruh

1. Ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 100%
2. Perlakuan kontrol positif (aplikasi *povidone iodine*) dan kontrol negatif (tanpa perlakuan).

b. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh pada penelitian ini adalah angka fibroblas pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*) jantan.

c. Variabel Terkendali

1. Jenis kelamin marmut (*Cavia cobaya*) adalah jantan
2. Usia marmut (*Cavia cobaya*) sekitar 5 bulan
3. Berat marmut (*Cavia cobaya*) berkisar antara 250-500 gram
4. Jenis makanan marmut (*Cavia cobaya*)
5. Bahan anestesi, yaitu menggunakan *ketamine*.
6. Elemen gigi yang dicabut, yaitu gigi insisivus kanan mandibula
7. Alat pencabutan gigi yaitu ekskavator dan *needle holder*
8. Pengukuran pembuatan ekstrak dan pengenceran bahan uji
9. Pembuatan preparat histologi
10. Komplikasi pasca pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*).

d. Variabel Tak Terkendali

1. Penyakit sistemik pada marmut (*Cavia cobaya*)
2. Besar luka pasca pencabutan gigi marmut (*Cavia cobaya*)
3. Alergi yang mungkin terjadi pada marmut (*Cavia cobaya*) efek dari pemberian anestesi.

2. Definisi Operasional

a. Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan pekat atau kental yang diperoleh dengan menyari zat dari simplisia nabati menggunakan metode maserasi di luar pengaruh langsung cahaya matahari.

b. Lidah Buaya (*Aloe vera*)

Lidah buaya merupakan tanaman yang diperoleh dari Pasar Satwa dan Tanaman Hias Yogyakarta (PASTY).

c. Pencabutan Gigi

Pencabutan yang dilakukan pada gigi insisivus atas marmut (*Cavia cobaya*) jantan dengan menggunakan ekskavator dan *needle holder*.

d. Penyembuhan Luka

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

e. Fibroblas

Fibroblas merupakan sel yang berperan dalam penyembuhan luka, yaitu pada fase proliferasi atau fase migrasi dan fase maturasi atau fase *remodelling*.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

- a. Alat pencabutan gigi (dalam hal ini digunakan *needle holder*) yang dalam kondisi steril
- b. Ekskavator untuk separasi gigi
- c. Gunting bedah dan pinset untuk dekapitasi rahang marmut
- d. Masker wajah
- e. Sarung tangan
- f. Kapas
- g. Seperangkat alat untuk pembuatan preparat histo
- h. Kandang marmut yang diberi kode nomer
- i. Alat tulis

2. Bahan

- a. Ekstrak daun lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 100%
- b. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan
- c. Bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE
- d. Bahan pakan marmut

- e. Formalin 10%
- f. *Povidon Iodine*
- g. Alkohol 70%
- h. *Ketamine*

G. Cara Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Ekstrak Bahan Uji

Pembuatan ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) menggunakan metode maserasi. Satu kilogram lidah buaya dicuci terlebih dahulu sampai bersih, kemudian dipotong kecil-kecil sekitar 0,5 cm². Setelah itu, potongan lidah buaya tersebut dimasukkan ke dalam oven dengan suhu sekitar 60° selama 4 hari. Proses dalam oven tersebut hanya dilakukan pada siang hari saja. Sediaan tersebut kemudian diblender hingga menjadi serbuk, lalu serbuk tersebut ditimbang sebanyak 100 gram. Serbuk sebanyak 100 gram itu direndam dalam air selama 24 jam, lalu setelah itu disaring. Hal ini dimaksudkan untuk memisahkan larutan dengan serbuk. Setelah itu, larutan yang diperoleh dipanaskan di atas penangas hingga menguap dan menyisakan ekstrak kental atau pekat dengan konsentrasi 100%.

b. Persiapan Hewan Uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji yang berjumlah 27 ekor dibagi dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan) sebanyak 9 ekor, kelompok kontrol positif (aplikasi *povidone iodine*) sebanyak 9 ekor, dan kelompok perlakuan (aplikasi ekstrak lidah buaya 100%) sebanyak 9 ekor. Dari masing-masing kelompok tersebut diambil 1 ekor untuk dilakukan pemeriksaan apakah hewan uji sedang mengalami inflamasi atau tidak yaitu dengan mengambil sampel darah dari hewan uji tersebut. Setelah itu, semua hewan uji diadaptasikan (diaklimatisasi) terlebih dahulu selama 1 minggu. Masing-masing kelompok dimasukkan ke dalam kandang yang sama pada kondisi lingkungan yang sama dan diberi makanan dengan jenis yang sama.

c. Sterilisasi Alat dan Bahan

Setiap kegiatan selalu diawali dengan proses sterilisasi alat dan bahan penelitian yang akan digunakan menggunakan alkohol. Akan tetapi untuk alat pencabutan gigi disterilkan terlebih dahulu menggunakan *autoclave*.

2. Tahap Pelaksanaan

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

Sebelum gigi marmut dicabut, marmut tersebut terlebih dahulu diberi sedatif berupa *ketamine*, lalu ditunggu hingga efek sedatif yang ditimbulkan oleh *ketamine* muncul. Setelah itu dilakukan separasi pada bagian gusi dan servikal gigi menggunakan ekskavator. Tindakan pencabutan gigi dilakukan dengan menempatkan *needle holder* (berfungsi sebagai tang cabut) pada sulkus gingiva. Gigi yang akan dicabut digerakkan ke arah labial dan lingual beberapa kali, kemudian dilanjutkan dengan gerakan rotasi dalam sumbunya. Setelah jaringan periodontal terlepas seluruhnya dan gigi terasa longgar, gigi tersebut dicabut keluar dari soketnya.

b. Menentukan Respon Sel Fibroblas Pada Luka Pasca Pencabutan Gigi

Dua puluh tujuh ekor marmut (*Cavia cobaya*) dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan (kelompok I), kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan dengan *povidon iodine* (kelompok II), dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 100% (kelompok III).

Pada hari ke-0, 27 ekor marmut tersebut dicabut giginya, kemudian diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Pada hari ke-1, ke-3, dan ke-7 setelah pencabutan gigi, 3 ekor marmut dari masing-masing kelompok dibunuh. Setelah itu, tulang rahang marmut didekapitasi. Jaringan tersebut kemudian difiksasi dengan formalin 10% selama semalam pada suhu kamar, selanjutnya dilakukan proses dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10% pada suhu kamar, kemudian dilakukan proses dehidrasi jaringan dengan menggunakan alkohol dengan kadar yang bertingkat hingga alkohol absolut. Spesimen dimasukkan ke dalam larutan alkohol toluol (1:1), dilakukan dengan menggunakan toluol murni, kemudian dimasukkan ke dalam larutan toluol parafin jenuh.

Proses selanjutnya adalah infiltrasi di dalam oven dengan cara spesimen dimasukkan ke dalam parafin cair. Setelah itu, dilakukan proses *embedding* (memasukkan jaringan ke dalam parafin) dan setelah itu diberi label/kode. Setelah tahap *embedding* selesai, jaringan diiris secara seri dengan ketebalan kurang lebih 6 mm menggunakan mikrotop.

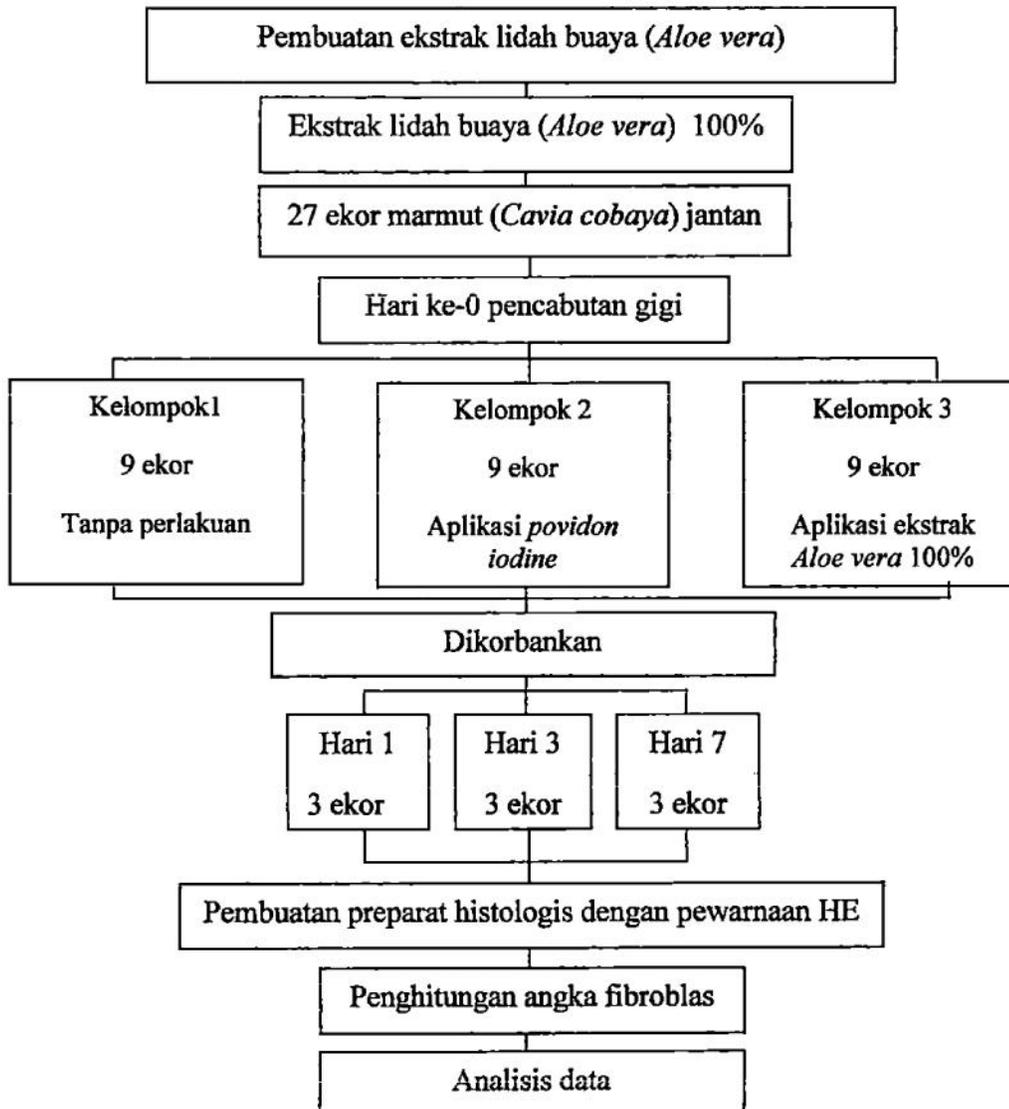
Proses evaluasi respon sel fibroblas menggunakan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE). Prosedur yang harus dilakukan adalah deparafinasi dengan menggunakan larutan xylol

dan alkohol, kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alkohol. Setelah itu dicuci dengan air mengalir, lalu dibilas dengan aquades dan kemudian dilap. Kaca benda kemudian dimasukkan dalam larutan *hematoksolin meyer's* dan dicuci dengan air mengalir, lalu dibilas dengan aquades, setelah itu pewarnaan dinilai di bawah mikroskop cahaya. Jika pewarnaan telah dianggap baik, kemudian dilanjutkan ke langkah selanjutnya yaitu proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Tahapan selanjutnya adalah dimasukkan ke dalam larutan xylol dan *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya.

H. Analisis Data

Analisis data hasil penelitian dilakukan dengan menggunakan *Two-way Annova* yang dilanjutkan dengan menggunakan *Least Significant Different (LSD)*.

I. Alur Penelitian



Gambar 4. Skema Alur Penelitian