

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah eksperimental *laboratories in vivo* dengan menggunakan hewan uji.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di laboratorium biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), laboratorium farmasi dan farmakologi klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, dan laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada selama dua bulan. Laboratorium patologi klinik fakultas kedokteran hewan UGM. Pembuatan preparat dilakukan di Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini menggunakan 36 tikus *Sprague dawley* jantan yang berumur \pm 3 bulan dengan berat badan 200 - 250 gram.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

1. Variabel

- a. Variabel pengaruh: salep ekstrak daun kamboja (*P. acuminata Ait*) 5%.
- b. Variabel terpengaruh: kepadatan kolagen pada luka gingiva tikus.
- c. Variabel terkendali :
 - 1) Galur tikus : *Sprague dawley*.
 - 2) Umur tikus : 2 – 2,5 bulan.
 - 3) Jenis kelamin tikus : jantan.
 - 4) Berat badan tikus : 200 – 250 gram.
 - 5) Jenis makanan.
 - 6) Air minum tikus : air mineral.
 - 7) Perlukaan pada gingiva tikus : panjang dan lebar 2 mm.
 - 8) Volume, waktu, dan lama pembilasan luka.
- d. Variabel tak terkendali:
 - 1) Kondisi sistemik individual tikus.
 - 2) Kontaminasi bakteri rongga mulut tikus.

E. Definisi Operasional

1. Salep Ekstrak daun kamboja adalah sediaan setengah padat yang mudah dioleskan dan digunakan sebagai obat luar dengan kandungan ekstrak yang diperoleh dengan cara menyaring daun kamboja menggunakan pelarut etanol 70%.

2. Luka gingiva tikus adalah perlukaan yang dibuat dengan *scalpel* dengan luas luka 2x2 mm pada labial gingiva rahang bawah tikus dengan kedalaman mencapai tulang alveolar.
3. Serabut kolagen adalah salah satu jenis serat utama dari jaringan penyambung yang dibentuk oleh protein kolagen. Kepadatan serabut kolagen tikus pada perlukaan dapat kita amati dengan menggunakan pewarnaan Trikom Mallory dan Mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x. Kriteria serabut kolagen tipis tampak bewarna keabu-abuan atau biru muda, kriteria sedang tampak bewarna biru muda hingga biru tua dengan serabut yang tebal namun belum berpilin. Kriteria padat tampak bewarna biru tua dengan serabut yang saling berpilin.

F. Instrumen Penelitian

I. Bahan

- a. Tikus *Sprague dawley* jantan.
- b. Salep Ekstrak daun kamboja (*Plumeria acuminata Ait.*) konsentrasi 10%.
- c. Akuades.
- d. Larutan buffer formalin 10%.
- e. Cat Trikrom Mallory.
- f. Pehacain.
- g. Phenorbarbital.
- h. Analgesik.

2. Alat

a. Untuk pembuatan ekstrak:

- 1) Blender
- 2) Corong Buchner
- 3) Evaporator tekanan vakum
- 4) Kertas saring
- 5) Erlenmeyer
- 6) Kain saring
- 7) Gelas ukur
- 8) Cawan porselin

b. Untuk perlakuan:

- 1) *Scalpel*
- 2) Mikropipet dan mikrotip
- 3) Kapas
- 4) Pinset
- 5) Stopwatch

c. Untuk pengukuran

- 1) Mikroskop cahaya
- 2) Penggaris

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Plumeria acuminata Ait*

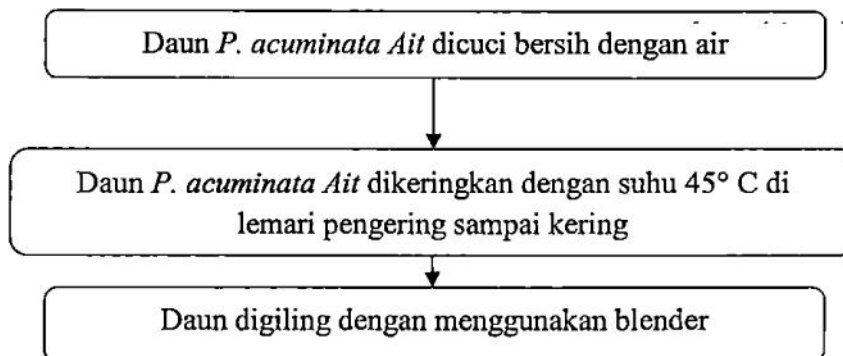
Daun *P. acuminata Ait* sebanyak 5 kilogram disiapkan kemudian dicuci dengan air bersih. Daun yang sudah dibersihkan kemudian dikeringkan dalam lemari pengering dengan suhu 60-70°C hingga kering. Daun kering sebanyak 500 gram dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk.

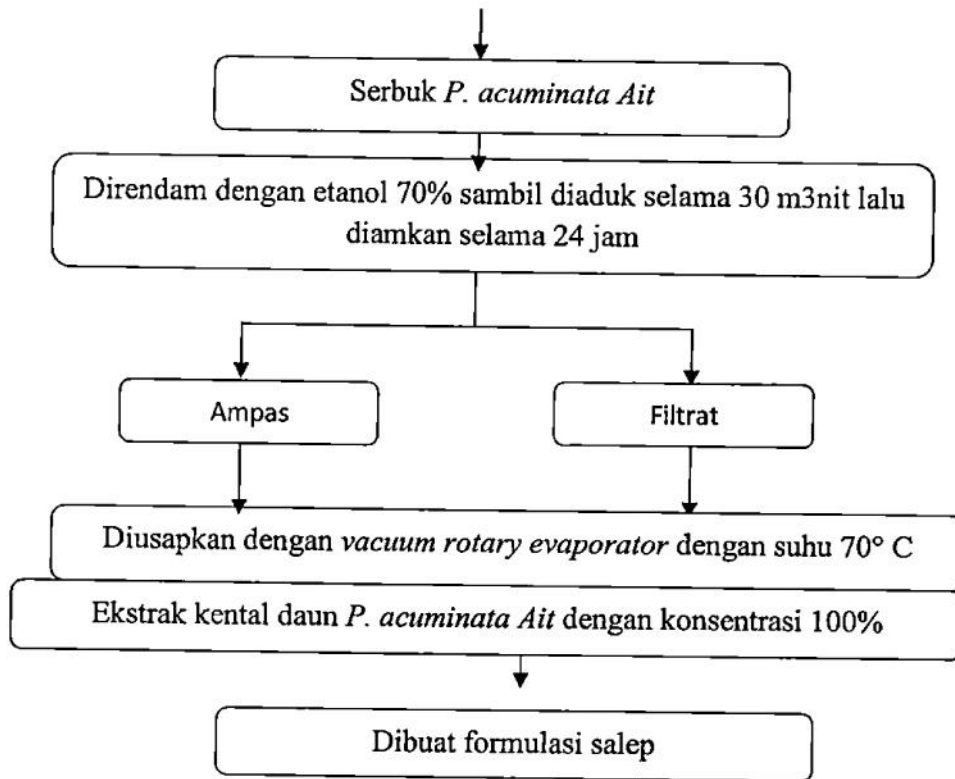
Serbuk diekstraksi dengan metode maserasi dalam larutan etanol 70 % yang berfungsi untuk melarutkan zat aktif yang terkandung dalam daun *P. acuminata Ait*. Dalam perendamannya sambil diaduk selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah direndam, maka akan terbentuk filtrat dan ampas. Filtrat diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dalam pemanas *water bath* dengan suhu 70°C. Setelah itu akan diperoleh ekstrak yang kental sebanyak 49 gram dengan konsentrasi 100 %.

2. Pembuatan Salep Ekstrak Etanol Daun *P. acuminata Ait*

Ekstrak daun kamboja (*P. acuminata Ait*) dijadikan sediaan salep di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Berikut skema proses pembuatan salep ekstrak:





Gambar 3. Skema Proses Pembuatan Salep Ekstrak

3. Pengelompokan Hewan Uji

Sebelum mendapat perlakuan, hewan uji diadaptasikan selama satu minggu. Selama periode ini, 36 tikus *Sprague dawley* diberi pakan dan minum standar. Setelah masa adaptasi selesai, tikus dibagi secara random menjadi tiga kelompok, terdiri dari kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok perlakuan.

Pada kelompok kontrol positif diberikan Kenalog®, pada kelompok kontrol negatif diaplikasikan akuades, dan pada kelompok perlakuan diaplikasikan salep ekstrak etanol *P. acuminata* Ait dengan konsentrasi 10%, masing-masing kelompok terdiri dari tiga tikus

4. Perlukaan Terhadap Gingiva Tikus dan Pemberian Perlakuan

Sebelum dilakukan perlukaan, semua tikus ditidurkan dengan *Phenobarbital*. Perlukaan dibuat pada gingiva bagian labial dibawah kedua gigi anterior mandibula dengan menggunakan *scalpel* dengan luas luka 2x2 mm hingga kedalaman mencapai tulang alveolar.

Tikus yang ada pada kelompok kontrol positif diaplikasikan Kenalog®, pada kelompok kontrol negatif diaplikasikan akuades, dan pada kelompok perlakuan diaplikasikan salep ekstrak daun *P. acuminata* Ait konsentrasi 10%, masing-masing diwakili tiga ekor.

Yang pertama dilakukan adalah membuat perlukaan menggunakan scalpel dengan kedalaman full thickness pada tikus kelompok pertama dengan perlakuan dan kontrol 7 hari. Setelah itu kelompok perlakuan diberi salep plumeria accuminata ait, untuk kelompok positif diberi salep kenalog, dan untuk kelompok negatif diteteskan aquades selama 7 hari berturut-turut sebanyak 3 kali sehari. Dua hari setelah membuat perlukaan pada kelompok pertama, dibuat perlukaan menggunakan scalpel dengan kedalaman *full thickness* pada tikus kelompok kedua dengan perlakuan dan kontrol 5 hari. Setelah itu kelompok perlakuan diberi salep plumeria accuminata ait , untuk kelompok positif diberi salep kenalog, dan untuk kelompok negative diteteskan aquades selama 5 hari berturut-turut sebanyak 3 kali sehari. Dua hari setelah membuat perlukaan pada kelompok kedua, dibuat perlukaan menggunakan scalpel dengan kedalaman *full thickness* pada tikus kelompok ke tiga perlakuan dan

kontrol 3 hari. Setelah itu, kelompok perlakuan diberi salep *Plumeria accuminata ait*, untuk kelompok positif diberi salep kenalog, dan untuk kelompok negatif diteteskan aquades selama 3 hari berturut-turut sebanyak 3 kali sehari. Satu hari setelah membuat perlukaan pada kelompok 3, dibuat perlukaan menggunakan scalpel dengan kedalaman *full thickness* pada tikus kelompok perlakuan dan kontrol 1 hari. Setelah itu, kelompok perlakuan diberi salep *Plumeria accuminata ait*, untuk kelompok positif diberi salep kenalog, dan untuk kelompok negatif diteteskan aquades selama 1 hari berturut-turut 3 kali sehari. Sehari setelah itu lakukan dekapitasi pada seluruh kelompok perlakuan maupun kontrol.

Setelah semua tikus dikorbankan, maka dilakukan pengambilan jaringan radang dengan memotong rahang bawah tikus tempat jaringan yang meradang dimulai dari bagian tepi hingga bagian tengah. Potongan jaringan difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 4 hari pada temperatur kamar. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi UGM yang dimulai dengan proses dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10% selama kurang lebih 30 hari pada temperature kamar lalu dilakukan prosesing jaringan dengan menggunakan alat *tissue processor automatic* dengan tahapan fiksasi, infiltrasi, *clearing*, dan infiltrasi paraffin. Proses dehidrasi terhadap specimen dengan menggunakan alkohol secara bertingkat. Spesimen dimasukkan ke dalam larutan alkohol dan toluol dengan perbandingan 1:1, lalu dilanjutkan dengan proses penjernihan menggunakan toluol murni. Setelah itu,

specimen dimasukkan kedalam larutan toluol paraffin jenuh yang dilanjutkan dengan proses infiltrasi di dalam oven dengan cara memasukkan specimen ke dalam paraffin cair. Proses selanjutnya adalah proses *embedding*, setelah itu jaringan diiris dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μ .

5. Uji Efektivitas Salep Ekstrak Etanol Daun *Plumeria acuminata* Ait

Setelah semua tikus dikorbankan, maka dilakukan pengambilan jaringan dengan memotong jaringan yang meradang dimulai dari bagian tepi ke bagian tengah dan bagian tepi seberangnya dari jaringan yang meradang. Potongan jaringan difiksasi dengan larutan formalin 10% selama empat hari pada temperatur kamar, dilanjutkan dengan proses dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10%. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi terhadap spesimen dengan menggunakan alkohol secara bertingkat. Spesimen dimasukkan ke dalam larutan alkohol dan toluol dengan perbandingan 1: 1, kemudian dilanjutkan dengan proses penjernihan menggunakan toluol murni. Setelah itu specimen kemudian dimasukkan kedalam larutan toluol paraffin jenuh lalu dilanjutkan dengan proses infiltrasi di dalam oven dengan cara memasukkan specimen kedalam paraffin cair. Kemudian dilakukan proses *embedding* terhadap spesimen lalu diberi label kode. Setelah proses *embedding* selesai maka diiris secara seri dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μ m.

Untuk melihat serabut kolagen maka digunakan pewarnaan dengan menggunakan *Mallory*. Jaringan yang akan diberi pewarnaan

diparafinisasi dengan menggunakan larutan *Xylo*l dan alkohol yang dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alcohol, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades lalu di lap. Lalu proses 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 alcohol secara bertingkat kemudian di lap. Setelah itu, dimasukkan kedalam larutan *Xylo*l dan terakhir *objek glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 \times .

H. Pengamatan dan Pengumpulan Data

Kriteria penilaian histologis dibuat berdasarkan kepadatan serabut kolagen, karena mengingat bentuk serabut kolagen dalam jaringan ikat adalah tidak beraturan. Kriteria dibuat berdasarkan penelitian Mawardi, *et al.*, (2002) dengan penilaian yang berdasarkan kriteria:

- A. (-) : tidak tampak gambaran serabut kolagen
- B. (+) : serabut kolagen terlihat tipis/ sedikit sekali
- C. (++) : serabut kolagen terlihat menyebar tipis
- D. (+++) : serabut kolagen terlihat menyebar tebal
- E. (++++): serabut kolagen terlihat mengumpul tebal

Hasil penilaian dapat diperoleh dengan diubah dalam angka:

- A. (-) : 0
- B. (+) : 1
- C. (++) : 2
- D. (+++) : 3
- E. (++++) : 4

I. Analisis Data

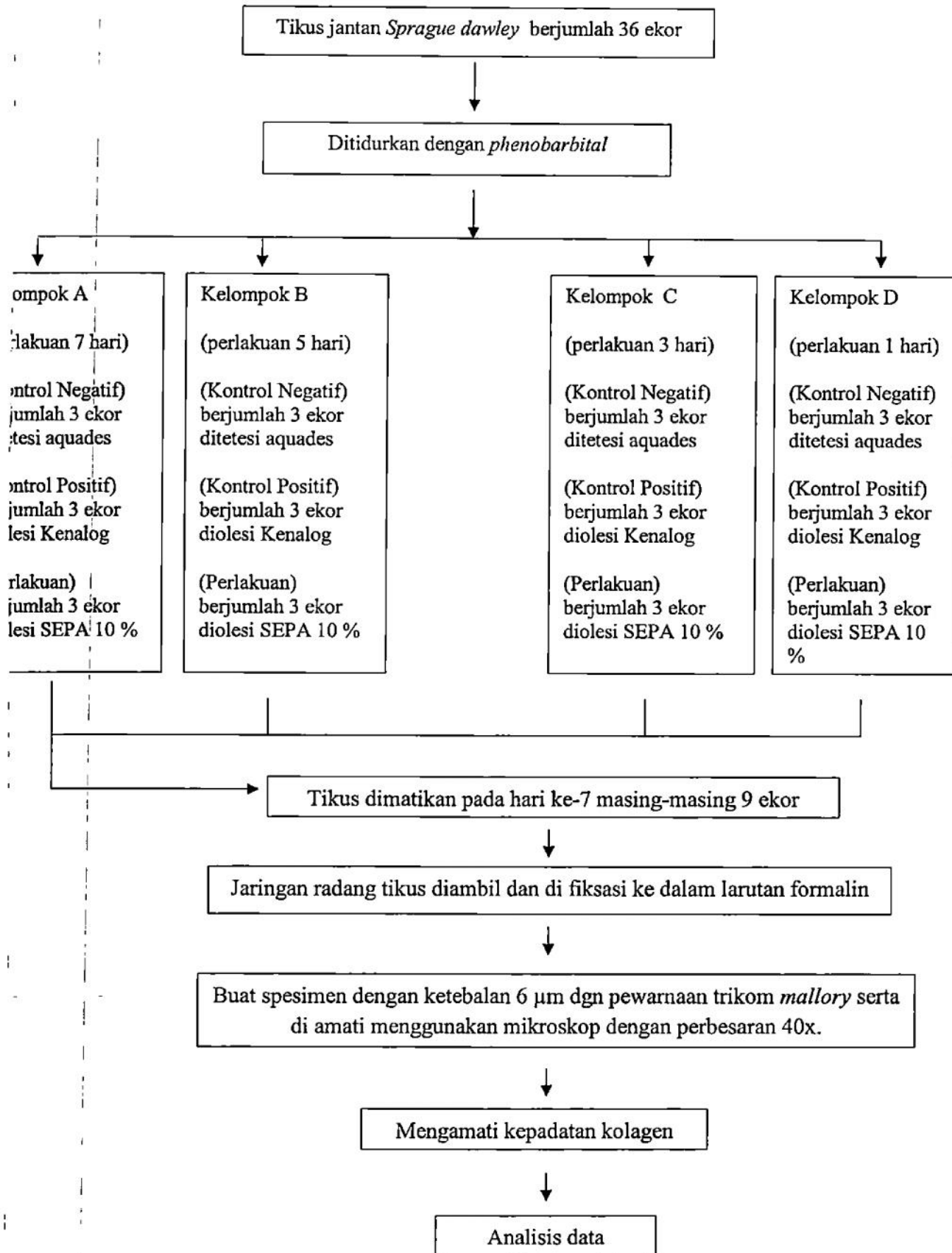
1. Uji Normalitas

Data diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk*.

Sebaran data dianggap normal jika $p > 0,05$.

2. Uji Hipotesis

- a. Bila didapatkan distribusi data normal, maka dilakukan uji hipotesis dengan menggunakan statistik parametrik one way ANOVA. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.
- b. Bila didapatkan distribusi data tidak normal, maka dilakukan uji hipotesis dengan uji Kruskal Wallis. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.



Gambar 5. Alur Pelaksanaan Penelitian