

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedis FKIK UMY, Laboratorium Histologi FKIK UMY. Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi UGM dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM selama dua bulan.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini menggunakan 39 tikus jantan *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang berumur \pm 3 bulan dengan berat badan 200-250 gram.

D. Variabel dan Definisi Operational Penelitian

1. Variabel

- a. Variabel bebas : Krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata* Ait atau KEEPA.
- b. Variabel terikat : Gambaran histopatologi ketebalan Epitel dan jumlah Fibroblas.
- c. Variabel terkontrol :

1) Spesies tikus yaitu menggunakan spesies *Rattus norvegicus* galur

Wistar.

- 2) Umur tikus yaitu menggunakan tikus berumur \pm 3 bulan.
- 3) Jenis kelamin tikus yaitu menggunakan tikus jantan.
- 4) Makanan yang diberikan adalah pakan standar BR-2 dan minuman untuk tikus.
- 5) Konsentrasi KEEPA yaitu dengan konsentrasi 1,25 %, 2,5% dan 5%.
- 6) Bahan base yaitu Asam Stearat, Gliserin, Metil Paraben dan Propil Paraben.
- 7) Konsentrasi H₂O₂ yaitu dengan konsentrasi 10%.
- 8) Konsentrasi anestesi Lidocain yaitu pada konsentrasi 5%.

2. Definisi operasional

- a) Ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait* adalah bentuk sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif menggunakan metode maserasi dengan etanol 70 %. Daun yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau dimulai daun ketiga dari pucuk.
- b) Krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Bahan obat terlarut yang digunakan adalah ekstrak etanol yang dibuat dengan formulasi dapat di lihat pada Tabel 1.
- c) Proses penyembuhan luka adalah proses penggantian dan perbaikan

- d) Epitelisasi adalah ketebalan lapisan epitel skuamosa stratifikasi yang tampak berwarna merah jambu dan inti berwarna biru pada pengecatan *Hematoksilin-Eosin* (HE) (Aryenti, 2008).
- e) Fibroblas adalah sel yang tampak berwarna merah jambu dengan inti berwarna biru. Dalam jaringan granulasi muda berbentuk oval kurus dengan inti oval besar atau stelat, pucat dengan kromatin halus dan anak inti yang jelas pada pengecatan *Hematoksilin-Eosin* (HE) (Aryenti, 2008).

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Pipet tetes, mikroskop, penggaris milimeter, spuit injeksi, alat timbangan, corong, spuit injeksi, masker, lanset, handscoon, *cotton bud* dan kandang tikus.

2. Bahan

Larutan H₂O₂ 10 %, krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait*, formalin 10%, anastesi Lidokain 5% dan bahan-bahan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE) untuk pengecatan jaringan epitel dan fibroblas.

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait*

Daun *Plumeria acuminata Ait* yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua sebanyak 5 kilogram yang sudah dipetik kemudian dicuci bersih dengan air yang mengalir. Daun yang sudah dibersihkan lalu

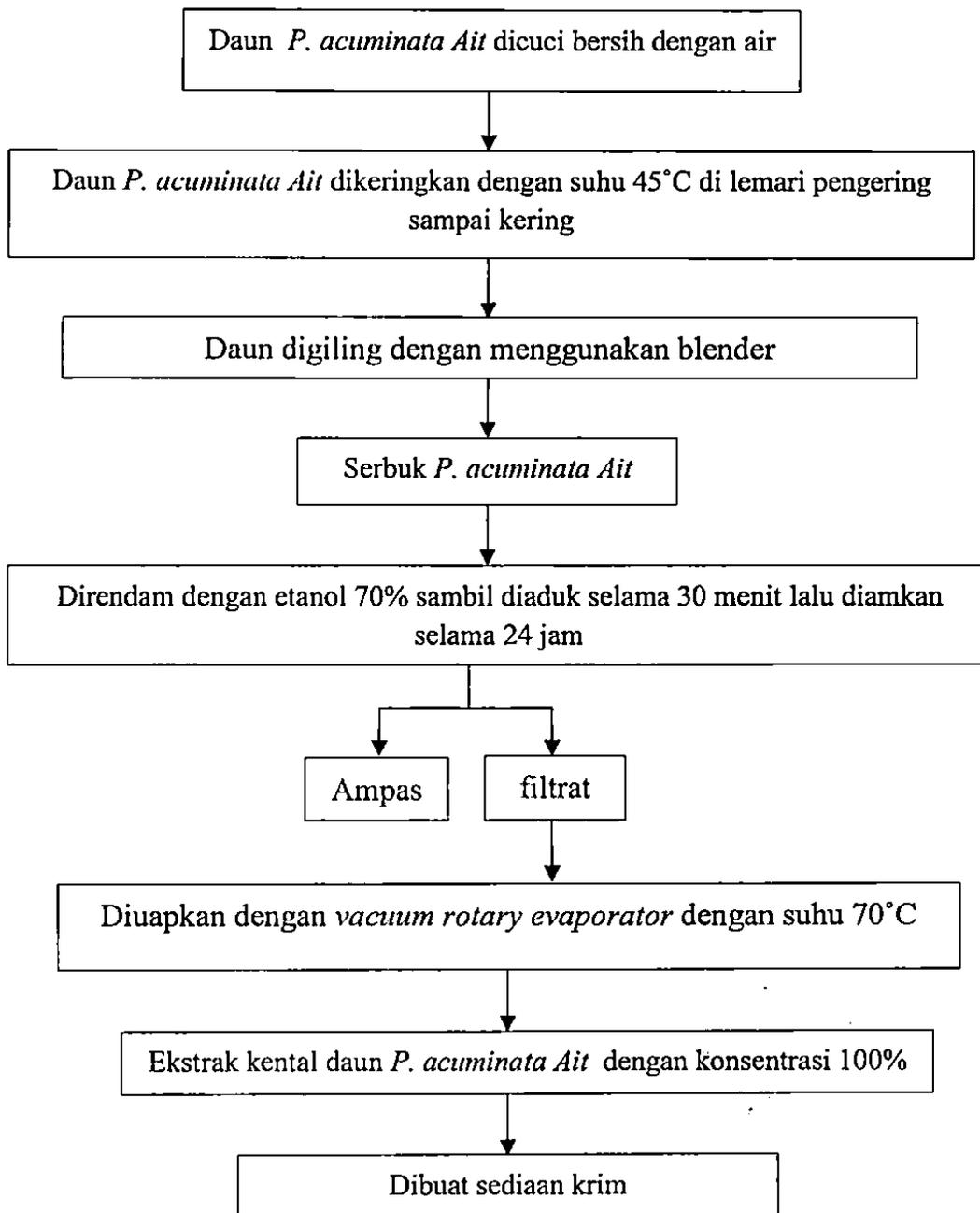
... 15°C di lamari

pengering selama 48jam 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 *Plumeria acuminata Ait.* Dalam perendamannya sambil diaduk selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah direndam maka akan terbentuk filtrate dan ampas. Filtrate diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dalam pemanas *water bath* dengan suhu 70°C. Setelah itu akan diperoleh ekstrak yang kental sebanyak 4,9 gram dengan konsentrasi 100%. Setelah itu ekstrak di jadikan sediaan krim di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Formulasi krim dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formulasi krim daun kamboja (*Plumeria acuminata Ait*)

| Bahan | KEEPA 1,25% | KEEPA 2,5% | KEEPA 5% | Basis krim |
|----------------|------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Ekstrak | 1,25 gram | 2,5 gram | 5 gram | - |
| Asam Stearat | 15 gram | 15 gram | 15 gram | 15 gram |
| Gliserin | 10 gram | 10 gram | 10 gram | 10 gram |
| Metil Paraben | 0,10 gram | 0,10 gram | 0,10 gram | 0,10 gram |
| Propil Paraben | 0,05 gram | 0,05 gram | 0,05 gram | 0,05 gram |
| Air Hingga | 100 gram | 100 gram | 100 gram | 100 gram |

Berikut skema proses pembuatan krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait*



Gambar 4. Skema Proses Pembuatan Krim Ekstrak Etanol Daun *Plumeria acuminata Ait*

2. Pengelompokan hewan uji

Sebelum mendapat perlakuan hewan uji harus diadaptasikan

lebih selama satu minggu. Hewan uji yaitu tikus jantan *Rattus*

norvegicus galur Wistar sebanyak 39 ekor dikelompokkan menjadi 7 kelompok yaitu kelompok pembanding (kelompok yang akan dimatikan setelah terbentuknya radang), 3 kelompok perlakuan, 2 kelompok kontrol dan 1 kelompok tanpa perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus, kecuali kelompok I sebagai kelompok pembanding yang terdiri 3 ekor tikus yang hanya dibuat radang dan tanpa diberi perlakuan. Kelompok perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok II, III dan IV masing-masing diaplikasikan krim ekstrak daun *Plumeria acuminata* Ait atau KEEPA dengan konsentrasi 1,25%, 2,5% dan 5%. Kelompok kontrol terdiri dari 2 kelompok yaitu kelompok V sebagai kelompok kontrol positif yang di aplikasikan Kenalog® dan kelompok VI sebagai kontrol negatif yang diaplikasikan Basis Krim atau Base dan kelompok VII sebagai kelompok Tanpa Perlakuan.

3. Induksi Luka Gingiva

Pertama-tama tikus diberi anastesi lidokain 5% kemudian gingiva tikus dilukai dengan menggunakan lanset sedalam 2 mm. Setelah itu diaplikasikan H₂O₂ 10% menggunakan *cotton bud* sebanyak 0,01 ml dengan menggunakan pipet ukur pada gingiva untuk menginduksi terjadinya radang, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa reaksi oksidasi dari On, yaitu radikal bebas dari H₂O₂ 10% masing-masing 3x 10 menit dalam sehari selama tiga hari

1. Setelah itu tetap dengan menggunakan *Cotton bud* akan terbentuk

4. Uji efektifitas krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait*

Untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait* maka semua hewan uji dikorbankan untuk diambil jaringan radangnya dan dibuat spesimen histologis. Namun waktu untuk mengorbankan hewan uji berbeda untuk setiap kelompok. Setiap kelompok dikorbankan masing-masing 3 tikus. Kelompok I dikorbankan pada hari ke-4 setelah terbentuk radang, karena kelompok I merupakan kelompok yang digunakan untuk pembandingan. Sedangkan kelompok II - VII dikorbankan pada hari ke-4 dan ke-7 setelah diberikan dengan Krim Ekstrak Etanol Daun *Plumeria acuminata Ait*, Kenalog®, Basis krim atau Base dan Tanpa Perlakuan. Setelah semua tikus dikorbankan, maka dilakukan pengambilan jaringan radang dengan memotong rahang bawah tikus tempat 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 temperature kamar. Pembuatan preparat dibuat di laboratorium Patologi Anatomi UGM yang dimulai dengan proses dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10% selama \pm 30 hari pada temperature kamar. Selanjutnya dilakukan processing jaringan dengan menggunakan alat *tissue processor automatic* dengan tahapan fiksasi, infiltrasi, *clearing* dan infiltrasi paraffin. Proses dehidrasi terhadap

dimasukkan ke dalam larutan alkohol dan toluol dengan perbandingan 1:1, kemudian 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 spesimen ke dalam paraffin cair. Proses selanjutnya adalah proses *embedding* terhadap spesimen kemudian diberi label kode. Setelah proses *embedding* selesai maka jaringan diiris secara seri dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μm .

Untuk melihat ketebalan epitel dan jumlah fibroblas pada radang gingiva maka dilakukan pewarnaan *Hemaktosilin-Eosin* (HE). Prosedurnya adalah deparafinisasi dengan menggunakan larutan *xylol* dan alcohol. Kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alcohol lalu dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades serta dilap. Setelah itu kaca benda dimasukkan ke dalam *Hematoksilin Meyer's* dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas dengan aquades, selanjutnya proses pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda ke dalam eosin dan dibilas dengan aquades, kemudian pewarnaan dinilai di bawah mikroskop cahaya. Bila pewarnaan telah dianggap baik maka langkah selanjutnya ialah proses dehidrasi dengan alcohol secara bertingkat kemudian dilap. Setelah itu dimasukkan ke dalam larutan *xylol* dan terakhir *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan

G. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.

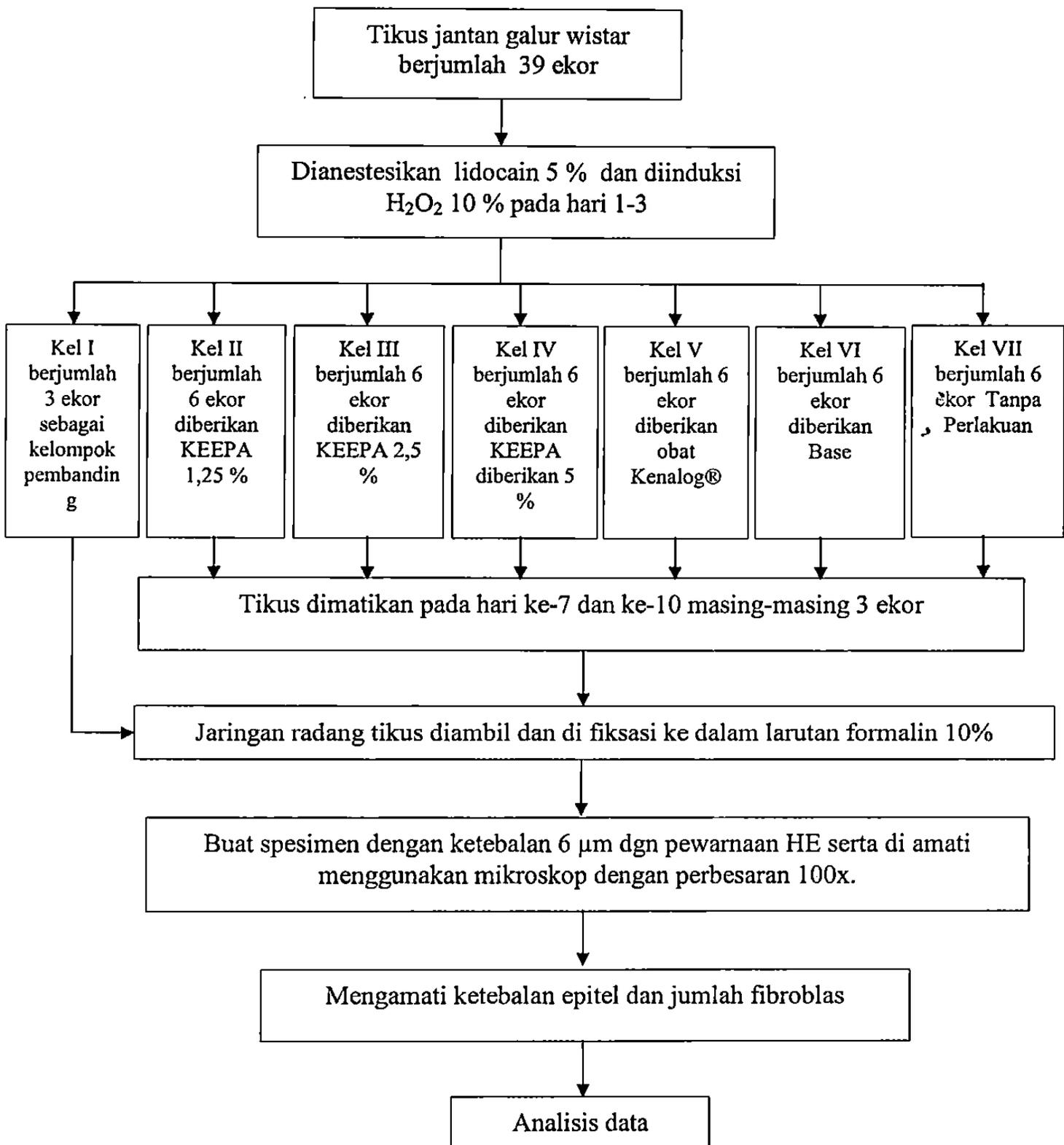
H. Pengamatan dan Pengumpulan data

Menurut Aryanti, 2008 epitelisasi dinilai dengan cara mengukur ketebalan lapisan epitel skuamosa stratifikasi yang tampak berwarna merah jambu dan inti berwarna biru dengan pengecatan *Hematoksin-Eosin* (HE), dengan pengamatan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 x. Ketebalan lapisan epitel diukur dengan penggaris milimeter yang kemudian dikonversi 1 cm = 10^4 milimeter. Untuk menghitung jumlah fibroblas dilihat juga pada pengecatan *Hematoksin-Eosin* (HE), dihitung sel warna merah jambu dengan inti berwarna biru. Pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x.

I. Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan berupa ketebalan epitel dan jumlah sel fibroblas merupakan data berskala ratio. Untuk melihat perbedaan ketebalan epitel dan jumlah sel fibroblas antar kelompok dan antar waktu dari hari ke-0, ke-4, dan ke-7 pada kelompok perlakuan, kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif digunakan uji statistik *one way ANOVA* satu

... ..



Gambar 5. Prosedur Penelitian