

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang di kerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*. Rancangan secara acak dengan tes akhir dan kelompok kontrol. Rancangan ini memiliki ciri adanya dua kelompok yang ditentukan secara *random* yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Dalam desain ini, kelompok eksperimen diberi perlakuan sedangkan kelompok kontrol tidak diberi perlakuan. Dalam penelitian ini, pengaruh eksperimen dianalisis dengan uji beda untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol.

4.2 Sampel

Sampel penelitian adalah tikus wistar jenis *Rattus norvegicus* strain wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih dengan sekam yang diganti setiap hari. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan:

Kriteria Inklusi:

- a. Jenis kelamin jantan.
- b. Usia 10 minggu.
- c. Berat badan 180 - 200 gram.
- d. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi:

- a. Tikus yang pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Tikus galur *Rattus norvegicus* dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia, harganya lebih terjangkau dibandingkan dengan menggunakan marmot (*Cavia cobaya*), serta luas penampang gingivanya lebih luas jika dibandingkan dengan mencit (*Mus musculus albinus*).

Dalam penelitian ini, tikus Wistar akan dibagi menjadi dua kelompok yaitu, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Semua kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi pada regio anterior rahang bawah. Pada kelompok kontrol, luka tidak diberikan bahan apapun, sedangkan kelompok perlakuan akan dikelompokkan lagi menjadi tiga perlakuan yaitu kelompok I (kelompok dengan gel getah batang pisang dosis 50%), kelompok II (kelompok dengan gel getah batang pisang dosis 75%) dan kelompok III (kelompok dengan gel getah batang pisang dosis 100%).

Proses reepitelisasi berlangsung antara hari ke-1 sampai hari ke-7 pasca terbentuknya luka. Hari ke-3 menjadi puncak induksi integrin yang berperan penting dalam migrasi sel-sel epitel (Larjava, 2012). Sehingga pengamatan epitel

dilakukan pada H+3 (tiga hari pasca prosedur gingivektomi) dan H+7 (tujuh hari pasca prosedur gingivektomi) agar dapat dibandingkan dalam skala hari.

Jumlah sampel pada penelitian ini adalah setiap tikus mendapatkan perlakuan berbeda dalam rongga mulut, yaitu dibagi menjadi 4 perlakuan (kontrol positif, gel 50%, 75% dan 100%). Penelitian ini menggunakan 2 *time series* yaitu H+3 dan H+7. Menurut Hanafiah (2005), jumlah sampel tiap perlakuan didapatkan dari rumus: $(t - 1) (r - 1) \geq 15$, dengan t adalah jumlah perlakuan (P0, P1, P2, P3), dan r adalah jumlah sampel yang dibutuhkan di setiap perlakuan.

Dari rumus tersebut maka didapatkan hasil perhitungan :

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

$$(4 \text{ perlakuan} \times 2 \text{ time series} - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(8 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$7 (r - 1) \geq 15$$

$$7 r - 7 \geq 15$$

$$7 r \geq 22$$

$$r \geq 3,14$$

Sehingga, sampel yang digunakan adalah 3 tikus ditambah 1 tikus replikasi untuk setiap kelompok perlakuan. Total tikus yang akan digunakan pada penelitian ini sejumlah $4(\text{perlakuan}) \times 2 (\text{hari pengamatan}) \times 4 (\text{tikus yang dibedah setiap } \textit{time series}) = 32$ tikus. Maka diperlukan sampel sejumlah 32 tikus dengan pembedahan 16 tikus setiap *time series* nya.

Berdasarkan hasil penelitian Yosaphat (2010), gel getah batang pisang Raja 80% yang diaplikasikan pada hewan coba marmut (*Cavia cobaya*) dapat mempercepat 30-60% proses penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi. Dalam penelitian ini dosis yang digunakan untuk diuji adalah dosis 50%, 75%, dan 100% gel getah batang pisang, yaitu getah batang pisang murni tanpa tambahan

bahan air. Pada akhirnya didapatkan perkiraan dosis yang akan diteliti dan dibandingkan yaitu gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75% dan 100%.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 variabel, yaitu:

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah getah batang pisang dengan dosis 50%, 75% dan 100% yang diberikan secara topikal yang dibagi dalam 3 kelompok:

1. Kelompok kontrol : Tikus dengan perlakuan gingivektomi tanpa diberikan bahan apapun.
2. Kelompok eksperimen I (P1): Tikus dengan perlakuan gingivektomi dan diberikan gel getah batang pisang dengan dosis 50%.
3. Kelompok eksperimen II (P2): Tikus dengan perlakuan gingivektomi dan diberikan gel getah batang pisang dengan dosis 75%.
4. Kelompok eksperimen III (P3): Tikus dengan perlakuan gingivektomi dan diberikan gel getah batang pisang dengan dosis 100%.

4.3.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol terdiri dari nutrisi makanan, minuman hewan coba, kebersihan kandang, jenis hewan coba, umur, dan berat badan hewan coba.

4.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah ketebalan epitel pada daerah luka.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu \pm 3 bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Perawatan Hewan Coba

Alat yang dibutuhkan untuk perawatan hewan coba adalah bak plastik sejumlah 12 buah, tutup kandang dari anyaman kawat, tempat makan, botol air minum. Bahan yang dibutuhkan untuk hewan coba adalah pakan tikus (pellet), sekam, air mineral.

4.5.2 Prosedur Gingivektomi

Untuk melakukan prosedur gingivektomi, dibutuhkan alat-alat seperti kaca mulut, pinset, sonde halfmoon, tools tray, bur bulat ukuran setengah, tempat antiseptik, syringe irigasi, syringe anestesi, pocket marker, petri dish. Bahan yang dibutuhkan adalah handscoen, masker, obat anestesi (Ketamin 0,2 ml), cotton roll, cotton pellet, povidon iodine 3%, alkohol 70%, kasa steril, aquades.

4.5.3 Pembuatan Gel Getah Batang Pisang Ambon

Pembuatan gel getah batang pisang Ambon menggunakan alat-alat seperti bowl porselen, mortar pastle, gelas ukur, timbangan gram, timbangan milligram, cawan porselen, sendok porselen, gelas beker, pengaduk kaca, tabung kaca dan tutupnya, ketas plastik, sudip. Sedangkan bahan yang dibutuhkan adalah batang pisang Ambon, carbomer, trietanolamin, propilen glikol, aquades, dan natrium benzoat.

4.5.4 Pembedahan Hewan Coba

Alat dan bahan untuk pembedahan hewan coba adalah gunting bedah, pinset, papan bedah, jarum pentul, dietil eter 10%, toples, kamera digital (untuk foto organ), handscoon, masker, NaCl 0,9% fisiologis (untuk mencuci organ), formalin buffer 10%, alcohol 70%, tabung organ 12 buah.

4.5.5 Pembuatan Preparat Jaringan

Pembuatan preparat jaringan membutuhkan bahan utama berupa potongan jaringan hewan yang telah difiksasi dengan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%, ethanol absolute, xylol, parafin, glyserin 99,5 %, ewit (albumin), larutan hematoksilin, lithium carbonat, larutan eosin, DPX, dan larutan dekalsifikasi. Untuk alat yang dibutuhkan adalah telenan, pisau scalpel, pinset, saringan, tissue casset, mesin processor otomatis, mesin vaccum, mesin bloking, freezer (-20°C), mesin microtome, pisau microtome, water bath 46 °C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60°C .

4.6 Definisi Operasional

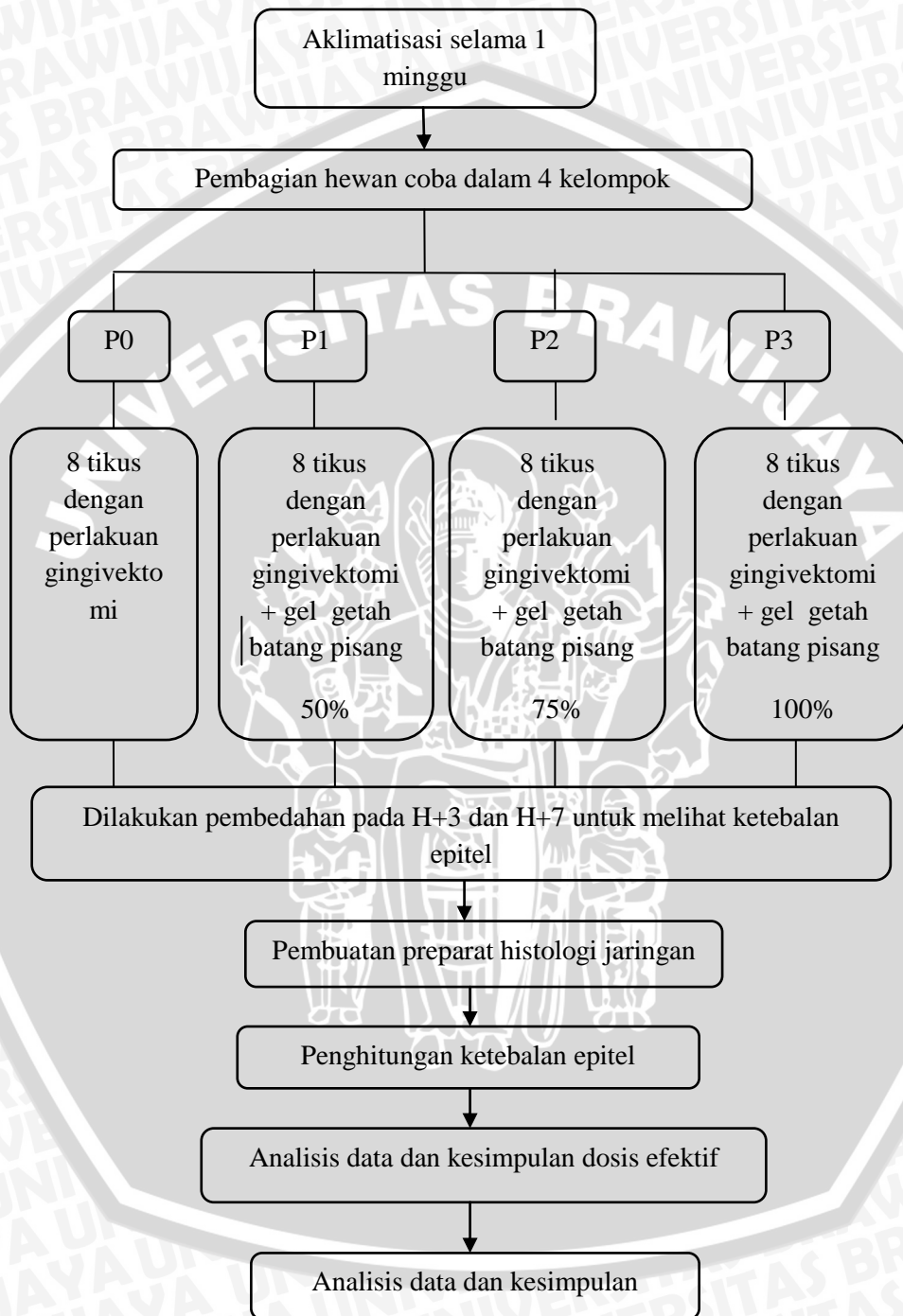
- 4.6.1 Getah batang pohon pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* var *sapientum*) diperoleh dari batang pohon pisang Ambon di kecamatan Pakis, kabupaten Malang, yang berumur sekitar 1 tahun, dengan lebar potongan umbi 15-20 cm. Untuk memperoleh batang pohon pisang Ambon, dilakukan pemotongan kemudian pada bagian tengah dibentuk semacam kawah untuk menampung getah, hingga akhirnya getah dituang ke penampungan. Getah yang keluar ditampung dalam wadah plastik yang steril menggunakan corong.
- 4.6.2. Gingivektomi yang dilakukan pada penelitian ini adalah melukai gingiva tikus *Rattus norvegicus* dengan bur buat ukuran $\frac{1}{2}$ seluas 1 cm x 0,5 cm dengan kedalaman 0,5 mm yang diukur dengan menandai bur bulat dan membandingkan dengan tebal gingiva tikus *Rattus norvegicus* tanpa gingivektomi .
- 4.6.3 Gel yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran getah batang pisang dengan carbomer dalam 3 konsentrasi yakni 50%, 75% dan 100%. Konsistensi gel getah batang pisang ini sama dengan gel komersial, sedangkan warna gel adalah bening, yang menandakan gel tidak teroksidasi.
- 4.6.4 Pemotongan jaringan luka gingivektomi pada mandibula *Rattus norvegicus* dilakukan secara homogen pada luka paling distal regio kanan, yakni sekitar 2 mm dari interdental insisivus kanan.
- 4.6.5 Ketebalan epitel dilihat dan diukur pada H+3 dan H+7 setelah dilakukan pewarnaan Hematoksin Eosin. Ketebalan epitel yang diukur homogen pada bagian paling distal regio kanan, yakni sekitar 2 mm dari interdental insisivus kanan. Pengukuran ketebalan epitel menggunakan mikrometer okuler pada mikroskop digital dan aplikasi software Olyvia-Olympus dengan perbesaran

400X. Untuk satu gambar histologis, pertama ditentukan panjang area luka yang diukur ketebalan epitelnya sepanjang 5000 μm (setara dengan lebar luka gingivektomi, yaitu 0,5 cm) dalam perbesaran 100x agar seluruh area terlihat. Ujung pertama diukur 1000 μm gingiva bebas, dari titik itu ditandai sepanjang 5000 μm sampai apikal. Kemudian ditentukan 10 garis pengukur dengan jarak yang sama. Selanjutnya perbesaran diubah menjadi 400X dan dengan mikrometer digital dibuat garis yang ditarik dari ujung epitel berkeratin hingga lamina basalis, dan secara otomatis akan menunjukkan besarnya ketebalan jaringan epitel hingga ke-10 titik terukur. Terakhir, diambil rata-rata dari 10 data tersebut.



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Alur penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.2 Pengambilan Getah batang pisang ambon

Batang pohon pisang Ambon diperoleh di sekitar Malang, tepatnya di kecamatan Pakis Kabupaten Malang, kemudian dideterminasi di Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya. berumur 1 tahun dan tumbuh di daerah Malang dengan suhu tropis antara 15-35°C dan curah hujan antara 1000-2500 mm/tahun. Alat-alat yang akan digunakan untuk memotong dan menampung batang pisang disterilisasi dengan autoklaf. Untuk memperoleh getah batang pisang Ambon, dilakukan pemotongan kemudian pada bagian tengah dibentuk semacam kawah untuk menampung getah, hingga akhirnya getah dituang ke penampungan. Getah yang keluar ditampung dalam botol plastik yang steril menggunakan corong. Botol tersebut dibungkus aluminium foil dan disimpan dalam suhu ruangan agar tidak teroksidasi .

4.7.3 Pembuatan Gel Topikal

Prosedur pembuatan gel getah batang pisang Ambon dilakukan di laboratorium farmakosetik Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya dan terdiri dari 2 tahap yakni pembuatan basis gel dan pencampuran dengan getah. Untuk membuat basis gel, langkah awal adalah mendidihkan air dengan *heater*. Sambil menunggu air mendidih, semua bahan ditimbang kecuali carbomer karena carbomer dapat menggumpal dalam ruang terbuka. Takaran bahan untuk membuat basis adalah propylen glicol =3,825 gram, trietanolamin= 1,275 gram, Na-benzoat= 0,1275 gram dilarutkan dalam 3 tetes air panas.

Selanjutnya, setelah air mendidih air dimasukkan ke dalam mortar sampai mortar terasa hangat. Kemudian carbomer ditimbang sebanyak 0,519 gram. Dengan teknik dispersi basah yakni menaburkan perlahan-lahan bahan-bahan yang ditimbang tadi ke dalam 10 tetes air, lalu diamati sampai seluruhnya terdispersi dan diaduk sampai homogen. Langkah berikutnya adalah mencampurkan basis gel dengan getah. Untuk gel dosis 50%, 75% dan 100% secara berurutan membutuhkan 12,25 gram, 19,12 gram, dan 25 gram getah batang pisang Ambon. Getah dituangkan secara perlahan-lahan dan diaduk sampai homogen. Gel yang nampak homogen tetap harus diuji homogenitasnya. Caranya dengan meletakkan sedikit gel diantara 2 kaca preparat dan diamati ada tidaknya gumpalan. Selanjutnya, dilakukan uji pH menggunakan pHmeter. karena pH yang dibutuhkan agar zat aktif dalam getah bataang pisang Ambon dapat bekerja adalah pH normal, maka pH dari gel getah batang pisang Ambon juga harus normal.

4.7.4 Tindakan Gingivektomi

Tindakan gingivektomi yang dilakukan adalah dengan desain berbentuk persegi namun tidak menyudut di bagian tepinya. Ukuran luka gingiva kurang lebih antara 1 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,5 mm. Pengukuran kedalaman menggunakan penanda pada bur dan membandingkan dengan gingiva tikus tanpa prosedur gingivektomi. Pengangkatan daerah gingiva yang dieliminasi digunakan *round diamond bur low speed* nomor 1/2.

Tindakan gingivektomi secara standar yang dilakukan adalah dengan tahapan sebagai berikut:

- a) Mempersiapkan alat dan bahan.

- b) Mengaplikasi antiseptik pada daerah operasi.
- c) Melakukan anestesi pada daerah operasi.
- d) Melakukan pemeriksaan dengan menggunakan periodontal probe untuk mengetahui dasar gingiva cekat.
- e) Menandai dasar poket dengan membuat *bleeding point* menggunakan pocket marker.
- f) Melakukan insisi dan pembuangan jaringan dengan scalpel (menggunakan blade nomor 11, 12 atau 15).
- g) Membuat dasar gingiva hingga menjadi *zero pocket*.
- h) Melakukan SRP untuk membersihkan dental deposit.
- i) Irigasi daerah operasi dengan normal salin.
- j) Kontrol perdarahan dan aplikasikan periodontal pack.

Dalam penelitian ini, prosedur pembuatan luka gingiva akan dilakukan pada tikus Wistar *Rattus norvegicus* yang tidak mengalami hiperplasi gingiva pada regio anterior rahang bawah, tahapan yang dilakukan antara lain:

- a) Mengaplikasi antiseptik pada daerah operasi.
- b) Melakukan anestesi daerah operasi menggunakan obat anestesi ketamine, perhitungan sediaan 50mg/ml dan kebutuhan dengan onset waktu 10-15 menit adalah 40mg/kg BB, maka dengan BB tikus ± 200 mg memerlukan 0,2 ml. Ketamine 0,2 ml secara intraperitoneal untuk memberikan efek analgesik dan sedasi sebelum dilakukan gingivektomi.
- c) Melakukan eksisi gingiva di regio anterior rahang bawah. Penggunaan round diamond bur *low speed* nomor $\frac{1}{2}$.
- d) Melakukan irigasi dengan antiseptik.
- e) Melakukan kontrol perdarahan menggunakan kasa steril.

- f) Mengaplikasikan basis gel dan gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75%, dan 100% pada kelompok perlakuan.
- g) Melakukan perawatan pasca gingivektomi dengan pemberian pakan yang lunak dan pemberian analgesik metampiron 0,2 ml intramuskular.

4.7.5 Pembedahan Hewan Coba

Pada H+3 dan H+7, hewan coba dieuthanasia dengan menggunakan anestesi inhalasi dietil eter 10% dengan cara memasukkan tikus ke dalam toples kemudian dimasukkan kapas yang telah dibasahi dengan eter. Setelah proses euthanasia selesai, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan gingiva pasca gingivektomi pada hewan coba beserta sedikit tulang rahang disekitarnya. Jaringan tersebut kemudian dibersihkan dengan NaCl 0,9% fisiologis dan dimasukkan ke dalam botol organ yang sudah berisi larutan BNF (Buffered Neutral Formalin) 10% pH antara 6,5-7,5 selama 1 hari (Yosaphat, 2010).

4.7.6 Pembuatan Preparat

Prosedur selanjutnya adalah perendaman jaringan dalam EDTA selama 30 hari dan diganti tiap 24 jam lalu dicuci dengan air mengalir. Setelah itu dilakukan dehidrasi dengan aceton 1X24 jam dan clearing dengan xilol 2x selama 1 jam kemudian proses infiltrasi dengan paraffin lunak pada suhu 42°-46°C selama 2 x 1 jam. Lalu blocking dengan paraffin keras pada suhu 46°-52°C selama 1 jam dilanjutkan sliding pada rotari mikrotom 4-6 µm kemudian dipanaskan pada suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi yaitu dengan perendaman dengan xilol 2x selama 5 menit, kemudian pada alkohol bertingkat

dengan urutan 2x alkohol absolut, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% dan H₂O; masing-masing selama 3 menit.

Langkah terakhir dilakukan pewarnaan Hematoxilen-Eosin (HE). Pertama pemberian H&E selama 15 menit, lalu ditetesi alkohol asam selama 3-10 detik dilanjutkan dengan pemberian larutan amonium selama 3-10 detik. Kemudian diberi counter staining selama 15-20 detik dilanjutkan dengan dehidrasi pada alkohol bertingkat. Terakhir pemberian xilol selama 5 menit dan mounting menggunakan entelan kemudian pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop.

4.7.7 Penghitungan Ketebalan Epitel pada Luka dan Persentase Penyembuhan Luka

Ketebalan epitel dilihat dan diukur pada H+3 dan H+7 setelah dilakukan pewarnaan Hematoksin Eosin. Ketebalan epitel yang diukur homogen pada bagian paling distal regio kanan, yakni sekitar 2 mm dari interdental insisivus kanan. Pengukuran ketebalan epitel menggunakan mikrometer okuler pada mikroskop digital dan aplikasi software Olyvia-Olympus dengan perbesaran 400X. Untuk satu gambar histologis, pertama ditentukan panjang area luka yang diukur ketebalan epitelnya sepanjang 5000 µm (setara dengan lebar luka gingivektomi, yaitu 0,5 cm) dalam perbesaran 100x agar seluruh area terlihat. Ujung pertama diukur 1000 µm gingiva bebas, dari titik itu ditandai sepanjang 5000 µm sampai apikal. Kemudian ditentukan 10 garis pengukur dengan jarak yang sama. Selanjutnya perbesaran diubah menjadi 400X dan dengan mikrometer digital dibuat garis yang ditarik dari ujung epitel berkeratin hingga lamina basalis, dan secara otomatis akan menunjukkan besarnya ketebalan

jaringan epitel hingga ke-10 titik terukur. Terakhir, diambil rata-rata dari 10 data tersebut.

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran ketebalan epitel yang positif pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 for windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis kompratif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

- Uji One-Way ANOVA: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- Post Hoc Tes (Uji Least Significant Difference): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p=0,05$).
- Uji korelasi Pearson : untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji Post Hoc (LSD).
- Uji analisis univariat: bertujuan melihat apakah data hasil H+3 dan H+7 berbeda secara signifikan.
- Uji regresi: bertujuan untuk melihat besarnya efek perlakuan terhadap variabel dependen.

