

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian ini adalah dengan eksperimental murni yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo*. Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana subyek ini dibagi menjadi 4 kelompok (I sampai dengan IV) secara random. Kelompok I (kelompok kontrol) adalah tikus tanpa pemberian ekstrak *Persea americana* dan kelompok II sampai dengan IV (kelompok perlakuan) adalah tikus yang diberi ekstrak *Persea americana* dengan dosis berbeda per oral dengan sonde setiap hari sekali. Kemudian pembedahan dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7. Setelah pembedahan, dilakukan observasi dan dibandingkan pengaruh ekstrak *Persea americana* terhadap jumlah fibroblas yang terbentuk.

4.2 Sampel

4.2.1 Pemilihan Hewan Coba dan Teknik Randomisasi

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan sebagai berikut.

1. Kriteria inklusi:

- a. tikus jenis kelamin jantan (untuk menghindari efek hormonal yang lebih dominan dari tikus jenis kelamin betina),
- b. usia 2,5-3 bulan,
- c. berat badan 250-350 gram,
- d. sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif,
- e. mata jernih,
- f. bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

2. Kriteria eksklusi:

- a. tikus yang selama penelitian tidak mau makan,
- b. tikus yang berat badannya kurang dari 250 gram,
- c. tikus yang mengalami diare selama penelitian ditandai dengan feses yang tidak berbentuk,
- d. tikus yang mengalami tanda-tanda infeksi (terdapat benjolan, berwarna kemerahan, dan suhu tubuh meningkat),
- e. tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Tikus galur wistar dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia. Lalu sampel dibagi kedalam empat kelompok dengan teknik *simple random sampling*.

Teknik randomisasi untuk pengelompokkan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) mengingat baik hewan coba, bahan pakan dan bahan penelitian lainnya adalah homogen. Pada rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel, baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan, serta menggunakan 2 *time series* yaitu hari ke-3 dan ke-7. Menurut Hanafiah (2005), jumlah sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan rumus:

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

dimana t= jumlah perlakuan, dan r= jumlah sampel tiap perlakuan.

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

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

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 22$$

$$r \geq 3,14 \approx 3$$

$$\text{Total sampel} = 3 \times 2 \text{ (time series)}$$

$$= 24$$

Dari perhitungan didapatkan $r \geq 3$, sehingga masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali replikasi untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.



Total tikus yang akan digunakan pada penelitian ini sejumlah 4 (perlakuan) x 2 (hari pengamatan) x 3 (tikus yang dibedah setiap *time series*) = 24 tikus. Maka diperlukan sampel sejumlah 24 tikus dengan pembedahan 12 tikus setiap *time series*-nya.

4.3 Penentuan Dosis

Rentang dosis yang digunakan diambil dari penelitian sebelumnya oleh Nayak *et al* (2008) yaitu 300 mg/kgBB, yang ditentukan sebagai dosis II. Jika dosis II adalah 300 mg/kgBB, maka dosis I adalah $\frac{1}{2}$ dosis II sehingga diperoleh 150 mg/kgBB dan dosis III adalah $\frac{3}{2}$ dosis II sehingga diperoleh 450 mg/kgBB (Hutomo, 2010).

4.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Variabel independen

Ekstrak *Persea americana*.

2. Variabel dependen

Jumlah sel fibroblas pada luka pasca pencabutan gigi.

3. Variabel luar

- a. Makanan sampel.

- b. Lingkungan kandang hewan coba.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Ekstrak *Persea americana*

Ekstrak *Persea americana* adalah sari-sari yang diperoleh dari daging buah alpukat yang diekstraksi menggunakan metode soxhletasi, dan kemudian dibagi menjadi beberapa dosis yaitu 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 450 mg/kgBB. Alpukat atau *Persea americana* yang digunakan dalam penelitian ini dibeli secara langsung di pasar Blimbing, Malang. Bagian yang digunakan adalah daging buah alpukat yang sudah matang dengan kriteria berwarna hijau kekuningan dan bertekstur lunak. Selanjutnya, daging buah alpukat diekstrak menggunakan metode soxhletasi.

4.5.2 Soket Gigi

Soket gigi yang dimaksud dalam penelitian ini adalah soket gigi mandibula *Rattus norvegicus*. Soket gigi adalah lubang dalam tulang alveolar pada rahang yang memberikan tempat untuk melekatnya akar gigi. Bagian tengah dari soket mandibula dipotong secara melintang dan diambil untuk pembuatan sediaan histologi.

4.5.3 Jumlah Sel Fibroblas

Jumlah sel fibroblas adalah seluruh sel fibroblas yang tampak per lapang pandang pada sediaan preparat yang diambil pasca pencabutan gigi tikus putih jantan. Bagian soket gigi dipotong secara melintang dan diberi pewarnaan

dengan hematoksin eosin, kemudian diperiksa secara mikroskopik dengan pembesaran 400 kali. Sediaan diambil pada hari ke-3 dan ke-7 pasca pencabutan gigi. Jumlah sel fibroblas yang terbentuk dihitung di setiap lapangan pandang yang ditetapkan dalam tiap sediaan. Tiap sediaan dievaluasi pada 5 lapangan pandang secara mikrobiologi. Fibroblas berbentuk gelendong atau fusiform, gepeng, dan berukuran besar. Intinya lonjong atau memanjang diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti yang jelas, dan berwarna pucat dengan kromatin halus.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

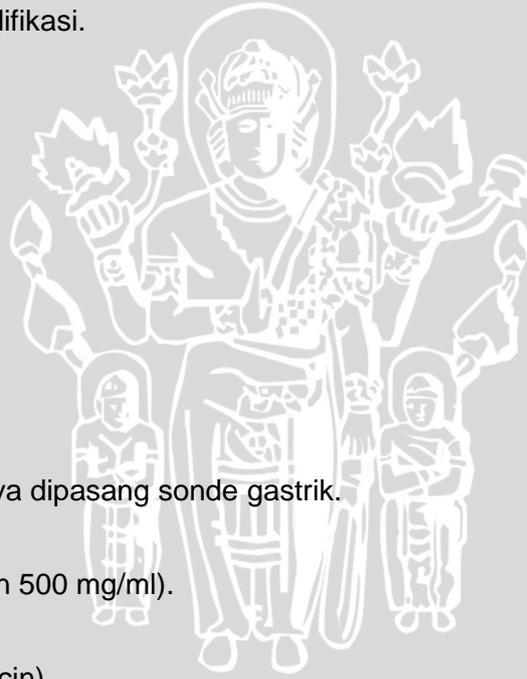
Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam waktu \pm 4 bulan.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

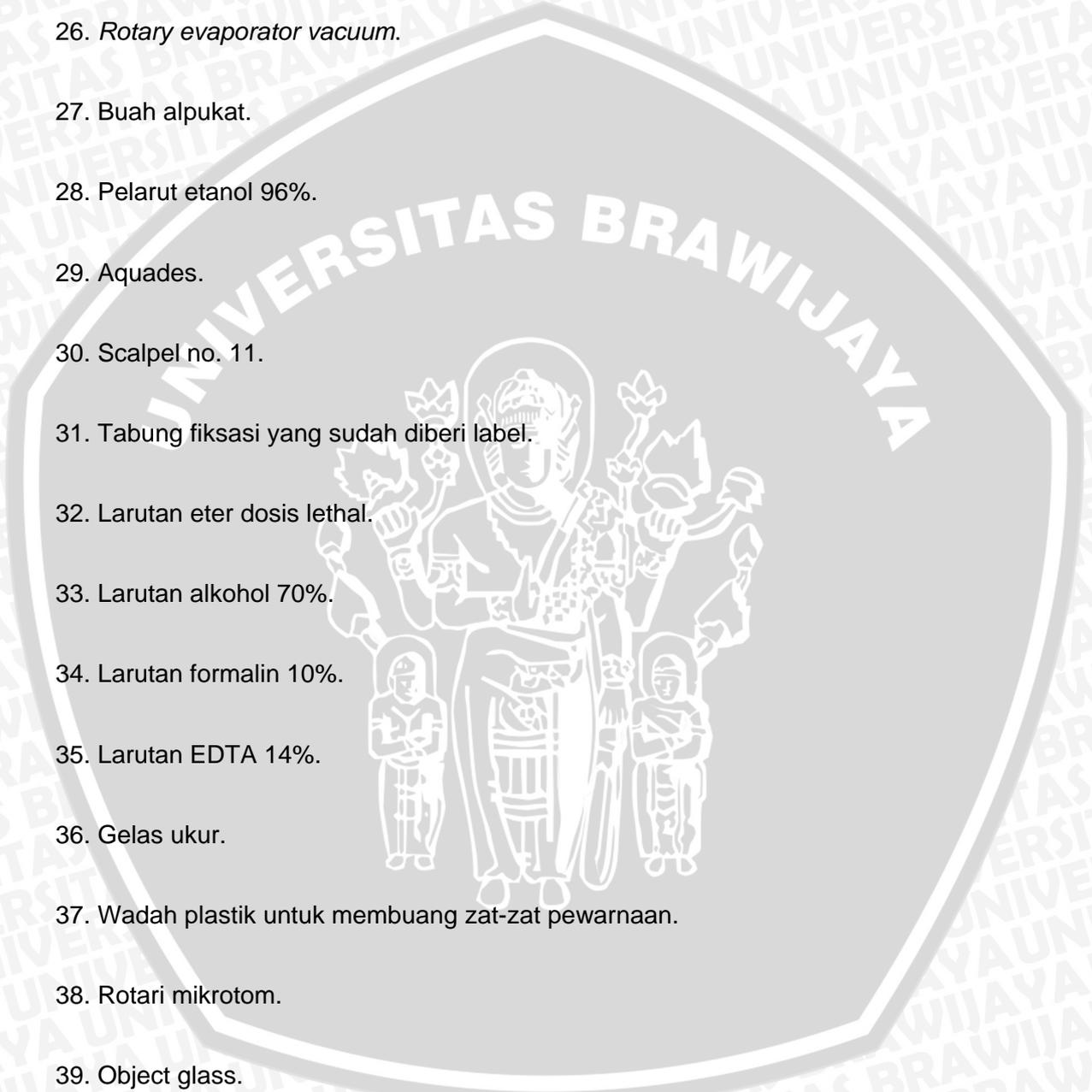
Alat dan bahan yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut.

1. Masker.
2. Sarung tangan.
3. 10 buah box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³
4. 24 tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar.
5. Kawat kasa sebagai tutup box.

6. Sekam sebagai dasar box.
7. Tempat minum.
8. Makanan hewan coba (*Comfeed*).
9. Minuman hewan coba (air PDAM yang diberikan *ad libitum*).
10. Neraca Ohaus merek Sartorius.
11. Lecron modifikasi.
12. Needle holder modifikasi.
13. Pinset.
14. Kapas.
15. Kassa.
16. Spuit.
17. Spuit yang ujungnya dipasang sonde gastrik.
18. Analgesik (novalgin 500 mg/ml).
19. Antibiotik (gentamicin).
20. Pisau.
21. Mortar dan pestle water bath.
22. Neraca analitik.
23. Kertas saring.



24. Beaker glass 250 ml.
25. Tabung ekstraktor soxhlet.
26. Rotary evaporator vacuum.
27. Buah alpukat.
28. Pelarut etanol 96%.
29. Aquades.
30. Scalpel no. 11.
31. Tabung fiksasi yang sudah diberi label.
32. Larutan eter dosis lethal.
33. Larutan alkohol 70%.
34. Larutan formalin 10%.
35. Larutan EDTA 14%.
36. Gelas ukur.
37. Wadah plastik untuk membuang zat-zat pewarnaan.
38. Rotari mikrotom.
39. Object glass.
40. Cover glass.
41. Mikroskop cahaya.



42. Mikroskop Olympus photo slide BX51 dengan kamera DP71 12 megapixel.
43. HCl 5%.
44. Amonium oksalat 1%.
45. Alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 95%, dan 96% dengan prusi.
46. Larutan xylo.
47. Parafin.
48. Hematoksilin.
49. Eosin.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diseleksi berdasarkan kriteria sampel, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus yang dipelihara dalam tempat pemeliharaan hewan coba.

4.8.2 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama 1 minggu pada temperatur ruangan konstan (22-24°C) (Tandon *et al*, 2000). Untuk tempat pemeliharaan digunakan 10 box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³, masing-masing untuk 4-5 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa, dan diberi alas sekam yang diganti setiap minggu. Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 50

gr/hari/ekor. Diet normal terdiri dari 67% *Comfeed* PAR-S, 33% terigu dan air secukupnya (Anwari, 2003).

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol *Persea americana*

Pembuatan ekstrak alpukat menggunakan metode soxhletasi dengan prosedur sebagai berikut.

1. Cuci buah alpukat dengan air bersih mengalir, lalu keringkan.
2. Belah alpukat menggunakan pisau dan ambil daging buahnya.
3. Haluskan daging buah alpukat menggunakan mortar dan pestle.
4. Timbang daging buah alpukat yang sudah dihaluskan hingga mencapai 1300 gram menggunakan timbangan analitik.
5. Bungkus menggunakan kertas saring.
6. Masukkan ke dalam tabung ekstraktor *soxhlet*.
7. Tambahkan pelarut etanol 96% dari bagian alas sampai tumpah ke dalam labu.
8. Tambahkan pelarut lagi hingga setengahnya.
9. Panaskan labu yang berisi pelarut pada suhu medium sampai mendidih.
10. Amati proses terjadinya sirkulasi kontinu pelarut etanol hingga semua ekstrak dianggap telah terekstrasi.

Prosedur proses evaporasi dengan *rotary evaporator vacuum* adalah sebagai berikut.

1. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja.
2. Masukkan hasil ekstraksi dalam labu ekstraksi.
3. Letakkan 1 set alas evaporasi sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada water bath.
4. Hubungkan water bath dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70°C.
5. Tunggu proses bedalan (pengembunan dan pemisahan di pendingin) sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi.
6. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100%.

4.8.4 Pencabutan Gigi Tikus

Gigi insisivus kanan rahang bawah adalah gigi yang dipilih untuk dilakukan pencabutan, dikarenakan tidak terdapat perbedaan struktur dari gigi dan jaringan di sekitar gigi antara gigi insisivus dan gigi molar tikus. Sebelum dilakukan pencabutan gigi, masing-masing tikus terlebih dahulu dilakukan anestesi ketamin secara intraperitoneal dengan dosis 1.000 mg/ 10 ml. Masing-masing tikus diinjeksi sebanyak 0,2 ml. Prosedur perlakuannya adalah sebagai berikut.

1. Ulasi alkohol 70% pada bagian yang akan dianestesi.

2. Masukkan jarum suntik pada 2/3 posterior dari perut. Sebaiknya hindari sisi kiri pada hewan pengerat karena adanya *cecum*.
3. Lakukan aspirasi; jika ada sesuatu yang terhisap (kemungkinan terkena *viscera*), injeksi ulang dengan jarum yang baru.
4. Jika letak jarum sudah benar, obat dapat disuntikkan. Tikus akan tertidur \pm 3 menit setelah injeksi, dan tikus akan sadar \pm 1 jam.
5. Pisahkan akar gigi dari gingiva menggunakan lecron modifikasi.
6. Ekstraksi gigi menggunakan needle holder modifikasi secara hati-hati.
7. Irigasi soket menggunakan larutan akuades steril untuk membersihkan sisa fragmen gigi.
8. Kontrol perdarahan menggunakan kassa steril.

4.8.5 Pemberian Ekstrak Buah Alpukat

Pemberian ekstrak alpukat diberikan satu kali per hari sebanyak 1 cc secara per oral selama 3 hari untuk kelompok tikus pembedahan hari ke-3 dan 7 hari untuk kelompok tikus pembedahan hari ke-7. Pemberian ekstrak alpukat pada kelompok dosis I (150 mg/kgBB/hari), dosis II (300 mg/kgBB/hari), dan dosis III (450 mg/kgBB/hari) secara per oral menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde gastrik sehingga dapat masuk ke mulut tikus hingga ke lambung.

4.8.6 Pemberian Analgesik dan Antibiotik

Pemberian analgesik pada tikus bertujuan untuk menghilangkan rasa nyeri pasca pencabutan gigi. Analgesik yang digunakan adalah novalgin, karena

dapat diberikan pada tikus secara injeksi. Analgesik diberikan 1 kali/ hari selama 1 hari dengan dosis 0,3 ml secara intraperitoneal. Jika selama penelitian tikus mengalami gejala infeksi, diberikan antibiotik yang bertujuan untuk mengontrol infeksi tersebut. Antibiotik yang digunakan adalah gentamicin, karena merupakan antibiotik yang paling cocok untuk tikus (EMEA, 2002). Antibiotik diberikan 1 kali/ hari selama 3 hari dengan dosis 0,3 ml secara intraperitoneal.

4.8.7 Perawatan Hewan Coba Pasca Pencabutan Gigi

Pemberian makan setelah pencabutan berbeda dengan pemberian makan sebelum pencabutan. Untuk menghindari gangguan penyembuhan luka pada soket dan rasa sakit pada soket oleh makanan, maka pemberian makanan setelah pencabutan gigi adalah dengan mengencerkan makanan tikus, dan pemberian dilakukan dengan sonde gastrik langsung menuju lambung tanpa melewati mulut. Hal tersebut dilakukan secara rutin setiap pagi dan sore hari. Selain itu juga dilakukan pemberian minum dari air PDAM secukupnya.

4.8.8 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7. Dilakukan eutanasia pada tikus masing-masing kelompok perlakuan dengan menggunakan inhalasi eter dosis lethal dengan cara yang sama dengan proses anestesi inhalasi di atas. Sebelum rahang bawahnya diambil, konfirmasi kematian tikus harus dilakukan dengan cara melihat respirasinya. Apabila sudah tidak ada aktivitas respirasi, pengambilan sediaan menggunakan scalpel no. 11 dan diambil rahang bawahnya dimana terdapat gigi yang sudah dicabut. Rahang bawah tikus kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan formalin 10%

untuk fiksasi jaringan dan diberi label. Jasad *Rattus norvegicus* kemudian dikuburkan dalam tanah dengan kedalaman 1 m.

4.8.9 Pembuatan Sediaan

Jaringan mandibula diproses untuk membuat sediaan histologi dengan menggunakan teknik rutin dengan prosedur sebagai berikut.

1. Potong mandibula dengan arah sagital labio-lingual pada daerah insisiv sentralis mandibula, mulai dari bagian ujung sampai dasar mandibula untuk dibuat sediaan histologi.
2. Masukkan potongan mandibula ke dalam automatic tissue processor, kemudian dehidrasi dengan alkohol 99% secara bertahap (dari konsentrasi rendah ke tinggi) untuk membersihkan sisa – sisa fiksatif.
3. Lakukan proses clearing dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan xylol.
4. Lakukan proses impregnasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan parafin.
5. Lakukan pembuatan blok (embedding).
6. Lakukan prosedur penanaman dengan infiltrasi parafin cair pada suhu 57-59°C ke dalam kotak parafin untuk mengisi rongga dalam jaringan yang ditempati oleh air sehingga terbentuk blok parafin.
7. Dinginkan sebentar blok parafin di dalam freezer agar tidak terlalu lunak, kemudian letakkan blok parafin yang sudah menempel pada pemegannya

pada rotary mikrotom dan lakukan pemotongan tipis sesuai ketebalan yang dikehendaki.

8. Masukkan irisan jaringan ke dalam water bath pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$.
9. Seleksi dan pindahkan hasil sayatan ke atas object glass yang telah diolesi egg albumin dan diberi label.
10. Biarkan sediaan jaringan kering dan masukkan ke dalam oven dengan suhu $58-60^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit.
11. Lakukan deparafinasi dengan xylol dan rehidrasi dengan alkohol (dari konsentrasi tinggi ke rendah) untuk menghilangkan xylol.
12. Bilas sediaan dengan air mengalir, kemudian melakukan pengecatan.

4.8.10 Teknik Pengecatan Hematoksilin Eosin

Prosedur pengecatan hematoksilin eosin adalah sebagai berikut.

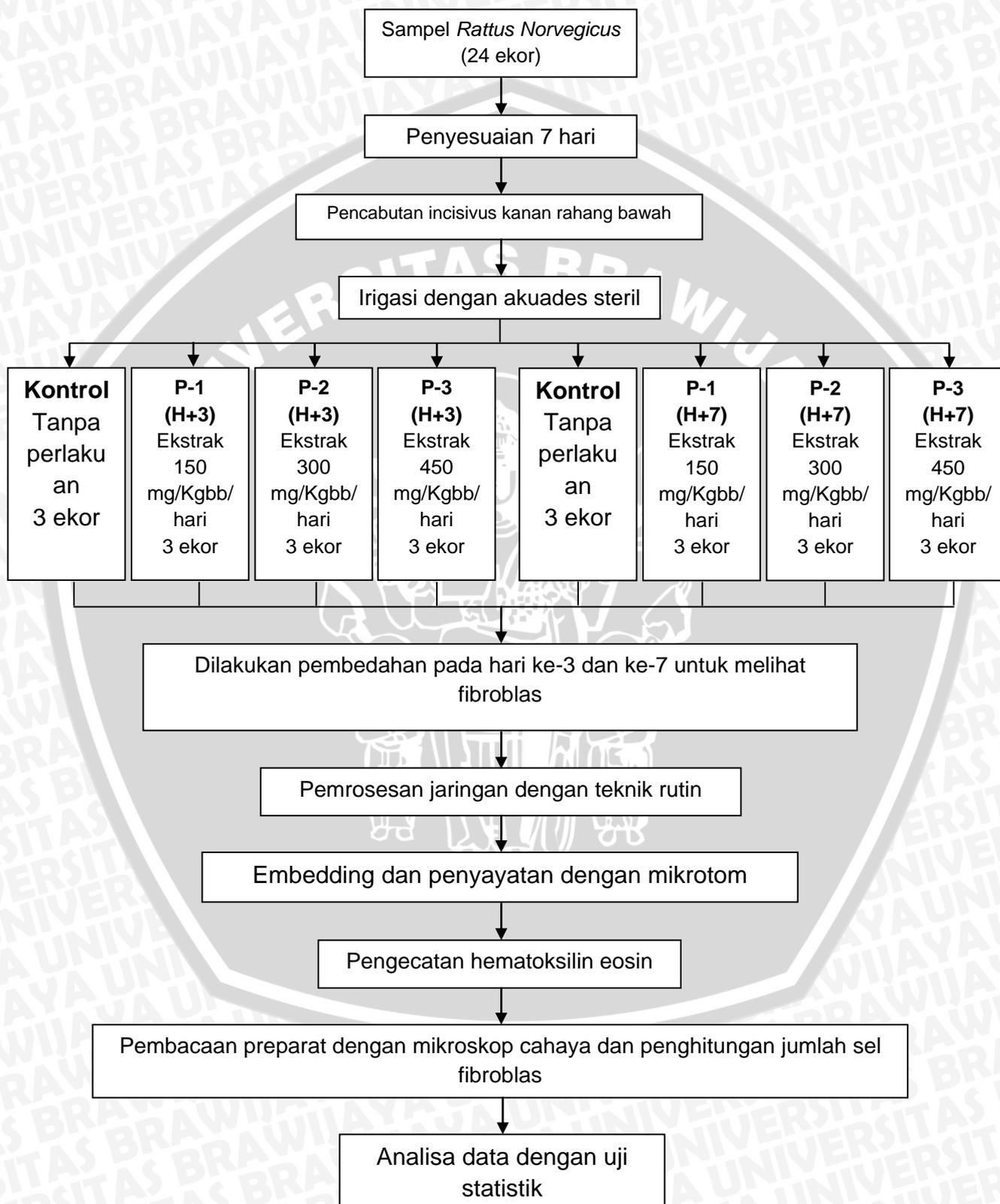
1. Celup sediaan dalam larutan xylol bak 1 selama 2 menit.
2. Pindahkan dalam larutan xylol II selama 2 menit.
3. Dalam alkohol absolute 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit.
4. Dalam alkohol 95% 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit.
5. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit.
6. Masukkan dalam larutan mayer hemotoksilin selama 15 menit.
7. Cuci kembali dengan air.

8. Masukkan ke dalam eosin antara 15 detik sampai 2 menit.
9. Masukkan dalam alkohol 95% 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit.
10. Dalam alkohol absolut 3 bak, bak I, bak II, dan bak III, masing-masing 2 menit.
11. Terakhir dalam xylol bak I, bak II, dan bak III, masing-masing 2 menit.
12. Mounting.

4.8.11 Pengamatan Sediaan Histologi Soket Mandibula *Rattus norvegicus*

Pengamatan dilakukan secara HPA dari hasil biopsi pada hari ke-3 dan ke-7 yaitu dengan membuat foto dari preparat HPA tersebut dan dilakukan penghitungan jumlah sel fibroblas yang terlihat pada hari tersebut, kemudian membandingkan proses penyembuhan pada kelompok perlakuan tersebut dengan kelompok perlakuan yang lainnya.

4.9 Skema Prosedur Penelitian



4.10 Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah sel fibroblas pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 20.0 for Windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p= 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha= 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut.

1. Uji Normalitas Data

Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu data memiliki distribusi normal atau tidak. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran, uji hipotesis menggunakan uji parametrik. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran, uji hipotesis menggunakan uji non parametrik.

2. Uji Homogenitas Varian

Uji ini bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

3. Uji One-way ANOVA

Uji ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui dua kelompok yang berbeda signifikan.

4. Post Hoc Test (Uji Least Significant Difference)

Uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Least Significant Difference* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).

