

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) secara *in vivo* di laboratorium dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

## 4.2 Desain Penelitian

Pada penelitian ini hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok yang tertera dalam tabel berikut:

**Tabel 4.1** Pembagian Kelompok Hewan Coba

No	Nama Kelompok	Perlakuan
1.	Kontrol negatif	Tidak dipapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak daun kemangi
2.	Kontrol Positif	Dipapar asap rokok selama 14 hari dan tidak diberi ekstrak daun kemangi
3.	Perlakuan 1	Dipapar asap rokok selama 14 hari dan diberi ekstrak daun kemangi dengan dosis 800mg/kgBB selama 6 hari.
4.	Perlakuan 2	Dipapar asap rokok selama 14 hari dan diberi ekstrak daun kemangi dengan dosis 1600mg/kgBB selama 6 hari.
5.	Perlakuan 3	Dipapar asap rokok selama 14 hari, diberi ekstrak daun kemangi dengan dosis 800mg ekstrak/kgBB selama 6 hari dengan tetap dipapar asap rokok selama hari pemberian ekstrak.
6.	Perlakuan 4	Dipapar asap rokok selama 14 hari, diberi ekstrak daun kemangi dengan dosis 1600mg ekstrak/kgBB selama 6 hari dengan tetap dipapar asap rokok selama hari pemberian ekstrak.

## 4.3 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus putih *Rattus norvegicus* dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. *Rattus norvegicus* galur murni berjenis kelamin jantan
- b. Belum pernah digunakan untuk penelitian
- c. Umur 8-10 minggu (dewasa)
- d. Berat badan 150-250 gram
- e. Tikus sehat ditandai dengan gerakan aktif, mata jernih dan bulu tebal berwarna putih mengkilap

Perhitungan jumlah pengulangan pada sampel digunakan Rumus Federer sebagai berikut:

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

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$5(r - 1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah sampel setiap perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini minimal 4 ekor tikus sehingga total tikus yang dibutuhkan sejumlah 24 ekor tikus. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan sehingga menjadi 30 ekor tikus.

#### 4.4 Variabel penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum L*) dengan variasi dosis 800mg/kgBB dan 1600mg/kgBB serta paparan asap rokok.

#### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah angiogenesis pada jaringan soket pasca ekstraksi gigi tikus (*Rattus norvegicus*).

#### 4.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah strain, jenis kelamin, umur, model luka tikus (pencabutan gigi) dan pakan.

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang serta Laboratorium Histologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Februari- April 2015.

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.6.1 Perawatan Hewan Coba

Untuk merawat tikus, digunakan kandang dari bak plastik, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, dan timbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

##### 4.6.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

Alat yang dibutuhkan dalam pembuatan ekstrak daun kemangi adalah oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, pendingin spiral/*rotary evaporator*, labu penampung, *evaporator*, *setal water pump*, *water pump*, *water bath*, *vacum pump*, mortar dan botol hasil ekstrak.

Bahan yang dibutuhkan adalah bubuk daun kemangi, etanol 95%, dan *aquadest*.

#### 4.6.3 Pemaparan Asap Rokok

Alat untuk pemaparan asap rokok adalah box tikus, klem, *smoking pump* dan korek api. Bahan yang digunakan adalah rokok merk tertentu yang sejenis.

#### 4.6.4 Pencabutan Gigi Hewan Coba

Alat yang dibutuhkan dalam pencabutan gigi tikus adalah lecron, *needle holder* modifikasi, pinset, spuit dan *petri disk*. Bahan yang dibutuhkan adalah masker, handschoen, kapas, kassa, betadine, pehacain, alkohol 70%, ketamin dan aquadest steril.

#### 4.5.5 Pemberian Ekstrak pada Hewan Coba

Alat yang dibutuhkan dalam pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L*) pada hewan coba adalah sonde gastrik. Bahan yang dibutuhkan adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L*), masker dan *handschoen*.

#### 4.5.6 Pembuatan Sediaan

Alat yang dibutuhkan dalam pembuatan sediaan adalah scalpel, *rotary mikrotom*, *object glass*, *automatic tissue processor*, *freezer*, *water bath*, kotak paraffin, dan oven. Bahan yang dibutuhkan adalah *xylol*, paraffin cair, *egg albumin*, alkohol konsentrasi rendah dan tinggi.

#### 4.5.7 Persiapan Analisis Histologi

Alat yang dibutuhkan untuk analisis histologi adalah wadah pembuangan zat warna, *object glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya, dan kamera digital untuk foto histologi. Bahan yang digunakan adalah *ammonium/potassium alum*, *sodium iodate*, *citric acid*, *chloralhydrate*, alkohol absolut, alkohol 80%, alkohol 95%, larutan *xylol*, HCl, hematoksilin, aquades dan eosin.

## **4.6 Definisi Operasional**

### **4.6.1 Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L*)**

Ekstrak daun kemangi adalah ekstrak yang didapatkan dari ekstraksi pada daun kemangi (*Ocimum sanctum L*) menggunakan metode maserasi dengan etanol dengan variasi dosis 800mg/kgBB dan 1600mg/kgBB. Daun kemangi didapatkan dari Materia Medika Batu dan telah dilakukan identifikasi sebelumnya. Ekstrak daun kemangi diberikan secara per oral pada hewan coba menggunakan sonde gastrik untuk menghindari proses mekanis yang terjadi di mulut.

### **4.6.2 Perhitungan Jumlah Angiogenesis**

Perhitungan jumlah angiogenesis menggunakan software Olyvia pada preparat yang telah di scan sebelumnya. Angiogenesis dihitung pada lima lapangan pandang berdasarkan pembuluh darah yang terlihat pada soket gigi hewan coba dengan perbesaran 100x. Pembuluh darah yang telah dilakukan pengecatan Hematoxylin Eosin menunjukkan gambaran berupa lumen kecil yang terbentuk dari sel endotel skuamosa di sekelilingnya. Bagian tengah lumen berwarna putih, tetapi kadang ditemukan eritrosit.

## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Adaptasi Hewan Coba**

Tikus (*Rattus norvegicus*) diadaptasi selama 7 hari di laboratorium. Tikus dipelihara dalam box plastik, diberi sekam pada alasnya, dan ditutupi kawat jaring. Pakan standar diberikan 40 gram per hari. Setiap box diberi label kelompok dan diisi oleh 4-6 tikus.

#### 4.7.2 Pemaparan Asap Rokok

Pemaparan asap rokok dari jenis rokok tertentu menggunakan *smoking pump* di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tiga ekor tikus dimasukkan ke dalam kotak berukuran 37cm x 25,5cm x 12cm yang di dalamnya terdapat pipa yang mengalirkan asap rokok dengan dosis 2 batang per hari (pagi dan sore) dalam 15 menit. Asap rokok ini berasal dari *smoking pump* yang dapat menghisap rokok secara otomatis dengan bantuan adaptor kemudian mengalirkannya.

#### 4.7.3 Pencabutan Gigi Hewan Coba

Pencabutan gigi diawali dengan tahapan anestesi. Anestesi yang digunakan adalah ketamin 1000mg/10ml yang diinjeksikan sebanyak 0,2ml secara intra muskular. Pada penelitian ini tidak dilakukan penjahitan setelah dilakukan ekstraksi gigi dikarenakan gingiva tikus yang tipis. Maka dari itu, setelah injeksi ketamin, dilakukan injeksi pehacain sebanyak 0,1ml pada gingiva gigi tikus yang akan dicabut untuk mengurangi perdarahan.

Pencabutan gigi insisivus kiri rahang bawah menggunakan lecron dan *needle holder* yang telah dimodifikasi secara hati-hati dengan arah pencabutan searah dengan soket gigi dengan kekuatan yang sama untuk meminimalisir patahnya gigi. Kemudian dilakukan irigasi dengan aquadest dan kontrol perdarahan menggunakan kasa steril setelah pencabutan gigi selesai.

#### 4.7.4 Pasca Pencabutan Gigi Hewan Coba

Tikus diberi novalgin (analgesik non narkotik untuk meringankan gejala penyakit dan tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit) dengan dosis 0,3 ml sebanyak 1 kali sehari selama 1 hari secara intramuskular dan gentamicin (antibiotik yang berpotensi tinggi dan berspektrum luas) dengan

dosis 0,3 ml sebanyak 1 kali sehari selama 3 hari secara intramuskular. Makanan diberikan dalam bentuk encer dengan sonde gastrik langsung menuju lambung untuk menghindari proses mekanis di mulut dan minuman berupa air PDAM secukupnya.

#### 4.7.5 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

Daun kemangi yang sudah cuci dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang 100gr menggunakan timbangan analitik. Daun yang sudah dihaluskan dimasukkan ke dalam *beaker glass*, ditambahkan pelarut etanol 95 %, dan direndam selama 3 hari. Evaporator dipasang pada tiang permanen dan digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja. Kemudian hasil perendaman atau maserasi dimasukkan dalam labu ekstraksi. Kemudian dilakukan pengaturan agar sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada *water bath*. Suhu dari *Water bath* diatur hingga 70° C (sesuai dengan titik didih etanol). Hasil evaporasi berupa cairan kental (Febrianto, 2014).

Untuk mendapatkan dosis ekstrak daun kemangi dilakukan perhitungan variasi dosis ekstrak daun kemangi 800mg/kgBB dan 1600mg/kgBB dikalikan dengan berat badan rata-rata tikus dalam kelompok perlakuan yang sama. Setelah itu ekstrak daun kemangi yang masih kental ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dilakukan pengenceran menggunakan *aquadest*.

#### 4.7.6 Pengorbanan/ Euthanasia

*Euthanasia* tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 21 menggunakan inhalasi ether dosis lethal. Tikus diletakkan dalam sebuah wadah tertutup berisi kassa yang sudah direndam ether. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dipastikan benar-benar mati. Pengambilan mandibula dilakukan dengan menggunakan scalpel dan selanjutnya dilakukan perendaman

dengan formalin 10% selama 24 jam serta dilanjutkan dengan proses dekalsifikasi dengan EDTA selama 10 – 20 hari pada suhu 4<sup>o</sup>. Jasad tikus dikubur ke dalam tanah.

#### 4.7.7 Pembuatan Preparat

Jaringan mandibula yang sudah diambil dibuat dalam bentuk sediaan histologi. Tahap pertama mandibula dipotong dengan arah sagital labio-lingual pada daerah insisiv sentralis mandibula, mulai dari bagian ujung sampai dasar mandibula. Potongan mandibula dimasukkan ke dalam *automatic tissue processor* dan di dehidrasi dengan alkohol 99% secara bertahap (dari konsentrasi rendah ke tinggi) untuk membersihkan sisa – sisa fiksatif. Kemudian dilanjutkan proses *clearing* dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan *xylo*. Setelah itu, dilakukan proses impregnasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan parafin dan melakukan pembuatan blok (*embedding*).

Tahap berikutnya dilakukan 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. Blok parafin didinginkan di dalam *freezer* agar tidak terlalu lunak dan diletakkan pada *rotary mikrotom*. Setelah itu dilakukan sayatan sesuai ketebalan yang dikehendaki.

Irisan jaringan dimasukkan ke dalam *water bath* pada suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ . Hasil sayatan dipindahkan ke atas *object glass* yang telah diolesi *egg albumin* dan diberi label. Sediaan jaringan didiamkan hingga kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 58-60°C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan deparafinasi dengan *xylo* dan rehidrasi dengan alkohol (dari konsentrasi tinggi ke rendah) untuk menghilangkan *xylo*. Bilas sediaan dengan air mengalir, kemudian dilakukan pengecatan untuk melihat jumlah pembuluh darah yang terbentuk.



#### 4.7.8 Pengamatan Sediaan Histologi Soket Mandibula Hewan Coba

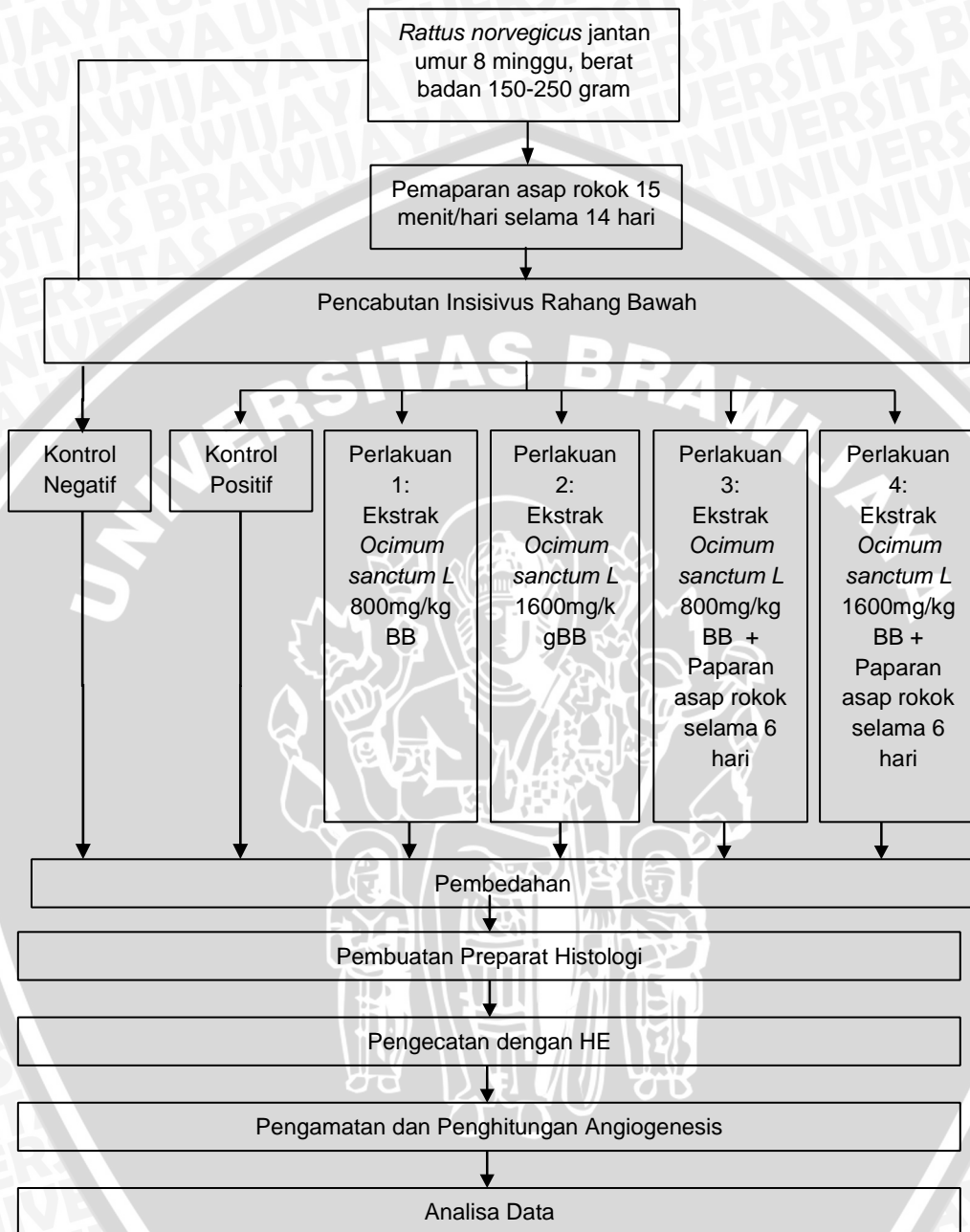
Pengamatan sediaan histologi soket mandibula tikus dilakukan menggunakan program *dot slide Olyvia Olympus* setelah dilakukan scan preparat di Laboratorium Patologi Anatomi sebelumnya. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 100x pada lima lapangan pandang untuk menghitung jumlah angiogenesis yang terlihat.

#### 4.8 Analisis Data

Data diperoleh berupa pengukuran jumlah angiogenesis pada preparat penelitian. Bila data berdistribusi normal dan varian homogen, digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesis dengan taraf kepercayaan  $\alpha < 0,05$ . Uji *One Way Anova* ini digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L*) terhadap jumlah angiogenesis jaringan soket pasca ekstraksi gigi *Rattus norvegicus* yang diberi paparan asap rokok. Apabila distribusi data tidak normal dan varian tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*, kemudian dilakukan uji *LSD* sebagai lanjutan *One Way Anova* atau uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*.

Kemudian dilakukan uji korelasi untuk menunjukkan apakah ada hubungan antara ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L*) terhadap angiogenesis pada jaringan soket pasca ekstraksi gigi tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok. Bila distribusi data normal maka dilakukan uji korelasi *Pearson*, dan uji *Spearman* bila distribusi data tidak normal. Selanjutnya analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*).

### 4.9 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian