

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*), dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Post Test Only Control Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*) 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 sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- Jenis kelamin jantan.
- Usia 6 - 8 minggu.
- Berat badan 150 - 200 gram.
- Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi:

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

Penghitungan jumlah sampel didapatkan dengan rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) > 15$$

$$5(n-1) > 15$$

$$5n-5 > 15$$

$$5n > 15 + 5$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

Keterangan: p = perlakuan

n = jumlah sampel tiap perlakuan

Jumlah sampel pada tiap perlakuan ialah 4 tikus dan 1 cadangan dengan total 5 perlakuan, sehingga total tikus yang digunakan ialah 25 tikus *Rattus norvegicus*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah salep chitosan dengan yang diberikan secara topikal yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok kontrol positif (KP) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah tanpa gel chitosan.
2. Kelompok kontrol negatif (KN) : Tikus tanpa perlakuan apapun.
3. Kelompok perlakuan I (P1) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 1,25%.
4. Kelompok perlakuan II (P2) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 2,5%.
5. Kelompok perlakuan III (P3) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 5%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah jumlah fibroblas pada gingiva rahang bawah regio anterior tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*).

4.3.3 Variabel Kontrol

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

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu ± 3 bulan, mulai Februari hingga April 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Adaptasi Tikus

Alat yang digunakan untuk adaptasi tikus adalah bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari kawat, botol air, dan neraca Sartorius untuk penimbangan berat badan tikus. Bahan yang dibutuhkan adalah sekam dan air.

4.5.2 Pembuatan Pakan Tikus

Untuk membuat pakan tikus digunakan timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan dan nampan. Bahan yang digunakan ialah PAR-S, terigu dan air.

4.5.3 Pembuatan Gel Chitosan

Untuk pembuatan gel chitosan topikal digunakan alat sentrifugasi dan timbangan. Bahan yang digunakan ialah bubuk chitosan dan gel gliserol fosfat.

4.5.4 Prosedur Insisi

Alat yang dibutuhkan dalam tindakan insisi adalah pinset, blade, blade holder dan periodontal probe. Bahan yang dibutuhkan adalah syringe, handscoon, masker, kentamine 0,2 ml, tampon dan alkhohol 70%.

4.5.5 Pengorbanan dan Pembedahan Tikus

Alat yang dibutuhkan untuk pengorbanan dan pembedahan tikus adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul dan toples. Bahan yang dibutuhkan ialah kapas, kloroform 20 ml, formalin 100% 200ml, alkhohol, kapas dan tabung organ 20 buah.

4.5.6 Pembuatan Sediaan

Alat yang digunakan untuk pembuatan sediaan adalah mikrotom, *beaker glass* 250 ml, kuas, *obyek glass*, inkubator, hot plate 38-40°C, wadah, rak untuk pewarnaan, pipet dan *cover glass*. Bahan pembuatan sediaan yang digunakan ialah *xylol*, *hematoksilin*, *eosin*, alkhohol absolut, alkhohol 90 %, alkhohol 80 %, HCl 0,6%, *lithium carbonat* 0,5%, dan *entellan/canada* balsem.

4.5.7 Persiapan Analisis Histologi (Penghitungan Sel Fibroblas)

Alat yang dibutuhkan untuk analisis histologi adalah preparat, *slide glass*, mikroskop cahaya (Olympus tipe BH-2, Olympus corp. Jepang), dan kamera digital untuk foto histologi.

4.6 Definisi Operasional

a. Chitosan

Serbuk chitosan diperoleh dari Swedish Chemical Agency, Swedia dan dibuat dalam bentuk gel. Pembuatan gel chitosan dilakukan dengan menformulasikan chitosan dengan gel pada konsentrasi 1,25%, 2,5%

dan 5% kemudian dicampur sampai homogen. Gel chitosan topikal kemudian dioleskan pada bagian anterior gingiva yang telah di gingivektomi \pm 0,1 cc menggunakan spatula.

b. Jumlah fibroblas

Jumlah fibroblas merupakan penghitungan jumlah sel fibroblas yang tampak pada daerah luka pasca insisi. Jumlah sel fibroblas dihitung per 5 lapang pandang pada preparat sampel gingiva tikus.

c. Insisi

Insisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan membuat sayatan pada gingiva tikus *Rattus norvegicus* sepanjang 2,5 mm dengan arah vertikal dari margin gingiva tikus ke arah apikal dan ketebalan 0,5 mm.



Gambar 4.1 Insisi pada tikus

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cara memperoleh Chitosan

Serbuk chitosan murni yang diperoleh dari Swedish Chemical Agent, Swedia.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Gel Chitosan

Gel chitosan topikal dibuat dengan cara melakukan sentrifugasi sekaligus pemanasan antara 10 ml gel dengan 1,25 gram, 2,5 gram, dan 5 gram bubuk chitosan. Gel yang digunakan terbuat dari gliserol fosfat. Gel dan bubuk chitosan tersebut dicampur sampai homogen. Dari percampuran gel dan bubuk chitosan tadi dihasilkan gel chitosan dengan konsentrasi 1,25%, 2,5% dan 5%. Perbedaan konsentrasi diambil untuk mengetahui perbedaan efek chitosan terhadap sel fibroblas apabila konsentrasi yang diberikan berbeda. Konsentrasi ini diambil berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Fitri dan Sri (2013). Gel chitosan topikal kemudian dioleskan pada bagian anterior gingiva rahang bawah yang telah di insisi dengan volume $\pm 0,1$ cc.

4.7.3 Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

Perawatan tikus menggunakan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam dan penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

Pembuatan ransum makanan menggunakan timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan, sedangkan bahannya adalah PAR-S, terigu, air.

4.7.4 Tindakan Insisi

Insisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan membuat sayatan sepanjang 2,5 mm secara vertikal dari margin gingiva ke arah apikal gigi insisivus tikus pada rahang bawah. Dilakukan insisi gingiva dari margin gingiva ke arah apikal gigi insisivus rahang bawah tikus dengan menggunakan insersi blade skalpel menyudut sebesar 45° dengan permukaan gigi sedalam $\pm 0,5$ mm. Setelah dilakukan insisi luka tidak diberi obat tetapi akan diaplikasikan gel

chitosan topikal sebagai akselerator penyembuh luka. Pada masing masing kelompok sampel diberi perlakuan yang berbeda. Kelompok sampel 1 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 1,25%. Kelompok sampel 2 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 2,5 % dan kelompok sampel 3 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 5%.

4.7.5 Pemberian Gel Chitosan Topikal Pada Kelompok Perlakuan

Pemberian gel chitosan topikal kepada kelompok perlakuan dilakukan sebanyak satu kali pasca insisi, dengan cara mengoleskan gel chitosan pada daerah luka insisi sebanyak $\pm 0,1$ cc menggunakan spatula setelah insisi selesai dilakukan (setelah kontrol pendarahan). Pada kelompok perlakuan I diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 1,25%, kelompok perlakuan II diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 2,5% dan kelompok perlakuan III diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 5%.

4.7.6 Pengorbanan dan Pembedahan Tikus

Pengorbanan tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 7 setelah perlakuan. Tikus diletakkan dalam sebuah wadah tertutup berisi kassa yang sudah direndam ether. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dipastikan benar-benar mati. Setelah tikus mati, dilakukan pembedahan pengambilan bagian mandibula tikus. Mandibula tikus diambil dan dimasukkan kedalam tabung organ yang sudah diisi dengan formalin 10%. Jasad tikus dikubur ke dalam tanah.

4.7.7 Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi Gingiva

Pertama merendam Jaringan dengan Larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%. Biasanya dilakukan dengan cara merendam jaringan di dalam zat-zat kimia yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari

pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Bahan pengawet yang rutin digunakan adalah larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10% dengan pH berkisar antara 6.5 - 7.5. pH ideal adalah 7.0 Untuk membuat 1 liter BNF 10% yaitu dengan menimbang garam $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 4,0 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 6,5 gram larutkan dengan akuades 1 liter kemudian tambahkan 100 ml formaldehyde (37%-40%). Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1 : 10, sedangkan lamanya fiksasi minimal 2 hari.

Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan fiksatif matang, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus .

Keranjang yang di dalamnya berisi jaringan organ, dimasukkan ke dalam mesin pemroses otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut : ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), ethanol 90 % (2 jam), ethanol absolut (2 jam), ethanol absolute (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya.

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur (59 - 60°C) di vakum selama 30 menit. Keranjang diangkat

tissue cassette dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair.

Cetakan dari bahan *stainless steel* dihangatkan di atas api bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara ditempat lain telah disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan.

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3 – 4 pm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi ewith, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

Timbang serbuk hematoksilin 1 gram, potasium aluminium sulfat sebanyak 50 gram dan sodium iodate sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam 1 liter akuades menggunakan alat pengaduk dengan sedikit dipanaskan, kemudian disimpan satu malam dalam temperatur ruangan. Keesokan harinya larutan tersebut ditambahkan asam sitrat sebanyak 50 gram dan chloral hydrate sebanyak 50 gram. Larutan dipanaskan dan diaduk selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Larutan akan stabil selama 1- 2 tahun dalam botol berwarna gelap pada temperatur ruangan.

Timbang serbuk eosin sebanyak 7,5 gram, eritrosin sebanyak 7,5 gram dan kalsium klorida sebanyak 2,5 gram dilarutkan dalam akuades 1 liter kemudian disaring. Larutan akan stabil selama 6 - 12 bulan dalam botol gelap pada temperatur ruangan. Lithium karbonat sebanyak 1,5 gram dilarutkan dengan akuades 1 liter dan diaduk hingga homogen.

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan xylol 3 menit, xylol 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol 90% 3 menit, ethanol 80% 3 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan hematoksilin 6-7 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan pembiru 1 menit, air keran 1 menit, larutan eosin 1 - 5 menit, bilas dengan air keran 1 menit, ethanol 80 % 10 celupan, ethanol 90 % 10 celupan, ethanol absolut 10 celupan, ethanol absolute 1 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit.

Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop (Mohamad, 2001).

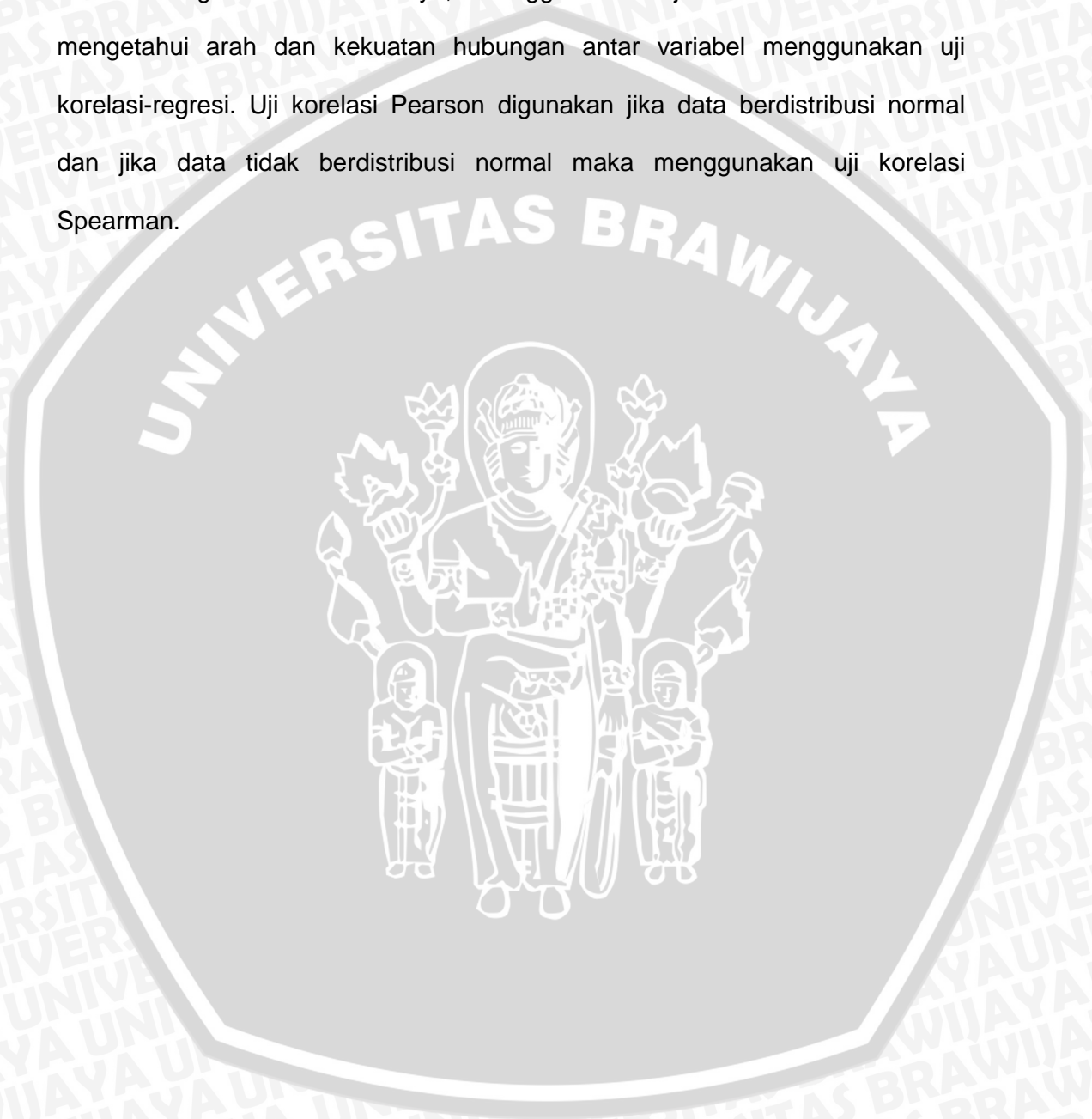
4.7.8 Penghitungan Jumlah Fibroblas pada Gingiva

Pengamatan jumlah sel fibroblas dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop digital Olympus dengan pembesaran 400 kali dan kemudian dibuat foto preparat. Sampel pada sediaan dibagi menjadi lima lapang pandang dan jumlah sel fibroblas dihitung di tiap lapang pandang.

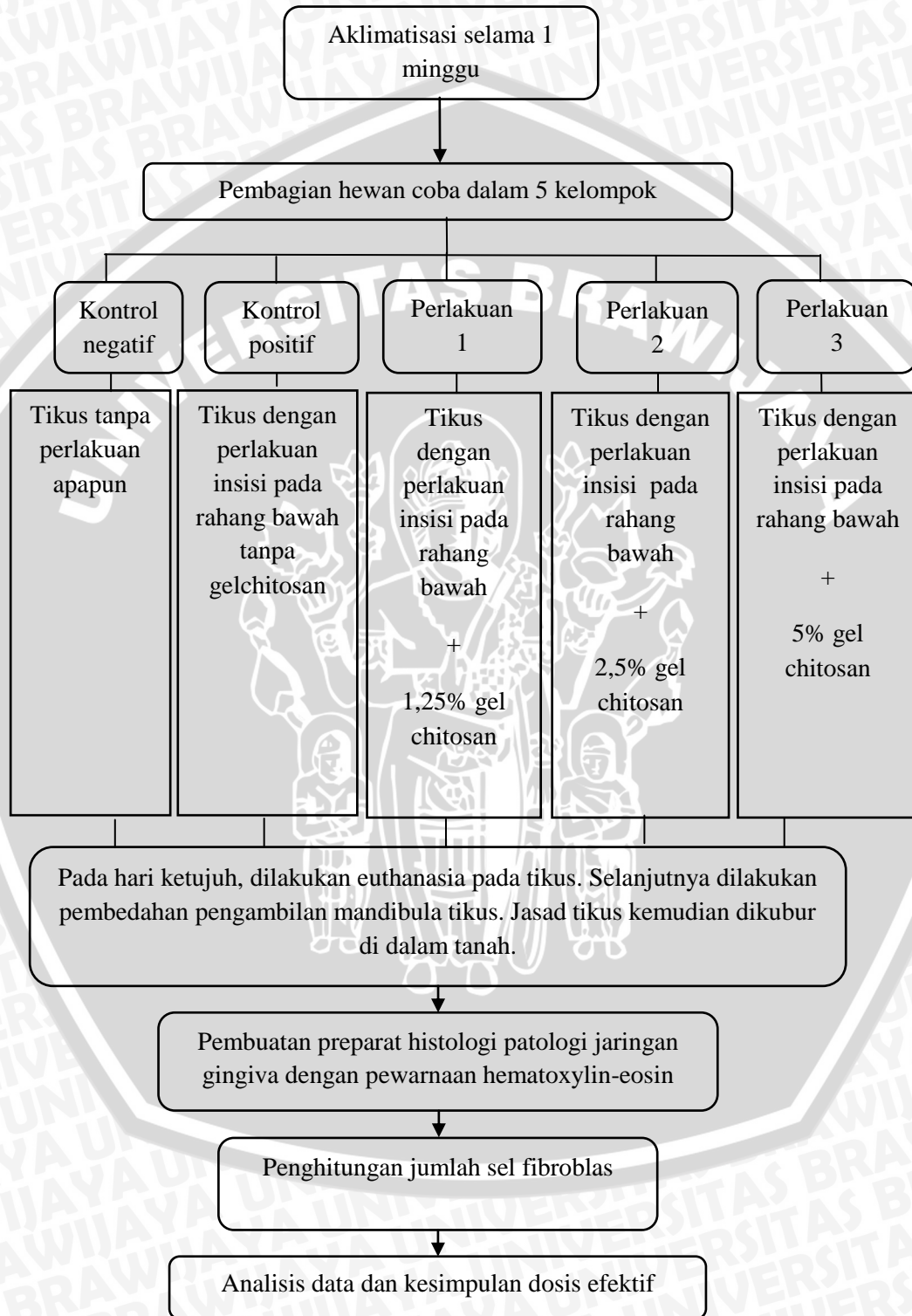
4.8 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan yang bermakna pada pengamatan setiap variabel berdasarkan kelompok perlakuan dan

kelompok kontrol maka data yang normal dan varian homogen dianalisis dengan menggunakan uji *one way Anova*. Jika salah satu data tidak normal atau varian tidak homogen atau keduanya, menggunakan uji Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antar variabel menggunakan uji korelasi-regresi. Uji korelasi Pearson digunakan jika data berdistribusi normal dan jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji korelasi Spearman.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

