

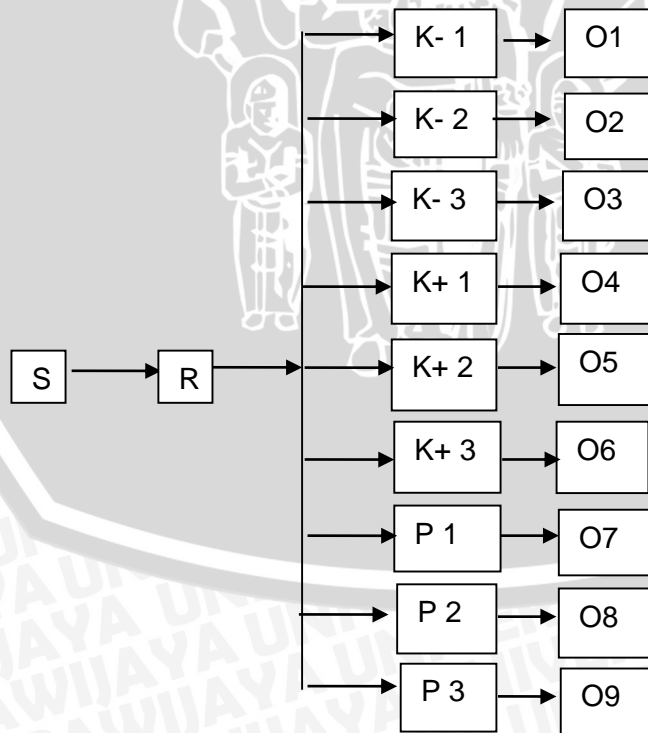
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan desain penelitian “*Post Test Only Randomized Control Group Design*” di laboratorium secara *in-vivo* untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill*) terhadap jumlah sel limfosit pada proses penyembuhan luka ulkus mukosa labial tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *cement stopper* panas.

Sampel dipilih dengan menggunakan tehnik “*Simple Random Sampling*” kemudian ditempatkan dalam 9 kelompok yaitu:



Gambar 4.1 Desain penelitian *Post Test Only Randomized Control Group Design*



**Keterangan:**

- S : sampel  
 R : randomisasi  
 K-1 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 3 hari  
 K-2 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 5 hari  
 K-3 : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 7 hari  
 K+1 : kelompok hewan perlakuan diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 3 hari  
 K+2 : kelompok hewan perlakuan diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 5 hari  
 K+3 : kelompok hewan perlakuan diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 7 hari  
 P1 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 3 hari  
 P2 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 5 hari  
 P3 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 7 hari  
 O1 : hasil pengamatan kelompok perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 3 hari  
 O2 : hasil pengamatan kelompok perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 5 hari  
 O3 : hasil pengamatan kelompok perlakuan tanpa diberi pengobatan selama 7 hari  
 O4 : hasil pengamatan kelompok perlakuan dengan diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 3 hari  
 O5 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 5 hari  
 O6 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama 7 hari  
 O7 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 3 hari  
 O8 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 5 hari  
 O9 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak biji alpukat selama 7 hari

**4.2 Sampel Penelitian**

Jumlah pengurangan penelitian dihitung menggunakan rumus *Federer* adalah sebagai berikut:

Rumus :

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

$$(n - 1) (3 - 1) \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Keterangan :

n : jumlah ulangan (replikasi)

r : jumlah perlakuan

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 9 tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) per kelompok. Penelitian ini dibagi 3 kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 27 ekor tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*). Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

Kriteria Inklusi :

1. Tikus putih galur wistar keturunan murni (*Rattus norvegicus*)
2. Berjenis kelamin jantan
3. Umur 3 bulan
4. Berat badan 180-200 gram
5. Belum pernah digunakan untuk penelitian
6. Kesehatan umum baik

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) sakit selama masa adaptasi 7 hari (tikus tidak bergerak aktif)
2. Tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) mati selama masa perlakuan berlangsung

#### **4.3 Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dari penelitian ini adalah gel ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill*).

##### **4.3.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dari penelitian ini adalah jumlah sel limfosit



### 4.3.3 Variabel Terkendali

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

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, Laboratorium Farmasi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Oktober s/d Desember 2015.

### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.5.1 Bahan dan Alat Untuk Ulserasi

Tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram, *cement stopper* dengan diameter 2mm, bunsen, pinset, kapas, *chloretyl*, *povidon iodine 10%*, masker, sarung tangan

#### 4.5.2 Bahan dan Alat Untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana mill.*)

Blender, saringan, timbangan: Neraca Ohaus merk Sartorius, baker glass, toples, water bath, rotary evaporator, shaker, erlenmeyer, *etanol 70%*, kertas saring *whatman no.40*, aquadest, masker, sarung tangan.

#### 4.5.3 Bahan dan Alat Untuk Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Biji alpukat (*Persea americana mill.*)

*Mortal and pastle*, ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill.*), Na-CMC, Gliserin, Propilenglikol, Metil Paraben, *Aquadest*, Pemanas air, batang pengaduk, pipet, sendok, *baker glass*, gelas ukur, neraca ohaus, masker, sarung tangan.

#### 4.5.4 Bahan dan Alat Perlakuan

Tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram yang diberi luka berupa trauma *thermal* sehingga terdapat ulkus pada mukosanya, gel ekstrak etanol ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill*), *Triamcinolone acetonide* 0,1%, *cotton buds*, masker, sarung tangan.

#### 4.5.5 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Ether, *scalpel*, *microtom*, kaca obyek dan penutup, blok *paraffin*, *waterbath*, tempat pewarnaan dan cucian, kertas saring, *timer*, formalin 10%, *acetone*, *xylol*, kuas kecil, gelatin, alkohol 96%, *lithium carbonat*, pewarna *haematoxylin* dan *eosin*.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Biji alpukat dibeli dari UPT Materia Medika Batu. Ekstrak biji alpukat (*Persea americana mill*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat 10% dengan cara diencerkan menggunakan *aquadest*. Dipilih sediaan berupa gel yang diaplikasikan secara topikal, karena berdasarkan studi dan penelitian yang telah dilakukan merupakan medikasi yang efektif untuk jenis lesi vesiko-erosif dan atau lesi ulkus dalam rongga mulut. Gel ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill*) dibuat di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya menggunakan *gelling agent* Na-CMC.
2. Pembentukan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan cara diberi trauma *thermal* menggunakan *cement stopper* panas. Diameter *cement stopper* yang



digunakan  $\pm 2$  mm. Sebelum dilakukan ulserasi mukosa labial tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan dioles antiseptik *povidon iodine* 10% kemudian diberikan *chloretyl*. Kemudian mukosa labial tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dilukai atau diberi trauma  $\pm 3$  detik menggunakan *cement stopper* yang terlebih dahulu dipanasi menggunakan bunsen selama  $\pm 10$  detik dengan cara ditempelkan.

3. Perhitungan jumlah limfosit adalah perhitungan rata-rata jumlah limfosit pada preparat eksisi jaringan sekitar ulkus pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 pasca ulserasi dengan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* dan diamati sebanyak 5 lapang pandang menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi *software* OLYVIA (*Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 20x tiap lapang pandang. Limfosit akan terpulas berwarna ungu muda dan terlihat inti sel berbentuk bulatan besar yang berwarna ungu gelap yang dikelilingi oleh pinggiran sitoplasma.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Alur Penelitian

Pada penelitian ini, akan dibuat ekstrak biji alpukat (*Persea americana mill.*) berupa sediaan gel. Pada hewan coba akan dilakukan adaptasi selama 7 hari. Setelah itu dilakukan prosedur pembentukan ulkus pada mukosa hewan coba, pengelompokan perlakuan dan sampel, pemberian pakan dan *aquadest* pada kelompok kontrol negatif, pemberian pakan, *aquadest* dan *triamcinolone acetone* 0,1% pada kelompok kontrol positif serta pemberian pakan, *aquadest* dan gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana mill.*) pada kelompok eksperimen dengan konsentrasi yang sudah ditentukan.

Hewan coba dikelompokkan dalam kandang yang sudah diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Kemudian, dilakukan pembedahan pada 9 hewan coba (3 tikus kelompok kontrol negatif, 3 tikus kelompok kontrol positif dan 3 tikus kelompok eksperimen atau kelompok perlakuan) pada setiap *time series* yaitu pada hari ke-3, hari ke-5, dan hari ke-7. Selanjutnya, dilakukan pembuatan preparat, perhitungan jumlah limfosit, analisis data, dan pembuatan kesimpulan.

#### 4.7.2 Perawatan Hewan Coba

Tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik bersih ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara di suhu ruangan yang berkisar antara 18°C - 27°C, ventilasi kandang harus baik. Satu kandang berisi 3 ekor tikus. Setiap hari dilakukan penggantian sekam, pemberian minum dengan air mineral (15-30 ml/hari) dan pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badan/hari).

#### 4.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana mill.*)

Biji alpukat (*Persea americana mill.*) dicuci dengan air hingga bersih. Setelah dicuci, biji buah alpukat dikeringkan di panas matahari selama 3 hari dibawah kain berwarna hitam agar kandungan aktif di dalamnya tidak rusak.. Kemudian biji buah alpukat (inti) dikeluarkan dari kulit biji. Biji buah alpukat (inti) dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang dan diambil sebanyak 200 gram. Kemudian biji alpukat dihaluskan dengan cara blender lalu diayak. Biji buah alpukat (*Persea americana mill.*) tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 600 ml etanol 70%. Tabung erlenmeyer ditutup rapat dan dikocok perlahan dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter. Hasil filtrat selanjutnya



dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak etanol biji buah alpukat (*Persea americana mill.*) dengan menggunakan alat evaporator. Filtrat dievaporasi agar filtrat menjadi kental, menggunakan pengurangan tekanan pada suhu 40°-50° C hingga semua pelarut terpisah. Kemudian akan didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak etanol biji buah alpukat (*Persea americana mill.*) dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol. Untuk mendapatkan konsentrasi 10% maka 0,1 ml ekstrak etanol.

#### **4.7.4 Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana mill.*)**

Pembuatan gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana mill.*) diawali dengan mengembangkan *gelling agent* (Na-CMC) dalam 20 ml air pada suhu 70°C. Na-CMC terus diaduk hingga membentuk gel dan jangan sampai ada yang menggumpal. Metil paraben dilarutkan dalam gliserin, kemudian tambahkan propilenglikol dan aduk hingga homogen. Masukkan campuran tersebut kedalam basis gel, kemudian tambahkan ekstrak biji alpukat (*Persea americana mill.*) dan air kedalam basis gel yang telah terbentuk dan aduk hingga homogen. Lakukan pengecekan pH pada sediaan gel sampai mendekati 7 (pH normal untuk basis Na-CMC berkisar 4,5-6,5)



Tabel 4.1 Formulasi sediaan gel ekstrak biji alpukat.

Bahan	Konsentrasi Bahan dalam Formula (%)	Jumlah
Ekstrak Biji Alpukat	10	4 g
CMC-Na	5	2 g
Gliserin	10	4 g
Propilenglikol	5	2 g
Metil Paraben	0,15	0,06 g
Air ad	100	40 g

(Abate, 2006)

#### 4.7.5 Pembentukan Ulkus pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Dalam penelitian ini, agar terbentuk ulkus hingga mencapai lamina propia, sebelumnya mukosa labial bawah tikus putih galur wistar jantan (*Rattus novergicus*) kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan diberi *povidon iodine* 10% dan *chloretyl*, lalu dilukai atau diberi trauma  $\pm 3$  detik menggunakan *cement stopper* kecil diameter  $\pm 2$  mm dengan cara ditempelkan yang sebelumnya telah dipanasi dengan menggunakan bunsen selama  $\pm 10$  detik.

#### 4.7.6 Pengaplikasian Gel Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana mill*) dan *Triamcinolone acetonida* 0,1%

Pada keokan harinya setelah ulserasi, kelompok perlakuan dilakukan pengolesan gel ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana mill*) selama 2 kali sehari saat pagi dan sore hari. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dilakukan aplikasi *Trimcinolone acetonide* 0,1% selama 2 kali sehari saat pagi dan sore hari, dan pada kelompok kontrol negatif tidak di beri perlakuan. Aplikasi gel dan dilakukan sampai hari ketujuh. Pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 ada 3 tikus putih

galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dari tiap kelompok dikorbankan kemudian diambil jaringan sekitar ulkus untuk pembuatan preparat

#### 4.7.7 Prosedur Eksisi

Pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7, tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dieuthanasia menggunakan teknik dekapitasi dengan menggunakan eter. Setelah proses euthanasia selesai, kemudian pada jaringan ulser diusap dengan menggunakan alkohol 70% lalu dibuat eksisi untuk dijadikan preparat.

#### 4.7.8 Pembuatan Preparat

##### a) Fiksasi

Pada tahap fiksasi, dilakukan perendaman jaringan ulser pada larutan formalin 10% selama 18-24 jam. Kemudian jaringan dicuci dengan aquadest selama 15 menit.

##### b) Embedding

Jaringan ulser dimasukkan pada beberapa cairan yaitu *acetone* selama 1 jam x 3, *xylo* selama ½ jam x 3, *paraffin* cair selama 1 x 3, dan penanaman jaringan kulit pada *paraffin* blok.

##### c) Slicing

Blok yang sudah tertanam jaringan ulser diletakkan pada blok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram mikrotom rotary* kemudian sayat jaringan ulser secara vertikal dengan ukuran 4 mikron. Sayatan jaringan ulser yang berbentuk pita diambil dengan menggunakan kuas kecil, kemudian letakkan pada *water bath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C. Setelah sayatan jaringan ulser merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam.



#### d) *Stanning*

*Object glass* dimasukkan dalam *Xylo* selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Haematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. *Object glass* dimasukkan pada *Lithium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarna *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *Xylo* selama 15 menit x 3. Dan yang terakhir, preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan*. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop.

#### 4.7.9 Pengukuran Jumlah Limfosit pada Daerah Luka dan Persentase Penyembuhan Luka

Jumlah limfosit pada daerah luka dapat dihitung dalam beberapa lapangan pandang dengan menggunakan mikroskop. Sementara, presentase percepatan penyembuhan luka didapatkan dari perbandingan antara hitungan hari dan jumlah limfosit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

#### 4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisa secara statistik. Mula-mula data diuji menggunakan One Sample Kolmogorof-Smirnov untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal, dan uji homogenitas untuk menguji apakah ragam dari populasi-populasi tersebut sama. Selanjutnya dilakukan uji ANOVA (Analisa of Varian) dua arah dengan tingkat kepercayaan 95 % ( $P < 0,05$ ) untuk mengetahui kemaknaan perbedaan antara kelompok perlakuan, yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* dan uji Regresi (Least Significance Difference) untuk mengetahui perbandingan antara mean perlakuan yang satu dengan mean



perlakuan lain atau untuk mengetahui manakah diantara mean-mean perlakuan tersebut yang berbeda nyata satu dengan yang lain (Sugiyono & Wibowo, 2002:97-100).



