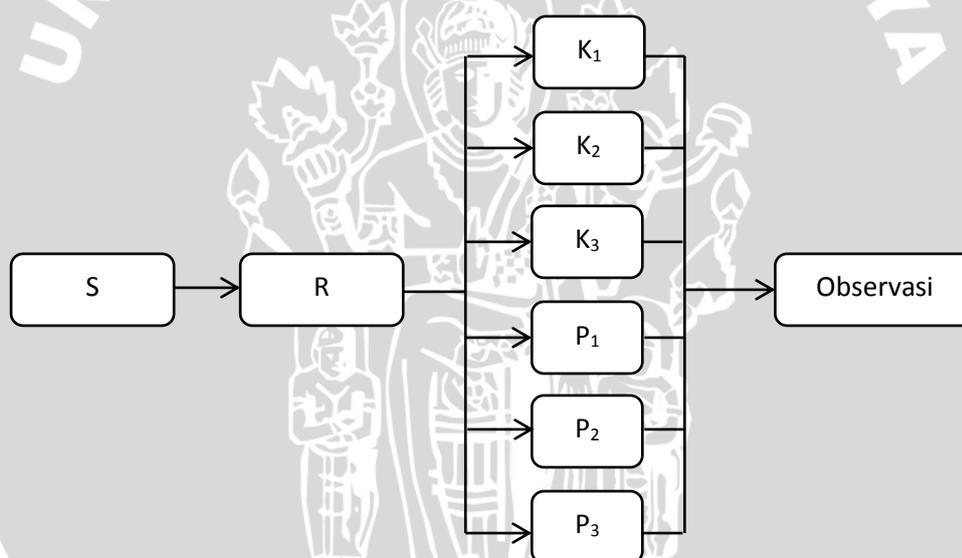


## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah desain eksperimental murni (*True Eksperimental*). Penelitian dilakukan di laboratorium patologi anatomi, laboatorium farmasi, dan laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Rancangan penelitian ini adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* (Notoadmodjo, 2015). Pada penelitian ini akan dibuat 6 kelompok.



Keterangan :

S : Sampel penelitian yaitu *Rattus norvegicus*

R : Sampel dipilih secara random pada pembagian 6 kelompok

K<sub>1</sub> : Kelompok kontrol 1 adalah kelompok tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah 1 hari perlakuan

K<sub>2</sub> : Kelompok kontrol 2 adalah kelompok tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah 3 hari perlakuan

K<sub>3</sub> : Kelompok kontrol 3 adalah kelompok tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah 7 hari perlakuan

P<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan 1 adalah kelompok yang akan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% pasca gingivektomi dibedah 1 hari perlakuan

P<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan 2 adalah kelompok yang akan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% pasca gingivektomi dibedah 3 hari perlakuan

P<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan 3 adalah kelompok yang akan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% pasca gingivektomi dibedah 7 hari perlakuan

## 4.2 Sampel

### 4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah hewan model tikus putih strain wistar jantan yang dilakukan gingivektomi kemudian diberikan perlakuan masing-masing sesuai kelompok.

Kriteria inklusi:

1. Tikus berbulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.
2. Berat rata-rata 250-300 gram
3. Umur  $\pm 10$  minggu

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang pernah digunakan penelitian sebelumnya
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berjalan

### 4.2.2 Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Federer (Notoadmodjo, 2005):

$(t-1)(n-1) \geq 15$  ; dengan  $t$  = jumlah kelompok ;  $n$  = jumlah sampel

$(\text{Jumlah kelompok} - 1)(n-1) \geq 15$

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

$5(n-1) \geq 15$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Penelitian ini dilakukan pada enam kelompok perlakuan dengan 3 *time series*, tiap kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus. Pada *time series* yang pertama menggunakan 8 ekor tikus begitu juga pada *time series* kedua dan *time series* ketiga sehingga total sampel penelitian sejumlah 24 ekor. Namun untuk mengantisipasi *loss of sample* diberlakukan 4 ekor tikus cadangan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian gel ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan konsentrasi 20%.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah.

#### 4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba
- b. Makanan hewan coba
- c. Cara pemberian gel ekstrak etanol daun sukun

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Perawatan dan Pengondisian Hewan Coba

Alat yang dibutuhkan dalam pengondisian tikus adalah tikus putih strain wistar jantan, kandang dari bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm sebanyak 14 buah, tutup kandang, tempat makan dan minum tikus, sekam, dan alat penimbang berat badan yaitu neraca sartorius. Bahan yang dibutuhkan adalah pakan tikus sebanyak 30 – 40 gram setiap tikus.

##### 4.5.2 Prosedur Gingivektomi pada Tikus

Alat yang digunakan antara lain pinset, sonde *halfmoon*, kaca mulut, kuret *gracey*, *pocket marker*, *periodontal probe*, *blade no. 15*, *blade holder*, pinset bedah, *deppen glass*, tempat antiseptik, *syringe*, *cotton roll*, kasa, masker, *handscoon*, ketamine 0,2%, povidone iodine 3%, alkohol 70%, akuades.

##### 4.5.3 Penghitungan Luas Penampang Luka

Alat yang digunakan untuk menghitung luas penampang luka adalah jangka sorong, *periodontal probe*, kaca mulut kapas, alkohol 70%.

#### 4.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sukun

Alat yang dibutuhkan adalah blender, kertas saring, gelas ekstraksi, seperangkat evaporator vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pompa vakum, tabung penampung etanol, batu didih, cawan penguap, neraca analitik. Bahan yang digunakan adalah daun sukun, etanol 96%, dan akuades.

#### 4.5.5 Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Daun Sukun

Pembuatan gel ekstrak etanol daun sukun membutuhkan beberapa alat yaitu pisau antikerat (*stainless steel*), cawan porselen, corong plastik, timbangan gram, timbangan milligram, cawan porselen, gelas ukur, pengaduk kayu, pengaduk kaca, tabung kaca, mortal pastle, kertas saring, plastik, gunting, sendok porselen, *water heater*, pot untuk menyimpan gel. Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol daun sukun, natrium benzoat, propilen glikol, trietanolamin.

#### 4.5.6 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus membutuhkan alat berupa kaca mulut, gunting bedah, jarum pentul, sterofoam, pinset, sonde *halfmoon*, *tools tray*, kuret *gracey*, *blade holder*, *blade no. 15*, *round diamond bur*, konektor bur, mikromotor, *handpiece low speed contra angle*, pinset bedah, *deppen glass*, tempat antiseptik, *syringe* irigasi, *syringe* anestesi, *pocket marker*, *petrie disk*. Bahan yang dibutuhkan adalah *handscoon*, masker, obat anestesi yaitu ketamine 0,2 ml, *cotton roll*, *cotton pellet*, povidone iodine

3%, alkohol 70%, kasa seril, akuades, formalin 10% (*Buffer Neutral Formalin*), tabung organ 24 buah, obat analgesik metampiron 0,2 ml *intramuscular*.

#### 4.5.7 Pembuatan Preparat Jaringan Histologi

Preparat jaringan dibuat menggunakan alat yaitu *scalpel*, pinset, saringan, *tissue cassette*, mesin *processor* otomatis, mesin *paraffin block station*, dan pisau *microtome*, *water bath* 46°C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus pewarnaan, oven 60°C. kemudian bahan yang dibutuhkan adalah jaringan hewan coba yang telah difiksasi dengan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%, etanol absolut, xylol, parafin, gliserin 99,5%, larutan hematoksilin, lithium bikarbonat, larutan eosin, dan larutan dekalsifikasi EDTA.

#### 4.5.8 Penghitungan Jumlah Pembuluh Darah

Alat yang dibutuhkan adalah mikroskop cahaya *Olympus DP 40* dan bahan yang digunakan adalah preparat histologi.

### 4.6 Definisi Operasional

#### 4.6.1 Gel Ekstrak Etanol Daun Sukun

Ekstraksi daun sukun yang dilakukan yaitu dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% asumsi konsentrasi awal adalah 100%. Ekstrak yang telah jadi kemudian dibuat menjadi gel menggunakan propilen glikol, trietanolamin, dan natrium benzoat sebagai basis gel hingga terbentuk gel ekstrak daun sukun dengan konsentrasi

20%. Sediaan daun sukun segar diperoleh dan diidentifikasi Balai Penelitian Materia Medika Batu, Jawa Timur.

#### 4.6.2 Gingivektomi

Gingivektomi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu membuat luka pada gingiva tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) seluas 1 cm x 0,5 cm dengan tebal kedalaman 0,5 mm menggunakan bur *handpiece low speed* nomor ½ dengan tujuan agar luka terbuka sebagai tempat untuk aplikasi gel ekstrak daun sukun dengan dosis ekstrak 20%. Gingivektomi dilakukan pada regio anterior rahang bawah karena pada region ini mudah dijangkau operator, ketebalan gingiva yang baik, dan memiliki kontur yang paling sehat. Untuk mengurangi rasa nyeri tikus, diberikan analgesik metampiron 0,2 ml *intramuscular*.

#### 4.6.3 Pembuluh Darah

Pembuluh darah yang dimaksud pada penelitian ini adalah pembuluh darah kapiler yang berproliferasi pada area luka. Penelitian ini bertujuan untuk menghitung jumlah pembuluh darah yang dilihat dalam 10 lapang pandang pada preparat sampel gingiva pasca gingivektomi pada tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Preparat diambil pada hari pertama, ketiga, dan ketujuh pasca gingivektomi. Pembuluh darah yang dilihat pada preparat diambil dari potongan gingiva anterior rahang bawah tikus. Pada pewarnaan Hematoksilin-eosin, pembuluh darah yang dihitung pada penelitian ini adalah berjenis kapiler yang akan tampak sebagai bulatan berbatas jelas

terlihat gambaran 1 lapis sel endotel dengan inti sel endotel di tepi berwarna ungu, lumen berwarna putih, dan bagian tengahnya tampak butiran - butiran berwarna merah yaitu eritrosit serta area sekitarnya banyak terdapat sel radang.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 *Ethical Clearence*

Penelitian diawali dengan pengurusan *ethical clearence* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sukun

Daun sukun (*Artocarpus altilis*) diambil dan diidentifikasi dari Balai Penelitian Materia Medika Batu, Jawa Timur. Ekstrak daun dibuat dngan tahapan sebagai berikut :

1. Pengolahan Daun sukun

Daun sukun segar dicuci kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan hingga layu. Daun sukun dibiarkan kering, setelah daun kering diblender lalu diayak.

2. Ekstraksi dengan Etanol

Daun sukun yang telah berbentuk serbuk diambil sebanyak 100 gram dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan dalam kertas ekstraksi. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol 96% dan direndam selama 3 hari. Ekstraksi dilakukan beberapa kali putaran dengan pergantian etanol.

3. Proses Evaporasi

- a. Evaporator dipasang tergantung pada tiang permanen dengan kemiringan  $30-40^{\circ}$  terhadap meja percobaan sehingga alat tersusun dari bawah yaitu alat pemanas air, labu penampung, hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin spiral.
- b. Hasil ekstraksi dipindah kedalam labu pemisah ekstraksi kemudian labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator.
- c. Tabung pendingin spiral dan labu penampung hasil dihubungkan dengan bagian atas evaporator.
- d. Tabung pendingin spiral dan pompa vakum dihubungkan dengan selang plastik.
- e. Tabung pendingin spiral dan pompa sirkulasi air dingin dihubungkan dengan selang plastik.
- f. Pompa sirkulasi air dingin ditempatkan dalam bak berisi akuades.
- g. Satu set alat evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam akuades pada pompa sirkulasi air dingin.
- h. *Rotary evaporator*, pompa sirkulasi air dingin, dan pompa vakum dijalankan.
- i. Menyalakan alat pemanas dengan suhu  $\pm 70^{\circ}-80^{\circ}\text{C}$  (sesuai titik didih etanol) sehingga hasil ekstraksi dalam labu pemisah ekstraksi menjadi mendidih dan pelarut etanol menguap.

- j. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak bercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lainnya akan tersedot pompa vakum.
- k. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Jika sudah kental maka proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- l. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dimasukkan ke dalam oven selama  $\pm 2$  jam pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$ , yang bertujuan untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan ekstrak etanol daun sukun sebesar 100%.

#### 4.7.3 Formulasi Gel Ekstrak Etanol Daun Sukun

Gel adalah zat yang berwujud koloid, yaitu memiliki sifat peralihan antara cair dan padat. Keuntungan dari penggunaan zat yang bersifat koloid adalah praktis, mudah digunakan, mudah diplikasikan, dan tahan lama. Gel dibuat dari ekstrak daun sukun yang telah dibuat sebelumnya dan telah dimasukkan dalam wadah yang steril untuk mencegah kontaminasi.

Gel dibuat dalam ruang farmasetik dengan suhu ruang yang stabil. Pertama dilakukan pembuatan basis gel. Bahan – bahan yang dipakai ditimbang terlebih dahulu dengan takaran Carbomer 0,519 g, Propilen glikol 3,825 g, Trietanolamin 1,275 ml, dan Natrium benzoat 0,1275%. Selanjutnya air dipanaskan sampai mendidih. Sebagian air yang panas diletakkan pada mortar dengan tujuan membuat mortar dalam keadaan hangat ketika dipakai untuk mengaduk gel.

Basis gel dibuat dengan menggunakan teknik basah, yaitu 10 tetes air panas dimasukkan dalam mortal lalu ditaburi carbomer perlahan-lahan sampai terdispersi seluruhnya. Setelah terdispersi seluruhnya, ditambahkan propilen glikol, trietanolamin, natrium benzoat secara perlahan-lahan sampai homogen. Setelah pembuatan basis gel selesai dilakukan pencampuran dengan ekstrak etanol daun sukun untuk prosedur pembuatan gel ekstrak etanol daun sukun dengan perbandingan konsentrasi basis gel 80% banding ekstrak etanol daun sukun 20%.

Tahap selanjutnya yaitu uji homogenitas untuk melihat apakah gel telah benar-benar homogen antara basis dengan ekstrak etanol daun sukun. Uji ini dilakukan dengan cara meletakkan sedikit gel yang telah diaduk diantara 2 kaca preparat lalu ditekan dan diamati homogenitasnya. Selain itu juga dilakukan uji pH menggunakan elektroda dan pH-meter, pH yang diharapkan adalah pH yang mendekati netral (pH 7) atau sedikit basa. Gel yang telah selesai dibuat ditimbang, kemudian gel disimpan dalam wadah berupa pot atau tube yang terlindung dari kontaminasi dari luar.

#### 4.7.4 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) dipelihara dikandangannya yang terbuat dari bak plastik bersih dengan ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang yang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara di suhu ruangan yang berkisar antara 18°C-27°C dengan ventilasi kandang yang baik. Satu kandang tikus berisi 1 ekor tikus. Setiap 3 hari sekali dilakukan penggantian sekam, diberikan air minum

mineral sebanyak 15-30 ml/hari, dan pemberian makan dengan pellet sebanyak 10%-15% dari berat tubuhnya.

#### 4.7.5 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok 1 : kelompok kontrol 1 ( $K_1$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah setelah 1 hari perlakuan.

Kelompok 2 : kelompok kontrol 2 ( $K_2$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah setelah 3 hari perlakuan.

Kelompok 3 : kelompok kontrol 3 ( $K_3$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi tanpa pemberian gel ekstrak etanol daun sukun pasca gingivektomi dibedah setelah 7 hari perlakuan.

Kelompok 4 : kelompok perlakuan 1 ( $P_1$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi dan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% sebanyak 2x yakni pada pagi dan sore hari kemudian dibedah setelah 1 hari perlakuan.

Kelompok 5 : kelompok perlakuan 2 ( $P_2$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi dan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% sebanyak 2x yakni pada pagi dan sore hari kemudian dibedah setelah 3 hari perlakuan.

Kelompok 6 : kelompok perlakuan 3 ( $P_3$ ) yaitu kelompok hewan coba dilakukan gingivektomi dan diberikan gel ekstrak etanol daun sukun dengan konsentrasi 20% sebanyak 2x yakni pada pagi dan sore hari kemudian dibedah setelah 7 hari perlakuan.

#### 4.7.6 Perlakuan Tindakan Gingivektomi pada Hewan Coba

Tindakan gingivektomi didesain berbentuk persegi namun tidak menyudut dibagian tepinya. Pengukuran luka adalah menggunakan jangka sorong dan luka dibuat dengan ukuran sekitar 0,5 cm x 0,5 cm. Luka yang akan dibuat ditandai pada daerah dengan *bleeding point* di bagian tepi luka, kemudian eksisi gingiva dilakukan menggunakan bur *handpiece low speed* nomor  $\frac{1}{2}$ . Prosedur gingivektomi yang akan dilakukan yaitu pada tikus *Rattus norvegicus* yang tidak mengalami hiperplasia gingiva, dengan tahapan sebagai berikut :

1. Aplikasi antiseptik pada daerah operasi.
2. Anestesi tikus menggunakan ketamine 0,2 ml secara intraperitoneal pada paha tikus sebagai analgesik dan sedasi sebelum dilakukan gingivektomi. Penghitungan sebanyak 50 mg/ml dan kebutuhan dengan onset waktu 10-15 menit yaitu sebesar 40 mg/kg BB, jika berat tikus 250 gram maka dibutuhkan ketamine sebanyak 0,2 ml.
3. Melakukan eksisi gingiva di regio anterior rahang bawah menggunakan *round diamond bur low speed* nomor  $\frac{1}{2}$ .
4. Melakukan kontrol pendarahan menggunakan kasa steril.
5. Melakukan irigasi povidone iodine.

6. Mengaplikasikan secara topikal gel ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 20% pada kelompok perlakuan (P<sub>1</sub>), (P<sub>2</sub>), dan (P<sub>3</sub>). Sedangkan pada kelompok kontrol (K<sub>1</sub>), (K<sub>2</sub>), dan (K<sub>3</sub>) tidak diaplikasikan secara topikal gel ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*).
7. Melakukan perawatan pada tikus pasca gingivektomi dengan pemberian pakan yang lunak dan analgesik metampiron 0,2 ml diberikan secara *intramuscular*.

#### 4.7.7 Pembedahan Hewan Coba

Hari pertama, ketiga, dan ketujuh pasca perlakuan tikus di matikan (Euthanasia) untuk melakukan tindakan pembedahan, dilakukan inhalasi klorofom dengan cara memasukkan tikus kedalam toples dan dimasukkan kapas yang telah dibasahi kloroform. Setelah proses euthanasia selesai dilakukan, kemudian tikus dibedah untuk mengambil gingiva beserta sedikit tulang rahang sekitarnya. Jaringan tersebut kemudian dibersihkan dengan NaCl 0,9% fisiologis dan dimasukkan ke dalam botol organ yang telah berisi larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan pH antara 6,5-7,5 (Eroschenko *et al.*, 2013).

#### 4.7.8 Pembuatan Preparat untuk Pengamatan Histologi Luka Gingivektomi

Pembuatan preparat dilakukan dengan estimasi setiap luka dengan memotong jaringan 3x dalam 1 slide. Penelitian ini menggunakan 45 slide preparat yang diamati.

Preparat jaringan yang akan diamati harus segera difiksasi setelah jaringan diambil. Ukuran jaringan yang diambil sebesar 1 cm<sup>2</sup>. Potongan jaringan yang terlalu besar menyebabkan jaringan yang terletak di dalamnya tidak terfiksasi dengan sempurna, jika jaringan yang diambil berupa tulang haruslah dilunakkan dahulu dalam larutan dekalsifikasi dengan perbandingan antara jaringan dan larutan yaitu 1:20 dengan waktu perendaman 24 jam. Berikut tahapan pembuatan preparat histologi:

1. Memotong Jaringan Organ

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

2. Proses Dehidrasi

Jaringan organ dimasukkan ke dalam mesin prosessor otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap putaran waktu dengan putaran waktu sebagai berikut : etanol 70% (2 jam), etanol 80% (2 jam), etanol 90% (2 jam), etanol absolut (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam). Lalu *tissue cassette* dikeluarkan untuk proses berikutnya.

3. Vakum

Proses ini adalah untuk menghilangkan udara dari jaringan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang berisi parafin, cair dengan temperatur (59-60°C) selama 30 menit. Setelah itu *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan

pada temperatur 60°C untuk sementara sebelum dilakukan pencetakan dengan parafin cair.

#### 4. Mencetak Blok Parafin

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

#### 5. Memotong Blok Jaringan

Blok parafin yang mengandung jaringan dipotong menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan sekitar 3-4 mikrometer. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C. Setelah itu bentuk irisan dirapikan dan diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi *ewith* (bahan perekat). Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

### 4.7.9 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Preparat yang akan dilakukan pewarnaan HE diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan urutan sebagai berikut : xylol 3 menit, xylol 3 menit, etanol absolut 3 menit, etanol absolut 3 menit, etanol 90% 3 menit, etanol 80% 3 menit, membilas dengan

air kran 1 menit, larutan hematoksilin 6-7 menit, dibilas air keran 1 menit, larutan pembiru 1 menit, air keran 1 menit, larutan eosin 1-5 menit, bilas air keran 1 menit, etanol 80% 10 celupan, etanol 90% 10 celupan, etanol absolut 10 celupan, etanol absolut 1 menit, xylol I selama 3 menit, xylol II selama 3 menit, xylol III selama 3 menit. Kemudian preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi 1 tetes cairan entellan dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat dibawah mikroskop.

#### **4.7.10 Penghitungan Jumlah Pembuluh Darah pada Luka Gingivektomi**

Penghitungan jumlah pembuluh darah jenis kapiler pada area luka pasca gingivektomi yang ditandai dengan sel-sel radang pada 10 lapangan pandang dengan mikroskop sinar perbesaran 400x. Persentase percepatan penyembuhan luka dilihat melalui peningkatan jumlah pembuluh darah yang didapatkan dari perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dilihat pada hari pertama, ketiga, dan ketujuh setelah perlakuan.

#### **4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data**

Hasil pengukuran jumlah neokapiler pada tikus kontrol dan tikus perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan program komputerisasi dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) serta taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data bertujuan untuk menginterpretasikan apakah data memiliki sebaran normal atau tidak karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis bergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Penyajian data yang berdistribusi normal digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak berdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis jika persebaran data normal maka dilakukan uji parametrik sedangkan jika persebaran data tidak normal dilakukan uji nonparametrik.
2. Uji homogenitas varian bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi *One-Way Anova* yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Apabila varian homogen maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji *One-Way Anova*.
3. Uji *One-Way Anova* bertujuan membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan dari hasil tes *One-Way Anova*.
4. Uji *Post-Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey* dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p = 0,05$ ).

### 4.9 Alur Penelitian

