

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 vitro*. Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana subyek ini dibagi menjadi 8 kelompok (I sampai dengan VIII) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 3 tikus. Kelompok I adalah tikus tanpa pemberian ekstrak *Persea americana* (kelompok kontrol) dan kelompok II sampai kelompok IV (kelompok perlakuan) diberi ekstrak *Persea americana* dengan dosis berbeda (150 mg/tikus/hari, 300 mg/tikus/hari, dan 450 mg/tikus/hari) per oral dengan sonde setiap hari sekali selama 3 dan 7 hari. Kemudian diobservasi dan dibandingkan efek ekstrak *Persea americana* terhadap ketebalan lapisan epitel yang terbentuk.

4.2 Sampel

4.2.1 Pemilihan Binatang 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.

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.

4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan kriteria inklusi yaitu :

- Tikus jenis kelamin jantan (untuk menghindari efek hormonal yang lebih dominan dari tikus jenis kelamin betina)
- Usia 2,5-3 bulan
- Berat badan 250-350 gram
- Sehat, yang ditandai dengan gerakannya yang aktif
- Mata jernih
- Bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap

4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan kriteria eksklusi yaitu :

- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- Tikus yang berat badannya kurang dari 250 gram
- Tikus yang mengalami diare selama penelitian ditandai dengan feses yang tidak berbentuk
- Tikus yang mengalami tanda-tanda infeksi pada soket gigi
- Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah sampel pada penelitian, setiap tikus mendapatkan perlakuan berbeda dalam rongga mulut, yaitu dibagi menjadi 4 perlakuan (kontrol positif, P1, P2, dan P3). Penelitian ini menggunakan *2 time series* yaitu hari ke 3 dan 7. Menurut Hanafiah tahun 2005, jumlah sampel tiap perlakuan didapatkan dari rumus $(t - 1)(r - 1) \geq 15$, dengan t adalah jumlah perlakuan dan r adalah jumlah sampel yang dibutuhkan di setiap perlakuan. Dari rumus tersebut maka didapatkan hasil perhitungan :

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

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

$$(8 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$7(r - 1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 22$$

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

Sehingga sampel yang digunakan adalah 3 tikus untuk setiap 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 dkk (2008) yaitu 300 mg/kgBB. Untuk penentuan dosis yang digunakan untuk diuji adalah 100% ekstrak alpukat, yaitu ekstrak alpukat murni tanpa tambahan bahan air. Dosis dari penelitian sebelumnya digunakan sebagai dosis II, dosis I $\frac{1}{2}$ dosis II dan dosis III didapat dari dosis II dikali 3 dibagi 2 (Hutomo, 2011). Sehingga didapatkan perkiraan dosis yang akan diteliti dan dibandingkan yaitu ekstrak *Persea americana* dengan dosis I (150 mg/kgBB), II (300 mg/kgBB), III (450 mg/kgBB).

4.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel independen

Ekstrak *Persea americana*

2. Variabel dependen

Ketebalan lapisan epitel yang terlihat dalam preparat histologi

3. Variabel terkendali

- a. Makanan sampel.
- b. Lingkungan kandang.

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama kurang lebih 4 bulan.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

Setiap prosedur harus menggunakan masker dan sarung tangan.

4.6.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Alat dan bahan yang digunakan adalah sepuluh box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³ yang diisi 3 ekor tikus Wistar, kawat kasa sebagai tutup box, sekam sebagai dasar box, tempat minum, dan ruangan yang tidak terkena sinar matahari secara langsung. Makanan hewan coba adalah *comfeed*, dan minuman hewan coba adalah air PDAM yang diberikan *ad libitum*.

4.6.2 Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan yang dilakukan terhadap hewan coba meliputi pencabutan gigi insisivus kanan pada rahang bawah tikus dan pemberian ekstrak *Persea americana* secara per oral, langsung ke lambung. Bahan-bahan yang digunakan adalah ketamin 40 mg/kgBB untuk anestesi secara intraperitoneal, aquades steril untuk irigasi soket, dan alkohol 70% untuk sterilisasi pada saat pencabutan gigi tikus dan novalgin 500 mg/kgBB untuk analgesik.

4.6.3 Pengambilan Sampel

Alat yang digunakan dalam pengambilan sampel yaitu scalpel no. 11, pinset, dan tabung fiksasi yang sudah diberi label. Pengambilan sampel dimulai dengan euthanasia hewan coba dengan larutan eter dosis lethal. Kemudian larutan alkohol 70% untuk sterilisasi scalpel dan larutan formalin 10% untuk fiksasi setelah rahang bawah tikus diambil. Setelah difiksasi, rahang bawah tikus di dekalsifikasi menggunakan larutan EDTA 14%.

4.6.4 Pemeriksaan Histologi

Bahan-bahan yang digunakan untuk pemeriksaan histologi adalah HCL 5%; formalin 10%; amonium oksalat 1%; alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 95%, dan 96% dengan prusi; larutan xylol; parafin; hematoksilin; air; aquades; dan eosin. Alat-alat yang digunakan dalam pemeriksaan histologi adalah gelas ukur, wadah plastik untuk membuang zat-zat pewarnaan, rotari mikrotom, object glass, cover glass, mikroskop cahaya, mikroskop Olympus photo slide BX51 dengan kamera DP71 12 megapixel.

4.7 Definisi Operasional

A. Ekstrak Alpukat atau *Persea americana*

Ekstrak alpukat atau *Persea americana* adalah sari-sari yang diperoleh dari daging buah alpukat yang diekstraksi menggunakan metode *Soxhlet*, 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 langsung dari kebun raya Purwodadi. Jenis alpukat yang digunakan adalah jenis alpukat ijo panjang. Bagian yang digunakan adalah daging buah alpukat yang sudah matang dengan kriteria berwarna hijau kekuningan dan bertekstur lunak.

B. Pencabutan Gigi

Pencabutan gigi merupakan proses pengeluaran gigi dari alveolus (Harty, 1995). Pencabutan gigi akan menimbulkan luka bekas pencabutan. Pencabutan gigi ini dilakukan pada gigi insisivus rahang bawah tikus galur wistar jantan. Hal ini dikarenakan dalam penelitian ini ingin melihat proses penyembuhan luka. Jadi,

tidak perlu dilakukan pencabutan gigi molar yang akan menimbulkan luka yang besar dan juga teknik pencabutan gigi molar yang sulit.

C. Soket Gigi

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

D. Ketebalan Lapisan Epitel

Epitel yang dimaksud adalah epitel yang terbentuk dari alveolar crest sampai tulang alveolar. Epitel yang diamati merupakan epitel yang terbentuk pada daerah bekas luka pencabutan yang diukur ketebalannya lalu diamati di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400x. Jika diberi pewarnaan HE dan diamati di bawah mikroskop, epitel akan berwarna keunguan. Epitel yang terlihat pada gambaran mikroskopik dibagi menjadi 4 sisi yaitu sisi labial, lingual, mesial, dan distal dan dihitung ketebalannya pada masing-masing sisi dilihat dari bagian yang paling tebal, kemudian diambil rata-rata ketebalannya.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diseleksi berdasarkan kriteria sampel, kemudian dibagi menjadi 8 kelompok, masing-masing terdiri dari 3 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 3 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa, 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 *Persea americana*

Pembuatan ekstrak alpukat menggunakan metode *Soxhlet* dengan prosedur sebagai berikut.

1. Mencuci buah alpukat kemudian memotong menjadi dua.
2. Mengambil daging buah alpukat.
3. Menghaluskan daging buah alpukat.
4. Menimbang sampel yang sudah dihaluskan sebanyak 1300gr.
5. Membungkus sampel dengan kertas saring atau menempatkan dalam thimble (selongsong tempat sampel) agar bahan tidak tercampur dengan pelarut secara langsung.
6. Menutup bagian atas sampel dengan kapas.
7. Mengisi labu kosong dengan butir batu didih untuk meratakan panas.
8. Mengeringkan dan dinginkan labu, isi labu dengan pelarut etanol 96%.
9. Memasukkan thimble yang berisi sampel ke dalam soxhlet.
10. Menyambungkan alat ekstraksi soxhlet dengan labu yang telah diisi pelarut etanol 96%.
11. Menempatkan alat ekstraksi pada alat pemanas listrik dan kondensor.
12. Menyambungkan alat pendingin dengan soxhlet.
13. Menjalankan air untuk pendingin dan alat ekstraksi mulai dipanaskan.
14. Uap dari pelarut yang dididihkan naik melewati soxhlet menuju pipa pendingin.
15. Air dingin yang dialirkan melewati bagian luar kondensor mengembunkan uap pelarut sehingga kembali ke fase cair, kemudian menetes ke thimble.
16. Pelarut akan melarutkan sampel dalam thimble dan menghasilkan larutan sari (ekstrak).

17. Bila volume ekstrak telah mencukupi, ekstrak dialirkan lewat sifon menuju labu.
18. Setelah proses ekstraksi selesai dilakukan proses penyulingan.
19. Hasilnya berupa cairan kental.

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 insisivus kanan rahang bawah tikus, masing-masing tikus terlebih dahulu dilakukan anestesi intraperitoneal dengan ketamin dosis 40 ml/kgBB. Pencabutan gigi dilakukan dengan menggunakan lecron dan needle holder modifikasi. Pencabutan gigi dilakukan searah dengan soket gigi dan dilakukan secara hati-hati untuk meminimalisir patahnya gigi. Lalu soket diirigasi dengan larutan akuades steril. Setelah dilakukan pencabutan dan perlakuan, hewan coba diberi makanan secukupnya dengan memperhatikan kesehatan hewan coba.

4.8.5 Pemberian Ekstrak *Persea americana*

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

4.8.6 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.

Untuk mencegah rasa sakit pasca pencabutan gigi, maka tikus diberi analgesik setelah dilakukan pencabutan. Obat yang digunakan adalah Novalgin 500 mg/kgBB sebanyak satu kali dalam sehari.

4.8.7 Pengambilan Sampel

Pada hari ke-3 dan ke-7 pada tikus masing-masing kelompok perlakuan dikorbankan dengan larutan eter dosis lethal. Sebelum rahang bawah diambil, tikus harus dipastikan sudah mati, kemudian dilakukan pengambilan jaringan dengan menggunakan scalpel. Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan menggunakan *buffer formalin* 10% selama maksimal 24 jam, kemudian dilakukan proses dekalsifikasi dengan EDTA selama 10 – 20 hari pada suhu 4° (Syafriadi dkk, 2006; Widodo, 2005). Jasad hewan coba kemudian dikuburkan.

4.8.8 Pembuatan Sediaan

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

1. Mandibula dipotong dengan arah transversal labio-lingual pada daerah insisivus sentral mandibula, mulai dari bagian ujung sampai dasar mandibula untuk dibuat sediaan histologi.
2. Potongan mandibula dimasukkan ke dalam *automatic tissue processor*, kemudian dehidrasi dengan alkohol 99% secara bertahap (dari konsentrasi rendah ke tinggi) untuk membersihkan sisa – sisa fiksatif.
3. Melakukan proses *clearing* dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan *xylol*.
4. Melakukan proses impregnasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan parafin.

4.8.9 Embedding dan Penyayatan Jaringan

Embedding dan penyayatan jaringan dilakukan dengan mikrotom dengan tata urutan sebagai berikut.

- a. Alat cetak yang berbentuk logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca yang telah diolesi gliserin. Penggunaan gliserin ini untuk mempermudah pemisahan alat cetak dari blok parafin yang sudah beku.
- b. Dua tempat parafin cair, yaitu parafin sebagai bahan embedding dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur jaringan yang akan ditanam, dipersiapkan dengan temperatur optimum tetapi tidak mengembangkan alat cetak blok.
- c. Parafin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh pada perlukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dengan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata
- d. Alat cetak dilepas bila parafin sudah cukup keras, lalu blok jaringan diberi label dan siap disayat.
- e. Blok parafin tadi ditempelkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan pada suhu kamar agar melekat erat.
- f. Pisau mikrotom dipasang pada pegangan mikrotom membentuk sudut 5-10°. Pisau harus selalu tajam dan permukaannya rata benar.
- g. Water bath dipersiapkan dengan mengatur suhu air di bawah titik leleh parafin ($\pm 48^{\circ}\text{C}$).
- h. Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki, umumnya 4-8 mikron.
- i. Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan ke dalam water bath agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.
- j. Sayatan diseleksi dan dipindahkan ke atas kaca obyek dengan telah diolesi dengan mayer albumin (putih telur) atau polisin sebagai bahan perekatnya dan sudah diberi label pada blok.
- k. Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu optimum (5860°C) selama 30 menit, dan sediaan siap dicat.

4.8.10 Teknik Pengecatan Hematoksilin Eosin

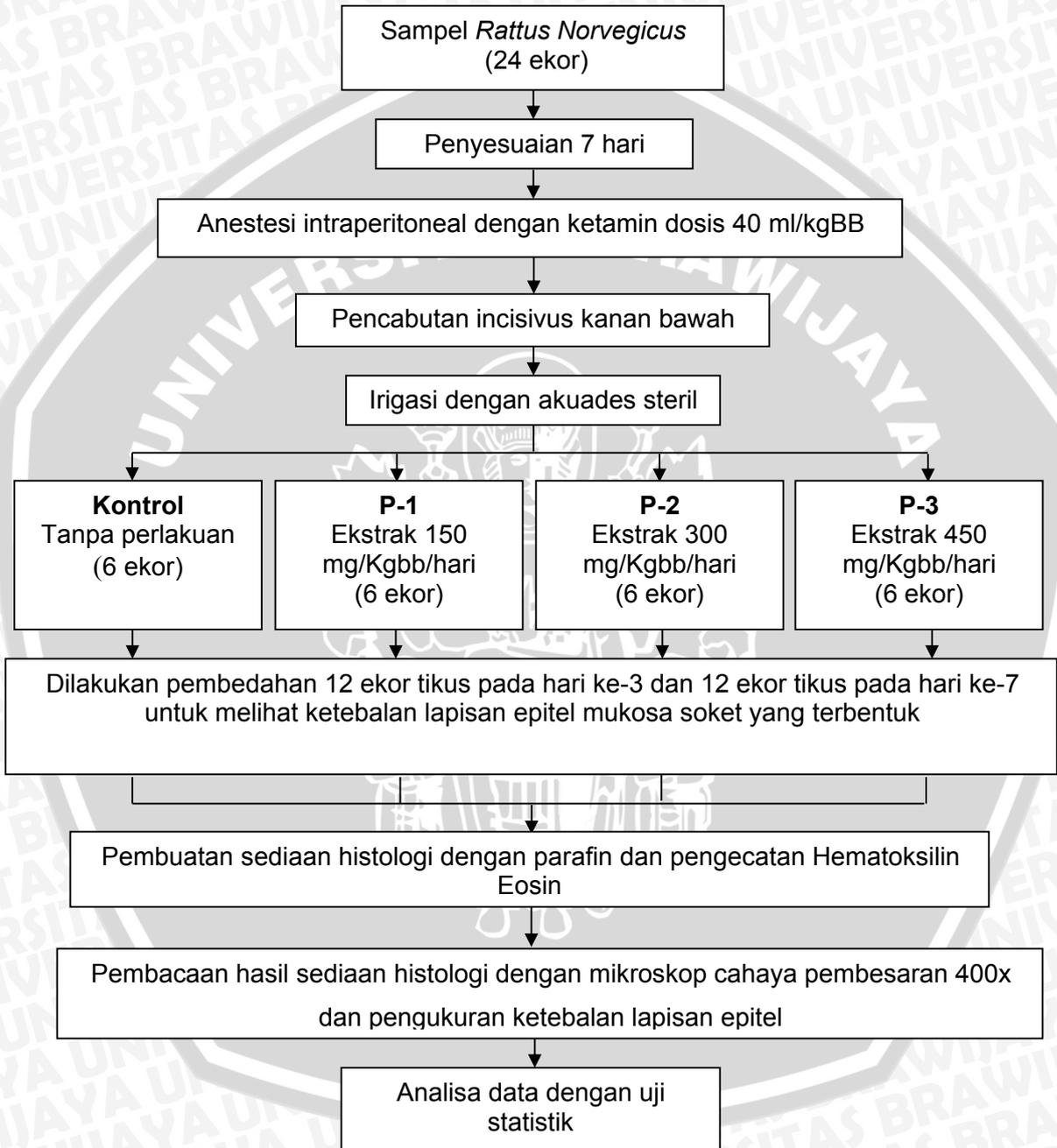
Prosedur pengecatan hematoksilin eosin adalah sebagai berikut.

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 hematoksilin 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 sediaan histologi soket mandibula tikus yang dibedah pada hari ke-3 dan ke-7 dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan dibuat foto dari preparat histologi tersebut lalu dilakukan pengukuran ketebalan lapisan epitel yang terlihat, kemudian membandingkan ketebalan lapisan epitel antara kelompok yang tidak diberi perlakuan dengan kelompok yang diberi perlakuan.

4.9 Skema Prosedur Penelitian



4.10 Analisis Data

Hasil pengukuran ketebalan lapisan epitel yang positif pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 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 :

- Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
- Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
- Uji One-way ANOVA : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan
- Post hoc test (uji Least Significant Difference) : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).
- Uji korelasi Pearson : untuk mencari hubungan antara dua variabel yaitu variabel bebas dan terikat, yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji Post Hoc (LSD)