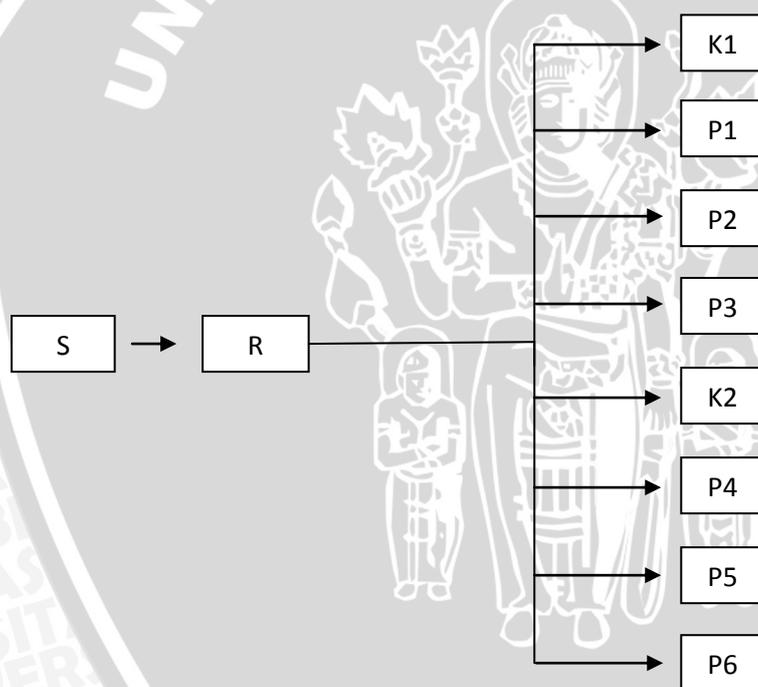


## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan metode *true eksperimental* yang di kerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*. Penelitian ini dibagi menjadi 8 kelompok dengan 2 *time series*. Desain Penelitian adalah sebagai berikut:



Keterangan:

- S = *Sampel*
- R = *Random*
- K1 = Kel. Kontrol 1 tanpa perlakuan pembedahan hari k-1
- P1 = Kel. Perlakuan 1 pemberian dosis 50% dekaputasi hari k-1
- P2 = Kel. Perlakuan 2 pemberian dosis 70% dekaputasi hari k-1
- P3 = Kel. Perlakuan 3 pemberian dosis 100% dekaputasi hari k-1
- K2 = Kel. Kontrol 2 tanpa perlakuan pembedahan hari k-3
- P4 = Kel. Perlakuan 4 pemberian dosis 50% dekaputasi hari k-3
- P5 = Kel. Perlakuan 5 pemberian dosis 75% dekaputasi hari k-3
- P6 = Kel. Perlakuan 6 pemberian dosis 100% dekaputasi hari k-3



## 4.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* strain wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan kriteria inklusi dan eksklusi. Termasuk kriteria Inklusi: tikus jenis kelamin jantan, usia 2,5 – 3 bulan, berat badan 250 – 300 gram, sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria eksklusi: 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.

Pada penelitian ini terbagi atas 8 kelompok sampel. Jumlah sampel yang dibutuhkan didapat dari perhitungan dengan rumus (Hanafiah, 2005):

$(t-1) (r-1)$	$\geq 15$
$(8 \text{ perlakuan} - 1) (r-1)$	$\geq 15$
$(8 - 1) (r - 1)$	$\geq 15$
$7r - 7$	$\geq 15$
$7r$	$\geq 22$
$r$	$\geq 3,14$

Sehingga sampel yang digunakan adalah 3 tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Total tikus yang digunakan pada 2 *time series* sejumlah 24 tikus.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 variabel, yaitu:

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah gel getah batang pisang ambon dengan dosis 50gr%, 75gr%, dan 100gr%

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah jumlah sel makrofag.

#### 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 akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu  $\pm 3$  bulan.

### 4.5 Definisi Operasional

#### 4.5.1 Gel Getah Batang Pisang Ambon

Getah batang pisang ambon yang digunakan adalah getah batang pohon pisang Ambon (*Musa Paradisiaca var sapientum*) diperoleh di Malang. Getah batang pisang diperoleh dari batang pohon pisang Ambon yang berumur sekitar 1 tahun dengan mengambil dari inti batang semu yang tumbuh dipermukaan tanah. Dibuat dalam bentuk gel dengan pelarutnya berupa *Carbomer*, *Propylen glicol*, *Trietanolamin*, dan *Na-benzoat* serta dosis getah pisang 50%, 75%, dan 100%.

#### 4.5.2 Jumlah Sel Makrofag

Jumlah sel makrofag yang terlihat pada preparat yang diambil dari gingiva tikus yang dipotong secara melintang dengan pewarnaan Hemotoksilin Eosin (HE) dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x per 10 lapangan pandang.

#### 4.5.3. Gingivektomi

Gingivektomi adalah membuat sayatan pada gingiva tikus *Rattus norvegicus* seluas 1 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,5-1 mm. Dengan tujuan membuat luka terbuka gingivektomi yang nantinya akan diaplikasikan gel getah pisang dengan berbagai dosis. Letak gingivektomi adalah pada rahang anterior bawah karena memiliki ketebalan gingiva paling baik dan kontur yang paling sehat.

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.6.1 Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

Perawatan tikus dengan kandang 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. Makanan tikus yang diberikan berupa pakan (pelet). Dengan jumlah pakan 30-40 gram setiap tikus

##### 4.6.2 Gingivektomi

Alat yang di gunakan berupa pinset, sonde *halfmoon*, kaca mulut, kuret *gracey*, *pocket marker*, *blade*, *blade holder*, *periodontal probe*, pinset bedah, tempat antiseptik, *syringe*.

Bahan-bahan yang di perlukan dalam prosedur berubapa *cotton roll*, kasa, masker, *handscoon*, *Ketamine* 0,2 ml, *Povinde iodine* 3%, Alkohol 70%,

aquadest, tampon, *periodontal pack (non-eugenol)* untuk kelompok kontrol.

#### 4.6.3 Penghitungan Luas Penampang Luka

Alat jangka sorong, *periodontal probe*, dan kaca mulut. Bahan yang disiapkan kapas, dan alkohol 70%.

#### 4.6.4 Pembedahan Tikus

Alat berupa gunting bedah, pinset, jarum pentul, *stereoform*, kapas. Bahan yang di perlukan dalam proses pembedahan adalah kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, alkohol, tabung organ 28 buah.

#### 4.6.5 Penghitungan Jumlah makrofag

Dalam melakukan penghitungan jumlah makrofag beberapa alat yang di perlukan antara lain preparat, slide glass, mikroskop. Bahan yang di gunakan adalah formalin 10%, Alkohol absolut, xilol, *Paraffin* lunak, *Paraffin* keras, Haris hematoxilen, alkohol asam, larutan amuniun, *counter staining*, Entelan.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pengambilan Getah Batang Pisang

Batang pohon pisang Ambon diperoleh di Malang dan diambil dengan cara memotong batang pohon pisang Ambon yang berumur sekitar 1 tahun secara miring dan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil kemudian diperas dengan wadah steril.

#### 4.7.2 Pembuatan Sediaan

Gel merupakan koloid yang bersifat setengah kaku (antara padat dan cair). Keuntungan bahan semi solid tersebut adalah praktis dan mudah digunakan/diaplikasikan serta tahan lama. Getah batang pisang Ambon yang sudah disimpan dalam wadah steril

Uji sensitivitas gel getah batang pisang menurut Bayu Febram (2010), yang telah diteliti dengan menggunakan 11 orang sampel wanita dan laki-laki (usia 23-30 tahun) menunjukkan hasil bahwa dengan pengolesan selama 5 menit setiap hari, tidak menunjukkan hasil positif terhadap alergi (kemerahan dan bengkak) sampai minggu ke 8. Setelah 8 minggu dimungkinkan terjadi sedikit eritema.

Pembuatan gel dilakukan di ruang farmasetik dengan suhu ruang stabil. Diawali dengan persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan. Pembuatan basis gel diawali dengan mendidihkan air dengan *water heater*, ketika menunggu air mendidih, semua bahan ditimbang dengan takaran *Carbomer* 0,519 gr, *Propylen glicol* 3,825 gr, *Trietanolamin* 1,275 ml, dan *Na-benzoat* 0,1275 gr dilarutkan dalam 3 tetes air panas.

Setelah air mendidih sebagian air dimasukkan ke dalam mortal, dengan tujuan membuat mortal dalam keadaan hangat ketika digunakan untuk mengaduk gel. Pembuatan basis gel dengan menggunakan teknik basah, yaitu dengan memasukkan 10 tetes air panas lalu ditaburi carbomer perlahan-lahan sampai terdispersi seluruhnya. Setelah terdispersi secara keseluruhan, ditambahkan propilen glikol, *trietanolamin*, *na-benzoat*, secara perlahan-lahan sampai homogen. Setelah pembuatan basis selesai dilakukan pencampuran getah batang pisang untuk prosedur pembuatan gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75% dan 100%.

Langkah pertama pencampuran getah batang pisang adalah dengan penimbangan getah batang pisang yang disesuaikan dengan konsentrasi dosis, yaitu untuk gel dosis 50% membutuhkan getah batang pisang sebanyak 12,2 gram, dosis 75% membutuhkan getah batang pisang sebanyak 18,7 gram dan

untuk gel dosis 100% membutuhkan getah batang pisang sebanyak 25 gram. Dilakukan pencampuran getah batang pisang yang telah ditimbang kedalam basis secara perlahan.

Tahap berikutnya adalah melakukan pengujian untuk mengetahui keadaan gel getah pisang. Uji yang dilakukan adalah uji homogenitas yang bertujuan untuk melihat apakah gel benar-benar homogen antara basis dengan getah batang pisang. Uji ini dilakukan dengan meletakkan sedikit gel yang sudah diaduk diantara 2 kaca preparat lalu ditekan dan diamati homogenitasnya. Selain uji homogenitas juga dilakukan uji pH menggunakan elektroda dan pH-meter, dengan pH yang diharapkan adalah pH yang mendekati nilai normal atau netral, atau sedikit basa.

Setelah gel getah batang pisang selesai dibuat, dilakukan penimbangan kemudian gel disimpan dengan meletakkan dalam wadah berupa *tube* atau *pot* yang terlindung dari kontaminasi luar.

#### 4.7.3 Prosedur Gingivektomi pada Hewan Coba

Prosedur pembuatan luka gingiva dilakukan pada tikus Wistar *Rattus norvegicus* yang tidak mengalami hiperplasi gingiva, tahapan yang dilakukan antara lain:

1. Aplikasi antiseptik pada daerah operasi.
2. Anastesi daerah operasi menggunakan *Ketamine* 0,2 ml. Dengan perhitungan sediaan 50mg/ml dan kebutuhan dengan onset waktu 10-15 menit adalah 40mg/kg BB, maka dengan BB tikus  $\pm 250$  mg memerlukan 0,2 ml.
3. Insisi gingiva di regio posterior rahang bawah. Penggunaan alat *diamond bur*
4. Pembuatan penampang luka dapat menggunakan kuret/*scaler*. Sisa jaringan fibrosa dan granulasi disekitar perlukaan dapat dibersihkan untuk membentuk

kontur tepi luka yang rapi. Insisi dibuat berbentuk menyerupai persegi panjang dengan ukuran 1 cm x 0,5 cm pada bagian anterior rahang bawah dengan desain tidak bersudut.

5. Kontrol perdarahan menggunakan kasa.
6. Irigasi dengan antiseptik
7. Aplikasi getah pisang sediaan gel dengan dosis 50gr%, 75gr%, dan 100r%.  
Untuk kontrol tanpa pemberian getah batang pisang diberikan *vaseline* yang hanya berfungsi sebagai penutup dan pelindung luka dari iritasi.
8. Perawatan pasca gingivektomi dilakukan dengan pemberian pakan yang lunak dan pemberian analgesik Novalgin.

#### **4.7.4 Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi Luka gingiva**

Pembuatan preparat dilakukan dengan estimasi setiap luka dengan 3 kali pembuatan preparat. Sehingga dengan 4 perlakuan, 3 sampel dan 1 hari pengamatan, masing-masing 3 preparat untuk setiap perlakuan akan membutuhkan total 36 preparat.

Dalam dekaputasi dapat digunakan alternatif dengan teknik *cervical dislocation* (dislokasi leher) atau dengan menggunakan gas eter. Kemudian dilakukan pengambilan jaringan gingiva beserta tulang rahang tikus yang telah dilakukan prosedur gingivektomi dengan pemotongan secara melintang. Jaringan gingiva tersebut di masukkan ke dalam botol organ dengan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan waktu perendaman minimal 2 hari bertujuan sebagai fiksasi jaringan dan diberi label penamaan sesuai dosis perlakuan dan hari pembedahan. Setelah itu diberikan larutan dekalsifikasi menggunakan asam format 50%, proses dekalsifikasi ini dilakukan selama 24-48 jam dan harus diganti setiap hari, setelah proses dekalsifikasi selesai pencucian air mengalir

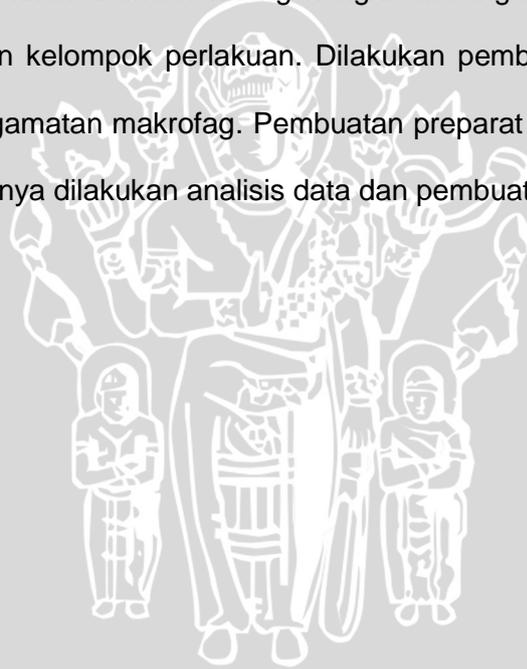
selama 3-8 jam untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu pada konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% dengan masing-masing selama 30 menit. Setelah itu dilakukan clearing dengan xilol 2x selama 1 jam kemudian proses infiltrasi dengan *paraffin* lunak pada suhu 42°-46°C selama 2 x 1 jam. Lalu *blocking* dengan *paraffin* keras pada suhu 46°-52°C selama 1 jam dilanjutkan sliding pada rotari mikrotom 4-6 µm kemudian dipanaskan pada suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi yaitu dengan perendaman dengan xilol 2x selama 5 menit, kemudian pada alkohol bertingkat dengan urutan 2x alkohol absolut, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% dan H<sub>2</sub>O; masing-masing selama 3 menit. Langkah terakhir Dilakukan pewarnaan *Hematoxilen-Eosin* (HE). Pertama pemberian *Haris Hematoxilen* selama 15 menit, lalu ditetesi alkohol asam selama 3-10 detik dilanjutkan dengan pemberian larutan amonium selama 3-10 detik. Kemudian diberi *counter staining* selama 15-20 detik dilanjutkan dengan dehidrasi pada alkohol bertingkat. Terakhir pemberian xilol selama 5 menit dan mounting menggunakan entelan kemudian pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Rosen. 2008).

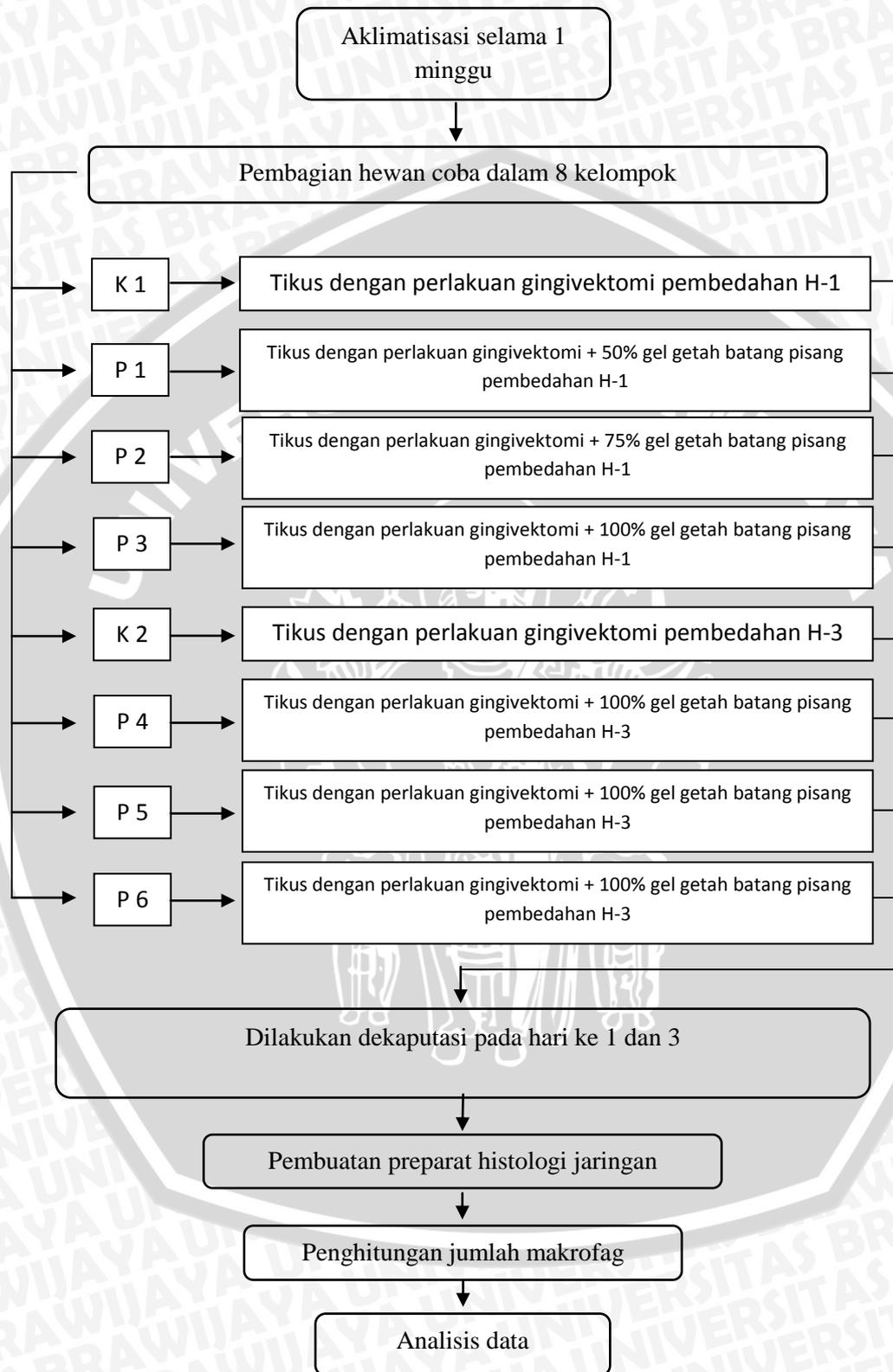
#### **4.7.5 Pengukuran Jumlah makrofag pada Luka dan Persentase Penyembuhan Luka**

Pengukuran jumlah makrofag dihitung dalam beberapa lapangan pandang dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 400x dan presentase dibandingkan percepatan penyembuhan dalam hitungan hari dan jumlah makrofag antara P0 dan dosis efektif yang memiliki jumlah makrofag paling banyak.

#### 4.8 Alur Penelitian

Pada tahap awal penelitian, dilakukan pembuatan sediaan berupa getah batang pisang Ambon dengan berbagai dosis, persiapan alat dan bahan penelitian, kemudian perlakuan aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu. Kemudian dilakukan pemilihan sampel teknik randomisasi lalu sampel dikelompokkan. Setelah alat dan bahan dipersiapkan, dilanjutkan dengan melakukan prosedur gingivektomi pada seluruh tikus, kemudian pemberian perlakuan sesuai dengan kelompok yang sudah ditentukan. Setelah perlakuan maka tikus di kelompokkan dalam kandang dengan masing-masing kandang 4 ekor tikus berdasarkan kelompok perlakuan. Dilakukan pembedahan pada hari ke 1 dan 3 untuk pengamatan makrofag. Pembuatan preparat dan penghitungan sel makrofag. Selanjutnya dilakukan analisis data dan pembuatan kesimpulan.





Gambar 4.1 Alur Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah yang positif pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dan dilakukan uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a) 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.
- b) *Post Hoc Tes* (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% ( $p=0,05$ ).
- c) Uji korelasi Pearson : untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji *Post Hoc* (LSD).