

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel

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

Kriteria Inklusi:

- Usia 2,5-3 bulan
- Berat badan 250-300 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.

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang lebih cepat, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia, harganya lebih terjangkau dibandingkan dengan menggunakan marmot (*Cavia cobaya*), serta luas penampang gingivanya lebih luas jika dibandingkan dengan mencit (*Mus musculus albinus*).
- Tikus dipilih dengan kriteria usia 2,5-3 bulan dan berat badan 250-300 gram dengan pertimbangan semakin besar dan semakin dewasa tikus maka luas penampang rahang tikus juga semakin besar, sehingga perlakuan gingivektomi lebih mudah diaplikasikan.

Pada penelitian ini, sampel penelitian dibagi ke dalam 4 kelompok:

1. Kelompok kontrol (K) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi tanpa pemberian gel getah batang pisang.
2. Kelompok perlakuan I (P1) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi dengan pemberian dosis 50% gel getah batang pisang.
3. Kelompok perlakuan II (P2) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi dengan pemberian dosis 75% gel getah batang pisang.
4. Kelompok perlakuan III (P3): Tikus dengan perlakuan gingivektomi dengan pemberian dosis 100% gel getah batang pisang.

Pengamatan penelitian secara keseluruhan dilakukan dalam 3 *time series* yaitu pada hari ke 1, 3, dan 7. Untuk kolagen diperlukan 1 *time series* yaitu hari

ke 7. Jumlah sampel yang digunakan memakai rumus: $(t - 1) (r - 1) \geq 15$

(Hanafiah, 2005) t : jumlah perlakuan, r : jumlah sampel

Pada penelitian ini $t = 4$ sehingga jumlah sampel adalah adalah:

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

$$(4 \text{ perlakuan} \times 3 \text{ time series} - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(12 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$11r - 11 \geq 15$$

$$11r \geq 26$$

$$r \geq 2,36$$

Sehingga, sampel yang digunakan adalah 3 tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Total tikus yang akan digunakan pada pada 1 *time series* sejumlah 12 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 dengan dosis 50%, 75%, dan 100%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah ketebalan serabut kolagen.

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 \pm 3 bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

- a. Perawatan tikus: 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.
- b. Makanan tikus: Makanan tikus berupa pakan (pelet). Dengan jumlah pakan 30-40 gram setiap tikus.

4.5.2 Alat dan Bahan Gingivektomi

Alat : Pinset, sonde halfmoon, blade, blade holder, periodontal probe, kaca mulut, tempat antiseptik, round diamond bur, connector bur, micromotor, handpiece low speed contra angle, pinset bedah, dappen glass, syringe irigasi, syringe anestesi, pocket marker, petrie dish.

Bahan : Cotton roll, kasa, masker, handscoon, Ketamine 0,2 ml, Povidon iodine 3%, Alkohol 70 %, aquades, tampon, analgesik metampiron 0,2 ml IM.

4.5.3 Alat dan Bahan Penghitungan Luas Penampang Luka

Alat : Jangka sorong, periodontal probe, kaca mulut.

Bahan : Kapas, Alkohol 70%.

4.5.4 Alat dan Bahan Pembuatan Gel Getah Batang Pisang

Alat : Pisau anti karat (*stainless steel*), corong plastik, timbangan gram, timbangan milligram, cawan porselen, gelas ukur, pengaduk kayu, pengaduk kaca, tabung kaca dan tutupnya, mortar pastle, kertas, plastik, gunting, sudip, sendok porselen, water heater, pot untuk menyimpan gel.

Bahan : Getah batang pisang Ambon, Natrium benzoat, Propylen glicol, Trietanolamin, Carbomer.

4.5.5 Alat dan Bahan Pembedahan Tikus

Alat : Gunting bedah, pinset, jarum pentul, kapas, handscoon, masker, papan bedah.

Bahan : Dietil eter 10%, Formalin 10%, alkohol 70%, tabung organ.

4.5.6 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Jaringan

Alat : Telenan, pisau scalpel, pinset, saringan, kaca obyek, rak khusus untuk pewarnaan, tissue casset, mesin processor otomatis, mesin vaccum, mesin bloking, freezer (-20°C), mesin microtome, pisau microtome, water bath 46 °C, kaca penutup, oven 60°C (Munthiha, 2001).

Bahan : Potongan jaringan hewan yang telah difiksasi dengan Buffer Neutral Formalin 10%, xilol, parafin, kit pewarnaan Masson Trichrome

4.5.7 Alat dan Bahan Pengukuran Ketebalan Serabut Kolagen

Alat : Preparat, slide glass, mikroskop

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Batang pisang adalah batang pohon pisang Ambon (*Musa Paradisiaca var sapientum*) diperoleh di daerah sekitar 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.

4.6.2 Serabut kolagen adalah ketebalan serabut kolagen yang dilihat pada sediaan preparat sampel gingiva pasca gingivektomi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar. Sediaan diambil pada hari ke 7 pasca gingivektomi. Serabut kolagen yang terlihat pada preparat diambil dari gingiva tikus yang dipotong secara melintang. Pada teknik pewarnaan Masson Trichome, serabut kolagen akan terpulas biru.

4.6.3. Gingivektomi adalah pengambilan sebagian jaringan gingiva yang dilakukan pada regio anterior rahang bawah yang memiliki ketebalan gingiva paling baik dan kontur paling sehat dengan membuat sayatan pada gingiva tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar 1 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,5-1 mm. Gingivektomi tersebut dilakukan dengan tujuan membuat luka terbuka pada gingiva yang nantinya akan diaplikasikan gel getah batang pisang

berbagai dosis sesuai kelompok perlakuan. Untuk mengurangi rasa nyeri pasca gingivektomi, hewan coba akan diberikan analgesik (metampiron 0,2 ml *intramuscular*).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penelitian Pendahuluan

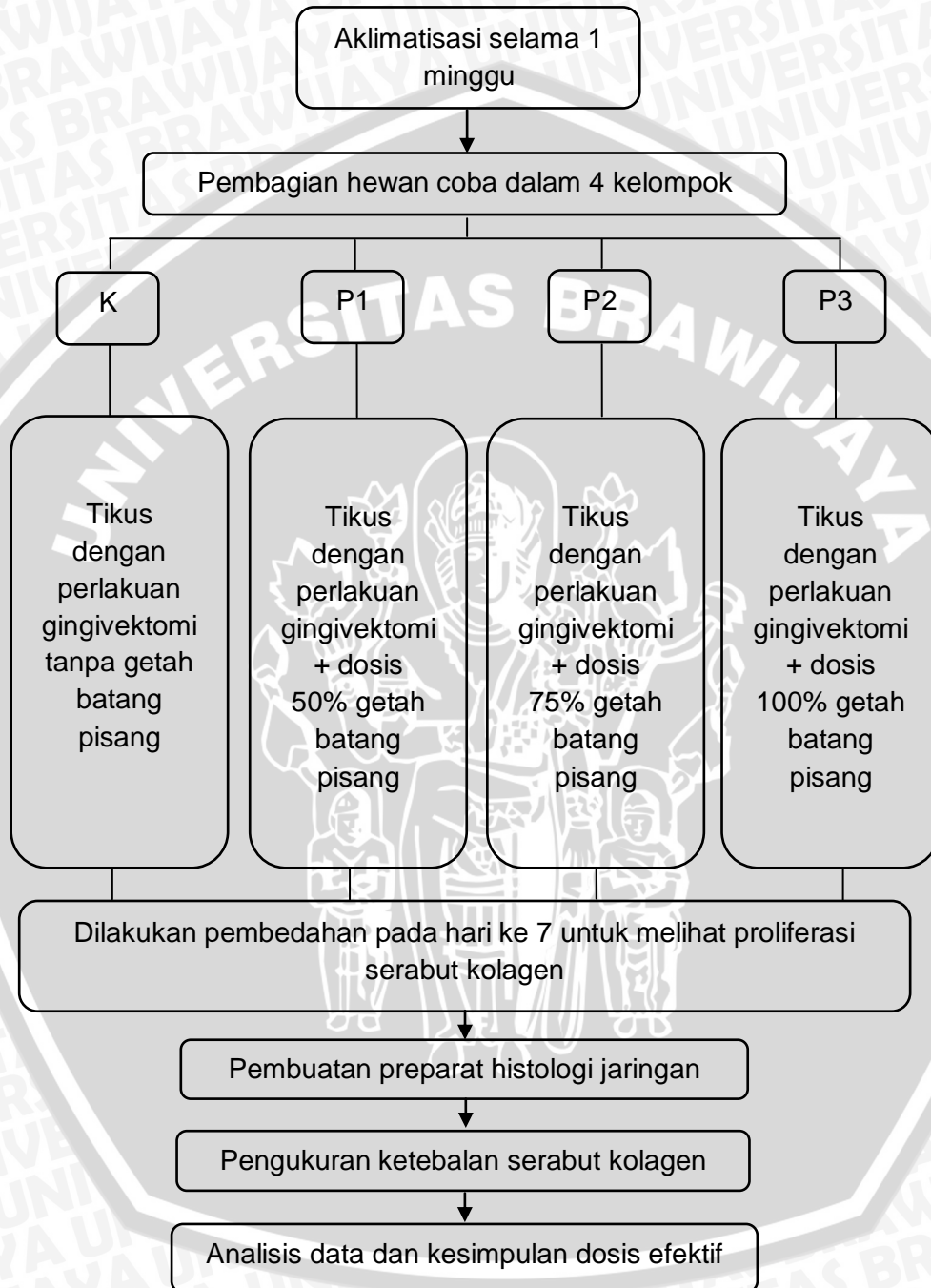
Pada tahap awal penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan dosis getah batang pisang, mengukur ketebalan gingiva tikus, dan untuk memperkirakan kedalaman gingivektomi yang akan diaplikasikan. Pada penelitian pendahuluan didapatkan gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75%, dan 100%.

4.7.2 Alur Penelitian

Alur penelitian terdiri dari pembuatan sediaan gel getah batang pisang Ambon dengan berbagai dosis sesuai dengan kelompok perlakuan, persiapan alat dan bahan penelitian, kemudian perlakuan aklimatisasi selama 1 minggu. Setelah alat dan bahan dipersiapkan, dilanjutkan dengan melakukan prosedur gingivektomi pada seluruh tikus, pengelompokan perlakuan dan sampel, kemudian pemberian perlakuan sesuai dengan kadar getah yang sudah ditentukan. Setelah perlakuan maka tikus di kelompokkan dalam kandang dengan masing-masing kandang 2 ekor tikus berdasarkan kelompok perlakuan. Dilakukan pembedahan pada hari ke 7 untuk pengamatan serabut kolagen,

pembuatan preparat dan pengukuran ketebalan serabut kolagen.

Selanjutnya dilakukan analisis data dan penarikan kesimpulan.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.3 Pengambilan Getah Batang Pisang

Kriteria pohon pisang Ambon yang digunakan adalah pohon pisang Ambon yang berumur 1 tahun yang tumbuh di daerah Malang dengan iklim tropis. Pohon pisang yang baik tumbuh di daerah yang memiliki kecepatan angin tidak terlalu tinggi. Curah hujan optimal adalah 1.520-3.800 mm/tahun dengan 2 bulan kering atau 2000-2500 mm/tahun dengan paling tidak 100 mm/bulan. Suhu udara berkisar antara 15-35°C. Media tanam pisang adalah tanah dengan pH antara 4,5-7,5 dengan ketinggian air yang tidak menggenang (Mulyanti, 2008).

Untuk memperoleh batang pohon pisang Ambon, dilakukan pemotongan secara miring pada batang pohon pisang Ambon hingga mencapai umbi batang bagian bawah. Penebangan dilakukan pada pagi hari pada pukul 8.00-11.00 yang merupakan waktu aktif tanaman pisang. Selanjutnya, diambil bagian hati atau bagian tengah batang. Batang inti yang didapat dipotong miring dan ditampung getahnya dalam wadah steril.

4.7.4 Pembuatan Sediaan Gel Getah Batang Pisang

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 didapat kemudian disimpan dalam wadah steril

Uji sensitivitas gel getah batang pisang 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 (Febram *dkk.*, 2010).

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 propylen glicol, 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, 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.

4.7.5 Prosedur Gingivektomi

Prosedur gingivektomi yang dilakukan adalah dengan desain berbentuk persegi namun tidak menyudut di bagian tepinya. Ukuran luka gingiva kurang lebih antara 1 cm x 0,5 cm. Dilakukan pengukuran dengan menggunakan jangka sorong dan periodontal probe. Pengangkatan daerah gingiva yang dieliminasi menggunakan round diamond bur low speed nomor ½.

Prosedur gingivektomi secara standart yang dilakukan adalah dengan tahapan sebagai berikut:

1. Persiapan alat dan bahan.
2. Aplikasi antiseptik pada daerah operasi.

3. Anestesi pada daerah operasi.
4. Pemeriksaan dengan menggunakan periodontal probe untuk mengetahui dasar gingiva cekat.
5. Menandai dasar poket dengan membuat *bleeding point* menggunakan *pocket marker*.
6. Melakukan insisi dan pembuangan jaringan dengan scalpel (menggunakan blade nomor 11, 12 atau 15) hingga menjadi zero *pocket*.
7. Melakukan SRP untuk membersihkan dental deposit.
8. Irigasi daerah operasi dengan normal salin.
9. Kontrol perdarahan dan aplikasikan periodontal pack.

Namun dalam penelitian ini, prosedur pembuatan luka gingiva dilakukan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang tidak mengalami hiperplasi gingiva, tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Aplikasi antiseptik pada daerah operasi.
2. Melakukan anestesi menggunakan obat anestesi Ketamine, perhitungan sediaan 50 mg/ml dan kebutuhan dengan onset waktu 10-15 menit adalah 40 mg/kg BB, maka dengan berat badan tikus ± 250 mg memerlukan 0,2 ml. Ketamine 0,2 ml diberikan secara intraperitoneal pada paha bagian atas untuk memberikan efek analgesik dan sedasi sebelum dilakukan gingivektomi.
3. Eksisi gingiva di regio anterior rahang bawah menggunakan round diamond bur low speed nomor $\frac{1}{2}$.

4. Eksisi dibuat berbentuk menyerupai persegi panjang dengan ukuran 1 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,5-1 mm.
5. Irigasi dengan antiseptik
6. Kontrol perdarahan menggunakan kasa.
7. Aplikasi berbagai dosis getah batang pisang sesuai kelompok perlakuan.
8. Perawatan pasca gingivektomi dilakukan dengan pemberian pakan yang lunak dan pemberian analgesik metampiron 0,2 ml *intramuscular*.

4.7.6 Pembedahan Hewan Coba

Pada hari ke-7, hewan coba dieuthanasia dengan menggunakan anestesi inhalasi dietil eter 10% dengan cara memasukkan tikus ke dalam toples kemudian dimasukkan kapas yang telah dibasahi dengan eter. Setelah proses euthanasia selesai, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan gingiva pasca gingivektomi pada hewan coba beserta sedikit tulang rahang disekitarnya. Jaringan tersebut kemudian dibersihkan dengan NaCl 0,9% fisiologis dan dimasukkan ke dalam botol organ yang sudah berisi larutan BNF (Buffer Neutral Formalin) 10%, pH antara 6,5-7,5 (Yosaphat, 2010).

Larutan BNF 10% digunakan untuk menghindari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1 : 10, sedangkan lamanya fiksasi 2 hari (Muntiha, 2001).

4.7.7 Sanitasi Hewan Coba

Semua sisa organ tikus yang sudah dibedah dan tidak terpakai dilakukan prosedur insinerasi secara layak. Insinerasi dilakukan di halaman belakang laboratorium Farmakologi dengan membuat lubang sebesar 100 cm x 30 cm x 50 cm.

4.7.8 Pembuatan Preparat Histologi dan Pewarnaan Masson Trichrome

Setelah proses pembedahan, jaringan gingiva di masukkan ke dalam botol organ dengan formalin (BNF) 10% dan diberi label penamaan sesuai dosis perlakuan. 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 H₂O; masing-masing selama 3 menit. Langkah terakhir dilakukan pewarnaan Masson Trichome.

4.7.9 Pengukuran Ketebalan Serabut Kolagen pada Luka

Pengukuran ketebalan serabut kolagen dihitung dalam 10 titik dibawah epitel pasca gingivektomi dengan menggunakan mikroskop olympus xc 10 dan program Dot Slide dengan perbesaran 1000x, kemudian dihitung rata-ratanya dan dibandingkan ketebalan serabut kolagen untuk melihat percepatan penyembuhan luka antar kelompok serta dosis efektif dilihat dari ketebalan serabut kolagen paling tinggi.

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran ketebalan serabut kolagen yang positif pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program komputer pada 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 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 secara signifikan.
- Uji T: bertujuan untuk membandingkan nilai antar kelompok dan mengetahui apakah nilai dari tiap dua kelompok berbeda secara signifikan.

