

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian ini adalah dengan rancangan eksperimental murni (*pure experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana subyek dibagi menjadi 8 kelompok (I sampai dengan VIII) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 3 tikus. Kelompok I dan V adalah tikus tanpa pemberian ekstrak *Persea americana* (kelompok kontrol) dan kelompok II – IV dan VI – VIII (kelompok perlakuan) diberi ekstrak *Persea americana* dengan dosis berbeda secara per oral setiap hari sekali selama 3 dan 7 hari. Kemudian diobservasi dan dibandingkan efek ekstrak *Persea americana* terhadap jumlah pembuluh darah yang terbentuk.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian di lakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 23 Januari 2014 sampai 14 Maret 2014.

4.3 Pemilihan Binatang Coba dan Teknik Randomisasi

Binatang coba 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. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan:

Kriteria Inklusi :

- a. Jenis kelamin jantan.
- b. Usia 2,5 – 3 bulan.
- c. Berat badan rata-rata 178 – 200 gram.
- d. Sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
3. Tikus yang mengalami infeksi paska pencabutan gigi insisivus kanan mandibula

Tikus jenis *Rattus norvegicus* galur Wistar dipilih sebagai populasi karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah perawatannya dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia. Lalu sampel di bagi kedalam empat kelompok dengan teknik *simple random sampling*.

Teknik randomisasi untuk pengelompokan 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.

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

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 (P0, P1, P2, P3), 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 $4 \text{ (perlakuan)} \times 2 \text{ (hari pengamatan)} \times 3 \text{ (tikus yang dibedah)}$

setiap *time series*) = 24 tikus. Maka diperlukan sampel sejumlah 24 tikus dengan pembedahan 12 tikus setiap *time series* nya.

4.5 Penentuan Dosis

Dosis yang digunakan diambil dari penelitian sebelumnya oleh Nayak *et al* (2008), yaitu 300mg/kgBB. Dosis dari penelitian sebelumnya merupakan dosis II, dosis I merupakan $\frac{1}{2}$ dosis II, dan dosis III merupakan dosis II dikali 3 dibagi 2 (Hutomo, 2010). Sehingga didapatkan perkiraan dosis yang akan diteliti dan dibandingkan, yaitu dosis I 150mg/kgBB, dosis II sebesar 300mg/kgBB, dan dosis III sebesar 450mg/kgBB.

4.6 Variable dan Definisi Operasional

4.6.1 Variable Penelitian

Variabel dalam penelitian ini, yaitu :

1. Variabel independen
 - Ekstrak *Persea americana*
2. Variabel dependen
 - Jumlah pembuluh darah pada soket yang terlihat dalam preparat histologi
3. Variabel kendali
 - Makanan sampel
 - Lingkungan kandang hewan coba

4.6.2 Definisi Operasional

1. Alpukat atau *Persea americana*

Alpukat atau *Persea Americana* kulit hijau yang dibeli langsung dari Pasar Belimbing. Jenis alpukat yang diunakan adalah jenis alpukat ijo panjang. Bagian yang dipakai untuk penelitian adalah bagian daging buah alpukat. Selanjutnya daging buah alpukat diekstrak dengan metode ekstraksi *Soxhlet*. Daging buah alpukat dipilih karena daun dan biji buah alpukat mengandung toksik. Selain itu kandungan tannin, yang dapat menghambat angiogenesis, pada daging buah lebih sedikit dibandingkan pada daun dan biji alpukat.

2. Pembuluh Darah

Pembuluh darah yang terbentuk pada saat proses angiogenesis adalah pembuluh darah kecil atau kapiler darah (Dvorak, 2005). Dalam pemeriksaan histologis yang diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, kapiler darah terlihat berupa lumen kecil berukuran 4 - 10 μm yang terbentuk dari sel endotel skuamosa di sekelilingnya. Bagian tengah lumen berwarna putih, tetapi kadang ditemukan eritrosit. Jumlah pembuluh darah yang terbentuk dihitung di setiap lapangan pandang pada sediaan. Setiap sediaan memiliki 10 lapangan pandang, yaitu di setiap sisi soket dan ditengah – tengah soket.

3. Luka pasca pencabutan

Luka pasca pencabutan yang dimaksud adalah luka pada soket mandibula gigi insisivus kanan *Rattus novergicus*. Soket dipotong

dengan arah sagital labio-lingual untuk mengambil jaringan yang akan dibuat sebagai sediaan histologi.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tempat untuk memelihara hewan coba adalah 8 buah box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³ yang diisi 3 ekor tikus *Rattus norvegicus*, kawat kasa sebagai tutup box, sekam sebagai dasar box, dan air minum.

Makanan hewan coba adalah pakan hewan coba *comfeed* dan minuman hewan coba adalah air mineral yang diberikan *ad libitum*.

4.7.2 Penimbangan Berat Badan Tikus

Alat yang digunakan untuk melakukan penimbangan berat badan tikus adalah neraca Ohaus merek Sartorius.

4.7.3 Pencabutan Gigi Tikus

Alat yang digunakan untuk mencabut gigi tikus adalah *needle holder* modifikasi, lecron modifikasi, kapas, dan cawan. Bahan yang digunakan untuk pencabutan tikus adalah ketamine untuk anestesi dan akuades steril untuk irigasi.

4.7.4 Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan yang dilakukan terhadap hewan coba meliputi pemberian aquades untuk kelompok kontrol dan pemberian ekstrak *Persea americana* melalui per oral, langsung ke lambung, pemberian novalgine 500 mg/ml dengan dosis 0,3 ml *intramuscular*/hari, serta

pencabutan gigi insisivus kanan pada rahang bawah tikus. Bahan-bahan yang digunakan adalah novalgin 500 mg/ml sebagai analgesik, ketamine 0,2 ml untuk anestesi secara intraperitoneal, aquades steril untuk irigasi soket, dan alkohol 70% untuk sterilisasi pada saat pencabutan gigi tikus.

4.7.5 Pembuatan Ekstrak *Persea americana*

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak *Persea americana* adalah pisau, kertas saring, pengaduk/granul anti-bumping, wadah penyuling/still pot bypass sidearm, thimble selulosa, siphon arm inlet, siphon arm outlet, expansion adapter, pendingin/condenser, cooling water in, dan cooling water out.

Bahan untuk mengekstrak adalah pelarut etanol 96%, aquadest murni, dan daging buah alpukat yang didapatkan dari pasar Belimbing.

4.7.6 Pemberian Ekstrak *Persea americana* pada Tikus secara per oral

Alat yang digunakan untuk memberikan ekstrak *Persea americana* secara per oral adalah spuit 2,5 mL yang ujungnya diberi sonde *gastric* yang langsung menuju lambung tikus.

4.7.7 Pengambilan Sampel dan Persiapan Jaringan

Alat yang digunakan untuk mengambil sampel adalah scalpel no.11, pinset, gunting bedah, dan tabung fiksasi yang sudah diberi label.

Bahan yang digunakan adalah larutan eter dosis lethal, larutan alkohol 70% untuk sterilisasi scalpel, larutan formalin 10% untuk fiksasi, dan larutan EDTA 14% untuk dekalsifikasi.

4.7.8 Pembuatan Sediaan

Alat yang digunakan untuk membuat sediaan adalah scalpel, *rotary mikrotom*, *object glass*, *automatic tissue processor*, *freezer*, *water bath*, kotak paraffin, dan oven.

Bahan yang digunakan adalah *xylol*, alkohol konsentrasi rendah dan tinggi, paraffin cair, dan *egg albumin*.

4.7.9 Persiapan Analisis Histologi

Alat yang digunakan untuk pemeriksaan histologi adalah wadah untuk pembuangan zat warna, *object glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya, dan kamera digital untuk foto histologi.

Bahan yang digunakan adalah *ammonium/potassium alum*, *sodium iodate*, *citric acid*, dan *chloralhydrate*, alkohol absolut, alkohol 80%, alkohol 95%, larutan *xylol*, HCl, hematoksilin, air, aquades, eosin, dan balsam kanada.

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 terhadap lingkungan kandang dalam laboratorium selama 7 hari. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³, masing-masing untuk 3 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa, dan 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*

Proses Ekstraksi *Soxhlet* (Darmasih, 1997) :

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 dan dikeringkan.
19. Hasilnya berupa cairan kental.

4.8.4 Pemberian Ekstrak *Persea americana*

Pemberian ekstrak alpukat (*Persea Americana*) dilakukan sekali sehari secara per oral setelah pencabutan selama 3 dan 7 hari menggunakan spuit yang ujungnya diberi sonde *gastric* dan langsung menuju lambung. Pemberian pada kelompok perlakuan I (150 mg/Kgbb/hari ekstrak), II (300 mg/Kgbb/hari ekstrak), dan III (450 mg/Kgbb/hari ekstrak) dilakukan satu kali per hari sebanyak 1 mL.

4.8.5 Pencabutan gigi tikus

Sebelum dilakukan pencabutan gigi insisivus kanan rahang bawah, pada masing-masing tikus dilakukan ketamine 0,2 ml untuk anestesi secara intraperitoneal. Kemudian dilakukan pencabutan gigi dengan menggunakan *needle holder* yang telah dimodifikasi. Pencabutan gigi dilakukan searah dengan soket gigi dan dilakukan secara hati-hati dengan kekuatan yang sama untuk meminimalisir patahnya gigi. Lalu soket diirigasi dengan larutan aquades steril. Setelah dilakukan pencabutan dan perlakuan, hewan coba diberi makanan secukupnya dengan memperhatikan kesehatan hewan coba. Hewan coba diberi novalgin 500 mg/ml dengan dosis 0,3 ml IM/hari sebagai analgesik untuk mencegah tikus mati dini karena tidak mempengaruhi proses penyembuhan luka.

4.8.6 Perawatan *Rattus norvegicus* pasca Pencabutan Gigi

Pemberian makan hewan coba setelah pencabutan dilakukan secara per oral. Makanan hewan coba dilunakkan dan dibentuk bulatan, kemudian diberikan setiap jam makan. Pemberian minum dari air mineral secukupnya. Perawatan terhadap hewan coba dilakukan sampai hari ke-3 dan ke-7 saat dilakukan euthanasia pada hewan coba untuk pengambilan sampel.

4.8.7 Pengambilan Sampel dan Preparasi Jaringan

Pada hari ke-3 dan ke-7 pada tikus masing-masing kelompok perlakuan dikorbankan dengan larutan eter dosis lethal. Sebelum rahang bawah yang sudah dicabut gigi insisivus kanan diambil, tikus harus dipastikan sudah mati, kemudian dilakukan pengambilan

jaringan dengan menggunakan scalpel. Selanjutnya dilakukan fiksasi pada rahang bawah 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 (Syafriadi dkk, 2006) :

1. Mandibula dipotong dengan arah sagital labio-lingual pada daerah insisiv sentralis 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.
5. Kemudian melakukan pembuatan blok (*embedding*).
6. Melakukan prosedur penanaman dengan infiltrasi parafin cair pada suhu 57-59°C ke dalam kotak parafin untuk mengisi rongga dalam jaringan yang ditempati oleh air sehingga terbentuk blok parafin.

7. Mendinginkan sebentar blok parafin di dalam *freezer* agar tidak terlalu lunak, kemudian letakkan blok parafin yang sudah menempel pada pemegannya pada *rotary mikrotom* dan lakukan pemotongan tipis sesuai ketebalan yang dikehendaki.
8. Memasukkan irisan jaringan ke dalam *water bath* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$.
9. Menyeleksi dan memindahkan hasil sayatan ke atas *object glass* yang telah diolesi *egg albumin* dan diberi label.
10. Membiarkan sediaan jaringan kering dan masukkan ke dalam oven dengan suhu $58-60^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit.
11. Selanjutnya, melakukan deparafinasi dengan *xylo*l dan rehidrasi dengan alkohol (dari konsentrasi tinggi ke rendah) untuk menghilangkan *xylo*l.
12. Membilas sediaan dengan air mengalir, kemudian melakukan pengecatan.

4.8.9 Teknik Pengecatan Hematoksilin Eosin

Prosedur pembuatan *Haematoxylin* Mayer :

1. Melarutkan *Ammonium/Potassium alum* di dalam aquades.
2. *Haematoxylin* ditambahkan dan dicampurkan hingga rata.
3. Menambahkan *Sodium Iodate*, *Citric acid*, dan *Chloralhydrate*.
4. Campur dan aduk hingga semua tercampur dengan rata.
5. Dibiarkan semalam, kemudian saring dengan kertas saring.

Prosedur pembuatan *Eosin* :

1. Eosin-alkohol *stock* 1 bagian.
2. Alkohol 80% 3 bagian.

3. Dibuat sesaat sebelum digunakan dan tambahkan asam asetat glasial 0,5 ml untuk setiap 100 ml larutan, aduk hingga rata.

Prosedur pengecatan Hematoksili Eosin :

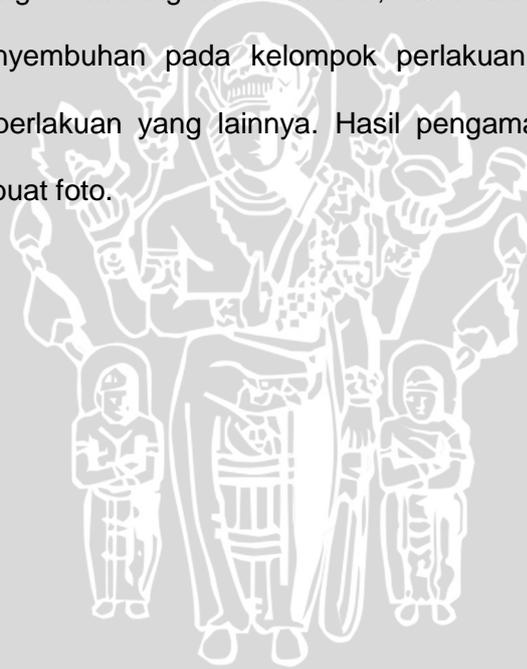
1. Preparat yang telah kering dideparafinisasi ke dalam xylol sebanyak tiga kali, masing – masing selama 2 menit.
2. Memasukkan ke dalam alkohol absolut sebanyak dua kali, masing – masing selama 1 menit.
3. Memasukkan ke dalam alkohol 95% sebanyak dua kali, masing – masing 1 menit.
4. Mencuci dengan air mengalir sampai alkohol hilang.
5. Memasukkan ke dalam larutan hematoxylin selama 15 menit.
6. Mencuci dengan air mengalir sampai tidak luntur.
7. Memasukkan ke dalam HCl dua kali untuk decolorasi.
8. Mencuci dengan air.
9. Memasukkan ke dalam larutan eosin.
10. Mencuci dengan air mengalir.
11. Memasukkan ke dalam alkohol 95% dua kali, masing – masing 1 menit.
12. Memasukkan ke dalam alkohol absolut tiga kali, masing – masing 2 menit.
13. Mencuci dengan air, tekan dengan kertas saring, dan keringkan dengan kapas.
14. Memasukkan ke dalam larutan xylol, tekan dengan kertas saring, dan keringkan dengan kapas.

15. Melakukan *mounting* dengan entellan/balsam Kanada dan *cover glass*.

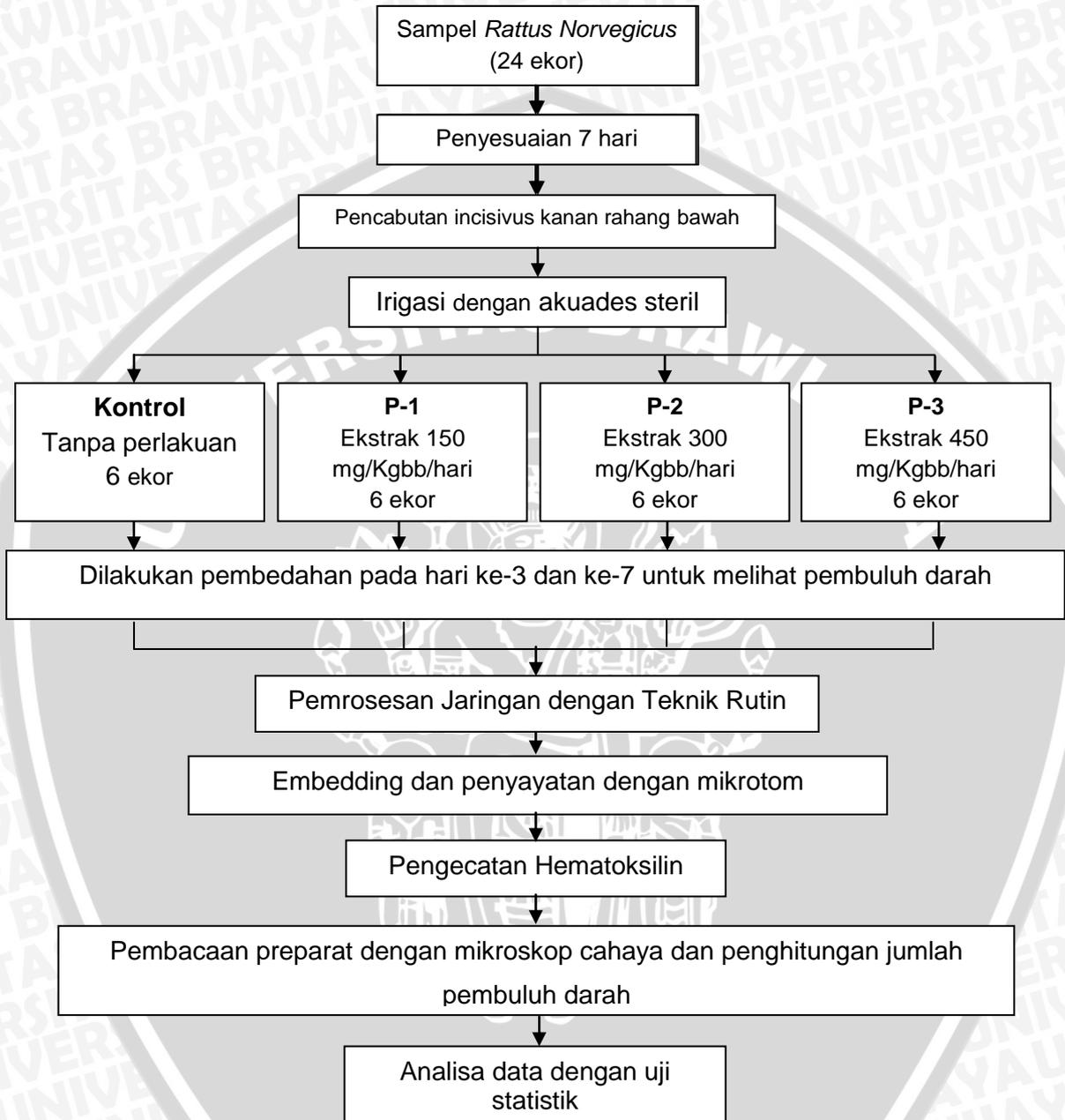
16. Memberi label dan dibiarkan hingga entellan mengering.

4.8.10 Pengamatan Sediaan Histologi Soket Mandibula *Rattus novergicus*

Pengamatan dilakukan secara histologis pada hari ke-3 dan ke-7 menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dan dilakukan penghitungan jumlah pembuluh darah baru yang terlihat pada masing – masing hari tersebut, kemudian membandingkan proses penyembuhan pada kelompok perlakuan tersebut dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Hasil pengamatan dari preparat histologi dibuat foto.



4.9 Skema Prosedur Penelitian



4.10 Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah pembuluh darah pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 14.0 for Windows 7 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 :

1. Uji normalitas data :

Bertujuan untuk mengetahui apakah suatu data memiliki distribusi normal atau tidak. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran, uji hipotesis menggunakan uji parametrik. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran, uji hipotesis menggunakan uji non parametrik.

2. Uji homogenitas varian :

Bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

3. Uji One-way ANOVA :

Bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui dua kelompok yang berbeda signifikan.

4. 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 Turke dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).

5. Uji korelasi Pearson :

Bertujuan untuk mencari hubungan antara dua variabel, yaitu variabel dependen dan variabel independen yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji Post Hoc (LSD).

