

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*) yang di kerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*.

#### 4.2 Sampel

Penelitian ini memakai sampel berupa tikus wistar jenis *Rattus norvegicus* strain wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan hewan coba dilakukan dalam kandang yang bersih dengan sekam yang diganti setiap hari. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan-ketentuan berikut:

Kriteria Inklusi:

- a. Jenis kelamin jantan.
- b. Usia 10 minggu.
- c. Berat badan 250 - 300 gram.
- d. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi:

- a. Tikus yang pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Tikus galur *Rattus norvegicus* dipilih sebagai sampel karena tikus tersebut merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang lebih cepat, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia. Selain itu, harganya pun lebih terjangkau

dibandingkan dengan menggunakan marmot (*Cavia cobaya*), serta luas penampang gingivanya lebih luas jika dibandingkan dengan mencit (*Mus musculus albinus*).

Jumlah sampel:

Pada penelitian, setiap tikus mendapatkan perlakuan berbeda dalam rongga mulut, yaitu dibagi menjadi 4 perlakuan (gel 0% kelompok kontrol, gel 50%, gel 75%, dan gel 100%). Untuk pengamatan variabel fibroblas diperlukan 2 *time series* yaitu hari ke 3 dan 7. Sehingga total tikus yang digunakan pada penelitian sejumlah:

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.

(4 perlakuan x 2 time series - 1)  $(r - 1) \geq 15$ , dan  $r$  didapatkan hasil 3,14.

Dengan jumlah tikus yang dibedah setiap harinya adalah 3 tikus sebagai replikasi. Sehingga total tikus yang digunakan adalah 4 (jumlah dosis perlakuan) x 2 (hari pengamatan) x 3 (minimal tikus yang dibedah setiap harinya 3 replikasi) = 24 tikus. Maka diperlukan sampel sejumlah 24 tikus dengan pembedahan 12 tikus setiap harinya.

Dengan dasar teori menurut Yosaphat (2012), bahwa dengan 80% gel getah batang pisang, dapat mempercepat 30-60% proses penyembuhan luka. Dosis yang digunakan untuk di uji adalah 100% gel getah pisang, yaitu ekstrak getah pisang murni tanpa bahan tambahan yang berkadar murni 100%. Berdasarkan acuan dosis yang digunakan dalam penelitian diatas, dosis yang akan digunakan adalah rentangan atas dosis 100%, dan rentangan bawah dosis 50% serta rentangan tengah yaitu 75%. Sehingga dosis yang digunakan dalam perlakuan ini adalah dosis 50%, 75% dan 100%.

#### 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% yang diberikan secara topikal yang dibagi dalam 4 kelompok:

1. Kelompok kontrol positif (P0) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi tanpa diberi gel getah batang pisang.
2. Kelompok perlakuan I (P1) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi yang diberi gel getah batang pisang dosis 50%.
3. Kelompok perlakuan II (P2) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi yang diberi gel getah batang pisang dosis 75%.
4. Kelompok perlakuan III (P3) : Tikus dengan perlakuan gingivektomi yang diberi gel getah batang pisang dosis 100%.

##### 4.3.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol terdiri dari nutrisi makanan dan minuman hewan coba, kebersihan kandang, serta umur dan jenis hewan coba.

##### 4.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah jumlah proliferasi fibroblas.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu  $\pm 2$  bulan.



#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

Perawatan tikus : bak plastik sejumlah 12 buah yang 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 serta makan tikus berupa pakan (pellet).

##### 4.5.2 Prosedur Gingivektomi

Alat : Kaca mulut, pinset, sonde halfmoon, tools tray, kuret gracey, blade holder, blade nomor 15, round diamond bur, connector bur, micromotor, handpiece low speed contra angle, pinset bedah, dipen glass, tempat antiseptik, syringe irigasi, syringe anestesi, pocket marker, petrie dish

Bahan : Handschoon, masker, obat anestesi (Ketamin 0,2 ml), cotton roll, cotton pellet, povidon iodine 3%, alkohol 70%, kasa steril, aquades, obat analgesic metampiron 0,2 ml intramucularly.

##### 4.5.3 Penghitungan Luas Penampang Luka

Alat : Jangka sorong, periodontal probe, kaca mulut.

Bahan : Kapas, Alkohol 70%.

##### 4.5.4 Pembedahan Tikus

Alat : Untuk melakukan prosedur gingivektomi, dibutuhkan kaca mulut, gunting bedah, jarum pentul, steroform, pinset, sonde halfmoon, *tools tray*, kuret gracey, *blade holder*, *blade* nomor 15, *round diamond* bur, konektor bur, mikromotor, *handpiece low speed contra angle*, pinset bedah, dipen glass, tempat antiseptik, syringe irigasi, syringe anestesi, *pocket marker*, *petrie dish*.

Bahan : *handschoon*, masker, obat anestesi (Ketamin 0,2 ml), cotton roll, cotton pellet, povidon iodine 3%, alkohol 70%, kasa steril, aquades,

Formalin 10% (Neutral Buffer Formalin), tabung organ 24 buah, obat analgesik metampiron 0,2 ml intramuskular.

#### 4.5.5 Penghitungan Jumlah Fibroblas

Alat : Preparat, slide glass, Mikroskop

Bahan : Formalin 10%, Alkohol absolut, xilol, Paraffin lunak, Paraffin keras, Haris hematoxilen, Alkohol asam, Larutan amuniun, Counter staining, Entelan.

#### 4.6 Definisi Teknis

##### 4.6.1 Getah Batang Pisang Ambon

Batang pohon pisang Ambon (*Musa Paradisiaca var sapientum*) diperoleh di desa Bringin kecamatan Turen Kabupaten Malang. Getah batang pisang diperoleh dari batang pohon pisang Ambon yang berumur sekitar 1 tahun yang diambil dengan cara memotong miring pada batang pohon pisang Ambon hingga mencapai umbi batang bagian bawah. Penebangan dilakukan pada pagi hari. Berikutnya diambil bagian hati atau bagian tengah batang. Batang inti yang didapat dipotong miring dan ditampung getahnya dalam wadah steril.

##### 4.6.2 Gel

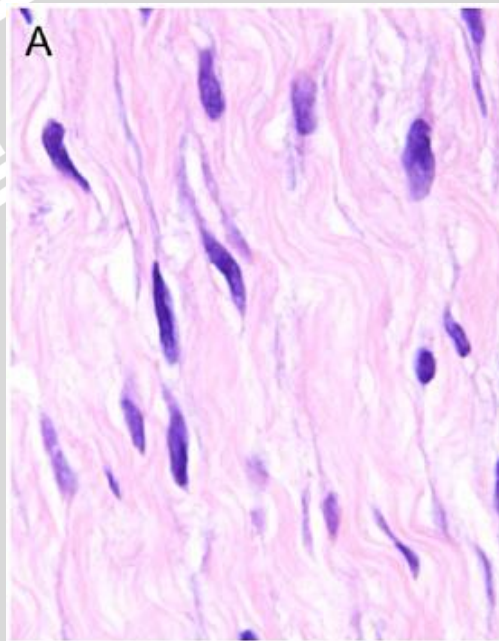
Pembuatan gel dilakukan di ruang laboratorium farmasetik FKUB dengan suhu ruang stabil. Gel yang digunakan pada penelitian merupakan campuran getah batang pisang dengan carbomer dalam 3 konsentrasi, yaitu 50%, 75%, dan 100%.

##### 4.6.3 Jumlah Fibroblas

Jumlah fibroblas dilihat rata-rata dari 10 lapang pandang dengan perbesaran 400X pada sediaan preparat sampel gingiva pasca gingivektomi



pada tikus *Rattus norvegicus*. Sediaan diambil pada hari ke 3 dan 7 pasca gingivektomi. Fibroblas yang terlihat pada preparat diambil dari gingiva tikus yang dipotong secara melintang. Pada teknik pewarnaan Hemotoksilin Eosin (HE), fibroblas akan terpulas ungu kebiruan dan menampakkan tonjolan-tonjolan sitoplasma yang tidak teratur, inti bulat telur, besar, kromatin halus, dan memiliki nukleus yang jelas (Adnan, 2010).



**Gambar 4.1 Fibroblas yang diwarnai HE (Chan, J.K.C, 2014)**

#### **4.6.4 Gingivektomi**

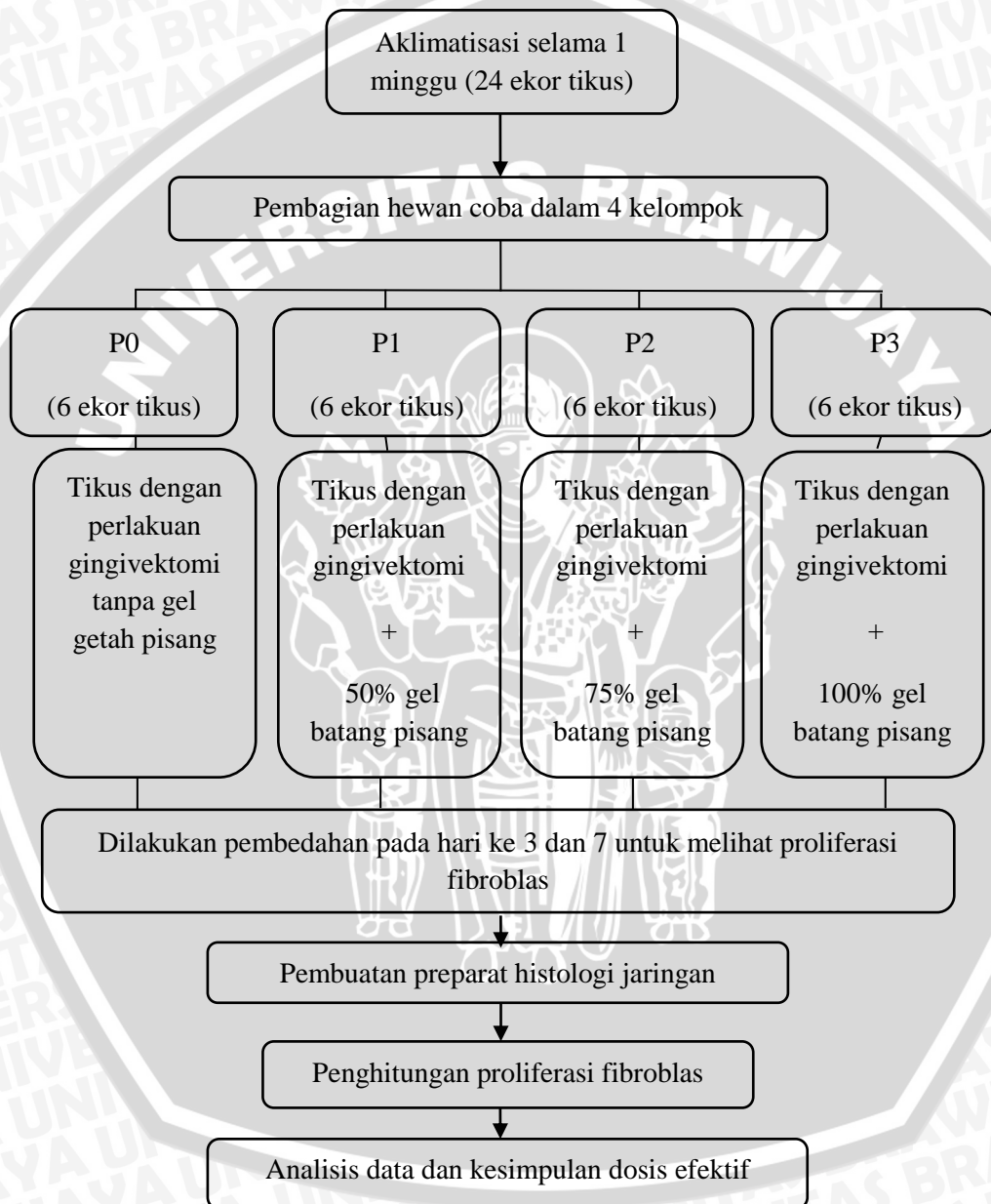
Gingivektomi yang dilakukan pada penelitian ini adalah membuat sayatan pada gingiva tikus *Rattus norvegicus* seluas 1 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,5-1 mm. Dengan tujuan membuat luka terbuka gingivektomi yang nantinya akan diaplikasikan gel getah pisang dengan berbagai dosis.

Gingivektomi akan dilakukan pada regio anterior rahang bawah dengan ketebalan 0,5-1 mm. Gingivektomi tersebut dilakukan dengan tujuan membuat luka terbuka pada gingiva yang nantinya akan diaplikasikan gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75% dan 100%. Untuk mengurangi rasa nyeri pasca

gingivektomi, hewan coba akan diberikan analgesik (metampiron 0,2 ml intramuskular).

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Alur penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian



Sediaan gel getah batang pisang ambon yang digunakan dalam penelitian dengan dosis 50%, 75%, dan 100%. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari. Kemudian, dilakukan prosedur gingivektomi pada seluruh hewan coba, pengelompokan perlakuan dan sampel, pemberian gel getah batang pisang pada masing-masing kelompok perlakuan dengan dosis 50%, 75% dan 100%.

Hewan coba dikelompokkan dalam kandang yang sudah diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Masing-masing kandang terdapat 3 ekor tikus dengan perlakuan yang sama. Kemudian, dilakukan pembedahan pada 12 hewan coba [3 tikus kelompok kontrol positif (P0), 3 tikus kelompok perlakuan I (P1), 3 tikus kelompok perlakuan II (P2) dan 3 tikus kelompok perlakuan III (P3)] pada setiap *time series* yaitu pada hari ke-3, dan hari ke-7. Selanjutnya, dilakukan pembuatan preparat, penghitungan jumlah neokapiler, analisis data, dan pembuatan kesimpulan.

#### **4.7.2 Pengambilan Getah batang pisang Ambon**

Batang pohon pisang Ambon diperoleh di desa Bringin kecamatan Turen Kabupaten Malang dan diambil dengan cara memotong miring pada batang pohon pisang Ambon hingga mencapai umbi batang bagian bawah. Penebangan dilakukan pada pagi hari. Berikutnya diambil bagian hati atau bagian tengah batang. Batang inti yang didapat dipotong miring dan ditampung getahnya dalam wadah steril.

#### **4.7.3 Pembuatan Gel Topical**

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 laboratorium farmasetik dengan suhu ruang stabil. Diawali dengan persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan. Adapun langkah pembuatan gel adalah sebagai berikut:

- a. Didihkan air dengan water heater, ketika menunggu air mendidih, timbang semua bahan 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.
- b. Setelah air mendidih masukkan sebagian air ke dalam mortar, dengan tujuan membuat mortal dalam keadaan hangat ketika digunakan untuk mengaduk gel.
- c. Pembuatan basis dengan menggunakan teknik basah, yaitu dengan memasukkan 10 tetes air panas lalu taburi carbomer perlahan-lahan sampai terdispersi seluruhnya. Setelah terdispersi secara keseluruhan, ditambahkan propilen glikol, trietanolamin, na benzoat, secara perlahan-lahan sampai homogen.
- d. Lakukan penimbangan getah batang pisang yang di sesuaikan dengan konsentrasi dosis (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).
- e. Lakukan pencampuran getah batang pisang yang telah ditimbang kedalam basis secara perlahan.

- f. Lakukan 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 di antara 2 kaca preparat lalu ditekan dan diamati homogenitasnya.
- g. Lakukan uji pH menggunakan elektroda dan pH-meter, dengan pH yang diharapkan adalah pH yang mendekati nilai normal atau netral, atau sedikit basa.
- h. 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.

#### 4.7.4 Tindakan Gingivektomi

Pembuatan luka gingivektomi pada penelitian ini dilakukan pada jaringan gingiva yang normal, sehingga tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a) Aplikasi antiseptik povidone iodine pada daerah operasi.
- b) Anestesi intraperitoneal menggunakan obat anestesi Ketamine, 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. Ketamine 0,2 ml secara intraperitoneal di bagian kuadran bawah abdomen untuk memberikan efek analgesik dan sedasi sebelum dilakukan gingivektomi.
- c) Insisi gingiva di regio anterior rahang bawah. Penggunaan alat *round diamond bur low speed* nomor 1/2.
- d) Kontrol perdarahan menggunakan kasa steril.
- e) Irigasi dengan antiseptik povidone iodine.



- f) Aplikasikan gel getah batang pisang dengan dosis 50%, 75% dan 100% pada kelompok perlakuan (P1), (P2), dan (P3). Untuk kelompok kontrol positif tidak diberikan gel getah batang pisang.
- g) Melakukan perawatan pasca gingivektomi dengan pemberian pakan yang lunak dan pemberian analgesik metampiron 0,2 ml *intra muscularly*.

#### 4.7.5 Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi Luka Gingiva

Setelah memasuki inkubasi luka, dilakukan tindakan pembedahan pengambilan jaringan gingiva tikus yang telah dilakukan prosedur gingivektomi dengan pemotongan secara melintang, menyertakan jaringan tulang agar tidak terjadi pengerutan saat pembuatan preparat. Jaringan gingiva tersebut dimasukkan ke dalam botol organ dengan formalin 10 % selama 1 hari dan diberi label penamaan. 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 cair pada suhu 42 °C-46°C selama 2 x 1 jam. Lalu blocking dengan paraffin beku pada suhu 8 °C -10°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 Harris 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 cahaya.

#### 4.7.6 Penghitungan Jumlah Fibroblas pada Luka dan Persentase Penyembuhan Luka

Penghitungan jumlah sel fibroblast dilakukan pengamatan pada daerah perlukaan sediaan mikroskopik dengan menggunakan mikroskop olympus xc 10 dan program Dot Slide dengan perbesaran 400x. Pengukuran kepadatan fibroblast dilakukan pada 10 lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel fibroblast yang berupa sel dengan tonjolan-tonjolan sitoplasma yang tidak teratur, inti bulat telur, besar, kromatin halus, memiliki nukleus yang jelas dan bersifat basofilik dan tercatat ungu pada pewarnaan HE (Adnan, 2010).

#### 4.8 Analisis Data

Hasil penghitungan jumlah fibroblas pada tikus kontrol positif 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 kompratif dan koreltif 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 signifikan.
- 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 Tuke dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p=0,05$ ).
- Uji korelasi Pearson : untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji Post Hoc (LSD).
- Uji T: bertujuan untuk membandingkan nilai antar kelompok dan mengetahui apakah nilai dari tiap dua kelompok berbeda secara signifikan.