

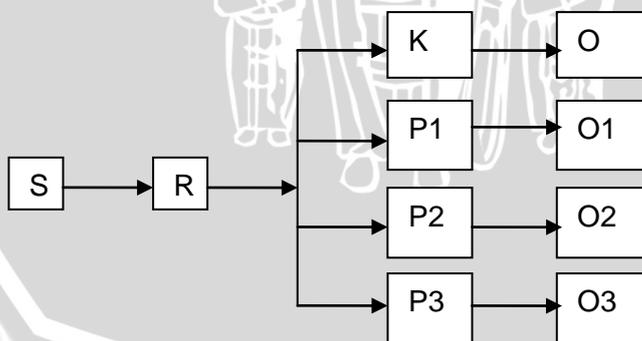
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experimental* dimana terdapat intervensi terhadap subyek penelitian. Penelitian ini dilakukan dengan desain *post test control group design* pada kelompok kontrol dan perlakuan. Pengelompokan subyek eksperimen dilakukan dengan *design* randomisasi simpleks, dimana setiap hewan coba memiliki probabilitas yang sama untuk mendapat perlakuan sehingga dapat menjaga validitas internal.

4.2 Desain Penelitian



Gambar 41 Desain penelitian *randomized post-test only control group design*

Keterangan:

- S : sampel
- R : randomisasi
- K : kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak rimpang kunyit



- P1 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 2%
- P2 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 4%
- P3 : kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 6%
- O : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan tanpa diberi gel ekstrak rimpang kunyit
- O1 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 2%
- O2 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 4%
- O3 : hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan diberi gel ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 6%

### **4.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **4.3.1 Pemilihan Sampel**

Penelitian ini menggunakan dua puluh empat ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jenis kelamin jantan, umur 2-4 bulan, berat badan rata-rata 180-250 gram. Tikus putih harus dengan tingkat kesehatan dan pergerakan yang baik. Persiapan sebelum penelitian dimulai, meliputi persiapan pemeliharaan hewan uji, yaitu, kandang, tempat makan minum, dan makanan tikus.

#### **4.3.2 Estimasi Besar Sampel**

Penelitian ini menggunakan empat kelompok, sehingga besar sampel dapat ditentukan dengan rumus (Supranto J, 2000) :

$$(np - 1) - (p - 1) \geq p^2$$

$$(4n - 1) - (4 - 1) \geq 4^2$$

$$(4n - 1) - 3 \geq 16$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Jadi dari hasil penghitungan diatas didapatkan jumlah sampel minimal adalah lima ekor tikus, untuk menghindari adanya tikus yang sakit atau mati maka pada penelitian ini digunakan sejumlah enam ekor tikus putih pada masing-masing kelompok perlakuan. Dimana kelompok I terdiri dari enam tikus putih tanpa pemberian ekstrak rimpang kunyit (kelompok kontrol), sedangkan kelompok II-IV terdiri dari masing-masing enam ekor tikus putih tiap kelompok dengan pemberian dosis yang berbeda setiap kelompoknya.

#### 4.3.3 Kriteria Sampel

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah :

1. Jenis kelamin tikus jantan
2. Berat badan tikus 180-250 gram
3. Umur tikus 2-4 bulan
4. Galur tikus wistar
5. Kondisi tikus sehat dan bebas penyakit, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, bulu yang tebal, bewarna putih mengkilap.

Kriteria eksekusi dalam penelitian ini adalah tikus yang sakit atau mati selama penelitian berlangsung.

#### 4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Gel ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn.).
2. Variabel terikat: Jumlah osteoblas
3. Variabel kontrol:
  - a. Pakan hewan coba.
  - b. Kesehatan hewan coba.
  - c. Lingkungan kandang (suhu, kelembaban, intensitas cahaya).

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### 4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama empat bulan pada tahun 2015

##### 4.5.3 Alat dan Bahan Penelitian

Tentunya sebelum melakukan penelitian pada setiap prosedur digunakan masker dan sarung tangan.

##### 4.5.3.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian adalah *Electric blender*, evaporator, kandang hewan coba berukuran 15 x 30 x 42 cm<sup>2</sup> dengan penutup box berupa kawat kasa serta sekam sebagai alas box. , tempat makanan dan minuman serta ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung, lecron dan *needle holder modifikasi* , *syringe*, sonde gastrik, *scalpel* No. 11, toples kaca

yang sudah diberi label untuk fiksasi, mikroskop Olympus photo slide BX51 dengan kamera DP71 12 MP, mikroskop cahaya, kamera digital.

#### 4.5.3.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa linn.*), etanol, sebagai pelarut, makanan hewan coba berupa *comfeed*, minuman berupa air putih (PDAM), anastesi ketamin 40 ml/Kg/BB, anastesi ketamin 60 ml/Kg/BB, obat analgesik Novalgin 500 mg/ml dengan dosis 0,3 ml, larutan eter dosis lethal, larutan alkohol 70%, larutan formalin 10% untuk fiksasi jaringan, alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%, larutan xylol/ xylene, parafin, larutan Hematoksilin dan Eosin untuk pengecatan, air dan aquades, kapas dan kassa steril, *cover glass* dan *object glass*, rotari mikrotom, wadah plastik, gelas ukur.

#### 4.6 Definisi Operasional

##### 4.6.1 Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa linn.*)

Rimpang kunyit pada penelitian ini adalah rimpang kunyit yang diolah menjadi simplisia (serbuk) rimpang kunyit dengan di lakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarutnya. Rimpang kunyit yang dibeli dari pemasok kunyit di kota Batu yang telah di sertifikasi oleh Materia Medika Batu. Kunyit yang sudah menjadi ekstrak kental kemudian dibuat menjadi berbagai konsentrasi yakni 2%, 4%, dan 6%. Lalu diolah menjadi gel dengan pemberian basis gel berupa karbomer.

##### 4.6.2 Jumlah Sel Osteoblas

Jumlah sel osteoblas adalah jumlah sel yang dilihat pada mikroskopis dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin yang berbentuk kuboid atau pipih dengan inti tunggal berwarna ungu atau biru. Jumlah osteoblas akan

dihitung dari 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x menggunakan mikroskop mikrofoto Olympus dan kemudian dihitung rata-ratanya.

#### 4.6.3 Pencabutan Gigi

Pencabutan gigi merupakan proses pengeluaran gigi yang melibatkan satu gigi utuh atau akar gigi dari tulang alveolar dengan menggunakan *lecron* dan *needle holder* modifikasi. Pencabutan dilakukan pada gigi insisivus kanan rahang bawah dan sebelumnya diberikan general anestesi menggunakan ketamin.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* Linn.)

Prosedur pembuatan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn.):

- 1) Kunyit yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit yang dibeli dari pemasok kunyit yang ada dipasar.
- 2) Kunyit dibersihkan dengan cara dicuci dengan air.
- 3) Kunyit dipotong kecil dan tipis, kemudian keringkan dengan dijemur sinar matahari sampai kering/ dikeringkan menggunakan *oven*.
- 4) Kunyit yang sudah kering dihaluskan untuk dibuat serbuk menggunakan mesin pengiling setelah jadi dalam bentuk bubuk kemudian di lakukan tahap ekstraksi dengan metode *maserasi*.
- 5) Serbuk kunyit (*simplisia*) yang didapatkan dari rimpang kunyit, dimasukkan ke dalam wadah, setelah itu ditambahkan pelarut *etanol* (alkohol 96%) dengan perbandingan 10 : 1.
- 6) Kemudian direndam selama 24 jam dengan melakukan pengadukan secara berkala.

- 7) Setelah itu dilakukan penampungan *filtrat*
- 8) Ampas yang didapatkan dari penyaringan kemudian direndam kembali dengan menggunakan *etanol* 96%. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 9) Setelah *filtrat* didapatkan maka dilakukanlah *evaporasi* dengan menggunakan evaporator hingga dihasilkan ekstrak semi padat *etanol* rimpang kunyit.
- 10) Kemudian keringkan dalam kompor bersuhu  $\pm 40^{\circ}$  C hingga didapatkan ekstrak kental *etanol* rimpang kunyit.

#### 4.7.1.1 Pembuatan Gel Ekstrak Rimpang Kunyit

1. Mempersiapkan alat dan bahan pembuatan gel yaitu air, gliserin, metal paraben, karbomer, dan ekstrak rimpang kunyit.
2. Rebus air hingga suhu  $70^{\circ}\text{C}$ .
3. Masukkan air ke dalam mortal sebanyak 30 ml.
4. Kemudian masukkan karbomer ke dalam mortal.
5. Tunggu 15 menit hingga karbomer larut dengan air, lalu aduk merata.
6. Setelah rata, tambahkan metal paraben lalu aduk kembali.
7. Apabila kurang kental dapat ditambahkan gliserin.
8. Letakkan masing- masing ekstrak rimpang kunyit 2%, 4%, dan 6% pada timbangan Ohaus.
9. Masukkan basis gel karbomer ke dalam masing-masing ekstrak rimpang kunyit konsentrasi 2%, 4%, dan 6%.
10. Aduk rata hingga semua tercampur.

#### 4.7.1.2 Dosis Gel Ekstrak Rimpang Kunyit

- a. Konsentrasi 2% merupakan campuran antara ekstrak rimpang kunyit 2% dengan bahan dasar karbomer 1,5%.
- b. Konsentrasi 4% merupakan campuran antara ekstrak rimpang kunyit 4% dengan bahan dasar karbomer 1,5%.
- c. Konsentrasi 6% merupakan campuran antara ekstrak rimpang kunyit 6% dengan bahan dasar karbomer 1,5%.

#### 4.7.2 Pemilihan hewan coba

Hewan coba yang dipilih adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus putih jantan galur wistar sesuai dengan kriteria sampel sebanyak 24 ekor dengan usia antara 2-4 bulan dengan berat badan 180-250 gram.

#### 4.7.3 Perawatan hewan coba

Kandang hewan coba berukuran 15 x 30 x 42 cm<sup>2</sup> dengan 1 kandang berisi 2 ekor tikus putih, dengan penutup box berupa kawat kasa serta sekam sebagai alas box. Tikus diadaptasikan selama 1 minggu dan diberi makanan berupa *comfeed* serta minuman air putih (PDAM) diletakkan dalam tempat makanan dan minuman serta ditempatkan dalam ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung.

#### 4.7.4 Proses pencabutan gigi tikus

Gigi tikus yang akan dicabut adalah gigi incisivus kanan rahang bawah, ditinjau dari teknik dan resistensi minimalnya terhadap komplikasi. Sebelum dilakukan anastesi, daerah operasi disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%. Kemudian tikus diberi larutan general anastesi ketamin 40 ml/Kg/BB secara *intraperitoneal* terlebih dahulu. Kemudian dilakukan pencabutan gigi dengan menggunakan *lecron* dan *needle holder modifikasi* yang sudah disterilisasi terlebih dahulu, *lecron* modifikasi dimasukkan ke soket dan digunakan untuk merusak stabilitas jaringan periodontal gigi tikus, kemudian menggunakan *needle holder* modifikasi untuk mengambil gigi dari dalam soket, dilakukan dengan gerakan searah dengan soket gigi dan dilakukan secara hati-hati dengan kekuatan yang sama untuk meminimalisir patahnya gigi. Kemudian perdarahan di kontrol menggunakan kasa steril dan daerah luka pada soket gigi dibersihkan dengan aquades untuk menghilangkan debris dan sisa-sisa pencabutan gigi.

#### 4.7.5 Proses pemberian gel ekstrak *Curcuma longa* Linn.

Pemberian gel ekstrak rimpang kunyit setelah dilakukan pencabutan gigi dengan menggunakan *syringe* pada 4 kelompok yang berbeda, dengan rincian:

- 1) Kelompok I terdiri dari 6 ekor *rattus norvegicus* tanpa pemberian gel ekstrak rimpang kunyit.
- 2) Kelompok II terdiri dari 6 ekor *rattus norvegicus* diberikan konsentrasi 2% gel ekstrak rimpang kunyit.
- 3) Kelompok III terdiri dari 6 ekor *rattus norvegicus* diberikan konsentrasi 4% gel ekstrak rimpang kunyit.
- 4) Kelompok IV terdiri dari 6 ekor *rattus norvegicus* diberikan konsentrasi 6% gel ekstrak rimpang kunyit.

Setelah pemberian gel ekstrak rimpang kunyit selesai, tikus dirawat dengan diberi makan dan minum seperti biasa untuk menjaga agar tikus tetap dalam keadaan sehat.

#### 4.7.6 Perawatan hewan coba pasca ekstraksi gigi

Untuk mencegah infeksi yang terjadi pada soket mandibula *Rattus norvegicus*, maka selama 1 hari pasca ekstraksi, tikus diberi obat analgesik. Obat yang digunakan adalah Novalgin 500 mg/kg/BB dengan dosis 0,3 ml IM 1 kali selama 1 hari. Perawatan berupa pemberian makan dilakukan setelah pencabutan gigi agar tikus tetap sehat setelah pemberian perlakuan. Untuk menghindari gangguan penyembuhan luka akibat pemberian makan, maka dilakukan pengenceran makanan dan pemberiannya melalui sonde gastrik yang dilewatkan melalui mulut tikus yang nantinya makanan dapat langsung masuk menuju lambung. Hal tersebut dilakukan secara rutin pagi dan sore hari. Selain itu pemberian minum secukupnya dengan air putih (PDAM) juga perlu dilakukan.

#### 4.7.7 Pengambilan Sampel

Tikus dikorbankan dengan menggunakan larutan eter dosis lethal sampai hewan coba dipastikan tidak bernyawa lagi. Sebelumnya, tikus ditidurkan dengan larutan general anestesi ketamin 60 ml/Kg/BB agar tikus tidak kaget saat dikorbankan. Selanjutnya semua kelompok baik kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan pemotongan rahang bawah dilakukan dengan menggunakan *scalpel* No. 11 dan dilakukan pemotongan rahang bawahnya dimana sudah terdapat gigi yang sudah dicabut sebelumnya. Mandibula tikus yang sudah diambil nantinya dimasukkan ke dalam toples kaca yang sudah diberi label sesuai kelompoknya. Tidak lupa dengan memandang etik yang ada mengenai hewan coba, maka

setelah dilakukan pengambilan, hewan coba dikuburkan dengan layak oleh pihak Laboratorium Faal dengan kedalaman 40 cm.

#### **4.7.8 Pembuatan Sediaan Histologis**

Pada tahap ini karena jaringan berupa tulang maka dilakukan pelunakkan jaringan tulang terlebih dahulu dengan menggunakan larutan dekalsifikasi.

##### **4.7.8.1 Bahan**

##### **4.7.8.2 Bahan Dekalsifikasi**

Cairan Onkalek ( HCL 36%, Gliserin, Formalin 40%, Alkohol 70%)

##### **4.7.8.3 Pemrosesan Jaringan dengan Teknik Rutin**

Pemrosesan jaringan menggunakan bahan-bahan sebagai berikut yakni formalin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%+Prusi, xylol, parafin cair (56-60 °C), gliserin, air, mayer albumin (putih telur) atau polisin, dan cat. Dilakukan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan.

##### **4.7.8.4 Bahan Pengecatan Hematoksilin Eosin**

Bahan yang digunakan untuk pengecatan HE adalah Xylol, Alkohol absolut, Alkohol 95%, Air, Mayer hematoksilin, Eosin.

##### **4.7.8.5 Prosedur**

##### **4.7.8.6 Prosedur Pemrosesan Jaringan dengan Teknik Rutin**

Melakukan dekalsifikasi selama lima hari dengan cara merendam jaringan tulang pada cairan onkalek. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, *clearing* dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan ke dalam larutan seperti dibawah ini sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Tahapan Prosedur Pemrosesan Dengan Teknik Jaringan Rutin

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin	2 jam	Fiksasi
2	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5	Alkohol 96%+Prusi	2 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 96%+Prusi	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 96%+Prusi	2 jam	Dehidrasi
8	Xylol	1 jam	<i>Clearing</i>
9	Xylol	2 jam	<i>Clearing</i>
10	Xylol	2 jam	<i>Clearing</i>
11	Parafin cair (58- 60 °C)	2 jam	Impregnasi
12	Parafin cair (58- 60 °C)	2 jam	Impregnasi

Tabel 4.1 : Tahapan Pemrosesan

Kemudian dilakukan *embedding* dan penyayatan jaringan dengan mikrotom dengan tata urutan sebagai berikut:

1. Alat cetak yang berbentuk logam berbentuk siku-siku disusun diatas permukaan kaca yang telah diolesi gliserin. Penggunaan gliserin ini untuk mempermudah pemisahan alat cetak dari blok parafin yang sudah beku.

2. 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.
3. Parafin cair pada tempat pertama dituangkan kedalam alat cetak hingga penuh ke permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dengan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
4. Alat cetak dilepas bila parafin sudah cukup keras, lalu blok jaringan diberikan label dan siap disayat.
5. 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 melekar erat.
6. Pisau mikrotom dipasang pada pegangan mikrotom membentuk sudut 5-10°. Pisau harus selalu tajam dan permukaannya rata benar.
7. *Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh parafin (48°C)
8. Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki umumnya 4-8 mikron.
9. Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan ke dalam *water bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.

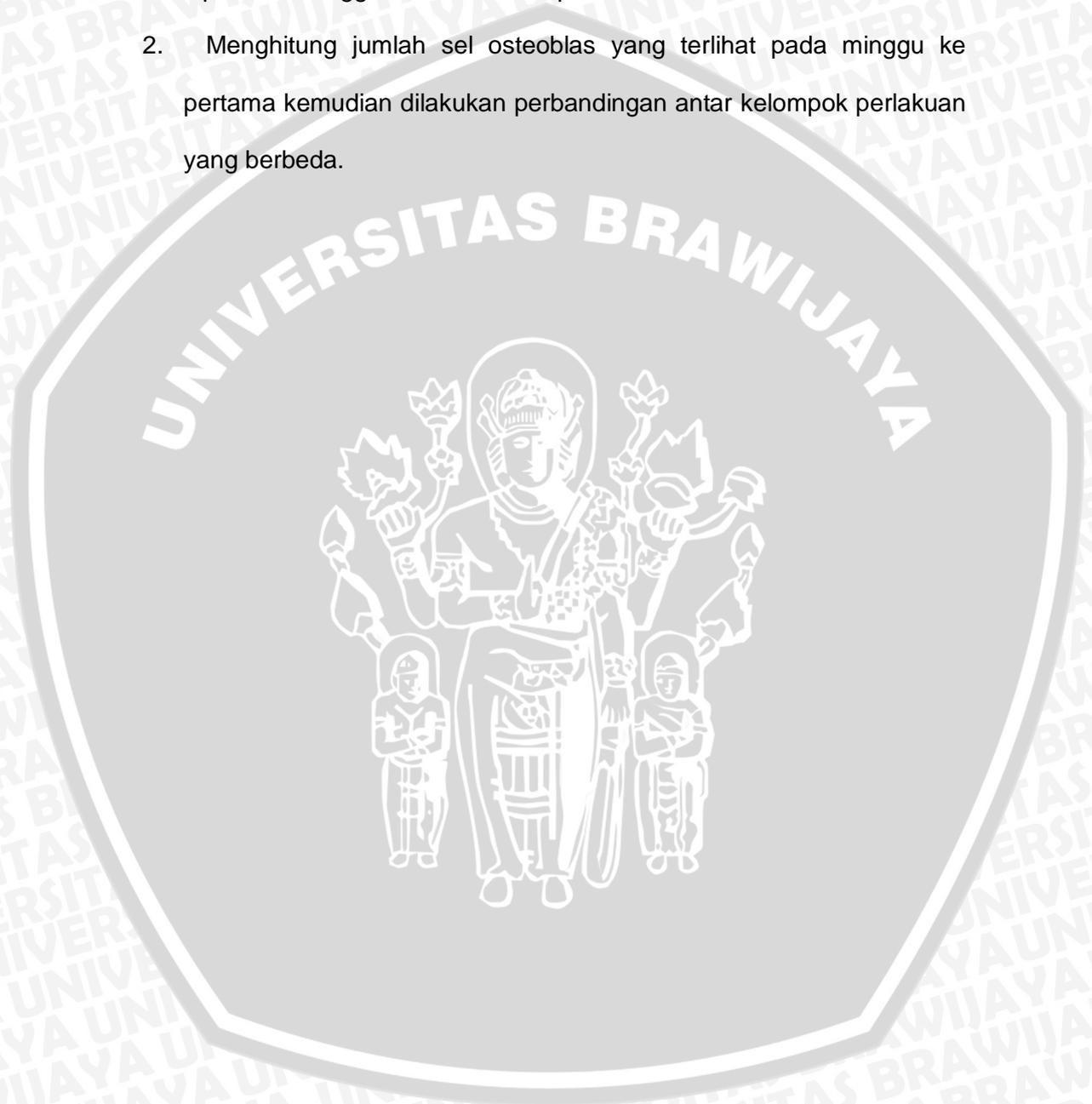
10. Sayatan di seleksi dan dipindahkan ke atas meja objek dengan telah diolesi dengan mayer albumin (putih telur) atau polisin sebagai bahan perekatnya dan sudah di beri label pada blok.
11. Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu optimum (5860°C) selama 30 menit, dan sediaan siap dicat.

#### 4.7.8.7 Prosedur Pengecatan Hematoksilin Eosin

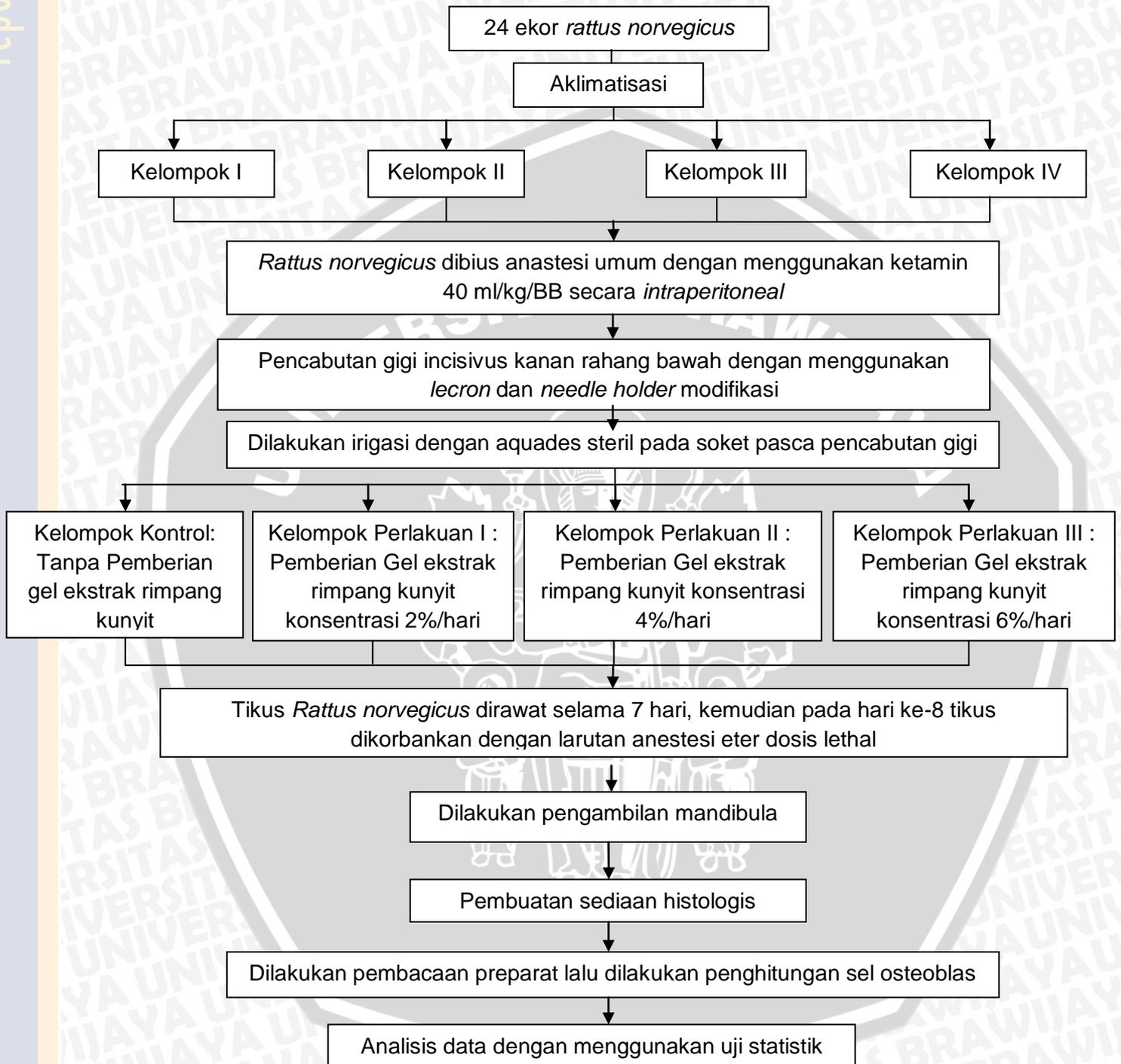
1. Sediaan dicelupkan dalam larutan xylol bak 1 selama 2 menit.
2. Pindahkan dalam larutan xylol II selama 2 menit.
3. Dalam alkohol absolut 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit.
4. Dalam alkohol 95% 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit.
5. Cuci dalam alir mengalir selama 10 menit.
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 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 2 menit.
11. Terakhir dalam xylol bak I dan bak II, masing-masing 2 menit.
12. *Mounting*

#### 4.7.8.8 **Prosedur Pemeriksaan Sediaan Histologis Tulang Mandibula**

1. Slide tulang mandibula hasil pewarnaan Hematoksin Eosin diperiksa menggunakan mikroskop.
2. Menghitung jumlah sel osteoblas yang terlihat pada minggu ke pertama kemudian dilakukan perbandingan antar kelompok perlakuan yang berbeda.



4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Analisa Data

Pengelolaan data dilakukan dengan bantuan komputerisasi. Analisis data yang digunakan pertama kali adalah Uji normalitas data, Uji normalitas data berguna untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak normal. Kemudian selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian, tujuannya untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Uji *One-way* ANOVA tujuannya untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara bermakna atau tidak. Kemudian apabila hasil yang didapat bermakna, maka dilanjutkan dengan *Post Hoc test Multiple Comparison Equal Variance* by Tukey. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ). Kemudian terakhir dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan, yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji Post Hoc (Tukey) (Dahlan, 2004).