

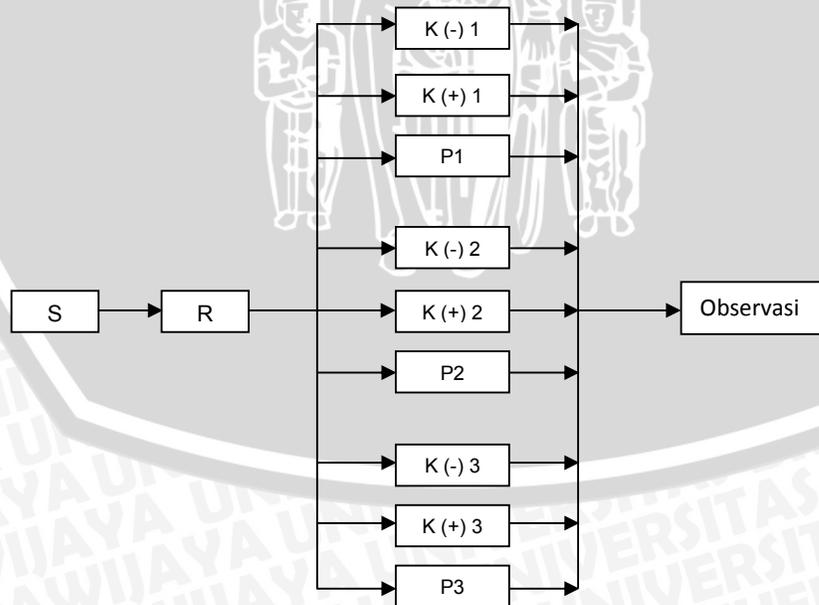
BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Dipilih jenis ini karena baik sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur, dan pengaruh perlakuan lebih dapat dipercaya. Dalam penelitian ini menggunakan *True Experimental* (eksperimental yang murni) di kerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan desain penelitian menggunakan rancangan *Post Test Only Randomized Control Group Design* (rancangan seara acak dengan tes akhir dan kelompok kontrol).

4.2 Desain Penelitian

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik "*Simple Random Sampling*" kemudian ditempatkan dalam 3 kelompok penelitian, yaitu:



Gambar 4.1. Desain penelitian *randomized post-test only control group design*

Keterangan:

- S = Sampel
- R = Random
- K (-) 1 = Kelompok kontrol negatif 1, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi dan tidak diberi perlakuan selama 3 hari.
- K (+) 1 = Kelompok kontrol positif 1, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan *triamcinoloe acetonide* 0,1% *dental paste* 2x sehari selama 3 hari.
- P 1 = Kelompok perlakuan 1, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) 10% 2x sehari selama 3 hari.
- K (-) 2 = Kelompok kontrol negatif 2, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi dan tidak diberi perlakuan selama 5 hari.
- K (+) 2 = Kelompok kontrol positif 2, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan *triamcinoloe acetonide* 0,1% *dental paste* 2x sehari selama 5 hari.
- P 2 = Kelompok perlakuan 2, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) 10% 2x sehari selama 5 hari.
- K (-) 3 = Kelompok kontrol negatif 3, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi dan tidak diberi perlakuan selama 7 hari.
- K (+) 3 = Kelompok kontrol positif 3, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan *triamcinoloe acetonide* 0,1% *dental paste* 2x sehari selama 7 hari.
- P 3 = Kelompok perlakuan 3, tikus putih yang mukosanya telah diulcerasi, aplikasikan gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) 10% 2x sehari selama 7 hari.

4.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang berumur 3 bulan dengan berat 180-200 gram. Jumlah tikus putih tiap kelompok menggunakan rumus Federer, 1963 adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

t : jumlah kelompok

n : jumlah pengulangan penelitian

Pada penelitian ini, $t=3$, sehingga jumlah tikus putih tiap kelompok adalah:

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Pada penelitian ini digunakan minimal 9 kali pengulangan penelitian. Penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 27 ekor tikus putih. Untuk mengurangi lost of sample ditengah-tengah penelitian, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih. Jadi, akan ada 10 tikus putih pada setiap kelompok perlakuan.

Kriteria Inklusi:

- 1) Tikus putih galur Wistar keturunan murni
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 3 bulan
- 4) Berat badan 180-200gram
- 5) Belum pernah digunakan untuk penelitian
- 6) Kesehatan umum baik

Kriteria Eksklusi:

- 1) Tidak bergerak aktif
- 2) Tikus mati selama perlakuan berlangsung
- 3) Terlihat tanda-tanda infeksi disekitar luka

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel penelitian ini adalah gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill)

4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah fibroblas.

4.4.3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi:

- 1) Genetik tikus
- 2) Jenis kelamin tikus
- 3) Umur tikus
- 4) Berat badan tikus
- 5) Makan dan minuman yang dikonsumsi tikus
- 6) Kemungkinan adanya infeksi
- 7) Aplikasi gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill)

4.5. Definisi Operasional

1. Gel Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) adalah sediaan gel yang didapat dengan mengekstrak biji alpukat yang diperoleh secara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak biji alpukat setelah diencerkan dengan akuades hingga mencapai konsentrasi 10%. Gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dibuat dengan cara ekstrak

biji alpukat dicampur dengan Na-CMC sebagai *gelling agent*. Biji alpukat diperoleh dan diidentifikasi oleh UPT Materia Medika di daerah Batu Jawa Timur.

2. Ulcerasi

Ulkus mukosa *oral* adalah peradangan mukosa mulut yang ditandai dengan lesi berupa bercak putih kekuningan, bentuk bulat atau oval, dengan diameter antara 2-3 mm, dan dikelilingi oleh pinggiran yang kemerahan. Pada penelitian ini lesi dibuat dengan menempelkan *semen stopper* yang telah dipanaskan dengan spiritus burner ke mukosa labial tikus dengan kedalaman mencapai sepertiga *semen stopper* selama 2 detik.

3. Jumlah Fibroblas

Penghitungan jumlah fibroblas pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulkus pada hari ke 3,5,7 pasca *ulcerasi* dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Kemudian dilihat secara histology pada lima lapang pandang dengan menggunakan software OlyVIA (*Olympus Viewer for Imagine Applications*) dengan pembesaran 20 kali. Fibroblas merupakan sel gepeng, bercabang-cabang langsing, yang dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform, inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran inti halus berwarna biru keunguan.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus-November 2015.

4.7. Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

4.7.1. Bahan dan Alat untuk Ulserasi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200gram, semen stopper, spiritus burner, cotton buds, masker dan sarung tangan.

4.7.2. Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Biji buah alpukat, pisau, kain berwarna gelap, blender, kertas saring (pengayak), etanol 70%, dan akuades

4.7.3. Bahan dan Alat untuk Pembuatan Gel Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Bejana, propilenglikol, Na-CMC, air panas, tube, masker dan sarung tangan.

4.7.4. Bahan dan Alat Perlakuan

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3bulan dengan berat 180-200 gram dan terdapat ulkus pada mukosanya.
- 2) Gel ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill). Biji alpukat dari buah alpukat hijau panjang berbentuk pear kecil, dan beratnya berkisar 170 gr-350 gr . Biji alpukat diperoleh dan diidentifikasi oleh UPT Materia Medika di daerah Batu Jawa Timur.
- 3) *Triamcinolone acetonide* 0,1% dental paste
- 4) Cotton buds
- 5) Masker
- 6) Sarung tangan

4.7.5. Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Ether, scalpel, microtom, kaca obyek dan penutup, Blok Paraffin, *waterbath*, tempat pewarnaan dan cucian, kertas saring, timer, formalin 10%, *acetone*, *xylol*, kuas kecil, gelatin, alkohol 96%, Pewarna *Hematoxylin* dan *Eosin*, *Lithium carbonat*.

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. *Ulcerasi* pada Mukosa Ora/Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Penelitian ini memakai 30 ekor tikus wistar jantan umur 3 bulan yang dibagi dalam kelompok kontrol negatif (10 ekor), kelompok kontrol positif (10 ekor), kelompok perlakuan (10 ekor), kemudian diberikan masa adaptasi pada ketiga kelompok selama 7 hari. Setelah masa adaptasi dan randomisasi, mukosa oral tikus putih dianestesi dengan *chlorethil* kemudian diinduksi dengan *semen stopper* yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus sampai warna *semen stopper* berubah merah, dengan kedalaman $\pm 2-3$ mm selama 2 detik. Kemudian tikus dimasukkan ke kandang sesuai kelompok :

- a. Kelompok kontrol negatif K(-)
- b. Kelompok kontrol positif K(+)
- c. Kelompok perlakuan K(P)

4.8.2. Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Biji alpukat dicuci dengan air hingga bersih. Setelah dicuci, biji buah alpukat dikeringkan di panas matahari selama 3 hari dibawah kain berwarna hitam agar kandungan aktif di dalamnya tidak rusak. Kemudian biji buah alpukat (inti) dikeluarkan dari kulit biji. Biji buah alpukat (inti) dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang dan diambil sebanyak 200 gram. Kemudian biji alpukat dihaluskan dengan cara blender lalu diayak. Biji buah alpukat tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 600 ml etanol 70%. Tabung erlenmeyer ditutup rapat dan dikocok perlahan. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter.

Hasil filtrat selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak etanol biji buah alpukat dengan menggunakan alat evaporator. Filtrat dievaporasi dengan pengurangan tekanan pada suhu yang diatur sesuai dengan titik didih etanol hingga semua pelarut terpisah. Kemudian akan didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan, yaitu ekstrak etanol biji buah alpukat dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol. Untuk mendapatkan konsentrasi 10% maka 0,1 ml ekstrak etanol biji alpukat 100% ditambah dengan 0,9 ml akuades.

4.8.3. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Ekstrak dengan konsentrasi 10% dilarutkan dalam sebagian air yang telah dipanaskan pada suhu 50°C. Ditambah Na-CMC 1,25gram dan diaduk hingga homogen. Ditambahkan gliserin, propilenglikol dan air dengan pengadukan secara terus menerus hingga terbentuk gel. Gel yang telah

terbentuk kemudian disimpan pada suhu ruangan selama 24 jam (Hamzah, 2008).

4.8.4. Pengaplikasian Gel Ekstrak Biji Alpukat dengan *Triamcinolone Acetonide* 0,1% dental paste

Pada hari pertama setelah diulserasi, pada kelompok kontrol positif diberi perlakuan dengan pengaplikasian *triamcinolone acetonide* 0,1% dental paste pada luka ulkus selama 2 kali sehari. Pada kelompok perlakuan, dilakukan aplikasi gel ekstrak biji buah alpukat pada luka ulkus selama 2 kali sehari. Pada kelompok kontrol negatif, ulkus pada tikus tidak diberi perlakuan. Aplikasi gel dilakukan sampai hari ke tujuh. Pada hari ketiga, kelima dan ketujuh, masing-masing ada 3 tikus yang dikorbankan tiap kelompok, kemudian diambil jaringan sekitar lesi untuk pembuatan preparat.

4.8.5. Pembuatan Preparat

1. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Gross atau sampel jaringan hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) semalam
2. Untuk jaringan keras (tulang, gigi) jaringan dilakukan dekalsifikasi (pengembukan) 15 sampai dengan 20 hari menggunakan EDTA
3. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
4. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mm
5. Di masukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross penelitian
6. Dicuci dengan air mengalir sebelum di lakukan proses jaringan atau dimasukkan ke alat Tissue Tex Prosesor

7. Di proses menggunakan alat mesin Automatis Tissue Tex Prosesor
(*automatic proccesing*)
8. Alarm bunyi tanda selesai

2. Prosedur Pengeblokan dan Pematangan Jaringan

1. Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan menggunakan *Microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron

3. Proses Deparafinisasi

Setelah disayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron ditaruh di oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan *syol* masing-masing 20 menit, setelah itu di masukkan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

4. Proses Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* atau *Auto Stanning*

1. Cat utama Harris Hematoksin selama 10-15 menit
2. Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
3. Alkohol asam 1% 2-5 celup
4. Amonia air 3-5 celup
5. Cat pembanding

Eosin 1% selama 10-15 menit

Dehidrasi :

- a. Alkohol 70% selama 3 menit
- b. Alkohol 80% selama 3 menit

- c. Alkohol 96% selama 3 menit
- d. Alkohol absolut selama 3 menit

Penjernihan (*Clearing*) :

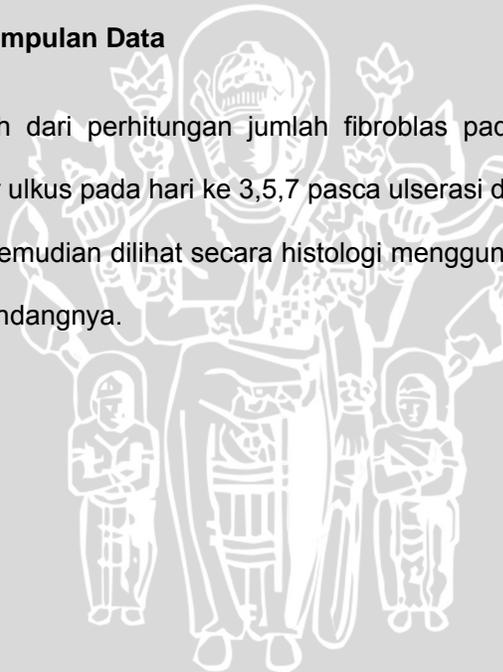
- a. *Xylo* selama 60 menit
- b. *Xylo* selama 60 menit

***Mounting* dengan entelan dan *coverglass* :**

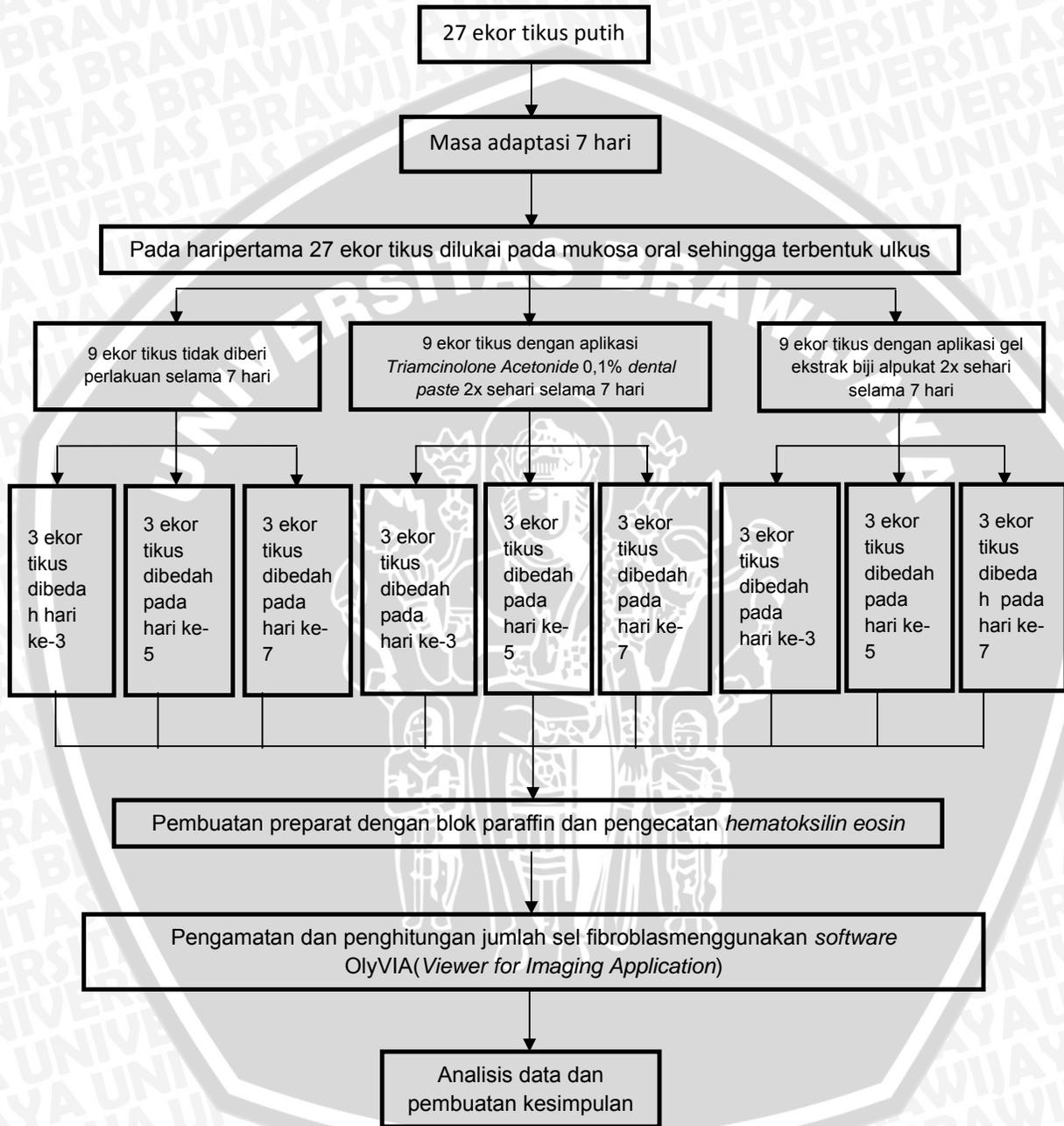
Biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering, slide siap untuk diamati.

4.9. Prosedur Pengumpulan Data

Data diperoleh dari perhitungan jumlah fibroblas pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulkus pada hari ke 3,5,7 pasca ulserasi dengan pewarnaan *hematoxylin–eosin*. Kemudian dilihat secara histologi menggunakan pembesaran 20 kali tiap lapang pandangnya.



4.10. Kerangka Operasional Penelitian



4.11. Analisa Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisa secara statistik. Analisis data yang dilakukan adalah uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal (sampel ≤ 50) dan uji homogenitas menggunakan *Levene's Test* untuk menguji apakah ragam dari populasi-populasi tersebut sama. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (signifikansi $>0,05$) dan homogenitas ragam terpenuhi ($p>0,05$), maka digunakan uji One Way Anova bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel fibroblas antar kelompok tanpa perlakuan, aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% *dental pastedan* aplikasi gel ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) pada proses penyembuhan ulkus mukosa *oral* tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas.

Apabila data tidak homogen maka digunakan uji Kruskal Wallis. Selanjutnya dilakukan uji post hoc Tukey sebagai lanjutan One Way Anova atau uji Mann Whitney sebagai uji lanjutan Kruskal Wallis. Selanjutnya dilakukan uji Korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan variable-variable yang terlibat Lalu uji Regresi. Dilakukan uji korelasi Pearson jika data berdistribusi normal dan Spearman jika data berdistribusi tidak normal.