

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan eksperimental laboratoris *in vivo* pada tikus putih wistar (*Ratus Norvegicus*)jantan dengan rancangan *post test only control group design*.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih wistar (*Ratus Norvegicus*).

2. Sampel

Perhitungan sampel pada penelitian ini menggunakan rumus Federer yang di dapatkan hasil jumlah tikus menjadi 9 ekor tikus yang dibagi dalam 3 kelompok yaitu 3 tikus kontrol positif, 3 tikus kontrol negatif, dan 3 tikus kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan 36 ekor tikus sebagai populasi yang dibagi dalam 4 kali pengambilan sampel.

C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Karakteristik umum dari keadaan tikus yang sehat dan aktif.
- b. Tikus wistar jantan berumur 2-3bulan.

c. Berat badan tikus putih 200-250 gram dan berat badan tidak boleh terpaut jauh.

2. Kriteria Eksklusi

a. Berat badan tikus yang mempunyai perbedaan terlalu jauh.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

a. Tempat

Pada hewan uji ini dilakukan di laboratorium farmakologi dan laboratorium hewan uji di FKIK UMY.

Pembuatan bahan ekstrak gel biji jintan hitam (*Nigella sativa* seeds) dilakukan di laboratorium LPPT Unit 1 UGM.

b. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai bulan Januari 2017

E. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

Gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*).

2. Variabel terpengaruh

Jumlah sel fibroblas pada perlukaan gingiva tikus wistar.

3. Variabel terkontrol

a. Galur tikus : Tikus wistar

b. Umur tikus : 2-3 bulan

- c. Jenis kelamin : jantan
 - d. Berat badan tikus : 200-250 gram
 - e. Makanan tikus : pellet tipe broiler-11 dan air mineral
 - f. Diameter luka pada tikus : 5 mm
 - g. Volume, waktu, dan lama aplikasi bahan
4. Variabel tak terkendali
- a. Kondisi sistemik individual tikus
 - b. Kondisi rongga mulut individual tikus (pH saliva, volume saliva, mikroorganisme dalam rongga muut)
 - c. Kontaminasi bakteri rongga mulut tikus

F. Definisi Operasional

1. Gel biji jintan hitam adalah suatu sediaan gel yang terbuat dari ekstrak etanol biji jintan hitam yang dioleskan di bagian gingiva tikus yang telah diberi perlukaan.
2. Fibroblas adalah sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang berkembang.
3. Luka adalah terputusnya integritas dari jaringan baik secara anatomis maupun fisiologis yang diikuti oleh kematian jaringan seluler. Perlukaan pada tikus akan dibuat dengan menggunakan *scalpel* diameter 5 mm.
4. Penyembuhan luka adalah proses untuk menutup luka yang dibantu dengan faktor lain untuk mengganti jaringan yang telah rusak.

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Bahan Penelitian
 - a. Tikus wistar jantan
 - b. Biji jintan hitam 2 kg.
 - c. Aloclair sebagai kontrol positif.
 - d. CMC-Na
 - e. Etanol 70% untuk pelarut ekstrak
 - f. Kapas steril
 - g. Natrium CMC (CMC-Na) sebagai gelling agent
 - h. Hematoksilin Eosin (HE)
 - i. Eter
 - j. Mikrotom
 - k. *Hot plate*
 - l. *Buffer* formalin 10%
2. Alat Penelitian
 - a. Alat penyaring ekstrak
 - b. Pembuatan ekstrak jintan hitam
 - c. Pembuatan gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*) konsentrasi 10%
 - d. Pembuatan sediaan histologis
 - e. Timbangan
 - f. *Scalpel*
 - g. Mikroskop cahaya
 - h. Objek *glass* dan deck *glass*

- i. Pot wadah untuk menyimpan gel
- j. Kandang tikus diberi kode nomer
- k. Pinset
- l. Gunting bedah

H. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

Pembuatan ekstrak etanol biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Kedokteran UMY. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Biji jintan hitam 2 kg dicuci kemudian dikeringkan selanjutnya biji jintan hitam diblender dan disaring setelah itu di ambil serbuknya. Serbuk tersebut direndam didalam etanol 70% selama 24 jam dan disaring dua kali hingga didapatkan ekstrak kental 100%. Larutan yang diperoleh dipanaskan hingga mendidih $\pm 70^{\circ}\text{C}$ dan menyisakan ekstrak kental atau pekat seperti jus buah yang disaring.

2. Pembuatan gel biji jintan hitam (*Nigella sativa*)

a. Tahap persiapan

Pembuatan gel biji jintan hitam di Laboratorium LPPT Unit 1 UGM. Gel yang dibuat terdiri dari ekstrak dan gelling agent. Gelling agent menggunakan bahan *Natrium CMC* 3 gram (5%) dan aquades 60 ml (10%) steril.

Proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan gelling agent yaitu serbuk CMC-Na.
- 2) CMC-Na ditimbang seberat 3 gram, dimasukkan kedalam 3 gelas ukur, masing-masing berisi 1 gram.
- 3) Bahan dasar dilarutkan dengan aquades sebanyak 17 ml untuk gel konsentrasi 10%, lalu diaduk sedikit demi sedikit hingga rata.
- 4) Menambahkan ekstrak biji jintan hitam sebanyak 2 gram untuk mendapatkan gel berkonsentrasi 10%.
- 5) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan menyatukannya dengan serbuk CMC-Na, kemudian diaduk hingga membentuk massa gel.
- 6) 20 gram gel ekstrak biji jintan hitam berkonsentrasi 10% yang menjadi padat didapatkan, kemudian disimpan didalam lemari es bersuhu 4-6°C.

3. Perlakuan pada tikus

a. Tahap persiapan

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan atau diaklimatisasi selama satu minggu. Hewan uji yang berjumlah 36 ekor dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu 12 ekor masuk dalam kelompok I (kontrol positif, diaplikasikan Aloclair), 12 ekor

kelompok II (kontrol negatif, diaplikasikan CMC-Na), 12 ekor kelompok III (perlakuan gel biji jintan hitam konsentrasi 10%). Masing-masing kelompok ditempatkan pada kandang yang berbeda dengan lingkungan yang sama.

b. Sterilisasi alat

Sebelum dilakukan perlakuan pada hewan coba, semua alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan alkohol. Tujuan dari sterilisasi ini adalah untuk menghindari adanya kontaminasi patogen yang tidak diinginkan pada penelitian ini.

c. Membuat perlukaan dan aplikasi bahan

Hari ke nol (0), perlukaan dengan menggunakan *Scalpel* dengan diameter 5 mm dilakukan pada gingiva 36 ekor tikus, kemudian diaplikasikan bahan sesuai dengan kelompok perlakuan. Tiga ekor tikus dari masing-masing kelompok dikorbankan pada hari pertama, ketiga, kelima, dan ketujuh untuk didekapitulasi dan dibuat preparat. Pengorbanan hewan uji dilakukan pada hari pertama untuk mengetahui jumlah sel fibroblas yang mengalami kemotaksis pada jaringan, hari ketiga dan kelima untuk melihat jumlah sel fibroblas pada fase inflamasi dan peralihan menuju fase proliferasi, dan pada hari kedelapan untuk mengetahui jumlah sel fibroblas pada fase proliferasi.

4. Pembuatan sediaan histopatologi

Jaringan gingiva diambil pada daerah perlukaan kemudian, dibersihkan dengan cairan fisiologis. Jaringan yang diambil dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan cara fiksasi menggunakan *buffer* formalin 10% maksimum selama 24 jam. Skapel digunakan untuk memotong jaringan setelah fiksasi selesai dan dimasukkan kedalam *automatic tissue processor*, kemudian dehidrasi dengan alkohol 99% secara bertahap untuk membersihkan sisa-sisa fiksatif. Alkohol yang tersisa dibersihkan dengan *clearing xylol* selanjutnya dilakukan prosedur penanaman. Prosedur tersebut dilakukan dengan infiltrasi parafin cair pada suhu 57-59⁰ C kedalam kotak parafin untuk mengisi rongga dalam jaringan yang ditempati oleh air sehingga terbentuk blok parafin.

Blok parafin dimasukkan kedalam *freezer* untuk didinginkan agar tidak terlalu lunak, kemudian dari setiap blok parafin dilakukan pengirisan jaringan setebal 3-4 μm menggunakan *mikrotom*. Irisan jaringan dimasukkan kedalam *water bath* pada suhu sekitar 50⁰ C, setelah itu diinkubasikan pada *hot plate* suhu 40-50⁰ C selama 15 menit untuk menguapkan air pada jaringan.

Irisan jaringan dideparafinisasi dengan xylol diikuti dengan rehidrasi menggunakan alkohol secara bertingkat untuk menghilangkan xylol. Sisa-sisa alkohol dibersihkan dengan membasuh preparat dibawah air mengalir lalu mengaplikasikan cat HE yang memberi warna biru pada inti sel, membilas dibawah air mengalir untuk

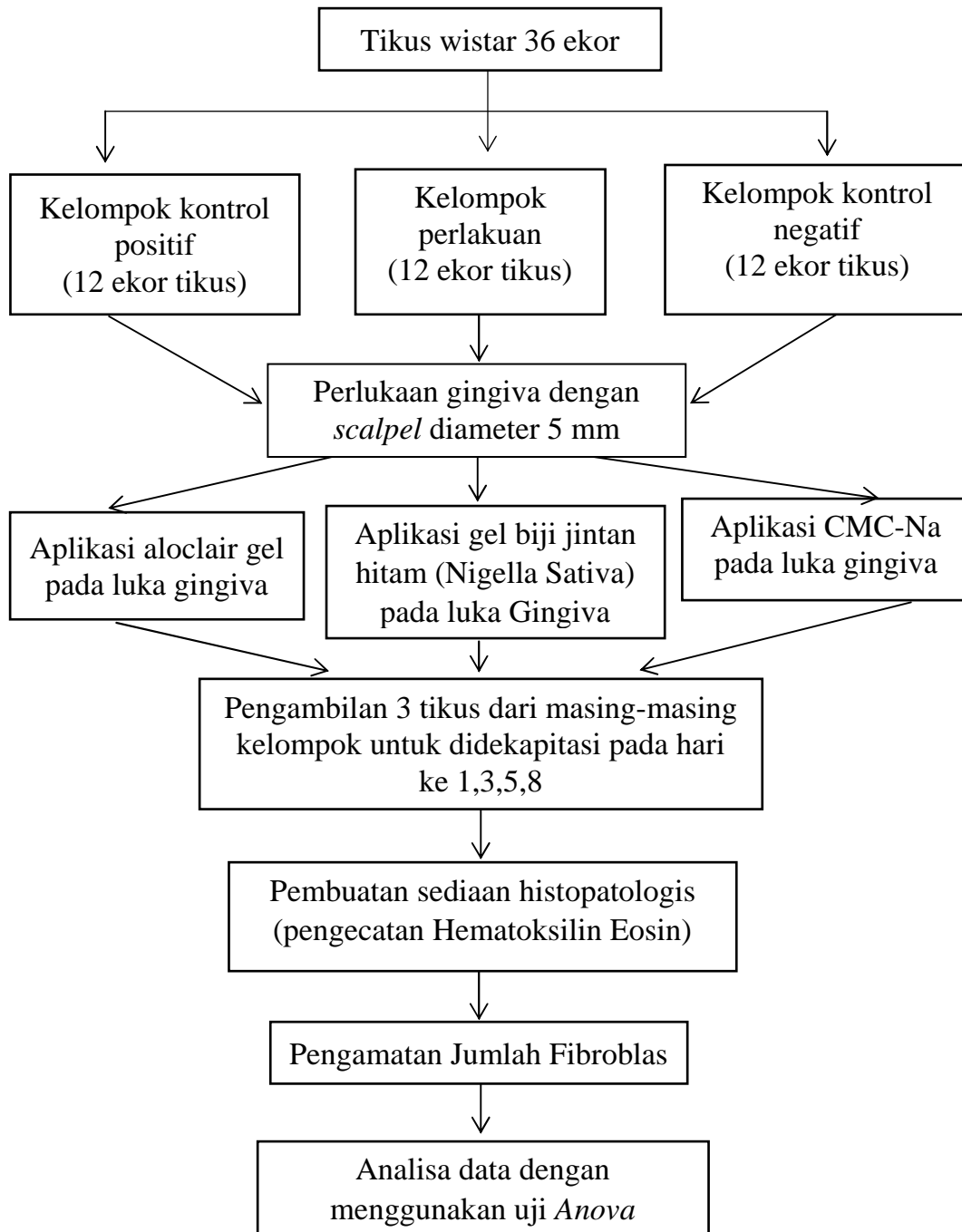
menghilangkan sisa cat, kemudian eosin sebagai bahan *counter stain* memberikan warna merah sebagai kontras. Preparat tersebut dicelupkan kedalam air untuk menghilangkan sisa eosin dan didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat untuk menghilangkan air. Tahap selanjutnya melakukan *clearing xylol* untuk memberikan warna bening pada jaringan dan *mounting* agar preparat awet serta menambah kejernihan.

Tahap selanjutnya untuk melihat ada atau tidaknya sel fibroblas pada permukaan gingiva maka dilakukan pewarnaan Hemaktosilin Eosin (HE). Prosedur pewarnaan HE adalah deparafinisasi dengan menggunakan larutan xylol dan alkohol. Tahap selanjutnya proses dehidrasi dengan alkohol kemudian dicuci dengan air mengalir dan bilas dengan menggunakan aquades dan dilap. Setelah itu, kaca benda dimasukkan kedalam Hematoksilin meyer's dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas aquades. Selanjutnya, proses pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda kedalam eosin serta dibilas menggunakan aquades. Pewarnaan dinilai dibawah mikroskop cahaya. Pewarnaan yang dianggap baik dilanjutkan langkah berikutnya yaitu proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Langkah selanjutnya dimasukkan kedalam larutan xylol dan terakhir *objek glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan mikroskop cahaya (Lab.Fakultas Farmasi UGM).

5. Interpretasi hasil

Pengamatan proses penyembuhan luka pada gingiva menggunakan pengamatan histologi dengan metode pengukuran *diferensial counting*, yaitu menghitung jumlah sel fibroblas pada 3x lapang pandang dengan perbesaran 40x10.

I. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

J. Analisis Data

Analisis data pada penelitian menganalisis perbedaan antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kontrol perlakuan dengan menggunakan uji two way ANOVA bila sebarang data normal dan varians data, sedangkan bila data tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak, digunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50.