

## **BAB III**

### **METODELOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan eksperimental murni (*true experimental*) dengan metode *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

#### **B. Tempat dan Waktu**

##### 1. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Kulit Buah jengkol diperoleh dari perkebunan jengkol di jalan raya Ngabul Jepara, Jawa Tengah.
- b. Pembuatan ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c. Pembuatan gel ekstrak kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin, Program Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- d. Seleksi Hewan uji, pencabutan gigi, dan dekapitulasi rahang marmut (*Cavia cobaya*) jantan di Fakultas Farmasi Unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- e. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- f. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

## 2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2014 sampai dengan Oktober 2014.

### **C. Subyek Penelitian**

#### 1. Populasi

##### a. Marmut (*Cavia cobaya*)

Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah marmut yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Marmut yang digunakan 45 ekor dengan kriteria : jenis kelamin jantan dengan berat sekitar 200-400 gram, umur 2-3 bulan. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada marmut dikendalikan.

##### b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol diambil yang sudah matang secara random dari pohonnya dengan ciri-ciri konsistensi keras, berwarna coklat dan kulit halus, dikupas kulitnya.

## 2. Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

sehingga didapat,

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

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$n = 4,75$$

Dilakukan pembulatan maka n = 5

Jumlah sampel minimal yang digunakan adalah 5 ekor marmut (*Cavia cobaya*) jantan. Penelitian ini menggunakan 45 ekor marmut jantan agar hasil penelitian dapat maksimal.

### D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Subyek penelitian yang digunakan adalah 45 ekor mamut jantan dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

#### 1. Kriteria inklusi

##### a. Marmut jantan

- 1) Jenis kelamin : jantan

- 2) Umur 2-3 bulan
  - 3) Berat 200-400 gram
  - 4) Dalam keadaan sehat/ aktif
- b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol yang segar, berwarna coklat.

## 2. Kriteria Eksklusi

- a. Marmut jantan
- 1) Diketahui terjangkit penyakit dan tidak aktif
  - 2) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai
- b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol yang belum matang dan busuk, dengan ciri-ciri konsistensi lunak dan kulit kasar.

## **E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

### **1. Identifikasi Variable Penelitian**

- a. Variabel Pengaruh
- 1) Perlakuan coba : Gel ekstrak kulit jengkol dengan konsentrasi perbandingan antara berat dan volume (b/v) mulai dari konsentrasi 1%, 5% dan 10%.
  - 2) Perlakuan kontrol : Waktu penyembuhan luka bekas pencabutan gigi dikontrol dengan mengaplikasikan *povidone iodine* 10% pada luka bekas pencabutan gigi untuk kontrol positif, dan tanpa perlakuan untuk kontrol negatif.

b. Variabel Terpengaruh

Jumlah sel makrofag pada proses penyembuhan luka bekas pencabutan gigi.

c. Variabel Terkendali

- 1) Jenis kelamin marmut jantan
- 2) Umur marmut sekitar 2-3 bulan
- 3) Berat marmut 200 gram hingga 400 gram
- 4) Makanan marmut : rumput
- 5) Bahan anastesi menggunakan ketamin
- 6) Elemen gigi yang dicabut yaitu insisivus bawah
- 7) Alat pencabutan gigi yaitu eskavator dan klem
- 8) Pengukuran pembuatan ekstrak
- 9) Pembuatan preparat histologi

d. Variabel Tidak Terkendali

- 1) Penurunan berat badan marmut jantan
- 2) Komplikasi pasca pencabutan
- 3) Infeksi bakteri

## 2. Definisi Operasional

a. Pencabutan Gigi

Ekstraksi atau pencabutan gigi adalah proses atau tindakan menarik keluar dan pengambilan gigi dari dalam mulut (Dorland &

Newman, 2002). Gigi dicabut menggunakan eksavator dan klem. Elemen gigi yang dicabut adalah gigi insisivus kiri bawah. Tindakan ekstraksi dimulai dengan klem ditempatkan di sulkus gingival. Gigi digerakkan ke arah labial dan lingual selama beberapa kali gigi kemudian dirotasi/diputar dalam sumbunya dan klem ditarik ketika jaringan periodontalnya sudah terlepas seluruhnya.

b. Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah proses kompleks yang dimulai sebagai respon terhadap luka untuk mengembalikan fungsi dan integritas jaringan yang rusak (Karodi dkk., 2009). Terjadinya penyembuhan luka melalui mekanisme hemostasis, pengurangan sel-sel radang dan pembentukan jaringan kolagen dari sel-sel fibroblas (Nanci, 2003). Secara histologi parameter luka yang menunjukkan luka pasca pencabutan gigi telah sembuh adalah merapatnya lapisan epidermis, pembentukan neokapiler, dan pembentukan sel-sel fibroblas yang ada dalam luka.

c. Kulit Jengkol

Jengkol (*Pithecellobium lobatum Benth.*) adalah tanaman dikotil atau berbiji dua yang banyak ditemukan di Indonesia yang buahnya hampir sama dengan petai tetapi warnanya lebih tua dan lebih besar. Suatu penelitian menyebutkan bahwa kandungan senyawa kimia dalam kulit buah jengkol yaitu Alkaloid, Saponin, Flavonoid, dan Tanin (Octaviani, 2010).

d. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua pelarut diuapkan, dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Indah dkk., 2004). Metode ekstraksi menggunakan metode maserasi. 2,5 kg kulit buah jengkol dibuat ekstrak menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian ekstrak kulit jengkol dibuat menjadi sediaan gel.

e. Gel

Gel adalah sediaan semi padat yang dapat diberikan untuk penggunaan topical atau dimasukkan ke dalam lubang tubuh. Keuntungan dari gel adalah menyerap dan mengandung banyak air, bersifat mendinginkan sehingga dapat mengurangi rasa perih (Syamsuni, 2006).

f. Makrofag

Makrofag merupakan sel berbentuk tidak beraturan dengan cabang-cabang pendek, kadang mempunyai cabang langsing panjang. Makrofag sebagai garis pertahanan pertama untuk melawan infeksi. Makrofag terdapat di jaringan dalam beberapa menit setelah peradangan. Makrofag diaktifkan oleh berbagai rangsangan, dapat menangkap, memakan dan mencerna antigen, seluruh

mikroorganisme, partikel tidak larut. Makrofag dapat hidup lama, mempunyai beberapa granulo dan melepas berbagai bahan, antara lain lisozim, komplomen, interferon, dan sitokin (Garna dkk., 2010).

## **F. Instrumen Penelitian**

### **1. Bahan**

- a. Kulit buah jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.)
- b. *Povidone iodine* 15 ml (10%)
- c. Etanol 70%, untuk pelarut ekstrak
- d. Marmut (*Cavia cobaya*) jantan
- e. Ketamin 10 ml, untuk anestesi
- f. Klorofom, untuk dekapitulasi marmut
- g. *Cotton bud*, untuk pengolesan dalam perlakuan.
- h. *Sodium* CMC (CMC-Na) 3 gram (5%)
- i. Aquades 100 ml (10%) steril
- j. Formalin 600 ml (10%)
- k. Bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan *Mallory*
- l. Rumput, untuk bahan pakan marmut
- m. Alkohol 70%
- n. Stik pH universal
- o. *Xylo*
- p. Kapas
- q. S spuit injeksi

## 2. Alat – alat

- a. Penyaring, untuk menyaring ekstrak
- b. Timbangan, untuk menimbang bahan
- c. Gelas ukur dan gelas beker, sebagai alat ukur
- d. *Water bath*, pemanas bahan
- e. Cahwan porselin, wadah pemanas bahan
- f. Sendok stenlistil, pengaduk gel
- g. Mortil, tempat pencampuran bahan
- h. Botol gel, untuk menyimpan gel
- i. Kaca alroji, untuk uji daya serap
- j. Sentrifugator, untuk uji konsentrasi
- k. Eksavator dan klem, untuk pencabutan gigi
- l. Gunting bedah, untuk dekapitulasi rahang
- m. Pot wadah, wadah organ
- n. Mikroskop cahaya, untuk membaca preparat
- o. *Objek glass* dan *deck glass*, sebagai alas preparat
- p. Kandang marmut diberi kode nomor

## G. Cara Pengumpulan Data

### 1. Tahap Persiapan

- a. Ekstraksi Bahan Uji

Pembuatan ekstrak etanol kulit jengkol dilakukan di Laboratorium Farmasi unit III UGM. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. 2,5 Kg kulit jengkol dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian di keringkan. Langkah selanjutnya, kulit jengkol dipotong kecil, kemudian diblender dan disaring lalu diambil serbuknya sebesar 100 gram. Rendam di dalam etanol 70% selama 24 jam dan disaring lalu disaring lagi hingga didapatkan ekstrak kental 100%, kemudian larutan yang diperoleh dipanaskan diatas penangas hingga menguap dan menyisahkan ekstrak kental (pekat).

b. Pembuatan gel

Pembuatan gel ekstrak kulit jengkol dilakukan pada Laboratorium Fitomedisin Farmasi UMY. Pembuatan gel terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-bahan seperti *natrium* CMC (CMC-Na) 3 gram (5%) dan aquades 60 ml (10%) steril.

Adapun proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan bahan dasar pembuat gel yaitu serbuk CMC-Na.
- 2) Menimbang CMC-Na seberat 3 gram, masukkan ke dalam 3 gelas ukur, tiap gelas ukur berisi 1 gram.
- 3) Melarutkan bahan dasar dengan aquades sebanyak 18,8 ml untuk gel konsentrasi 1%, aquades 18 ml untuk gel konsentrasi 5%, dan

aquades 17 ml untuk gel konsentrasi 10%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.

- 4) Menambahkan ekstrak kulit buah jengkol 0,2 gram untuk gel konsentrasi 1%, ekstrak kulit buah jengkol 1 gram untuk gel konsentrasi 5%, dan ekstrak kulit buah jengkol 2 gram untuk gel konsentrasi 10%.
- 5) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan satukan dengan serbuk CMC-Na, aduk sampai rata sehingga membentuk masa gel.
- 6) Setelah bahan menjadi padat akan menghasilkan 20 gram gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1%, 5%, dan 10%. Gel tersebut di masukkan kedalam botol gel dan disimpan didalam lemari es bersuhu 4-6° C.

Lalu dilakukan evaluasi sediaan gel, yaitu dengan cara :

a) Uji Organoleptik

Uji organoleptik merupakan uji yang dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Ditjen POM, 2000).

b) Uji Homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Caranya, gel dioleskan pada kaca transparan dimana sediaan

diambil 3 bagian yaitu atas, tengah dan bawah. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar (Ditjen POM, 2000).

c) Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan gel untuk menjamin sediaan gel tidak menyebabkan iritasi pada kulit. pH sediaan gel diukur dengan menggunakan stik pH universal. Stik pH universal dicelupkan ke dalam sampel gel yang telah diencerkan, diamkan beberapa saat dan hasilnya disesuaikan dengan standar pH universal. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH mukosa yaitu dalam interval 4,5-6,5 (Ditjen POM, 2000).

d) Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk menjamin pemerataan gel saat diaplikasikan pada mukosa yang dilakukan segera setelah gel dibuat. Gel ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan ditengah kaca bulat berskala. Di atas gel diletakkan kaca bulat lain atau bahan transparan lain dan pemberat sehingga berat kaca bulat dan pemberat 150 gram, didiamkan 1 menit, kemudian dicatat diameter penyebarannya. Daya sebar gel yang baik antara 5-7 cm (Ditjen POM, 2000).

e) Uji Konsistensi

Uji konsistensi dilakukan untuk mengetahui stabilitas sediaan gel yang dibuat dengan cara mengamati perubahan konsistensi sediaan setelah disentrifugasi. Uji konsistensi dilakukan dengan cara mekanik menggunakan sentrifugator dengan cara sediaan disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. Perubahan fisik diamati apakah terjadi pemisahan atau *bleeding* antara bahan pembentuk gel dan pembawanya yaitu air dan pengujian hanya dilakukan pada awal evaluasi (Ditjen POM, 2000).

c. Cara pengaplikasian gel

- 1) Siapkan gel ekstrak kulit jengkol.
- 2) Mengambil gel dengan menggunakan kapas dan dimasukkan pada soket luka pasca pencabutan gigi marmut 24 jam sekali.
- 3) Perlakuan tersebut terus dilakukaan dari hari pertama sampai hari ketujuh pasca pencabutan gigi marmut jantan.

d. Persiapan Hewan Uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan (diaklimatisasi) selama 1 minggu. Hewan uji yang berjumlah 45 ekor dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 1%) sebanyak 9 ekor, kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 5%) sebanyak 9 ekor, kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 10%)

sebanyak 9 ekor, kelompok kontrol positif (diaplikasikan *povidone iodine 10%*) sebanyak 9 ekor, dan kelompok negatif (tanpa perlakuan) sebanyak 9 ekor. Masing-masing kelompok dikandang yang berbeda dan diletakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

e. Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada saat kegiatan pengujian diawali dengan proses sterilisasi alat penelitian dengan alkohol.

## 2. Jalannya Penelitian

a. Pencabutan Gigi Marmut Jantan (*Cavia cobaya*)

Marmut diberi injeksi ketamil dengan aquades sebagai pelarutnya dengan perbandingan 1 : 1, yaitu 0,3 ml ketamin + 0,3 ml aquades. Kemudian diinjeksikan pada pangkal paha marmut. Posisi marmut harus terbalik dan kaki agak ditarik keluar agar paha bagian belakang terlihat serta posisi jarum sejajar dengan tubuh/abdomen. Suntikkan pada otot paha bagian belakang. Suntikan tidak boleh terlalu dalam agar tidak terkena pembuluh darah. Satu menit kemudian dilakukan tindakan separasi. Tindakan separasi dilakukan dengan memisahkan gusi dan bagian servikal gigi dengan eksavator. Tindakan ekstraksi dimulai dengan klem ditempatkan di sulkus gingival. Gigi digerakkan ke arah labial dan lingual selama beberapa kali gigi kemudian dirotasi/diputar dalam sumbunya dan klem ditarik ketika jaringan periodontalnya sudah terlepas seluruhnya.

Empat puluh lima ekor marmut dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1% (kelompok I), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 5% (kelompok II), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% (kelompok III), kelompok kontrol positif diaplikasikan *povidone iodine 10%* (kelompok IV), dan kelompok negatif tanpa perlakuan (kelompok V). Hari ke nol (0), 45 ekor marmut dicabut giginya, kemudian diberi perlakuan pada masing-masing kelompok. Pada hari pertama, ketiga, ketujuh setelah pencabutan gigi, 3 ekor marmut dari masing-masing kelompok dikorbankan. Marmut kemudian didekalsifikasi tulang rahang.

b. Prosedur Pembuatan Preparat

Jaringan bekas luka pencabutan gigi diambil dengan ketebalan 5 mm, kemudian jaringan difiksasi dengan formalin 10% selama semalaman pada suhu kamar. Jaringan didekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10% pada suhu kamar, selanjutnya dilakukan proses dehidrasi jaringan dengan menggunakan alkohol dengan kadar bertingkat hingga alkohol absolut. Spesimen dimasukkan ke dalam larutan alkohol toloul (1:1), dilakukan dengan proses penjernihan menggunakan toloul murni, kemudian dimasukkan ke dalam larutan toloul paraffin jenuh. Spesimen dimasukkan ke dalam paraffin cair pada proses infiltrasi, selanjutnya dilakukan proses *embedding* terhadap jaringan dan diberi label. Setelah tahap

*embedding* selesai, jaringan diiris secara seri dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mm.

Proses evaluasi respon sel inflamasi menggunakan pewarnaan *hematoksilin* dan *eosin (H & E)*. Prosedurnya yaitu deparafinisasi dengan menggunakan larutan xylol dan alkohol, dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alkohol lalu dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan aquades dan dilap. Kaca benda dimasukkan ke dalam larutan hematoksilin meyer's dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas aquades. Proses pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda ke dalam eosin dan dibilas dengan aquades, kemudian pewarnaan dinilai di bawah mikroskop cahaya. Bila pewarnaan telah dianggap baik, maka langkah selanjutnya proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Masukkan ke dalam larutan xylol dan *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan mikroskop cahaya.

c. Pembacaan Preparat Histopatologi

Sel makrofag pada sediaan preparat jaringan dihitung menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100x. Setiap potongan jaringan jumlah makrofag dihitung secara sistematis mulai dari pojok kiri bawah kemudian digeser kekanan dan ditarik keatas demikian seterusnya sehingga 10 lapang pandang terbaca. Kemudian dihitung jumlah rata-rata makrofag.

## H. Analisis Data

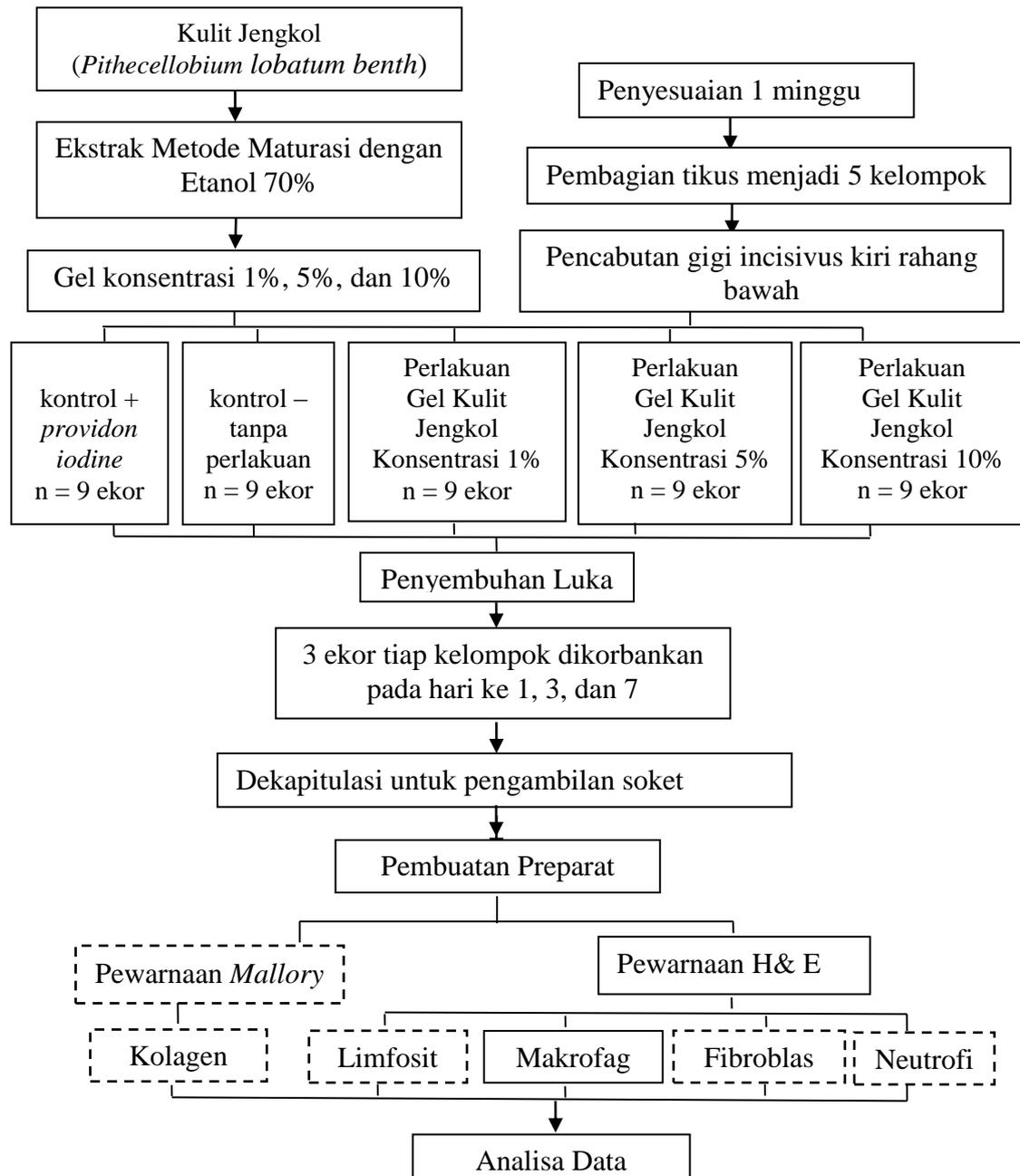
Data sel makrofag berupa data ordinal. Uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro wilk*. Data penelitian yang terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One way Anova*, selanjutnya uji lanjutan dengan menggunakan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok yang memiliki nilai signifikan tertinggi (Notoatmojo, 2002).

## I. Etik Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak sampel selama proses penelitian dengan mendapatkan persetujuan dari komite etik bahwa penelitian dilakukan tidak melanggar kode etik penelitian. Beberapa tahapan perlakuan marmut yaitu :

1. Hewan coba marmut jantan pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan yaitu diberikan ruang gerak untuk marmut.
2. Tidak dilakukan pembatasan pakan dan air minum. Marmut jantan diberi pakan dan air minum sesuai kebutuhan dengan jenis nutrisi yang sama.
3. Marmut jantan dilakukan pencabutan gigi insisivus bawah, dilakukan anestesi pada bagian pangkal paha marmut agar marmut tidak merasa sakit ketika dilakukan pencabutan gigi.
4. Marmut dilakukan pengambilan tulang rahang dan pembuatan preparat, agar marmut tidak merasakan kesakitan berkepanjangan maka pengambilan tulang rahang dilakukan hingga marmut mati.

## J. Alur Penelitian



**Gambar 1. Alur Penelitian**

Keterangan : Garis lurus (—) = dilakukan penelitian

Garis putus-putus (---) = tidak dilakukan penelitian.