

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris, secara *in vivo* dengan menggunakan hewan uji

B. Sampel Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus betina Sprague Dawley umur 3 bulan, berat $\pm 170 -200$ gr. Pada penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan jumlah tikus dalam satu kelompok sebanyak 4 ekor, ditentukan sesuai rumus hitung sampel dari Kumar (1996) yaitu:

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

n = jumlah sampel untuk tiap kelompok

Z = nilai standar untuk α 0,05 (tingkat kepercayaan 95%) dengan nilai Z 1,96

σ = nilai standar deviasi

d = rentang nilai yang diinginkan

Data standar deviasi dari penelitian sebelumnya belum ada, oleh karena itu diasumsikan nilai σ sama dengan d , sehingga perhitungan jumlah sampel yang diinginkan menjadi :

$$n = \frac{1,96^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

$n = Z^2 = 1,96^2 = 3,8416$ sampel dibulatkan menjadi 4 ekor tikus untuk setiap kelompok.

C. Tempat dan waktu penelitian

1. Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu
 - a) Pembuatan ekstrak tepung tempe kedelai dilaksanakan di Laboratorium unit II Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
 - b) Proses ovariektomi dan pemeliharaan pada tikus *Sprague-Dawley* betina dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
 - c) Pembuatan preparat dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
 - d) Pengamatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Riset MMT FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
 - e) Pengecekan hormon estrogen dengan ELISA dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 – Maret 2019.

D. Kriteria eksklusi dan inklusi

1. Kriteria inklusi
 - a) Species tikus yang akan digunakan : *Sprague dawley*
 - b) Berat badan tikus : $\pm 170 -200$ gr
 - c) Jenis kelamin tikus : betina
 - d) Umur tikus : 3 bulan
2. Kriteria eksklusi
 - a) Tikus *Sprague dawley* hamil

E. Variable penelelitian

1. Variable bebas
 - a) Ekstrak tepung tempe kedelai
2. Variable terikat
 - a) Jumlah sel PMN pada proses penyembuhan ulkus traumatik
3. Variable terkendali
 - a) Ukuran sampel
 - b) Tempe yang digunakan
 - c) Jumlah konsentrasi ekstrak tepung tempe yang akan digunakan
 - d) Ulkus traumatik regio 3 di gingiva cekat dekat mukosa
 - e) Tikus menopause:
 - 1) Spesies tikus yang akan digunakan : *Sprague-Dawley*
 - 2) Berat badan tikus : 170-200 gram
 - 3) Jenis kelamin tikus : betina

- 4) Makan yang akan di berikan : *pellet* CP511 dan minum air *ad libitum*

F. Definisi operasional

1. Ekstrak tepung tempe
Pembuatan tepung tempe dilakukan sebelum pembuatan ekstrak. Ekstrak tepung diperoleh dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak tepung tempe adalah ekstrak dari tepung tempe yang diperoleh dengan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Defisiensi estrogen
Didapatkan dengan cara ovariectomi sehingga terjadi defisiensi hormon estrogen. Tikus ovariectomi adalah tikus yang telah dilakukan pembedahan ovarium.
3. Ulkus traumatik
Diinduksi dengan cara *scraping* pada gingiva cekat dekat mukosa regio 3 mandibula menggunakan *scalpel*.
4. Jumlah sel PMN
Jumlah sel PMN pada 4 lapang pandang pada mikroskop cahaya dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).
5. Hormon estrogen
Kadar hormone estrogen dalam plasma tikus yang telah diuji dengan ELISA.

G. Alat dan bahan penelitian

1. Alat

- a) Alat ekstraksi tepung tempe kedelai terdiri dari beaker glass 1000ml (Iwaki pyrex), beaker glass 600ml (Iwaki pyrex), beaker glass 200ml (Iwaki pyrex), gelas ukur 100ml, botol scott 100ml (Duran), botol scott 500ml (Duran), corong plastic kecil, pipet tes, spatula, grinder, cawan porselen 75cc, saringan tepung 70mesh 'Retsch', *Lab Stirrer electricity*, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki stainless steel, baki plastic, pisau, talenan, sendok plastic, spatula, cup kecil.
- b) Alat ovariektomi terdiri papan bedah, *sput injection*, Silet, Pinset (*Yamako*), lampu operasi, jarum sutura nomor 2 (*One Med*), klem arteri (*One Med*), klem *kocher* (*One Med*), *Needle holder* (*One Med*), pinset anatomi (*One Med*), pinset sirugis (*One Med*), gunting *metzenbaum* (*One Med*), gunting balutan (*One Med*), gunting runcing (*One Med*), klem *mosquito* (*One Med*), *gloves* dan masker, kandang tikus.
- c) Pengambilan darah digunakan dengan *hematocrit*
- d) Alat induksi ulkus traumatik berupa *scalpel*
- e) Alat pembuatan preparat terdiri dari mikroskop cahaya, *object glass*, *deck glass*, kontainer specimen.
- f) ELISA kit untuk mengukur kadar serum estrogen.

2. Bahan

- a) Bahan ekstraksi tepung tempe terdiri dari tempe kedelai, alkohol 70 %, kertas saring, *tissue*, kain saring, larutan fiksatif BPS formalin, NaCl 0,9 %, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut.
- b) Bahan untuk proses ovariektomi terdiri dari ketamin 50mg/ml, benang silk nomor 3 (*One med*), benang *catgut* nomor 3 (*One med*), sekam padi steril, serbuk gergaji kayu steril, *betadine (Povidone Iodine)* 10%, Alkohol 70% (*Mediss*), antibiotik (*Ciprofloxacin*), cairan infus 0,9%, *Sodium Chloride' (Cotsu-NS)*, kasa steril (*OneMed*), *tissue*,
- c) Bahan pembuatan preparat terdiri dari *Formalin Buffer 10%* untuk fiksasi rahang, larutan *Xylo*, alkohol, air mengalir, aquades, bahan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin (HE)*.
- d) Bahan yang diaplikasikan pada ulkus traumatik terdiri dari gel kenalog

H. Cara kerja penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Pembuatan ekstrak tepung kedelai dimulai dari fermentasi tempe kedelai murni selama 2 x 24 jam yang dipotong kecil kemudian ditimbang berat basah dan dioven pada suhu 44 - 46°C, kemudian digiling menggunakan grinder sampai menjadi tepung. Dilakukan pengayakan 70 mesh untuk mendapatkan tekstur tepung tempe yang halus, selanjutnya tepung tempe tersebut dibuat ekstrak dengan diberi pelarut alkohol 70% dengan perbandingan 1:4. Menggunakan *stirrer electric* larutan

dihomogenkan dengan kecepatan 500rpm dan dilakukan maserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrate diwaterbath selama \pm 8jam untuk mendapatkan filtrat murni berbentuk pasta.

2. Pengelompokan Hewan Uji

Sebelum mendapat perlakuan hewan uji diadaptasikan selama kurang lebih satu minggu. Hewan uji yaitu tikus *Sprague-Dawley* sebanyak 20 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok kontrol (tanpa ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa diberi kenalog dan tanpa ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok perlakuan 1 (tanpa ovariektomi, induksi ulkus traumatik, diberi kenalog, tanpa diberi ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok perlakuan 2 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, diberi kenalog dan tanpa ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok perlakuan 3 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog dan diberi ekstrak tepung tempe kedelai), kelompok perlakuan 4 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog, tanpa ekstrak tepung tempe kedelai). Tikus diberi pakan dan air minum *ad libitum*.

3. Ovariektomi tikus

Ovariectomi dilakukan pada hari ke-8 setelah masa adaptasi. Sebelum ovariectomi, tikus dianestesi dengan menggunakan ketamin HCL 100 mg secara intra muskular. Tikus difiksasi dimeja operasi, rambut tikus di area perut dicukur, kemudian di insisi pada bagian perut (*linea mediana*) yang akan dibedah, dilanjutkan dengan ligasi pembuluh darah dan pembedahan ovarium. Daerah yang diinsisi dijahit kembali setelah itu luka jahitan diolesi *povidon iodine*. Setelah prosedur selesai hewan uji ditunggu selama 7 hari untuk proses penyembuhan.

4. Pemberian ekstrak tepung tempe

Pada hari ke-16 tikus diberikan ekstrak tepung tempe kedelai. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu sebesar 0,63 g/ml. Ekstrak tepung tempe kedelai diberikan setiap hari pada siang hari, diberikan secara oral menggunakan sonde lambung sebanyak 1 ml sesuai dengan dosis satu kali sehari selama 30 hari.

5. Induksi ulkus traumatik

Setelah pemberian ekstrak tepung tempe kedelai, pada hari ke-47 dilakukan induksi ulkus traumatik pada kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan. Pertama-tama tikus diberi larutan anestesi ketamin HCL 100 mg intramuskular kemudian dilakukan *scraping* pada gingiva regio 3 mandibula menggunakan *scalpel* agar terjadi ulkus traumatik.

6. Pengolesan gel kenalog

Pengolesan gel kenalog pada ulkus tikus dilakukan setelah induksi ulkus traumatik pada kelompok 1 dan 2 setiap hari selama 7 hari.

7. Pengambilan sampel gingiva

Sebelum pengambilan sampel gingiva dengan pengambilan mandibula, dilakukan etanasia dengan ketamine HCL 100 mg. Sampel gingiva diambil pada hari ke-48, 50, 52, 54 setelah pemberian ekstrak tepung tempe kedelai atau diambil pada hari ke-1, 3, 5, dan 7 setelah induksi ulkus traumatik.

8. Pengambilan dan analisis kadar hormon estrogen

Pengambilan darah tikus dilakukan pada hari ke-8 setelah satu minggu masa adaptasi, yaitu saat melakukan ovariektomi. Pengambilan darah hari ke-8 dilakukan pada semua kelompok tikus. Pengambilan darah tikus dilanjutkan pada hari ke- 16 untuk tiga kelompok tikus yang diberi perlakuan ovariektomi. Pengambilan darah selanjutnya dilakukan pada hari ke-47 pada semua kelompok tikus untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak tepung tempe kedelai pada kadar hormon dalam darah tikus. Plasma dari darah tikus dipisahkan dengan *centrifuge* kemudian disimpan dalam *freezer* pada suhu -80°C hingga semua serum yang dibutuhkan terkumpul, kemudian dilakukan pengukuran kadar hormon estrogen dengan menggunakan ELISA.

9. Pembuatan preparat histologi

Sampel gingiva yang telah diambil dibuat preparat histologi dengan tahapan sebagai berikut :

a. Fiksasi jaringan gingiva

Jaringan gingiva dicuci dengan garam fisiologis (NaCl 0,9%), kemudian jaringan dimasukkan dalam botol flakon yang berisi larutan formalin buffer 10% dan dibiarkan selama 24 jam.

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat memakai alkohol 70% sampai 100%. Jaringan gingiva dijernihkan dengan *xylol* (clearing).

c. *Clearing*

Jaringan gingiva dijernihkan dengan *xylol* (clearing). Proses clearing memberikan warna bening pada jaringan dan sebagai perantara masuknya kedalam paraffin.

d. Infiltrasi dan penanaman (*embedding*)

Melakukan infiltrasi terlebih dahulu sebelum penanaman. Dilakukan dengan cara menggunakan paraffin cair dengan suhu 57-59°C. Setelah itu, jaringan yang telah selesai diinfiltrasi dikeluarkan dan segera dimasukkan kedalam cetakan blok yang sebelumnya telah diisi paraffin cair kemudian ±20 menit setelah mengeras cetakan dilepas.

e. Pematangan

Sebelum dipotong dengan mikrotom, blok didinginkan terlebih dahulu dengan cara dimasukkan ke dalam plastik yang berisi air dan dimasukkan kedalam *freezer* selama ± 15 menit. Blok dijepitkan pada mikrotom lalu dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan $\pm 30^\circ$ terhadap blok paraffin setebal $\pm 2-5$ mikron, hasil potongan dimasukkan ke wterbath yang telah diisi air yang dihangatkan $\pm 50^\circ\text{C}$. Setelah itu diambil dengan objek *glass* dan dibiarkan ± 5 menit lalu diinkubasi.

f. Inkubasi

Preparat diinkubasi dengan suhu $\pm 50^\circ\text{C}$ selama ± 15 menit.

g. Pengecatan

Pengecatan dilakukan dengan menggunakan *Hematoxylin-eosin* (HE). Proses pengecatan sebagai berikut :

1) Deparafinisasi

Preparat dimasukkan ke dalam xylol I, II, III, masing-masing selama tiga menit.

2) Rehidrasi

Preparat dimasukkan ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70%, masing-masing selama dua menit.

3) Preparat dimasukkan ke air mengalir

4) Pengecatan inti

Preparat dimasukkan ke larutan Mayer Hematoksilin selama tujuh menit.

5) Preparat dimasukkan ke air mengalir.

6) *Counter Stain*

Preparat dimasukkan ke larutan eosin ± 30 detik.

7) Preparat masuk ke air wadah I, II, III, masing-masing tiga kali celup.

8) Dehidrasi

Preparat dimasukkan ke alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, masing-masing tiga kali celup.

9) *Clearing*

Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I dan II.

10) *Mounting*

Preparat diberi satu tetes entelan dan deck glass.

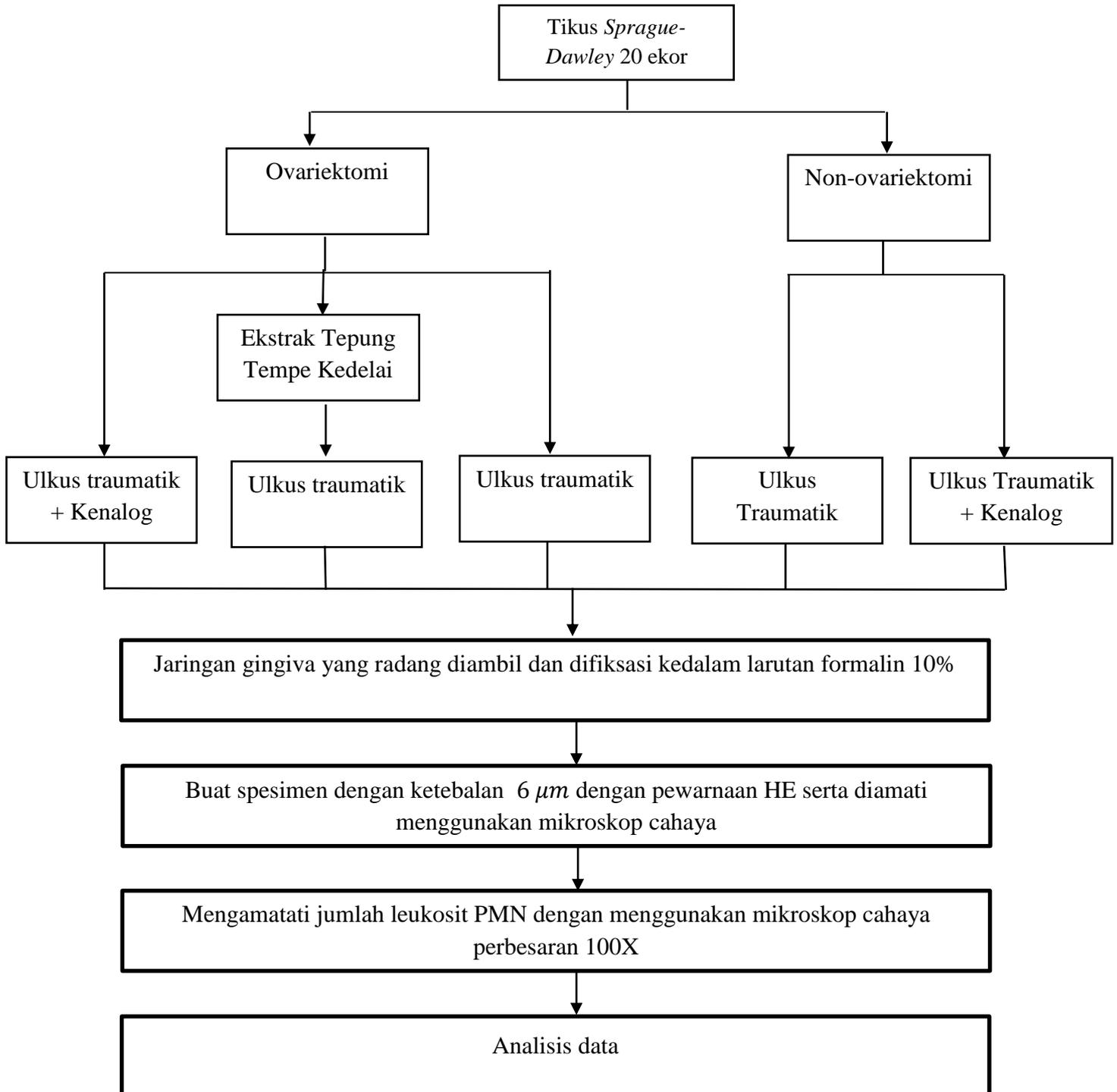
10. Pemusnahan hewan uji

Setelah dilakukan euthanasia dan pengambilan mandibula, tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran ditempat khusus, yaitu insulator.

11. Pengamatan jumlah leukosit PMN

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada tiga lapang pandang untuk mengamati jumlah Leukosit PMN. Leukosit PMN tampak berbentuk bulat, inti terdiri dari 2-5 lobus berwarna biru keunguan dan sitoplasma berwarna kemerahan dengan pewarnaan HE.

I. Alur Penelitian



J. Analisis Data

Data pada penelitian ini akan di analisis menggunakan aplikasi SPSS 15. Uji normalitas yang digunakan adalah saphiro-wilk karena sampel yang digunakan pada penelitian ini kurangdari 50. Jika persebaran data normal, maka dianalisis dengan *one way* ANOVA, karena jenis hipotesis pada penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel > 2 . Jika data memiliki persebaran tidak normal maka analisis data yang akan digunakan adalah uji non parametrik, yaitu *Kruskall Wallis* ataupun uji *Mann-Witney*.