

### **BAB III**

#### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Jenis penelitian penelitian ini adalah eksperimental laboratoris, secara *in vivo* pada tikus betina *Sprague-Dawley* sebagai hewan uji.

##### **B. Sample Penelitian**

Subyek dari penelitian ini adalah hewan uji dengan tikus *Sprague-Dawley* betina umur 3 bulan dengan berat badan  $\pm$  170-200 gram sebanyak 20 tikus.

Subyek penelitian ini akan di bagi menjadi 5 kelompok. Jumlah hewan coba untuk masing-masing kelompok perlakuan dapat dicari dengan 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  $\alpha$  0,05 (tingkat kepercayaan 95%) dengan nilai Z  
1,96

$\sigma$  = nilai standar deviasi

d = rentang nilai yang diinginkan

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

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

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

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### 1. Lokasi

- a) Pembuatan ekstrak tepung tempe kedelai dilaksanakan di Laboratorium LPPT unit II Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- b) Proses Ovariektomi dan pemeliharaan pada tikus Sprague Dawley betina dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c) Pembuatan Preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- d) Proses pengecekan hormon estrogen dengan tekni ELISA dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- e) Pengamatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Riset MMT FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

#### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 sampai dengan April 2019.

#### **D. Kriteria Eksklusi dan Inklusi**

##### 1. Kriteria Eksklusi

- a) Tikus *Sprague Dawley* yang sedang hamil

##### 2. Kriteria Inklusi

- a) Memiliki Berat badan  $\pm$  170-200 gram
- b) Jenis Kelamin Betina
- c) Spesies *Sprague Dawley*
- d) Umur 3 Bulan

#### **E. Variabel Penelitian**

##### 1. Variable bebas

Ekstrak tepung tempe kedelai

##### 2. Variable terikat

Jumlah sel Fibroblas pada proses penyembuhan ulkus traumatik

##### 3. Variable terkontrol

- a) Tempe yang digunakan
- b) Jumlah konsentrasi ekstrak tepung tempe yang akan digunakan
- c) Ulkus Traumatik region 3 gingiva cekat dekat mukosa
- d) Tikus menopause:
  - 1) Species tikus yang akan digunakan : *Sprague dawley*
  - 2) Berat badan tikus :  $\pm$  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 tempe adalah ekstrak dari tepung tempe yang diperoleh dengan proses maserasi pelarut etanol 70%.

### 2. Defisiensi Hormon Estrogen

Didapatkan dengan cara ovariectomi sehingga terjadi defisiensi hormon estrogen. Tikus ovariectomi adalah tikus yang telah dilakukan pemotongan ovarium.

### 3. Ulkus Traumatik

Diinduksi dengan pembuatan luka *scraping* pada gingiva cekat dekat mukosa region 3 mandibula menggunakan *scalpel*.

### 4. Jumlah Fibroblas

Jumlah sel Fibroblas dilihat pada 3 lapang pandang pada mikroskop cahaya dengan pewarnaan *hematoksilin-eosin* (HE).

## 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, *sprit 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 pembuatan ulkus traumatik pada gingiva terdiri dari *Scalpel*
- e) Alat pembuatan preparat terdiri dari mikroskop cahaya, *object glass, deck glass*, kontainer specimen.
- f) Alat untuk mengukur kadar serum Estrogen terdiri dari ELISA kit

## 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 ketamil 10%, *xyla*, 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 (*Levofloxacin*), 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 traumatic terdiri dari gel kenalog

## **H. Jalannya Penelitian**

- a) Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Pembuatan ekstrak tepung kedelai dimulai dari pembuatan simplisia serbuk terlebih dahulu. Tempe kedelai murni 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. Filtrat yang diperoleh dimasukkan kedalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga didapat filtrat murni tanpa alkohol, kemudian filtrate di *waterbath* selama  $\pm$  8jam untuk mendapatkan filtrat murni berbentuk pasta.

- b) 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 4 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog, tanpa ekstrak tepung tempe kedelai). Tikus diberi pakan dan air minum *ad libitum*.

c) Ovariektomi tikus

Ovariektomi dilakukan pada hari ke-8 setelah masa adaptasi. Sebelum ovariektomi, tikus anestesi menggunakan ketamin HCl 100 mg. 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 pemotongan 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.

d) Pemberian ekstrak tepung tempe

Setelah penyembuhan luka ovariektomi dan penyesuaian hormon estrogen selama 7 hari, pada hari ke-16 tikus diberikan ekstrak tepung tempe kedelai. Penentuan dosis didapatkan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu sebesar 0,63 g/ml. Ekstrak tepung tempe kedelai diberikan setiap hari pada siang hari yang dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung sesuai dengan dosis satu kali sehari selama 30 hari.

e) 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 dengan induksi intramuskular kemudian gingiva regio 3 mandibula tersebut dilakukan *scraping* menggunakan *scalpel* agar terjadi ulkus traumatik.

f) Pengolesan Gel Kenalog

Setelah induksi ulkus traumatik, pada hari itu juga kelompok perlakuan 1 dan 2 pada bagian gingiva tikus yang terluka dioleskan gel kenalog setiap hari selama 7 hari

g) Pengambilan sampel gingiva

Sebelum pengambilan sampel gingiva dengan pengambilan mandibula, dilakukan euthanasia dengan ketamin 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

h) Pengambilan dan Analisis Kadar Hormone 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, bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perubahan kadar hormon estrogen.

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  $-80^{\circ}\text{C}$  hingga semua serum yang dibutuhkan terkumpul, kemudian dilakukan pengukuran kadar hormone estrogen dengan menggunakan ELISA.

i) Pembuatan preparat histologi

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

1) Fiksasi jaringan gingiva

Fiksasi memiliki fungsi untuk mempertahankan struktur sel sehingga menjadi stabil secara fisik dan kimiawi dan juga mencegah terjadinya dialysis atau pembekakan pada ruptur. 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.

2) Dehidrasi

Dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan / menarik kadar air dalam jaringan dengan cara menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat. Untuk dehidrasi yang baik memakai alkohol 70% hingga 100%.

3) Clearing

Clearing berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan., meberikan warna yang bening pada jaringan dan juga sebagai zat perantara masuknya kedalam paraffin/zat padat. Jaringan gingiva dijernihkan menggunakan xylol.

4) Infiltrasi dan penanaman (embedding)

Infiltrasi berfungsi untuk mengisi rongga-rongga atau pori-pori yang ada pada jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan sebelumnya (xylol).

Infiltrasi terlebih dahulu dilakukan sebelum penanaman, dengan cara menggunakan paraffin yang telah dicairkan dalam oven pada suhu 57-59°C. Setelah itu, jaringan tersebut di keluarkan dan dimasukkan ke dalam cetakan blok yang sebelumnya telah diisi paraffin cair. Kemudian ditunggu  $\pm 20$  menit sampai mengeras dan cetakan dilepas.

#### 5) Pemotongan

Sebelum dilakugan pemotongan dengan mikrotom, blok didinginkan terlebih dahulu dengan cara menggunakan batu es atau dimasukkan kedalam plastic yang sudah berisikan air kemudian dimasukkan kedalam freezer  $\pm 15$  menit. Blok dijepitkan pada mikrotom kemudian dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan  $\pm 30^\circ$  terhadap blok paraffin. Hasil potongan berupa pita yang kemudian dimasukkan kedalam waterbath yang sebelumnya diisi air hangat dengan suhu  $\pm 50^\circ$ , lalu dibiarkan selama  $\pm 5$  menit dan diinkubasi.

#### 6) Inkubasi

Proses ini berfungsi untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan / pita sehingga jaringan menempel kuat pada objek glass. Preparat diinkubasi diatas hot plate dengan suhu  $\pm 50^\circ$  C selama  $\pm 15$  menit.

#### 7) Pengecatan

Pengecatan dilakukan dengan menggunakan Hematoxylin-Eosin (HE).

Proses pengecatan sebagai berikut :

- 1) Deparafinisasi : Preparat dimasukkan ke dalam xylol I,II,III selama 3 menit
- 2) Rehidrasi : Preparat dimasukkan ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70% selama 2 menit
- 3) Preparat dimasukkan ke air mengalir
- 4) Pengecatan Inti : Preparat dimasukkan ke larutan Mayer Hematoksin 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

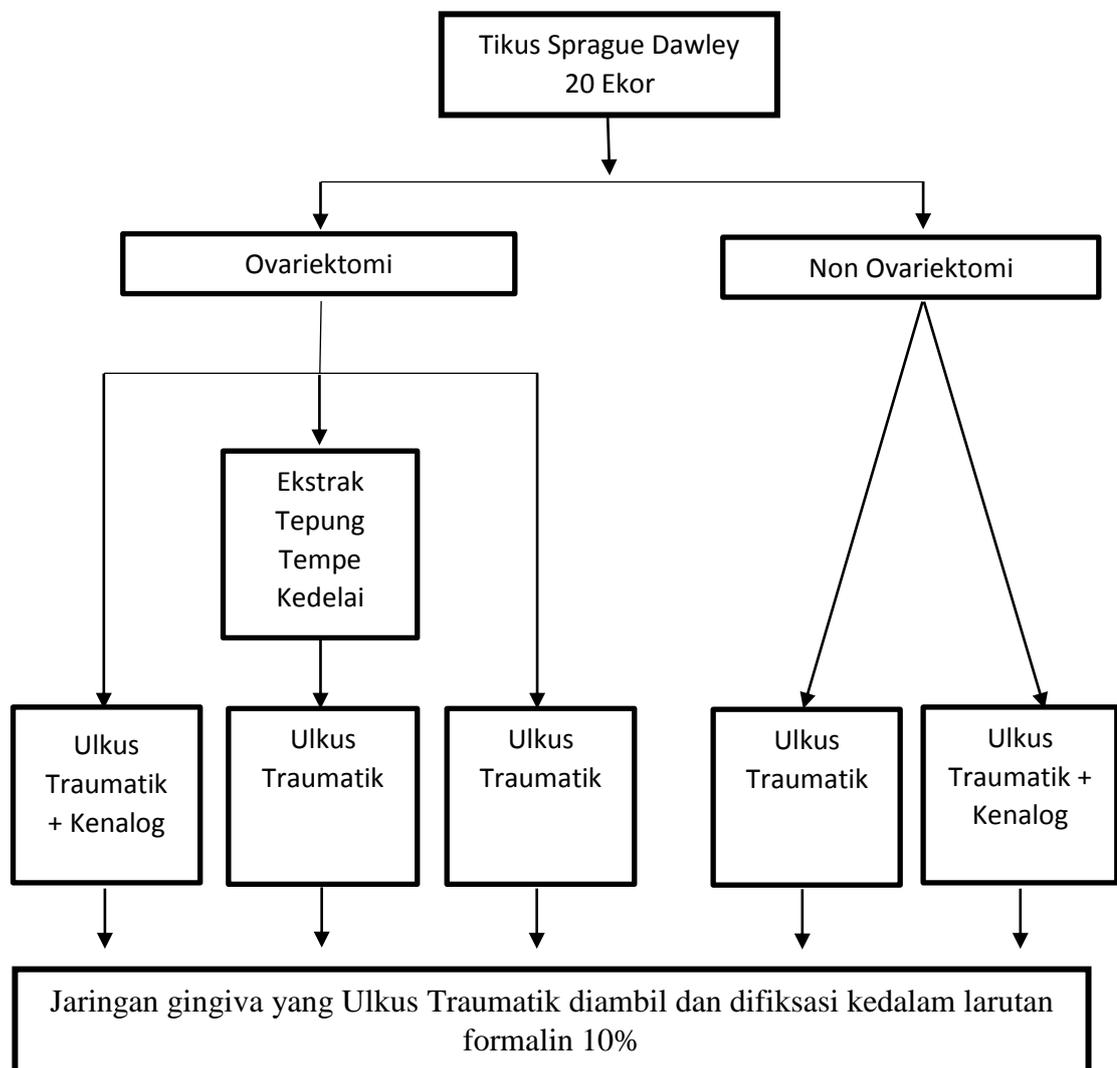
j) Pemusnahan Hewan Uji

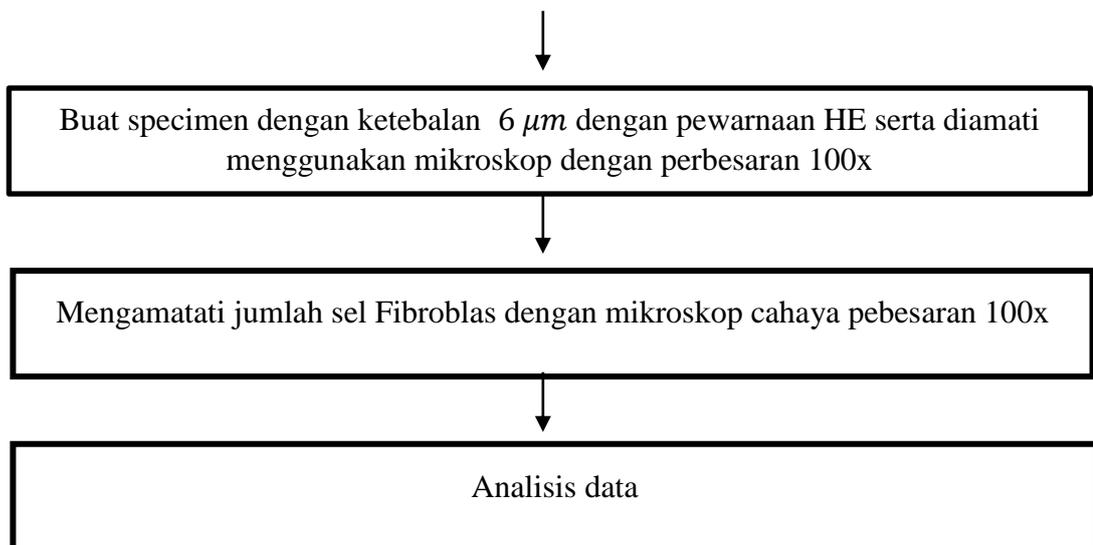
Setelah dilakukan euthanasia dan pengambilan mandibula, tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran ditempat khusus, yaitu insulator.

k) Pengamatan dan Pengumpulan Data

Untuk menghitung jumlah fibroblas dapat dilihat dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x pada tiga lapang pandang. Sel fibroblas akan tampak berwarna merah jambu dengan inti berwarna biru dengan pewarnaan *hematoksilin-eosin* (HE).

#### D) 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 kurang dari 50. Jika persebaran data normal, maka dapat dianalisis dengan *One Way ANOVA* karena jenis hipotesis pada penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel  $> 2$ . Adapun jika data memiliki persebaran tidak normal maka analisis data yang akan digunakan adalah *kruskall wallis*.