

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah eksperimental, laboratories *in vivo* dengan hewan uji.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah 39 tikus *Rattus norvegicus* jantan galur *Wistar* yang berumur sekitar 3 bulan dengan berat badan 200-250 gram.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

1. Variabel

- a. Variabel bebas : Krim ekstrak etanol daun *P. acuminata* Ait (KEEPA)
- b. Variabel terikat : Skor sel PMN
- c. Variabel terkontrol :
 - 1) Tikus dengan spesies *Rattus norvegicus* galur *Wistar*
 - 2) Tikus yang berumur sekitar 3 bulan
 - 3) Tikus dengan jenis kelamin jantan

- 4) Tikus yang diberi pakan standar BR-2
- 5) Konsentrasi krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* yaitu 1,25%, 2,5%, 5 %
- 6) Konsentrasi H₂O₂ yaitu 10 %
- 7) Konsentrasi lidokain yaitu 5 %

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol 70 %. Daun yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau dimulai daun ketiga dari pucuk sehingga daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda.
- b. Krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Bahan obat terlarut yang digunakan adalah ekstrak etanol yang dibuat dengan formulasi dapat dilihat pada Tabel 1.
- c. Proses penyembuhan luka adalah proses penggantian dan perbaikan fungsi jaringan yang rusak yang melibatkan integrasi proses fisiologis.
- d. Sel PMN adalah leukosit neutrofil yang merupakan fagosit aktif terhadap berbagai jenis mikroorganisme, mempertahankan terhadap invasi

E. Instrumen Alat

1. Alat

Pipet tetes, *cutton bud*, corong, gelas objek, spuit injeksi, lanset, masker, *handscone*, alat timbang, kandang tikus, serta mikroskop.

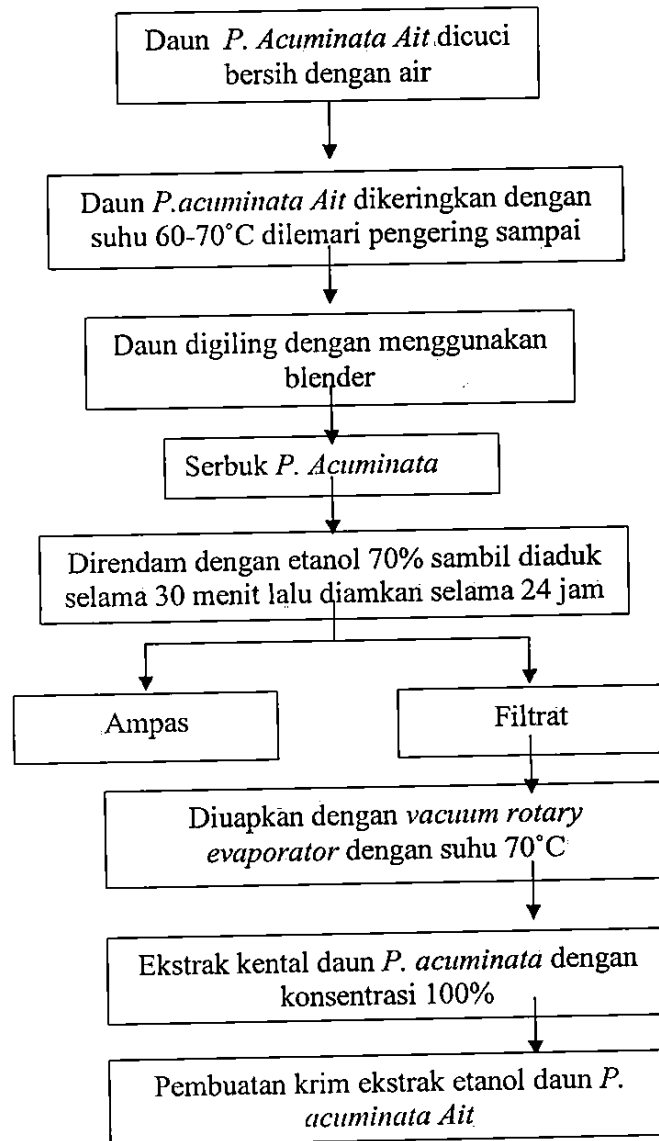
2. Bahan

Larutan H₂O₂ 10 %, anestesi lidocain 5 %, krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*, kenalog®, kloroform, formalin 10 %, bahan – bahan pewarna HE untuk pengecetan sel PMN.

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*

Daun *P. acuminata Ait* sebanyak 5 kilogram disiapkan kemudian dicuci dengan air bersih. Daun yang sudah dibersihkan kemudian dikeringkan dalam lemari pengering dengan suhu 60-70°C hingga kering. Daun kering sebanyak 500 gram dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk. Serbuk diekstraksi dengan metode maserasi dalam larutan etanol 70 % yang berfungsi untuk melarutkan zat aktif yang terkandung dalam daun *P. acuminata Ait*. Dalam perendamannya sambil diaduk selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah direndam maka akan terbentuk filtrat dan ampas. Filtrat diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dalam pemanas *water bath* dengan suhu 70°C. Setelah itu akan diperoleh ekstrak yang kental sebanyak 49 gram dengan konsentrasi 100 %. Proses pembuatan ekstrak dapat dilihat pada



Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak

2. Pembuatan krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*

Krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* dibuat di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dengan formulasi sebagai berikut :

Tabel 1. Formulasi krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*

Bahan	Konsentrasi 1,25 %	Konsentrasi 2,5 %	Konsentrasi 5 %	Rasis
Ekstrak	1,25 gram	2,5 gram	5 gram	-
Asam Stearat	15 gram	15 gram	15 gram	15 gram
Gliserin	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram
Metil Paraben	0,10 gram	0,10 gram	0,10 gram	0,10 gram
Propil Paraben	0,05 gram	0,05 gram	0,05 gram	0,05 gram
Air Hingga	100 gram	100 gram	100 gram	100 gram

3. Pengelompokan hewan uji

Sebelum mendapat perlakuan hewan uji diadaptasikan selama satu minggu. Selama periode ini, 39 tikus galur *Wistar* diberi pakan standar dan minum. Setelah masa adaptasi selesai, tikus dibagi secara random menjadi tujuh kelompok terdiri dari kelompok pembanding, kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok tanpa perlakuan.

Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus kecuali kelompok I sebagai kelompok pembanding sebanyak 3 ekor tikus yang hanya dibuat radang tanpa diberi perlakuan. Kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 kelompok yaitu kelompok II, III, dan IV, masing-masing diaplikasikan krim ekstrak etanol *P. acuminata Ait* dengan konsentrasi berbeda. Kelompok II 1,25 %, kelompok III 2,5 %, kelompok IV 5 %. Kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok V sebagai kontrol negatif diaplikasikan Base (bahan dasar krim) dan kelompok VI sebagai kelompok kontrol positif diaplikasikan Kenalog®, dan kelompok VII sebagai kelompok tanpa perlakuan.

4. Induksi Luka Gingiva

Sebelum induksi luka menggunakan H₂O₂ 10 % tikus diberi lidokain 5 % terlebih dahulu untuk anestesi. Kemudian gingiva tikus dilukai menggunakan lanset, jarum lanset sedalam 2 mm. Setelah itu aplikasi H₂O₂ 10 % menggunakan *cotton bud* sebanyak 0,01 ml pada gingiva tikus tersebut. Induksi luka dilakukan 3 kali sehari selama 10 menit selama 3 hari.

5. Pemberian perlakuan krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*

Setelah pengaplikasian H₂O₂ 10 % selama 3 hari dan diperoleh radang, maka pada masing-masing tikus diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Pemberian krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5% masing-masing 3 kali sehari selama 10 menit selama 3 hari. Kelompok kenalog® dan base juga diberikan perlakuan yaitu selama 3 hari sebanyak 3 kali

periode ini, semua tikus dipantau dengan memberi makan dan minum secara rutin untuk mengontrol nutrisinya.

6. Uji efektivitas krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait*

Untuk mengetahui efektivitas krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* semua tikus diambil jaringan radangnya kemudian dibuat spesimen histologis.

Namun waktu untuk mengorbankan tikus pada setiap kelompoknya berbeda.

Kelompok pertama yang dikorbankan adalah kelompok pembanding yang berjumlah 3 ekor tikus yang dimatikan pada hari ke-0 perlakuan atau hari ke-4 setelah terjadinya peradangan. Kemudian kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yaitu kelompok II-VII dikorbankan pada hari ke-4 dan ke-7 setelah pengobatan. Masing-masing kelompok dikorbankan sebanyak 3 ekor pada hari ke-4 setelah pengobatan, dan 3 ekor pada hari ke-7 setelah pengobatan.

Setelah semua tikus dikorbankan, maka dilakukan pengambilan jaringan radang dimulai dari bagian tepi sampai bagian tengah jaringan yang meradang. Potongan jaringan difiksasi dengan larutan formalin 10 % selama 4 hari pada temperatur kamar, dilanjutkan proses dehidrasi terhadap spesimen menggunakan alkohol secara bertingkat. Kemudian spesimen dimasukkan kedalam larutan toluol (1:1), dan dilanjutkan dengan proses penjernihan menggunakan toluol murni, lalu spesimen dimasukkan kedalam larutan toluol paraffin jenuh. Kemudian dilakukan proses infiltrasi kedalam oven dengan cara memasukkan spesimen kedalam paraffin cair. Setelah itu dilakukan proses *embedding* terhadap

jaringan diiris secara seri dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μm .

Untuk melihat ada atau tidaknya sel inflamasi pada radang gingiva maka dilakukan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Prosedur pewarnaan HE adalah deparafinisasi dengan menggunakan larutan *xylol* dan alkohol. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi dengan alkohol lalu dicuci dengan air mengalir dan bilas dengan aquades serta dilap. Setelah itu kaca benda dimasukkan kedalam hematoksin Meyer's dan dicuci dengan air mengalir serta dibilas dengan aquades. Selanjutnya proses pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan kaca benda kedalam eosin dan dibilas dengan aquades. Pewarnaan dinilai dibawah mikroskop cahaya. Bila pewarnaan telah dianggap baik maka langkah selanjutnya ialah proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Setelah itu dimasukkan kedalam larutan *xylol* dan terakhir *object glass* ditutup dengan deck glass dan dilakukan pengamatan mikroskop cahaya (Lab. Patologi Anatomi FK UGM).

G. Pengumpulan Data

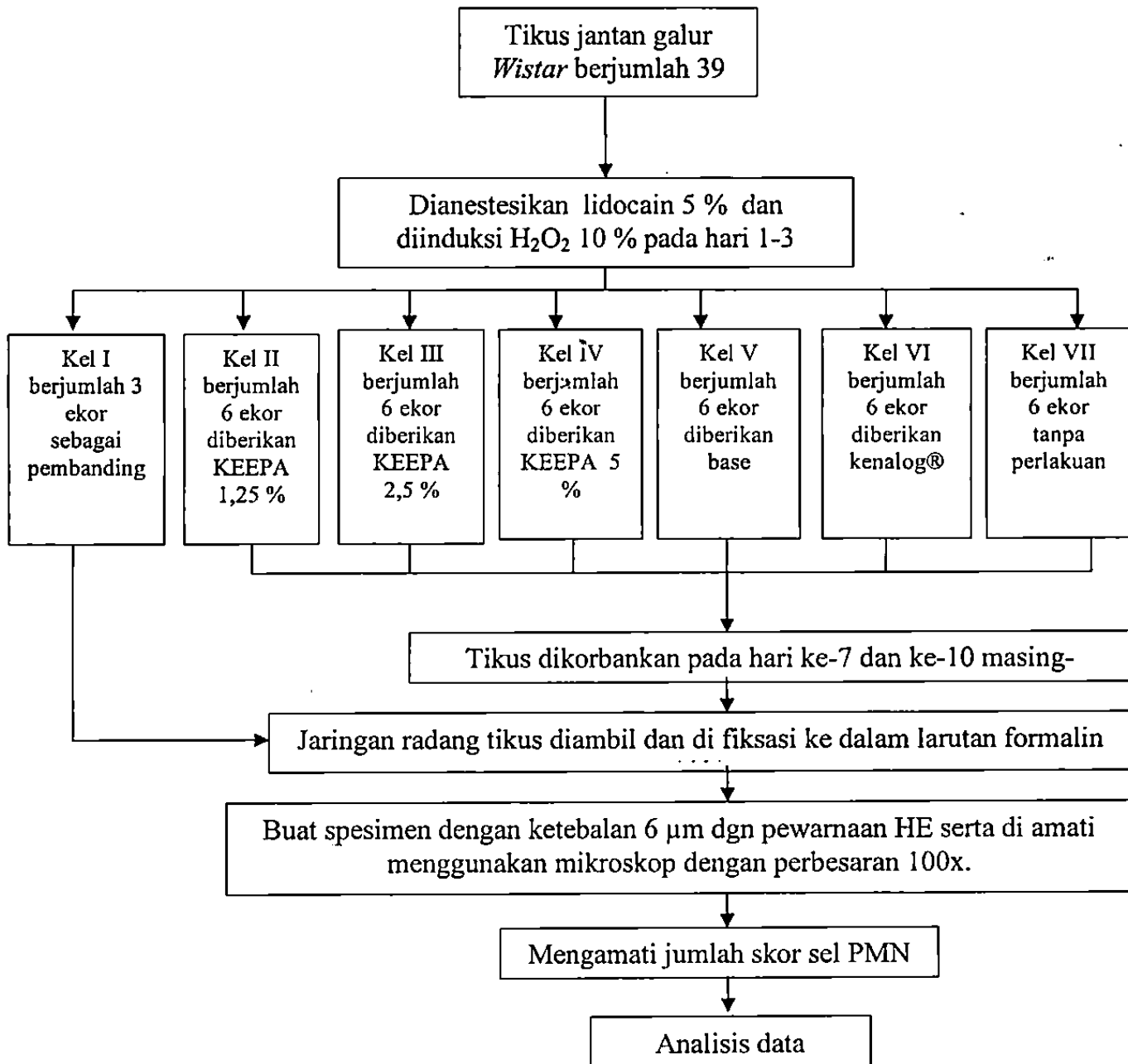
Pengamatan proses penyembuhan luka pada gingiva menggunakan pengamatan histologi dengan metode pengukuran *differential counting*, yaitu menghitung jumlah sel PMN pada 10 kali lapang pandang dengan pembesaran 100 x 10. Penilaian jumlah sel PMN dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Penilaian skor sel PMN

Jumlah sel PMN	Skor
0	0
1-5	1
6-10	2
11-15	3
16-20	4
Terbentuk nodulus limfatikus	5

H. Analisis data

Hasil uji normalitas menunjukkan distribusi data tidak normal sehingga digunakan uji hipotesis *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui signifikansi antar variabel.



Gambar 5. Alur penelitian