

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

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

#### B. Sampel Penelitian

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

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

n = Jumlah sampel untuk tiap kelompok

Z = nilai standar untuk  $\alpha$  0,05 (tingkat kepercayaan 95%) dengan nilai

Z 1,96

$\alpha$  = nilai standar deviasi

d = rentang nilai yang diinginkan

Data standar deviasi dari penelitian sebelumnya belum ada, oleh karena itu diasumsikan nilai  $\alpha$  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. Tempat dan Waktu Penelitian**

### **1. Tempat**

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

### **2. Waktu**

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

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

### **1. Kriteria Eksklusi**

- a) Tikus *Sprague-Dawley* betina yang sedang hamil

### **2. Kriteria Inklusi**

- a) Spesies tikus : *Sprague-Dawley*
- b) Berat badan tikus :  $\pm 170-200$  gram
- c) Jenis kelamin tikus : betina
- d) Umur tikus : 3 bulan

## **E. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel bebas**

- a) Ekstrak tepung tempe kedelai

### **2. Variabel terikat**

- a) Ketebalan epitel pada penyembuhan ulkus traumatik

### **3. Variabel terkontrol**

- 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. Tikus yang mengalami defisiensi hormon estrogen didapatkan dengan cara ovariektomi. Tikus ovariektomi adalah tikus yang telah dilakukan pemotongan ovarium. Ovariektomi penelitian ini dilakukan pada bagian tengah perut.
3. Ulkus traumatik diinduksi dengan *scraping* pada gingiva tikus menggunakan *scalpel* pada gingiva cekat dekat mukosa regio 3 mandibula.
4. Ketebalan epitel adalah ketebalan epitel pada 3 lapang pandang pada mikroskop cahaya dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).
5. Hormon estrogen adalah kadar hormon 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 plastik kecil, pipet tes, spatula, grinder, cawan porselen 75cc, saringan tepung 70mesh 'Retsch', *Lab Stirrer electricity*, *waterbath*, baki *stainless steel*, baki plastik, pisau, talenan, sendok plastik, 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 sirurgis (*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 menggunakan hematokrit.
- d) Alat induksi ulkus traumatik berupa *scalpel*.
- e) Alat pembuatan preparat terdiri dari mikroskop cahaya, *object glass*, *deck glass*, kontainer spesimen.
- 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 *xylozin* (anestesi), benang silk nomor 3 (*One med*), benang *cutgut* 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 *Xylol*, alkohol, air mengalir, akuades, bahan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* (HE).
- d) Bahan yang diaplikasikan pada ulkus traumatik berupa gel kenalog.

## H. Cara Kerja Penelitian

### 1. Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Tempe kedelai murni dipotong kecil kemudian ditimbang berat basah dan dioven pada suhu  $+50^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari kemudian digiling menggunakan grinder sampai menjadi tepung. Dilakukan pengayakan 70 mesh untuk mendapatkan tekstur tepung tempe yang halus, selanjutnya tepung tempe tersebut direndam dengan 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 di *waterbath* selama  $\pm 8$ jam 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 4 (ovariektomi, induksi ulkus traumatik, tanpa kenalog, tanpa ekstrak tepung tempe kedelai) dan kelompok 5 (ulkus). Tikus diberi pakan dan air minum *ad libitum*.

### **3. Ovariektomi tikus**

Ovariektomi diawali dengan anestesi menggunakan ketamin HCL 100 mg secara intramuskular. Tikus difiksasi di meja operasi. Rambut tikus pada area perut dicukur, kemudian bagian perut tengah di insisi dan dilakukan ligasi pembuluh darah serta pengambilan ovarium. Selanjutnya, daerah yang diinsisi dijahit kembali dan diolesi dengan betadin. Setelah itu tikus diistirahatkan selama 7 hari untuk penyembuhan luka ovariektomi dan penyesuaian hormonal.

### **4. Pemberian ekstrak tepung tempe**

Pada hari ke-16 tikus diberikan ekstrak tepung tempe kedelai. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu sebanyak

0,63 gr/ml. Perlakuan diberikan setiap hari pada siang hari. Pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung sesuai dengan dosis satu kali sehari selama 30 hari. Setelah aplikasi perlakuan kemudian dilakukan induksi ulkus traumatik.

#### **5. Induksi Ulkus Traumatik**

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

#### **6. Pengolesan Kenalog**

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

#### **7. Pengambilan sampel gingiva**

Pengambilan sampel gingiva dilakukan dengan *euthanasia* terlebih dahulu. 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 data analisis kadar hormon estrogen**

Pengambilan darah tikus yang pertama dilakukan pada hari ke-8 setelah satu minggu masa adaptasi, yaitu sesaat sebelum proses ovariektomi. Pengambilan darah hari ke-8 dilakukan pada semua

kelompok tikus. Pengambilan darah tikus yang kedua pada hari ke-16 yaitu pada kelompok tikus yang di ovariektomi. Pengambilan darah ketiga yaitu hari ke-47 pada semua kelompok tikus untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak tepung tempe kedelai pada kadar hormon dalam darah tikus. Plasma darah tikus dipisahkan dari *centrifuge* kemudian disimpan dalam *freezer* pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  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 yaitu alkohol 70% sampai 100%. Kemudian dilakukan penjernihan jaringan gingiva dengan *xylol*.

### 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 yang telah dicairkan dalam oven (suhu 57 – 59°C). Setelah itu, jaringan yang telah selesai diinfiltrasi kemudian dikeluarkan dan segera dimasukkan kedalam cetakan blok yang sebelumnya telah diisi paraffin cair kemudian cetakan dilepas setelah  $\pm 20$  menit mengeras.

e) Pemotongan

Sebelum dipotong dengan mikrotom, blok didinginkan terlebih dahulu dengan cara dimasukkan ke dalam plastik yang berisi air dan dimasukkan kedalam *freezer* selama  $\pm 15$  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 *waterbath* yang telah diisi air yang dihangatkan  $\pm 50^\circ\text{C}$ . Setelah itu diambil dengan objek *glass* dan dibiarkan  $\pm 5$  menit lalu diinkubasi.

f) Inkubasi

Preparat diinkubasi dengan suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$  selama  $\pm 15$  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 selam 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  $\pm 30$  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*.

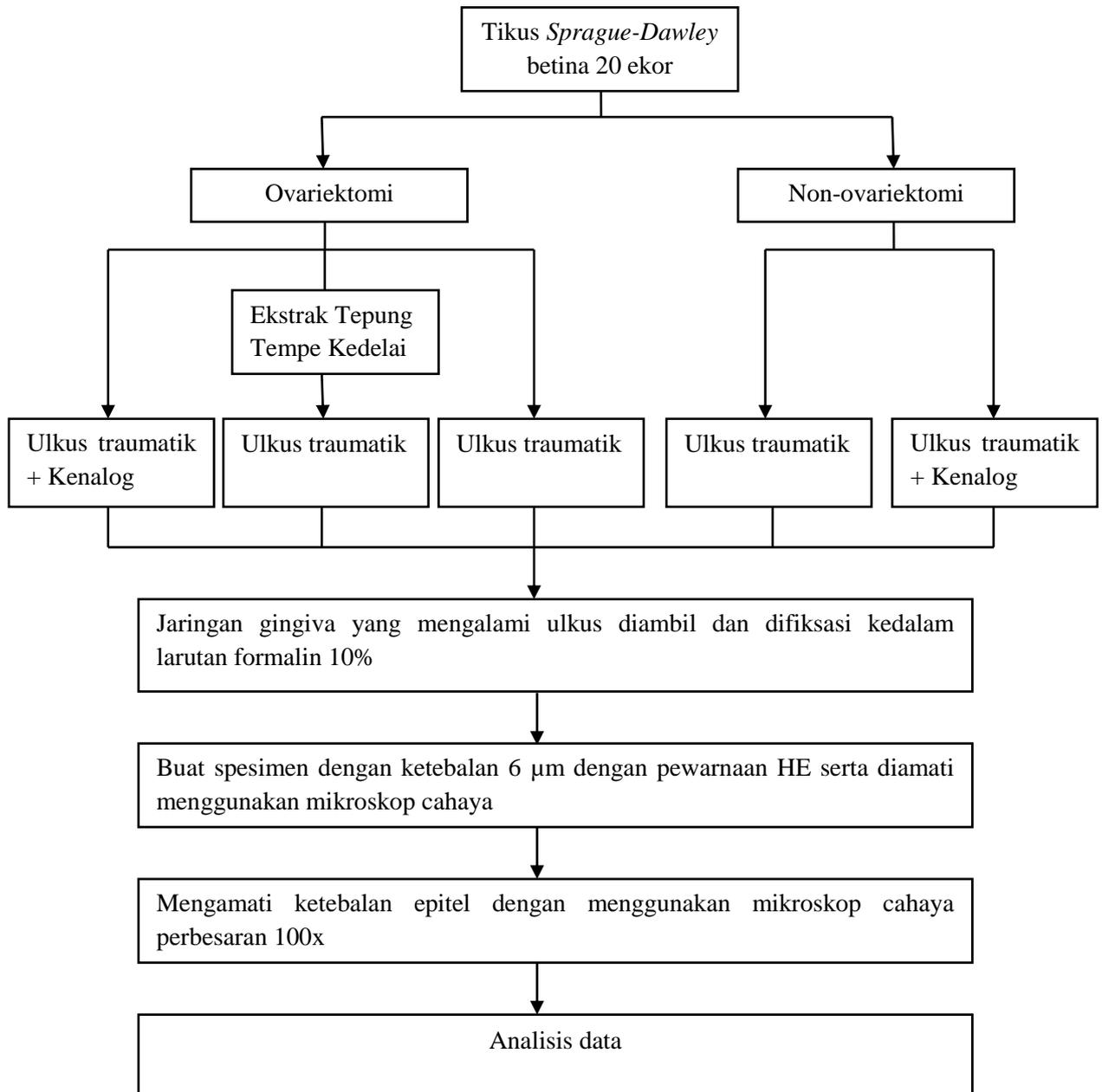
**10. Pemusnahan hewan uji**

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

## **11. Pengamatan dan Pengumpulan Data**

Ketebalan epitel dinilai dengan cara mengukur ketebalan lapisan epitel skuamosa stratifikasi yang tampak berwarna merah jambu dan inti berwarna biru dengan pengecatan *Hematoksin-Eosin* (HE), dengan pengamatan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x.

## I. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

## **J. Analisis Data**

Pada penelitian ini analisis data 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 data dianalisis dengan *One Way ANOVA* karena jenis hipotesis dari penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel >2. Adapun jika data memiliki persebaran tidak normal, maka analisis data yang digunakan adalah *Kruskall-Wallis*.