

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian dengan rancangan eksperimental dengan *randomized pre-post test control group design*.

Desain ini melibatkan 2 kelompok subjek, kelompok pertama diberikan perlakuan eksperimental atau kelompok eksperimen dan kelompok yang lain tidak diberi apa-apa atau yang disebut kelompok kontrol. Dari desain ini efek suatu perlakuan terhadap variabel dependen akan di uji dengan cara membandingkan keadaan variabel dependen pada kelompok eksperimen diberikan perlakuan dengan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan.

### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada Oktober–November 2014, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk proses pembuatan ekstraksi. Identifikasi dan determinasi sampel dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi–LIPI Bogor. Perawatan dan perlakuan sampel bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Pemeriksaan jumlah morfologi pada mukosa mulut tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### 3.3 Sumber Data

Sesuai dengan rancangan penelitian, maka sampel tikus dalam penelitian ini jumlahnya 30 dan dibagi dalam lima kelompok yang tidak berpasangan, yaitu satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan. Kelompok kontrol mendapat pemberian akuades. Satu kelompok perlakuan mendapat pemberian ekstrak daun lidah buaya konsentrasi 25%, satu kelompok perlakuan mendapat pemberian ekstrak daun lidah buaya konsentrasi 50%, satu kelompok perlakuan mendapat pemberian ekstrak daun lidah buaya konsentrasi 75%, dan satu kelompok perlakuan mendapat pemberian ekstrak daun lidah buaya konsentrasi 100%.

#### 3.3.1 Besar sampel

Untuk menghitung besar sampel di gunakan rumus Frederer (Hanafiah, 2004). sebagai berikut :

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

Dari rumus di atas dapat dilakukan perhitungan besaran sampel sebagai berikut :

$t = 5$ , maka didapatkan :

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

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

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$(4n-4) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4.75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

n : jumlah ulangan (replikasi)

t : jumlah perlakuan

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 ekor per kelompok. Untuk menghindari *drop out* pada sampel ditambahkan 10 % sehingga jumlah sampel menjadi 6 ekor per kelompok. Jadi jumlah sampel seluruhnya adalah 30 ekor.

### 3.3.2 Kriteria sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

Kriteria Inklusi:

- a. Tikus putih jantan dewasa (*Sprague dawley*)
- b. Umur 3 bulan
- c. Berat badan tikus 180–200 gram
- d. Kesehatan umum baik

Kriteria Eksklusi :

- a. Tikus tidak mau makan selama masa adaptasi.
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- c. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, botak dan aktivitas kurang/tidak aktif).
- d. Mati selama masa pemberian perlakuan.

### 3.4 Identifikasi Variabel

**3.4.1 Variabel bebas:** Ekstrak daun lidah buaya konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

**3.4.2 Variabel tergantung:** Jumlah makrofag pada radang mukosa mulut tikus putih jantan

**3.4.3 Variabel terkendali:**

- a. Galur tikus: Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*
- b. Umur tikus: 3 bulan
- c. Jenis kelamin tikus: Jantan
- d. Berat badan tikus: 180–200 gram
- e. Jenis makanan tikus: Pelet broiler–11 dan air

### 3.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun lidah buaya: adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstrak zat aktif daun lidah buaya menggunakan etanol 70% yang diperoleh secara maserasi. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak daun lidah buaya setelah diencerkan dengan akuades hingga mencapai konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100 %.
2. Radang mukosa mulut: adalah peradangan mukosa mulut yang ditandai dengan lesi berupa bercak putih kekuningan, bentuk bulat atau oval, dengan diameter antara 2–3 mm, dan dikelilingi oleh pinggiran yang kemerahan. Pada penelitian ini lesi dibuat dengan pengolesan bahan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 30% menggunakan *microbrush* (diameter 2

mm) pada bagian mukosa labial di bawah *frenulum insisivus central* rahang bawah sehingga terjadi iritasi mukosa labial tikus.

3. Makrofag dinilai dengan menghitung jumlah sel makrofag di daerah radang mukosa labial mulut, yang telah dibuat preparat mikroskopis dengan pengecatan *Harris Hematoxylin–Eosin* dan dilihat pada lima lapang pandang dengan menggunakan mikroskop elektrik dengan pembesaran 400x.

### **3.6 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.6.1 Bahan penelitian**

a. Bahan utama :

1. Mukosa labial tikus
2. Ekstrak daun lidah buaya 25%, 50%, 75%, dan 100%

b. Bahan penunjang

1. Anastesi seperti *Xylonor* dan *Chloroform*
2. Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 30%
3. Akuades steril (kontrol)
4. Cat *Harris Hematoxylin–Eosin*
5. Alkohol 70%
6. Larutan *formaldehid* 10%

### 3.6.2 Alat penelitian :

1. Mikroskop elektrik (*Olympus Type CX 21*)
2. *Scalpel*
3. Pinset
4. *Cotton buds*
5. *Microbrush* (diameter 2 mm)
6. Gunting bedah
7. *Stop watch*
8. Dan lain–lain.

## 3.7 Jalannya Penelitian

### 3.7.1 Penentuan Kelompok

Penelitian ini memakai 30 ekor tikus putih jantan umur 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II, kelompok perlakuan III, dan kelompok perlakuan IV, seperti tampak pada gambar 4. Dengan tiap kelompok terdapat 6 ekor tikus, dan mendapat pengolesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% dengan menggunakan *microbrush* pada jaringan mukosa labial mulut 1 kali tiap 5 menit sebanyak 2 kali tiap hari selama 6 hari berturut–turut bertujuan untuk membuat radang, seperti tampak pada Gambar 6 dan 7.



**Gambar 6.** Penentuan Kelompok Tikus.



**Gambar 7.** Pengolesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

### 3.7.2 Pembuatan Ekstrak Lidah Buaya

Ekstrak daun lidah buaya didapat dengan cara menggiling halus daun lidah buaya dengan panjang kira-kira 50 cm, tebal 2,5 cm yang telah dibersihkan dan dihilangkan durinya. Kemudian ditambah etanol 70% diaduk selama 30 menit dengan *stirrer magnetic* dan didiamkan selama 48 jam. Hasil maserasi disaring sebanyak 3 kali dengan corong *buctner* yang dilapisi kertas saring dan ditampung dengan *erlenmeyer*. Filtrat hasil penyaringan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator*. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan akuades sehingga mencapai konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% (Sulistiawati, 2011).

Proses pembuatan ekstrak lidah buaya ini seperti tampak pada Gambar 8–15.



**Gambar 8.** Pencucian Lidah buaya. **Gambar 9.** Pengeringan Lidah buaya.



**Gambar 10.** Proses Penimbangan. **Gambar 11.** Proses Pematangan.



**Gambar 12.** Ditambahkan Etanol 70% dan Didiamkan Selama 48 Jam.





**Gambar 13.** Hasil Maserasi Disaring dengan Corong *Buctner* Beserta Kertas Saring dan Ditampung dengan *Erlenmeyer*.



**Gambar 14.** Filtrat Hasil Penyaringan Diuapkan dengan *Vacum Rotary Evaporator*.



**Gambar 15.** Pengenceran dengan Akuades Sehingga Mencapai Konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

### 3.7.3 Proses Pemberian Ekstrak

Pemberian bahan obat dilakukan mulai pada hari ketujuh sebanyak 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari berturut-turut dengan menggunakan *cotton buds*.

- a. Kemudian untuk kelompok kontrol hanya dioleskan dengan akuades 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari berturut-turut.
- b. Kelompok perlakuan I diolesi ekstrak daun lidah buaya 25% 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari.
- c. Kelompok perlakuan II diolesi ekstrak daun lidah buaya 50% 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari.
- d. Kelompok perlakuan III diolesi ekstrak daun lidah buaya 75% 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari.
- e. Kelompok perlakuan IV diolesi ekstrak daun lidah buaya 100% 1 kali tiap 5 menit sebanyak 3 kali tiap hari selama 3 hari berturut-turut dengan menggunakan *cotton buds*.

Pengolesan dilakukan selama 5 menit karena dengan waktu tersebut obat sudah dapat berpenetrasi atau meresap ke dalam jaringan mukosa rongga mulut. Pengobatan dengan bahan ini selama 3 hari diharapkan sudah terjadi penurunan jumlah sel makrofag atau bahkan penyembuhan peradangan pada jaringan mukosa rongga mulut tikus.



**Gambar 16.** Gambaran Peradangan pada Bibir Tikus.



**Gambar 17.** Pengolesan Ekstrak Lidah Buaya.

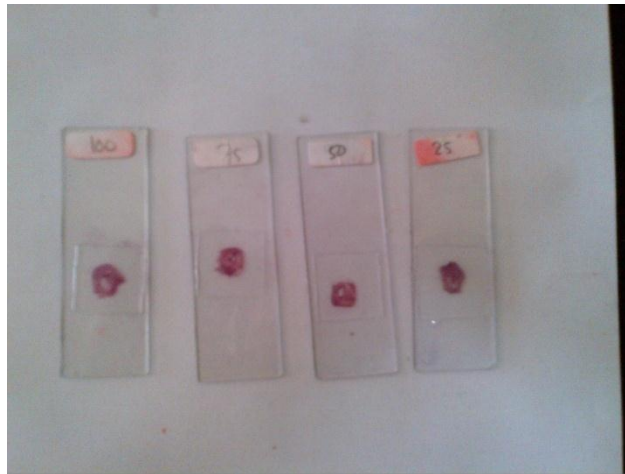
#### **3.7.4 Pembuatan Preparat**

Pada hari ke 10 semua hewan percobaan dilakukan dislokasi servikal dengan anestesi menggunakan *chloroform*. Kemudian dibuat spesimen mukosa labial rahang bawah, selanjutnya jaringan difiksasi dengan *formaldehid* 10% dan dibuat sediaan mikroskopik. Untuk semua spesimen, pemotongan dengan mikrotom dilakukan dengan ketebalan 5 mikron, diambil untuk diwarnai dengan *Harris Hematoxylin Eosin*. Perbandingan antar kelompok dilakukan dengan pemeriksaan

mikroskopik dengan pembesaran 400x dan masing–masing sediaan dinilai dengan menghitung jumlah sel radang makrofag pada lima lapang pandang pada setiap sediaan mikroskopis.



**Gambar 18.** Fiksasi Jaringan dengan *Formaldehid* 10%.



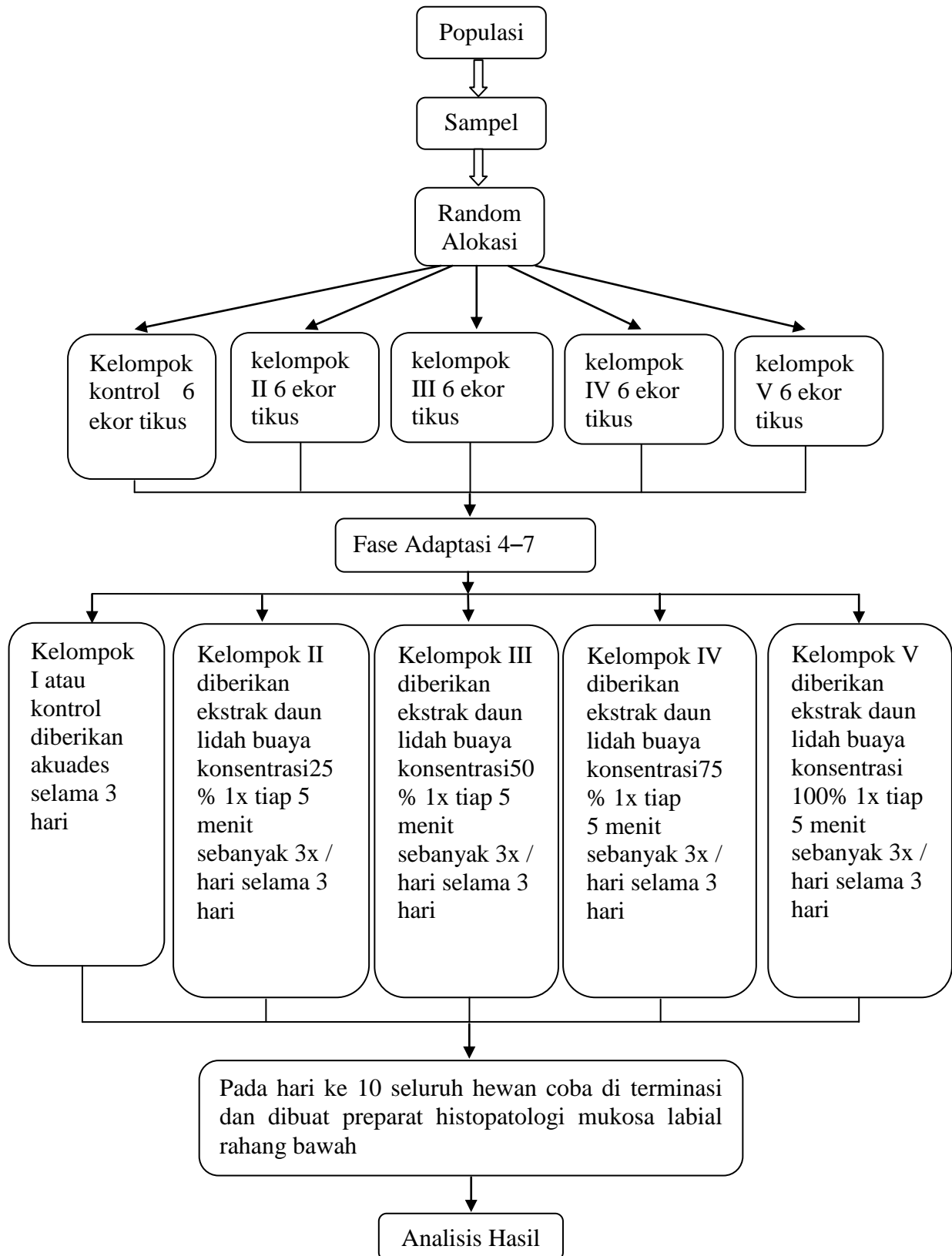
**Gambar 19.** Jaringan yang Telah Selesai Dibuat Sediaan Preparat.



**Gambar 20.** Hewan Percobaan Dimatikan dengan Anastesi Menggunakan *Chloroform* dan *Cervical Dislocation*.

### 3.8 Analisis Data

- a. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal ( $p > 0,05$ ) atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *shapiro-wilk* karena jumlah sampel  $\leq 50$ .
- b. Kemudian dilakukan uji homogenitas *Levene's* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varian yang sama ( $p > 0,05$ ) atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, akan dilanjutkan dengan metode *one way anova*. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen (tidak memenuhi syarat parametrik), akan diuji dengan uji *kruskal-wallis*.
- c. Jika pada uji *one way anova* menghasilkan nilai  $p < 0,05$  dengan hipotesis dianggap bermakna, maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci.



**Gambar 21.** Rancangan Penelitian.

### 3.9 Aspek Penelitian

#### Pemeliharaan Hewan Coba

1. Pemeliharaan hewan coba sebelum intervensi:

- Dilakukan fase adaptasi selama kurang lebih 7 hari, hal ini dilakukan untuk membuat hewan coba dapat menyesuaikan diri dengan tempat barunya agar hewa coba merasa nyaman. Diberikan makan menggunakan pelet 781 kurang lebih sebanyak 1 sendok makan untuk 2 tikus, diberikan sebanyak 3 kali sehari yaitu pagi siang dan sore, dan diberikan minum menggunakan alat khusus yang telah disesuaikan untuk hewan coba.

2. Pemeliharaan hewan coba selama intervensi:

- Dilakukan induksi menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 6 hari menggunakan *cotton buds* dengan cara mengoleskan pada bibir hewan coba sebanyak 2 kali dengan interval 5 menit dalam satu hari.
- Dilakukan pemberian ekstrak daun lidah buaya pada hari ke 7 selama 3 hari, dengan cara yang sama namun pada pemberian ekstrak daun lidah buaya dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 5 menit dalam satu hari.
- Selama perlakuan makan dan minum tetap diberikan seperti biasa.

3. Pemeliharaan hewan coba setelah intervensi:

- Pada hari ke 10 hewan coba di terminasi dengan cara pemberian anestesi *chloroform* pada kapas yang telah disiapkan dalam wadah yang kedap udara, di tutup selama 3 menit, setelah itu masukkan hewan coba ke dalam wadah tersebut kurang lebih 2 menit sampai tidak lagi dapat mengangkat tubuhnya atau berdiri dan terlihat pucat pada sekujur tubuhnya, kemudian dilakukan *cervical dislocation* pada hewan coba. Namun pada kondisi tertentu tanpa harus dilakukan *cervical dislocation* hewan coba dapat langsung mati.