

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Desain penelitian ini ialah eksperimental laboratoris *in vivo* dengan menggunakan hewan uji.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### 1. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Daun pepaya diperoleh dari Perkebunan Muntilan.
- b. Pembuatan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) dilaksanakan di Laboratorium Farmasi unit II Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c. Pembuatan gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) dilaksanakan di Laboratorium Farmasi unit II Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- d. Penelitian pada hewan uji dan perlukaan gingiva tikus (*Sprague dawley*) jantan di FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### 2. Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Desember 2015 sampai dengan Januari 2016.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### 1. Tikus (*Sprague dawley*) jantan

Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus yang diperoleh dari Abadi Jaya, Gandok gg Narodo No. 3X, Condong Catur Depok, Sleman, Yogyakarta. Tikus yang digunakan 33 ekor dengan kriteria: jenis kelamin jantan dengan berat sekitar 200 – 250 gram dan

umur  $\pm 3$  bulan. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada tikus dikendalikan.

2. Daun pepaya (*Carica papaya*)

Daun pepaya diperoleh dari Perkebunan Muntilan yang sehat dengan ciri berwarna hijau dan tampak bersih.

3. Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer(1963) :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

sehingga didapatkan,

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

$$(n-1) (3-1) \geq 15$$

$$(n-1) (2) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5 (n= 9)$$

Dengan pembulatan maka  $n=9$  dan asumsi *drop out* 2 tiap kelompok, sehingga jumlah subyek penelitian yang digunakan pada tiap kelompok  $n=11$  ekor. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan, sehingga total subyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 33 ekor tikus (*Sprague dawley*)jantan.

#### D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Subyek penelitian yang digunakan adalah 33 ekor tikus (*Sprague dawley*) jantan dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

##### 1. Kriteria inklusi

###### a. Tikus jantan

- 1) Jenis kelamin : jantan
- 2) Umur :  $\pm 3$  bulan
- 3) Berat : 200-250 gram
- 4) Dalam keadaan sehat dan aktif

###### b. Daun pepaya

Daun pepaya dengan keadaan baik yang berwarna hijau.

##### 2. Kriteria eksklusi

###### a. Tikus jantan

- 1) Jenis kelamin : betina
- 2) Umur :  $\neq \pm 3$  bulan
- 3) Berat :  $\neq 200-250$  gram
- 4) Diketahui terjangkit penyakit atau tidak aktif
- 5) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai

###### b. Daun pepaya

Daun pepaya yang akan busuk dengan berwarna hijau kekuningan atau kecoklatan.

## E. Variabel dan Definisi Operasional

### 1. Variabel

#### a. Variabel pengaruh

Perlakuan coba : Gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*)

Perlakuan kontrol : Mengaplikasikan *Kenalog in orabase* pada luka gingiva tikus (*Sprague dawley*) jantan untuk kontrol positif serta perlakuan aquades.

#### b. Variabel terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah penurunan diameter ukuran luka dan peningkatan jumlah fibroblas.

#### c. Variabel terkendali

1) Jenis kelamin tikus, yaitu tikus (*Sprague dawley*) jantan

2) Umur tikus sekitar  $\pm 3$  bulan

3) Berat tikus 200-250 gram

4) Makanan tikus menggunakan pellet AD-2

5) Air minum : air mineral

6) Area gingiva yang dilukai

7) Alat pengolesan hidrogen peroksida

8) Konsentrasi gel ekstrak

9) Konsentrasi hidrogen peroksida

#### d. Variabel tidak terkendali

1) Infeksi bakteri

2) Penurunan berat badan tikus jantan

### 3) Komplikasi pasca perlukaan gingiva

## 2. Definisi Operasional

### a. Ekstrak daun pepaya

Ekstrak daun pepaya adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstrak zat aktif daun pepaya menggunakan etanol 70%, yang diperoleh dengan cara maserasi. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak daun pepaya setelah diencerkan dengan aquades hingga mencapai konsentrasi 75%.

### b. Gel ekstrak daun pepaya

Gel merupakan sediaan semi padat digunakan pada kulit, umumnya sediaan tersebut berfungsi sebagai pembawa pada obat-obat topikal, pelunak kulit atau sebagai pelindung. Pembuatan gel ekstrak daun pepaya terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-bahan seperti natrium CMC (CMC-Na) 5 gram dan aquades 100 gram (10%) steril, sehingga diperoleh gel daun pepaya 75%.

### c. Luka gingiva

Luka gingiva adalah hilang atau rusaknya sebagian jaringan gingiva. Luka gingiva yang disebabkan oleh bahan hidrogen peroksida berupa luka bakar.

### d. Penyembuhan luka

Penyembuhan luka merupakan proses untuk mengembalikan keutuhan jaringan yang rusak. Proses tersebut dibagi menjadi tiga fase,

yaitu inflamasi, proliferasi dan *remodelling*. Penyembuhan luka dapat diamati dari penurunan ukuran diameter luka. Luka dinyatakan sembuh apabila ukuran diameter luka sudah mencapai 0,0 mm. Dapat pula diamati dari peningkatan jumlah sel fibroblas secara histologi.

e. Sel Fibroblas

Fibroblas merupakan sel besar, gepeng, bercabang-cabang, yang dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform. Dalam beberapa situasi, fibroblas ditemukan dalam bentuk stelata gepeng dengan beberapa cabang langsing. Inti panjangnya terlihat jelas, namun garis bentuk selnya mungkin sukar dilihat pada sediaan histologis.

f. Bahan *bleaching*

Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) merupakan salah satu bahan yang digunakan sebagai bahan pemutih gigi. Hidrogen peroksida merupakan oksidator kuat, sehingga apabila saat pemakaiannya tidak berhati-hati maka akan menimbulkan luka pada gingiva berupa iritasi serta ulserasi. Pada praktek dokter gigi hidrogen peroksida yang biasanya digunakan adalah konsentrasi 35%.

## F. Instrumen Penelitian

1. Bahan

- a. Daun pepaya (*Carica papaya*)
- b. *Kenalog in orabase*, sebagai pembanding ke-1
- c. Hidrogen peroksida 35% , didapat dari Bratachem

- d. Etanol 70%, untuk pelarut ekstrak
  - e. Tikus (*Sprague dawley*) jantan
  - f. Natrium CMC (CMC-Na) 5 gram
  - g. Aquades 100ml steril
  - h. Formalin 10%
  - i. Pellet AD-2, pakan tikus
  - j. Alkohol 70%
  - k. Kloroform, untuk bius sebelum dekapitasi tulang rahang
  - l. Xylol
  - m. Bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE
2. Alat
- a. Penyaring, untuk menyaring ekstrak
  - b. Pemanas, untuk memanaskan larutan
  - c. Timbangan, untuk menimbang bahan
  - d. Blender, untuk menghaluskan daun pepaya yang sudah kering
  - e. Gelas ukur dan gelas beker, sebagai alat ukur
  - f. *Water bath*, pemanas bahan
  - g. Cawan porselin, wadah pemanas bahan
  - h. Sendok stainless steel, pengaduk gel
  - i. Mortil, tempat pencampuran bahan
  - j. Botol gel, untuk menyimpan gel
  - k. Mikro brush, untuk pengolesan dalam perlakuan
  - l. Kapas

- m. Jangka sorong, untuk pengukuran diameter luka pada gingiva tikus
- n. Mikroskop cahaya, untuk pengamatan jumlah fibroblas
- o. Kamera
- p. Sarung tangan
- q. Masker
- r. Handscoon
- s. Kandang tikus diberi kode nomor
- t. Gunting bedah, untuk mengambil rahang
- u. Pinset

## **G. Cara Kerja**

1. Tahap persiapan
  - a. Ekstraksi bahan uji

Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya dilakukan di Laboratorium Farmasi unit II UGM. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Tiga kilogram daun pepaya dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian di keringkan. Langkah selanjutnya, daun pepaya dipotong-potong kecil. Kemudian dioven pada suhu 50<sup>0</sup>C sampai kering selama 5 hari. Daun tersebut dihaluskan dengan blender menjadi serbuk.

Serbuk daun pepaya dimasukkan ke dalam maserator, lalu ditambahkan ethanol 70% dan dilakukan pengadukan selama 30 menit sampai homogen. Campuran serbuk daun pepaya dan ethanol 70% dibiarkan termaserasi selama sehari dalam maserator tertutup. Setelah

itu, maserat disaring dari ampasnya dan diendapkan selama dua hari. Kemudian pisahkan maserat dari endapannya. Maserat dituang pada tabung *rotavapour* lalu dimasukkan ke dalam penguap putar (*rotavapour*) pada suhu 70<sup>0</sup>C, kemudian diuapkan kembali pada waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak daun pepaya dienceran dengan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian yaitu 75%.

b. Pembuatan bentuk sediaan gel

Pembuatan gel ekstrak daun pepaya dilakukan pada Laboratorium Farmasi unit II UGM. Pembuatan gel terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-bahan seperti natriumCMC (CMC-Na) 5 gram dan aquades 100 gram (10%) steril.

Adapun proses pembuatan gel adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan bahan dasar pembuat gel yaitu serbuk CMC-Na.
- 2) Menimbang CMC-Na seberat 5 gram, masukkan ke dalam gelas ukur.
- 3) Melarutkan bahan dasar dengan aquades sebanyak 100 gram untuk gel konsentrasi 75%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.
- 4) Menambahkan ekstrak daun papaya 100 gram untuk gel konsentrasi 75%.

- 5) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan satukan dengan serbuk CMC-Na, aduk sampai rata sehingga membentuk masa gel.
- 6) Setelah bahan menjadi padat akan menghasilkan 50gram gel ekstrak daun pepaya konsentrasi 75%. Gel tersebut di masukkan kedalam botol gel dan disimpan didalam lemari es bersuhu 4-6°C.

c. Cara pengaplikasian gel

- 1) Menyiapkan gel ekstrak daun pepaya
- 2) Mengambil gel dengan menggunakan mikro brush ,1ml dan dioleskan pada gingiva yang dilukai, pengolesan dilakukan 1 kali sehari pada sore hari.
- 3) Perlakuan tersebut terus dilakukaan dari hari pertama sampai hari ketujuh pasca perlukaan gingiva tikus jantan.

d. Persiapan hewan uji

Persiapan sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan selama 3 hari untuk menghindari tikus yang stress dan membuat lingkungan udara dan kandang agar stabil. Hewan uji yang berjumlah 33 ekor dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok I (perlakuan *kenalog in orabase*) sebanyak 11 ekor, kelompok II perlakuan gel ekstrak daun pepaya (konsentrasi 75%) sebanyak 11 ekor dan kelompok III (perlakuan aquades) sebanyak 11 ekor. Masing-masing kelompok dikandang yang berbeda dan diletakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

## 2. Jalannya penelitian

### a. Induksi luka pada tikus *Sprague Dawley*

Setelah tikus dapat beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Dilakukan perlakuan dengan mengoleskan hidrogen peroksida 35% menggunakan mikrobrush dan ditunggu hingga 24 jam. Luka yang akan nampak berupa luka melepuh berwarna keputihan yang diakibatkan oleh zat kimia tergolong sebagai luka bakar.

Tiga puluh tiga ekor tikus dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu 11 ekor tikus untuk kelompok I perlakuan *Kenalog in orabase* (kelompok I), 11 ekor tikus untuk kelompok II perlakuan gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) konsentrasi 75% (kelompok II) dan 11 ekor tikus untuk kelompok III perlakuan aquades (kelompok III).

Pada hari ke-0, 33 ekor tikus (*Sprague dawley*) jantan diberi perlakuan dengan mengoleskan hidrogen peroksida 35% menggunakan mikrobrush, kemudian mulai diberi perlakuan pada hari ke-1 atau 24 jam setelah pengolesan hidrogen peroksida 35% serta diukur diameter lukanya menggunakan jangka sorong.

Tikus yang sudah dikelompokkan dan diukur diameter lukanya diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Tikus pada kelompok I diberi perlakuan *kenalog in orabase*. Tikus pada kelompok II diberi perlakuan gel ekstrak daun pepaya muda (*Carica papaya*) konsentrasi 75%. Tikus pada kelompok III diberi perlakuan aquades. Pemberian setiap perlakuan sebanyak 0,1 ml dan pengolesannya

menggunakan mikro brush. Pemberian perlakuan sebanyak 1 kali sehari pada sore hari. Dilakukan pengamatan diameter luka pada hari ke-0, 1, 3, 5 dan 7 menggunakan jangka sorong. Keadaan luka difoto dengan jarak kamera dan luka yang disamakan setiap kali diamati. Setelah diukur diameter lukanya, tiga ekor tikus dari masing-masing kelompok dikorbankan. Tikus didekapitasi (pengambilan rahang) dengan anestesi menggunakan kloroform.

b. Pembuatan preparat

Organ rahang yang telah didekapitasi kemudian dimasukkan ke formalin 10% untuk disimpan dan selanjutnya dibuat preparat. Metode pembuatan preparat histopatologi berdasarkan Dirjen Kesehatan Hewan (1999) adalah sebagai berikut :

- 1) Spesimen diambil segera setelah hewan mati, jika terlambat akan terjadi autolisis sehingga akan mengacaukan interpretasi.
- 2) Dilakukan pemotongan jaringan untuk spesimen agar berisi jaringan yang mengalami perubahan dari jaringan normal. Penelitian ini menggunakan pemotongan melintang.
- 3) Tebal spesimen tidak boleh lebih dari 5mm untuk mempermudah penetrasi jaringan fiksasi.
- 4) Spesimen difiksasi segera dengan formalin 10%.
- 5) Perbandingan volume spesimen dengan larutan formalin adalah 1:10, agar didapat hasil fiksasi yang sempurna.

- 6) Setiap kontainer spesimen diberi label yang berisi informasi tentang identitas hewan, tanggal pengambilan spesimen, macam spesimen dan bahan pengawet yang dipakai.
- 7) Kontainer tersebut harus tertutup rapat dan tidak boleh bocor.
- 8) Dihindarkan agar tidak membekukan jaringan yang akan dipilih dengan pemeriksaan histopatologi.

Untuk melihat sel fibroblas maka digunakan pewarnaan HE. Jaringan yang akan diberi pewarnaan diparafinisasi dengan menggunakan larutan *Xylo*l dan alkohol yang dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan alkohol, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades lalu dilap. Kaca benda kemudian dimasukkan ke dalam *Hematoksin Meyer's* dan dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades. Kaca benda kemudian dimasukkan ke dalam eosin dan dibilas dengan aquades, kemudian pewarnaan dinilai di bawah mikroskop cahaya. Bila pewarnaan telah dianggap baik maka langkah selanjutnya adalah proses dehidrasi dengan alkohol secara bertingkat kemudian dilap. Setelah itu dimasukkan ke dalam larutan *Xylo*l dan terakhir *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

Perhitungan jumlah sel fibroblas menggunakan mikroskop cahaya dengan pebesaran 40x. Penghitungan fibroblas dilakukan pada 5x lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel fibroblas yang

berupa sel besar, gepeng, bercabang-cabang, yang dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform dengan inti satu atau dua berbentuk lonjong dan tercat ungu pada pewarnaan HE.

#### **H. Cara Pengamatan dan Pengumpulan Data**

Perhitungan jumlah sel fibroblas menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x. Penghitungan fibroblas dilakukan pada 5x lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel fibroblas yang berbentuk berupa sel besar, gepeng, bercabang-cabang, yang dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform dengan inti satu atau dua berbentuk lonjong dan tercat ungu pada pewarnaan HE.

Selain itu teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah penurunan ukuran diameter luka pada hari ke-0, 1, 3, 5 dan 7 yang diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketepatan 0,1 mm dalam setiap mm.

#### **I. Analisa Data**

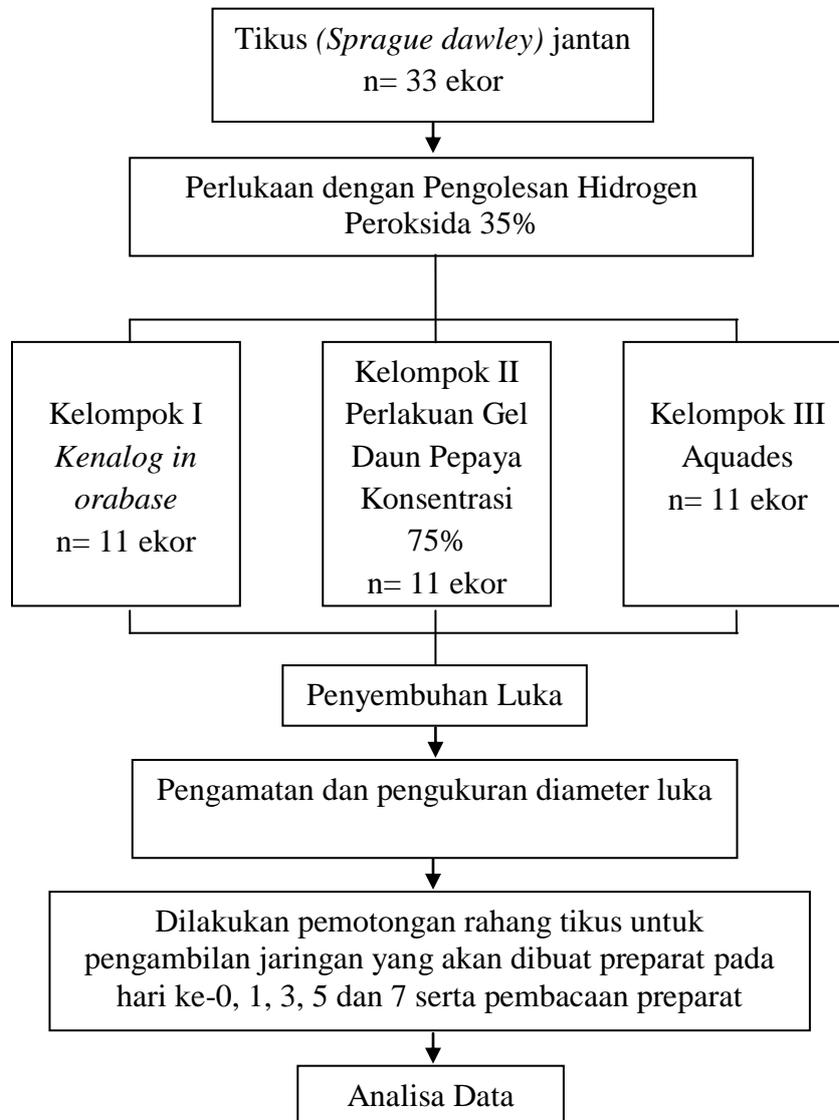
Data yang diperoleh dari hasil pengamatan berupa ukuran diameter luka dan jumlah sel fibroblas. Uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel sebanyak 33 (kurang dari 50). Uji hipotesis penelitian menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pada setiap kelompok, selanjutnya uji lanjutan dengan menggunakan uji *Least Significant Difference (LSD) Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok yang memiliki nilai signifikan tertinggi terhadap penurunan ukuran diameter luka

dan peningkatan jumlah fibroblas. Uji *One Way Anova* digunakan jika distribusi data normal, apabila tidak normal menggunakan uji Kruskal Wallis.

#### **J. Etik Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak subyek selama proses penelitian, untuk itu peneliti mengajukan *ethical clearance* dan mendapatkan persetujuan dari Tim Komite Etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta bahwa penelitian dilakukan tidak melanggar kode etik penelitian. Hewan coba tikus jantan pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan yaitu diberikan ruang gerak untuk tikus. Tikus tidak dilakukan pembatasan pakan dan air minum. Tikus jantan diberi pakan dan air minum sesuai kebutuhan dengan jenis nutrisi yang sama.

Manfaat yang diharapkan adalah untuk membuktikan secara ilmiah tentang efektifitas gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) terhadap penurunan ukuran diameter luka pada proses penyembuhan luka akibat bahan *bleaching* tikus (*Sprague dawley*) jantan.

**K. Alur Penelitian**

Gambar 5. Alur Penelitian