

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris *in vivo* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan, yaitu dengan melakukan tindakan terhadap subyek penelitian dan selanjutnya mempelajari dengan menganalisis efek yang timbul dari tindakan yang dilakukan terhadap subyek.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Daun Pepaya diperoleh dari perkebunan belimbing manis di Muntilan, Magelang, Jawa Tengah.
- b. Pembuatan ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L.*) dilaksanakan di Laboratorium Farmasi unit II Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- c. Pembuatan gel ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L.*) dilaksanakan di Laboratorium Farmasi unit II Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- d. Seleksi Hewan uji dan pengukuran diameter luka tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan di Laboratorium FKIK, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

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

C. Subyek dan Sampel Penelitian

1. Subyek

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan

Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus yang diperoleh dari Abadi Jaya, Gondok gang 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.

- b. Daun pepaya (*Carica Papaya L.*) diperoleh dari Muntilan, Magelang, Jawa Tengah. Daun pepaya berwarna hijau segar dan tampak bersih.

2. 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,

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$n = 8,5$$

jika dibulatkan 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 putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Inklusi

a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan

- 1) Jenis kelamin : Jantan
- 2) Umur : ± 3 bulan
- 3) Berat badan : 200-250 gram
- 4) Aktif

b. Daun papaya (*Carica Papaya* L.)

Daun papaya yang sehat adalah berwarna hijau segar dan tampak bersih

2. Eksklusi

a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan

- 1) Diketahui terjangkit penyakit atau tidak aktif
- 2) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai
- 3) Keadaan psikologi

- 4) Jenis kelamin : betina
- 5) Umur : \neq 3 bulan
- 6) Berat badan : \neq 200-250 gram
- b. Daun pepaya (*Carica Papaya L.*)

Daun pepaya yang busuk dan berwarna kecoklatan.

E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi variabel penelitian

a. Variabel pengaruh

1) Kontrol positif :

Perlakuan 1 : Mengaplikasikan *Kenalog in orabase* pada luka gingiva tikus (*Sprague dawley*) jantan

Perlakuan 2 : Mengaplikasikan Gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) pada luka gingiva tikus (*Sprague dawley*) jantan

2) Kontrol Negatif :

Mengaplikasikan Aquades pada luka gingiva tikus (*Sprague dawley*) jantan

b. Variabel terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah penurunan diameter luka dan jumlah sel makrofag pada proses penyembuhan luka iritasi gingiva pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan.

c. Variabel terkendali

- 1) Jenis kelamin tikus, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan
- 2) Umur tikus sekitar \pm 3 bulan
- 3) Berat tikus 200 gram hingga 250 gram
- 4) Makanan tikus menggunakan pellet broiler AD-2
- 5) Air minum yaitu air mineral
- 6) Area gingiva yang terkena perlukaan menggunakan micro brush pada bagian bawah gigi anterior tikus rahang bawah
- 7) Alat pengolesan hidrogen peroksida yaitu micro brush
- 8) Pembuatan ekstrak
- 9) Konsentrasi gel ekstrak
- 10) Pengukuran diameter luka
- 11) Pembacaan ukuran diameter luka
- 12) Konsentrasi hidrogen peroksida
- 13) Konsentrasi kloroform

d. Variabel tidak terkendali

- 1) Infeksi bakteri
- 2) Daya tahan tubuh atau imunitas tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan
- 3) Penurunan berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan
- 4) Komplikasi pasca pengolesan bahan *bleaching*

2. Definisi Operasional

- a. Luka gingiva dalam penelitian ini adalah perlukaan yang dilakukan pada gingiva tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan dengan menggunakan hidrogen peroksida yang mengakibatkan iritasi pada bagian gingiva.
- b. Yang dimaksud proses penyembuhan luka pada penelitian ini adalah proses dimana perlukaan pada bagian gingiva menuju ke titik pulih dan sembuh dilihat dari ukuran diameter luka dari hari ke hari.
- c. Bahan *bleaching* pada penelitian ini adalah bahan yang digunakan sebagai pemutih gigi yaitu hidrogen peroksida konsentrasi 35% yang mengakibatkan iritasi pada gingiva.
- d. Daun pepaya mempunyai kandungan saponin, tanin, dan flavonoid yang berfungsi dalam membantu proses penyembuhan luka pada penelitian ini adalah daun pepaya dengan konsentrasi 75% yang digunakan sebagai obat herbal untuk penyembuhan luka pada gingiva yang diakibatkan oleh iritasi bahan *bleaching*.
- e. Yang dimaksud pengukuran diameter luka dalam penelitian ini adalah gambaran dari diameter luka dilihat menggunakan alat ukur jangka sorong dengan melihat jumlah satuan mm atau cm dari hari ke hari.
- f. Ekstrak daun pepaya pada penelitian ini yaitu ekstrak yang diambil dari daun pepaya yang digunakan sebagai obat herbal untuk mempercepat proses penyembuhan luka pada gingiva akibat dari iritasi hidrogen peroksida.

- g. Gel ekstrak daun pepaya pada penelitian ini adalah bentuk sediaan dari ekstrak daun pepaya yang digunakan dalam penyembuhan luka pada gingiva dengan cara topikal dalam mengaplikasikannya.
- h. Yang dimaksud *in vivo* pada penelitian ini adalah penelitian yang dilakukan dalam lingkungan buatan dan di dalam jaringan makhluk hidup dengan memberikan gel ekstrak daun pepaya, aquades dan *kenalog* secara topikal pada tikus putih.
- i. Sel makrofag pada penelitian ini adalah sel raksasa yang berbentuk tidak teratur dan mempunyai inti yang bulat serta dapat bergabung dengan sel-sel makrofag lainnya.

F. Instrumen Penelitian

1. Bahan

- a. Daun pepaya (*Carica Papaya L.*) sebagai bahan dasar ekstrak
- b. *Kenalog in orabase* sebagai kelompok perlakuan I
- c. Etanol 70%, untuk pelarut ekstrak
- d. Tikus (Sprague Dawley) jantan sebagai hewan uji
- e. *Natrium CMC (CMC-Na)* sebagai bahan tambahan dalam pembuatan gel
- f. *Aquades* 100ml murni sebagai kontrol negatif
- g. *Pellet broiler AD-2*, bahan pakan tikus
- h. Alkohol 70%
- i. *Stik pH* universal untuk mengukur Ph pada ekstrak
- j. *Xylol* untuk larutan yang digunakan saat pembuatan preparat

- k. Kloroform sebagai larutan anestesi dan mematikan tikus sebelum dekapitulasi rahang
 - l. Hidrogen peroksida 35% sebagai bahan yang digunakan untuk menginduksikan luka, didapat dari Bratachem, Yogyakarta
2. Alat – alat
- a. Penyaring, untuk menyaring ekstrak daun pepaya
 - b. Pemanas, untuk memanaskan larutan ekstrak daun pepaya
 - c. Autoclave, untuk sterilisasi alat-alat pembuatan ekstrak daun pepaya
 - d. Timbangan, untuk menimbang bahan saat pembuatan ekstrak daun pepaya dan saat pembuatan gel ekstrak daun pepaya
 - e. Gelas ukur dan gelas beker, sebagai alat ukur larutan saat proses ekstraksi daun pepaya
 - f. *Water bath*, pemanas bahan ekstrak daun pepaya
 - g. Cahwan porselin, wadah pemanas bahan ekstrak daun pepaya
 - h. Sendok stenlistil, pengaduk saat proses pembuatan gel ekstrak daun pepaya
 - i. Mortil, tempat pencampuran bahan saat pembuatan gel ekstrak daun pepaya
 - j. Botol gel, untuk menyimpan gel ekstrak daun pepaya
 - k. Kaca alroji, untuk uji daya serap gel ekstrak daun pepaya
 - l. Sentrifugator, untuk uji konsentrasi larutan ekstrak daun pepaya
 - m. Kandang tikus diberi kode nomor
 - n. Jangka sorong untuk alat pengukuran diameter luka pada gingival tikus

- o. Gunting bedah untuk dekapitulasi rahang pada tikus
- p. Micro brush, untuk pengolesan dalam setiap perlakuan
- q. Kamera sebagai alat dokumentasi
- r. Kapas sebagai alat bantu dalam proses induksi luka serta saat proses perlakuan berjalan
- s. Sarung tangan untuk melindungi tangan dari paparan bakteri maupun virus
- t. Masker melindungi bagian mulut dan hidung dari paparan bakteri maupun virus
- u. Kandang tikus dengan diberikan penomoran pada masing-masing perlakuan

G. Cara Kerja

1. Tahap persiapan
 - a. Ekstraksi bahan uji

Pembuatan ekstrak etanol daun papaya (*Carica Papaya L.*) dilakukan di Laboratorium Farmasi unit II UGM. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. Tiga kilogram daun papaya (*Carica Papaya L.*) dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian di keringkan. Langkah selanjutnya, daun papaya (*Carica Papaya L.*) dipotong kecil, kemudian diblender dan disaring lalu diambil serbuknya sebesar ± 300 gram, kemudian dioven pada suhu 60-70⁰C. Daun tersebut dihaluskan dengan blender menjadi serbuk. Rendam di dalam etanol 70% selama 24 jam pada maserator

dan disaring lalu disaring lagi dan diendapkan selama dua hari, kemudian pisahkan maserat dari endapannya. Maserat dituang pada tabung *rotavapour* lalu dimasukkan ke dalam penguap putar (*rotavapour*) pada suhu 70⁰C, kemudian diuapkan kembali pada waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental (pekat) 100%.

Untuk mendapatkan hasil konsentrasi 75% 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 (*Carica Papaya L.*) dilakukan pada Laboratorium Farmasi unit II UGM. Pembuatan gel terdiri dari ekstrak dan bahan basis gel. Bahan basis digunakan bahan-bahan seperti *natrium* CMC (CMC-Na) 5 gram (5%) dan aquades 100 ml (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, tiap gelas ukur berisi 1 gram.
- 3) Melarutkan bahan dasar dengan aquades sebanyak 100 ml untuk ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L.*) konsentrasi 75%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.
- 4) Memasukkan ekstrak kedalam gelas beker dan satukan dengan serbuk CMC-Na, aduk sampai rata sehingga membentuk masa gel.

5) Setelah bahan menjadi padat akan menghasilkan 100 gram gel ekstrak daun papaya (*Carica Papaya L.*) 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 papaya (*Carica Papaya L.*)75%
- 2) Mengambil gel ekstrak daun papaya (*Carica Papaya L.*)75% dengan menggunakan *micro brush* sekitar 0,1ml dan oleskan pada luka gingiva tikus satu kali sehari pada saat sore hari selama 7 hari

d. Cara pengaplikasian aquades murni

- 1) Menyiapkan aquades murni
- 2) Mengambil aquades murni dengan menggunakan *sprit* sekitar 0,5ml dan teteskan pada luka gingiva tikus satu kali sehari pada saat sore hari selama 7 hari

e. Cara pengaplikasian *kenalog in orabase*

- 1) Menyiapkan *kenalog in orabase*
- 2) Mengambil *kenalog in orabase* dengan menggunakan *micro brush* sekitar 0,1ml dan oleskan pada luka gingiva tikus satu kali sehari pada saat sore hari selama 7 hari

f. Persiapan hewan uji

Persiapan sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan (*diaklimatisasi*)selama tiga hari untuk menghindari tikus yang stress dan membuat lingkungan udara serta kandang agar stabil. Hewan uji

yang berjumlah 33 ekor dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok kontrol positif (diaplikasikan *kenalog in orabase*) sebanyak 11 ekor, kelompok kontrol negatif (diaplikasikan aquades) sebanyak 11 ekor, dan kelompok perlakuan gel ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L.*) 75% sebanyak 11 ekor. Masing-masing kelompok diaplikasikan bahan bleaching yang sama dengan menggunakan hidrogen peroksida 35%, yang mengakibatkan iritasi atau luka pada gingiva. Penempatan tikus berada dikandang yang berbeda dan diletakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

g. Cara dekapitulasi Rahang

Tikus di ambil secara acak dari hari yang ditentukan yaitu pada hari ke-1, ke-3, ke-5, dan ke-7 kemudian dikorbankan dengan cara dimasukan kedalam toples kemudian di beri kloroform setelah tikus mati kemudian tikus diambil rahangnya menggunakan gunting bedah. Kemudian rahang tikus dimasukan ke larutan *formalin buffer 10%* untuk dibawa di laboratorium histologi untuk pembuatan preparat.

2. Jalannya penelitian

a. Induksi luka tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan

Tikus dipegang oleh satu peneliti menggunakan dua tangan kemudian peneliti yang lain mengaplikasikan bahan *bleaching* yaitu hidrogen peroksida 35% menggunakan *micro brush* pada satu titik bagian bawah gigi anterior tikus rahang bawah area gingiva tikus.

Tiga puluh tiga ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu (kelompok I) diaplikasikan *kenalog in orabase*, (kelompok II) diaplikasikan aquades, (kelompok III) perlakuan gel ekstrak daun papaya 75%.

Hari ke nol (0), 33 ekor tikus diaplikasikan hidrogen peroksida 35% sebagai bahan bleaching, kemudian diberi perlakuan pada masing-masing kelompok sesuai dengan cara aplikasi setiap perlakuan seperti pada penjelasan sebelumnya. Setelah aplikasi hidrogen peroksida 35% dilakukan pengukuran diameter luka pada hari ke-1, ke-3, ke-5, dan ke-7 melalui pengamatan diameter luka dan histologi.

b. Pemberian perlakuan gel ekstrak

Perlakuan gel ekstrak dilakukan selama 7 hari dan satu kali sehari pada sore hari secara topikal menggunakan *micro brush*. Untuk melihat diameter luka maka digunakan jangka sorong dan untuk melihat pengamatan histologi dilakukan dekapitulasi rahang setelah dilakukan pengamatan diameter luka.

c. Pemberian perlakuan *kenalog in orabase*

Perlakuan *kenalog in orabase* juga dilakukan selama 7 hari dan satu kali sehari pada sore hari secara topikal menggunakan *micro brush*. Untuk pengamatan ukuran diameter luka maka digunakan jangka sorong dan untuk melihat pengamatan histologi dilakukan dekapitulasi rahang setelah dilakukan pengamatan diameter luka.

d. Pemberian perlakuan aquades murni

Pemberian aquades murni juga dilakukan selama 7 hari dan satu kali sehari pada sore hari dengan cara diteteskan menggunakan *sprit*. Pengamatan ukuran diameter luka menggunakan jangka sorong dan untuk melihat pengamatan histologi dilakukan dekapitulasi rahang setelah dilakukan pengamatan diameter luka.

e. Pengukuran diameter luka

Pada hari ke 1, 3, 5, dan 7 setiap 11 ekor tikus diambil secara acak dari kelompok I sampai III diamati secara klinis dengan pengukuran diameter luka menggunakan jangka sorong. Kemudian keadaan luka difoto, untuk menentukan jarak foto terhadap lesi dengan menggunakan jangka sorong agar didapatkan jarak yang sama.

f. Dekapitulasi Rahang

Pada masing-masing kelompok pada hari ke-1, ke-3, ke-5, dan ke-7 di ambil 1 ekor tikus secara random dari tiap kelompok perlakuan lalu diukur diameter luka menggunakan jangka sorong serta diambil foto luka nya dengan jarak foto yang disesuaikan pada setiap kali foto, setelah itu tikus-tikus yang telah diukur dan di foto akan dikorbankan untuk diambil rahangnya (dekapitulasi rahang).

g. Evaluasi luka

Evaluasi luka dilakukan pada hari ke-1 sebelum diberi perlakuan menggunakan gel ekstrak daun pepaya 75%, *kenalog in orabase*, dan aquades untuk melihat luka yang sedang mengalami inflamasi setelah

24 jam terkena hidrogen peroksida 35%, lalu diamati lagi pada hari ke-1, ke-3, ke-5, dan ke-7 pasca diberi perlakuan. Jalannya evaluasi melalui pengamatan lama waktu penyembuhan luka dengan indikator penurunan diameter luka (Rahman dkk.,2013). Selain itu juga dilakukan pengambilan foto dengan jarak kamera dan luka yang disamakan setiap kali diamati.

h. Pembuatan preparat

Bagian rahang yang telah didekapitulasi kemudian dimasukkan ke *formalin buffer 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 mempeermudah penetrasi jaringan fiksasi.
- 4) Spesimen difiksasi segera dengan *formalin buffer 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 makrofag maka digunakan pewarnaan HE (*haematoxylin-eosin*). 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 *haematoxylin-eosin* 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 makrofag menggunakan mikroskop cahaya dengan pebesaran 40x. Penghitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel makrofag atau sel

raksasa yang berbentuk tidak teratur dan mempunyai inti yang bulat serta dapat bergabung dengan sel-sel makrofag lainnya dan tercatat ungu tua pada pewarnaan HE.

H. Analisa Data

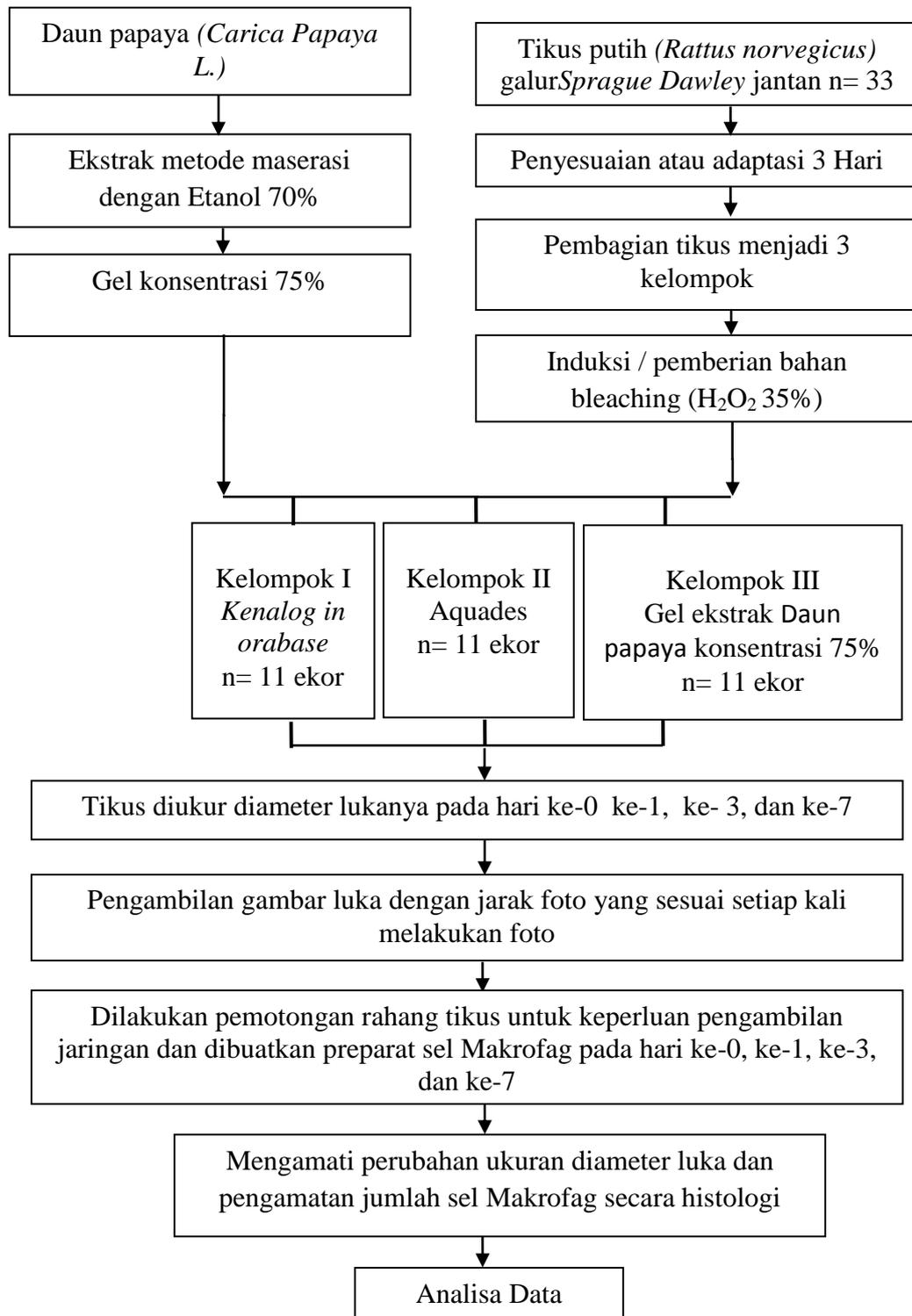
Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan *Saphiro Wilk* karena sampel yang digunakan kurang dari 50. Jika data terdistribusi normal dilanjutkan dengan analisa *One Way Annova* atau anova satu jalur sebagai uji komparatif tetapi jika tidak terdistribusi normal maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*, Perbedaan dianggap bermakna jika $p > 0,05$. Kemudian menggunakan uji *Least Significant Difference* untuk mengetahui kelompok yang memiliki nilai signifikan tertinggi terhadap penurunan diameter luka dan jumlah sel makrofag.

I. 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.

Pada penelitian ini sebelum dilakukan perlukaan tikus, dilakukan terlebih dahulu anestesi dengan injeksi golongan ester untuk mengurangi rasa sakit pada tikus. Manfaat yang diharapkan adalah untuk membuktikan secara ilmiah tentang efektifitas gel ekstrak daun pepaya pada proses penyembuhan luka iritasi gingiva akibat dari hidrogen peroksida pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan.

J. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian