

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris *in vivo* pada tikus *Sprague Dawley* jantan.

B. Lokasi 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. 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, 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 ± 3 bulan. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada tikus dikendalikan.

b. Daun pepaya (*Carica papaya*)

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

2. Besar Sampel

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

sehingga didapatkan,

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

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

$$n = 8,5$$

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

1. Inklusi

a. Tikus *Sprague Dawley* jantan

Jenis kelamin : Jantan

Umur : \pm 3 bulan

Berat badan : 200-250 gram

Warna bulu : Putih

b. Daun pepaya

Daun pepaya dengan keadaan baik yang berwarna hijau.

2. Eksklusi

a. Tikus *Sprague Dawley* jantan

1) Jenis kelamin : betina

2) Umur : \neq 3 bulan

3) Berat badan : \neq 200-250 gram

4) Diketahui terjangkit penyakit atau tidak aktif

5) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai

6) Keadaan psikologi

b. Daun pepaya

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

E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel

a. Variabel pengaruh

1) Kontrol positif :

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

b) 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 ukuran luka dan jumlah sel limfosit

c. Variabel terkendali :

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

2) Umur tikus sekitar ± 3 bulan

3) Berat tikus 200-250 gram

4) Makanan tikus menggunakan pellet broiler-11 dan air mineral

5) Air minum : air mineral

6) Area gingiva yang dilukai

7) Alat pengolesan hidrogen peroksida

- 8) Konsentrasi gel ekstrak
 - 9) Konsentrasi hidrogen peroksida
 - 10) Konsentrasi anestesi Kloroform
- d. Variabel tidak terkendali
- 1) Infeksi bakteri
 - 2) Penurunan berat badan tikus jantan
 - 3) Komplikasi pasca perlukaan gingiva
 - 4) Imunitas tikus

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

Luka yang disebabkan oleh bahan hidrogen peroksida berupa luka bakar. Luka bakar dapat menyebabkan hilangnya integritas kulit dan juga menimbulkan efek sistemik yang sangat kompleks. Penyebab luka bakar adalah paparan suhu tinggi dari matahari, listrik, maupun bahan kimia.

d. Penyembuhan luka gingiva

Penyembuhan luka dapat dibagi menjadi tiga fase: 1) fase inflamasi, 2) fase proliferasi, proses proliferasi fibroblas 3) fase remodelling. Dalam indikator penyembuhan luka tersebut dapat dilihat dari gambaran klinis dan pengukuran diameter luka menggunakan jangka sorong. Apabila diameter luka sudah mencapai 0,0 mm.

e. Sel Limfosit

Limfosit adalah sel-sel mononuklear yang sitoplasmanya tidak mengandung granul-granul terwarnai spesifik. Inti berbentuk bulat dan besar dibandingkan dengan sel hampir memenuhi sitoplasma. Limfosit berbentuk bulat dengan diameter yang bervariasi antara 6 sampai 8 μm , walaupun beberapa diantaranya mungkin lebih besar (Leeson et al., 1996)

f. Bahan *bleaching*

Bahan *bleaching* yang dipakai pada penelitian ini adalah hidrogen proksida konsentrasi 30%. Hidrogen peroksida sendiri merupakan zat kimia yang terkandung dalam bahan *bleaching*.

Hidrogen peroksida juga memiliki efek samping iritasi apabila mengenai jaringan gingiva. Cara perlukaan dengan cara pengolesan pada jaringan gingiva tikus menggunakan cotton bud dengan bahan bleaching kandungan hidrogen peroksida 30%.

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, sebagai pembanding ke-2
- h. Formalin 10%
- i. Pellet broiler-11 AD-2, pakan tikus
- j. Alkohol 70%
- k. Kloroform, untuk dekapitulasi tulang rahang
- l. *Xylol*
- m. Kloroform, untuk anestesi
- n. Bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE
- o. Hidrogen peroksida 35%, merupakan bahan bleaching yang biasa digunakan di *office bleaching*

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 stenlistil, pengaduk gel
- i. Mortil, tempat pencampuran bahan
- j. Botol gel, untuk menyimpan gel
- k. *Micro brush*, untuk pengolesan dalam perlakuan
- l. Spuit injeksi, untuk anestesi
- m. Kapas
- n. Jangka sorong, untuk pengukuran diameter luka pada gingiva tikus
- o. Mikroskop cahaya, untuk pengamatan jumlah sel limfosit
- p. Kamera
- q. Sarung tangan
- r. Masker
- s. Kandang tikus diberi kode nomor

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 kecil dan dilayukan. Kemudian dioven pada suhu 60-70⁰C. 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 dimasukan ke dalam penguap putar (*rotavapour*) pada suhu 70⁰C, kemudian diuapkan kembali pada waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental.

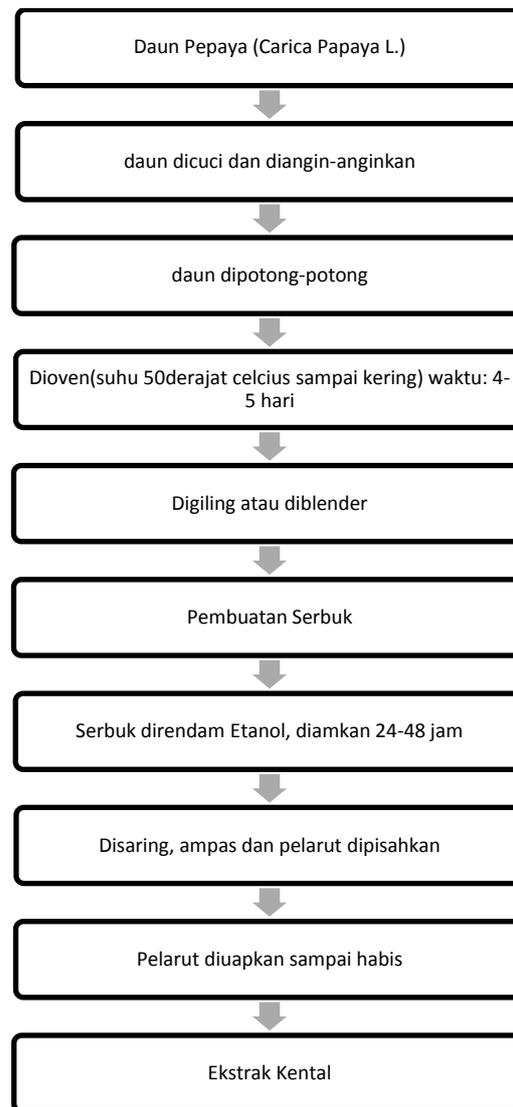
Ekstrak daun pepaya dienceran dengan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian yaitu 75%.

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 100gram untuk gel konsentrasi 75%, lalu aduk sedikit demi sedikit dan di aduk sampai rata.
- 4) Menambahkan ekstrak daun pepaya 100gram 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.



Gambar 5. Kerangka Ekstrak

c. Cara pengaplikasian gel

- 1) Menyiapkan gel ekstrak daun pepaya
- 2) Mengambil gel dengan menggunakan *micro brush* sekitar 0,1 mm dan dioleskan pada gingiva yang dilukai pengolesan dilakukan 1 kali sehari, pada sore hari.
- 3) Perlakuan tersebut terus dilakukan dari hari pertama sampai hari ketujuh pasca perlakuan gingiva tikus jantan.

d. Persiapan hewan uji

Persiapan sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan (diaklimatisasi) 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, 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 anestesi dengan inhalasi kloroform dan perlukaan dengan mengoleskan hidrogen peroksida 35% menggunakan microbrush 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 gel ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) konsentrasi 75% (kelompok II), 11 ekor tikus kelompok III perlakuan aquades (kelompok III).

Pada hari ke-0, 33 ekor tikus (*Sprague dawley*) jantan diberi perlakuan dengan mengoleskan hidrogen peroksida 35% menggunakan microbrush, 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 (*Carica papaya*) konsentrasi 75%. Tikus pada kelompok III diberi perlakuan aquades. Pemberian setiap perlakuan sebanyak 0,1 ml dan pengolesannya menggunakan microbrush. Pemberian perlakuan sebanyak 1 kali sehari, pada sore hari. Dilakukan pengamatan diameter luka pada hari ke-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 didekapitulasi (pengambilan rahang) dengan anestesi menggunakan kloroform.

b. Pembuatan preparat

Organ rahang yang telah didekapitulasi 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 *Hematoksilin 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 kedalam larutan *Xylo* dan terakhir *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

Perhitungan jumlah sel limfosit menggunakan mikroskop cahaya dengan pebesaran 40x. Penghitungan limfosit dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel limfosit yang berbentuk nucleus besar dan bulat berinti satudan tercatat ungu pada pewarnaan HE.

H. Cara Pengamatan dan Pengumpulan Data

Perhitungan jumlah sel limfosit menggunakan mikroskop cahaya dengan pebesaran 40x. Penghitungan limfosit dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan menghitung jumlah sel limfosit yang berbentuk nucleus besar dan bulat berinti satu dan tercatat ungu pada pewarnaan HE.

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

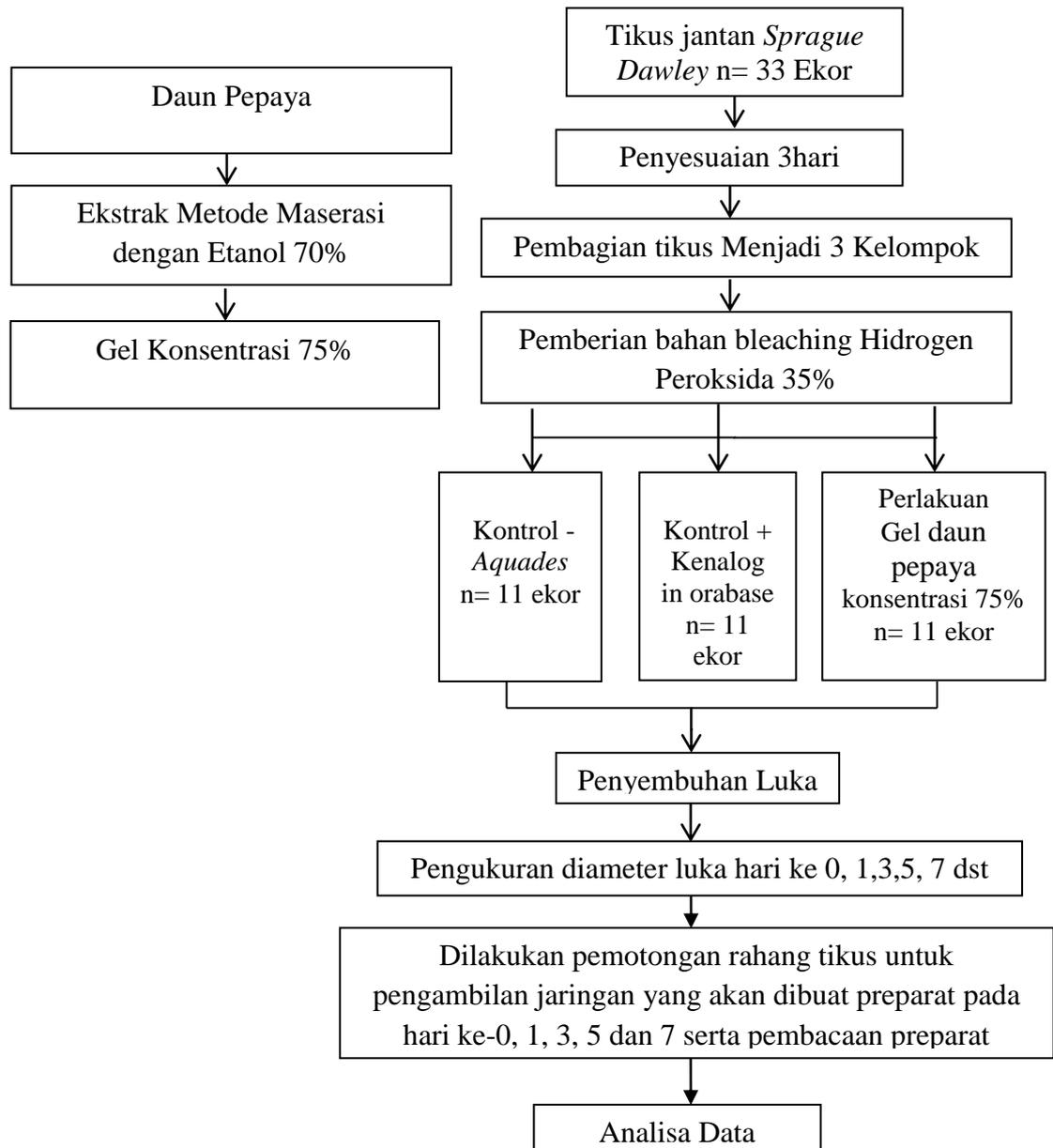
I. Analisa Data

Uji normalitas data yang digunakan adalah Shapiro Wilk karena sample kurang dari 50, data dianalisa dengan menggunakan Uji one way Anova jika distribusi data normal. Dan menggunakan Kruskal Wallis jika distribusi data tidak normal. 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 limfosit.

J. Etik Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak subyek selama proses penelitian, untuk itu peneliti mengajukan *ethical clearanced* 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 6. Alur Penelitian