

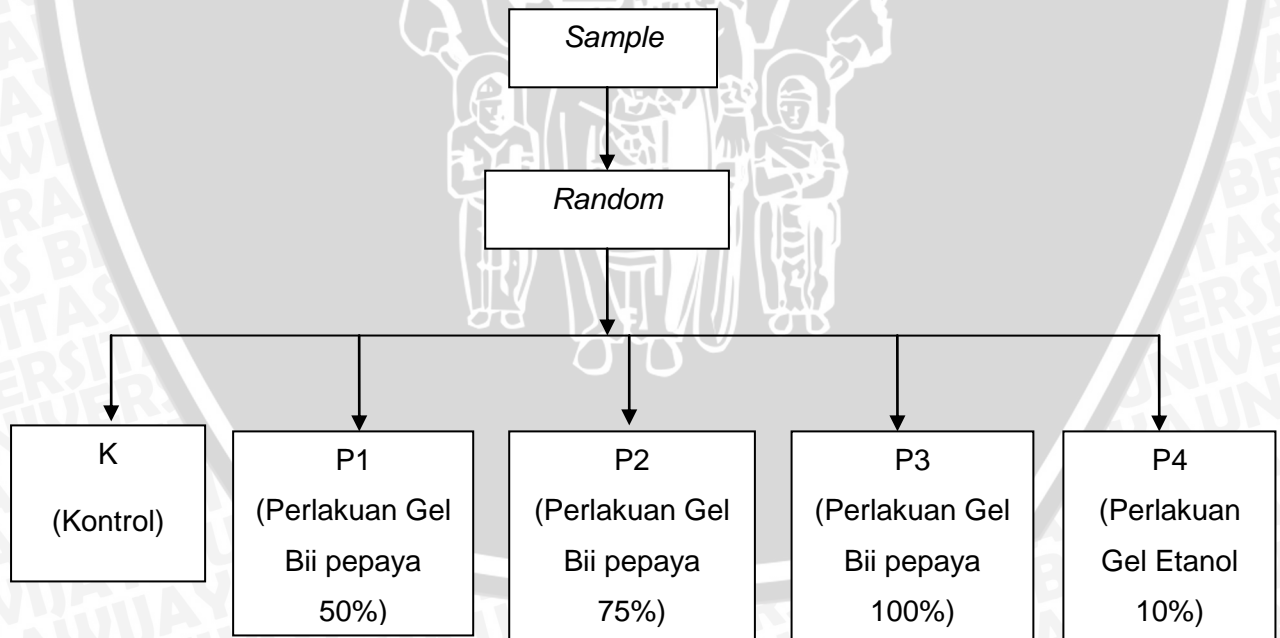
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian “*Post Test Only Control Group Design*” di laboratorium untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya L.*) secara topikal terhadap peningkatan jumlah sel fibroblas mukosa oral tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) pada proses penyembuhan ulkus traumatik.

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik “*Simple Random Sampling*” kemudian ditempatkan dalam kelompok, sebagai berikut:



4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar berjenis kelamin jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan umur 3 bulan dan berat badan 200-250 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif.

Jumlah sampel yang digunakan memakai rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15 ; \text{dimana}$$

t = jumlah kelompok perlakuan

r = jumlah sampel

Pada penelitian ini jumlah t = 5 perlakuan, jadi jumlah pengulangan penelitian adalah:

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

Dari hasil perhitungan diatas, dibutuhkan minimal 5 ekor tikus putih untuk tiap kelompoknya. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan adalah 30 ekor tikus putih.

Kriteria inklusi :

1. Tikus putih galur Wistar
2. Berjenis kelamin jantan
3. Berat badan 200-250 gram
4. Umur 3 bulan
5. Belum pernah digunakan untuk penelitian

6. Dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif, mata yang jernih, berbulu tebal dengan warna putih mengkilat.

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian mengalami penurunan berat badan secara drastis
2. Tikus yang mengalami tanda-tanda infeksi disekitar luka selama penelitian berlangsung
3. Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya L.*) dengan konsentrasi 50%, 75% dan 100% serta gel etanol 10%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah genetik hewan coba, jenis kelamin hewan coba, umur hewan coba, berat badan hewan coba, makanan dan minuman yang dikonsumsi objek penelitian, kemungkinan adanya infeksi, dan aplikasi gel ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya L.*)

4.4 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2015 – Februari 2016.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat Untuk Pembuatan Ulkus

1. Tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) berjenis kelamin jantan, umur 3 bulan dengan berat badan 180-200 gram
2. *Cement stopper*
3. *Spiritus burner*
4. Pinset bedah
5. Kapas
6. Ether
7. Kotak kaca anastesi
8. Masker
9. Sarung tangan



4.5.2 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Pepaya

1. Biji pepaya (*Carica papaya L.*)
2. Pisau
3. Kain berwarna gelap
4. Blender
5. Kertas saring
6. Tabung Erlenmeyer

7. Alat evaporator
8. Etanol 96%
9. Akuades

4.5.3 Bahan dan Alat Pembuatan Gel Etanol 10%

1. Bejana
2. Trietanolamin
3. *Carbomer 934*
4. *Aquadest*

5. Gliserin
6. Etanol 96%
7. Tube
8. Masker
9. Sarung tangan

4.5.4 Bahan dan Alat Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Biji Pepaya

1. Bejana
2. Propilenglikol
3. *Carbomer 934*
4. *Aquadest*
5. Metil paraben
6. Tube
7. Masker
8. Sarung tangan



4.5.5 Bahan dan Alat Perlakuan

1. Tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) berjenis kelamin jantan, umur 3 bulan dengan berat badan 200-250 gram yang diinduksi *cement stopper* panas sehingga terdapat ulkus pada mukosanya
2. Gel ekstrak etanol biji pepaya
3. *Cotton buds*
4. Masker
5. Sarung tangan

4.5.6 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

1. Ether
2. Formalin 10%
3. Alkohol 96%
4. *Aceton*
5. *Xylol*
6. Gelatin
7. Pewarna *Haematoxylin* dan *Eosin*
8. *Lithium carbonat*
9. Scalpel
10. *Microtom*
11. Kaca obyek dan penutup
12. Blok *paraffin*
13. *Water bath*
14. Tempat pewarnaan dan cucian
15. Kertas saring
16. Kuas kecil



17. Timer

4.6 Definisi Operasional

1. Gel ekstrak etanol biji pepaya berasal dari buah pepaya muda yang ditandai dengan daging buah yang berwarna putih dan kulit buah yang berwarna hijau. Bagian yang dipergunakan yaitu bagian biji tanpa ada kriteria khusus mengenai berat, ukuran atau jenis pepaya yang dipergunakan. (Amazu *et. al.*, 2010) Pada penelitian ini menggunakan pepaya jenis lokal yang diperoleh dari Pasar Belimbing Malang yang kemudian diidentifikasi di UPT Materia Medika dengan cara mengamati dan membandingkan morfologi dari sampel yang diberikan. Biji pepaya dilakukan pembuatan ekstrak etanol dan dilanjutkan dengan pembuatan gel dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% menggunakan *Carbomer 934* yang berfungsi sebagai *gelling agent*. (Sugiharto, 2014)
2. Ulkus mukosa oral merupakan luka terbuka dengan kehilangan lapisan epitel dari permukaan sampai dasarnya yang disebabkan oleh berbagai macam hal salah satunya adalah trauma. Ulkus pada mukosa oral tikus dibuat dengan *cement stopper* dengan penampang ± 2 mm yang telah dipanaskan selama 10 detik kemudian ditempelkan pada mukosa labial bawah tikus selama 3 detik sehingga terbentuk ulkus dengan gambaran klinis berbentuk bulat sampai oval, dasar lesi berwarna putih kekuningan dan dikelilingi batas tepi yang eritema yang nantinya akan diolesi gel ekstrak etanol biji pepaya secara topikal. (Tjahajani, 2011)
3. Fibroblas memiliki bentukan gelendong atau fusiform, inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran inti halus berwarna biru keunguan

disertai proses sitoplasmik yang tidak teratur. Penghitungan fibroblas dilakukan pada sediaan jaringan ulkus yang diambil 7 hari pasca pembuatan ulkus dan telah diberi pewarnaan *Haematoxylin* dan *Eosin* dengan menggunakan mikroskop digital *Olympus dot slide* dengan pembesaran 20x dan kemudian dibuat foto preparat. Foto preparat dibagi menjadi 5 lapang pandang dan fibroblas dihitung pada tiap lapang pandang. Hasil perhitungan fibroblas dijumlahkan sesuai banyaknya replikasi untuk menghitung jumlah rata-rata fibroblas masing-masing sampel. Perhitungan total fibroblas tiap kelompok kemudian dibagi dengan jumlah sampel tiap kelompok untuk memperoleh jumlah rata-rata fibroblas dalam tiap kelompok.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ulkus Pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih dilakukan adaptasi dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama 7 hari, sebelum dibuat ulkus pada mukosa labialnya. Setelah 7 hari masa adaptasi, dilakukan anestesi secara inhalasi dengan menggunakan kapas yang diberi *ether* pada kotak kaca anestesi. Kemudian mukosa labial bawah tikus dianestesi dengan *chlorethil* lalu dilukai dengan *cement stopper* penampang ± 2 mm yang dipanaskan dengan *spiritus burner* selama 60 detik. Mukosa labial bawah tikus dijepit dengan pinset bedah, kemudian *cement stopper* panas disentuhkan dalam waktu 3 detik pada mukosa labial bawah tikus sehingga terbentuk ulkus. Pembuatan ulkus traumatik ditandai dengan gambaran klinis berbentuk bulat sampai oval, dasar lesi berwarna putih kekuningan dan dikelilingi batas tepi yang eritema. (Tjahajani, 2011)

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Pepaya

Biji pepaya dicuci dengan air hingga bersih. Setelah dicuci, biji buah pepaya dikeringkan di panas matahari selama 3 hari dibawah kain berwarna hitam agar kandungan aktif di dalamnya tidak rusak. Biji pepaya dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang dan diambil sebanyak 200 gram. Kemudian biji pepaya dihaluskan dengan cara blender lalu diayak. Biji pepaya tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 600 ml etanol 96%. Tabung erlenmeyer ditutup rapat dan dikocok perlahan. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter. Hasil filtrat selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak etanol biji pepaya dengan menggunakan alat evaporator. Filtrat dievaporasi dengan pengurangan tekanan pada suhu yang diatur sesuai dengan titik didih etanol hingga semua pelarut terpisah. Kemudian akan didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan, yaitu ekstrak etanol biji pepaya dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol (Hedaputra, 2014).

4.7.3 Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Biji Pepaya

Tabel 4.1 Formulasi Gel Ekstrak Etanol Biji Pepaya

Komponen Formula	Konsentrasi 50%	Konsentrasi 75%	Konsentrasi 100%
Ekstrak Biji Pepaya	10 gr	15 gr	20 gr
Carbomer	0,6 gr	0,6 gr	0,6 gr
Metil Paraben	0,036 gr	0,036 gr	0,036 gr
Propilenglikol	3,34 gr	3,34 gr	3,34 gr
Aquadest ad.	100 ml	100 ml	100 ml

Formulasi pembuatan sediaan gel ekstrak etanol biji pepaya mengacu pada penelitian Rahmawati, tahun 2015 (Tabel 4.1). Basis gel yang digunakan dalam penelitian adalah Carbomer. Adapun prosedur pembuatan gel ekstrak etanol biji pepaya:

1. Carbomer didispersikan terlebih dahulu ke dalam 100 ml aquades kemudian diaduk dan ditunggu selama 30 menit hingga terbentuk basis gel.
2. Selanjutnya ditambahkan komponen lain seperti metilparaben dan propilenglikol sesuai takaran, kemudian diaduk sampai tercampur homogen.
3. Kemudian ekstrak biji pepaya dimasukkan ke dalam basis gel tersebut dan diaduk hingga homogen. Kemudian sediaan gel masing-masing disimpan pada wadah yang tertutup rapat dan diberi label.

4.7.4 Pembuatan Gel Etanol 10%

Tabel 4.2 Formulasi Gel Etanol 10%

Komponen Formula	Konsentrasi 10%
Etanol 96%	2 ml
Carbomer	0,4 gr
Trietanolamin	0,4 gr
Gliserin	2 gr
Aquadest ad.	100 ml

Formulasi pembuatan sediaan gel etanol 10% mengacu pada penelitian Sitti fauziah, tahun 2011 (Tabel 4.2). Basis gel yang digunakan dalam penelitian adalah Carbomer. Adapun prosedur pembuatan gel etanol:

1. Carbomer didispersikan terlebih dahulu ke dalam 100 ml aquades kemudian diaduk dan ditunggu selama 30 menit hingga terbentuk basis gel.
2. Selanjutnya ditambahkan komponen lain seperti Trietanolamin (TEA) dan gliserin, sesuai takaran, kemudian diaduk sampai tercampur homogen.
3. Kemudian etanol 96% dimasukkan ke dalam basis gel tersebut sesuai takaran dan diaduk hingga homogen. Kemudian sediaan gel disimpan pada wadah yang tertutup rapat dan diberi label.

4.7.5 Pengaplikasian Gel Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica papaya L.*) dan Gel Etanol 10%

Sehari setelah pembuatan ulkus, pada kelompok kontrol (K) tidak dilakukan perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) diaplikasikan gel ekstrak etanol biji pepaya dengan konsentrasi 50% sebanyak 2 kali sehari. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) diaplikasikan gel ekstrak etanol biji pepaya dengan konsentrasi 75% sebanyak 2 kali sehari. Pada kelompok perlakuan 3 (P3) diaplikasikan gel ekstrak etanol biji pepaya dengan konsentrasi 100% sebanyak 2 kali sehari. Pada kelompok perlakuan 4 (P4) diaplikasikan gel etanol 10% sebanyak 2 kali sehari. Selanjutnya, tikus pada tiap kelompok K, P1, P2, P3 dan P4 pada hari ke-7 dilakukan pembedahan dan diambil jaringan disekitar ulkus untuk pembuatan preparat

4.7.6 Pembedahan dan Sanitasi Hewan Coba

Pada hari ke-7, hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi tulang leher. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70% kemudian dikubur dengan baik yaitu dengan mengubur langsung didalam tanah secara bersamaan tanpa dilapisi plastik untuk mempercepat penguraian

4.7.7 Prosedur Pembuatan Preparat

a) Proses Pematangan Jaringan Berupa Makros

- a. Gross/sampel jaringan hasil bedah dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% (fiksasi) semalam.
- b. Untuk jaringan keras (tulang dan gigi) dilakukan dekalsifikasi (pengembukan) 15 s/d 20 hari menggunakan EDTA 10%.

- c. Jaringan dipilih sesuai dengan yang akan di teliti, pada penelitian ini yaitu jaringan yang mengalami ulkus.
- d. Jaringan yang telah dipilih kemudian dipotong secara melintang kemudian dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti.
- e. Kaset dicuci dengan air mengalir sebelum dilakukan proses jaringan/dimasukkan ke alat *Tissue Tex Prosesor*.
- f. Kaset diproses menggunakan alat mesin *Automatic Tissue Tex Prosesor* (*automatic processing*).
- g. Alarm bunyi tanda selesai.

B. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

1. Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*.
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan.
3. Jaringan dipotong dengan alat *Microtome* ketebalan 3-5 mikron.

C. Proses Deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, kemudian diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80⁰ C, lalu masukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi) dan yang terakhir dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.

D. Proses Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*/Auto Stanning

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| 1. Cat utama Harris Hematoksilin | 10-15 menit |
| 2. Cuci dengan air mengalir | 15 menit |
| 3. Alkohol asam 1% | 2-5 celup |
| 4. Amonia air | 3-5 celup |
| 5. Cat pembanding Eosin 1% | 10-15 menit |

a) Dehidrasi

- | | |
|--------------------|---------|
| a. Alkohol 70% | 3 menit |
| b. Alkohol 80% | 3 menit |
| c. Alkohol 96% | 3 menit |
| d. Alkohol Absolut | 3 menit |

b) Penjernihan

- | | |
|----------|----------|
| 1. Xylol | 60 menit |
|----------|----------|

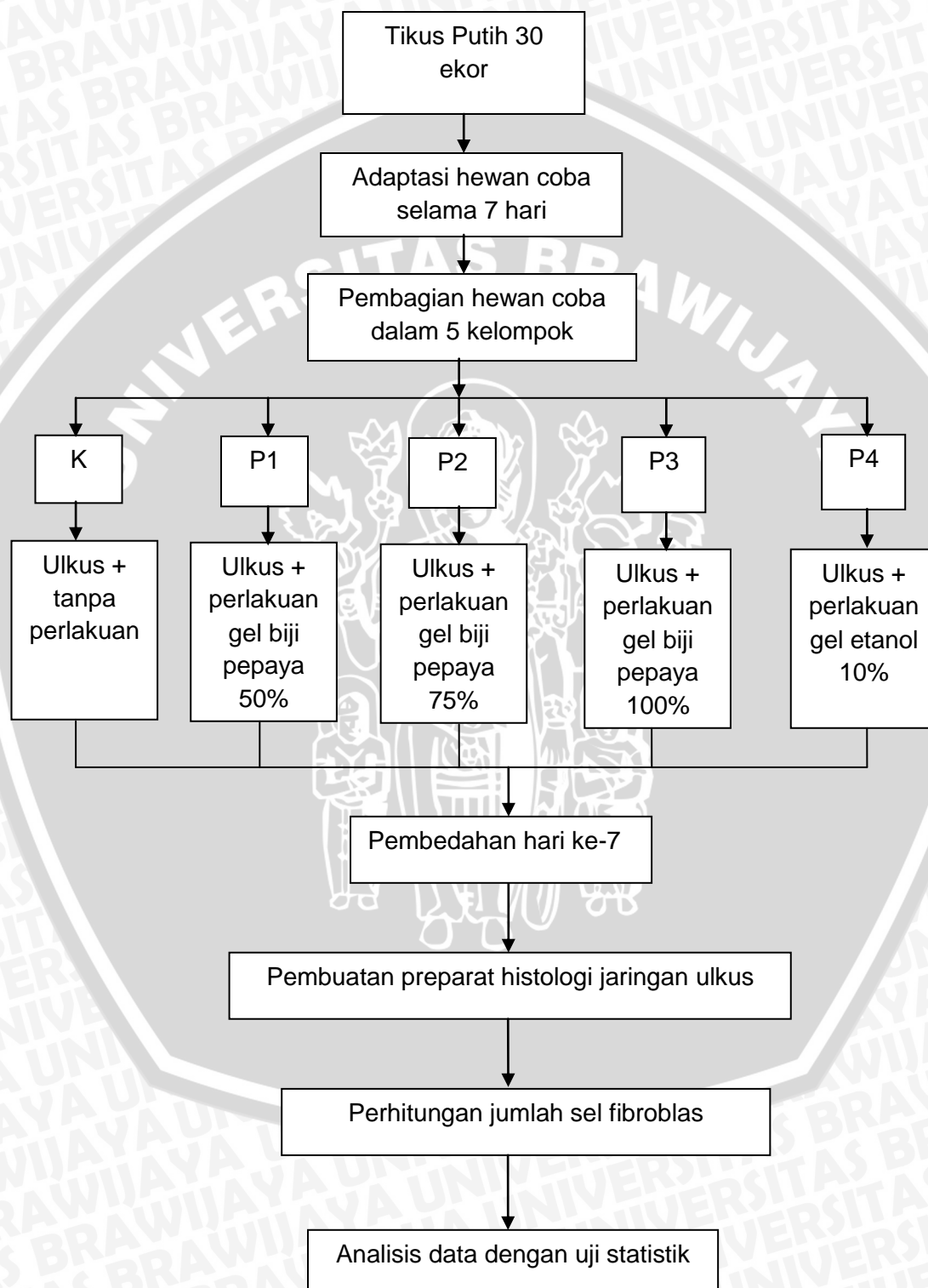
c) Mounting dengan entelan dan coverglass

1. Biarkan slide kering pada suhu ruangan.
2. Setelah slide kering siap kering siap untuk diamati.

4.7.8 Penghitungan Jumlah Fibroblas

Infiltrasi fibroblas pada daerah luka dapat dihitung dalam beberapa lapangan pandang dengan menggunakan mikroskop. Sementara, presentase percepatan penyembuhan luka didapatkan dari perbandingan antara jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dengan kelompok eksperimen. Pengamatan fibroblas dilakukan dengan menggunakan mikroskop digital *Olympus dot slide* dengan pembesaran 200 kali dan kemudian dibuat foto preparat. Sampel pada sediaan masing-masing replikasi dibagi menjadi 5 lapang pandang dan fibroblas dihitung pada tiap lapang pandang. Hasil perhitungan fibroblas dijumlahkan sesuai banyaknya replikasi untuk menghitung jumlah rata-rata fibroblas masing-masing sampel. Perhitungan total fibroblas tiap kelompok kemudian dibagi dengan jumlah sampel tiap kelompok untuk memperoleh jumlah rata-rata fibroblas dalam tiap kelompok.

4.7.8 Kerangka Operasional Penelitian



4.8 Analisa Data

Hasil perhitungan jumlah fibroblas pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a) Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- b) Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
- c) Uji One-Way ANOVA: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan yang memiliki varian homogen dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- d) Uji *Post Hoc Tukey* (Uji *Honestly Significant Difference*): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Jika hasil uji H_0 diterima (tidak ada perbedaan) maka uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan dari *One-Way Anova* tidak perlu dilakukan,

sebaliknya jika H_0 ditolak (ada perbedaan), uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One Way Anova* dilakukan. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p=0,05$).

- e) Uji korelasi *Pearson*: untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji *Pos Hoc Tukey* (HSD).

Pada penelitian ini dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dulu, apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (*signifikansi* $>0,05$) dan varian data homogen ($p>0,05$), maka digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya. Uji *One Way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel fibroblas mukosa oral tikus putih antara kelompok kontrol (K) dengan eksperimen (P1, P2, P3,P4) pada proses penyembuhan ulkus traumatik. Apabila data berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One Way Anova* atau uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*.

Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk menunjukkan apakah ada pengaruh pemberian gel ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya* L.) secara topikal dengan jumlah fibroblas pada proses penyembuhan ulkus traumatik tikus putih. Untuk mengetahui kekuatan hubungan dari kedua variabel dilakukan uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal atau *Spearman* jika data berdistribusi tidak normal.