

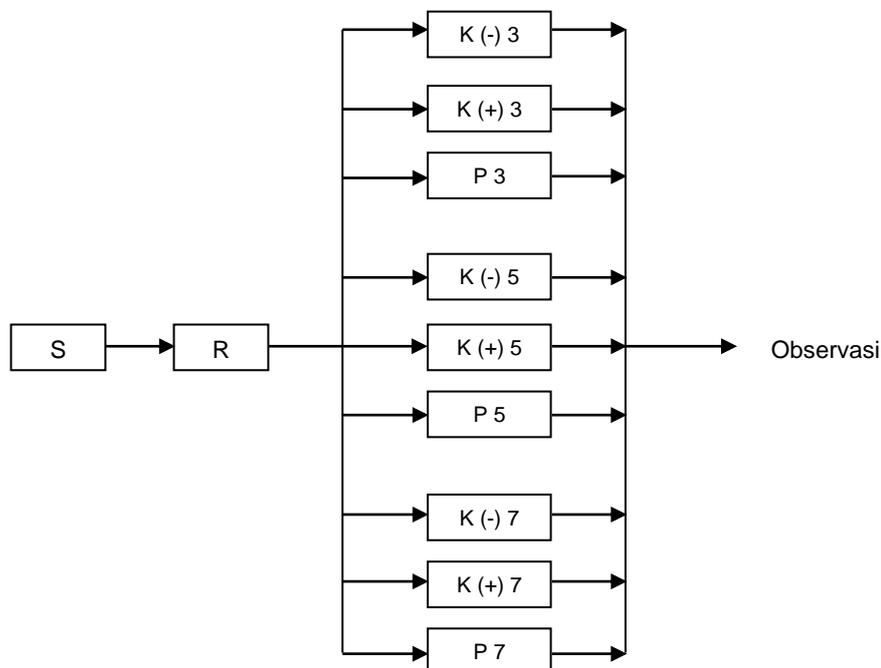
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Randomized Control Group Design*” di laboratorium secara in-vivo (Purnasari, 2012). Jenis penelitian ini untuk mengetahui pengaruh gel kulit delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah fibroblas pada proses penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas.

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik “*Simple Random Sampling*” kemudian ditempatkan dalam 9 kelompok yaitu :



Keterangan :

S = *Sample*

R = *Random*

K (-) 3 = Kelompok kontrol negatif 3 tanpa diberi gel kulit delima hari ke-3 pasca ulserasi.

K (+) 3 = Kelompok kontrol positif 3 yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 3 hari pasca ulserasi.

P 3 = Kelompok perlakuan 3 diberi gel kulit delima yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 3 hari pasca ulserasi.

K (-) 5 = Kelompok kontrol negatif 5 tanpa diberi gel kulit delima hari ke-5 pasca ulserasi.

K (+) 5 = Kelompok kontrol positif 5 yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 5 hari pasca ulserasi.

P 5 = Kelompok perlakuan 5 diberi gel kulit delima yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 5 hari pasca ulserasi.

K (-) 7 = Kelompok kontrol negatif 7 tanpa diberi gel kulit delima hari ke-7 pasca ulserasi.

K (+) 7 = Kelompok kontrol positif 7 diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1 % 2 kali sehari selama 7 hari pasca ulserasi.

P 7 = Kelompok perlakuan 7 diberi gel kulit delima yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 7 hari pasca ulserasi.

## **4.2 Sampel Penelitian**

### **4.2.1. Populasi Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang berumur 3 bulan dengan berat 180-200 gram.

Tikus galur wistar dipilih sebagai populasi karena merupakan hewan coba yang tergolong jinak, perawatan mudah dan fungsi metabolisemenya mirip dengan manusia.

#### 4.2.2. Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah pengulangan penelitian dihitung menggunakan rumus *Federer*

(Marlina, 2012) :

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

Keterangan :

t= jumlah kelompok

n= jumlah pengulangan

Pada penelitian ini t=9, oleh karena itu, perhitungan menjadi :

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

$$(n-1) (9-1) \geq 15$$

$$(n - 1) 8 \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$n \geq 2,8$$

Penelitian ini menggunakan minimal 3 tikus putih untuk tiap kelompok.

Penelitian ini dibagi menjadi sembilan kelompok, sehingga dibutuhkan 27 tikus putih. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus putih mati, maka jumlah sampel ditambah 3 ekor menjadi 30 ekor tikus putih.

#### 4.2.3 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria inklusi sampel penelitian sebagai berikut :

1. Tikus putih galur *Wistar* keturunan murni yang sehat ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, bulu mata tebal, dan berwarna putih mengkilap
2. Berjenis kelamin jantan (untuk menghindari efek hormonal yang lebih dominan pada tikus betina)
3. Belum pernah digunakan untuk penelitian

4. Umur 3 bulan
5. Berat badan 180-200 gram

Kriteria eksklusi sampel penelitian sebagai berikut :

1. Tikus sakit selama penelitian, yang ditandai dengan tikus putih tidak bergerak aktif, mata tidak jernih dan berwarna kemerahan, keluar lender dari hidung, mengeluarkan air liur terus – menerus, dan mengalami diare pada saat penelitian yang ditandai dengan feses tikus yang tidak berbentuk.
2. Tikus mati selama penelitian berlangsung.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel kulit delima (*Punica granatum L.*).

##### **4.3.2 Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas saat proses penyembuhan pada tikus putih wistar (*Rattus novvegicus*) yang telah diinduksi panas.

##### **4.3.3 Variabel kendali**

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Genetik
2. Jenis kelamin
3. Usia
4. Berat badan
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi objek penelitian
6. Dosis gel kulit delima (*Punica granatum L.*)

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus 2017 - Februari 2018.

#### **4.5 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian**

##### **4.5.1 Bahan dan alat yang digunakan untuk proses terbentuknya ulkus**

Alat yang dibutuhkan *cement stopper*, spiritus burner, pinset bedah, dan kaca mulut. Bahan yang dibutuhkan ketamin 0.2 – 0.3 ml, novalgin, *cotton pellet*, masker, dan sarung tangan, tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram.

##### **4.5.2 Bahan dan alat pembuatan ekstrak kulit delima (*Punica granatum L.*)**

Alat yang dibutuhkan pisau, kertas saring, tabung Erlenmeyer, alat evaporator. Bahan yang dibutuhkan kulit buah delima (*Punica granatum L.*), ethanol 96%, dan *aquadest*.

##### **4.5.3 Bahan dan alat pembuatan gel kulit delima (*Punica granatum L.*)**

Alat yang dibutuhkan mortar, pengaduk, alat penimbangan digital dan tube. Bahan yang dibutuhkan ekstrak kulit delima (*Punica granatum L.*), propilenglikol, carbopol, metil paraben, gliserin, Trietanolamin (TEA), masker, sarung tangan dan *aquadest*.

##### **4.5.4 Bahan dan alat perlakuan**

Alat yang dibutuhkan *cotton bud*, masker, dan sarung tangan. Bahan yang dibutuhkan gel kulit buah delima (*Punica granatum L.*), *Triamcinolone acetoneid* 0.1%, Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-

200 gram yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* alat kedokteran gigi sehingga terdapat ulkus pada mukosanya.

#### **4.5.5 Bahan dan alat pengambilan jaringan dan pembuatan preparat**

Alat yang dibutuhkan scalpel, microtom, kaca obyektif dan penutup, blok paraffin, waterbath, tempat pewarna dan cucian, kertas saring, timer, dan kuas kecil. Bahan yang dibutuhkan eter, formalin 10 %, acetone, xylol, gelatin, alkohol 96%, Pewarna *Haematoxylin* dan *Eosin*, dan *Lithium carbonat*.

#### **4.6 Definisi Operasional**

##### **1. Gel Kulit Delima**

Ekstrak kulit buah delima adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstrak zat aktif kulit buah delima dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bagian tanaman yang digunakan adalah kulit buah tanpa ada kriteria khusus mengenai berat dan ukuran yang dipergunakan. Kemudian ekstrak kulit buah delima dengan konsentrasi 100% dibuat menjadi gel dengan menggunakan bahan carbopol, propilenglikol, metil paraben, TEA (trietanolamin), gliserin, dan *aquadest* hingga terbentuk gel kulit delima dengan konsentrasi ekstrak kulit delima sebesar 8,9%. Penelitian ini menggunakan kulit buah delima jenis lokal yang diperoleh dari Kecamatan Ngadiluwih, Kabupaten Kediri, Jawa Timur dan diidentifikasi di Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur UPT Medica Batu.

##### **2. Ulkus traumatik**

Ulkus traumatik adalah peradangan mukosa mulut yang ditandai dengan lesi berupa bercak putih kekuningan atau putih pucat, dan merupakan lesi yang dangkal. Ulkus dibuat dengan menekan *cement stopper* yang telah dipanaskan dengan lampu spiritus sampai warna *cement stopper* berubah merah, ke

mukosa labial tikus selama 2 detik dengan kedalaman mencapai  $\pm 1$  mm, yang didahului dengan anestesi menggunakan ketamin 0,2-0,3 ml, kemudian akan diaplikasikan gel kulit delima secara topikal (Sulistiawati, 2011).

### 3. Penghitungan jumlah sel fibroblas

Penghitungan jumlah sel fibroblas pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulkus pada hari ke 3, ke 5, ke 7 pasca ulserasi dengan pewarnaan *haematoxylin eosin* dan diamati dengan mikroskop *digital Olympus dot slide* sebanyak 5 lapang pandang menggunakan *software OlyVIA (Olympus Viewer for Imaging Applications)* dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pandangnya (Yasa, 2010).

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 *Ethical clearance*

Penelitian ini diawali dengan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Bioscience Universitas Brawijaya.

### 4.7.2 Alur Penelitian

Sebelum ulserasi pada mukosa labial, sejumlah tikus wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangkan pada box plastik berukuran 15 x 35 x 45 cm<sup>3</sup> yang ditutup dengan kawat kassa dengan dasar sekam yang diganti setiap 3 hari sekali dan diberi pakan standar selama 7 hari. Setelah 7 hari masa adaptasi, tikus wistar dianestesi dengan ketamin 0.2-0.3ml, kemudian jika tikus tidak memberi respon saat diberi rangsangan rasa sakit menggunakan pinset bedah maka tikus putih bisa diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* pada mukosa labial bawah bagian tengah sehingga terbentuk ulkus, dan diinjeksikan novalgin kemudian dimasukkan ke dalam kandang yang telah diberi label kelompok kontrol negatif K(-), kelompok kontrol positif K(+), kelompok perlakuan

(P). Satu kandang terdiri dari 1 ekor tikus. Kemudian dilakukan pembedahan pada hewan coba pada H+1 setelah diberi perlakuan *time series* yaitu pada hari ke 3, 5, dan 7. Kemudian membuat preparat untuk menghitung jumlah sel fibroblas, analisis data dan membuat kesimpulan.

#### **4.7.3 Pembuatan ekstrak kulit delima (*Punica granatum L.*)**

Kulit buah delima yang masih segar dikirim ke Dinas Kesehatan UPT Medica Batu untuk dilakukan identifikasi dan pembuatan ekstrak. Kulit buah delima yang masih segar dicuci dengan air hingga bersih kemudian dikeringkan hingga benar-benar kering dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan, digiling hingga halus dengan menggunakan alat giling khusus sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang sebanyak 500 gram serbuk kulit buah delima.

Proses pembuatan ekstrak dengan teknik maserasi yaitu dengan cara serbuk kulit buah delima dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer, kemudian ditambahkan ethanol 96% sebanyak 4000 mL. Tabung erlenmeyer ditutup rapat dan dikocok perlahan hingga homogen selama 30 menit dan disimpan pada suhu kamar dan didiamkan selama 5 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan untuk meratakan konsentrasinya. Setelah 5 hari campuran itu disaring dengan kertas filter, proses ini diulang 2 kali hingga diperoleh hasil berupa ampas dan filtrat, hasil filtrat dievaporasi guna memisahkan pelarut ethanol dengan ekstrak ethanol kulit buah delima dengan menggunakan alat evaporator. Filtrat dievaporasi dengan pengurangan tekanan pada suhu yang diatur sesuai dengan titik didih ethanol hingga semua pelarut terpisah. Didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak ethanol kulit buah delima dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut ethanol dengan berat sebesar 58 gram (Sugiharto, 2014).

#### 4.7.4 Pembuatan gel kulit delima (*Punica granatum L.*)

Menimbang terlebih dahulu semua bahan yang akan digunakan ke dalam pembuatan gel kulit buah delima sesuai takaran. Setelah semua bahan ditimbang sesuai takaran kemudian karbopol dikembangkan dengan *aquadest* dalam mortir hingga mengembang. Metil paraben dilarutkan dalam gliserin aduk hingga larut dalam beaker gelas. Pada mortir yang berbeda ekstrak etanol kulit buah delima digerus hingga teksturnya menjadi lembut lalu tambahkan sebagian propilenglikol lalu gerus hingga homogen. Setelah karbopol mengembang gerus terlebih dahulu dengan di tambahkan TEA sedikit- sedikit untuk membuat pH sediaan gel sedikit basa kemudian gerus hingga membentuk basis gel. Campuran gliserin dan metil paraben ditambahkan dalam basis gel sambil di gerus hingga homogen. Sisa propilenglikol ditambahkan dalam campuran basis, gerus hingga homogen. Campurkan gerusan ekstrak ke dalam basis gel dan gerus sampai homogen. Ditambahkan *aquadest* yang sudah dipanaskan sedikit sedikit sampai 40 ml. Kemudian setelah gel kulit buah delima selesai dibuat gel dimasukkan ke dalam tube tertutup yang terlindung dari kontaminasi luar dan ditimbang untuk mengetahui berat gelnya. Didapatkan hasil akhir penimbangan gel kulit buah delima sebanyak 44,67 gram.

Gel tersebut lalu disimpan pada suhu kamar selama 24 jam untuk mengamati sifat fisik gel (pengamatan organoleptis meliputi homogenitas, pH dan daya sebar). Uji organoleptis bertujuan untuk mengetahui apakah ada perubahan warna, bentuk, dan bau selama penyimpanan. Uji pH bertujuan untuk mengetahui adanya perubahan pH yang mungkin terjadi selama penyimpanan yang akan berpengaruh terhadap stabilitas gel. Untuk memenuhi syarat sediaan gel yang baik dan dapat diterima masyarakat dapat dilihat dari sifat fisik dan

stabilitasnya. Sifat fisik yang diukur adalah daya sebar gel. Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan zat yang akan diuji pada sekeping kaca harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar. (Supomo, 2016)

**Tabel 4.1. Formula Sediaan Gel dari Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) (Maulina, 2015)**

Komponen	Takaran (gram)
Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima	4 g
Karbopol	2 g
Gliserin	4 g
Propilenglikol	2 g
Metil paraben	0,06 g
Trietanolamin (TEA)	2 g
<i>Aquadest</i>	40 g

#### 4.7.5 Pengaplikasian gel kulit delima (*Punica granatum L.*)

Kelompok perlakuan yang telah diulserasi, dilakukan aplikasi gel kulit delima (*Punica granatum L.*). Sedangkan pada kelompok kontrol positif dilakukan aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% dua kali sehari dan kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan. Pengaplikasian gel kulit delima (*Punica granatum L.*) dilakukan secara topikal menggunakan *cotton bud* sekali usap dengan ketebalan  $\pm 0,5$  mm. Pengaplikasian dilakukan dua kali sehari pada pukul 07.00 WIB dan 17.00 WIB. Dilakukan aplikasi yang sama sampai hari ketujuh. Hari ketiga, kelima dan ketujuh tikus wistar putih dari tiap kelompok dikorbankan dan diambil jaringan ulkus untuk pembuatan preparat.

#### 4.7.6 Pembuatan preparat

##### 1. Prosedur pengambilan jaringan

Hari ke 3, ke 5, ke 7 pasca perlakuan, masing – masing tiga tikus putih pada sembilan kelompok dilakukan pembiusan dengan menggunakan ketamin dosis letal. Setelah tikus putih terbius kemudian pada jaringan ulkus diusap dengan alkohol 70% dan dipastikan tikus tidak lagi bernafas dan bergerak kemudian dilakukan pengambilan jaringan.

##### 2. Prosedur pembuatan preparat

###### a. Fiksasi

Tahap fiksasi dilakukan perendaman jaringan ulkus pada larutan formalin 10% selama 18-24 jam, kemudian jaringan dicuci dengan aquades selama 15 menit (Erna, 2002)

###### b. *Embedding*

Jaringan ulkus dimasukkan pada beberapa cairan yaitu *acetone* selama 1 jam x 4, *Xylo* selama ½ jam x 4, *paraffin* cair selama 1 jam x 3 dan penanaman jaringan kulit pada *paraffin* blok (Erna, 2002).

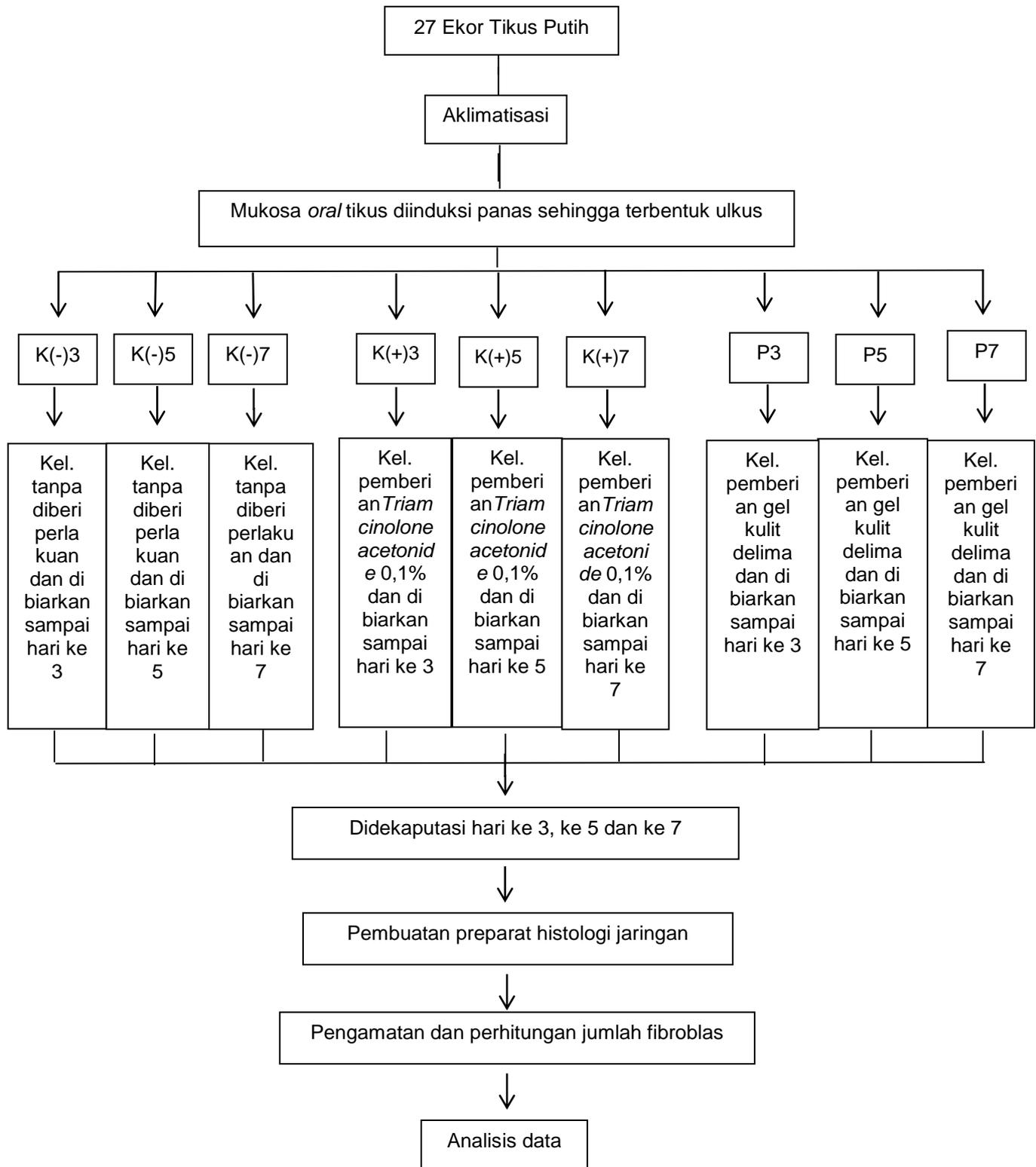
###### c. *Slicing*

Blok yang sudah tertanam jaringan ulkus diletakkan pada balok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram microtom rotary* kemudian sayat jaringan ulkus secara vertikal dengan ukuran 4 mikron. Sayatan jaringan ulkus yang dibentuk pita diambil dengan menggunakan kuas kecil, kemudian diletakkan pada *waterbath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C. Setelah sayatan jaringan ulkus merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam (Erna, 2002).

d. *Staining*

*Object glass* dimasukkan dalam *Xylo* selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Haematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. *Object glass* dimasukkan pada *Litium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarnaan *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *Xylo* selama 15 menit x 3, dan yang terakhir preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan* (Erna, 2002).

#### 4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Penelitian dilakukan uji normalitas untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak dan uji homogenitas untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampelnya  $\leq 50$  kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (*signifikansi*  $> 0,05$ ) dan homogenitas ragam terpenuhi ( $p > 0,05$ ), maka digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya.

Uji *one way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah fibroblas antara K(-), K(+), dan P pada proses penyembuhan ulkus traumatik mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas. 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 *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* (Dahlan, 2008).