

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian dilakukan dalam ruang lingkup Ilmu Kimia Medik, Ilmu Histologi, dan Ilmu Farmakologi.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian, pengumpulan data serta pengelolaan akan dilaksanakan selama penelitian dari awal pembuatan proposal sampai ujian hasil 3-5 bulan di Laboratorium *animal* Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk perlakuan hewan coba dan Laboratorium Obat Tradisional Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pembuatan ekstrak daun binahong (*Anredera Cardifolia (Tenore) Steenis*) dan ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L*). Proses blok parafin, pewarnaan dengan metode Hematoxcilin Eosin di Laboratorium Patologi Anatomi RSI Sultan Agung.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan uji eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek percobaan.

#### **3.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.4.1 Populasi Target**

Populasi target adalah tikus wistar.

### **3.4.2 Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau adalah tikus wistar yang didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### **3.4.3 Sampel Penelitian**

#### **3.4.3.1 Kriteria Inklusi**

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Umur 8-10 minggu (sebelum adaptasi)
- c. Berat badan 200-250 gram
- d. Tikus dalam keadaan sehat, aktivitas aktif, dan tingkah laku normal.
- e. Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

#### **3.4.3.2 Kriteria *Drop out***

Kriteria *Drop out* dari penelitian ini adalah tikus mati selama dilaksanakan penelitian.

### **3.4.4 Cara Sampling**

Sampel penelitian dipilih secara *simple random sampling* untuk menghindari bias sehingga semua objek populasi mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel.

### **3.4.5 Besar Sampel**

Berdasarkan ketentuan dari WHO jumlah sampel yang dibutuhkan adalah minimal 5 untuk setiap kelompok perlakuan. Dikarenakan adanya kriteria *drop out*

maka setiap kelompok ditambah 1 ekor tikus. Sehingga selama penelitian ini dibutuhkan 30 ekor tikus untuk lima kelompok.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun binahong (*Anredera Cardifolia (Tenore) Steenis*) dan ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L*).

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penilaian tampilan mikroskopis serabut kolagen.

### 3.6 Defenisi Operasional

**Tabel 2.**Defenisi Operasional

No	Variabel	Defenisi	Unit	Skala
1	Ekstrak daun binahong	Substansi kimia yang dipisahkan dari bentuk daun binahong melalui pengeringan daun binahong, lalu dilarutkan pada etanol 70 %, disaring dan diuapkan. Setelah didapatkan larutan kental.	0,5 mg	Ratio

2	Ekstrak daun papaya	Substansi kimia yang dipisahkan dari bentuk daun pepaya melalui pengeringan daun binahong, lalu dilarutkan pada etanol 70 %, disaring dan diuapkan. Setelah didapatkan larutan kental.	0,5 mg	Ratio
3	Luka sayatan	Satu sayatan pisau bedah dibuat tegak lurus dengan tulang belakang pada bagian kulit yang paling tebal. Panjang sayatan 2cm dengan kedalaman 0,5 cm. Sayatan kemudin dijahit dengan 2 jahitan benang sutra <i>nonabsorbable</i> untuk mengendalikan lebar luka		Ratio
4	Gambaran mikroskopis penyembuhan	Pengukuran perkembangan penyembuhan luka sayatan secara mikroskopis dengan		Ratio

---

luka sayatan	gambaran histologi pada
dengan tampilan	tampilan serabut kolagen.
kepadatan serabut	Dengan pewarnaan
kolagen	Hematoxcilin Eosindalah
	Pengukuran luasan serabut
	kolagen dilakukan dengan
	mikroskop pada pembesaran
	400 kali. Setiap sediaan
	diperiksa 5 lapangan pandang
	dan dilakukan pengambilan
	gambar dengan kamera
	Optilap <sup>®</sup> . Gambar yang
	didapat dianalisis
	menggunakan software
	ImageJ <sup>®</sup> lalu dilakukan
	pengukuran terhadap
	lapangan pandang.

---

### **3.7 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.7.1 Bahan**

1. Tikus wistar jantan sebanyak 30 ekor
2. Air
3. Basis krim
  - a. Asam Stearat
  - b. Cera Alba
  - c. Vaselin Album
  - d. Propilenglikol
  - e. Triethanolamina
  - f. Polisorbat
  - g. Nipagin
  - h. Aquadest
4. Bahan untuk membuat ekstrak daun binahong
  - Daun binahong
  - Ethanol 70%
5. Bahan untuk membuat ekstrak daun papaya
  - Daun papaya
  - Ethanol 70%
6. Obat anastesi yaitu ketamin dan silasin
7. Povidon iodine

8. Set pewarna Hematoxcilin Eosin
9. Formalin 10%
10. Makanan dan minum untuk tikus wistar

### **3.7.2 Alat**

1. Wadah tikus
2. Timbangan hewan
3. Mikroskop OLYMPUS<sup>®</sup> seri BX 4I
4. Slide preparat
5. Mikrotom
6. Spuit injeksi
7. Alat untuk membuat krim *placebo* ekstrak daun binahong dan daun pepaya
  - Kain penyaring
  - Cawan
  - Alat penguap
  - Timbangan
  - Mortar dan Stamfer
  - Pinset
  - Peralatan gelas
  - Kertas saring whatman no. 1
  - Perangkat uji daya lekat
  - Kaca penutup

- Penangas air
8. Alat membuat luka sayatan
    - Alat pencukur bulu
    - Set minor
    - Penggaris
  9. Masker dan sarung tangan
  10. Plastik, spidol, dan kertas label

### **3.7.3 Cara Kerja**

#### **3.7.3.1 Pembagian kelompok coba**

Dari seluruh sampel yang berjumlah 30 ekor tikus wistar jantan, dibagi menjadi 5 kelompok dengan cara *simple random sampling* masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus wistar. Masing-masing kelompok akan diberi makanan dan minuman standar secara *ad libitum*.

Dosis yang digunakan untuk ekstrak daun binahong dan daun pepaya pada penelitian ini sebesar 0,5 mg/kgBB. Penentuan dosis ini berdasarkan penelitian Wika (2012) mengenai Uji Pemanfaatan Daun Binahong (*Anredera Cardifolia (Tenore) Steenis*) Pada Proses Penyembuhan Luka Gingiva Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Melalui Pengamatan Kepadatan Serabut Kolagen Dan Ketebalan Epitel dan penelitian Nirwansyah (2013) mengenai Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pepaya dalam Etanol 70% pada Proses Penyembuhan Luka Insisi yang menyatakan

bahwa pada dosis 0,5 mg/kgBB memiliki efektivitas lebih baik dibandingkan dosis 0,25 mg/kgBB dan 0,75 mg/kgBB.

Pembagian perlakuan masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

K1 ( Kontrol Positif ) : kelompok ini diberi Povidiodine

K2 (Kontrol Negatif ) : kelompok ini tidak diberi perlakuan

P1 ( Perlakuan 1 ) : kelompok ini diberi ekstrak daun binahong 0,5mg/kgBB

P2 ( Perlakuan 2 ) : kelompok ini diberi ekstrak daun pepaya 0,5 mg/kgBB

P3 ( Perlakuan 3 ) : kelompok ini diberi campuran ekstrak daun binahong dan ekstrak daun pepaya 0,5 mg/kgBB dengan perbandingan 1:1.

### **3.7.3.2 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong dan Daun Pepaya**

Daun binahong dan daun pepaya yang telah diambil dikeringkan dalam oven dengan suhu 40-50 °C selama ± 5 hari. Daun binahong dan daun pepaya yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender sampai didapatkan tepung dari kedua jenis daun. Tepung daun binahong dan daun pepaya ditimbang 100 mg, kemudian direndam dengan 1000 ml etanol 70% selama 5 hari dimana terlindung dari sinar cahaya. Selama perendaman setiap hari dilakukan pengadukan selama 15 menit. Setelah di rendam selama 5 hari, larutan di saring dengan kain penyaring. Hasil penyaringan kemudian disaring lagi dengan kertas saring whatman no. 1. Hasil dari filtrasi penyaring di tempatkan dalam cawan petri untuk kemudian diuapkan dalam oven dengan suhu 40-50 °C sampai didapatkan ekstrak pekat. Ekstrak inilah yang digunakan dalam penelitian.

### **3.7.3.3 Pembuatan Basis Krim**

Proses pembuatan sediaan krim meliputi proses peleburan dan proses emulsifikasi. Komponen seperti minyak dan lilin, yang tidak bercampur dengan air, akan dileburkan terlebih dahulu di penanas air pada suhu 70-75<sup>0</sup> C. Sementara larutan berair, komponen larut dalam air dipanaskan pada suhu yang sama dengan komponen lemak. Kemudian larut berair secara perlahan di tambahkan ke dalam campuran lemak cair dan diaduk secara konstan dengan temperatur yang dipertahankan selama 5-10 menit untuk mencegah kristalisasi lilin/lemak. Setelah itu campuran didinginkan dengan pengadukan terus- menerus sampai campuran mengental.

### **3.7.3.4 Pembuatan Krim Ekstrak Daun Binahong dan Daun Pepaya**

Pembuatan ekstrak teknik maserasi diawali dengan pembuatan sediaan kering dari sediaan segar daun binahong dan daun pepaya dengan oven pada suhu 40-50<sup>0</sup>C. Bahan yang sudah tidak memiliki kandungan air diblender hingga membentuk serbuk. Serbuk kemudian dicampur dengan etanol pada perbandingan 10 bagian serbuk dan 75 bagian etanol. Setelah diaduk sampai rata, campuran diletakkan pada wadah tertutup yang terindung dari sinar matahari selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Campuran disaring dengan kain penyaring hingga didapatkan filtrat. Filtrat yang didapatkan diuapkan dengan oven dengan suhu 40-50<sup>0</sup>C hingga mengental. Hasil akhir ekstraksi ini berupa ekstrak kental. Selanjutnya

ekstrak kental dicampur dengan basis krim sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

### **3.7.3.5 Pembuatan Luka Sayatan**

Dilakukan anestesi pada tikus dengan ketamin 0,1 ml dan salisin 0,05 ml dalam aquades 0,5 mg/kgBB, injeksi secara intramuskular. Rambut dorsal dicukur secara luas dari scapula hingga panggul dan di sterilkan dengan povidon iodine. Satu sayatan pisau bedah dibuat tegak lurus dengan tulang belakang pada bagian kulit yang paling tebal. Panjang sayatan 2cm dengan kedalaman 0,5 cm.

### **3.7.3.6 Pembuatan Preparat Histokimia**

#### **a. Fiksasi**

Jaringan biopsi eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam Phospat Buffer Saline pada pH 7,0 ). Waktu fiksasi jaringan 18 – 24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

#### **b. Dehidrasi**

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2 jam.

#### **c. Impregnasi**

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam

#### **d. Embedding**

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58<sup>0</sup>C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyektif yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyektif dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58<sup>0</sup>C sampai parafin mencair.

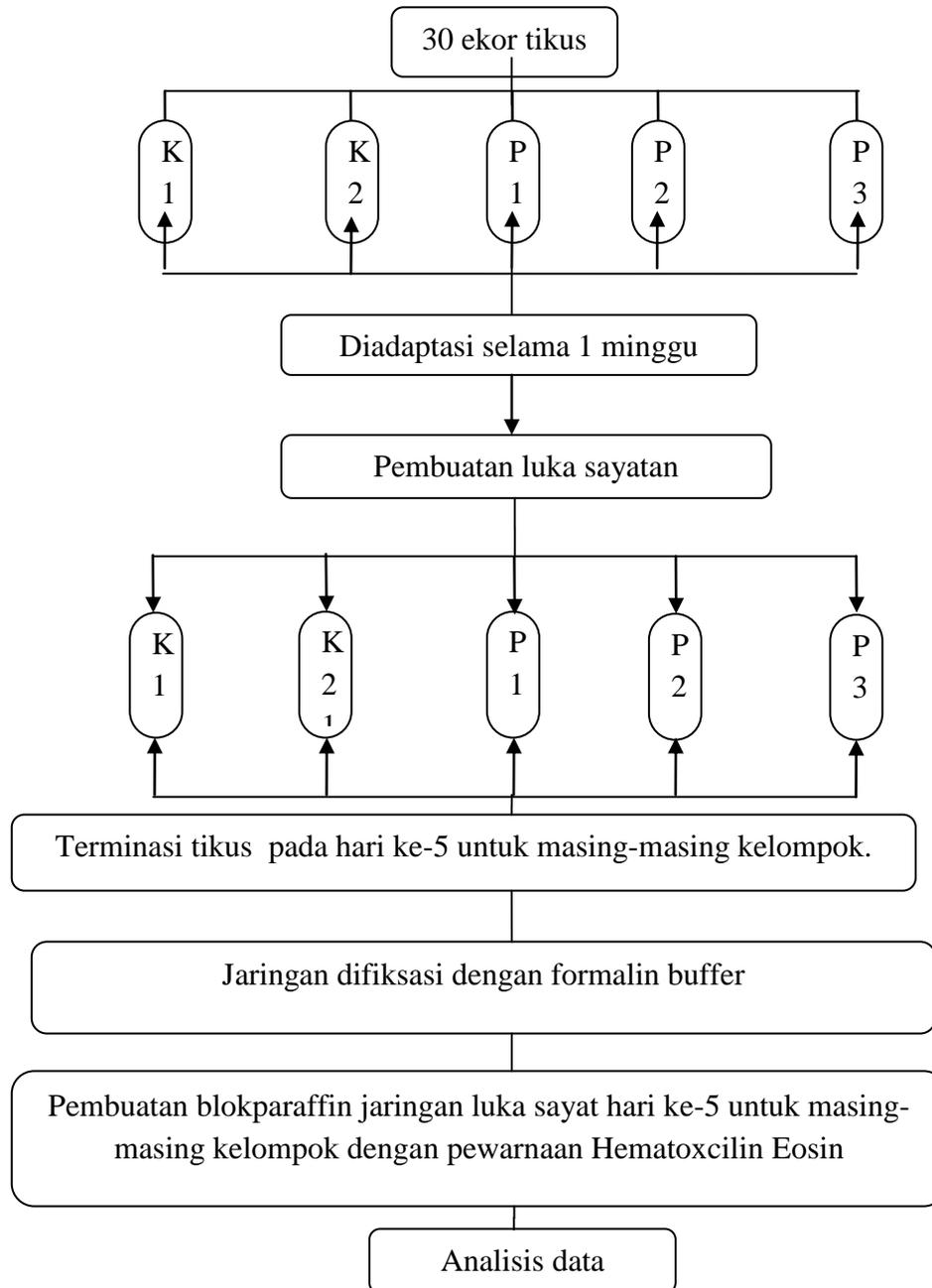
**e. Pewarnaan dengan metode Hematoxilin Eosin**

Metode pewarnaan ini deparafinisasi dalam xylol, kemudian hidrasi dalam larutan alkohol dengan gradasi yang menurun dari 100%-95%-90%-80%-70%. Inkubasi dalam larutan hematoxilin Harris selama 15 menit dan bilas dalam air mengalir dalam waktu yang singkat. Celup dalam campuran asam-alkohol secara cepat 3-10 celup cek differensiasi warna di bawah mikroskop. Bilas dalam air mengalir secara singkat, celup sebanyak 3-5 kali dalam larutan ammonium atau lithium karbonat hingga potongan bewarna biru cerah selanjutnya cuci dalam air mengalir selama 10-20 menit. Bila pencucian tidak maksimal jaringan sulit terwarna oleh Eosin, inkubasi dalam eosin selama 15 detik hingga 2 menit. Dehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat secara perlahan masing-masing selama 2 menit, inkubasi dalam xylol 2x2menit. Tutup dengan kaca penutup.

### **3.7.3.7 Pengumpulan Data**

Pengamatan dan pengukuran secara mikroskopis dari masing masing kelompok pada hari ke-5 dilakukan eksisi biopsi. Jaringan eksisi biopsi difiksasi dengan buffer formalin, dibuat blok parafin kemudian dipulas dengan Hematoxcilin Eosin. Jumlah kolagen dihitung dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri BX 41. Pengukuran luasan serabut kolagen dilakukan dengan mikroskop pada pembesaran 400 kali. Setiap sediaan diperiksa 5 lapangan pandang dan dilakukan pengambilan gambar dengan kamera Optilap<sup>®</sup>. Gambar yang didapat dianalisis menggunakan software ImageJ<sup>®</sup>

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 11.** Alur Penelitian

### 3.9 Pengolahan dan Analisis Data

#### 3.9.1 Pengolahan Data

Data yang telah terkumpul diolah dengan bantuan komputer menggunakan program statistika. Data tersebut diolah dengan beberapa tahap pengolahan data sebagai berikut :

1. Entry dan Tabulasi. Dengan memasukkan dan menyajikan data yang telah dimasukkan dan menyajikan dalam tabel
2. Cleaning. Peneliti melakukan pengecekan kembali data yang telah dimasukkan dalam program komputer. Apabila ada data yang tidak lengkap atau tertukar, segera peneliti memperbaikinya dengan data yang sesuai.

#### 3.9.2 Analisis Data

Data yang didapatkan akan dianalisis menggunakan program komputer. Penelitian ini memiliki variabel bebas dan variabel dengan skala numeric atau non kategorik ratio. Sampel pada penelitian ini terdiri atas lebih dari dua kelompok dan berpasangan. Berdasarkan hal tersebut maka dipilih uji hipotesis *one way* ANOVA.

Hal yang menjadi syarat dilakukannya uji parametric *one way* ANOVA adalah distribusi data harus sama. Distribusi data diuji normalitasnya dengan *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Jika hasil kemaknaan  $p > 0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa distribusi normal. Jika syarat tidak terpenuhi maka dapat dilakukan transformasi agar data menjadi normal. Akan tetapi, apabila setelah dilakukan transformasi data masih tidak normal, akan dilakukan uji *Kruskal-Wallis* sebagai alternatif.

Pada hasil akhir, jika pada uji *one way* ANOVA atau *Kruskal-Willis* didapatkan hasil  $p < 0,05$  maka didefenisikan memiliki makna.

### **3.10 Etika Penelitian**

*Ethical clearance* telah mendapatkan izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan No.59/EC/H/FK-RSDK/VIII/2017 tanggal 1 Agustus 2017. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium animal Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Seluruh yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.



