

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan eksperimental laboratorium *in vivo* pada tikus putih.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Kulit buah jengkol diperoleh dari perkebunan jengkol di jalan raya Ngabul Jepara, Jawa Tengah.
- b. Pembuatan ekstrak etanolik kulit buah jengkol dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- c. Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan pembuatan gel kulit buah jengkol dilaksanakan di Laboratorium Fitomedisin, Program Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- d. Seleksi hewan uji, penyesuaian tikus, dan pembuatan luka eksisi dilaksanakan di Laboratorium Hewan uji Farmasi UGM (Universitas Gadjah Mada), Yogyakarta.
- e. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM (Universitas Gadjah Mada), Yogyakarta.
- f. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi UMY (Universitas Muhammadiyah Yogyakarta).

2. Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan juni 2014 sampai dengan Agustus 2014.

C. Populasi dan Sempel Penelitian

1. Populasi

a. Tikus Putih

Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus yang diperoleh dari LPPT Unit IV UGM. Tikus yang digunakan 45 ekor dengan kriteria : jenis kelamin jantan dengan berat sekitar 200-400 gram dan umur 2-3 bulan dalam keadaan sehat dan aktif bergerak. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada tikus dikendalikan.

b. Kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol diambil yang sudah matang secara random dari pohonnya. Ditandai dengan berbentuk bulat, berwarna coklat dan sedikit lunak.

2. Sampel

Pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7 dikorbankan 3 ekor tiap kelompok, sehingga tiap kelompok terdapat 9 ekor tikus. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, jadi total besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 45 ekor tikus jantan

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel Pengaruh

- 1) Pemberian *povidone iodine* sebagai kontrol positif
- 2) Tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif
- 3) Pemberian gel ekstrak konsentrasi 1%
- 4) Pemberian gel ekstrak konsentrasi 5%
- 5) Pemberian gel ekstrak konsentrasi 10%

b. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah jumlah angka makrofag pada proses penyembuhan luka eksisi.

c. Variabel Terkendali

- 1) Jenis kelamin tikus, yaitu tikus putih jantan
- 2) Umur tikus sekitar 2-3 bulan
- 3) Berat tikus 200 gram hingga 400 gram
- 4) Makanan tikus yaitu pelet AD2
- 5) Bahan anastesi menggunakan ketamin
- 6) Luas perlukaan eksisi pada punggung tikus
- 7) Pengukuran bahan pembuatan gel ekstrak
- 8) Pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin
- 9) Pembacaan preparat histologi di bawah pengamatan mikroskop

d. Variabel Tidak Terkendali

- 1) Infeksi bakteri

- 2) Kondisi sistemik tikus
- 3) Penurunan berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- 4) Komplikasi pasca perlakuan luka eksisi

2. Definisi Operasional

a. Pembuatan luka eksisi

Perlakuan eksisi dilakukan pada kulit tikus yang telah dibersihkan dari bulu dengan pola berbentuk lingkaran dengan diameter 2cm dan kedalaman \pm 2mm. luka dibersihkan dengan pinset samapai terlihat lapisan dermis.

b. Ekstrak kulit buah jengkol

Kulit buah jengkol diekstrak menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi selama 5 hari dan remaserasi selama 24 jam. Kemudian pelarutnya diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental.

c. Gel

Gel merupakan sediaan semi padat digunakan pada kulit, umumnya sediaan tersebut berfungsi sebagai pembawa pada obat-obat topikal, pelunak kulit atau sebagai pelindung. Bahan pembuatan gel yaitu ekstrak kulit jengkol dan *sodium CMC* (CMC-Na) dengan kadar 5% dan aquadest.

d. Kromatografi lapis tipis

Kandungan senyawa pada ekstrak kental dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis. Untuk uji flavonoid menggunakan plat silika GF₂₅₄ dan disemprot dengan reagen sitroborat. Sedangkan uji tanin

menggunakan plat selulosa dan disemprot dengan reagen FeCl_3 . Fase gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5).

e. Makrofag

Setelah tikus dikorbankan, diambil jaringan yang telah diberi perlakuan dan direndam dalam larutan buffer formalin 10%. Kemudian jaringan tersebut dibuat ke dalam preparat slide dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin yang dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran $40\times$ dan $100\times$ pada 10 lapang pandang dan dilakukan pengamatan terhadap sel makrofag.

Makrofag biasa ditemukan dalam fase istirahat (tidak aktif). Makrofag berperan dalam memfagositosis patogen dan sel-sel yang terinfeksi. Aktifitas makrofag dapat dipicu salah satunya oleh sitokin yang dihasilkan sel *T-helper* dan mampu meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag secara signifikan. Makrofag yang telah aktif dapat dikenali dengan mudah, yaitu berukuran besar dan bercabang-cabang (Tortora dkk, 2007)

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

Kulit buah jengkol, larutan etanol 70%, *povidone iodine* 10%, tikus putih jantan, anestesi Ketamin, Natrium CMC (CMC-Na), Aquadest steril, bahan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin,

bahan pakan tikus pelet AD2, larutan buffer Formalin 10%, stik pH universal, n-butanol, asam asetat, pereaksi sitroborat, pereaksi FeCl₃.

2. Alat – alat

Penyaring ekstrak, penangas, gelas ukur, gelas beaker, pot penyimpanan gel, *cotton bud*, spuit injeksi, kaca bulat transparan, sentrifugator, timbangan, gunting bedah, pinset, pisau silindris, mikroskop, *object glass*, *deck glass*, kandang tikus, plat silika GF₂₅₄, plat selulosa, pipa kapiler, toples bejana, kertas saring, lampu UV-Vis.

F. Cara Kerja

1. Tahap persiapan

a. Ekstraksi bahan uji

Pembuatan ekstrak etanol kulit jengkol dilakukan di Laboratorium Fitomedisin UMY. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 70%. 2,5 kilogram kulit jengkol dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian dikeringkan. Langkah selanjutnya, kulit jengkol dipotong kecil, kemudian diblender dan diayak lalu diambil serbuknya sebesar 500 gram. Serbuk direndam di dalam etanol 70% selama 5 hari kemudian dilakukan remaserasi selama 24 jam. Kemudian larutan yang diperoleh dipanaskan diatas penangas hingga menguap dan menyisakan ekstrak kental (pekat).

b. Kromatografi lapis tipis

Analisis kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam berupa plat silika GF₂₅₄ dan plat selulosa berukuran 10×4 cm, sedangkan fase gerak

yang digunakan yaitu campuran antara n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5). Mula-mula ekstrak kental dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol 70% kemudian dilakukan penotolan menggunakan pipa kapiler pada 1 cm dari tepi bawah plat fase diam dengan tiga penotolan yang beragam dan masing-masing diberi jarak 1 cm. Setelah itu, plat fase diam dimasukkan ke dalam bejana yang berisi fase gerak dan sudah dalam keadaan jenuh. Ketika sudah terjadi pemisahan, maka hasilnya dapat disimpulkan dari nilai Rf dan deteksi bercak menggunakan reagen penyemprotan dan dilihat dibawah sinar tampak dan sinar UV (254 nm dan 366 nm). Adapun rumus untuk menghitung nilai Rf yaitu:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Analisis kandungan senyawa pada ekstrak kulit jengkol menggunakan kromatografi lapis tipis dilakukan sebagai berikut:

- Flavonoid

Fase diam : Silika GF₂₅₄

Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)

Deteksi : Sinar UV-Vis, penyemprotan sitroborat

- Tanin

Fase diam : Selulosa

Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)

Deteksi : Sinar UV-Vis, penyemprotan FeCl₃

c. Pembuatan bentuk sediaan gel

Pembuatan gel ekstrak kulit jengkol terdiri dari ekstrak kental menggunakan *natrium CMC* (CMC-Na) sebagai basis gel (5%) dan aquades steril sebagai pelarut. Takaran yang digunakan dalam formulasi gel adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Formulasi pembuatan gel ekstrak kulit buah jengkol

	Konsentrasi 1%	Konsentrasi 5%	Konsentrasi 10%
Ekstrak	0,2 gram	1 gram	2 gram
CMC-Na	1 gram	1 gram	1 gram
Aquadest	18,8 ml	18 ml	17 ml
Volume gel	20 ml	20 ml	20 ml

Proses pembuatan gel dimulai dengan menimbang basis CMC-Na sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam gelas ukur. Kemudian CMC-Na dilarutkan dengan aquadest yang telah dipanaskan dengan waterbath dengan suhu 60-70°C sedikit demi sedikit dan diaduk sampai mengembang. Selanjutnya basis ditambahkan dengan ekstrak sesuai takaran pada Tabel 1. Campuran tersebut kemudian diaduk hingga membentuk massa gel dan simpan di lemari es bersuhu 4-6° C.

Evaluasi sediaan gel, dilakukan dengan cara

1) Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan melihat tampilan fisik sediaan gel dengan pengamatan terhadap bentuk, warna, dan baunya.

2) Uji homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji untuk mengetahui tercampurnya suatu sediaan secara merata. Uji ini dilakukan dengan cara mengoleskan sebagian sediaan gel pada permukaan yang transparan. Gel dioleskan pada kaca transparan diambil dari bagian atas, tengah, dan bawah. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar.

3) Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan gel untuk menjamin sediaan tidak menyebabkan iritasi pada kulit. pH sediaan diukur dengan stik pH universal. Stik pH dicelupkan ke dalam sediaan gel selama beberapa saat kemudian hasilnya disesuaikan dengan standar pH. Sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit yaitu dalam interval 4,5-6,5.

4) Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk menjamin pemerataan gel saat diaplikasikan pada kulit. Gel ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan ditengah kaca bulat berskala kemudian ditimpa dengan kaca bulat yang lain dan diberi pemberat sehingga berat kaca dan pemberat yaitu 150 gram. Setelah didiamkan satu menit, dicatat diameter penyebarannya. Daya sebar gel yang baik yaitu antara 5-7 cm.

5) Uji konsistensi

Uji konsistensi bertujuan untuk mengetahui stabilitas sediaan gel dengan cara mengamati perubahan konsistensi setelah dilakukan sentrifugasi. Sediaan gel disentrifugasi dengan sentrifugator dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam kemudian diamati apakah ada pemisahan pada sediaan gel.

d. Persiapan hewan uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diadaptasikan (diaklimatisasi) selama 1 minggu. Hewan uji yang berjumlah 45 ekor dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif (diaplikasikan *povidone iodine*) sebanyak 9 ekor, kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan) sebanyak 9 ekor, kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 1%) sebanyak 9 ekor, kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 5%) sebanyak 9 ekor, dan kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol (konsentrasi 10%) sebanyak 9 ekor. Masing-masing kelompok dikandang yang berbeda dan diletakkan pada kondisi lingkungan yang sama.

e. Sterilisasi alat dan bahan

Pada saat kegiatan pengujian diawali dengan proses sterilisasi alat penelitian dengan alkohol.

2. Jalannya penelitian

a. Induksi luka eksisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus yang sudah diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama satu minggu dicukur bersih dengan pola berbentuk lingkaran berukuran 3cm dibagian dorsal dekstra, kemudian dilakukan penggambaran diameter luka pada punggung tikus agar luka yang terbentuk terlihat rapi, setelah itu tikus dianasthesi dengan cara injeksi ketamin pada daerah yang telah digambar tadi agar memungkinkan dilakukan induksi luka eksisi. Perlakuan eksisi dilakukan pada kulit tikus yang telah dibersihkan dari bulu dengan pola berbentuk lingkaran dengan diameter 2cm dan kedalaman \pm 2mm. Luka dibersihkan dengan pinset samapai terlihat lapisan dermis.

Luka yang terbentuk tidak mengenai otot sehingga luka terbuka seperti luka derajat tiga. Tanda-tanda makroskopik pada luka derajat tiga adalah perlukaan kulit terlihat berlemak, tidak dijumpai bulu, kerusakan meliputi epidermis, dermis, subkutis, dan kelenjar mengalami kerusakan kulit.

Empat puluh lima ekor tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif diaplikasikan *povidone iodine 10%* (kelompok I), kelompok negatif tanpa perlakuan (kelompok II), Kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 1% (kelompok III), kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 5% (kelompok IV),

dan kelompok perlakuan gel ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% (kelompok V).

Hari ke nol (0), 45 ekor tikus putih di beri perlakuan eksisi dengan pembedahan, kemudian diberi perlakuan yang sesuai pada masing-masing kelompok. Pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7 setelah luka eksisi, 3 ekor tikus dari masing-masing kelompok dikorbankan.

b. Pemberian perlakuan gel ekstrak

Tikus yang sudah dikelompokkan dan diukur diameter lukanya diberikan perlakuan sesuai kelompok. Kelompok 1 adalah kelompok hewan uji kontrol positif dengan diberikan *povidone iodine*. Kelompok 2 adalah kelompok hewan uji dengan kontrol negatif yaitu tanpa perlakuan. Kelompok 3 adalah kelompok hewan uji diberi sediaan gel kulit jengkol dengan konsentrasi 1%. Kelompok 4 adalah kelompok hewan uji diberi sediaan gel kulit jengkol dengan konsentrasi 5%, dan kelompok 5 adalah kelompok hewan uji diberi sediaan gel kulit jengkol dengan konsentrasi 10%. Pemberian setiap perlakuan dilakukan setiap hari dengan volume 0,1 ml sampai luka eksisi sampai pada hari ke-7.

c. Pembuatan preparat

1) Penerimaan jaringan

Jaringan ada yang diterima oleh TU Patologi Anatomi untuk pemeriksaan histopatologi adalah jaringan yang diperoleh dengan biopsi insisi/eksisi, nekrosis atau aspirasi yang difiksasi dalam cairan

formalin buffer 10 % dan ditutup dengan rapat. Perbandingan jaringan dengan cairan fiksasi adalah 1:10.

2) Makroskopis jaringan

Dokter PA mengambil 1 kope dari satu atau beberapa tempat pengambilan masing-masing Kope adalah dengan ukuran 2 x 1,5 x 0,2-0,3 cm. setelah itu jaringan yang diambil tersebut akan dilakukan *processing*.

3) Processing jaringan

Untuk memproses jaringan memakai alat *automatic tissue processor* yang bekerja \pm 18,5 jam. Proses ini terbagi dalam empat tahap, yaitu:

a) Fiksasi

Berfungsi untuk mempertahankan struktur gel sehingga menjadi stabil secara fisik maupun kimiawi dan mencegah terjadinya dialisis atau pembengkakan pada ruptur. Fiksasi yang paling sering digunakan adalah formalin 10%, tetapi sebaiknya formalin *buffer* 10%.

b) Dehidrasi

Berfungsi untuk menghilangkan atau menarik kadar air dalam jaringan dengan cara mulai konsentrasi rendah sampai tinggi. Untuk dehidrasi yang baik memakai alkohol 70%-100%.

c) *Clearing*

Berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan, memberikan warna yang bening pada jaringan dan juga sebagai zat perantara masuknya kedalam parafin.

d) Infiltrasi parafin

Parafin cair suhu 57-59⁰C berfungsi mengisi rongga-rongga atau pori-pori yang ada yang ada dalam jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan *xylol*.

d. Pembacaan preparat Histopatologi

Pembacaan preparat histologi dilakukan oleh peneliti dengan bantuan ahli Patologi Anatomi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Sel makrofag diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40× dan 100× dan dihitung dalam 10 lapang pandang kemudian dijumlahkan.

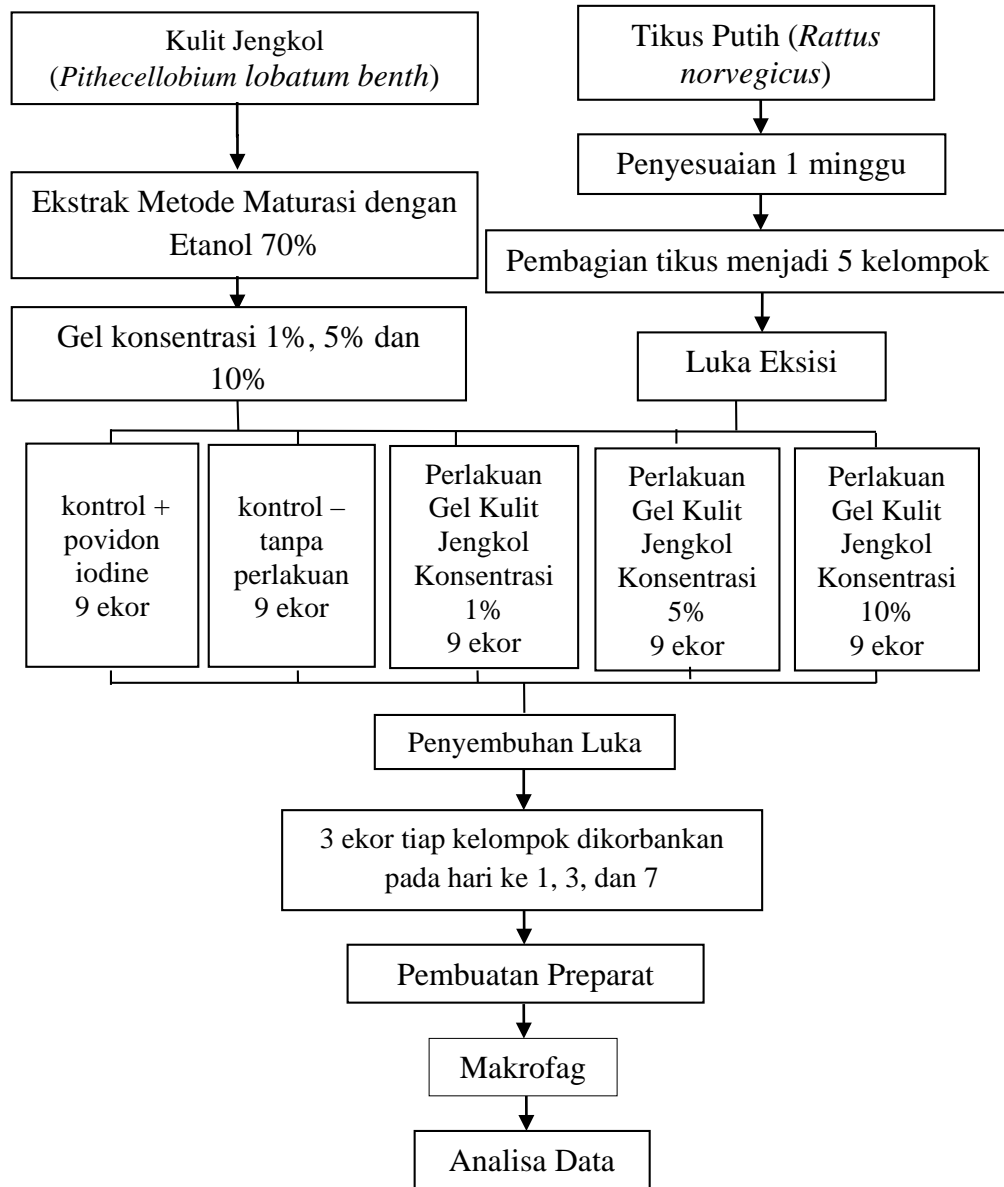
G. Analisis Data

Data uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro Wilk* karena sampel kurang dari 50 dan data dianalisa dengan uji *Two Way Anova*, selanjutnya uji lanjutan dengan menggunakan uji *Least Significant Difference* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok dan angka makrofag per hari.

H. Etik Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melindungi hak sampel selama proses penelitian dengan mendapatkan persetujuan dari komite etik bahwa penelitian dilakukan tidak melanggar kode etik penelitian.

I. Alur Penelitian



Gambar 1. Alur penelitian