

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian secara eksperimen yaitu dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL merupakan jenis rancangan percobaan dengan jumlah percobaan dapat dikontrol. Dikatakan rancangan acak lengkap karena pengacakan percobaan dilakukan terhadap semua unit percobaan dan dipakai jika faktor yang diteliti lebih dari satu (Elvinus *et al*, 2016). dilakukan dengan empat kelompok percobaan dan dilakukan pengulangan. Perlakuan yang diberikan yaitu:

- K : Aquades
- P1 : Infusa Daun Pepaya 10% b/v
- P2 : Infusa Daun Pepaya 20% b/v
- P3 : Infusa Daun Pepaya 30% b/v

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah sejumlah karakteristik umum yang dimiliki oleh seluruh elemen dari sekumpulan elemen, yang di dalamnya terdapat bidang-bidang yang dapat diteliti, atau populasi merupakan orang-orang dari dalam kelompok yang menjadi keseluruhan atau peristiwa untuk diteliti oleh peneliti yang mereka minati. (Malhotra, 1996). Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan mencit galur BALB/c. Penelitian ini menggunakan mencit jantan yang terdiri dari 4 kelompok, pada masing-masing kelompok berisi 6 ekor mencit yang berumur 6-8 minggu dengan bobot badan antara 20-40 gram. Sampel adalah suatu sub kelompok dari populasi yang dipilih untuk dipakai dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu infusa daun pepaya.

. Untuk menentukan jumlah kelompok uji menggunakan rumus Federer (Hanafiah, 1997). Sebagai berikut :

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

Ket :

t = Jumlah kelompok

r = Jumlah subjek perkelompok

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

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$r-1 \geq 15/3$$

$$r-1 \geq 5$$

$$r \geq 5+1$$

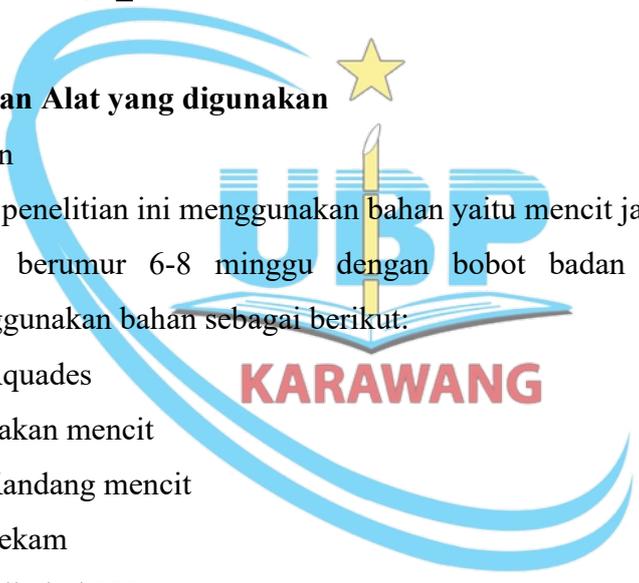
$$r \geq 6$$

3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

A. Bahan

Pada penelitian ini menggunakan bahan yaitu mencit jantan galur BALB/c yang berumur 6-8 minggu dengan bobot badan 20-40 gram, dan menggunakan bahan sebagai berikut:

1. Aquades
2. Pakan mencit
3. Kandang mencit
4. Sekam
5. Alkohol 70%
6. Eter
7. Xylol
8. Parafin
9. Balsam canada
10. Formalin 10%
11. NaCl 0,9%

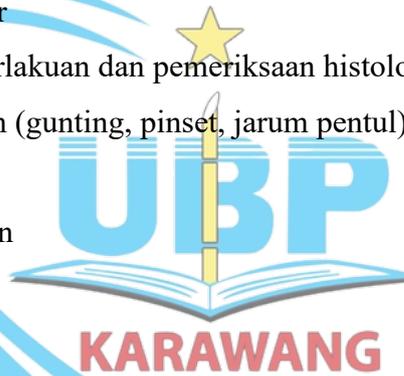


UBPP
KARAWANG

B. Alat

Pada penelitian ini menggunakan alat sebagai berikut:

1. Alat untuk membuat infusa yaitu:
 - a. Termometer
 - b. Stopwatch
 - c. Panci lapis enamel
 - d. Kompor
 - e. Kain flanel
 - f. Batang pengaduk
 - g. Beaker glass
 - h. Gelas ukur
2. Alat untuk perlakuan dan pemeriksaan histologi hati yaitu:
 - a. Alat bedah (gunting, pinset, jarum pentul)
 - b. Sпит
 - c. Timbangan
 - d. Vial



3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan April sampai dengan Juni 2021, yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Lokasi penelitian dan pembacaan gambaran histopatologi hati dilakukan di Laboratorium Patologi Institut Pertanian Bogor.

3.5 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis infusa daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan konsentrasi 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah mengamati perubahan histopatologi hati mencit jantan galur BALB/c.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan hewan uji mencit jantan galur BALB/c, bahan uji yang digunakan daun pepaya (*Carica papaya* L.), pemberian infusa dilakukan 1 kali setiap hari selama 28 hari secara oral.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Simplisia dan Determinasi Tanaman

Pembuatan simplisia serta determinasi tanaman telah diuji di Badan Penelitian dan Pengembangan (LITBANG) yang berlokasi di Kota Bogor.

3.6.2 Proses Pembuatan Infusa Daun Pepaya

Ada beberapa kriteria yang harus diperhatikan untuk mendapatkan simplisia tanaman yang kualitasnya bagus yaitu tahapan panen dan pascapanen, yang harus diperhatikan yaitu:

1. Pedoman Panen Daun

Menurut (Kementerian RI dan Badan LITBANG, 2011). Pada proses pemanenan daun, harus menghindari terjadinya kerusakan pada tanaman. Pedoman cara pemanenan daun adalah sebagai berikut:

- a. Sebelum tanaman memiliki bunga daun harus segera dipanen dan daun yang dipanen adalah daun yang sudah dewasa kecuali dinyatakan lain.
- b. Untuk tanaman berupa pohon, sebisa mungkin menghindari untuk memanen semua daun pada tanaman agar tidak mengganggu proses fisiologi.
- c. Jika daun masih muda perlu dihindari untuk dipanen kecuali sudah diketahui kandungan kimia yang diperlukan.
- d. Jika hasil daun yang dipanen mengalami penurunan dari hasil panen sebelumnya, maka hasil panen harus dibatasi.

2. Pedoman Pascapanen

Menurut (Kementerian RI dan Badan LITBANG, 2011) yaitu mulai dari pengumpulan bahan, sortasi basah, pencucian, penirisan, perubahan bentuk, pengeringan sortasi kering, pengemasan dan penyimpanan.

a. Sortasi Basah

Sortasi basah adalah memisahkan zat asing maupun kotoran juga bagian tanaman lainnya yang tidak diperlukan, kotoran itu berupa bahan yang rusak, tanaman yang serupa, rumput/gluma, tanah, kerikil, tujuannya yaitu untuk menjaga kemurnian dan menghindari kontaminasi, mendapatkan simplisia dengan ukuran dan jenis yang serasi, serta mengurangi cemaran mikroba.

b. Pencucian

Tujuan dari pencucian yaitu untuk membuang kotoran dan tanah yang menempel pada simplisia, dicuci menggunakan air bersih yang mengalir, air bersih yang berasal dari PAM atau sumur. Pencucian dilakukan secepat mungkin untuk bahan yang mengandung senyawa aktif mudah larut air, bahan simplisia yang berasal dari bawah tanah seperti rimpang, akar, dan batang, serta daun yang menempel pada permukaan tanah dilakukan pencucian secara tepat terutama dibersihkan dengan penyemprotan air bertekanan tinggi atau disikat.

c. Penirisan

Bahan ditiriskan setelah dicuci pada wadah yang sudah disiapkan untuk penirisan, untuk mencegah bertambahnya kandungan air atau terjadinya pembusukan pada bahan, tujuan penirisan yaitu untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan air pada permukaan bahan dan dilakukan setelah pencucian segera mungkin, untuk mempercepat penirisan simplisia harus dibolak-balik agar air cepat menguap.

d. Perubahan bentuk

Beberapa jenis bahan baku perlu dilakukan perubahan bentuk seperti serutan, potongan, dan irisan agar lebih mudah dalam proses pengeringan, sortasi, pengemasan, penyimpanan, dan juga untuk memperbaiki fisik agar lebih praktis dan memenuhi keseragaman bobot. Untuk perubahan bentuk biasanya hanya pada simplisia bunga, daun, kayu, batang, umbi, kulit batang, rimpang dan akar. Perubahan bentuk dilakukan menggunakan pisau dll.

e. Pengeringan

Pada tanaman segar jarang digunakan karena mudah rusak jika disimpan dalam jangka waktu lama, tujuan pengeringan yaitu untuk mengurangi kadar air simplisia supaya tidak rusak oleh jamur, kapang dan jasad renik lainnya. Pengeringan dibagi menjadi dua macam yaitu :

- Pengeringan sinar matahari langsung digunakan untuk bahan yang cukup kuat seperti biji, kulit kayu, kayu, dan bagian senyawa aktif yang terkandung yang cukup stabil keuntungan dari metode ini yaitu murah dan mudah, kekurangan metode ini bergantung dengan cuaca.
- Pengeringan untuk bagian simplisia yang lunak seperti bunga, daun dll. Sangat cocok menggunakan metode pengeringan dengan cara diangin-anginkan saja tidak perlu dibawah matahari.

f. Sortasi Kering

Sortasi kering memiliki prinsip dan tujuan yang sama dengan sortasi basah hanya saja pada sortasi kering digunakan untuk zat asing simplisia yang belum kering harus dipisahkan dan untuk menjamin bahan bebas dari bahan asing dan pemisahan bentuk dan ukuran bahan.

g. Pengemasan dan Pemberian Label

Pengemasan bahan berpengaruh sekali pada mutu dan kualitasnya dengan penyimpanan dan pengangkutan simplisia, tujuannya yaitu untuk menjaga simplisia saat penyimpanan, distribusi dan pengangkutan dari gangguan luar seperti pencemaran mikroba, kelembaban, cahaya, suhu, juga gangguan dari berbagai jenis serangga, bahan kemas harus kedap udara dan air yang dapat menjaga simplisia dari berbagai gangguan luar.

3. Penyiapan Sediaan Uji Infusa

Sediaan cair yang pembuatannya dilakukan dengan cara mengekstrak simplisia tumbuhan memakai aquades pada suhu 90°C dalam waktu 15 menit disebut dengan Infusa. Dalam pembuatan obat herbal berbahan lunak seperti daun dan bunga, sediaan infusa adalah cara yang cukup mudah. Cara pembuatan sediaan infusa yaitu mencampurkan simplisia yang telah dihaluskan dengan aquades secukupnya dan dimasukkan ke dalam panci, lalu panaskan pada penangas air dalam waktu 15 menit, dihitung pada saat suhu 90°C sambil diaduk sesekali. Sering menggunakan kain flanel saat panas, lalu tambahkan sedikit air panas melewati ampas sampai didapatkan volume infusa yang diinginkan. Setelah dingin infusa diperas jika terkandung minyak atsiri, infusa tidak boleh diperas jika terkandung lendir, dan infusa ditambahkan larutan Na₂CO₃ P 10% b/v dari berat simplisia jika terkandung glikosida antarkuinon (BPOM, 2010).

Pembuatan infusa daun pepaya dibuat dengan beberapa macam yaitu dengan berbagai konsentrasi 10 % b/v, 20 % b/v, dan 30 % b/v. Untuk pembuatan sediaan infusa daun pepaya 10 % b/v digunakan daun pepaya sebanyak 10 gram kemudian direbus dalam 100 ml aquades dengan suhu 90°C dengan waktu kurang lebih selama 15 menit. Hal yang sama dilakukan pada konsentrasi 20 % digunakan 20 gram simplisia daun pepaya, dan 30 % b/v digunakan 30 gram simplisia daun pepaya. Kemudian disaring menggunakan kain flanel (BPOM, 2010).

Infusa yang mengandung bukan bahan khasiat keras, dibuat dengan menggunakan 10% simplisia (Anonim, 1979). Dosis infusa daun pepaya berorientasi dengan konsentrasi 10% pada konsentrasi infusa. Kemudian dibuat konsentrasi pada kelompok perlakuan yaitu 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v dengan volume pemberian untuk mencit adalah 1 mL/20gBB. Infusa daun pepaya sebanyak 1 mL per oral diberikan pada mencit dengan berat badan 20 gram, maka dosis infusa daun pepaya yang diberikan yaitu sebanyak 5, 10, dan 15 g/kgBB (Tanti *et al*, 2012).

3.6.3 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan mencit galur BALB/c yang bersumber dari peternak pakan reptil di daerah Cibarusah Kab. Bekasi. Umumnya untuk uji menggunakan hewan uji tikus/mencit betina karena memiliki sensitivitas yang lebih sensitif dibandingkan dengan jantan, akan tetapi menurut literatur secara toksikologi dan toksikokinetik menunjukkan bahwa jenis kelamin jantan lebih sensitif oleh karena itu penelitian ini menggunakan mencit jantan.

Kriteria untuk hewan uji yaitu :

- a. Hewan sehat dan dewasa.
- b. Untuk penggunaan hewan betina yang belum pernah beranak atau tidak sedang hamil.
- c. Untuk permulaan uji menggunakan hewan dewasa untuk mencit 5-8 minggu dan untuk tikus 8-12 minggu, dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan.

Sebelum dilakukan pengujian terhadap hewan uji, mencit diadaptasi terlebih dahulu dengan lingkungan supaya mencit dapat menyesuaikan diri dan tidak stres saat dilakukan pengujian pada hewan uji.

3.6.4 Perlakuan

Sebelum dilakukan pengujian hewan uji harus dipuaskan terlebih dahulu selama 8-12 jam, hanya diberikan air minum saja, kemudian berat badan mencit ditimbang dan diberikan sediaan uji menggunakan sonde. Metode yang digunakan yaitu pemberian infusa daun pepaya secara oral menggunakan spuit yang ujungnya diberi kanul selama 28 hari. Setelah 1-2 jam perlakuan mencit boleh diberikan pakan kembali, apabila sediaan uji diberikan beberapa kali, maka pakan diberikan setelah perlakuan, untuk volume maksimal cairan yang diberikan tergantung dari ukuran hewan uji, untuk jumlah normalnya tidak melebihi 1 mL/20g/BB, jika pelarut yang diberikan hanya air boleh diberikan hingga 2 mL/20g/BB (BPOM, 2014).

3.6.5 Pembuatan Sediaan Preparat Hati

Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dibius terlebih dahulu dengan cara memasukkan mencit kedalam wadah yang telah diisi eter, kemudian mencit dibedah dan diambil organ hatinya menggunakan gunting dan pinset bedah. Mencit yang sudah dibedah dan diambil organ hatinya dimasukkan ke dalam wadah plastik dan dikubur. Kemudian organ hati yang sudah diambil dibilas menggunakan NaCl 0,9% dan dimasukkan ke dalam vial yang sudah diisi dengan formalin 10% agar organ hati mencit awet.

Pada pembuatan preparat hati mencit yaitu difiksasi menggunakan formalin 10% dan dimasukkan ke dalam alkohol 30% selama 20 menit hingga 3 kali pengulangan. Selanjutnya diberikan alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 60%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol 96% selama waktu 60 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam larutan xylol alkohol 1:1 selama \pm 24 jam, dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali selama 20 menit supaya jaringan pada hati mencit dapat terlihat tembus pandang, kemudian dimasukkan ke dalam xylol parafin 1:1 selama 20 menit, dan dipanaskan dengan oven, setelah itu embeding dan blocking parafin sebanyak 3 kali selama 20 menit, lalu blok parafin dicetak dan didinginkan.

Pengujian selanjutnya yaitu proses pewarnaan menggunakan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi (mencegah kerusakan sel) menggunakan larutan xylol alkohol (alkohol 96% + xylol) ± selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 80%, alkohol 70%, alkohol 60%, alkohol 50%, alkohol 40%, alkohol 30%, ± selama 30 menit.

Pengujian selanjutnya dibersihkan menggunakan alkohol 30%-96% selama 30 menit dan dengan aquades 1 kali selama 10 menit, setelah itu dibersihkan lagi dengan air mengalir sampai bersih, dibersihkan kembali dengan aquades, setelah itu dibersihkan dengan menggunakan acid alkohol (alkohol + NaCl 0,9%), setelah itu dibersihkan dengan alkohol 50%-96%, kemudian dengan eosin selama 2-5 menit, setelah itu dibilas dengan alkohol sebanyak 3 kali. Setelah selesai sesuai dengan prosedur, organ hati dikeringkan dengan kertas saring, dan dibersihkan dari kotoran yang terdapat pada jaringan, tahapan terakhir yaitu direndam dengan menggunakan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit, kemudian ditetesi dengan balsam canada lalu vial ditutup (Nida *et al*, 2018).

3.6.6 Pengamatan Preparat Histopatologi Hati

Pengamatan preparat histopatologi hati dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali pada penentuan letak lobulus hati dan perbesaran 400 kali untuk mengamati perubahan sel hati. Pengamatan yang dilakukan antara lain yaitu degenerasi dan nekrosis pada 3 zona yaitu area periportal, area midlobular, dan area centrilobular minimal 3 lapang pandang (LP) pada setiap area, lalu data tersebut dijumlah dan diakumulasikan dengan menghitung persentase jumlah sel, kerusakan yang dinilai yaitu banyaknya jumlah sel degenerasi dan nekrosis (Lindberg, 2017). Data yang telah diakumulasikan dijumlah dan dihitung rata-ratanya, sehingga didapatkan nilai presentase 1 ulangan pada masing-masing perlakuan (Wafa *et al*, 2018).



Gambar 1. Gambaran sel hati normal

Sumber : (Charlotte, 2002)

Gambaran sel hati yang normal yaitu terlihat dari susunan radier sel teratur, sinusoid normal, batas vena sentralis jelas dan inti sel hepatosit jelas.

Degenerasi adalah luka cedera ringan yang diakibatkan oleh perubahan morfologi sel yang sifatnya reversibel. Disebut reversibel karena jika cedera dapat dihentikan, maka sel akan kembali seperti semula. Tapi jika dosis berlebihan dan berjalan terus menerus, maka akan mengakibatkan kematian sel atau nekrosis yang tidak dapat pulih kembali (Himawan, 1994).

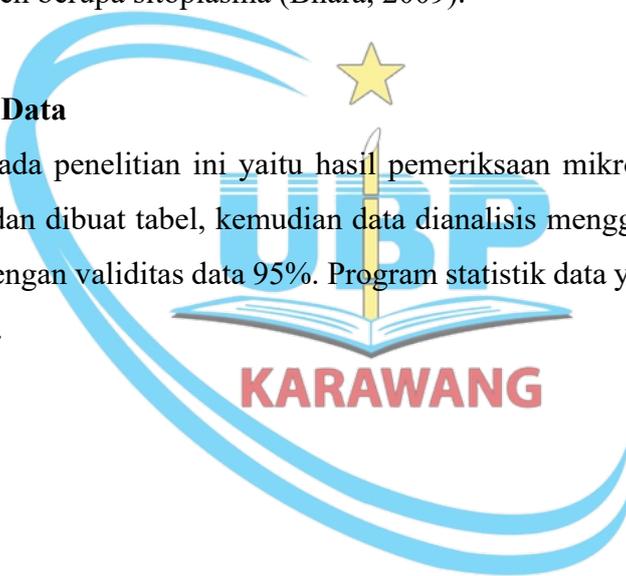
Nekrosis adalah rusaknya susunan enzim dari sel atau jaringan yang merupakan tindak lanjut dari kerusakan degenerasi yang sifatnya ireversibel sebab nekrosis pada sel hati adalah kematian sel. Terlihat atau tidaknya kerusakan pada sel tergantung pada lama dan jenis nekrosis. Tahap-tahap nekrosis meliputi piknosis, karioeksis, dan kariolisis. Piknosis ditandai dengan terjadinya penggumpalan kromatin dan inti (nukleus) tidak dikenali lagi, inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioeksis ditandai dengan terjadinya kerusakan pada inti yaitu inti pecah berkeping-keping sehingga bentuknya menjadi tidak teratur. Sitoplasma mulai memanjang dan menyerap zat warna lebih banyak sehingga warna menjadi lebih gelap setelah dilakukan pewarnaan. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai

hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopik, bentuk sel lebih memanjang dan warnanya menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan (Price & Wilson, 2002).

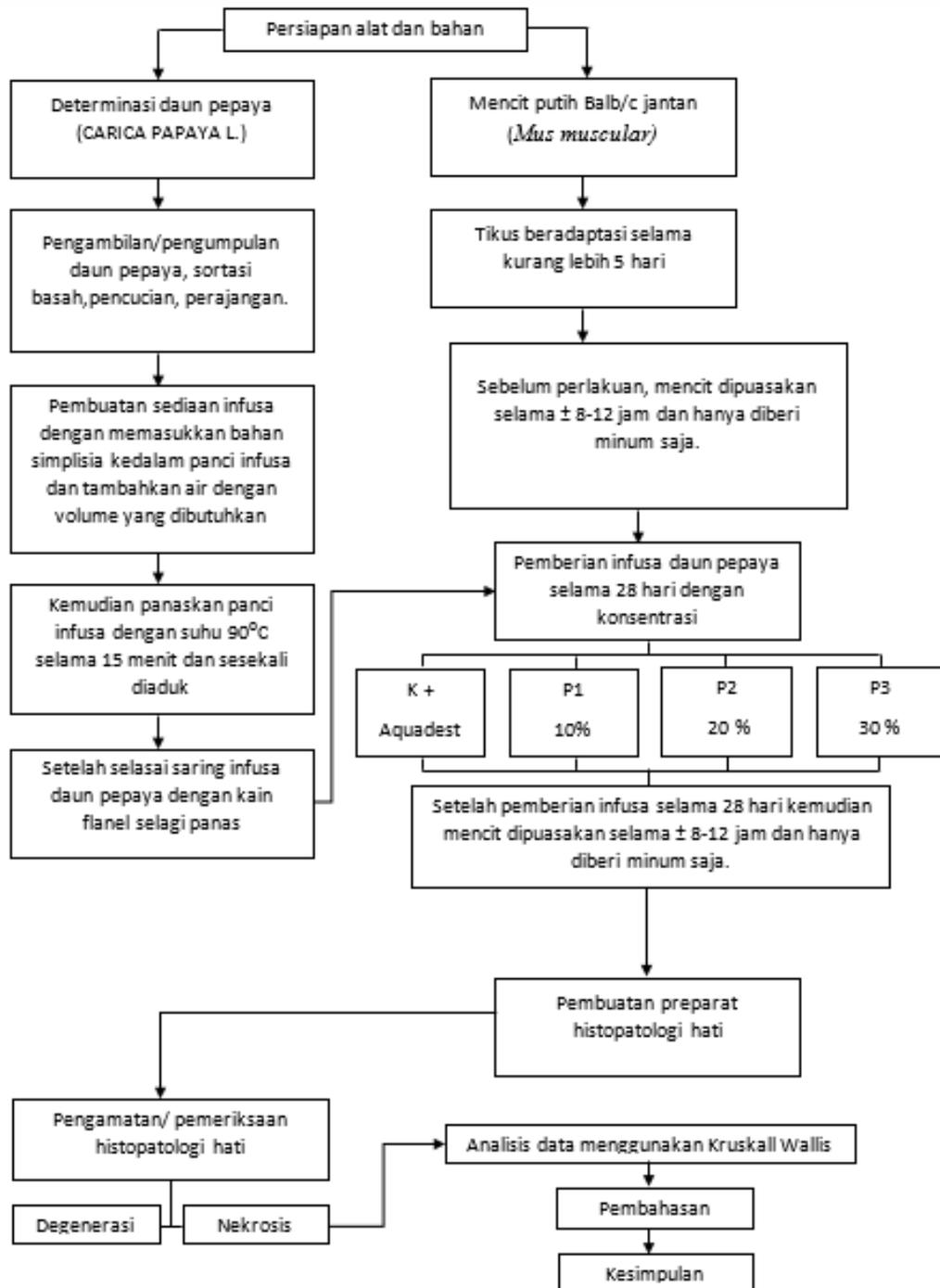
Sel degenerasi ditandai dengan adanya penimbunan lemak di dalam parenkim hati berupa bercak, zonal dan merata, pengecatan inti terlihat terdesak ke tepi serta rongga sel terlihat kosong, atau sel yang mengalami pembengkakan serta kekeruhan sitoplasma karena munculnya granula-granula dalam sitoplasma. Sedangkan sel yang dikatakan nekrosis ditandai dengan hilangnya inti sel pada sel hepatosit, sehingga hanya terdapat fragmen berupa sitoplasma (Bhara, 2009).

3.7 Analisis Data

Pada penelitian ini yaitu hasil pemeriksaan mikroskopik berupa data skoring dan dibuat tabel, kemudian data dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis dengan validitas data 95%. Program statistik data yang digunakan yaitu SPSS 16.



3.8 Skema Penelitian



Gambar 2. Skema Penelitian