

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Control Group Design*. Adapun rancangan penelitian dengan 6 perlakuan sebagai berikut :

R	X ₁	0 ₁
R	X ₂	0 ₂
R	X ₃	0 ₃
R	X ₄	0 ₄
R	K-	0 ₅
R	K+	0 ₆

Sumber dimodifikasi dari Sugiyono (2014)
Gambar 5 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- R** = Random
- K+** = Kelompok kontrol positif (dengan diolesi betadine)
- K-** = Kelompok kontrol negatif (dengan diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 0%)
- X1** = Kelompok perlakuan 1 (dengan diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 25 %)
- X2** = Kelompok perlakuan 2 (dengan diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 50 %)
- X3** = Kelompok perlakuan 3 (dengan diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 75 %)
- X4** = Kelompok perlakuan 4 (dengan diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 100 %)
- 0₆₊** = Observasi kelompok kontrol positif setelah diolesi betadine
- 0₅₋** = Observasi kelompok negatif setelah diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 0%
- 0₁** = Observasi kelompok perlakuan 1 setelah diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 25 %)
- 0₂** = Observasi kelompok perlakuan 2 setelah diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 50 %)
- 0₃** = Observasi kelompok perlakuan 3 setelah diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 75 %)
- 0₄** = Observasi kelompok perlakuan 4 setelah diolesi ekstrak minyak bunga cengkeh 100 %)

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di beberapa tempat :

- a. Laboratorium Fitokimia Unit Layanan Pengujian (Assessment Service Unit) Fakultas Farmasi Universitas Erlangga BHMN Kampus B Jalan Dharmawangsa Dalam Surabaya untuk pembuatan ekstrak minyak bunga cengkeh.
- b. Toko Hewan dan Peternakan Tikus Putih Jl. Jambangan 7E No. 10, Surabaya, Jawa Timur 60232.
- c. Laboratorium Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Surabaya untuk penempatan kandang mencit serta pengujian pengaruh ekstrak minyak bunga cengkeh terhadap kesembuhan

luka gores pada mencit (*Mus musculus*). Penelitian secara keseluruhan dilakukan pada bulan Desember 2017 hingga bulan Juni 2018.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah sekelompok mencit (*Mus musculus*) yang diperoleh dari Toko Hewan dan Peternakan Tikus Putih Jl. Jambangan 7E No. 10, Surabaya, Jawa Timur 60232. Dengan kriteria sebagai berikut:

- a) Berjenis kelamin jantan
- b) Berumur 2-3 bulan
- c) Berat badan 20-30 gram
- d) Berada dalam keadaan sehat dan normal

Setiap perlakuan terdiri dari 4 replikasi berdasarkan rumus berikut (Kusriningrum, 2008) :

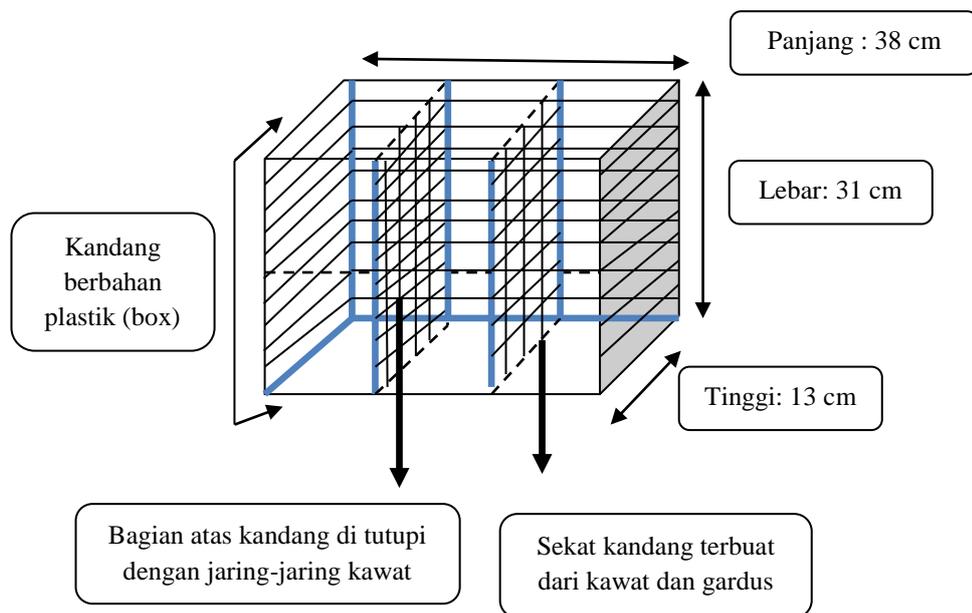
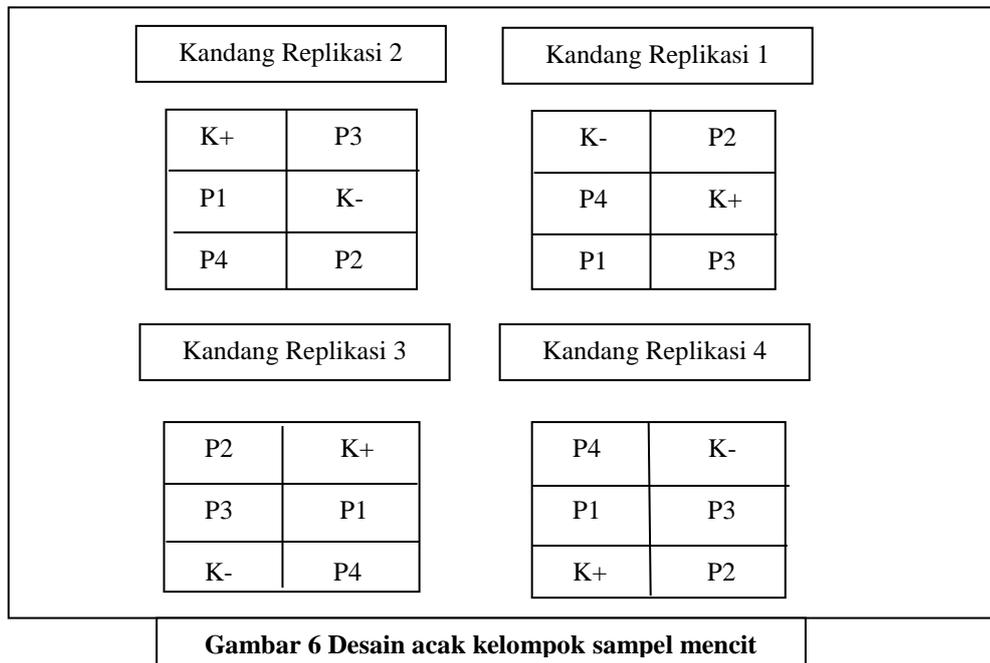
$$\begin{array}{rcl}
 (r - 1) (k - 1) & \geq & 15 \\
 (r - 1) (6 - 1) & \geq & 15 \\
 (r - 1) (5) & \geq & 15 \\
 5r - 5 & \geq & 15 \\
 5r & \geq & 15 + 5 \\
 r & \geq & 20/5 \\
 r & \geq & 4
 \end{array}$$

Keterangan :

- r** = Pengulangan
k = Kelompok

Setiap satuan percobaan membutuhkan 1 ekor mencit, sehingga total mencit (besar sampel) adalah 1 ekor x 6 perlakuan x 4 replikasi = 24 ekor mencit. Adapun penempatan sampel pada penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Pengacakan dilakukan pada setiap kelompok. Setiap pengulangan ditempatkan dalam satu wadah yang disekat menjadi 6 sebagai tempat perlakuan.

Adapun prosedur untuk teknik samplingnya adalah sebagai berikut :



Gambar 7 Kandang untuk satu replikasi

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Variasi bebas (*independent variabel*) dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak minyak bunga cengkeh.
- b. Variabel terikat (*dependent variabel*) dalam penelitian ini adalah kesembuhan luka.
- c. Variabel kendali, meliputi jenis kelamin dan umur mencit (*Mus musculus*), jenis pakan dan ukuran kandang.

2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah :

- 1) Konsentrasi ekstrak minyak bunga cengkeh dalam penelitian ini adalah ekstrak minyak bunga cengkeh dengan konsentrasi 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100 % (skala ordinal). Ekstrak yang dimaksud adalah hasil penyulingan bunga cengkeh dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut :
 - a. Konsentrasi minyak bunga cengkeh 0% merupakan sediaan kontrol negatif sebagai pembanding dalam proses penyembuhan luka gores pada mencit diolesidengan aquades.
 - b. Konsentrasi minyak bunga cengkeh 25 % diperoleh dari 2,5 ml (ekstrak minyak bunga cengkeh 100%) + etanol 96% sebanyak 7,5 ml.
 - c. Konsentrasi minyak bunga cengkeh 50 % diperoleh dari 5 ml (ekstrak minyak bunga cengkeh 100%) + etanol 96% sebanyak 5 ml.
 - d. Konsentrasi minyak bunga cengkeh 75 % diperoleh dari 7,5 ml (ekstrak minyak bunga cengkeh 100%) + etanol 96% sebanyak 2,5 ml.
 - e. Konsentrasi minyak bunga cengkeh 100 % diperoleh dari 10 ml ekstrak minyak bunga cengkeh tanpa diberi etanol
 - f. Betadine merupakan sediaan kontrol positif sebagai pembanding dalam proses penyembuhan luka gores pada mencit.

- 2) Kesembuhan luka yang dimaksud dalam penelitian ini adalah angka (skor) yang menunjukkan rata-rata dari tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru (skala ordinal). Skor dihitung mulai hari ke 2 setelah perlakuan sampai dengan akhir pengamatan (hari ke 14). Skor kesembuhan luka ditentukan berdasarkan total skor rata-rata dari gabungan parameter tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru. Adapun skor tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru dikategorikan menjadi :

Tingkat Eritema	Terbentuknya jaringan baru
(1) Luka kemerahan, (2) Luka kehitaman, (3) Tidak adanya eritema pada luka.	(1) Panjang luka masih 1 cm, (2) Panjang luka \leq 1 cm hingga 0,5 cm (3) Panjang luka \leq 0,5 cm hingga 0 cm

E. Prosuder Penelitian

1. Tahap Persiapan (Sebelum Perlakuan)

a. Pembuatan Kandang

Alat : Gunting

Bahan : Kotak plastik berukuran 38 cm x 31 cm x 13 cm, jaring-jaring kawat berdiameter 12,6 cm, pengikat (kawat) dan serbuk kayu.

Prosedur :

- 1) Langkah pertama menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan untuk pembuatan kandang mencit
- 2) Memotong jaring-jaring kawat sesuai ukuran kandang
- 3) Menggunting kawat sebagai pengikat
- 4) Membuat sekatan dalam kandang sesuai banyak sampel dalam 1 replikasi dengan menggunakan jaring-jaring kawat serta mengikatnya dengan kuat
- 5) Memasukkan serbuk kayu pada alas bagian bawah kandang
- 6) Menempatkan tempat makan dan minum pada setiap sampel mencit

- 7) Langkah terakhir, di bagian atas kandang ditutupi dengan menggunakan jaring-jaring kawat
- 8) Kandang percobaan siap di pakai.

b. Persiapan Hewan Coba (Masa Adaptasi Mencit)

Alat : Kandang mencit, tempat makan, tempat air minum

Bahan : Mencit (*Mus musculus*), pakan mencit (nasi 40% : pallet 40% : sayuran 20%) dan air minum.

Prosedur :

- 1) Membeli mencit dari Toko Hewan dan Peternakan Tikus Putih Jambangan Surabaya sebanyak 24 ekor.
- 2) Menimbang berat mencit untuk memastikan berat sesuai yang dikehendaki yaitu 20-30 gram.
- 3) Memberi tanda (lebel) pada tiap-tiap mencit untuk siap di taruh kedalam kandang (pada gambar 5).
- 4) Memberi makan pada mencit berupa nasi, pallet dan sayuran sebesar 3,80 gram dan minum 5,14 ml pada setiap sekat.
- 5) Mengganti makanan setiap hari.
- 6) Memastikan makanan tetap tersedia sampai akhir pengamatan.

c. Persiapan Bunga Cengkeh

Bahan tanaman yang digunakan untuk pembuatan ekstrak dalam penelitian ini adalah bunga dari cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) yang sudah kering. Bunga cengkeh kering ini diperoleh dari Desa Tikong, Kecamatan Taliabu Utara, Kabupaten Taliabu Provinsi Maluku Utara.

d. Pembuatan Ekstrak Minyak Bunga Cengkeh dengan Proses Destilasi Uap

Alat : Set alat destilasi (labu alas bulat, kondensor (pendingin), termometer, erlenmeyer, pemanas), gelas ukur, pipet tetes, kertas label, botol vial, sarung tangan, masker.

Bahan : Bunga kering cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan etanol 96 %.

Prosedur :

- 1) Langkah pertama, cengkeh kering yang sudah ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan kedalam labu destilasi dan diberi aquades
- 2) Dilakukan penyulingan \pm 8 jam
- 3) Minyak atsiri yang diperoleh ditampung.
- 4) Mengambil minyak bawah dan dipisahkan dengan air

Ekstrak minyak bunga cengkeh yang diperoleh dengan konsentrasi 100 % dibagi menjadi 4 sampel dan diencerkan dengan etanol 96 % sesuai dengan prosedur sehingga memperoleh ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% sedangkan konsentrasi 100 % tidak diencerkan lagi dengan etanol

2. Tahap Pelaksanaan

a. Prosedur Pengujian Efek Penyembuhan Luka Gores

Alat : Wadah plastik bening, alat cukur, scalpel steril, sarung tangan, perlak/alas, kamera, *spidol cottonbud*, dan kapas.

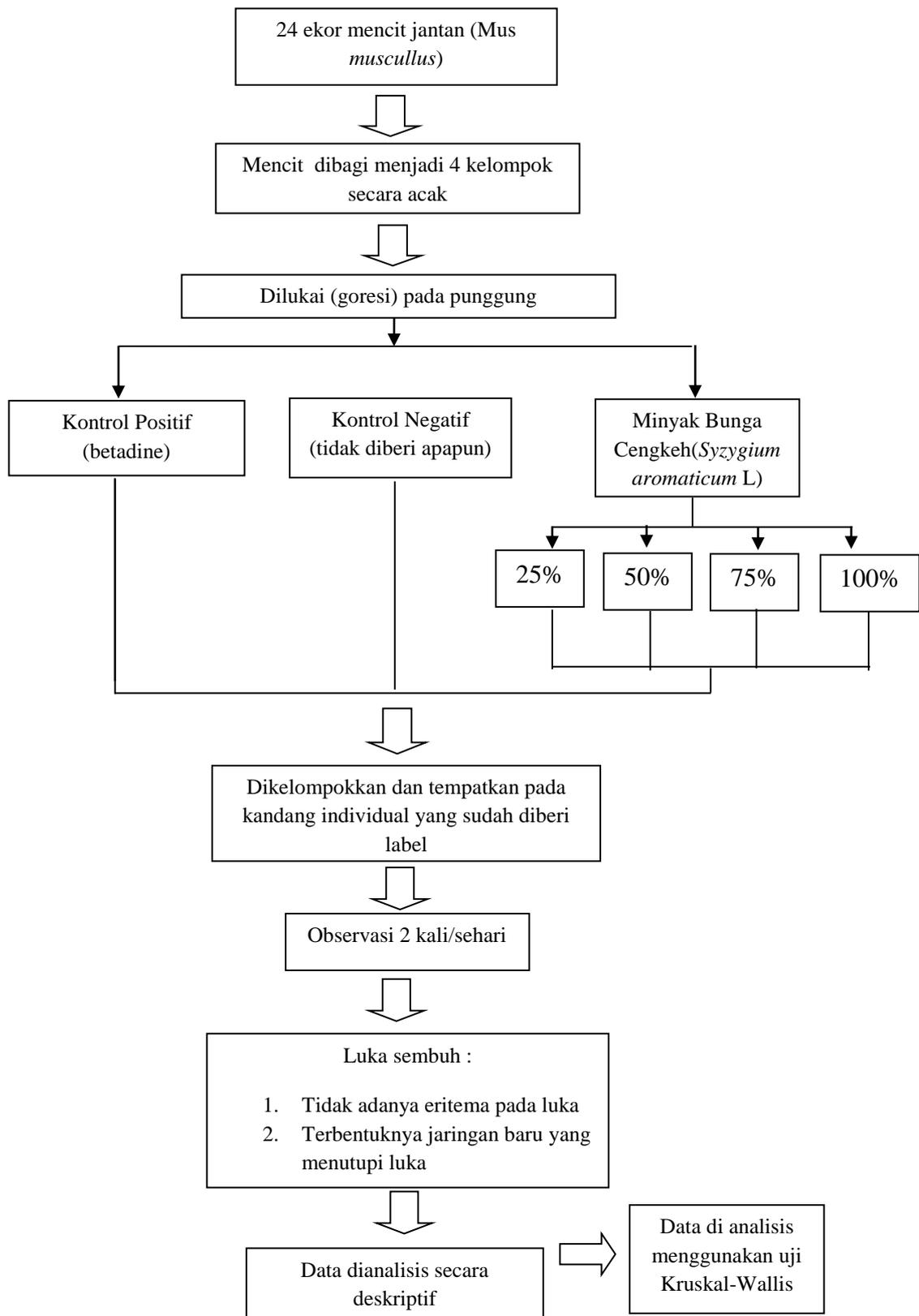
Bahan : Eter, alkohol, mencit (*Mus musculus*), betadine, aquades dan minyak bunga cengkeh (dalam konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%)

Tahap Pembuatan Luka Gores :

1. Menentukan terlebih dahulu daerah yang akan dilukai (goresi).
2. Melakukan pembiusan mencit pada setiap kelompok dengan cara anastesi umum inhalasi menggunakan eter pada kapas, kemudian meletakkan pada wadah plastik bening bersama dengan mencit dan menutupnya dengan penutup hingga mencit terbius.
3. Setelah mencit terbius, selanjutnya rambut di sekitar punggung mencit dicukur menggunakan alat cukur dengan luas ukuran 2 x 2 cm hingga bersih
4. Memasang perlak dan alas dibawah tubuh tikus yang akan dilukai
5. Melakukan desinfeksi pada area kulit yang telah dicukur dengan alkohol 70 %

6. Memakai sarung tangan yang steril, punggung mencit dilukai (goresi) dengan silet dan alat cukur dibuat goresan sepanjang ± 1 cm, lebar $\pm 0,5$ cm dengan kedalaman luka sampai pada batas epidermis dan hipodermis.
7. Merenggangkan kulit mencit dengan jari telunjuk dan ibu jari tangan kiri sebagai peregang atau penekan agar kulit mencit mudah digoresi (dilukai)
8. Selanjutnya luka gores pada punggung mencit tidak diolesi apapun, diolesi dengan betadine dan minyak bunga cengkeh sesuai dengan rancangan penelitian.
9. Perlakuan diberikan sampai luka gores dinyatakan sembuh dengan batas waktu ± 14 hari.

b. Alur Penelitian



Gambar 8 Alur Penelitian

F. Teknik Pengumpulan Data

Data keseluruhan luka pada mencit diamati setelah 14 hari (sampai luka sembuh) sejak penggoresan luka. Data diambil dengan cara observasi terhadap tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru. Alat yang diperlukan untuk mengukur lama penyembuhan luka adalah :

- a) Alat tulis
- b) Lembar observasi
- c) Mistar
- d) Sarung tangan
- e) Masker

Tabel 6 Observasi pengamatan skor kesembuhan luka mencit (*musmusculus*) dari berbagai perlakuan berdasarkan kriteria : eritema (kemerahan) dan terbentuknya jaringan baru

Perlakuan	Replikasi	Skor														Rata-rata Gabungan (Tingkat eritema dan Terbentuknya Jaringan Baru	
		Tingkat Eritema							Rata-rata	Terbentuknya Jaringan Baru							Rata-rata
		Hari ke								Hari ke							
2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14				
X1 (25%)	1																
	2																
	3																
	4																
X2 (50%)	1																
	2																
	3																
	4																
X3 (75%)	1																
	2																
	3																
	4																
X4 (100%)	1																
	2																
	3																
	4																
K+ (Betadine)	1																
	2																
	3																
	4																
K- (Aquades)	1																
	2																
	3																
	4																

Keterangan Tabel :

- a. Tingkat eritema (kemerahan) pada luka diberi skor 1-3 dengan kriteria :
 - 1) Luka kemerahan,
 - 2) Luka kehitaman,
 - 3) Tidak adanya eritema pada luka.
- b. Terbentuknya Jaringan Baru pada luka diberi skor 1-3 dengan kriteria :
 - 1) Panjang luka masih 1 cm,
 - 2) Panjang luka ≤ 1 cm hingga 0,5 cm
 - 3) Panjang luka $\leq 0,5$ cm hingga 0 cm

Selanjutnya berdasarkan tabel di atas, data dirangkum dalam bentuk penyajian sebagai berikut.

Tabel 7 Hasil pengamatan skor kesembuhan luka mencit (*Mus musculus*) dari berbagai perlakuan

Replikasi	Skor Kesembuhan Pada Perlakuan Luka (hari)					
	K+	K-	X1	X2	X3	P4
1						
2						
3						
4						
Rata-rata						

Keterangan :

K+ = Kontrol Positif (betadine)

K- = Kontrol Negatif (aquades)

X1 = Minyak Bunga Cengkeh 25%

X2= Minyak Bunga Cengkeh 50%

X3= Minyak Bunga Cengkeh 75%

X4= Minyak Bunga Cengkeh 100%

G. Teknik Analisis Data

Untuk membandingkan kesembuhan luka gores mencit pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak minyak bunga cengkeh, maka data dianalisis dengan Kruskal-Wallis dengan tingkat kesalahan (α) 5% (Sugiyono, 2006).