

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini berjenis eksperimental yang bertujuan untuk menentukam lama waktu penutupan luka infeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya dan Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai bulan Juni 2017.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berusia 2-3 bulan yang didapatkan dari peternak mencit di Jl. Jambangan Surabaya.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel yang diambil adalah 27 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan berusia 2-3 bulan, jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

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

$$2(r-1) \geq 15$$

$$2r-2 \geq 15$$

$$2r \geq 17$$

$$r \geq 8,5 \sim 9$$

Keterangan:

r : jumlah replikasi

t: jumlah kelompok

Jadi, jumlah sampel yang diperlukan adalah 9 ekor mencit pada masing-masing kelompok, sehingga, total mencit yang diperlukan adalah 27 ekor.

3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1. Variabel Penelitian

Variabel yang dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : Ekstrak biji alpukat.
2. Variabel terikat : Penutupan luka infeksi *Staphylococcus aureus*.

3.4.2. Definisi Operasional Variabel

- a. Ekstrak biji alpukat dibuat dalam konsentrasi 5% melalui metode maserasi dengan cara mencampur 50 gr serbuk biji alpukat dengan 375 ml pelarut etanol 96% atau dengan perbandingan 1:7,5 (b/v).
- b. Penutupan luka *Staphylococcus aureus* diamati dengan cara mengukur pengurangan panjang sayatan luka serta mencatat lama waktu penutupannya (hari) pada masing-masing kelompok.
- c. Luka dikatakan menutup apabila panjang sayatan berkurang hingga habis atau apabila sudah terjadi pengelupasan keropeng pada kulit mencit.
Keropeng adalah formasi darah, nanah, atau cairan kulit lainnya yang mengering diatas robekan kulit.
- d. Ekstrak biji alpukat dikatakan efektif sebagai pilihan alternatif untuk pengobatan luka infeksi *Staphylococcus aureus* apabila waktu penutupan luka

pada kelompok perlakuan lebih cepat dari waktu penutupan luka pada kelompok negatif serta sebanding atau mendekati waktu penutupan luka pada kelompok kontrol positif yang menggunakan salep asam fusidat.

3.5. Metode Pengumpulan Data

Data penutupan luka *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi laboratorium.

3.5.1. Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat

1. Alat dan Bahan

Toples/wadah tertutup, batang pengaduk, oven, blender, corong kaca, kertas saring, *vacuum rotary evaporator*, biji alpukat, etanol 96%, dan aquadest steril.

2. Prosedur

- a. Mencuci bersih 1 kg biji alpukat kemudian tiriskan dan keringkan tanpa terkena sinar matahari langsung.
- b. Kemudian biji alpukat dioven dengan suhu 50°C selama 1 jam.
Suhu pengeringan harus memenuhi standart yaitu tidak lebih dari 60°C (Kemenkes RI, 2009).
- c. Biji alpukat yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.
- d. Lakukan proses ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut.
- e. Mencampurkan 50 gr serbuk biji alpukat dengan 375 pelarut etanol 96% atau dengan perbandingan 1:7,5 (b/v).

- f. Serbuk simplisia direndam selama 24 jam dengan pengadukan sebanyak 2 kali sehari. Setelah 24 jam, filtrat maserasi kemudian disaring menggunakan corong kaca yang dilapisi kertas saring.
- g. Serbuk simplisia yang tertinggal dilakukan maserasi ulang sebanyak ± 2 kali atau sampai filtrat maserasi jernih.
- h. Hasil maserasi lalu diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 50°C hingga sisa pelarut habis atau menguap seluruhnya.
- i. Dari ekstrak 100% kemudian dibuat menjadi konsentrasi 5% melalui proses pengenceran dengan aquadest steril.

3.5.2. Pembuatan Suspensi McFarland I

1. Alat dan Bahan

Tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, reagen BaCl_2 1% dan H_2SO_4

2. Prosedur

- a. Menyiapkan tabung reaksi yang bersih dan kering.
- b. Menggunakan pipet ukur, Pipet 0,1 ml reagen BaCl_2 1% ke dalam tabung yang sudah disiapkan.
- c. Kemudian menambahkan 9,9 ml reagen H_2SO_4 1% ke dalam tabung yang sama, homogenkan.

suspensi ini digunakan sebagai larutan standart pembanding kekeruhan suspensi bakteri uji.

3.5.3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Alat dan Bahan

Tabung reaksi steril, ose bulat, bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media NAS, PZ steril, dan standart pembanding McFarland I.

2. Prosedur

- a. Menyiapkan 1 ml PZ steril di dalam tabung reaksi steril yang berdiameter sama dengan tabung standar pembanding McFarland I yang dibuat sebelumnya.
- b. Mengambil 1 mata ose bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media NAS.
- c. Bakteri dimasukkan ke dalam PZ steril, kemudian diinkubasi selama 2-3 jam pada suhu 35°C.
- d. Kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan dengan standart pembanding McFarland I dengan latar belakang kertas hitam-putih.
- e. Menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri dengan standart pembanding McFarland.

3.5.4. Pembuatan Luka Infeksi pada Mencit

1. Alat dan Bahan

Skalpel, pencukur bulu, *alcohol swab*, mikropipet 10µL, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, dan mencit.

2. Prosedur

- a. Pada 27 ekor mencit terlebih dahulu diadaptasi selama empat hari di dalam kandang dengan cara diberi pakan dan minum secara berlebih sebelum perlakuan percobaan dilakukan.
- b. Mencukur bulu mencit pada bagian yang akan dilukai.

- c. Kemudian bagian yang akan dilukai disterilkan dengan alkohol swab.
- d. Mencit dilukai pada bagian punggungnya dengan cara insisi sepanjang ± 1 cm menggunakan skalpel steril.
- e. Kemudian pada daerah yang luka diinfeksi dengan 10 μ l suspensi *Staphylococcus aureus* menggunakan mikropipet
- f. Inkubasi ± 2 hari sampai timbul nanah atau pus

3.5.5. Pengobatan Luka Infeksi Mencit

1. Alat dan Bahan

Cotton bud, kasa atau kapas, aquadest steril, ekstrak biji alpukat 5%, dan salep asam fusidat.

2. Prosedur

- a. Sebelum dilakukan pengobatan, bersihkan luka dengan aquadest steril.
- b. Membasahi *cotton bud* dengan ekstrak biji alpukat 5% lalu usapkan pada daerah luka secara merata.
- c. Melakukan prosedur yang sama pada kontrol positif dengan menggunakan salep asam fusidat. Pada kelompok kontrol negatif hanya dilakukan pembersihan luka dengan aquadest steril.
- d. Melakukan pengobatan tiga kali sehari pada jam 07.00, 14.00 dan 20.00 WIB.
- e. Melakukan tabulasi terhadap data penutupan luka pada mencit dengan format sebagai berikut:

Tabel 3.1: Contoh tabulasi panjang sayatan (cm) pada mencit (M)

Kelompok	Hari Ke-	Panjang Sayatan (cm) pada Mencit (M)								Rata-rata (cm)
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	
Perlakuan (Ekstrak Biji Alpukat)	H0									
	H1									
	dst.									
Kontrol (+)	H0									
	H1									
	dst.									
Kontrol (-)	H0									
	H1									
	dst.									

Tabel 3.2: Contoh tabulasi lama waktu penutupan luka (hari) pada masing-masing mencit (M)

Kelompok	Lama waktu penutupan luka (hari) pada mencit (M)								Rata-rata waktu penutupan luka (hari)
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	
Perlakuan									
Kontrol (+)									
Kontrol (-)									

3.6. Metode Analisis Data

Data penutupan luka mencit dianalisis menggunakan *Mann-Whitney test* untuk membandingkan lama penutupan luka mencit pada kelompok perlakuan (dengan pemberian ekstrak biji alpukat) dengan kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak biji alpukat) pada tingkat kesalahan 5%.

3.7. Keterbatasan Penelitian

Pengamatan mengenai panjang sayatan luka pada masing-masing mencit dilakukan dengan cara pengukuran menggunakan penggaris yang hanya dilakukan oleh peneliti sendiri, sehingga tidak adanya pembanding ketika mengamati panjang sayatan luka menjadi salah satu keterbatasan dalam penelitian yang telah dilakukan.