

BAB III

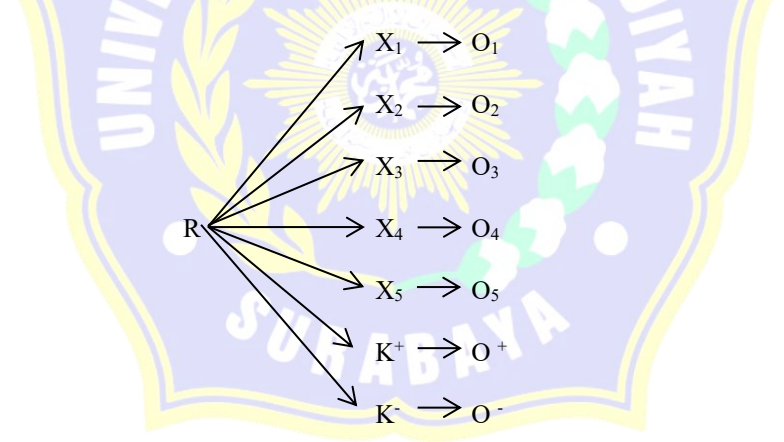
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu penelitian eksperimental. Dimana penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian berbagai konsentrasi *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) untuk penyembuhan luka sayat pada mencit (*Mus musculus*).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan yaitu berupa eksperimental laboratories *Post Test Control Grub Design* (Sugiyono, 2015). Adapun rancangan penelitiandengan 7 perlakuan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Modifikasi

Keterangan :

R : Randomisasi.

K^+ : Kelompok Perlakuan kontrol positif menggunakan betadine.

K^- : Kelompok Perlakuan kontrol negatif menggunakan aquades.

X_1 : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 20%.

X_2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 40%.

X_3 : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 60%.

X_4 : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 80%.

X_5 : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 100%.

O^+ : Observasi kelompok Perlakuan kontrol positif menggunakan betadine.

O^- : Observasi Kelompok Perlakuan kontrol negatif menggunakan aquades.

O_1 : Observasi Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 20%.

O_2 : Observasi Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 40%.

O_3 : Observasi Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 60%.

O_4 : Observasi Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 80%.

O_5 : Observasi Kelompok perlakuan dengan pemberian *Eco Enzyme* limbah jeruk manis 100%.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Uji Coba Hewan Universitas Muhammadiyah Surabaya. Secara keseluruhan penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari 2023 hingga Juni 2023 dan pengambilan data dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2023.

D. Sasaran Penelitian (Populasi dan Sampel Penelitian)

Populasi dalam penelitian kali ini adalah sekelompok mencit (*Mus musculus*) yang di peroleh dari Puspetma Surabaya.

Sampel pada penelitian ini merupakan mencit (*Mus musculus*) yang sehat dan aktifitas normal (lincah) dengan umur 2 – 3 bulan dengan berat 20 – 30 gram. jumlah sampel ditentukan menggunakan rumus. Jumlah pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus (Hanafiah, 2010) sebagai berikut :

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

$$(r - 1) (7 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) (6) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$r \geq 21/6$$

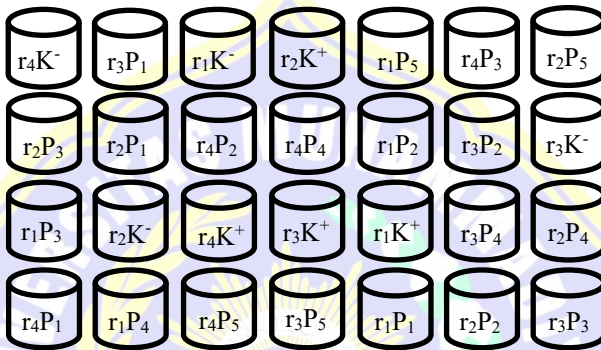
$$r \geq 3,5 \quad (4)$$

Keterangan :

r = Pengulangan

t = Perlakuan

Berdasarkan perhitungan sampel diatas, menunjukkan bahwa setiap satuan percobaan digunakan 1 ekor mencit, sehingga total seluruhnya yaitu 1 ekor x 7 perlakuan x 4 replikasi = 28 ekor mencit. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), pengacakan di lakukan saat menetapkan perlakuan dan pengulangan pada sampel mencit yang diletakkan pada setiap kandang.



Gambar 3. 2 Desain Rancangan Acak Lengkap

E. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel yang di gunakan pada penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas (*Independent variable*) pada penelitian ini yaitu berupa konsentrasi *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*).
- Variabel terikat (*Dependent variable*) pada penelitian ini yaitu tingkat kesembuhan luka sayat pada mencit (*Mus musculus*) setelah pemberian perlakuan.
- Variabel control pada penelitian ini yaitu jenis kelamin , jenis pakan, jenis minum, berat badan, umur, dan ukuran kandang.

2. Definisi Operasional

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah :

- a. Konsentrasi obat oles *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) dalam penelitian ini adalah konsentrasi 20%, 40%, 60 %, 80%, 100% (Kartika & Suharti, 2018)
- b. Kesembuhan luka pada penelitian ini yaitu dengan persentase tingkat kesembuhan luka sayat yang di dapat dari jumlah skor eritema dan terbentuknya jaringan yang baru pada luka sayat yang ditandai dengan berkurangnya panjang luka sayatan, penelitian ini menggunakan (skala ordinal). Skor akan dihitung mulai dari hari ke 1 setelah perlakuan sampai akhir pengamatan (hari ke 7), pengukuran panjang luka sayat dengan menggunakan meteran dalam satuan milimeter (mm) (Ulmi et al., n.d.) Dimana skor kesembuhan luka akan ditentukan berdasarkan total skor yang dilihat dengan parameter tingkat eritema dan terbentuknya jaringan yang baru. Adapun skor tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru (Salmawati & Daesusi, 2019) dikategorikan menjadi :
 - 1) Eritema (kemerahan pada luka)
 - a) Skor 1 : Adanya luka kemerahan.
 - b) Skor 2 : Adanya luka kehitaman.
 - c) Skor 3 : Tidak ada eritema pada luka sayat.
 - 2) Terbentuknya Jaringan Baru
 - a) Skor 1 : Panjang luka sayat masih 1 cm.
 - b) Skor 2 : Panjang luka sayat 7,5 mm sampai < 10 mm.
 - c) Skor 3 : Panjang luka sayat 5 mm sampai < 7,5 mm.
 - d) Skor 4 : Panjang luka sayat 2,5 mm sampai < 5 mm.
 - e) Skor 5 : Panjang luka sayat 0 mm sampai < 2,5 mm.

Tingkat kesembuhan dinyatakan dalam % yang didapat dari jumlah skor eritema dan terbentuknya jaringan baru, jumlah skor yang di dapat dijadikan nilai persentase dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{skor perolehan}}{\text{skor maksimal}} \times 100 \% =$$

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan (Sebelum Perlakuan)

a. Pembuatan Kandang

Berikut merupakan beberapa alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan kandang yaitu :

- 1) Alat : Gunting/tang.
- 2) Bahan : Jaring kawat dengan diameter 12,6 cm, box plastik dengan ukuran 38 cm x 31 cm x 13 cm, tali/kawat sebagai pengikat, dan serbuk kayu.

Prosedur :

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan dalam pembuatan kandang mencit.
- 2) Setelah itu potong jaring – jaring kawat menjadi beberapa ukuran dan bagian yang diperlukan sebagai penutup box.
- 3) Setelah jaring – jaring kawat siap, potong tali/kawat sebagai pengikat nantinya.
- 4) Lalu siapkan box plastik.
- 5) Setelah box siap masukan serbuk kayu kedalam box.
- 6) Terakhir tutup box menggunakan jaring – jaring kawat yang telah di siapkan.

b. Persiapan Hewan Uji Coba (Masa Adaptasi Mencit)

Berikut merupakan beberapa alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan kandang yaitu :

Alat: Tempat minum, tempat makan, kandang mencit.

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

Prosedur uji coba hewan :

- 1) Menyiapkan kandang mencit yang telah di buat.
- 2) Apabila kandang telah siap selanjutnya belilah mencit di toko hewan yang tersedia sebanyak 28 ekor.
- 3) Setelah itu timbang berat mencit untuk memastikan berat masing-masing mencit.
- 4) Setelah siap masukan mencit pada setiap skat dan berikan label pada setiap skat.
- 5) Memberi makan mencit berupa sayuran, nasi, pelet, dan minum pada setiap skat.

6) Amatilah pakan dan minum tikus setiap harinya.

c. Pembuatan *Eco Enzyme* Limbah Jeruk Manis (*Citrus sinensis*)

Eco Enzyme dihasilkan melalui fermentasi dengan bahan berupa campuran gula merah/ tetes tebu, air, limbah dapur berupa limbah buah segar. Berikut merupakan beberapa alat dan bahan yang di gunakan dalam pembuatan *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) (Astuti, et al., 2020) yaitu :

Alat : Wadah, botol air mineral 1,5 L, timbangan, pisau.

Bahan : Limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*), tetes tebu, air mineral.

Prosedur :

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang akan di gunakan.
- 2) Pastikan wadah yang akan digunakan telah bersih dan steril.
- 3) Setelah itu cucilah limbah jeruk manis sampai bersih dan potong-potong menjadi beberapa bagian.
- 4) Setelah itu timbanglah limbah jeruk manis seberat 3ons, air 1 liter/1kg, 1 ons tetes tebu.
- 5) Setelah semua bahan siap masukkan air, limbah jeruk manis, dan tetes tebu ke dalam botol yang telah di sediakan. Gunakan perbandingan 10:3:1, yakni 10 untuk air, 3 untuk buah atau sayur, dan 1 untuk gula/tetes tebu.
- 6) Setelah itu aduk merata semua bahan dan tutup rapat sehingga tidak terkontaminasi udara luar.
- 7) Letakkan pada tempat yang sejuk dengan sirkulasi udara yang baik pastikan tidak terkena sinar matahari secara langsung.
- 8) Buka tutup secara perlahan setiap 12 jam agar gas yang berada di dalam keluar dan biarkan selama 3 bulan sebelum pemakaian.
- 9) Setelah 3 bulan, *Eco Enzyme* bisa dipanen dan dapat digunakan.

d. Pembuatan Obat Oles *Eco Enzyme* Limbah Jeruk Manis (*Citrus sinensis*)

Berikut merupakan beberapa alat dan bahan yang digunakan dala pembuatan obat oles *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) yaitu :

Alat : Gelas ukur.

Bahan : *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*), aquades steril.

Prosedur :

1. Menyiapkan bahan obat oles yang akan digunakan berupa *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*).
2. Menyiapkan aquades yang akan digunakan sebagai bahan campuran *Eco Enzyme*.
3. Setelah itu menyiapkan gelas ukur untuk menakar *Eco Enzyme* dan aquades menjadi 20 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml, 100 ml.
4. Setelah semua siap buat obat oles *Eco Enzyme* jeruk manis (*Citrus sinensis*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% sebagai berikut :
 - a. 20% = 20 ml *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) + 80 ml Aquades steril.
 - b. 40% = 40 ml *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) + 60 ml Aquades steril.
 - c. 60% = 60 ml *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) + 40 ml Aquades steril.
 - d. 80% = 80 ml *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) + 20 ml Aquades steril.
 - e. 100% = 100 ml *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) tanpa pemberian aquades steril.

2. Tahap Pelaksanaan

1. Prosedur Pengujian Efek *Eco Enzyme* Limbah Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Sebagai Obat Oles Untuk Penyembuhan Luka Sayat Pada Mencit (*Mus musculus*)

Berikut merupakan beberapa alat dan bahan yang digunakan dalam Pengujian Efek *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) Sebagai Obat Oles Untuk Penyembuhan Luka Sayat Pada Mencit (*Mus musculus*) (Salam et al., 2017) yaitu :

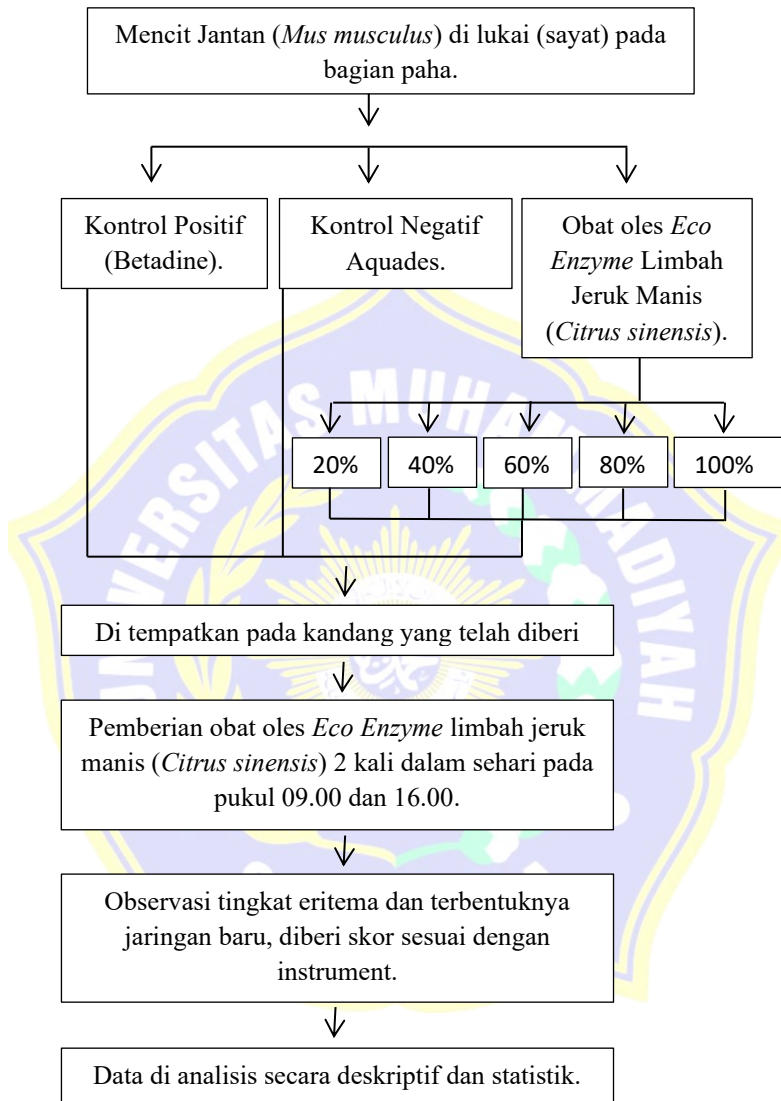
Alat: Box plastik, sarung tangan, perlak/alas, kapas/tisu, spidol, scalpel steril, alat cuku, silet.

Bahan : Mencit (*Mus musculus*), alkohol, eter, betadine, aquades, dan obat oles *Eco Enzyme* limbah jeruk

manis (*Citrus sinensis* dalam konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%).

Tahap Pembuatan Luka Sayat :

1. Menentukan terlebih dahulu daerah yang akan dilukai (sayat).
2. Setelah itu melakukan pembiusan pada mencit pada setiap kelompok dengan cara inhalasi menggunakan eter pada kapas, letakkan pada box plastik bersama dengan mencit lalu tutup dengan penutup hingga mencit terbius.
3. Setelah mencit terbius, selanjutnya rambut di sekitar paha mencit dicukur menggunakan alat cukur yang telah di siapkan dengan luas ukuran sekitar 2 x 2 cm hingga bersih, usahakan mencukur dan rapi sehingga dapat memudahkan untuk menggores dan mengamati nantinya.
4. Setelah itu pasang perlak/alas dibawah tubuh mencit yang akan dilukai.
5. Lakukanlah desinfeksi pada area kulit yang akan di lukai agar terhindar dari bakteri dan kuman dengan alkohol 70 %.
6. Setelah itu pakailah sarung tangan yang steril, lalu lukai (sayat) pada bagian paha mencit dengan silet dibuatlah sayatan sepanjang ± 1 cm, lebar = 0,5cm dengan kedalaman luka sampai pada batas epidermis.
7. Setelah itu regangkan kulit mencit agar kulit pada mencit tidak kendur dan mudah digoresi (sayat).
8. Selanjutnya luka sayat pada paha mencit diolesi dengan aquades, betadine dan obat oles *Eco Enzyme* jeruk manis (*Citrus sinensis*) sesuai dengan rancangan penelitian diberikan sampai luka sayat dinyatakan sembuh dengan batas waktu 14 hari.



Gambar 3. 3 Prosedur Penelitian

G. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data di ambil dengan cara observasi secara keseluruhan diamati selama 14 hari sejak paha mencit di lukai hingga sembuh dengan melihat tingkat eritema dan terbentuknya jaringan baru terhadap luka sayatan. Adapun alat yang di butuhkan dalam observasi untuk mengukur lama penyembuhan luka yaitu :

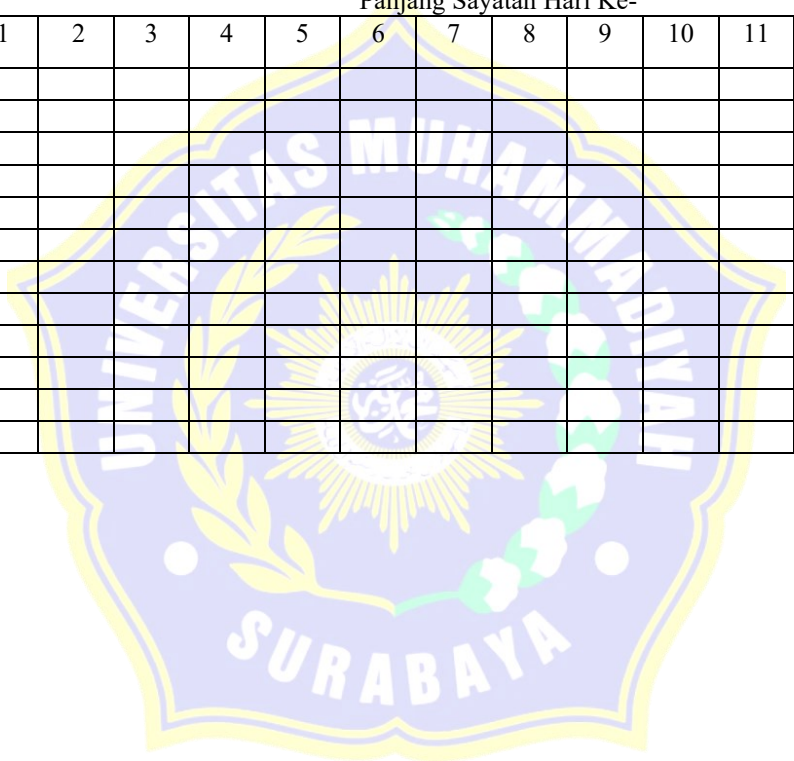
1. Lembar observasi.
2. Alat tulis.
3. Mistar.
4. Masker.
5. Sarung tangan



Tabel 3. 1 Lembar Harian Pengukuran Panjang Luka Sayat Hingga Sembuh (Tertutup) (mm)

P	No	R	Panjang Sayatan Hari Ke-													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
K ⁺	19	1														
	4	2														
	18	3														
	17	4														
K ⁻	3	1														
	16	2														
	14	3														
	1	4														
P ₁	26	1														
	9	2														
	2	3														
	22	4														
P ₂	12	1														
	27	2														
	13	3														
	10	4														

P	No	R	Panjang Sayatan Hari Ke-													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
P ₃	15	1														
	8	2														
	28	3														
	6	4														
P ₄	23	1														
	21	2														
	20	3														
	11	4														
P ₅	5	1														
	7	2														
	25	3														
	24	4														



Tabel 3. 2 Lembar Skor Eritema

Perlakuan	Skor Eritema						
	K+	K-	P1	P2	P3	P4	P5
1							
2							
3							
4							
Rata-rata							
Std. deviasi							

Tabel 3. 3 Lembar Skor Terbentuknya Jaringan Baru

Perlakuan	Skor Terbentuknya Jaringan Baru						
	K+	K-	P1	P2	P3	P4	P5
1							
2							
3							
4							
Rata-rata							
Std. deviasi							

Tabel 3. 4 Lembar Persentase Tingkat Kesembuhan

Perlakuan	Persentase Tingkat Kesembuhan													
	K+		K-		P1		P2		P3		P4		P5	
	J	PTK	J	PTK	J	PTK	J	PTK	J	PTK	J	PTK	J	PTK
1														
2														
3														
4														
Rata-rata														
Std. deviasi														

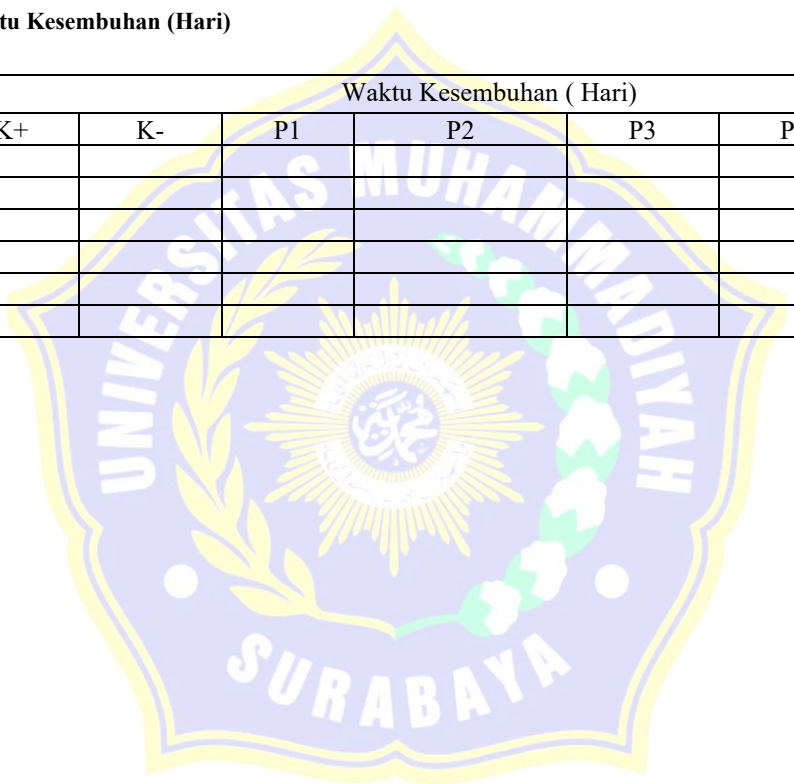
Keterangan :

J = Jumlah skor eritema dan terbentuknya jaringan baru

PTK = Persentase Tingkat Kesembuhan

Tabel 3. 5 Lembar Waktu Kesembuhan (Hari)

Perlakuan	Waktu Kesembuhan (Hari)						
	K+	K-	P1	P2	P3	P4	P5
1							
2							
3							
4							
Rata-rata							
Std. deviasi							



H. Teknik Analisis Data

Untuk menguji bagaimana pengaruh *Eco Enzyme* limbah jeruk manis (*Citrus sinensis*) sebagai obat oles untuk penyembuhan luka sayat pada mencit (*Mus musculus*), dilakukan terlebih dahulu uji normalitas terkait data tingkat kesembuhan luka sayat dan apabila data berdistribusi normal maka di lanjutkan dengan uji analisis varian (ANOVA) dengan ($\alpha = 0,05$), dan apabila data berdistribusi tidak normal maka akan dilanjutkan menggunakan uji kruskal wallis, yang dimana jika dalam uji Kruskal wallis H_a diterima dan H_0 ditolak maka akan dilanjutkan dengan uji Mann whitney (Sugiyono, 2015). Pengolahan data akan dilakukan menggunakan aplikasi IMB SPSS versi 25.

