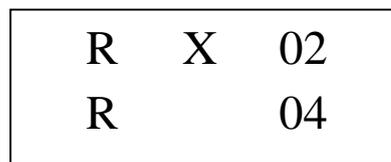


BAB III

METODE PENELITIAN

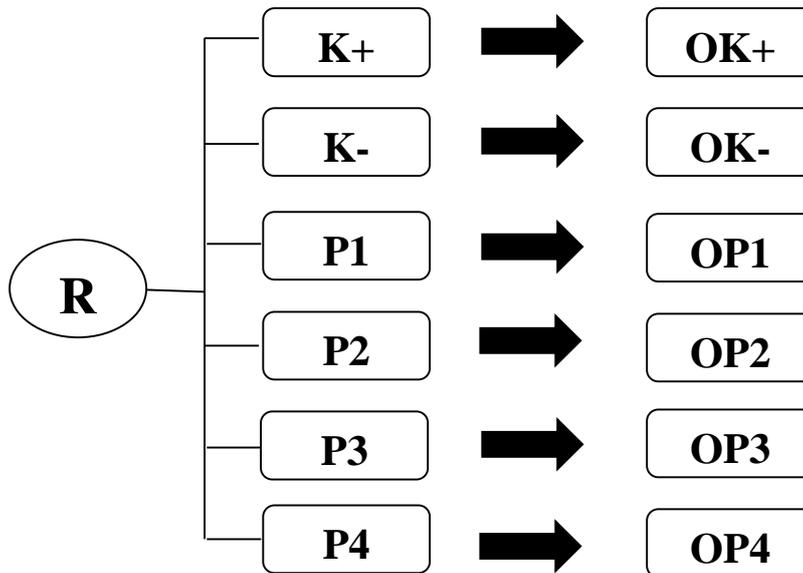
3.1. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan memberikan salep ekstrak daun wijayakusuma (*Epihyllum anguliger* (Lem.) G.Don) terhadap luka sayat pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *sprague dawley*. Penelitian ini menggunakan *Post Test Control Group Design* yaitu dengan mengambil data setelah perlakuan.



Gambar 3.1. Post Test Control Group Design (Sugiyono, 2014)

Adapun desain penelitian ini menggunakan 6 perlakuan sebagai berikut :



Keterangan :

R = Random

K+ = Kelompok kontrol positif (dengan pemberian salep Povidone Iodine 10%)

K- = Kelompok kontrol negatif (tidak diberi salep)

P1 = Kelompok perlakuan 1 (dengan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 20%)

- P2** = Kelompok perlakuan 2 (dengan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 40%)
- P3** = Kelompok perlakuan 3 (dengan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 60%)
- P4** = Kelompok perlakuan 4 (dengan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 80%)
- OK+** = Observasi kelompok kontrol positif setelah pemberian salep Povidone Iodine 10%
- OK-** = Observasi kelompok kontrol negatif (tidak diberi salep)
- OP1** = Observasi kelompok perlakuan 1 setelah pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 20%
- OP2** = Observasi kelompok perlakuan 2 setelah pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 40%
- OP3** = Observasi kelompok perlakuan 3 setelah pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 60%
- OP4** = Observasi kelompok perlakuan 4 setelah pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 80%

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Sutorejo No. 59 dan Laboratorium Kimia Universitas Airlangga Jalan Mulyorejo, Surabaya. Penelitian secara keseluruhan dilakukan pada bulan Januari hingga bulan Juni. Uji laboratorium dan pengambilan data dilaksanakan pada bulan Mei 2017.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah sekelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari peternakan tikus *mouse for lab* Boyolali, Jawa Tengah. Tikus putih yang dipilih berjenis kelamin jantan yang berumur 2-3 bulan dan memiliki berat badan 150-200 gram.

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari galur *sprague dawley*. Jumlah sampel dapat ditentukan menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008) dengan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

r = Pengulangan

k = Kelompok

Berdasarkan perhitungan diatas, jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah minimal 4 kali. Dalam penelitian ini diambil 4 kali pengulangan dalam setiap kelompok dengan jumlah perlakuan sebanyak 6. Untuk setiap pengulangan dalam setiap perlakuan digunakan 1 ekor tikus putih, sehingga jumlah sampel secara keseluruhan yang digunakan adalah $4 \times 6 \times 1 = 24$ ekor dan diletakkan seperti pada tabel 3.2.

Penempatan penelitian yang digunakan dalam penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL).

Tabel 3.1. Rancangan Penelitian Pengaruh Salep Ekstrak Daun Wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don) Pada Penyembuhan Luka Sayat Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley*

Pengulangan	PERLAKUAN					
	Kontrol Positif (PI 10%)*	Kontrol Negatif	Konsentrasi Ekstrak Daun Wijayakusuma			
			P1 (20%)	P2 (40%)	P3 (60%)	P4 (80%)
1	K ₊₁	K ₋₁	P1 ₁	P2 ₁	P3 ₁	P4 ₁
2	K ₊₂	K ₋₂	P1 ₂	P2 ₂	P3 ₂	P4 ₂
3	K ₊₃	K ₋₃	P1 ₃	P2 ₃	P3 ₃	P4 ₃
4	K ₊₄	K ₋₄	P1 ₄	P2 ₄	P3 ₄	P4 ₄

Keterangan :

* = Salep Povidone Iodine 10%

K₊₁₋₄ : Perlakuan kontrol positif (Povidone Iodine 10%) ulangan 1 sampai 4

K₋₁₋₄ : Perlakuan kontrol negatif (tidak diberi salep) ulangan 1 sampai 4

- P1-4** : Perlakuan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 20% ulangan 1 sampai 4
- P2-4** : Perlakuan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 40% ulangan 1 sampai 4
- P3-4** : Perlakuan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 60% ulangan 1 sampai 4
- P4-4** : Perlakuan pemberian salep ekstrak daun wijayakusuma 80% ulangan 1 sampai 4

Tabel 3.2. Desain Acak Lengkap Pengaruh Salep Ekstrak Daun Wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don) Pada Penyembuhan Luka Sayat Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley*

K+ (PI 10%)	K-	P1 (20%)	P2 (40%)	P3 (60%)	P4 (80%)
P1 ₃	P1 ₁	P3 ₄	K- ₂	P3 ₁	P1 ₄
K+ ₂	P2 ₄	K+ ₁	P4 ₁	K+ ₃	P3 ₂
P2 ₃	K- ₃	P2 ₁	P1 ₂	P2 ₂	K- ₁
K- ₄	P3 ₃	P4 ₂	K+ ₄	P4 ₄	P4 ₃

3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas (*independent variable*) dalam penelitian ini adalah variasi ekstrak daun wijayakusuma dengan vaselin dosis 20%, 40%, 60%, 80%, salep Povidone Iodine 10% dan kontrol negatif.
2. Variabel terikat (*dependent variable*), meliputi penyembuhan luka dengan indikator tidak adanya eritema, tidak adanya pembengkakan, dan luka menutup.
3. Variabel kendali, meliputi jenis kelamin, umur, jenis pakan dan ukuran kandang.

3.4.2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Variasi ekstrak daun wijayakusuma dalam penelitian ini adalah ekstrak daun wijayakusuma yang dikategorikan menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Salep ekstrak daun wijayakusuma dalam penelitian ini

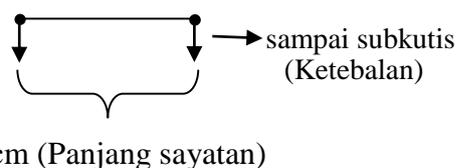
merupakan sediaan yang digunakan untuk penutupan luka sayat dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut :

- a. Konsentrasi salep wijayakusuma 20% diperoleh dari 6 gram (ekstrak daun wijayakusuma 100%) + 24 gram vaselin putih.
 - b. Konsentrasi salep wijayakusuma 40% diperoleh dari 12 gram (ekstrak daun wijayakusuma 100%) + 18 gram vaselin putih.
 - c. Konsentrasi salep wijayakusuma 60% diperoleh dari 18 gram (ekstrak daun wijayakusuma 100%) + 12 gram vaselin putih.
 - d. Konsentrasi salep wijayakusuma 80% diperoleh dari 24 gram (ekstrak daun wijayakusuma 100%) + 6 gram vaselin putih.
 - e. Salep Povidone Iodine 10% merupakan sediaan kontrol dalam proses penutupan luka sayat
2. Penyembuhan luka sayat dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan:
- a. Lama penyembuhan luka

Lama penyembuhan luka adalah angka yang menunjukkan pada hari ke berapa luka memiliki kriteria yang dapat dideskripsikan berdasarkan tidak adanya eritema, tidak adanya pembengkakan dan terbentuknya jaringan baru atau luka menutup sejak dilakukan penyayatan pada punggung tikus.

- b. Panjang luka

Panjang luka adalah angka yang menunjukkan panjang luka yang sudah tertutup pada sayatan. Luka sayat awal dibuat sepanjang ± 2 cm dengan kedalaman sampai pada area subkutan atau hipodermis. Panjang luka sayat yang diukur mulai dari pinggir luka dari sisi kiri sampai sisi kanan dalam satuan (cm). Panjang luka yang sudah tertutup diukur sejak hari pertama hingga sembuh menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan setiap 3 hari sekali.



Gambar 3.2. Luka Sayatan Awal

3. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini seluruhnya berkelamin jantan berumur 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram dari galur *sprague dawley*. Pemberian pakan untuk tikus dalam penelitian ini adalah perbandingan antara 40% nasi : 40% pallet : 20% sayuran. Sedangkan pemberian air minum dilakukan secara *adlibitum*. Tikus dalam penelitian ini diletakkan pada kandang box plastik berukuran 38 cm x 31 cm x 13 cm dengan ditutup jaring-jaring kawat pada bagian atas.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Kandang

Alat : Gunting

Bahan : Box plastik berukuran 38 cm x 31 cm x 13 cm, jaring-jaring kawat, serbuk kayu

Prosedur : Box plastik diberikan serbuk kayu pada alas bawahnya. Di bagian atas ditutup dengan menggunakan jaring-jaring kawat dengan kuat.

b. Persiapan Hewan Coba (Masa Adaptasi Tikus)

Alat : Kandang tikus, tempat makan, tempat air minum

Bahan : Tikus putih, pakan tikus (pallet 40% : nasi 40% : sayuran 20%), air minum

Prosedur : Tikus putih yang telah ditimbang diletakkan dalam kandang kemudian diadaptasikan dengan memberikan makanan yang sama berupa campuran pallet, nasi dan sayuran serta diberikan air minum selama 14 hari.

c. Persiapan Bahan Tanaman (Daun Wijayakusuma)

Alat : Gunting dan kantong plastik

Bahan : Daun wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don)

Prosedur :

1. Memilih daun yang segar dan tidak berwarna pucat ataupun mengering
2. Memotong daun tersebut dengan gunting, kemudian kumpulkan menjadi satu dalam kantong plastik

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah daun dari tanaman wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don) dari daun kedua sampai daun keempat dari pucuk (daun muda). Tanaman ini diperoleh di Dsn. Tanggul, Ds. Banjartanggul, Kec. Pungging, Kab. Mojokerto.

d. Pembuatan Ekstrak Daun Wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don)

Alat : Gelas ukur (2500 ml, 250 ml, 100 ml dan 10 ml), corong *buncher*, erlenmeyer, gunting, oven, pengaduk/spatula, toples kaca, kertas label, neraca analitik, botol vial, evaporatori (*rotary vacuum evaporator*), pipet tetes, sarung tangan, mortar dan penggerus.

Bahan : Etanol 96% dan daun wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don)

Prosedur :

1. Daun wijayakusuma ditimbang sebanyak 1 kg kemudian dicuci bersih.
2. Daun dipotong-potong hingga berukuran kecil untuk mempermudah pengeringan.
3. Daun wijayakusuma dikering-anginkan selama 14 hari atau di oven sampai kering.
4. Daun wijayakusuma kering ditumbuk sampai menjadi serbuk.
5. Menyaring serbuk untuk memisahkan serbuk yang kasar dan halus menggunakan saringan berukuran 40 mesh. Serbuk yang halus digunakan untuk membuat ekstrak.
6. Simplisia daun wijayakusuma dimasukkan ke dalam toples kaca besar untuk dimaserasi menggunakan etanol 96% sampai 3 kali. Perbandingan antara serbuk daun wijayakusuma dengan etanol ialah 1:3 (untuk perendaman pertama kali) pada maserasi pertama dibutuhkan etanol berjumlah banyak untuk membasahi serbuk yang kering (pembasahan), 1:2 (perendaman kedua dan ketiga) masing-masing selama 24 jam.

7. Hasil maserasi disaring dengan corong *buncher* kemudian menghasilkan filtrat.
8. Filtrat daun wijayakusuma tersebut kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Hasil penguapan tersebut menghasilkan ekstrak kental berwarna hijau pekat.
9. Ekstrak disimpan di lemari pendingin pada suhu 4°C sebelum digunakan.

e. Pembuatan Salep Ekstrak Daun Wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don)

Pembuatan salep ekstrak daun wijayakusuma dengan konsentrasi perbandingan yang sesuai dengan prosedur dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 3.3. Formulasi salep ekstrak daun wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don)

Jenis	Bahan (gram)				
	20%	40%	60%	80%	PI
Ekstrak daun wijayakusuma	6	12	18	24	10*
Vaselin	24	18	12	6	

Keterangan :

***PI = Salep Povidone Iodine 10%**

Alat : Spatula, wadah salep, neraca digital, gelas arloji, pipet tetes, mortar, mangkok kaca, gelas ukur, *petridish*

Bahan : Ekstrak daun wijayakusuma (*Epiphyllum anguliger* (Lem.) G.Don) dan vaselin album

Prosedur :

1. Menimbang vaselin album dan ekstrak daun wijayakusuma sesuai dengan tabel 3.3 dengan neraca digital.
2. Tuangkan ekstrak daun wijayakusuma pada vaselin album yang sudah ditimbang dalam mortar
3. Kemudian campurkan vaselin album dengan ekstrak daun wijayakusuma dan aduk menggunakan spatula hingga homogen.
4. Setelah tercampur rata, pindahkan salep tersebut ke dalam wadah yang telah disiapkan.

5. Lakukan hal yang sama untuk setiap konsentrasi formulasi salep ekstrak daun wijayakusuma

3.5.2. Tahap Pelaksanaan

a. Pengelompokkan Hewan Coba

Alat : Box plastik, jaring-jaring kawat, tempat minum, tempat makan tikus

Bahan : Tikus putih jantan galur *sprague dawley*, pakan tikus, serbuk kayu, air minum

Prosedur :

1. 24 ekor tikus putih dibagi menjadi 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 4 ekor. Penentuan perlakuan pada tikus dilakukan secara acak. Masing-masing kelompok disebut kelompok K+, K-, P1, P2, P3 dan P4 sesuai dengan rancangan penelitian.
2. Tikus ditempatkan pada kandang individu sesuai kelompoknya dengan diberikan makan dan minum secara *ad libitum*.

b. Prosedur Pengujian Efek Penyembuhan Luka Sayat

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

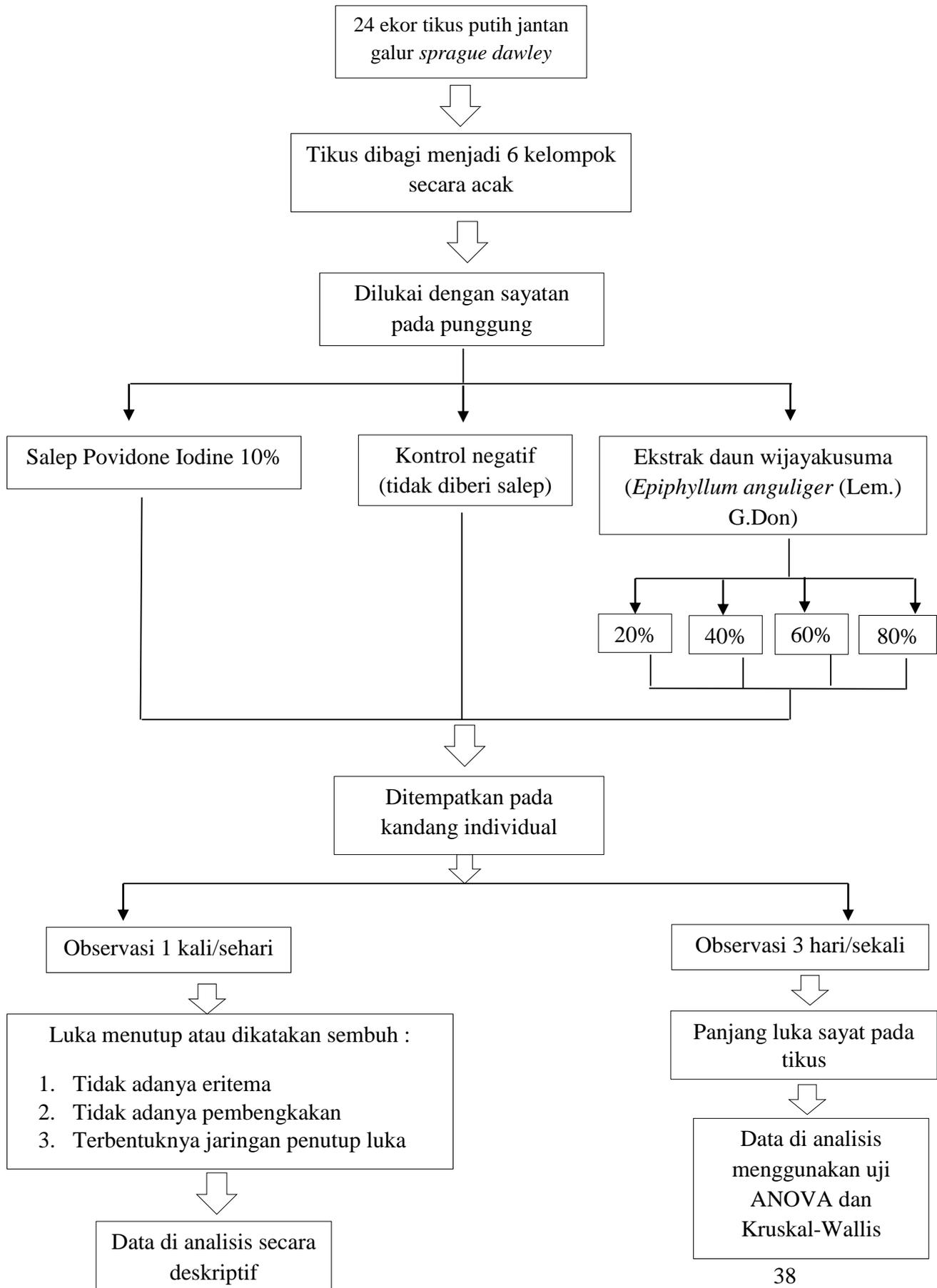
Bahan : Eter, tikus putih jantan galur *sprague dawley*, salep Povidone Iodine 10%, salep ekstrak daun wijayakusuma (dalam konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%), alkohol 70%

Prosedur :

1. Menentukan terlebih dahulu daerah yang akan dilukai atau disayat.
2. Tikus pada setiap kelompok dilakukan pembiusan dengan anastesi umum inhalasi menggunakan eter. pembiusan dilakukan dengan cara menuangkan sedikit eter pada kapas atau *tissue*, kemudian letakkan pada wadah plastik bening bersama dengan tikus dan tutup dengan penutup hingga tikus terbius.
3. Setelah terbius, rambut di sekitar punggung tikus dicukur dengan luas ukuran 4 X 4 cm hingga bersih (tambahkan dengan *feet* jika perlu) menggunakan alat cukur.

4. Kemudian pasang perlak dan alas di bawah tubuh tikus yang akan dilukai.
5. Melakukan desinfeksi pada area kulit yang telah dicukur dengan alkohol 70%.
6. Memakai sarung tangan yang steril.
7. Punggung tikus dilukai dengan *scalpel* steril mata pisau no. 4 dibuat irisan sepanjang ± 2 cm dengan kedalaman luka sampai pada area subkutan atau hipodermis. Dengan cara kulit diregangkan dengan jari telunjuk dan ibu jari tangan kiri bertindak sebagai peregang atau penekan.
8. Kemudian luka sayat pada punggung tikus diolesi dengan salep Povidone Iodine 10% dan salep ekstrak daun wijayakusuma sesuai dengan rancangan penelitian.
9. Perlakuan diberikan sampai luka sayat dinyatakan sembuh.
10. Pada hari berikutnya dilakukan pengamatan, mengukur panjang luka setiap 3 hari sekali dan mendokumentasikan kondisi luka. Observasi dilakukan sebanyak 1 kali sehari sampai luka sembuh atau dengan adanya indikator tidak adanya eritema, pembengkakan dan luka menutup (terbentuk jaringan baru).

3.6. Alur Penelitian



3.7. Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

Penelitian ini merupakan penelitian dengan menggunakan metode kuantitatif berupa data panjang luka sayat dan lama waktu yang dihitung secara statistik. Dan data berupa hasil pengamatan morfologi penyembuhan luka sayat yang dijelaskan secara deskriptif berdasarkan hasil observasi. Pengumpulan data pada penelitian ini terdiri dari :

- a. Pengukuran panjang luka sayat (tertutup) hingga sembuh
- b. Pengamatan lama waktu penyembuhan luka hingga sembuh
- c. Pengamatan morfologi kulit tikus putih (*Rattus norvegicus*)

3.8. Teknik Analisis Data

Data lama penyembuhan luka dan panjang luka sayat dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (Kolmogorof-Swirnov) dan uji homogenitas. Selanjutnya jika data berdistribusi normal akan dilanjutkan menggunakan uji parametrik ANOVA satu jalur untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari perlakuan pemberian variasi salep ekstrak daun wijayakusuma. Jika ada perbedaan maka dilanjutkan menggunakan uji lanjutan DUNCAN. Selanjutnya, jika data berdistribusi tidak normal akan dilanjutkan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Jika ada perbedaan dilanjutkan menggunakan uji Man-Whitney U (Sugiyono, 2006).