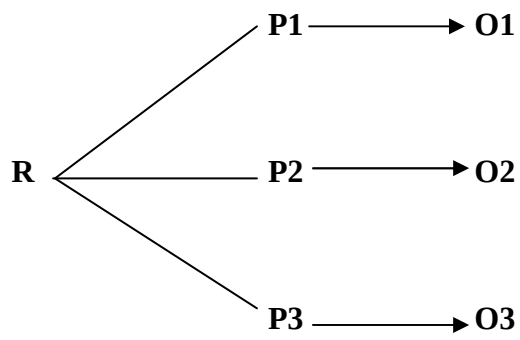
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental, yang bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap lama kesembuhan luka insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Rancangan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:



Keterangan:

R = Randomisasi

P1 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* tanpa diobati.

P2 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan asam fusidat.

P3 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan ekstrak daun sirsak.

O1 = Observasi luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* tanpa diobati.

O2 = Observasi luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan asam fusidat.

O3 = Observasi luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan ekstrak daun sirsak.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Adapun populasi dalam penelitian ini adalah sekelompok mencit yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini terdapat 3 kelompok setiap kelompok terdiri dari 9 ekor mencit *(Mus musculus)* berjenis kelamin betina yang berumur 1-2 bulan dengan berat 20-50 gram dan berjenis *Mus musculus*. Sampel penelitian sebanyak 9 sampel yang diperoleh dari rumus seperti dibawah ini:

$(n-1)\ (k-1) \geq 15$

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

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

$2n-2 \geq 15$

$n \geq 8{,}5$

$n \geq 9$ (Aziz, 2008)

Keterangan:

n = jumlah sampel

k = jumlah perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboraturium Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Ekstraksi daun sirsak *(Annona muricata)* dilakukan di Laboraturium Kimia Kesehatan Prodi Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dimulai bulan Februari 2013 hingga Juni 2013. Sedangkan pemeriksaannya dilakukan pada bulan Mei 2013.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian bahan antibakteri pada luka infeksi pada mencit *(Mus musculus).*
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah lamanya waktu kesembuhan luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit *(Mus musculus).*
3. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah
    a. Mencit : Galur mencit, jenis kelamin, umur, berat badan, jenis makanan, dosis makanan, dan lebar luka insisi.
    b. Ekstrak : Pemilihan daun sirsak, pelarut ekstrak, lama maserasi.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Pemberian bahan atibakteri pada luka infeksi pada mencit *(Mus musculus)* adalah :

a. Dengan pemberian ekstrak daun sirsak konsentrasi 0,6% yang digunakan untuk menyembuhkan luka insisi pada mencit (*Mus musculus)* dengan menggunakan lidi kapas steril yang telah dibasahi ekstrak daun sirsak *(Annona muricata)* sebanyak 3 kali sehari dengan interval waktu 8 jam (Pathak dkk, 2010)

b. Pemberian krim asam fusidat pada mencit (*Mus musculus)* sebagai kontrol positif dengan menggunakan lidi kapas steril yang telah diolesi krim asam fusidat 20 mg sebanyak 3 kali sehari dengan interval waktu 8 jam (Umar, 2012).

c. Tanpa pemberian ekstrak daun sirsak sebagai kontrol negatif.

2. Waktu kesembuhan luka insisi adalah lamanya waktu (hari) yang diperlukan mencit *(Mus musculus)* hingga terjadi kesembuhan pada luka insisi.
3. Variabel kontrol mencit meliputi :
   a. Galur mencit yaitu berjenis *Swiss albino mice*
   b. Jenis kelamin mencit yang digunakan yaitu betina
   c. Umur mencit yaitu berumur 4-8 minggu
   d. Berat badan mencit yaitu 20-50 gram
   e. Jenis makanan mencit adalah pelet ayam jenis 511 dengan kadar protein minimal 15%
   f. Dosis makan yang diberikan pada mencit yaitu 2 kali sehari (pagi dan sore)
   g. Lebar luka insisi yaitu sepanjang 0,5 cm.

4. Variabel kontrol ekstrak meliputi :
    a. Pemilihan daun sirsak yaitu pada daun ketiga dan keempat dari ujung ranting.
    b. Pelarut ekstrak yaitu menggunakan metanol pekat.
    c. Lama maserasi yaitu selama 24 jam di simpan dalam ruang gelap dan suhu kamar.

3.5 Metode Pengumpulan Data

3.5.1 Persiapan penelitian

1. Alat : timbangan, oven, blender, labu erlenmeyer, scalpel streril
2. Bahan : Daun sirsak, mencit *(Mus musculus)*, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, alkohol 70 %, metanol, PZ steril, aquades steril, H_2SO_4 1%, BaCl 1%, krim asam fusidat.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak *(Annona muricata)*

1. Proses pengeringan
    a. Mencuci bersih daun sirsak yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang akan dikeringkan.
    b. Memotong kecil-kecil daun yang telah dicuci.
    c. Lalu memasukkan ke dalam oven dengan suhu 40-60^{o}C hingga kering dan bebas kandungan air.
2. Proses ekstraksi
    a. Setelah kering, menghaluskan bahan dengan blender sampai halus.
    b. Menimbang 10 gram bahan kering daun sirsak yang telah dihaluskan.
    c. Memasukkan 10 gram sampel kering ke dalam labu erlenmeyer dan larutkan dengan pelarut metanol 100 ml.

d. Merendam bahan dalam ruang gelap selama 48 jam sambil dikocok.
e. Setelah 48 jam, lapisan bagian atas disaring dengan kertas saring.
f. Bahan dikumpulkan dalam wadah botol penampung

3. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirsak (LEDS)

$$\text{LEDS } 0{,}6\% = \frac{0.6 \text{ ml ekstrak}}{100 \text{ ml aquades steril}}$$

3.5.3 Pembuatan Suspensi Kuman *Staphylococcus aureus*

1. Pembuatan suspensi kuman Metode Mac Farland I
   a. Memipet 0,1 ml BaCl 1% dan 9,9 ml H_2SO_4 1% kemudian dihomogenkan.
   b. Memipet PZ steril 5 ml dalam tabung steril.
   c. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni dengan menggunakan lidi kapas steril.
   d. Mencelupkan lidi kapas steril ke dalam tabung yang berisi PZ steril.
   e. Membandingkan warna suspensi kuman dengan warna kekeruhan Mac Farland I (tiap 1 ml standart Mac Farlan I sama dengan mengandung 300 juta kuman).
   f. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila warna terlalu keruh maka ditambahkan PZ steril hingga warna sama dengan standart Mac Farland I.

3.5.4 Perlakuan Terhadap Mencit *(Mus musculus)*

1. Infeksi Luka Insisi Mencit dengan Kuman *Staphylococcus aureus*
   a. Menyiapkan mencit berjenis kelamin betina yang berumur 1-2 bulan dengan berat 20-50 gram. Kemudian secara acak dibagi menjadi 3 .kelompok setiap kelompok terdiri dari 9 ekor mencit.

b. Mencukur bulu bagian punggung mencit seluas 3 x 2,5 cm dan dilakukan insisi menggunakan scalpel sepanjang 0,5 cm.
c. Meinginfeksi luka insisi dengan suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 tetes pipet pasteur (0,05 ml).
d. Kemudian diinkubasi 1 hari atau sampai timbul nanah.

2. Pengobatan Luka Insisi pada Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Pengobatan dilakukan secara topikal setelah luka menunjukkan gejala klinis berupa nanah berwarna putih kekuningan. Pengobatan dilakukan sebanyak 3 kali sehari dengan interval waktu 8 jam yaitu pukul 07.00, 13.00 dan 20.00 WIB sampai luka infeksi sembuh. Perlakuan pengobatan dibagi menjadi menjadi 3 kelompok. Kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

a. P1 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* tanpa diobati (kontrol negatif).
b. P2 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan asam fusidat (kontrol positif).
c. P3 = Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan pengobatan ekstrak daun sirsak.

Sebelum dilakukan pengobatan, luka dibersihkan menggunakan aquades steril. Selanjutnya, pengobatan dilakukan dengan menggunakan lidi kapas steril yang telah dibasahi ekstrak daun sirsak hingga mencapai seluruh permukaan luka yang terinfeksi. Cara tersebut juga dilakukan pada perlakuan dengan menggunakan antibiotik asam fusidat.

3.5.5 Perubahan yang Diamati

Perubahan yang diamati adalah waktu kesembuhan luka infeksi *Staphylococcus aureus* dalam hitungan hari. Perhitungan hari dimulai dari pengobatan hari pertama setelah terjadinya infeksi pada luka yang ditandai dengan timbulnya nanah hingga penutupan luka dan pengelupasan jaringan nekrotik.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisis menggunakan uji- *Anova one-way* dengan satu perlakuan atau satu kelompok sampel.

Tabel 3.1 Pengamatan percobaan pemberian ekstrak daun sirsak terhadap waktu kesembuhan luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit

Kelompok Perlakuan	Lama waktu kesembuhan luka (hari) pada mencit (M)									Rata-rata Waktu Kesembuhan (hari)
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
Dengan pemberian ekstrak										
Kontrol positif										
Kontrol negatif										