

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *True-experiment* menggunakan metode *Post tes Only Control Group Design* (Nursalam, 2003). Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap peningkatan kontraksi luka fase proliferasi. Pada rancangan ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Kelompok perlakuan diberikan tiga macam konsentrasi (menurut kelompok) ekstrak daun sirih yang berbeda, sedangkan kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan normal salin (NaCl 0,9 %).

4.1.1. Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- Tikus jantan galur wistar.
- Umur 75-90 hari.
- Berat badan 150-250 gram.
- Kondisi sehat, yang ditandai dengan tidak ada kerontokan bulu, tidak ada peradangan dan atau pus pada mata, telinga, badan, dan ekor.
- Tikus aktif.
- Tikus tidak mendapat perlakuan sebelumnya.

Kriteria eksklusi:

- Tikus yang tidak mau makan selama penelitian.
- Tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati.

Cara perlakuan pada sampel:

- Tikus pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan (restrain) dan dipelihara di kandang dengan ukuran 900 cm² dilapisi sekam yang diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan tidak lembab.
- Tikus diberi makanan dan air minum yang sama di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Makanan tikus dibuat dari bahan baku bermerk BURAS berbentuk serbuk yang komposisinya terdiri dari jagung, katul, pollard, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin dan mineral dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1. Makanan dibentuk berupa bulatan padat seberat 40 gram.

4.1.2. Cara Penghitungan Jumlah Sampel

Teknik pengambilan sampel adalah dengan menggunakan rancangan acak kelompok. Rancangan ini dicirikan oleh adanya kelompok dalam jumlah sama di mana setiap kelompok diberi perlakuan-perlakuan (Pratisto, 2004). Pada penelitian ini terdapat empat kelompok dengan perhitungan jumlah sampel sebagai berikut (Hidayat, 2009):

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok atau perlakuan

r = adalah banyaknya sampel pada tiap kelompok

Pada penelitian ini “t” adalah 4, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

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

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Sehingga dapat disimpulkan jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 6 sampel pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 24 tikus.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari sampai Februari 2013.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* Linn.) dengan dosis 15%, 30%, dan 45%.

4.3.2. Variabel Terikat

Peningkatan Kontraksi Luka.

4.4. Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas: Ekstrak Daun Sirih	Ekstrak daun sirih yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96% di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	%	Rasio
Variabel tergantung: Peningkatan Kontraksi Luka	Proses penyembuhan luka dengan ditandai pengecilan area permukaan luka. Peningkatan kontraksi luka diukur menggunakan penggaris sebagai skala ukur lalu difoto dengan kamera digital Canon Ixus 105. Hasil foto dianalisa menggunakan software Auto CAD untuk mendapatkan presisi luas luka, lalu dihitung dengan rumus persentase kontraksi luka.	Luas Luka	Rasio
Perawatan luka bakar menggunakan ekstrak daun sirih	Perawatan luka bakar dengan menggunakan ekstrak daun sirih yang mempunyai dosis berbeda. Terdapat 3 kelompok yaitu perawatan luka bakar dengan ekstrak daun sirih dosis 15%, 30%, dan 45%. Sebelum dilakukan perawatan dengan ekstrak daun sirih luka terlebih dahulu dibersihkan menggunakan normal salin. Rawat luka dilakukan 1 kali per hari selama 15 hari.	Dosis sirih 15%, 30%, dan 45%	
Perawatan luka bakar menggunakan normal salin	Perawatan luka menggunakan normal salin 0,9% dan dilakukan 1 kali per hari selama 15 hari.	-	-

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstraksi

- | | |
|--|----------|
| 1. Daun sirih | |
| 2. Etanol 96% | |
| 3. Vaseline | 150 gram |
| 4. Botol hasil ekstrak | 12 botol |
| 5. Oven | 1 buah |
| 6. Timbangan | 1 buah |
| 7. Pisau <i>stainless steel</i> | 1 buah |
| 8. Gelas <i>Erlenmeyer</i> | 2 buah |
| 9. Corong gelas | 1 buah |
| 10. Kertas saring | 1 buah |
| 11. Labu evaporator | 1 buah |
| 12. Labu penampung etanol | 1 buah |
| 13. Evaporator | 1 buah |
| 14. Pendingin spiral atau <i>rotary evaporator</i> | 1 buah |
| 15. Selang <i>water pump</i> | 1 buah |
| 16. <i>Water pump</i> | |
| 17. <i>Water bath</i> | |
| 18. <i>Vacum pump</i> | 1 buah |

(Patmawati, 2010)

4.5.2. Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Luka Bakar Derajat II A

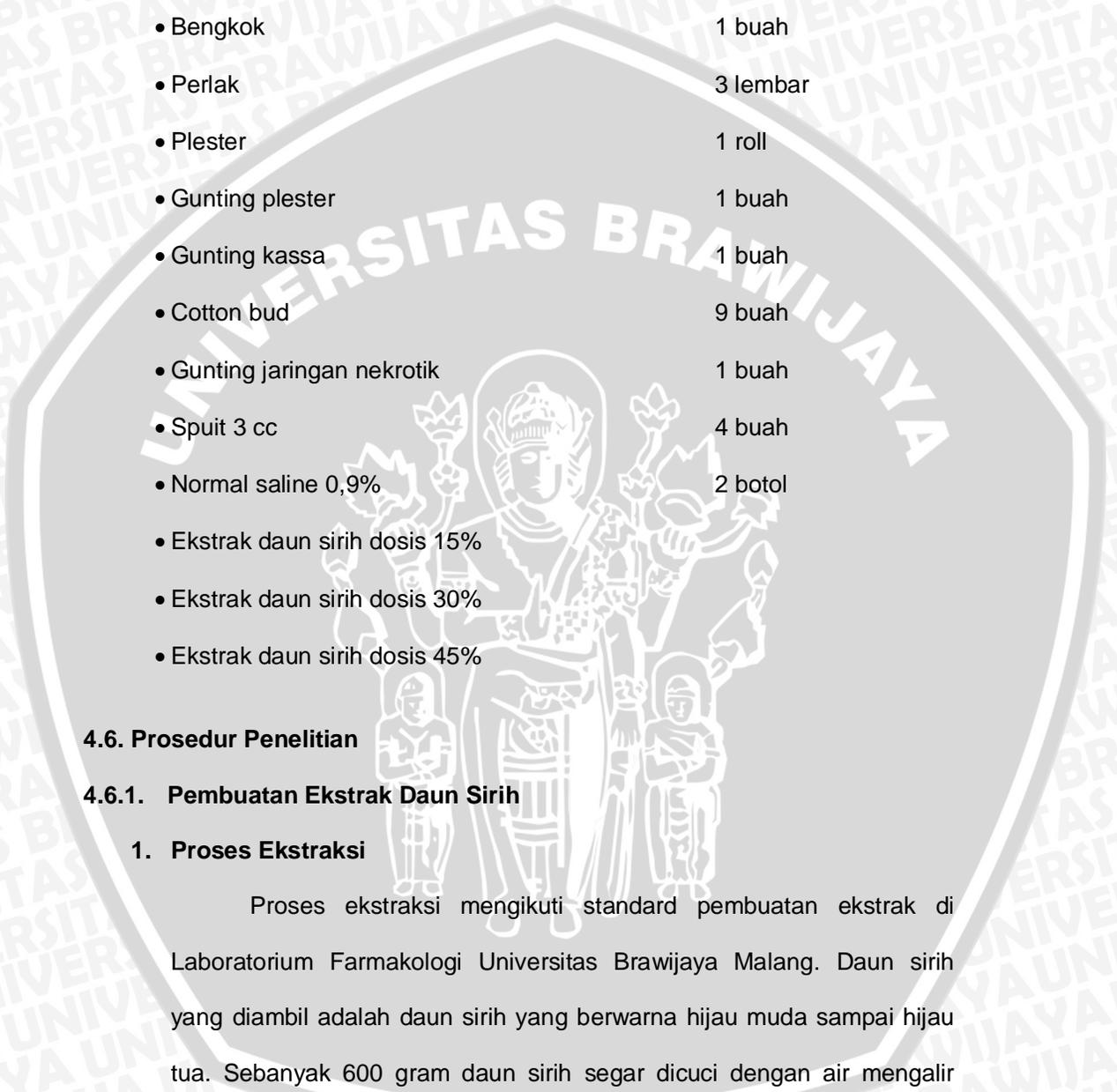
- Pisau cukur dan gagangnya 1 buah
- Tikus Jantan Strain Wistar 24 ekor
- Penggaris 1 buah

• Sarung tangan steril	1 pasang
• Bengkok	1 buah
• Kom steril	2 buah
• Perlak	1 buah
• Air panas suhu 98°C	700 ml
• Jas laboratorium	1 buah
• Gunting plester	1 buah
• Pinset anatomis	2 buah
• Obat anastesi (Lidokain non adrenalin)	24 ampul
• Normal Saline 0,9%	1 botol
• S spuit + jarum	24 buah
• Kassa steril	72 buah
• Kassa + NS 0,9%	24 buah
• Alkohol swab	24 buah
• Arloji	1 buah
• Balok (sterofoam) berbungkus kassa	24 buah

(Gayline *et al.*, 2000)

4.5.3. Alat Untuk Perawatan Luka Bakar Derajat II A

• Sarung tangan	1 pasang
• Jas laboratorium	1 buah
• Bak instrument	1 buah
• Pinset anatomis	2 buah
• Kom	2 buah
• Korentang dan tempatnya	1 buah



• Kassa steril	24 buah
• Kassa + NS 0,9%	24 buah
• Bengkok	1 buah
• Perlak	3 lembar
• Plester	1 roll
• Gunting plester	1 buah
• Gunting kassa	1 buah
• Cotton bud	9 buah
• Gunting jaringan nekrotik	1 buah
• Spuit 3 cc	4 buah
• Normal saline 0,9%	2 botol
• Ekstrak daun sirih dosis 15%	
• Ekstrak daun sirih dosis 30%	
• Ekstrak daun sirih dosis 45%	

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih

1. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standard pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Daun sirih yang diambil adalah daun sirih yang berwarna hijau muda sampai hijau tua. Sebanyak 600 gram daun sirih segar dicuci dengan air mengalir sampai bersih kemudian dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari dengan cara daun ditutup dengan kain hitam saat dijemur.

Setelah daun sirih kering dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi bentuk serbuk. Serbuk daun sirih ditimbang sebanyak 100 gram. Selanjutnya masukkan 100 gram serbuk daun sirih ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter dan rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit). Diamkan 1 malam sampai mengendap.

2. Proses Evaporasi

Hasil rendaman etanol dengan serbuk daun sirih dimasukkan ke dalam labu evaporasi. Pasang labu evaporasi pada evaporator dan isi water bath dengan air sampai penuh. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C), sambungkan dengan aliran listrik. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Tunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung. Hasil yang diperoleh kira-kira sepertiga dari bahan alam kering. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan simpan dalam *freezer*.

Stok ekstrak daun sirih (*Piper betle* Linn) yang ada kemudian akan dibuat beberapa dosis yang berbeda dengan cara menambahkan pelarut vaselin (kadar vaselin yang digunakan sebanyak 50 mg berdasarkan ukuran luas luka yang akan diberikan yaitu 2x2 cm²) menggunakan rumus (Pratiwi *et al.*, 2004) :

$$L = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

L : Konsentrasi larutan (%)

a : Massa zat terlarut (mg)

b : Massa zat pelarut (mg)

Penelitian ini menggunakan tiga konsentrasi ekstrak daun sirih yang dipilih berdasarkan studi pendahuluan. Dalam studi pendahuluan dosis sirih 30% merupakan dosis yang paling optimal terhadap pengurangan area luas luka. Dosis 15% dan 45% diberikan diberikan sebagai konsentrasi yang diambil dari setengah di atas dan di bawah konsentrasi optimal. Sehingga bila dimasukkan rumus penambahan vaselin seperti di atas didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Konsentrasi 15%

$$L = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$a = \frac{15 \times 50 \text{ mg}}{100\%}$$

$$a = 7,5 \text{ mg}$$

Dalam ekstrak daun sirih dosis 15% terdapat 7,5 mg ekstrak daun sirih dalam 50 mg vaselin.

2. Konsentrasi 30%

$$L = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$a = \frac{30 \times 50 \text{ mg}}{100\%}$$

$$a = 15 \text{ mg}$$

Dalam ekstrak daun sirih dosis 30% terdapat 15 mg ekstrak daun sirih dalam 50 mg vaselin.

3. Konsentrasi 45%

$$L = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$a = \frac{45 \times 50 \text{ mg}}{100\%}$$

$$100\%$$

$$a = 22,5 \text{ mg}$$

Dalam ekstrak daun sirih dosis 45% terdapat 22,5 mg ekstrak daun sirih dalam 50 mg vaselin.

4.6.2. Pembuatan Luka Bakar Derajat IIA

Tindakan yang harus dilakukan untuk membuat luka bakar pada hewan coba adalah sebagai berikut:

- Tentukan terlebih dahulu daerah yang akan dibuat luka bakar yaitu punggung kanan atas.
- Bersihkan bulu dan cukur area yang akan dibuat induksi luka bakar seluas $5 \times 5 \text{ cm}^2$.
- Pasang perlak/ alas di bawah tubuh tikus yang akan di buat luka bakar.
- Buka bak instrumen steril, cuci tangan, dan pakai sarung tangan steril.
- Desinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar, tunggu sampai alkohol kering.
- Lakukan anestesi dengan cara disuntikkan pada area kulit yang akan di buat luka bakar yaitu punggung kanan atas dengan lidocain non adrenalin dosis 0,5 cc.
- Siapkan sterfoam berukuran $2 \times 2 \text{ cm}^2$ kemudian balut dengan kasa sebanyak 2 lapis.

- Celupkan sterofoam yang berbungkus kasa ke dalam air panas (suhu 98 ° C) selama 3 menit.
- Tempelkan sterofoam yang berbungkus kasa pada hewan coba selama 30 detik.
- Setelah diinduksi, kompres area yang diberi luka bakar menggunakan normal saline selama 1 menit untuk mencegah luka bakar menyebar ke daerah yang lain.
- Tunggu sampai terbentuk bula.
- Balut luka.
- Lepas sarung tangan.
- Rapikan alat dan cuci tangan.

4.6.3. Prosedur Perawatan Luka Bakar Derajat II

1. Persiapan alat:

- a. Semua peralatan yang diperlukan disiapkan
- b. Cuci tangan

2. Perawatan luka (Dengan prinsip steril)

- a. Pakai sarung tangan
- b. Buka balutan
- c. Perawatan

❖ Kelompok 1 (Kelompok perlakuan dengan perawatan menggunakan ekstrak daun sirih dosis 15%).

- Bersihkan luka dengan normal saline 0,9%.
- Berikan ekstrak daun sirih dosis 15% yang dilarutkan dalam 50 mg vaselin pada area luka menggunakan cotton bud (perawatan dilakukan 1x/hari yaitu jam 09.00 WIB).

- ❖ Kelompok 2 (Kelompok perlakuan dengan perawatan menggunakan ekstrak daun sirih dosis 30%).
 - Bersihkan luka dengan normal saline 0,9%.
 - Berikan ekstrak daun sirih dosis 30% yang dilarutkan dalam 50 mg vaselin pada area luka menggunakan cotton bud (perawatan dilakukan 1x/hari yaitu jam 09.00 WIB).
 - ❖ Kelompok 3 (Kelompok perlakuan dengan perawatan menggunakan ekstrak daun sirih dosis 45%).
 - Bersihkan luka dengan normal saline 0,9%.
 - Berikan ekstrak daun sirih dosis 45% yang dilarutkan dalam 50 mg vaselin pada area luka menggunakan cotton bud (perawatan dilakukan 1x/hari yaitu jam 09.00 WIB).
 - ❖ Kelompok 4 (Kelompok kontrol dengan perawatan menggunakan normal saline 0,9%)
 - Bersihkan luka dengan normal saline 0,9 %.
 - Berikan 0,5 cc normal salin pada area luka (perawatan dilakukan 1x/hari yaitu jam 09.00 WIB).
- d. Tutup luka dengan kassa steril
 - e. Bereskan peralatan
 - f. Lepaskan sarung tangan
 - g. Cuci tangan.

4.7. Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1. Teknik Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini digunakan teknik observasi eksperimen dimana sampel dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok

kontrol yang dilakukan perawatan setiap hari sampai hari ke-15. Pengamatan dan pengukuran peningkatan kontraksi luka dilakukan pada hari ke 1 setelah di induksi luka bakar dan diukur kembali pada hari ke-15 baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

4.7.2. Metode Pengumpulan Data

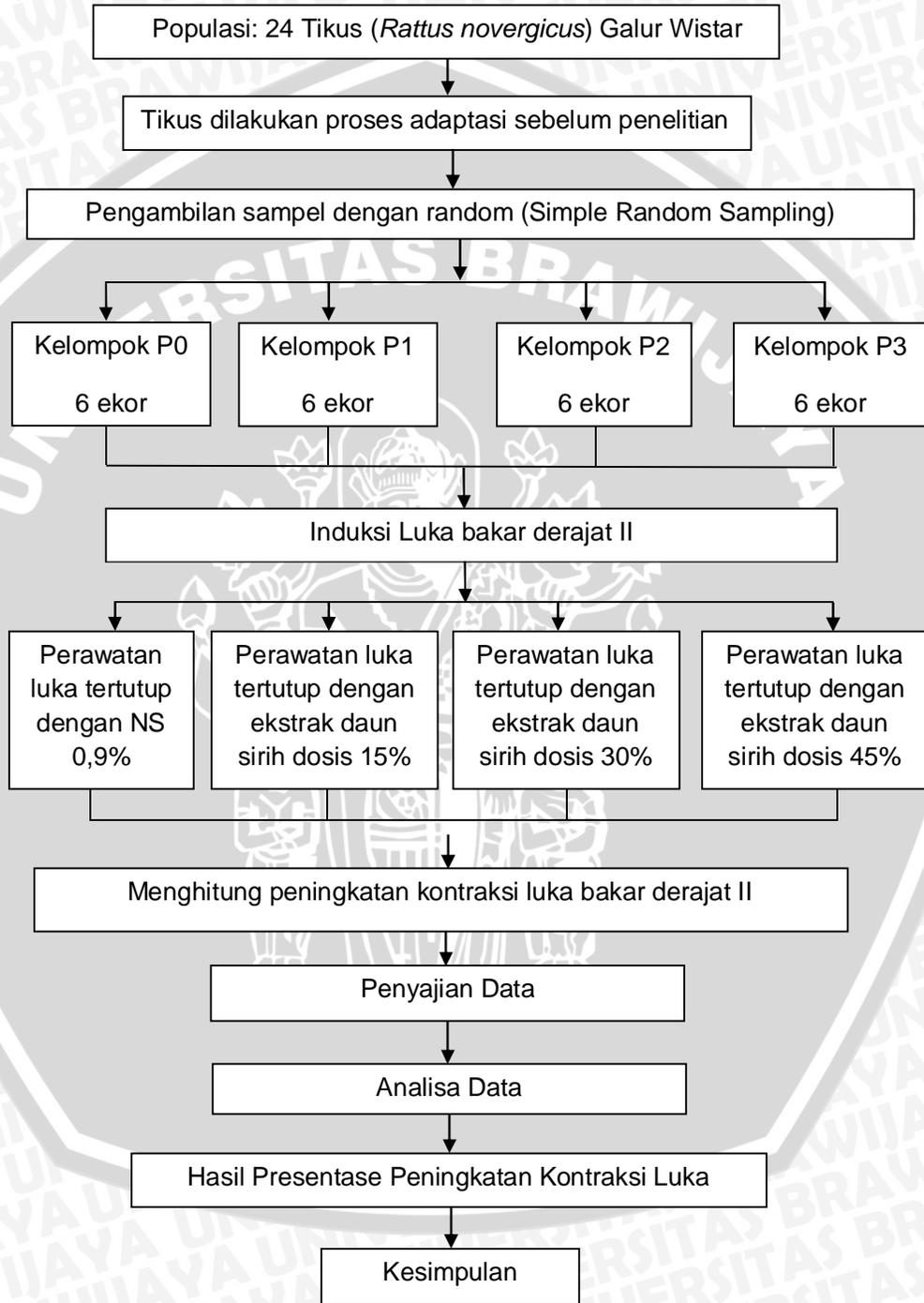
Metode pengumpulan data dengan menghitung persentase kontraksi luka yang ditandai dengan pengecilan ukuran luka diukur menggunakan penggaris sebagai skala ukur kemudian difoto dengan kamera digital Canon Ixus 105. Hasil foto dianalisa dengan software AutoCAD setelah itu dihitung dengan rumus presentase kontraksi luka untuk mendapatkan persentase peningkatan kontraksi luka (Bairy *et al.*, 2012).

4.7.3. Identifikasi Kontraksi Luka

Proses identifikasi kontraksi luka dilakukan sebelum diberikan perlakuan terapi yaitu hari pertama setelah dilakukan proses induksi luka bakar kemudian diamati lagi pada hari ke 15. Rumus persentase luka menurut Bairy *et al* (2012) :

$$\% \text{ of wound contraction} = \frac{\text{Initial wound size} - \text{Specific day wound size}}{\text{Initial wound size}} \times 100$$

4.7.4. Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8. Analisa Data

4.8.1. Uji Normalitas dan Homogenitas

Dari hasil analisa terhadap peningkatan kontraksi luka bakar derajat II pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan kemudian dilakukan uji asumsi statistik *SPSS version 20 for windows* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan statistik uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan $\alpha=0,05$. Jika data menunjukkan *p value* $> 0,05$, maka data terdistribusi normal. Kemudian pada uji homogenitas / keragaman data menggunakan uji *Tukey HSD (High Significance Difference)*, jika nilai *F* hasil $>$ nilai *F* tabel, maka data adalah homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA*.

4.8.2. Uji *One way ANOVA*

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan *One way ANOVA SPSS version 20 for windows* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi $< \alpha$ (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan kontraksi luka pada luka bakar derajat II antar kelompok.

4.8.3. Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*)

Digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang paling signifikan di antara kelompok-kelompok uji coba. Nilai signifikansi antar kelompok yang paling bermakna adalah yang memiliki nilai signifikansi paling kecil.