

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *True-experiment* post-test dengan kelompok eksperimen dan kontrol. Pada rancangan ini kelompok eksperimental diberi perlakuan sedangkan kelompok kontrol diberikan normal salin (NaCl 0,9%). Seluruh kelompok tidak diawali dengan pra-tes. Penghitungan hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai (Nursalam, 2008).

Pada rancangan ini terdapat 3 kelompok eksperimen dan 1 kelompok kontrol. Kelompok eksperimen diberi perlakuan yaitu dengan terapi ekstrak daun sirih. Dosis yang diberikan adalah 15%, 30% dan 45%. Dosis ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 30% mempunyai kemampuan penyembuhan luka yang optimal (Pramana 2009). Sedangkan dosis 15% dan 45% diberikan sebagai eksplorasi dosis yang diambil dari setengah atas dan setengah bawah dosis optimal. Kelompok kontrol adalah kelompok yang diberikan NaCl (Normal Saline 0,9%) sebagai kontrol.

4.2 Sampel

4.2.1 Kriteria Sampel

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

Kriteria inklusi:

- Galur Wistar.

- Umur 2,5-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia ini terjadi cepat sehingga dapat mendukung proses penyembuhan luka.
- Berat badan 150-200 gram.
- Mendapatkan nutrisi yang sama.
- Kondisi sehat, yang ditandai dengan tidak ada kerontokan bulu, tidak ada peradangan dan atau pus pada mata, telinga, badan, dan ekor.
- Tikus aktif.
- Tidak ada abses karena infeksi.

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).
- Tikus diberi makan dan air minum yang sama di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Makanan diberikan sebanyak 30 gram/hari yang terbuat dari makanan ayam buras (campuran dari jagung, bekatul pollard, DDGS, rapeseed, copra meal, biji batu CPO, vitamin dan mineral) dan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1. Minuman berupa air biasa sebanyak 20-45 ml/hari.
- Tikus diberi perlakuan yang sama yaitu dilakukan pembuatan luka bakar derajat IIA (yang sebelumnya di

anestesi dengan lidokain non-adrenalin) kubus dengan ukuran 2x2cm yang dibalut menggunakan kassa steril yang dicelupkan dalam air mendidih suhu 98°C selama 3 menit dan ditempelkan dengan pinset anatomis selama 30 detik pada area pembuatan luka bakar sampai terbentuk bula kemudian diberi perawatan luka bakar derajat IIA sesuai kelompok.

- Tikus dilakukan anestesi dengan lidokain non adrenalin 0,5 cc dalam 1 cc akuades sebelum dilakukan pembuatan luka bakar derajat IIA untuk menghindari nyeri.
- Setiap kandang berukuran 900 cm² dilapisi sekam yang diganti tiga hari sekali agar tetap kering dan tidak lembab untuk 1 tikus.

4.2.2 Cara Penghitungan Jumlah Sampel

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

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

“t” adalah 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 r sebagai berikut:

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

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Sehingga didapat jumlah sampel dalam penelitian ini adalah minimal 6 sampel pada setiap kelompok. Dalam penelitian ini menggunakan jumlah sampel sebanyak 6 ekor sehingga total sampel berjumlah 24.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan selama kurang lebih 4 minggu pada bulan Januari 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

- Konsentrasi ekstrak etanol daun sirih : 15%, 30%, dan 45%

4.4.2 Variabel Terikat

Jumlah pembuluh darah.

4.5 Definisi Operasional

4.6

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak kasar daun Sirih	Bahan perawatan luka bakar derajat IIA dari daun sirih yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 95% dibuat dosis 15%, 30% dan 45% di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	%	Rasio
Perawatan Luka Bakar derajat IIA dengan ekstrak etanol daun sirih	Proses membersihkan area cedera karena termal terlebih dahulu dengan kassa steril yang direndam Normal Saline 0,9% kemudian lalu diberi ekstrak daun sirih secara topikal dosis 15%, 30% dan 45% pada masing-masing perlakuan dan ditutup dengan kassa steril setelah itu diplester.	Milliliter (ml)	Rasio
Jumlah pembuluh darah	Interpretasi hasil pengamatan banyaknya pembuluh darah yang terbentuk diidentifikasi pada penampang melintang dengan bentuk bulat berwarna pink dengan eritrosit berwarna merah pada lapisan sel-sel endotel pada pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> pada saat dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC 10, kamera digital Canon Ixus 105 dan memakai software OlyVIA dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pandang yang diukur pada hari ke-15 (Eroschenko, 2010).	Jumlah pembuluh darah	Rasio

Perawatan Luka Bakar derajat IIA dengan normal saline 0,9%.	Proses membersihkan area cedera karena termal pada kelompok kontrol dengan kassa + Normal saline 0,9% yang kemudian dibalut dengan kassa yang direndam normal salin dan diplester (Azizah,2012)	cc	Rasio
---	---	----	-------

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstraksi

Dalam pembuatan ekstrak dibutuhkan persiapan alat-alat dan bahan sebagai berikut (Patmawati, 2010):

1. Daun sirih
2. Etanol 95%
3. Aquades : 1 botol
4. Botol hasil ekstrak : 12 botol @ 9 ml
5. Oven : 1 buah
6. Timbangan : 1 buah
7. Pisau *stainlesssteel* : 1 buah
8. Gelas *Erlenmeyer* : 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 *rotary evaporator* : 1 buah
15. Selang *water pump* : 1 buah
16. *Water pump*

17. *Water bath*

18. *Vacum pump* : 1 buah

4.7.2 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Luka Bakar Derajat IIA

Alat dan bahan yang dipersiapkan untuk pembuatan luka bakar derajat IIA sebagai berikut (Gayline *et al.*, 2010):

1. Tikus *Rattus novergicus* Galur Wistar : 24 ekor
2. Air mendidih suhu 98°C : 700 ml
3. Pisau cukur : 1 buah
4. Penggaris : 1 buah
5. Kom steril : 2 buah
6. Pinset anatomis : 2 buah
7. Obat anastesi (lidokain non adrenalin) : 24 ampul
8. S spuit 3 cc dan jarum steril : 24 buah
9. Alkohol swab : 24 buah
10. Kassa steril : 72 buah
11. Sarung tangan steril : 1 pasang
12. Bengkok : 1 buah
13. Balok stereofoam : 24 buah
14. Timer : 1 buah
15. Jas lab : 1 buah
16. Perlak : 1 buah
17. Gunting plester : 1 buah
18. Normal Saline 0,9% : 1 botol
19. Kassa + Normal Saline 0,9% : 24 buah

4.7.3 Alat Untuk Perawatan Luka Bakar Derajat IIA

Alat dan bahan yang perlu disiapkan selama proses perawatan luka bakar derajat IIA sebagai berikut (Gayline *et al.*, 2010):

- 
1. Sarung tangan : 1 pasang
 2. Jas laboratorium : 1 buah
 3. Bak instrumen : 1 buah
 4. Pinset anatomis : 2 buah
 5. Kom : 2 buah
 6. Korentang dan tempatnya : 1 buah
 7. Kassa steril : 24 buah
 8. Kassa + Normal Saline 0,9% : 24 buah
 9. Bengkok : 1 buah
 10. Perlak : 3 lembar
 11. Plester : 1 roll
 12. Gunting plester : 1 buah
 13. Gunting kassa : 1 buah
 14. Lidi wotton : 9 buah
 15. Spuit 3 cc : 1 buah
 16. Normal saline 0,9% : 1 botol
 17. Ekstrak daun sirih dosis 15% : 1200 mg
 18. Ekstrak daun sirih dosis 30% : 1200 mg
 19. Ekstrak daun sirih dosis 45% : 1200 mg

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih

1. Proses Pengeringan

Daun sirih diperoleh dari satu pohon yang sama di Balai Materia Medika Batu Malang pada bulan Januari 2013. Daun sirih yang diambil adalah daun berwarna hijau muda sampai

hijau tua. Daun sirih dicuci secara terpisah dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian daun sirih dikeringkan pada suhu kamar dan menggunakan kipas angin untuk mempercepat proses pengeringan pada permukaan daun bekas bilasan. Setelah permukaan daun kering dilakukan penimbangan secara terpisah. Kemudian daun sirih dipotong-potong menggunakan pisau *stainlesssteel* dengan ukuran 1-3 mm dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari dengan cara daun ditutup dengan kain hitam saat dijemur. Setelah daun sirih kering dilakukan proses penghalusan menggunakan blender secara terpisah sehingga menjadi bentuk serbuk (Patmawati, 2010).

2. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standard pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang.

- a. Serbuk daun sirih ditimbang sebanyak 100 gram.
- b. Masukkan 100 gram serbuk ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- c. Rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml.
- d. Kocok sampai benar-benar tercampur
- e. Diamkan 1 malam sampai menguap

3. Proses Evaporasi

- a. Ambil lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif
- b. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter dan isi sampai 2/3 labu.
- c. Pasang labu evaporasi pada evaporator

- d. Isi water bath dengan air sampai penuh.
- e. Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 70-80°C), sambungkan dengan aliran listrik.
- f. Biarkan larutan etanol mendidih lalu memisah ke dalam labu penampung.
- g. Tunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 satu labu).
- h. Hasil yang diperoleh kira-kira sepertiga dari bahan alam kering.
- i. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol hasil ekstrak
- j. Simpan dalam freezer

Stok ekstrak daun sirih (*Piper betle* Linn.) yang ada kemudian diencerkan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

- L : konsentrasi larutan (%)
- a : massa zat terlarut (mg)
- b : massa larutan (mg)

Berdasarkan penelitian sebelumnya (Pramana, 2009) pengenceran ekstrak daun sirih menjadi konsentrasi yang diinginkan dengan dilakukan dengan menambahkan Vaseline (besar olesan 50 mg berdasarkan luas luka $2 \times 2 \text{ cm}^2$ melalui studi eksplorasi) :

1. Konsentrasi 15%

$$a = \frac{L}{100} \times b = 7,5 \text{ mg (tiap tikus)}$$

Total : 6 tikus x 14 hari x 7,5 mg = 735 mg ekstrak daun sirih

6 tikus x 14 hari x 50 mg = 4200 mg Vaseline

2. Konsentrasi 30%

$$a = \frac{\text{Ekstrak}}{\text{Vaseline}} = \frac{\text{Ekstrak}}{4200 \text{ mg}} = 15 \text{ mg (tiap tikus)}$$

Total : 6 tikus x 14 hari x 15mg = 1260 mg ekstrak daun siri

6 tikus x 14 hari x 50 mg = 4200 mg Vaseline

3. Konsentrasi 45%

$$a = \frac{\text{Ekstrak}}{\text{Vaseline}} = \frac{\text{Ekstrak}}{4200 \text{ mg}} = 22,5 \text{ mg (tiap tikus)}$$

Total : 6 tikus x 14 hari x 22,5 mg = 1890 mg ekstrak daun siri

6 tikus x 14 hari x 50 mg = 4200 mg vaseline.

Pengenceran dilakukan setiap hari, Sisa ekstrak yang sudah jadi disimpan dalam lemari es.

4.8.2 Pembuatan Luka Bakar Derajat IIA

Tindakan yang harus dilakukan untuk membuat luka bakar pada hewan coba adalah sebagai berikut (Gayline *et al.*, 2000):

1. Tentukan terlebih dahulu daerah yang akan dibuat luka bakar yaitu daerah punggung kanan atas.
2. Bersihkan bulu dan cukur area tersebut sampai jarak 3 cm dari area yang akan dibuat luka bakar.
3. Pasang perlak atau alas di bawah tubuh tikus yang akan dibuat luka bakar.
4. Buka bak instrumen steril, cuci tangan dan pakai sarung tangan steril
5. Disinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar dan tunggu sampai alkohol kering.

6. Lakukan anastesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar menggunakan lidokain non adrenalin dengan dosis 0,5 cc dan tunggu 1,5-2 jam untuk membuat luka bakar (onset lidokain non adrenalin: 1,5-2 jam)
7. Lipat kasa sesuai dengan luas luka bakar dan bentuk sesuai cetakan.
8. Pasang kasa di atas balok (stereofom) berukuran 2x2 cm² dan cetakan.
9. Celupkan balok yang berlapis dan terbungkus kasa dengan air panas (suhu 98°C) selama 3 menit.
10. Tempelkan balok yang terbungkus kassa pada hewan coba selama 30 detik.
11. Tunggu sampai terbentuk bula (30detik)
12. Angkat kasa lalu kompres dengan normal salin selama 1 menit untuk mencegah kombusio.
13. Berikan perawatan pada area luka yang terbentuk sesuai prosedur rawat luka yaitu keringkan dan tutup luka.
14. Lepas sarung tangan.
15. Rapikan alat dan cuci tangan.

4.8.3 Prosedur Perawatan Luka Bakar Derajat IIA

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 perlakuan (kelompok dengan perawatan menggunakan ekstrak daun sirih dosis 15%, 30% dan 45%) (Azizah, 2012).
 - Bersihkan luka dengan kassa +normal saline 0,9% yang diusapkan pada luka.
 - Berikan 200 mg ekstrak daun sirih dosis 15%, 30% dan 45% pada area luka menggunakan lidi wotten (perawatan dilakukan 1x/hari yaitu jam 13.00 WIB).
 - ❖ Kelompok kontrol (kelompok dengan perawatan menggunakan normal saline 0,9% saja)
 - Bersihkan luka dengan kassa +normal saline 0,9% yang diusapkan pada luka.
 - balut dengan kassa yang direndam normal salin dan diplester.
- d. Tutup luka dengan kassa steril
 - e. Bereskan peralatan
 - f. Lepaskan sarung tangan
 - g. Cuci tangan

4.9 Prosedur Pengumpulan Data

4.9.1 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-14. Pengamatan dan penghitungan jumlah pembuluh darah dilakukan sesudah pemberian perlakuan pada hari

ke-15 baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol lalu hasilnya dimasukkan dalam instrumen penelitian.



Tabel 4.2 Instrumen Penelitian

no	Perlakuan	Kode Sampel	Jumlah Pembuluh Darah Baru														
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	LP 6	LP 7	Lp 8	LP 9	LP 10	LP 11	LP 12	LP 13	LP 14	LP 15
1	Ekstrak Daun Sirih Dosis 15%	K1.1															
		K1.2															
		K1.3															
		K1.4															
		K1.5															
		K1.6															
2	Ekstrak Daun Sirih Dosis 30%	K2.1															
		K2.2															
		K2.3															
		K2.4															
		K2.5															
		K2.6															
3	Ekstrak Daun Sirih Dosis 45%	K3.1															
		K3.2															
		K3.3															
		K3.4															
		K3.5															
		K3.6															
4	Normal Salin 0,9%	K4.1															
		K4.2															
		K4.3															
		K4.4															
		K4.5															
		K4.6															

4.9.2 Metode Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit dilakukan setelah tikus di *euthanasia* dengan menggunakan larutan eter dosis berlebih secara perinhalasi. Daerah punggung (daerah luka) yang akan diambil kulitnya dibersihkan dari bulu yang mulai tumbuh kembali, kulit digunting dengan ketebalan ± 3 mm sepanjang 1-1,5 cm². Kulit yang diperoleh kemudian difiksasi dengan larutan *Buffer Neutral Formalin* atau BNF 10% dibiarkan pada suhu kamar selama ± 48 jam (Febram, 2010).

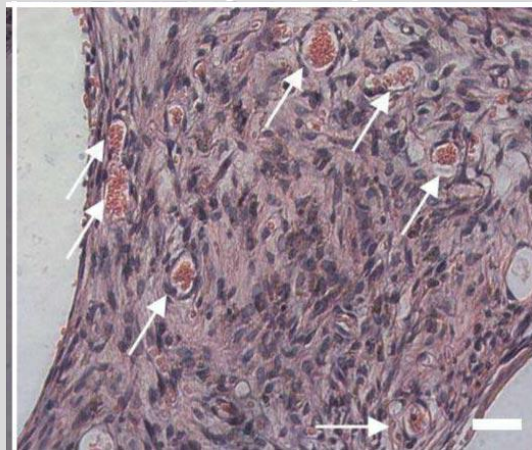
4.9.3 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dengan menghitung pembuluh darah yang terbentuk menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC 10,

kamera digital Canon Ixus 105 dan software OlyVIA dengan perbesaran 400 kali dimana setiap sediaan diperiksa pada luas pandang 15 area kemudian dirata-rata (Febram et al, 2010).

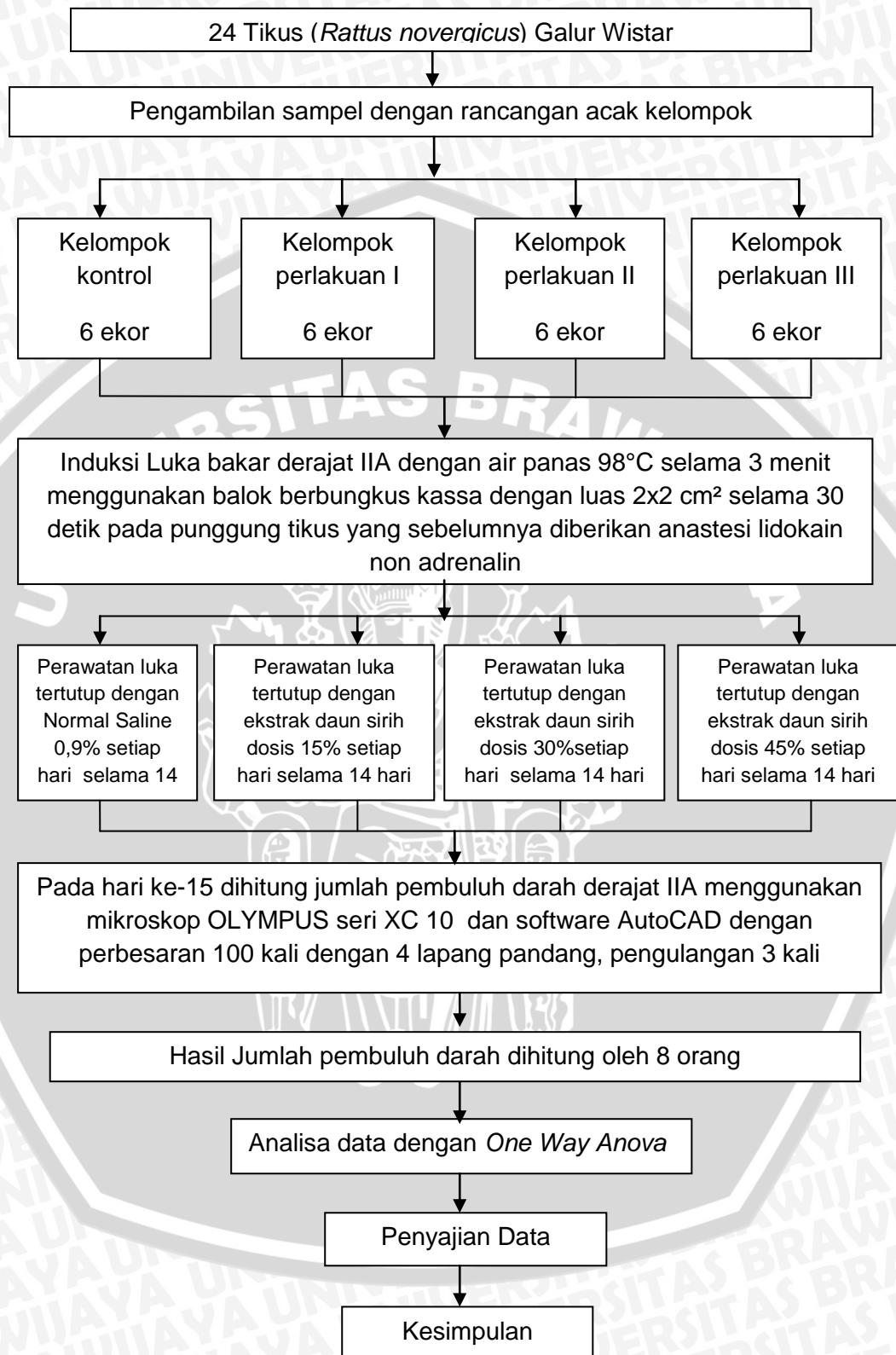
4.9.4 Identifikasi Pembuluh Darah

Proses identifikasi pembuluh darah dilakukan pada hari ke-15 setelah luka dibersihkan. Interpretasi hasil pengamatan banyaknya pembuluh darah baru diidentifikasi dengan bentuk bulat berwarna pink dengan eritrosit berwarna merah pada lapisan sel-sel endotel pada pewarnaan *Hematoxylin Eosin* pada saat dilakukan pengamatan (Eroschenko, 2010).



Gambar 4. 1 Pengamatan histopatologi pembuluh darah (Jabbarzadeh et al, 2008)

4.8.5 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian

4.10 Analisa Data

4.10.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Dari hasil analisa terhadap jumlah pembuluh darah yang terbentuk luka bakar derajat IIA pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan kemudian dilakukan uji asumsi statistik *SPSS version 17 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 (Priyatno, 2011). Kemudian pada uji homogenitas / keragaman data menggunakan Test Homogeneity of Variance. Jika signifikansi lebih dari 0,05 maka data adalah homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan One way ANOVA.

4.10.2 Uji One way ANOVA

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan One way ANOVA *SPSS version 17 for windows* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi $< \alpha$ (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah pembuluh darah yang terbentuk pada luka bakar derajat IIA antar kelompok (Sugiyono, 2011).

4.10.3 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 (Plichta & Garson, 2009).