

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experimental* dengan desain penelitian *Pre Test and Post Test Control Group Design*, pengumpulan data dilakukan di awal dan di akhir perlakuan baik pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan coba tikus putih (*rattus norvegicus*) untuk mengetahui penurunan jumlah koloni bakteri pada perawatan luka dengan ekstrak etanolit jahe emprit (*zingiber officinale var amarum*), *povidone iodine* 10% dan *betaine polyhexanide* 0,1% pada luka terkontaminasi. Pembagian kelompok menjadi tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol yang dilakukan dengan menggunakan teknik acak atau *simple random sampling*. Tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberikan ekstrak etanolit jahe emprit konsentrasi 5%, 20% dan 35%. Dua kelompok kontrol yaitu kelompok yang dirawat dengan *povidone iodine* 10% dan kelompok yang dirawat dengan *betaine polyhexanide* 0,1%.

4.2. Sampel

4.2.1. Kriteria sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respon biologis yang mendekati manusia. Proses penyembuhan luka dipengaruhi oleh berbagai faktor. Oleh sebab itu, untuk menghindari faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses

penyembuhan luka, maka ditentukan kriteria inklusi untuk menghomogenkan sampel. Adapun kriteria inklusi tersebut, meliputi :

- a. Jenis tikus adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Usia 2-2,5 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka
- d. Berat badan tikus antara 150-250 gram
- e. Diberi minum dan makan dengan jumlah dan jenis yang sama
- f. Kondisi sehat ditandai dengan: pergerakan aktif, jinak, berbulu licin, mengkilat dan bersih, rambut tebal dan tidak kasar, badan tegap dan tidak kerempeng, tidak ada luka, mata jernih dan baik, tidak mengeluarkan lendir/nanah/darah dari mata atau telinga, tidak terlalu banyak ludah, tidak mencret, dan pernafasan tenang.
- g. Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya
- h. Masing-masing tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran yang sama dan diberi sekam. Sekam diganti setiap 3 hari sekali agar tetap kering, tidak lembab. Satu kandang ditempati oleh satu ekor tikus supaya tikus tidak berkelahi dan tidak menimbulkan luka baru.
- i. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari di laboratorium farmakologi FKUB

4.2.2. Besar sampel

Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok, yaitu tiga kelompok perlakuan yang dirawat ekstrak etanolit jahe emprit konsentrasi 5%, 20%, 35%, dan dua kelompok kontrol, yaitu kelompok yang dirawat dengan *povidone iodine 10%* dan kelompok yang dirawat dengan *betaine polyhexanide*

0,1%. Jumlah objek penelitian tiap kelompok dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

P = jumlah perlakuan

N = banyaknya sampel tiap kelompok perlakuan

Pada penelitian ini menggunakan lima kelompok sehingga jumlah sampel yang diperlukan dalam satu kelompok adalah

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

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Jadi, dalam penelitian ini dibutuhkan jumlah sampel minimal setiap kelompok sebanyak 4 ekor. Sehingga total jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus. Kemudian, setelah penentuan jumlah sampel, maka dilakukan pembagian kelompok. Pembagian kelompok dilakukan dengan cara *simple random sampling*.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak jahe emprit dengan konsentrasi 5%, 20%, 35%.

4.3.2. Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri.

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Mikrobiologi FKUB pada tanggal 3-22 Februari 2014.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Hewan Coba

Pemilihan hewan uji idealnya harus dipilih semirip mungkin dengan kondisi manusia, utamanya dalam hal absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi terhadap senyawa uji. Hal ini dilakukan untuk memperkecil perubahan respon antarjenis dan dalam satu jenis hewan uji terhadap efek senyawa uji. Pada umumnya hewan uji yang sering digunakan adalah mencit, tikus, kelinci, anjing, kera serta kucing. Dalam percobaan ini, hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur wistar sebanyak 20 ekor tikus yang dibagi dalam lima kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Umur tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah 2 sampai 2,5 bulan dan berat 150-250gram. Keuntungan penggunaan tikus putih galur wistar terutama yang masih muda (± 2 bulan) adalah pada umumnya mempunyai nafsu makan yang kuat dan masih dalam taraf pertumbuhan yang optimal, sedangkan kerugiannya adalah berat badannya relatif belum stabil dan sering menunjukkan fluktuatif. Secara hormonal tikus putih jantan lebih stabil dibandingkan dengan tikus putih betina karena tikus putih betina mengalami masa esterus dan masa bunting.

4.5.2. Alat dan Bahan Pembuatan Luka Terkontaminasi

Alat dan bahan yang diperlukan dalam pembuatan luka terkontaminasi adalah sebagai berikut:

- a. Pisau bedah (surgical blade)
- b. Pinset anatomis 2 buah
- c. Kassa
- d. Sarung tangan bersih
- e. Alat cukur
- f. Alkohol swab/ alkohol 70%
- g. Hypafix/plester
- h. Gunting
- i. Lidokain/agen anestesi lokal lain
- j. Aquades
- k. Spuit 3 mL
- l. Perlak
- m. Bengkok
- n. Penggaris dan Spidol
- o. Jas lab (Gaylene,2000)



4.5.3. Alat dan Bahan Perawatan Luka terkontaminasi

Alat dan bahan yang diperlukan dalam perawatan luka terkontaminasi adalah sebagai berikut :

- a. Bak steril yang berisi:
 - Sarung tangan steril
 - Kassa steril

- Pinset anatomis steril 2 buah
- b. Kom steril
- c. Ekstrak jahe emprit konsentrasi 5%, 20%, 35%
- d. *Normal saline 0,9%*
- e. *Povidone iodine 10%*
- f. *Betaine polyhexanide 0,1%*
- g. Bengkok
- h. Sarung tangan bersih
- i. Perlak
- j. Plester/hypafix
- k. Gunting
- l. Deeper/kapas
- m. Korentang dalam tempatnya
- n. Jas lab

4.5.4. Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstraksi Jahe Emprit

Alat dan bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak jahe berdasarkan standar pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang adalah sebagai berikut :

- a. Rimpang jahe emprit (*Zingiber Officinale var Amarum*)
- b. Ethanol 96%
- c. Vaseline
- d. Oven
- e. Gelas Erlenmeyer
- f. Botol hasil ekstrak
- g. Timbangan

- h. Corongan gelas
- i. Kertas saring (berukuran 30 mesh)
- j. Labu evaporator
- k. Labu penampung ethanol
- l. Evaporator
- m. Pendingin spiral/ rotary evaporator
- n. Selang water pump
- o. Water pump
- p. Water bath
- q. Vacuum pump
- r. Freezer

4.5.5. Alat dan Bahan Isolasi Bakteri dan Perhitungan Bakteri

1. Isolasi bakteri dengan metode *streaking plate*
 - a. Cawan petri
 - b. Tabung reaksi dan rak tabung
 - c. Lampu spiritus
 - d. Lidi cotton (lidi kapas)
 - e. Sarung tangan
 - f. Inkubator
 - g. *Normal saline 0,9%*
2. Perhitungan bakteri dengan *colony counter*
 - a. *Colony counter* merek Funke Gerber, type 8500, dilengkapi skala/kuadran.

4.5.6. Pemeliharaan dan Penimbangan Tikus

Alat dan bahan yang diperlukan untuk pemeliharaan dan penimbangan tikus adalah sebagai berikut :

- a. Kandang/bak tikus
- b. Penutup kandang dari anyaman kawat
- c. Botol air untuk minum
- d. Makanan tikus
- e. Timbangan sartorius
- f. Sekam
- g. Alas tidur
- h. Nomor kandang

4.6. Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No.	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Luka Terkontaminasi	Luka insisi sepanjang 2,5 cm dengan kedalaman sampai area subkutan yang dibuat pada punggung tikus tanpa menggunakan teknik steril, yaitu pisau bedah yang digunakan dipaparkan dengan udara terbuka selama 24 jam dan tidak disterilkan. Kemudian luka dibiarkan terpapar dengan udara terbuka selama 6 jam agar terjadi kontaminasi.	-	-

2.	Ekstrak etanolit jahe emprit	Bubuk jahe yang diekstrak dengan prosedur ekstrak dingin menggunakan etanol 96% untuk mendapatkan kandungan oleoresin, minyak atsiri, dan flavonoid dalam jahe yang kemudian digunakan sebagai bahan perawatan luka. Hasil ekstrak diperoleh dalam bentuk cair.	mL	Rasio
3.	Perawatan luka terkontaminasi menggunakan ekstrak etanolit jahe emprit dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 5%, 20%, 35%	Perawatan pada luka terkontaminasi dengan cara membersihkan luka dengan kassa yang telah dibasahi cairan NS 0,9%, sekali usap dari atas ke bawah. Kemudian luka dikeringkan dengan kassa steril dan diberi ekstrak jahe yang telah dicampur dengan vaseline menjadi konsentrasi 5%, 20%, 35%. Ekstrak dioleskan secara topikal sebanyak 50 mg sesuai kelompok perlakuan. Kemudian luka ditutup dengan kassa steril dan diplester. Masing masing kelompok dirawat 1x/hari sampai luka sembuh (luka menutup tanpa infeksi).	-	Nominal
4.	Perawatan luka terkontaminasi	Perawatan luka terkontaminasi pada kelompok kontrol dengan membersihkan luka dengan kassa yang telah dibasahi	-	Nominal

	menggunakan <i>Povidone iodine 10%</i>	cairan NS 0,9%, sekali usap dari atas ke bawah. Kemudian luka dikeringkan dengan kassa steril. Setelah kering luka ditetesi dengan <i>Povidone iodine 10%</i> sebanyak 0,5 cc yang diberikan dengan spuit 3 cc. Luka ditutup dengan kassa steril dan diplester. Perawatan luka dilakukan 1x/sehari sampai luka sembuh (luka menutup tanpa infeksi).		
5.	Perawatan luka terkontaminasi menggunakan <i>Betaine polyhexanide 0,1%</i>	Perawatan luka terkontaminasi pada kelompok kontrol dengan membersihkan luka dengan kassa yang telah dibasahi cairan NS 0,9%, sekali usap dari atas ke bawah. Kemudian luka dikeringkan dengan kassa steril. Setelah kering luka ditetesi <i>Betaine polyhexanide 0,1 %</i> dengan 0,5 cc yang diberikan dengan spuit 3 cc. Luka ditutup dengan kassa steril dan diplester. Perawatan luka dilakukan 1x/sehari sampai luka sembuh (luka menutup tanpa infeksi).	-	Nominal
6.	Penurunan jumlah koloni bakteri	Selisih antara jumlah koloni bakteri sebelum perlakuan (pretest) dan sesudah perlakuan (postest). Perhitungan jumlah koloni bakteri menggunakan <i>Colony</i>	CFU/plate	Rasio

		counter merek <i>Funke Gerber</i> , type 8500, dilengkapi skala/kuadran. Bakteri pada luka terkontaminasi adalah bakteri yang berasal dari paparan udara terbuka, tanpa diketahui jenis bakteri (bakteri secara umum).	
--	--	--	--

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Pembuatan Ekstrak Jahe

Jahe yang digunakan dalam penelitian ini adalah jahe emprit (*Zingiber Officinale Var Amarum*) yang didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu. Penelitian ini menggunakan metode ekstrak yang menggunakan pelarut etanol 96%. Sifat-sifat fisika etanol utamanya dipengaruhi oleh keberadaan gugus hidroksil dan pendeknya rantai karbon etanol. Gugus hidroksil dapat berpartisipasi ke dalam ikatan hidrogen, sehingga membuatnya cair dan lebih sulit menguap daripada senyawa organik lainnya dengan massa molekul yang sama. Hal ini menyebabkan titik didih etanol 96% cukup tinggi yaitu 78,1⁰C (Pavia dkk, 2007).

Proses evaporasi dalam pembuatan ekstrak jahe emprit ini bertujuan memisahkan zat-zat aktif dengan pelarutnya. Oleh karena itu dibutuhkan suhu yang lebih tinggi dari titik didih pelarut agar dapat menguapkan etanol 96%. Karena titik didih etanol 78,1⁰C, maka suhu yang diperlukan untuk proses evaporasi ini minimal sebesar 78,1⁰C. Sedangkan titik didih minyak asiri yang merupakan volatile oil (minyak yang mudah menguap) sebesar 34⁰C pada tekanan 14 mm (Paimin dkk, 2007). Hal ini menyebabkan minyak asiri hilang

(menguap) selama proses evaporasi. Akibatnya, efek antimikroba dari ekstrak jahe emprit diambil alih oleh oleoresin yang memiliki sifat tidak mudah menguap.

Prosedur pembuatan ekstrak jahe emprit ini mengikuti standar pembuatan ekstrak yang ada di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang meliputi beberapa tahap sebagai berikut :

a. Proses pengeringan

- 1) Mencuci bersih rimpang jahe.
- 2) Memotong tipis rimpang jahe .
- 3) Mengeringkan jahe dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

b. Proses ekstraksi

- 1) Setelah jahe kering, menghaluskan jahe dengan blender sampai halus.
- 2) Menyaring jahe yang sudah dihaluskan dengan saringan ukuran 30 mesh (Wresdiyati, 2003).
- 3) Menimbang sampel kering (bubuk jahe) sebanyak 100 gram.
- 4) Memasukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 5) Merendam dengan etanol sampai volume 900 ml.
- 6) Mengocok bubuk jahe yang direndam dengan etanol sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
- 7) Mendinginkan 1 malam sampai mengendap.

c. Proses evaporasi

- 1) Mengambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif.
- 2) Memasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter.
- 3) Memasang labu evaporasi pada evaporator.

- 4) Mengisi water bath dengan air sampai penuh.
- 5) Memasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90°C), kemudian menyambungkan dengan aliran listrik.
- 6) Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- 7) Menunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- 8) Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari bahan alam kering.
- 9) Memasukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik/kaca.
- 10) Menyimpan dalam freezer.

4.7.2. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Jahe

Pembuatan stok ekstrak jahe emprit menjadi konsentrasi yang diinginkan dilakukan dengan menambahkan vaselin yang dihitung menggunakan rumus :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 = \frac{(V_2 \times N_2)}{N_1}$$

Keterangan:

N_1 : konsentrasi awal

N_2 : konsentrasi akhir (konsentrasi yang diinginkan)

V_1 : berat awal

V_2 : berat akhir

Pada penelitian ini jumlah ekstrak (V_1) yang dibutuhkan untuk dicampur dengan vaselin agar menjadi konsentrasi yang diinginkan adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi 5%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 4.200 \text{ mg} \times 5\%$$

$$V_1 = 210 \text{ mg}$$

Mencampur 210 mg ekstrak etanolit jahe dengan vaseline 3.990 mg.

2. Konsentrasi 20%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 4.200 \text{ mg} \times 20\%$$

$$V_1 = 840 \text{ mg}$$

Mencampur 840 mg ekstrak etanolit jahe dengan vaseline 3.360 mg.

3. Konsentrasi 35%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 4.200 \text{ mg} \times 35\%$$

$$V_1 = 1.470 \text{ mg}$$

Mencampur 1.470 mg ekstrak etanolit jahe dengan vaseline 2.730 mg.

4.7.3. Pembagian Kelompok Tikus

Pembagian kelompok tikus dilakukan pada tikus yang sudah memenuhi kriteria inklusi dalam penelitian. Pembagian kelompok tikus dilakukan secara *simple random sampling*, tikus dibagi dalam lima kelompok yaitu tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol. Tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberikan ekstrak etanolit jahe emprit konsentrasi 5%, 20% dan 35%. Dua kelompok kontrol yaitu kelompok yang dirawat dengan *povidone iodine 10%* dan kelompok yang dirawat dengan *betaine polyhexanide 0,1%*.

4.7.4. Pembuatan Luka Terkontaminasi

Cara pembuatan luka terkontaminasi dengan menggunakan metode insisi adalah sebagai berikut :

- 1) Memasang perlak di bawah tubuh tikus yang akan dibuat luka.
- 2) Menentukan area yang akan dibuat luka terkontaminasi yaitu pada daerah punggung kanan tikus.
- 3) Menghilangkan bulu tikus dengan cara mencukurnya menggunakan alat cukur seluas 5 x 3 cm disekitar area kulit yang akan dibuat insisi.
- 4) Membuat tanda sepanjang 2,5 cm pada punggung tikus yang sudah dicukur menggunakan spidol dan penggaris.
- 5) Mencuci tangan dan memakai sarung tangan bersih.
- 6) Mendesinfeksi kulit yang akan di insisi menggunakan alkohol swab.
- 7) Melakukan anestesi di area kulit yang akan dibuat insisi dengan menyuntikkan lidocain 0,5 cc secara IM menggunakan spuit 3 cc.
- 8) Melakukan penyayatan kulit pada punggung kanan tikus tanpa teknik steril dengan menggunakan pisau bedah dengan panjang luka 2,5 cm dan kedalaman 0,5 cm (sampai subkutan).
- 9) Membersihkan darah dan serum yang keluar dari luka dengan kassa yang sudah diberi NaCl 0,9%.
- 10) Membiarkan luka selama 6 jam dan setiap jam tikus dipindahkan dari satu tempat ke tempat lain dalam ruangan untuk mendapatkan kesempatan terpapar udara yang sama antara satu tikus dengan tikus yang lain.
- 11) Melepas sarung tangan
- 12) Merapikan alat dan mencuci tangan (Gaylene, 2000)

4.7.5. Pembuatan Kultur Bakteri dengan Metode *Streak Plate*

- 1) Mempersiapkan cawan petri, tabung reaksi beserta rak tabung.
- 2) Menuangkan *Normal salin 0,9%* ke dalam tabung reaksi.
- 3) Mencuci tangan dan memakai sarung tangan bersih.
- 4) Memanaskan sebentar lidi kapas diatas lampu spiritus.
- 5) Melakukan swab luka tikus dengan lidi kapas.
- 6) Memasukkan lidi kapas ke dalam tabung reaksi.
- 7) Menggoreskan lidi kapas ke atas cawan petri di daerah sektor 0 disusul gerakan ke tepi luar sektor 1 lalu kembali ke sektor 0. Lakukan bolak-balik sebanyak 3 kali. Kemudian selesaikan penggoresan di sektor I tanpa menyentuh sektor 0 kembali hingga seluruh permukaan sektor I penuh goresan yang tidak bertumpang tindih.
- 8) Memutar cawan petri hingga sektor I berada di sebelah kiri. Mengulangi kegiatan 7 untuk sektor II dan III.
- 9) Membungkus cawan petri dengan *plastik wrap*.
- 10) Melakukan inkubasi pada inkubator dengan suhu 37° c, selama 18 – 24 jam.
- 11) Menghitung koloni yang tumbuh pada jalur goresan di masing-masing sektor dengan menggunakan *colony counter*.

4.7.6. Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri dengan *Colony Counter*

- 1) Menghubungkan stop kontak dengan sumber tenaga.
- 2) Menyalakan alat dengan menekan tombol 'ON'.
- 3) Mereset jumlah perhitungan hingga menunjuk angka '0'.
- 4) Meletakkan cawan petri yang berisi koloni bakteri yang akan dihitung di atas meja yang dilengkapi dengan skala.

- 5) Melihat koloni dengan bantuan kaca pembesar.
- 6) Mengamati pertumbuhan koloni pada cawan petri secara subjektif apakah koloni sangat banyak atau tidak.
- 7) Apabila sangat banyak maka dipilih 5 kotak yang mewakili masing-masing cawan petri. Jumlah koloni yang didapatkan dari 5 kotak tersebut dijumlahkan, kemudian dibagi 5 dan dikalikan dengan luas cawan petri.
- 8) Apabila dalam satu cawan petri tidak terlalu banyak bakteri yang tumbuh, maka semua koloni bakteri dapat langsung dihitung dengan cara menandai koloni dengan mengarahkan pulpen ke meja skala.
- 9) Mematikan alat dengan menekan tombol 'OFF'.
(Instruksi kerja pemakaian *colony counter*, 2012)

4.7.7. Perawatan Luka Terkontaminasi

Perawatan luka dilakukan dengan menggunakan teknik aseptik, yaitu:

- 1) Menyiapkan peralatan untuk perawatan luka.
- 2) Mencuci tangan dan memakai sarung tangan bersih.
- 3) Membuka pembungkus dan penutup steril dengan korentang.
- 4) Menuangkan NaCl 0,9% dan povidone iodine 10% dalam kom steril yang berbeda.
- 5) Menyiapkan *Betaine polyhexanide 0,1%*.
- 6) Menyiapkan ekstrak etanolit jahe emprit konsentrasi 5%, 20% dan 35%.
- 7) Menempatkan perlak di bawah tikus.
- 8) Mengatur posisi tikus senyaman mungkin.
- 9) Menempatkan bengkok di dekat area luka yang akan dirawat.
- 10) Membuka bagian pinggir perekat dengan alkohol swab.

- 11) Membuka seluruh balutan dengan cara menggulung ke arah dalam dari proksimal ke distal dengan pinset.
- 12) Membuang balutan kotor ke dalam bengkok.
- 13) Memakai sarung tangan steril.
- 14) Mengkaji luka : inspeksi adanya kemerahan, tanda penyatuan jaringan, edema, adanya pus, atau cairan lain dan kaji warna serta bau.
- 15) Mengambil kassa steril yang telah dibasahi NaCl 0,9% dari kom steril.
- 16) Membersihkan luka dengan kassa dan NaCl 0,9% dari atas ke bawah. Bersihkan dengan menggunakan kassa steril sekali usap langsung buang ke bengkok.
- 17) Mengeringkan luka dengan kassa steril kering dengan gerakan yang sama dan satu kassa untuk sekali pengeringan
- 18) Memberikan ekstrak jahe emprit sebanyak 50 mg pada kelompok perlakuan sesuai konsentrasi yang telah ditentukan pada tiap kelompok perlakuan dengan konsentrasi 5%, 20% dan 35%, kelompok kontrol yang dirawat dengan *povidone iodine 10%* sebanyak 0,5 cc dan kelompok kontrol yang dirawat dengan *betaine polyhexanide 0,1%* sebanyak 0,5 cc.
- 19) Menutup luka dengan kassa steril dan plester.
- 20) Melepaskan sarung tangan, merapikan alat dan mencuci tangan.
- 21) Luka tikus di kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol dirawat hingga sembuh kemudian tikus dikembalikan ke habitat asalnya.

4.7.8. Teknik Sterilisasi

Sterilisasi set rawat luka menggunakan autoklaf suhu 160-170°C. Teknik sterilisasi yang digunakan yaitu teknik panas kering untuk peralatan logam dan untuk peralatan non logam menggunakan teknik ionisasi. Sebelum memasukkan

ke dalam autoklaf, peralatan logam direndam pada cairan savlon yang telah diencerkan dengan NS 0,9% dengan perbandingan 1:9. Perendaman dilakukan selama 30 menit, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tissue dan memasukkan ke dalam autoklaf bagian bawah dan untuk peralatan non logam diletakkan pada bagian atas autoklaf.

4.7.9. Prosedur Pemeliharaan dan Penimbangan Tikus

Adapun prosedur pemeliharaan dan penimbangan tikus yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1) Penandaan tikus

Untuk menghindari kesalahan dalam penilaian penyembuhan luka pada tikus, maka masing-masing tikus harus diberi tanda yang tidak mudah hilang. Dalam penelitian ini, penandaan dilakukan dengan cara memberi nama jenis perlakuan pada kandang tikus.

2) Tempat perawatan tikus

Kandang tempat perawatan tikus dalam penelitian ini terbuat dari bahan plastik yang tebal karena bahan ini cukup kuat, tidak mudah rusak, dan mudah dibersihkan. Kandang dilengkapi dengan penutup yang terbuat dari anyaman kawat agar tikus tidak mudah lepas. Ukuran kandang untuk setiap tikus adalah sama dan diberi sekam. Sekam diganti setiap 3 hari sekali agar tetap kering, tidak lembab. Satu kandang ditempati oleh satu ekor tikus supaya tikus tidak berkelahi dan tidak menimbulkan luka baru.

3) Nutrisi tikus

Tikus diberikan makanan dengan jumlah dan frekuensi yang sama setiap hari. Makanan tikus berupa pars yang dicampur dengan terigu sebanyak 40

gram/hari. Minuman tikus diletakkan dalam botol yang berada di dalam kandang. Air minum tikus adalah air aqua/air matang.

4) Penimbangan tikus

Pengukuran berat badan tikus menggunakan alat penimbang sartorius yang dilakukan sebelum dan selama eksperimen dilakukan.

4.8. Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan sebelum perlakuan (*pretest*) berupa metode *swab* yang dilakukan 6 jam setelah pembuatan luka terkontaminasi, kemudian di *streaking* pada NAP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Setelah diinkubasi dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan *Colony counter* merk Funke Gerber, type 8500, dilengkapi skala/kuadran. Pengumpulan data *posttest* dilakukan setelah 3x24 jam perawatan luka yang pertama (hari ke-3) dengan cara yang sama seperti *pretest*.

4.9. Analisa Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini adalah *One way ANOVA* menggunakan program *SPSS for windows. (Analysis of Variance)* dengan menggunakan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dengan menggunakan software *SPSS Statistics 12 for Windows*. Uji statistik *One Way ANOVA* merupakan suatu uji statistik inferensial parametrik yang memungkinkan peneliti dapat membandingkan dua atau lebih data mean dari masing-masing kelompok.

Menurut Dahlan (2009), uji hipotesis ANOVA mempersyaratkan beberapa hal yang harus dipenuhi sebelum melakukan pengujian, yaitu :

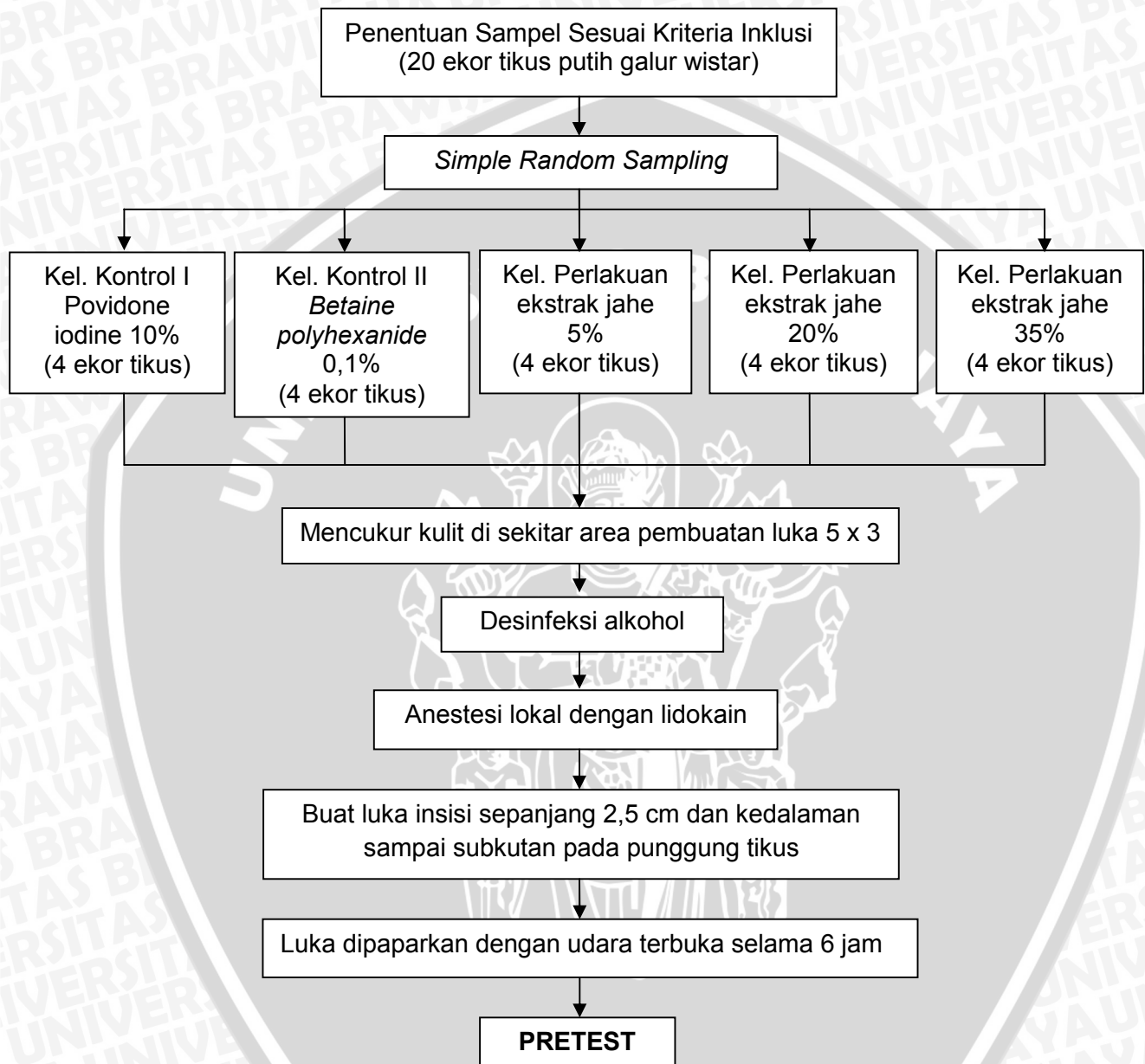
1. Skala variabel yang diukur minimal interval.

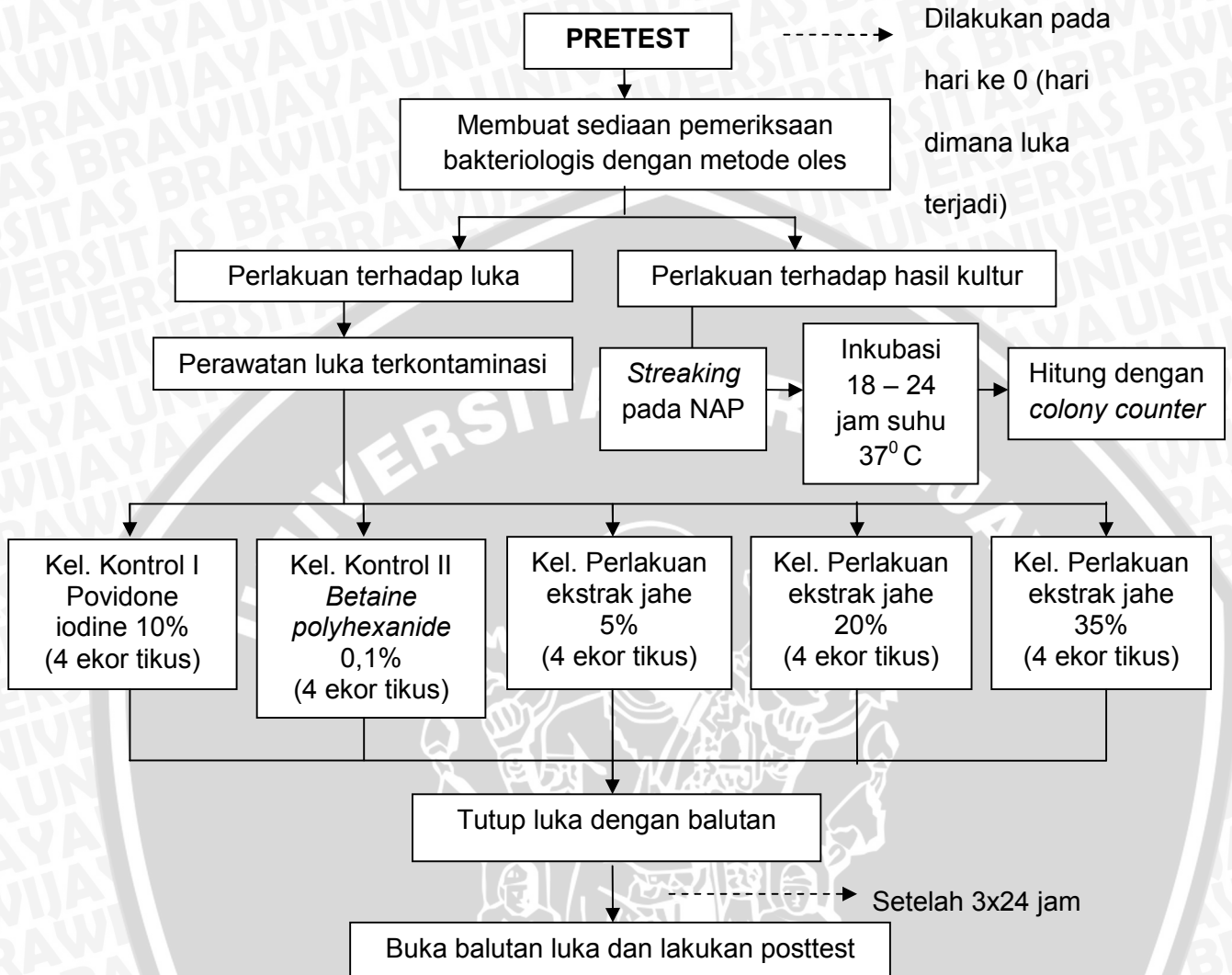
2. Distribusi data normal (*Kolmogorov-sminov test / Shapiro-wilk test*, normal jika $p > 0,05$).
3. Varians data homogen (*test homogeneity of variences*, normal jika $p > 0,05$).
4. Percobaan bersifat random dan bebas.

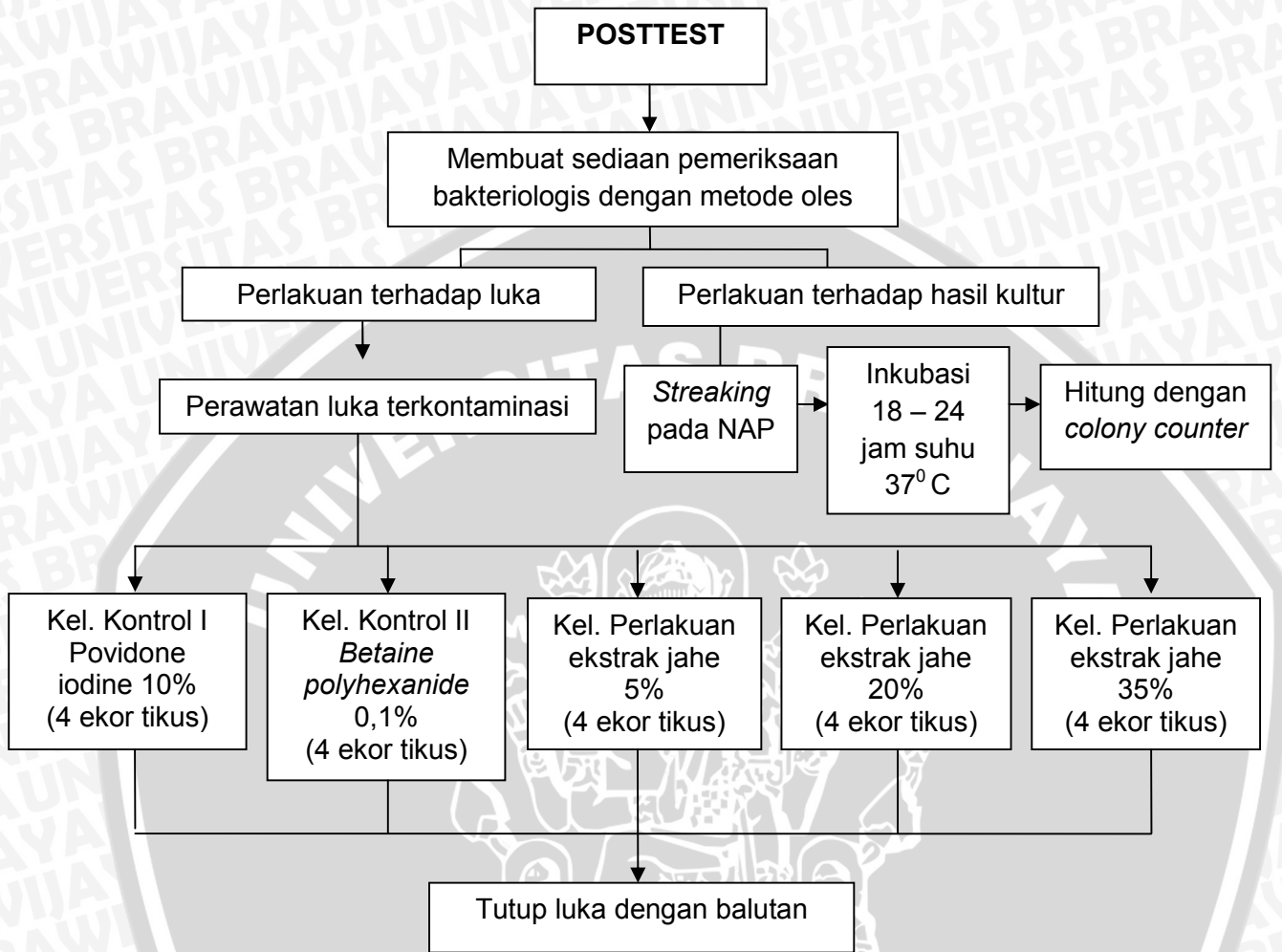
Untuk mengetahui pengujian apakah data sampel penelitian merupakan jenis distribusi normal, maka digunakan pengujian *Shapiro-wilk test* terhadap masing-masing variabel. Jika angka signifikansi *p value* $> 0,05$, maka data berdistribusi normal. Sebaliknya jika angka signifikansi *p value* $< 0,05$, maka data tidak berdistribusi normal.

Setelah terbukti bahwa data berdistribusi normal, kemudian dilakukan uji homogenitas. Untuk mengetahui apakah data homogen atau tidak, digunakan *Test of Homogeneity of Variances*. Selanjutnya dilakukan pengujian *One Way ANOVA*. Setelah itu dilakukan uji *Post Hoc Test* atau *Turkey HSD* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki rata-rata sama atau berbeda secara signifikan (Dahlan, 2004). Setelah uji *post hoc Tukey HSD* digunakan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui besarnya hubungan dari pemberian ekstrak jahe emprit terhadap penurunan jumlah koloni bakteri.

4.10. Alur Kerja Penelitian







Bagan 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.11. Kode Etik Penelitian

Dalam penelitian kesehatan, seorang peneliti harus selalu menghormati dan melindungi kehidupan, kesehatan, kesejahteraan dan penanganan secara manusiawi, termasuk terhadap hewan coba. Oleh sebab itu, sebelum penelitian dilakukan, peneliti melakukan permohonan lolos uji etik (*ethical clearance*) kepada panitia etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Disamping permohonan lolos uji etik, dalam memanfaatkan hewan percobaan untuk penelitian kesehatan peneliti juga mempertimbangkan prinsip-prinsip etik penelitian yang merujuk pada 3R, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Polit dan Hungler, 1999).

1) *Replacement*

Ada dua alternatif untuk replacement, yaitu:

- a) *Replacement relatif*, yaitu menggunakan sel, jaringan, atau organ dari hewan vertebrata yang dimatikan secara manusiawi.
- b) *Replacement absolut*, yaitu tidak memerlukan bahan dari hewan, melainkan memanfaatkan galur sel (*cell lines*) atau program komputer.

2) *Reduction*

Mengurangi pemanfaatan jumlah hewan percobaan sehingga sesedikit mungkin dengan bantuan ilmu statistik, program komputer, dan teknik-teknik biokimia serta tidak mengurangi penelitian dengan hewan percobaan apabila tidak perlu.

3) *Refinement*

Mengurangi ketidaknyamanan yang diderita oleh hewan percobaan sebelum, selama, dan setelah penelitian, misalnya dengan pemberian analgesik.

Pada penelitian ini, peneliti melakukan penelitian terhadap 20 ekor tikus putih galur wistar yang mana jumlah tikus tersebut telah dihitung dan disesuaikan dengan jumlah perlakuan. Sebelum pembuatan luka terkontaminasi pada tikus diberikan anestesi lokal dengan lidokain yang bertujuan untuk mengurangi rasa nyeri pada tikus. Perdarahan pada saat pembuatan luka terkontaminasi diatasi dengan cara melakukan penekanan langsung pada lokasi perdarahan dengan menggunakan kassa sampai perdarahan berhenti. Selama proses penyembuhan luka, risiko infeksi dapat terjadi. Oleh sebab itu, untuk mencegah terjadinya infeksi selama proses penyembuhan, balutan luka harus diinspeksi dan diganti setiap hari.

