

## BAB III

### SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek Penelitian, Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar*. Tikus yang akan diteliti berumur sekitar 2-3 bulan dan berat badan 200-250 gram.

##### 3.1.2 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* dengan jenis kelamin jantan berumur 2 - 3 bulan
- b. Berat badan tikus 200-250 gram
- c. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif.

##### 3.1.3 Kriteria Eksklusi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* yang sakit yaitu berat badan selama adaptasi mengalami perubahan lebih dari 10% dan secara visual menunjukkan perilaku yang tidak normal.<sup>25</sup>

#### 3.2 Metode Penelitian

##### 3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) secara *in vivo* pada tikus putih jantan *Wistar*.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

#### A. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: konsentrasi larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*).
2. Variabel Terikat: waktu penyembuhan luka.
3. Variabel Terkendali :
  - a. Spesies tikus
  - b. Jenis kelamin tikus
  - c. Umur tikus
  - d. Berat badan tikus
  - e. Makanan standar tikus
  - f. Panjang dan kedalaman insisi.

#### B. Definisi Operasional

**Table 3.1 Tabel Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Konsentrasi larutan ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle L.</i> )	Hasil ekstraksi daun sirih hijau dengan etanol dan pelarut <i>carboxymethyl cellulose</i> (CMC) menjadi konsentrasi 10%, 20%, 40% sesuai ketentuan Farmakope Indonesia.	Gelas ukur	Mililiter	Skala numerik

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
2	Waktu penyembuhan luka	Hari yang diperlukan setelah pemberian perlakuan pertama pada subjek hingga terbentuknya jaringan pada area perlukaan dan panjang sisa luka akibat insisi 0 cm	Kalender	Hari	Skala numerik
3	Luka sembuh	Terbentuknya jaringan pada area perlukaan dan panjang luka menjadi 0 cm			
4	Spesies tikus	Spesies tikus yang digunakan adalah tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) galur Wistar			
5	Jenis kelamin tikus	Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus putih jantan			
6	Umur tikus	Umur tikus pada penelitian ini adalah antara 2-3 bulan			
7	Berat badan tikus	Berat badan tikus pada penelitian ini adalah antara 200-250 gram	Timbangan	Gram	Skala numerik
8	Makanan standar tikus	Pakan tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah makanan dengan komposisi tinggi lemak dan protein	Timbangan	Gram	Skala numerik
9	Panjang dan kedalaman insisi	Panjang dan kedalaman perlukaan yang dibuat pada tikus dengan menggunakan pisau bedah masing-masing 2,5 cm dan 2 mm	Penggaris	Milimeter	Skala numerik

### 3.2.3 Prosedur Penelitian

#### 3.2.3.1 Instrumen Penelitian

##### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Ohaus*), pisau bedah ukuran 11 yang telah diberi tanda sesuai dengan kedalaman luka yang dibutuhkan (2 mm), *syringe*, gelas ukur, dan penggaris yang telah diberi pembatas pada kedua sisi sesuai dengan panjang luka yang dibutuhkan (2,5 cm).

##### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%, *povidone iodine* 10%, *carboxymethyl cellulose* (CMC), *ketamine*, alkohol 70% dan tikus putih jantan galur *Wistar* (*Rattus norvegicus*).

#### 3.2.3.2 Jalannya Penelitian

##### 1. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)

Pembuatan larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) pada penelitian ini menggunakan metode yang telah dijelaskan dalam Farmakope Indonesia edisi V. Sebelumnya, daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang akan digunakan harus dipilih sesuai dengan kriteria, yaitu tidak rusak, tidak menguning dan tidak busuk. Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang masuk ke dalam kriteria selanjutnya dicuci hingga bersih dengan menggunakan air yang mengalir, lalu

dikeringkan. Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) kering sebanyak satu kilogram dihaluskan dengan cara di blender hingga menjadi serbuk. Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang sudah halus direndam pada etanol 95% selama 24 jam. Dimana, untuk konsentrasi 10% dibutuhkan 1 gram ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang direndam bersama 10 ml *carboxymethyl cellulose* (CMC). Setelah itu ekstrak disaring untuk mengeluarkan etanol. Etanol tersebut diuapkan hingga mengental dan dikeringkan pada suhu 60° sampai 70° celcius. Pembuatan larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dengan konsentrasi 20% dan 40% menggunakan prinsip yang sama.

2. Pembagian Kelompok Uji dan Besar Sampel per-Kelompok

Pada penelitian ini, tikus putih jantan *Wistar* ditimbang terlebih dahulu sehingga berat tikus sesuai dengan kriteria inklusi dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, yaitu dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Pembagian kelompok dan perlakuan seperti yang bisa dilihat pada **Tabel 3.2**

**Tabel 3.2 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Hewan Uji**

Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol negatif, luka diaplikasikan <i>carboxymethyl cellulose</i> (CMC).
II	Kontrol positif, luka diaplikasikan <i>povidone iodine</i> 10%.
III	Luka diaplikasikan larutan ekstrak etanol sirih hijau ( <i>Piper betle L.</i> ) secara topikal dengan konsentrasi 10%.
IV	Luka diaplikasikan larutan ekstrak etanol sirih hijau ( <i>Piper betle L.</i> ) secara topikal dengan konsentrasi 20%..
V	Luka diaplikasikan larutan ekstrak etanol sirih hijau ( <i>Piper betle L.</i> ) secara topikal dengan konsentrasi 40%.

Besar sampel per kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer:

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Untuk mengantisipasi *drop out* selama penelitian berlangsung, maka ditambahkan masing-masing 1 ekor setiap kelompok menjadi 6 ekor per kelompok sehingga total menjadi 30 ekor.

### 3. Perlukaan Pada Hewan Uji

Cara pembuatan luka menurut metode Erlich dan Hunt<sup>8</sup> yang telah dimodifikasi, yaitu sebagai berikut:

- a. Tikus disuntikkan *ketamine*, obat golongan anastesi, melalui subkutan dengan dosis 120 mg/Kg BB (24-30 mg)
- b. Tikus dicukur rambutnya di daerah punggung bagian atas
- c. Daerah punggung bagian atas dan sekitarnya yang telah dicukur kemudian dibersihkan dengan alkohol 70%

- d. Dibuat luka sayat sepanjang 2,5 cm dengan kedalaman 2 mm mencapai subkutan menggunakan pisau bedah.

#### 4. Pemberian Perlakuan

Pemberian perlakuan dilakukan segera setelah pembuatan luka dilakukan dengan meneteskan bahan uji yaitu *carboxymethyl cellulose* (CMC), *povidone iodine* 10% dan larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) pada daerah luka dan dibiarkan hingga kering. Pemberian perlakuan dilakukan satu kali setiap hari.

#### 5. Pengamatan dan Pengumpulan Data Pengaruh Perlakuan

Pengukuran penyembuhan luka dilakukan satu hari setelah pembuatan luka dan bahan uji diberikan (hari ke - 0). Pengamatan waktu penyembuhan luka adalah sejak hari ke - 1 (sehari setelah pemberian bahan uji) sampai dengan hari ke - 14 atau panjang luka sayat adalah 0 cm yang diukur dengan menggunakan penggaris dan keadaan luka yang telah kering.

### 3.2.4 Tempat dan Waktu Penelitian

#### a. Tempat

Pembuatan dan penelitian larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi & Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

## b. Waktu

Waktu penelitian dapat dilihat pada **Tabel 3.3** berikut

**Tabel 3.3 Waktu Penelitian**

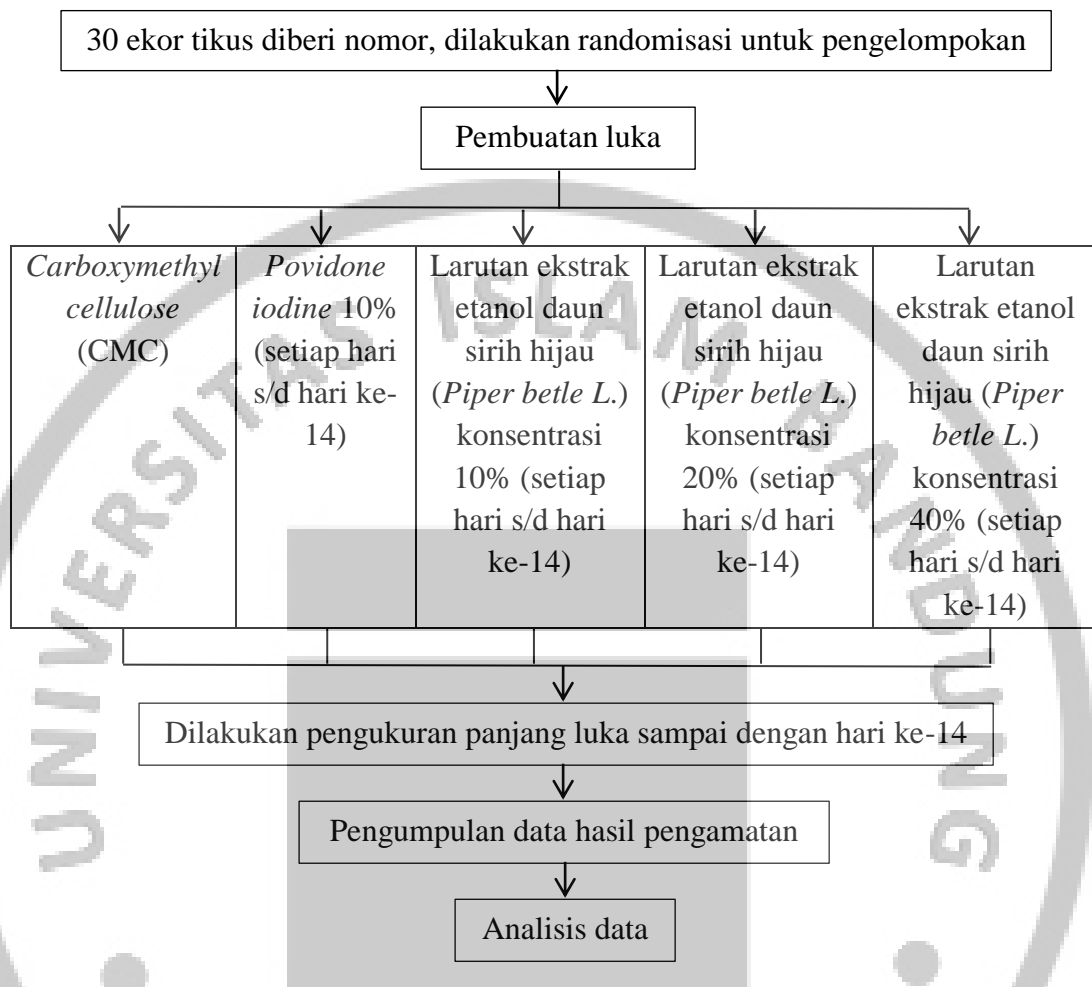
Keterangan	Des	Jan	Feb	Maret	April	Mei	Juni
Persiapan							
Pelaksanaan							
Pelaporan							

### 3.2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro- Wilk* dan homogenitas *Levene*. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji analisis varians satu arah (*ANOVA*) untuk melihat adanya pengaruh pemberian larutan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap penyembuhan luka.



### 3.2.6 Alur Penelitian



**Gambar 3.1** Bagan Alur Penelitian

### 3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Penderitaan hewan coba untuk kebaikan manusia akan dijamin kesejahteraan dan diperlakukan secara baik serta menggunakan prinsip *replacement, reduction* dan *refinement*.

a. *Replacement*

Penelitian menggunakan tikus putih galur *Wistar* dikarenakan memiliki ukuran badan yang lebih besar dengan rasio badan lebih tinggi dibanding ekor sehingga memudahkan untuk dilakukan pembuatan luka dan penilaian terhadap penyembuhan luka. Pemilihan tikus putih galur *Wistar* dibandingkan tikus putih galur *Sprague-Dawley* adalah untuk membantu peneliti dalam kriteria inklusi. Tikus putih galur *Wistar* lebih aktif bila dibandingkan dengan tikus putih galur *Sprague-Dawley*. Pemilihan tikus putih jantan dikarenakan tikus putih jantan memiliki sistem imun yang lebih baik dan untuk menghindari tikus betina yang sedang hamil.<sup>26,27</sup>

b. *Reduction*

Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian telah dihitung dengan menggunakan rumus Federer sehingga penggunaan tikus pada penelitian ini efisien dan efektif

c. *Refinement*

Sebelum dilakukan pembuatan luka, tikus diberi anastesi terlebih dahulu dengan menggunakan ketamine yang disuntikkan melalui subkutan. Tikus kelompok kontrol setelah dilakukan penelitian akan diberi perawatan sesuai standar.

*Ethical clearance* pada hewan uji yang digunakan pada penelitian ini telah diurus ke Komite Etik Penelitian.