

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 atau mati saat penelitian.

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 infusa sirih merah (*Piper cf. fragile*, Benth.)
2. Variabel Terikat: waktu penyembuhan luka insisi
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

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Konsentrasi infusa sirih merah	Hasil rebusan daun sirih merah dengan pelarut air sesuai ketentuan Farmakope Indonesia sebesar 10%, 20%, 40%	Gelas ukur	Mililiter	Skala numerik
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	Penggaris	Sentimeter	Skala numerik

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
4	Spesies tikus	Spesies tikus yang digunakan adalah tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) galur <i>Wistar</i>			
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*), satu set peralatan bedah, *syringe*, gelas ukur, penggaris, kompor listrik.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah infusa daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%, *povidone iodine* 10%, akuades steril, *ketamine*, alkohol 70% dan tikus putih jantan galur *Wistar* (*Rattus norvegicus*).

3.2.3.2 Jalannya Penelitian

1. Pembuatan infusa sirih merah

Pembuatan infusa sirih merah menggunakan metode yang dijelaskan di dalam Farmakope Indonesia edisi IV.³¹ Sebelumnya, daun sirih merah yang akan digunakan harus dipilih sesuai dengan kriteria, yaitu tidak rusak, tidak menguning dan tidak busuk. Daun sirih merah yang masuk dalam kriteria selanjutnya dicuci hingga bersih dengan menggunakan air yang mengalir, lalu dikeringkan. Daun sirih merah yang telah kering kemudian dihaluskan dengan cara di blender hingga menjadi serbuk.

Untuk membuat infusa sirih merah dengan konsentrasi 10%, serbuk sirih merah sebanyak 10 gr ditambahkan akuades steril sebanyak 100 ml. Selanjutnya campuran serbuk sirih merah dan akuades steril direbus selama 15 menit terhitung saat suhu 90⁰C dengan sesekali diaduk. Setelah dingin, larutan disaring dan volumenya dicukupkan menjadi 100 ml dengan ditambahkan akuades. Pembuatan infusa sirih merah 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 akuades steril pada daerah perdarahan
II	Kontrol positif, luka diaplikasikan <i>povidone iodine</i> 10% pada daerah perdarahan.
III	Luka diaplikasikan infusa sirih merah secara topikal dengan konsentrasi 10% pada daerah perdarahan.
IV	Luka diaplikasikan infusa sirih merah secara topikal dengan konsentrasi 20% pada daerah perdarahan.
V	Luka diaplikasikan infusa sirih merah secara topikal dengan konsentrasi 40% pada daerah perdarahan

Besar sampel per kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer: $(n - 1)(t - 1) = 15$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

$$(n - 1)(t - 1) = 15$$

$$(n - 1)(5 - 1) = 15$$

$$(n - 1)(4) = 15$$

$$4n - 4 = 15$$

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

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 Hunt³² yang telah dimodifikasi, yaitu sebagai berikut:

- a. Tikus disuntikkan *ketamine*, obat golongan anastesi, melalui subkutan dengan dosis 120 mg/Kg BB
- 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 insisi 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 akuades steril, *povidone iodine* 10% dan infusa sirih merah 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 insisi adalah 0 cm yang diukur dengan menggunakan penggaris.

3.2.4 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat

Pembuatan infusa sirih merah dan penelitian 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 Aspek Etik Penelitian

Penderitaan hewan coba untuk kebaikan manusia akan dijamin kesejahteraan dan diperlakukan secara manusiawi 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.

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*

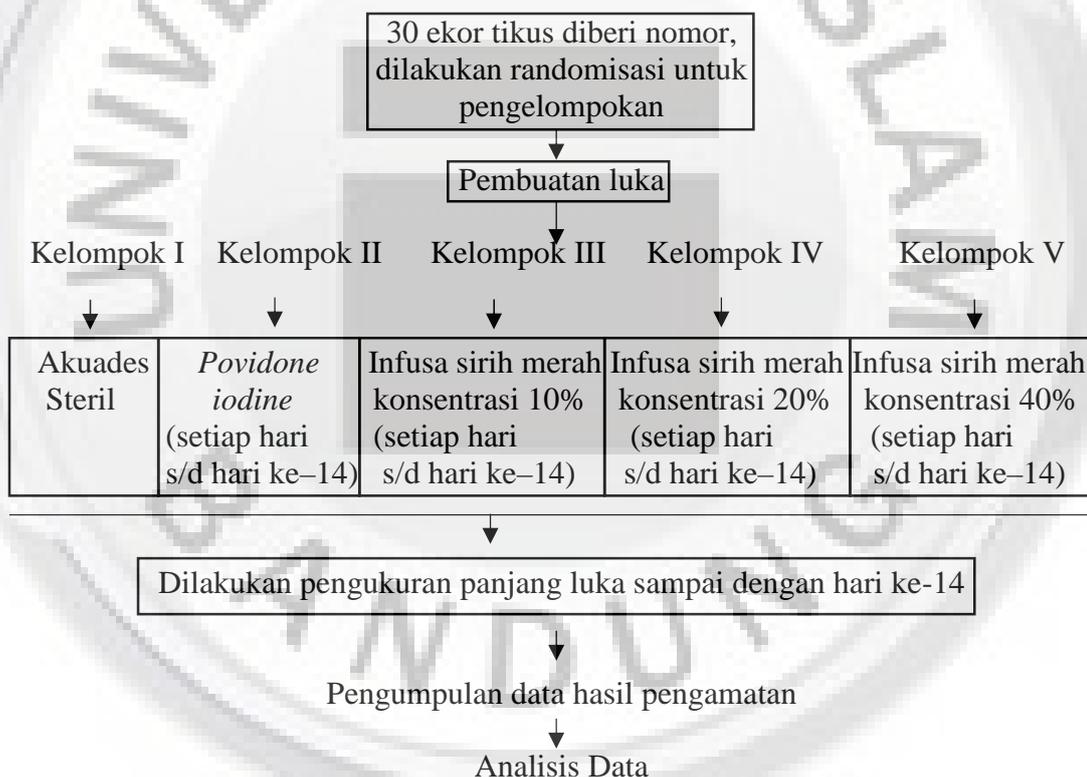
Sebelum dilakukan pembuatan luka, tikus diberi anastesi terlebih dahulu dengan menggunakan ketamine yang disuntikkan melalui subkutan. Tikus kelompok kontrol setelah dilakukan penelitian akan diberi perawatan sesuai standar.

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

3.2.6 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 infusa daun sirih merah terhadap penyembuhan luka.

3.2.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian