

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Subjek Penelitian, Alat, Bahan

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, umur berkisar 2 bulan dengan berat badan berkisar 180-200 gram dan kelamin jantan yang didapat dari Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Teknologi Bandung (ITB).

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Kandang dan tempat makanan tikus

Kandang dan tempat makan tikus disediakan untuk menyimpan tikus yang nanti akan digunakan untuk percobaan dan tempat makanan untuk menyimpan makanan tikus yaitu pelet dan gabah.

2. Timbangan digital acs skala 0-600 gram

Timbangan disediakan untuk menimbang berat badan dari tikus yang masuk dalam kriteria percobaan.

3. Sarung tangan

Sarung tangan disediakan sebagai proteksi diri dari agen-agen yang dapat membahayakan tubuh.

4. Pisau cukur

Disediakan untuk menyayat bagian punggung tikus.

5. Gunting

Disediakan untuk mencukur bagian bulu rambut dari tikus.

6. Kamera

Disediakan untuk dokumentasi.

7. Kapas iodine

Disediakan sebagai bahan antiseptic sebelum dilakukan penyuntikan dan penyayatan.

8. Botol plastik

Disediakan untuk menyimpan ekstrak etanol daun cocor bebek yang akan diberikan pada tikus.

9. Cotton bud

Disediakan untuk pemberian ekstrak etanol daun cocor bebek terhadap hewan percobaan.

10. Alat tulis

Untuk mencatat perubahan hasil dari setiap hewan uji.

### 3.1.3 Bahan

Bahan penelitian terdiri dari :

1. Ekstrak cocor bebek (*Kalanchoe pinnata [Lam] Pers.*)

Daun cocor bebek diambil dari Pusat Perkebunan Tanaman Obat Manaco Lembang, Jawa Barat. Daun cocor bebek yang diambil yaitu daun cocor bebek yang berwarna hijau muda, daunnya yang tebal serta mengandung banyak air dengan ukuran yang sama dengan tinggi  $\pm$  1-2 m batang tegak, lunak dan pangkalnya berkayu dengan bentuk membulat.

2. Tikus putih jantan galur Wistar

Hewan yang akan dijadikan penelitian.

3. Povidone iodine 10% (Betadine)

Disediakan sebagai kontrol positif.

4. Ketamin

Obat anastesi yang digunakan untuk manusia dan hewan.

Dosis yang diberikan 0,3 cc dalam 100 mg.

5. Makanan standar tikus

Makanan standar tikus yaitu berupa pelet, gabah, dan air minum.

### 3.1.4 Sampel Penelitian

#### 3.1.4.1 Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federrer:  $(n - 1)(t - 1) \geq 15$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah variabel

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \Rightarrow \text{dengan pembulatan maka } n = 5,$$

Jumlah sampel yang digunakan adalah 5 ekor tikus.dengan drop out 10% (untuk menghindari), maka diambil 6 ekor tikus.

#### 3.1.4.2 Kriteria Inklusi:

- a. Tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*)
- b. Umur 2 sampai 2,5 bulan
- c. Berat badan 180-250 gram

#### 3.1.4.3 Kriteria Eksklusi

Sampel dianggap *drop out* (untuk menghindari) apabila selama penelitian dilaksanakan tikus putih jantan sakit dan mati.

## 3.2 Metode penelitian

### 3.2.1 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik.

### 3.2.2 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

#### 3.2.2.1 Definisi Konsep Variabel

Terbagi menjadi 3 yaitu:

- a. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak etanol *Kalanchoe pinnata* [Lam] Pers.
- b. Variabel terikat : Waktu penyembuhannya luka sayat pada tikus putih jantan galur Wistar.
- c. Variabel terkontrol :- Galur tikus, jenis kelamin tikus, umur tikus dan berat badan tikus.
  - Makanan dan minuman
  - Kandang tikus

#### 3.2.2.2 Definisi Operasional Variabel

- a. Ekstrak daun cocor bebek

Ekstrak daun cocor bebek adalah sediaan serbuk kering yang dibuat dengan mengekstrak daun cocor bebek dengan dosis yang berbeda-beda.

- b. Luka insisi

Luka insisi adalah luka yang dibuat dengan cara menyayat punggung tikus dengan menggunakan pisau steril dan diukur dengan menggunakan penggaris dengan satuan cm. Sayatan

sepanjang  $\pm$  2cm, kedalaman  $\pm$  0,25mm sampai dengan lapisan subkutis dengan hati-hati menggunakan pisau bedah steril yang diberi batas untuk mendapatkan hasil sayatan yang sama.

### 3.2.3 Prosedur Penelitian

#### A. Pengumpulan Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata [Lam] Pers.*) yang dikumpulkan dari Pusat Perkebunan Tanaman Obat Manaco Lembang, Jawa Barat.

#### B. Determinasi Bahan Uji

Determinasi daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnta [Lam] Pers.*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Eyckman RSHS Bandung.

#### C. Pengolahan dan Penyimpanan Bahan

Tanaman dikumpulkan untuk disortasi, ditimbang, dibersihkan dari pengotornya dengan cara dicuci dengan air, dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia kering yang diperoleh kemudian dihaluskan serta disimpan dalam wadah bersih tertutup rapat.

#### D. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

Pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek dilakukan di Laboratorium Farmasi dan Terapi Universitas Padjajaran Bandung. Pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe Pinnata [Lam] Pers.*) dilakukan dengan cara maserasi, yaitu dengan memasukkan simplisia ke dalam maserator yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas atau penyumbat. Kemudian simplisia direndam dengan etanol (70%) hingga terendam. Dilakukan beberapa kali

pengadukan selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Setelah 24 jam filtrat ditampung dan disaring, residu dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama. Proses ini dilakukan berulang kali hingga dihasilkan pelarut yang bening. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Maserat yang tersisa kemudian diuapkan menggunakan waterbath sampai terbentuk ekstrak kental. Hasilnya, diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia yang Diekstraksi}} \times 100\%$$

#### **E. Pembuatan Na CMC (*Natrium- Carboxymethyle Cellulose*)**

Dibuat suspensi Na CMC dengan penimbangan Na CMC 500mg, kemudian dilakukan pengembangan dengan menambahkan air suling panas sedikit demi sedikit ke dalam mortir sambil digerus sampai volume mencapai 100ml.<sup>36</sup> Na CMC merupakan zat dengan warna putih, atau sedikit kekuningan, tidak berbau, dan tidak berasa, berbentuk granula yang halus (Inchem, 2002). Adapun sifat fungsional yaitu untuk pengental, stabilisator, pembentuk gel. Dimana Na CMC hanya sebagai placebo tidak mengandung kimi khusus.

#### **F. Perhitungan dosis ekstrak etanol *Kalanchoe pinnata***

Perhitungan dosis didapat dari penelitian sebelumnya (*Indian Journal of Experimental Biology*), di dapat pada manusia adalah 400 gram yang di konversi dari manusia ke tikus dengan menggunakan rumus tabel konversi *Laurence-Bacharach* pada tikus dengan berat 200 gram adalah :

$400 \times 0,018 = 7,2 \text{ gram}/200\text{g BB tikus}$

Dosis 1:  $7,2/2 = 3,6$

$$\frac{3,6 \times 200}{1000} = 0,72 \times 6 = 4,32 \text{ gram}/200\text{g BB tikus}$$

Dosis 2: 7,2

$$\frac{7,2 \times 200}{1000} = 1,44 \times 6 = 8,64 \text{ gram}/200\text{g BB tikus}$$

Dosis 3:  $7,2 \times 2 = 14,4$

$$\frac{14,4 \times 200}{1000} = 2,88 \times 6 = 17,28 \text{ gram}/200\text{g BB tikus}$$

#### **G. Pelukaan Pada Tikus**

Rambut disekitar daerah yang akan dilukai dicukur dan dibersihkan menggunakan NaCl fisiologis 0,9%. Pelukaan setelah sebelumnya tikus dianastesi dengan diberikan kentanin dengan dosis 0,3 cc. Pada daerah tersebut dilakukan sayatan di daerah punggung sejajar dengan os.vertebra menggunakan skalpel sepanjang 2 cm dan kedalaman 0,25 cm sampai lapisan subkutis dengan cara kulit diregangkan dengan jari telunjuk dan ibu jari tangan kiri bertindak sebagai peregang dan penekan.

#### **H. Pembagian Kelompok Hewan Uji**

Sebelum dilakukan penelitian, tikus jantan Wistar dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi kode per kelompok, diberi makanan standar tikus(pellet) serta air minum. Dari 30 tikus jantan Wistar ditimbang terlebih dahulu dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing masing terdiri dari 6 ekor tikus:



1. Kelompok I

Kelompok I sebagai kontrol negatif yang diaplikasikan *Natrium-Carboxymethyle Cellulose*(CMC) pada daerah perlukaan sayatan.

2. Kelompok II

Kelompok II sebagai kontrol positif yang diaplikasikan Povidone Iodine (Betadine®) pada daerah yang terjadi perlukaan sayatan.

3. Kelompok III

Kelompok III diaplikasikan ekstrak etanol daun cocor bebek dosis 1 pada daerah yang terjadi perlukaan sayatan.

4. Kelompok IV

Kelompok IV diaplikasikan ekstrak etanol daun cocor bebek dosis 2 pada daerah yang terjadi perlukaan sayatan.

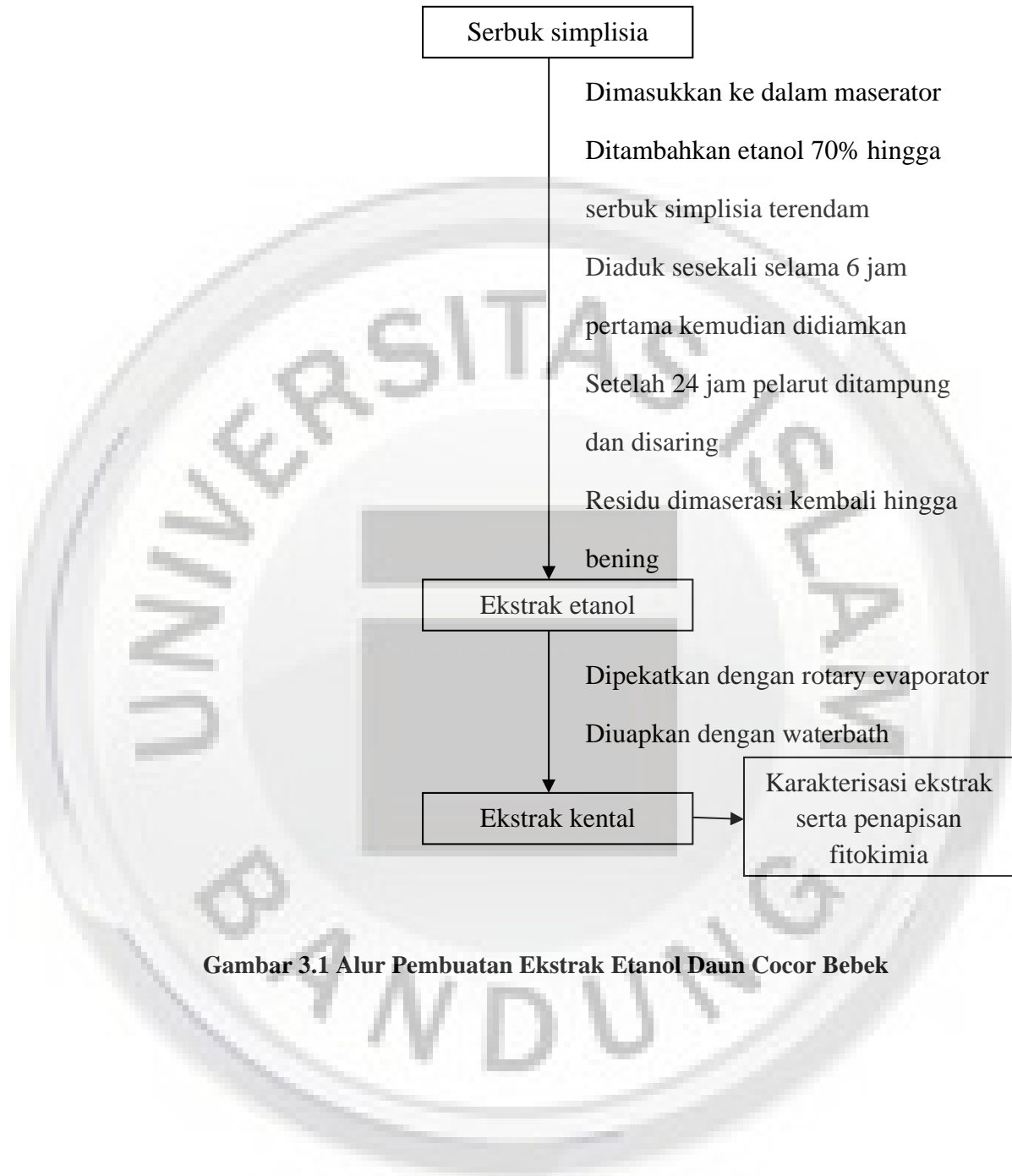
5. Kelompok V

Kelompok V diaplikasikan ekstrak etanol daun cocor bebek dosis 3 pada daerah yang terjadi perlukaan sayatan.

**I. Pemberian Obat Luka Standar dan Ekstrak Etanol Cocor Bebek**

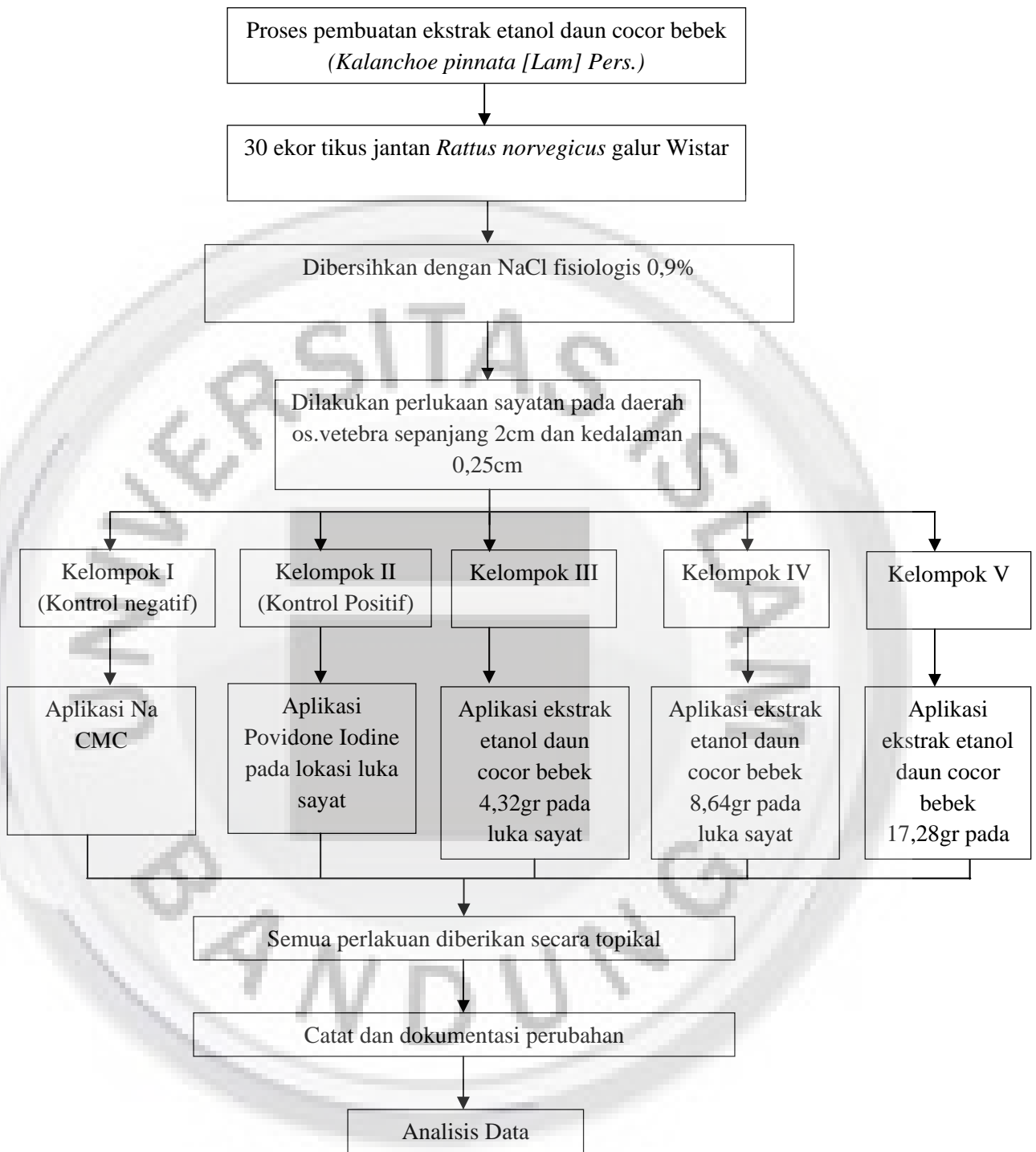
Obat luka standar (Povidone Iodine 10%) dan ekstrak etanol daun cocor bebek diberikan secara topikal langsung pada luka sejak terjadinya luka yang dihitung sebagai hari ke-0. Pemberian obat dilakukan dua kali dalam sehari sampai luka sembuh.

### 3.2.4 Proses Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek



Gambar 3.1 Alur Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

### 3.2.5 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

### 3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini berpatokan kepada etika penelitian yang di kemukakan oleh Russel (1959) yang mencakup aspek etik 3R, yaitu:

A. *Replacement* / menggantikan hewan coba dengan alternatif lain

*Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).

B. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu  $(n-1)(t-1) > 15$ , dengan  $n$  adalah jumlah hewan yang diperlukan dan  $t$  adalah jumlah kelompok perlakuan. Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistik yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.

C. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (humane), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.<sup>36</sup>

D. *Euthanasia* dilakukan dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan mendiadakan penderitaan hewan coba. Hewan juga harus bebas dari ketakutan dan stress jangka panjang, dengan menciptakan lingkungan yang dapat mencegah stress, misalnya memberikan masa adaptasi atau aklimatisasi, memberikan latihan prosedur penelitian untuk hewan. Semua prosedur dilakukan oleh tenaga yang kompeten, terlatih, dan berpengalaman dalam merawat atau memperlakukan hewan percobaan untuk meminimalisasi stres.

### **3.2.7 Analisis Data**

Analisis data menggunakan *one way* ANOVA untuk mengetahui perbedaan tiap-tiap waktu penyembuhan pada setiap kelompok yang berbeda dan perhitungan statistik dengan perangkat lunak komputer *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).