

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini adalah eksperimental laboratories *invivo* pada hewan uji.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dengan waktu penelitian selama dua bulan.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Wistar* dengan kriteria umur \pm enam sampai delapan minggu dengan berat 160-200 gram. Tikus dipelihara dalam kandang hewan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UMY.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

1. Variabel

- a. Variabel Bebas : kadar krim ekstrak etanol *P. acuminata*
- b. Variabel Terikat : waktu penyembuhan (dalam hari) dan persentase penyembuhan luka bakar termal.
- c. Variabel Terkendali :
 - 1) Spesies tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Wistar* (umur 6-8 minggu dan berat 160-200 gram).

- 2) Faktor genetik menggunakan tikus satu galur yaitu dari galur *Wistar* dan proses pengambilan sampel menggunakan randomisasi.
- 3) Kondisi kandang dan pakan sama.

2. Definisi Operasional

- a. Perlakuan krim ekstrak etanol *P. acuminata* secara topikal adalah memberikan krim ekstrak etanol *P. acuminata* dengan kadar 2,5%, 5% dan 10% yang berbentuk krim dengan pengolesan. Ekstrak etanol *P. acuminata* diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Daun *P. acuminata* yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau dimulai daun ketiga dari pucuk sehingga daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Daun tersebut dipilih agar varian daun tidak terlampaui berbeda satu sama lainnya.
- b. Pembuatan luka bakar termal pada penelitian ini yakni luka bakar dengan derajat tiga yang diinduksi dengan cara menempelkan logam tembaga murni berdiameter 20 mm dengan spesifikasi 80 watt, 240 volt dengan suhu 100° C selama 10 detik pada kulit bagian dorsal dextra (punggung) tikus yang telah dicukur dan dianestesi (Yuliani, 2011).
- c. Kriteria makroskopis luka bakar derajat tiga adalah tidak dijumpai bula (penumpukan cairan infiltrat), permukaan kulit terlihat berlemak, kerusakan meliputi epidermis, dermis, subkutan, folikel rambut, kelenjar keringat dan kelenjar sebacea. Kulit yang terluka berwarna merah atau pucat abu-abu (Yuliani, 2011).

- d. Metode pembuatan luka, penilaian waktu sembuh dan penilaian persentase penyembuhan adalah dengan menggunakan “Metode Morton” (Morton dalam Kusmiati dkk., 2006).
- e. Waktu sembuh adalah waktu penyembuhan mulai dari induksi luka hingga luka tersebut sembuh berdasarkan indikator kesembuhan luka (dalam hari) (Yuliani, 2011).
- f. Metode penilaian persentase penyembuhan adalah persentase penyembuhan didapatkan dari hasil pengukuran diameter luka setiap hari. Berdasarkan diameter tersebut lalu dilakukan perhitungan persentase penyembuhan setiap hari dengan menggunakan suatu rumus persentase (Yuliani, 2011).
- g. Indikator kesembuhan adalah diameter luka dan persentase penyembuhan yang dihitung dari waktu ke waktu telah mencapai diameter 0 mm (persentase 100%) dan didukung dengan tanda-tanda luka bakar derajat tiga yang menghilang tergantikan jaringan parut serta tanda-tanda radang menghilang (tidak terlihat bengkak, warna kulit bekas luka berwarna pucat atau berwarna sama dengan kulit yang sehat, dan tidak terasa panas) (Suratman dkk., 1996).

E. Instrumen Penelitian

1. Alat-Alat Penelitian

Alat yang digunakan antara lain solder 80 watt, 240 volt yang telah dimodifikasi ujungnya dengan menggunakan tembaga murni berbentuk lingkaran dengan diameter 20 mm, alat pencukur

rambut, toples ukuran besar, jangka sorong, sarung tangan, masker, timbangan tikus, spuit 1 ml, kamera, dan kandang.

2. Bahan-Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah krim ekstrak etanol *P. acuminata* dengan kadar 2,5%, 5 % dan 10%, krim pembawa (*base cream*), Bioplacenton[®], eter, kapas, dan alkohol 70%.

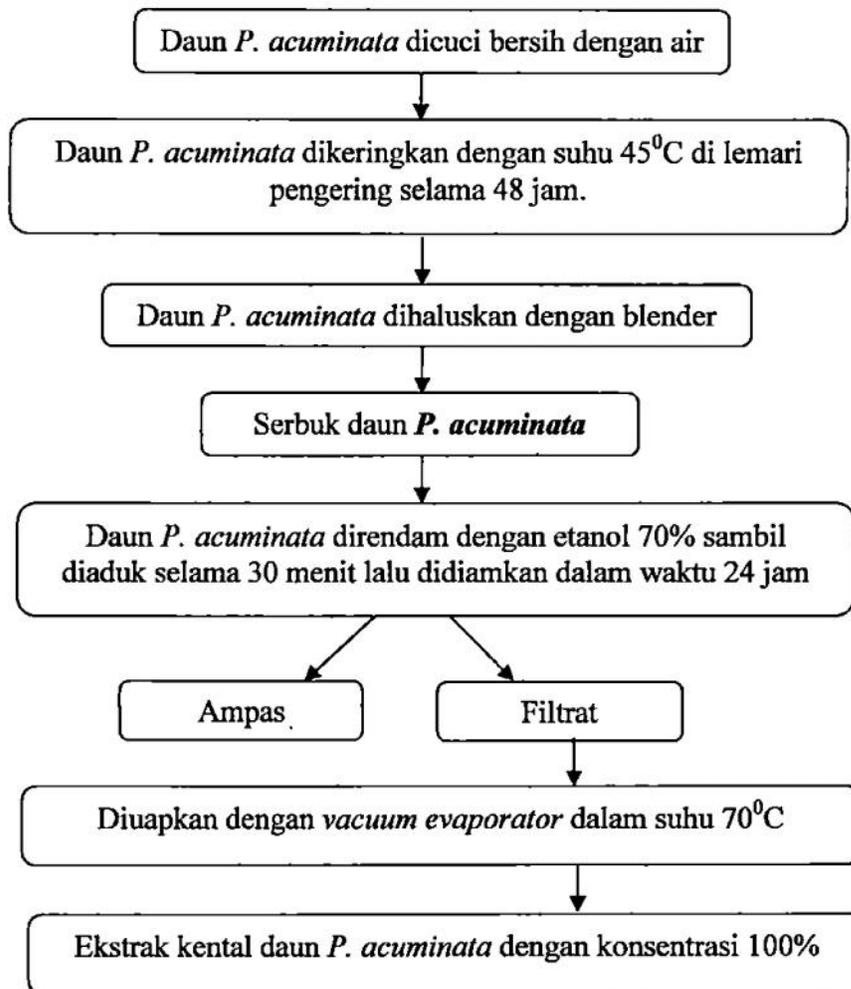
F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

1. Ekstraksi daun *P. acuminata*

Ekstraksi daun *P. acuminata* dilakukan dengan metode maserasi. Daun *P. acuminata* sebanyak 5 kilogram yang sudah dipetik lalu dicuci dengan air bersih. Daun *P. acuminata* yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau dimulai daun ketiga dari pucuk sehingga daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Daun yang sudah dicuci dikeringkan dalam lemari pengering dengan suhu 60⁰C-70⁰C hingga kering. Daun kering sebanyak 500 gram dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk. Serbuk di ekstraksi dengan metode maserasi dalam larutan etanol 70% yang berfungsi untuk melarutkan zat aktif yang terkandung dalam larutan *P. acuminata*. Dalam perendamannya sambil diaduk selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah direndam maka akan terbentuk filtrate dan ampas. Filtrate diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dalam pemanas *water bath* dengan suhu

70⁰C. Setelah itu akan diperoleh ekstrak yang kental sebanyak 49 gram dengan konsentrasi 100%. Proses pembuatan ekstrak dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Skema Pembuatan Ekstrak

2. Pembuatan sediaan uji

Sediaan uji yang dibuat di laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Univeritas Gadjah Mada ini adalah berupa krim minyak dalam air (KM/ A). Formulasi dari sediaan tercantum dalam Tabel 3.

3. Pengelompokan hewan uji

Sebelum mendapatkan perlakuan semua hewan telah diadaptasikan selama satu minggu. Hewan uji sebanyak 30 ekor ditimbang dan dibagi secara random menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus, yaitu:

- Kelompok I : kontrol negatif (tanpa perlakuan)
 Kelompok II : kontrol positif (Bioplacenton[®])
 Kelompok III : krim pembawa (*base cream*)
 Kelompok IV : krim ekstrak etanol *P. acuminata* 2,5% (EPA 2,5%)
 Kelompok V : krim ekstrak etanol *P. acuminata* 5% (EPA 5%)
 Kelompok VI : krim ekstrak etanol *P. acuminata* 10% (EPA 10%)

Tabel 3. Formula Krim Ekstrak Daun *P. acuminata*

Bahan	Bentuk Sediaan (dalam satuan gram)			
	KM/A			
	0%	2,5%	5%	10%
Ekstrak <i>P. acuminata</i>	-	2,5	5	10
Asam Stearat	15	15	15	15
Gliserin	10	10	10	10
Metil paraben	0,10	0,10	0,10	0,10
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Air hingga	100	100	100	100

4. Induksi luka bakar termal

Punggung tikus dicukur bersih sehingga memungkinkan untuk dibuat luka bakar termal berdiameter 20 mm. Semua hewan uji dianestesi menggunakan eter secara inhalasi menggunakan toples besar yang berisi kapas yang sudah diberi eter. Kemudian diinduksi untuk

membuat luka bakar termal dengan alat penginduksi luka bakar termal 80 watt, 240 volt bersuhu 100° C yang berdiameter 20 mm selama 10 detik (Yuliani, 2011).

5. Pemberian perlakuan bahan uji

Sesaat setelah induksi luka bakar termal, diameter luka awal diukur dan diberi perlakuan sesuai kelompok masing-masing. Kelompok I dibiarkan tanpa perlakuan, kelompok II diolesi Bioplacenton® 0,1 ml dan kelompok III diolesi krim pembawa (*base cream*), kelompok IV, V, dan VI diolesi krim etanol *P. acuminata* dengan kadar 2,5%, 5% dan 10%. Pemberian semua perlakuan topikal sebanyak 0,1 ml dilakukan setiap hari sampai luka sembuh dengan memakai spuit berukuran 1 ml. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat badan tikus selama 4 kali selang waktu 2 minggu sekali dan pemantauan pemberian pakan setiap hari untuk mengontrol nutrisi semua tikus percobaan.

6. Pengamatan dan pengukuran luka bakar termal

Dengan Metode Morton dilakukan pengamatan dan pengambilan data makroskopis penyembuhan luka bakar termal setiap hari untuk mendapatkan data waktu sembuh dan persentase penyembuhan.

Waktu sembuh (dalam hari) dicatat berdasarkan pada indikator kesembuhan dan pengukuran diameter luka setiap hari terus-

menerus sampai luka sembuh dengan indikatornya diameter luka menjadi 0 mm.

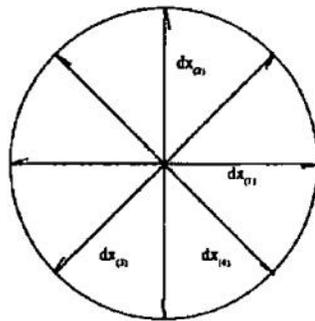
Persentase penyembuhan didapat dari data diameter luka. Luka yang terjadi diukur diameternya (dalam mm) dengan cara dihitung rata-ratanya menggunakan rumus :

$$dx = \frac{dx_{(1)} + dx_{(2)} + dx_{(3)} + dx_{(4)}}{4}$$

Keterangan :

dx : diameter luka hari ke-x (dalam mm)

$dx_{(1),(2),(3)}$ dan (4) : diameter luka diukur dari 4 arah (lihat pada Gambar.7)



Gambar 7. Cara mengukur diameter luka (Suratman dkk., 1996)

G. Analisis Data

1. Perhitungan persentase penyembuhan

Setelah hasil diameter luka didapat kemudian dilakukan perhitungan persentase penyembuhan luka (dalam %) setiap hari dengan menggunakan "Rumus Konversi Persentase" sebagai berikut:

$$P_x = \frac{d_1^2 - dx^2}{d_1^2} \times 100 \%$$

keterangan:

P_x : persentase penyembuhan hari ke-x (dalam %)

d_1 : diameter luka hari pertama

dx : diameter luka hari ke-x

2. Pengolahan data dengan statistik

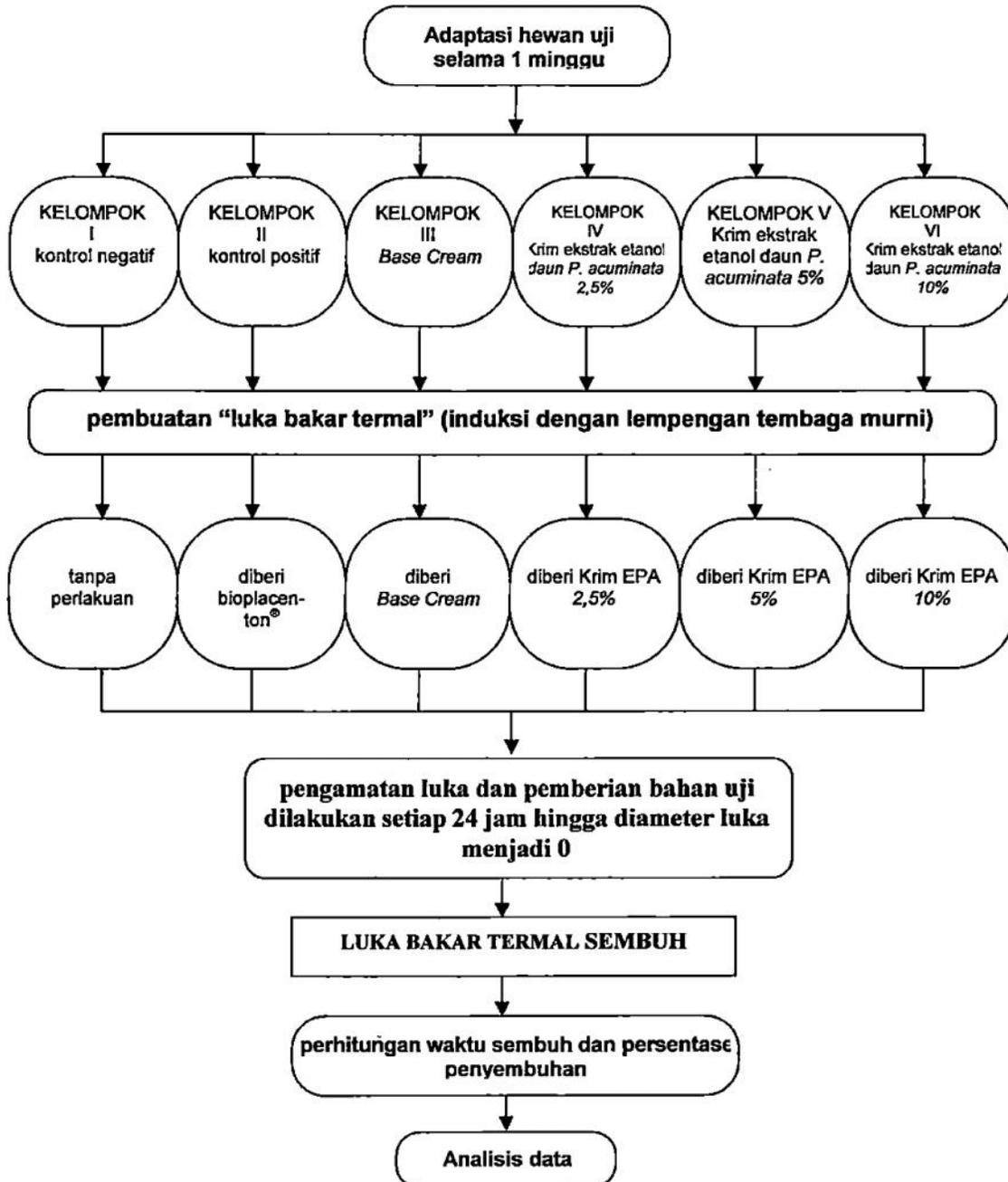
Data yang diperoleh adalah waktu sembuh (dalam hari) dan persentase penyembuhan (dalam %) berupa data numerik atau ratio yang selanjutnya dilakukan uji normalitas data untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Karena data tidak terdistribusi normal maka uji parametrik yang digunakan adalah turunan dari *ANOVA* (*Analysis of Varians*) yaitu Kruskal Wallis (*ANOVA* Non-parametrik) (Riwidikdo, 2008).

H. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah pengamatan terhadap perkembangan luka bakar termal dilakukan secara makroskopis sehingga bersifat subyektif yakni menggunakan jangka sorong dan penglihatan penelitian. Hal ini sangat diperlukan ketelitian dan ketajaman penglihatan peneliti untuk keakuratan hasil penelitian.

I. Diagram Prosedur Penelitian

Gambar 8 menunjukkan diagram prosedur dalam penelitian.



Gambar 8. Diagram Prosedur penelitian