

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan atau desain penelitian ini menggunakan *Post Test Only Control Group Design* yang memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkannya terhadap kelompok kontrol.

### **3.2 Tempat dan Waktu**

Pembuatan ekstrak daun ketapang dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Perlakuan hewan coba dilakukan di *Pet House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan pada bulan Oktober-November 2015.

### **3.3 Populasi dan Sampel**

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2010). Pada penelitian ini populasi yang akan digunakan

adalah mencit (*Mus musculus*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 25-50 gram.

Sampel adalah objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi (Notoatmodjo, 2010). Pemilihan sampel digunakan dengan cara simple random sampling. Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Frederer, yaitu (Sastroasmoro, 1995):

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

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

$$5n - 5 = 15$$

$$5n = 20$$

$$n = 4$$

Keterangan :

n = besar sampel

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan rumus diatas didapatkan besar sampel minimal yang digunakan dalam setiap kelompok perlakuan adalah 4 sampel. Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan sebanyak 5 kelompok, sehingga dibutuhkan total sampel sebanyak 20 ekor mencit (*Mus musculus*).

### 3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

1. Sehat, ditandai dengan bergerak aktif
2. Berumur 2-3 bulan

3. Berat 25-50 gram

#### Kriteria Eksklusi

1. Mencit mati sebelum penelitian selesai

### **3.5 Identifikasi Variabel**

Variabel independen (variabel bebas) merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab (Notoatmodjo 2010). Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L) konsentrasi 25%, 50% dan 100%.

Variabel dependen (variabel terikat) merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas (Notoatmodjo, 2010). Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah fibroblas pada penyembuhan luka.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 1. Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel independen Ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L) konsentrasi 25%, 50%, dan 100%	Daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L) yang telah diekstraksi	$V_1M_1 = V_2M_2$ Keterangan: V1= volume awal (ml) M1= konsentrasi awal (%) V2= volume akhir (ml) M2= konsentrasi akhir (%)	1. ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L) konsentrasi 25% 2. ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L) konsentrasi 50% 3. ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L) konsentrasi 100%	Ordinal
2	Variabel dependen Jumlah fibroblas pada penyembuhan luka	Jumlah fibroblas yang terdapat pada gambaran histopatologi kulit yang mengalami luka	Menghitung jumlah fibroblas memakai <i>software ImageJ</i> dengan perbesaran 400 kali dimana setiap sediaan diperiksa pada luas pandang 10 area (Aulia, 2014).	Jumlah fibroblas (sel)	Rasio

### 3.7 Cara Kerja

#### 1. Pengadaptasian Mencit

Adaptasi mencit dilakukan selama 7 hari sebelum dilakukan penelitian.

Adaptasi mencit dilakukan di *pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## 2. Pengambilan Sampel Daun Ketapang

Daun ketapang diperoleh dari pohon ketapang di sekitar kawasan Universitas Lampung. Daun ketapang dibersihkan dengan air mengalir hingga bersih. Daun dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dikeringkan dibawah sinar matahari hingga kering. Daun yang telah kering dibawa ke Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

## 3. Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang

Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Ekstraksi komponen aktif menggunakan pelarut metanol. Metode ekstraksi komponen aktif yang digunakan adalah metode ekstraksi tunggal. Metode ini menggunakan pelarut metanol yang dimaserasi selama 3x24 jam dengan perbandingan 1:3 (b/v), kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman 42*. Filtrat ekstrak pelarut masing-masing yang diperoleh kemudian dievaporasi sehingga semua pelarut terpisah dari ekstrak menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C, 500 mmHg, kemudian residu yang tersisa dibuang. Proses ini akan menghasilkan ekstrak metanol yang kental dengan kadar 100%.

## 4. Penentuan dosis

Mencit yang telah diinduksi luka sayat akan diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak daun ketapang masing-masing kelompok dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 100% (Matheson, 2014).

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus (Safitri, 2012):

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

$M_1$  = Konsentrasi ekstrak daun ketapang yang tersedia (%)

$V_2$  = Volume larutan (air + ekstrak ) yang diinginkan (ml)

$M_2$  = konsentrasi ekstrak daun ketapang yang akan dibuat (%)

## 5. Pembuatan Luka Sayat pada Mencit

Sebelum dilakukan penyayatan, mencit terlebih dahulu dianestesi menggunakan lidokain 0,2 cc dalam 2 cc aquades. Sebelum dilakukan perlukaan, bulu di sekitar punggung dicukur dan kulit diolesi dengan alkohol, kemudian mencit diadaptasikan selama 2 hari, kemudian dilukai. Perlukaan dilakukan pada punggung mencit dengan membuat sayatan dengan panjang 1 cm dan lebar 0,5 mm menggunakan skalpel yang steril.

## 6. Penanganan Pada Mencit

Penanganan dilakukan sebanyak dua kali sehari, sebelum pemberian ekstrak daun ketapang pada luka, selalu dibersihkan terlebih dahulu menggunakan aquadest. Pemberian ekstrak daun ketapang dilakukan dengan cara mengoleskannya di bagian luka pada punggung mencit, yaitu di pagi dan sore hari, selama 7 hari setelah induksi luka sayat. Sebagai pembanding digunakan kontrol negatif yaitu mencit yang diberi aquades

saja tanpa kandungan ekstrak daun ketapang dan kontrol positif yang diberi *povidone iodine* sebagai obat standar penanganan sebagian besar luka sayat yang sampai saat ini masih digunakan secara luas. Kelompok perlakuan 1 (KP1) diberikan ekstrak daun ketapang secara topikal dengan konsentrasi 25%, (KP2) diberikan ekstrak daun ketapang secara topikal dengan konsentrasi 50%, dan (KP3) diberikan ekstrak daun ketapang secara topikal dengan konsentrasi 100%. Berikut prosedur penanganan luka sayat yang akan diaplikasikan :

- a. Tempelkan perlek yang dilapisi kain dibawah luka yang akan dirawat.
- b. Pakai sarung tangan steril
- c. Siapkan kasa.
- d. Untuk kelompok kontrol positif olesi luka menggunakan kasa yang telah dibasahi dengan *Povidone iodine* hingga menutupi seluruh permukaan luka, untuk kelompok kontrol negatif luka diberikan aquades saja, sedangkan pada kelompok perlakuan luka diolesi menggunakan ekstrak daun ketapang hingga menutup seluruh bagian luka.
- e. Tutup luka dengan kasa steril

## **7. Prosedur Operasional Pembuatan Preparat Histopatologi**

Setelah 7 hari mencit diterminasi dengan menggunakan eter inhalasi. Setelah itu dilakukan eksisi pada seluruh ketebalan jaringan kulit yang diambil dari lokasi luka, kemudian difiksasi menggunakan larutan formalin 10% dan disimpan dalam tabung organ, kemudiaan sediaan

tersebut dibuat menjadi preparat histopatologi. Metode pembuatan preparat histopatologi Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sebagai berikut :

a. Prosedur pembuatan *slide* :

1. Organ telah dipotong secara melintang dan telah difiksasi menggunakan formalin 10% selama 24 jam.
2. Bilas dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali.
3. Dehidrasi dengan :
  - Alkohol 70% selama 0,5 jam
  - Alkohol 70% selama 0,5 jam
  - Alkohol 96% selama 0,5 jam
  - Alkohol 96% selama 0,5 jam
  - Alkohol absolut selama 1 jam
  - Alkohol absolut selama 1 jam
4. *Clearing* dengan menggunakan :

Untuk memberishkan sisa alkohol, dlakukan *clearing* dengan xilol I dan II masing-masing selama 1 jam.
5. Impregnasi dengan paraffin selama 1 jam 2 kali dalam oven suhu 65°C.
6. Pembuatan blok parafin :

Sebelum dilakukan pemotongan blok parafin, parafin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan *rotary microtome* dengan menggunakan *disposable knife*. Pita parafin



dimekarkan pada *water bath* dengan suhu 56-58°C. Dilanjutkan dengan pewarnaan hematoksilin eosin.

b. Prosedur pulasan HE :

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut.

1. Dilakukan deparafinisasi dalam :
  - Larutan *xylol* I selama 3 menit
  - Larutan *xylol* II selama 3 menit
  - Larutan *xylol* III selama 3 menit
2. Hydrasi dalam :
  - Alkohol 100% selama 2 menit
  - Alkohol 95% selama 2 menit
  - Alkohol 80% selama 2 menit
  - Alkohol 70% selama 2 menit
3. Pulasan inti dibuat dengan menggunakan :
  - Meyer hematoksilin selama 15 menit
  - Air mengalir
  - Eosin selama maksimal 1 menit
4. Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan :
  - Alkohol 70% selama 3 celup
  - Alkohol 80% selama 3 celup
  - Alkohol 95% selama 3 celup
  - Alkohol 100% selama 3 celup

5. Penjernihan:

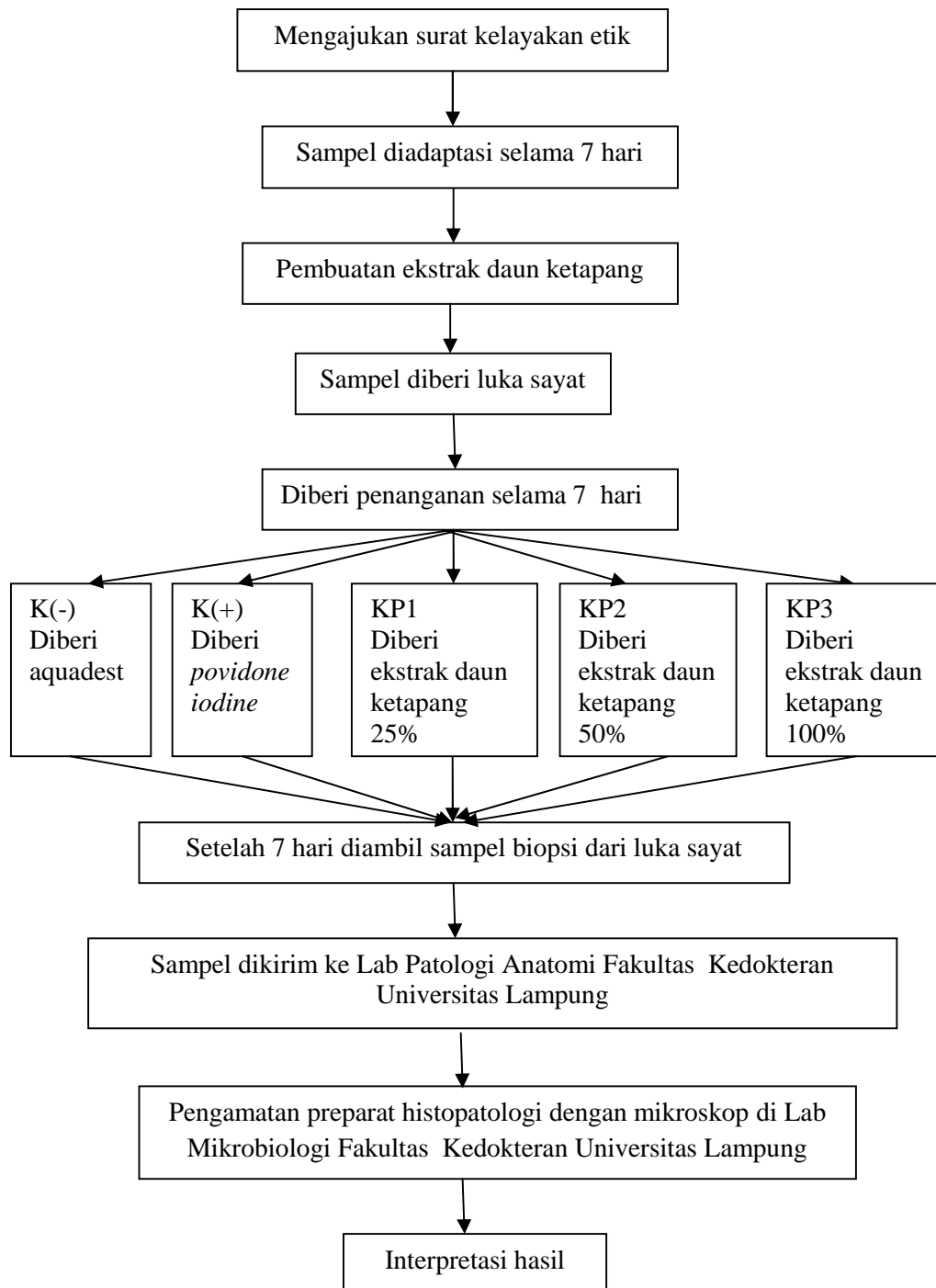
- *Xylo* I selama 2 menit
- *Xylo* II selama 2 menit

6. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*.

### **8. Pengamatan Preparat Histopatologi**

Preparat histopatologi diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 kali lensa objektif dan dilakukan pemotretan 10 lapang pandang pada setiap preparat. Untuk menghitung jumlah fibroblas diamati dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* 49. Fibroblas dilihat dengan gambaran jenis sel berinti lonjong dan berwarna ungu pucat. Setiap 10 lapang pandang foto dihitung jumlah selnya, kemudian dihitung nilai rata-rata dari setiap kelompok perlakuan

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 10. Alur Penelitian**

### **3.9 Pengolahan dan Analisis Data**

Data dianalisis dengan menggunakan program komputer, diuji normalitas sebaran datanya berdistribusi normal atau tidak dengan uji *Shapiro-wilk* karena sampel berjumlah kurang dari 50, dan uji homogenitas varian dengan uji Levene statistic. Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji parametrik *One Way Anova* karena merupakan kategori komparatif numerik >2 kelompok tidak berpasangan dan data berdistribusi normal serta sebaran data homogen. Analisis data dilanjutkan dengan uji *Post hoc* LSD (Dahlan, 2012).

### **3.10 Etika Penelitian**

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan penelitian dari komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.