

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen diartikan sebagai pendekatan kuantitatif yang paling penuh, artinya memenuhi semua persyaratan untuk menguji hubungan sebab akibat. Metode penelitian eksperimen diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali (Sugiyono, 2012).

#### **3.2 Desain Penelitian**

Desain yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap merupakan jenis rancangan percobaan dimana perlakuan diberikan secara acak kepada seluruh unit percobaan. Hal ini dapat dilakukan karena lingkungan tempat percobaan diadakan relatif homogen sehingga media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh berarti pada respon yang diamati (Rakhmadi, 2012). Sampel yang digunakan dibuat sama dari mulai umur, jenis kelamin, berat badan dan menderita hiperglikemia atau diabetes dengan induksi sukrosa sebanyak 5,625 g/KgBB (Kanon, 2015) sehingga memenuhi metode rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan enam kelompok yaitu kelompok kontrol positif luka mencit (*Mus musculus*) yang menderita diabetes diberikan povidone iodine, kelompok Perlakuan satu (PI) diberikan ekstrak buah palem putri (*Veitchia merrillii*) konsentrasi 25%, PII konsentrasi 50%, PIII 75%, PIV 100%, dan kelompok negative yang hanya diberikan gel tanpa ekstrak buah palem putri (konsentrasi 0%) setiap perlakuan dilakukan secara topical sekali setiap hari. Banyaknya pengulangan ditentukan dengan rumus pengulangan (Federer, 1963) sebagai berikut:

$(t-1)(r-1)$	$\geq 15$	Keterangan:
$(6-1)(r-1)$	$\geq 15$	t : perlakuan
$6r-6-r+1$	$\geq 15$	r : pengulangan
$5r-5$	$\geq 15$	15 : Faktor nilai derajat kebebasan umum
$5r$	$\geq 15+5$	
r	$\geq 20/5$	
r	$\geq 4$	

Berdasarkan perhitungan dengan rumus tersebut penelitian ini menggunakan 4 pengulangan untuk setiap kelompoknya, dimana setiap pengulangan terdiri dari seekor mencit (*Mus musculus*) jantan. Luka dibuat pada bagian punggung mencit sepanjang 1 cm. Parameter yang diukur adalah panjang, lebar, persentase penyembuhan luka, kecepatan penyembuhan luka dan waktu penyembuhan luka sampai luka benar-benar sembuh dengan ciri kulit bersih tanpa ada bekas luka. Pemberian makan dan minum dilakukan secara *ad libitum*.

### 3.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) yang diinduksi sukrosa 10% secara *ad libitum* selama 20 hari. Pengecekan kadar gula darah dilakukan pada hari 21 menggunakan glukosa meter. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara menggantung ekor mencit (Tendri, 2017).

### 3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di rumah pemeliharaan mencit di Kebun Botani dan Lab Riset FPMIPA B untuk pembuatan gel ekstrak palem putri, Universitas Pendidikan Indonesia selama lima bulan dari Januari – Maret 2020.

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian dalam hal ini berupa seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian yang terdapat di rumah pemeliharaan mencit dan Lab Riset FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia.

#### a. Alat

Tabel 3.1 Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Jumlah	Kegunaan
1	Sarung tangan	1 pack	Memegang tikus
2	<i>Beaker glass</i>	1 unit	Mencampurkan semua bahan
3	Tempat plastik	1 unit	Membuat ekstrak
4	Saringan	1 unit	Menyaring ekstrak
5	<i>Evaporator</i>	1 unit	Menguapkan etanol agar membuat ekstrak menjadi padat
6	Timbangan analitik	1 unit	Menimbang bahan untuk pembuatan ekstrak dan sediaan gel
7	Blender	1 unit	Menghaluskan buah palem putri
8	Pengaduk	1 unit	Mengaduk ekstrak
9	Water Bath	1 unit	Menghomogenkan sediaan gel
10	Pengerok tambut	2 unit	Mengerok rambut mencit
11	Botol minum mencit	6 unit	Tempat minum mencit
12	Kandang	6 unit	Memelihara mencit
13	Gunting	2 unit	Memotong rambut punggung mencit
14	Kamera	1 unit	Mendokumentasikan ukuran luka dan tahap penyembuhan mencit
15	<i>Cutton bud</i>	1 pack	Mengoleskan sediaan ekstrak
16	Masker	1 pack	Menutup mulut
17	Kapas	1 pack	Mengoleskan alkohol sebelum mencit diberikan luka
18	<i>Micro cam</i> dan penggaris	2 unit	Mengukur panjang dan lebar luka
19	Alat tulis	1 set	Mencatat data yang telah diamati

## b. Bahan

Tabel 4.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Alkohol 70%	100 ml
2	Etanol 96%	700 ml
3	Mencit jantan	24 ekor
4	Pakan	36 kg
5	Ekstrak buah palem putri	100 gr
6	Eter	100 ml
7	Equades	150 ml
8	CMC-Na	19 gr
9	Gliserin	15 gr
10	Propilengkolikol	16 gr
11	Gula (sukrosa)	5 gr
12	Povidone Iodine	15 ml

### 3.6 Cara Kerja

#### 3.6.1 Tahap Persiapan

##### 3.6.1.1 Persiapan Alat dan bahan

Sebelum melaksanakan penelitian lebih lanjut, bahan-bahan beserta alat yang akan digunakan saat penelitian disterilkan dan disiapkan terlebih dahulu termasuk mempersiapkan sampel buah palem putri (*Veitchia merrillii*) untuk pembuatan ekstrak. Buah palem putri (*Veitchia merrillii*) diambil dari parkiran depan FPMIPA A. Sampel dicuci dengan bersih menggunakan air mengalir sebelum di bawa ke laboratorium riset biologi FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia untuk dibuat ekstraknya.

Selain sampel buah palem putri (*Veitchia merrillii*) hewan percobaan dimasukan kedalam kandang bak plastik yang terdapat di ruang pemeliharaan hewan di Kebun Botani. Kandang plastik ditutup atasnya agar mencegah mencit keluar dari kandang. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dengan tujuan agar mencit tersebut bisa menyesuaikan diri dengan lingkungan sekitar yang baru.

### 3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak

Buah palem putri dipilih dari buah palem yang sudah ranum dan berwarna merah. Buah palem putri terpilih dijemur di bawah terik sinar matahari selama beberapa hari sampai biji terlepas dari tempurungnya. Kulit luar buah palem putri yang telah kering dikupas dan bijinya diambil untuk diekstraksi (Balqis, 2016). Biji palem putri dikeringkan dengan bantuan sinar matahari, kemudian di haluskan dengan cara menggunakan blender. Sampel yang telah halus kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol selama 3 x 24 jam dengan perbandingan 1:10. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator sampai ekstrak berbentuk seperti pasta (Adawiah, 2016)

### 3.6.1.3 Pembuatan Sediaan Gel

Ekstrak buah palem putri dibuat dalam sediaan gel dikarenakan gel dapat mempertahankan kandungan air. Pada penelitian ini dibuat sediaan gel dengan konsentrasi yang telah ditentukan, yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%, serta 1 bahan dasar gelynya tanpa ada ekstrak buah palem putri untuk kontrol negatif. Berikut formula standar basis gel CMC-Na (sodium karboksimetil selulosa) menurut Maswadeh *et al.* (2006):

Tabel 3.3. Formula Standar Basis Gel CMC-Na

Komponen	% b/v
CMC-Na	5 g
Gliserin	10 g
Propilenglikol	5 g
Akuades	100 ml

Sehingga formula untuk membuat sediaan gel ekstrak buah palem putri (*Veitchia merillii*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% atau 100% sebagai berikut:

Tabel 4.4. Formula sediaan gel ekstrak buah palem putri (*Veitchia merillii*)

<b>Bahan</b>	<b>Konsentrasi 25% b/v</b>	<b>Konsentrasi 50% b/v</b>	<b>Konsentrasi 75% b/v</b>	<b>Konsentrasi 100% b/v</b>
Ekstrak	7,5 g	15 g	22,5 g	30 g
CMC-Na	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Gliserin	3 g	3 g	3 g	3 g
Propilenglikol	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Akuades	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Bahan disiapkan kemudian ditimbang sesuai dengan formula yang telah ditentukan. Ekstrak setiap konsentrasi dilarutkan dalam sebagian air kemudian dipanaskan pada suhu yang sesuai agar tidak terjadi penggumpalan dan tercampur merata (sekitar 50°C). Kemudian ditambahkan Na-CMC dan diaduk hingga homogen. Ditambahkan gliserin, propilenglikol dan air sebagian lagi dengan pengadukan secara kontinyu hingga terbentuk gel. Gel yang terbentuk kemudian disimpan pada tempat dingin (10-15°C) selama semalam agar membentuk sediaan gel yang lebih kental (Maswadeh *et al.*, 2006 dalam Mappa *et al.*, 2013).

### 3.6.2 Tahap Pelaksanaan

#### 3.6.2.1 Pengelompokan Hewan Uji

Dalam penelitian ini 24 ekor tikus putih dibagi menjadi 6 kelompok setiap kelompok terdiri dari 4 ekor yang merupakan jumlah ulangan. Masing-masing kelompok disebut kelompok KP (Kontrol Positif), P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3), P4 (Perlakuan 4) dan KN (Kontrol Negatif). Berikut pengelompokan hewan uji berdasarkan perlakuan :

Perlakuan 1	Luka diberikan gel ekstrak biji palem putri dengan konsentrasi 25%
Perlakuan 2	Luka diberikan gel ekstrak biji palem putri dengan konsentrasi 50%
Perlakuan 3	Luka diberikan gel ekstrak biji palem putri dengan konsentrasi 75%

Perlakuan 4	Luka diberikan gel ekstrak biji palem putri dengan konsentrasi 100%
Kontrol Negatif	Luka diberikan gel tanpa ekstrak biji palem putri atau konsentrasi 0%
Kontrol Positif	Luka diberikan Povidone iodine 10%

### 3.6.2.2 Induksi Sukrosa

Mencit diinduksi sukrosa 10% secara ad libitum selama 20 hari. Pengecekan kadar gula darah dilakukan pada hari 21 menggunakan glukosa meter. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara menggantung ekor mencit (Tendri, 2017).

### 3.6.2.3 Pembuatan Luka

Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan pada kandang yang baru selama 2 hari, setelah itu rambut di disekitar punggung mencit bagian belakang dibersihkan, selanjutnya dibius menggunakan eter 0,25% lalu kulit diolesi dengan alkohol sebelum diberi perlakuan sayatan. Perlakuan dilakukan pada punggung mencit dan membuat sayatan dengan panjang 1 cm dan kedalaman 1 mm menggunakan pisau bedah (*Scalpel*).

### 3.7.2.4 Pengujian Efek Penyembuhan Luka Sayat

Luka sayat pada punggung tikus diberi Povidon Iodine 10% sebagai kontrol positif, diberikan bahan dasar gel tanpa ekstrak sebagai kontrol negatif dan diolesi dengan gel ekstrak biji palem putri (*Veitchia merillii*) dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Pemberian gel dan Povidone iodine diberikan sampai luka dinyatakan sembuh. Pengamatan dilakukan satu kali setiap hari selama 20 hari dan didokumentasikan menggunakan kamera. Pada pengujian ini perlu diperharikan penanganan hewan coba secara baik sesuai dengan prinsip etik hewan percobaan.

Berikut penanganan hewan coba sesuai prinsip 3R dan 5F yang akan dilaksanakan:

1. *Replacement* yaitu pemanfaatan hewan coba diperhitungkan dengan dasar penelitian terdahulu dan berbagai literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian. Pada penelitian uji efektivitas penyembuhan luka pada penderita diabetes ini tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan sesuai dengan literatur, oleh karena itu digunakan *Mus musculus*

2. *Reduction* merupakan pemanfaatan hewan coba dengan jumlah sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal dengan menggunakan rumus ulangan  $(n-1) (t-1) > 15$  ( $n$ : jumlah hewan/ ulangan yang diperlukan,  $t$ : jumlah kelompok perlakuan). Semakin sedikit kelompok perlakuan maka semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan sebagai ulangan, serta sebaliknya.
3. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*) dengan memperhatikan kesejahteraan hewan coba (*animal welfare*) → 5F:
  1. *Freedom from hunger & thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus). Karena di dalam metode ini di beri makan dan minum secara *adlibitum* (sampai kenyang, meskipun makanan dan minuman di sekitarnya masih ada)
  2. *Freedom from pain* (bebas dari rasa sakit). Pada metode mencit dianestesi (dibiuis) sebelum diberi perlakuan sayatan pada punggung sepanjang 1 cm
  3. *Freedom from distress & feeling discomfort* (bebas dari penderitaan dan rasa gelisah). Pada metode yang digunakan mencit di urus dan dipelihara sampai mencit sehat sehingga lukanya dapat pulih kembali
  4. *Freedom from injury & disease* (bebas dari luka dan penyakit). Mencit memang di lukai sepanjang 1 cm pada punggung bagian belakang yang sebelumnya dianestesi, namun di obati dan dirawat sampai sembuh total, karena tema utama penelitiannya adalah uji efektivitas penyembuhan luka sayat. Tindakan yang dilakukan apabila mencit mengalami infeksi sekunder ketika proses pembuatan luka atau pada saat penelitian, yaitu dengan cara melakukan pemberhentian penelitian khusus pada mencit tersebut, kemudian dipindahkan pada tempat berbeda, khusus untuk dirawat dan diobati secara rutin dengan memberikan obat antiseptik dan obat penyembuh luka yang telah teruji, misalkan obat betadine sampai infeksiya sembuh. Namun selanjutnya tidak digunakan lagi untuk penelitian, karena digantikan oleh mencit yang baru ketika mencit yang awal mengalami infeksi.
  5. *Freedom to express their normal behaviour* (bebas berekspresi dan bertingkah laku normal). Pada metode ini, mencit ditempatkan pada



kandang yang layak, serta sering dibersihkan sehingga nyaman untuk hidup mencit agar hewan coba tersebut bebas berekspresi dan bertingkah laku dengan normal (Ridwan, 2013)

### 3.7 Analisis Data

Pada penelitian ini penurunan ukuran panjang dan lebar luka dihitung persentase dan kecepatan penyembuhan lukanya masing-masing dengan rumus :

a. Persentase penyembuhan luka

$$P\% = \frac{do - dx}{do} \times 100\%$$

Keterangan :

P% : presentase penyembuhan luka

do : (Panjang dan lebar) luka awal

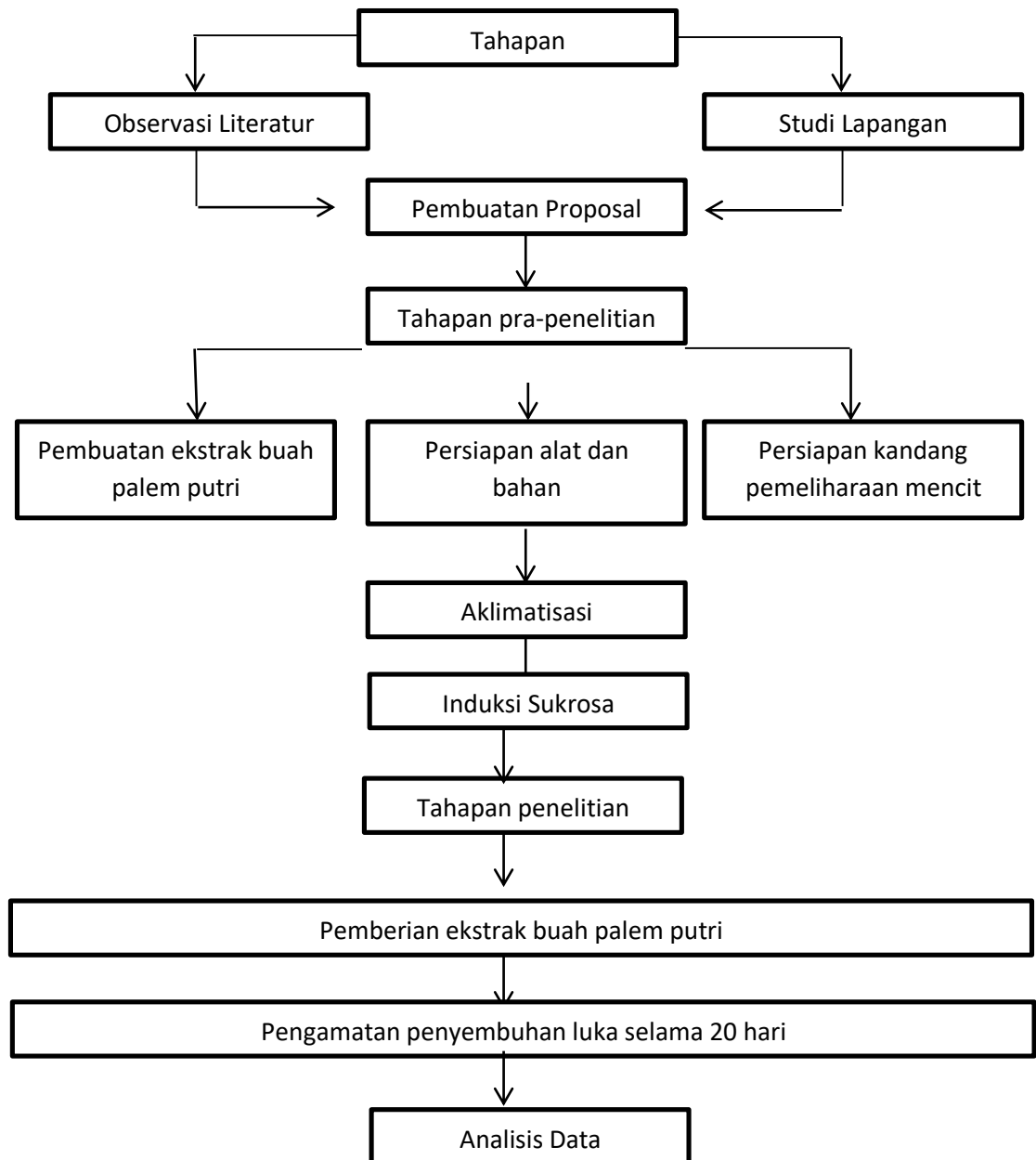
dx : (Panjang dan lebar) pada hari pengamatan

b. Kecepatan penyembuhan luka

$$\frac{\text{Panjang dan lebar luka awal}}{\text{waktu penyembuhan luka}} = \text{cm/hari}$$

Data persentase penyembuhan dan kecepatan luka tersebut kemudian dianalisis dengan uji One Way ANOVA dengan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS)*. Uji statistik yang digunakan adalah uji perbedaan antara perlakuan dengan kontrol positif. Sebelumnya data dianalisis menggunakan uji normalitas (Kolmogrov Smirnov & Shapiro Wilk) dan uji homogenitas (uji F), apabila data normal dan homogen dilanjutkan pada uji perbedaan statistik parametrik yaitu independen sample test (uji T) dan apabila data tidak normal atau tidak homogen maka uji perbedaan menggunakan uji statistik nonparametrik yaitu Mann-Whitney.

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian