

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

Pada bab ini akan diuraikan tentang tempat dan waktu penelitian, alat dan bahan, desain penelitian, sampel, variabel penelitian, kerangka operasional, proses pengumpulan data, dan etik.

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan selama 6 bulan, mulai pada bulan Januari hingga Juni 2012. Pembuatan hidrogel dilakukan di Laboratorium Material Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Uji FT-IR dilakukan di Laboratorium Penelitian Universitas Surabaya. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Uji pada hewan coba dilakukan di Unit Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Gelas *beaker*, pengaduk, *magnetic stirrer*, pipet, plat kaca, pisau, kandang, cawan petri, autoklaf, inkubator, *laminar airflow*, *vortex*, oven, ose, kuvet, tabung reaksi, *blank disc*, spektrofotometer FT-IR, *sterilisator* ultra violet, timbangan digital, mikroskop optik, mikrometer skrup.

### 3.2.2 Bahan

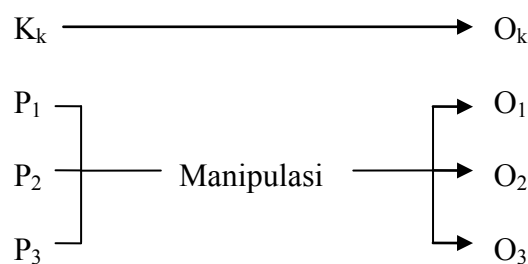
Alginat, poli vinil alkohol (PVA), ZnO nano, aquades, asam sitrat, bakteri *Staphylococcus aureus*, MSA (*Manitol Salt Agar*), MHA (*Mueller-Hinton Agar*), MHB (*Mueller-Hinton Broth*), mencit.

### 3.3 Desain Penelitian

Rancangan atau desain penelitian adalah sesuatu yang sangat penting dalam penelitian, yang memungkinkan pemaksimalan kontrol beberapa faktor yang bisa mempengaruhi akurasi suatu hasil (Nursalam, 2008).

#### 3.3.1 Desain Penelitian Uji *In Vitro*

Penelitian pada uji *in vitro* ini merupakan penelitian eksperimental kuasi. Pada penelitian eksperimental kuasi, tidak terdapat randomisasi untuk membentuk kelompok eksperimen (perlakuan) dan kelompok kontrol. Desain penelitian ini menggunakan desain penelitian *Static Group Design* atau biasa disebut *Non-Equivalent Posttest-Only Design*. Skema desain penelitian yang dipakai sebagai berikut:



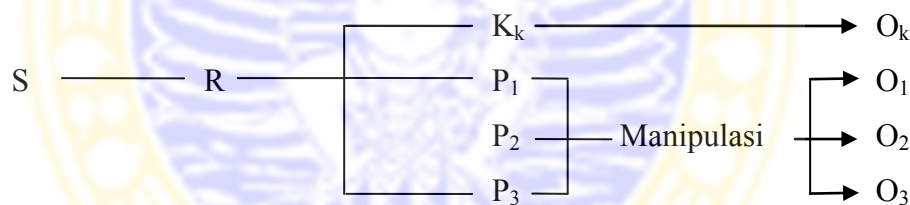
Gambar 3.1 Desain Penelitian Karakterisasi *In Vitro* Komposit Alginat – Poli Vinil Alkohol – ZnO Nano Sebagai *Wound Dressing* Antibakteri

Keterangan :

- $K_k$  : Kelompok kontrol. Hidrogel alginat – PVA tanpa ZnO nano (metode cakram kertas). Suspensi mikroba uji (metode pengenceran dalam tabung).
- $P_1$  : Kelompok perlakuan pertama. Hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,25%.
- $P_2$  : Kelompok perlakuan kedua. Hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,5%.
- $P_3$  : Kelompok perlakuan ketiga. Hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,75%.
- $O_{k123}$  : Observasi (pengukuran) *post-test*.

### 3.3.2 Desain Penelitian Uji *In Vivo*

Penelitian pada uji *in vivo* merupakan penelitian eksperimen murni (*True Experimental*). Kriteria penelitian *true experimental* terdiri dari adanya perlakuan, kontrol, replikasi, dan juga terdapat randomisasi. Desain penelitian ini menggunakan desain penelitian *Post-Test Control Group Design*. Skema desain penelitian yang dipakai sebagai berikut:



Gambar 3.2 Desain Penelitian Karakterisasi *In Vivo* Komposit Alginat – Poli Vinil Alkohol – ZnO Nano Sebagai *Wound Dressing* Antibakteri

Keterangan :

- $S$  : Sampel penelitian (hewan coba).
- $R$  : Randomisasi (acak).
- $K$  : Kelompok kontrol. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa steril dan NaCl 0,9% untuk menjaga kelembapan.
- $P_1$  : Kelompok perlakuan pertama. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,25%.
- $P_2$  : Kelompok perlakuan kedua. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,5%.

- $P_3$  : Kelompok perlakuan ketiga. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel alginat–PVA–ZnO nano 0,75%.
- $O_{k123}$  : Observasi (pengukuran) *post-test*.

### 3.4 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi adalah setiap subyek yang memenuhi kriteria yang telah ditetapkan (Nursalam, 2008). Notoatmodjo (2003) menyatakan bahwa populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti tersebut. Populasi penelitian pada uji *in vivo* ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan dari koloni yang sama, umur 2-3 bulan, berat 20-30 gram. Pembagian kelompok dilakukan dengan cara *sampling*. *Sampling* adalah proses menyeleksi porsi dari populasi untuk mewakili populasi. Teknik *sampling* merupakan cara-cara yang ditempuh dalam pengambilan sampel, agar memperoleh sampel yang benar-benar sesuai dengan keseluruhan obyek penelitian. Pemilihan sampel pada penelitian ini menggunakan cara *simple random sampling*. *Simple random sampling* merupakan pemilihan sampel dengan cara menyeleksi setiap elemen secara acak (Nursalam, 2008). Penjabaran rumus besar sampel (Soedigdo dan Sofyan, 1995):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi di dalam penelitian ini didapatkan jumlah sampel dari tiap kelompok adalah 4 ekor mencit (*Mus musculus*). Jumlah sampel secara keseluruhan

dibutuhkan 20 ekor mencit (*Mus musculus*). Hal tersebut diterapkan untuk mendukung terlaksananya penelitian ini sampai selesai dan menghindari terjadinya drop out pada sampel. Peneliti telah menetapkan kriteria sampel subyek penelitian sebagai berikut :

1. Usia sekitar 2-3 bulan.
2. Jenis kelamin yaitu jantan.
3. Berat badan antara 20-30 gram.
4. Sehat (mata jernih, bulu bersih, gerakan aktif).

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)**

Variabel bebas adalah variabel yang nilainya menentukan variabel lain (Nursalam, 2008). Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah hidrogel alginat–PVA dengan berbagai komposisi ZnO nano.

#### **3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)**

Variabel terikat adalah variabel yang nilainya ditentukan oleh variabel lain (Nursalam, 2008). Dalam penelitian ini, variabel terikatnya adalah Aktivitas antibakteri (diameter zona inhibisi) dan proses penyembuhan luka akut pada kulit mencit.

#### **3.5.3 Variabel Kendali (*Control Variable*)**

Variabel kendali adalah variabel pembaur yang dapat dikendalikan pada saat riset desain. Pengendalian dapat dilakukan dengan cara eksklusi dan inklusi atau dengan *blocking*, yaitu membagi obyek penelitian menjadi

kelompok-kelompok yang relatif homogen. Dalam penelitian ini, variabel kendalinya adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapat dari satu sumber biakan, umur mencit 2-3 bulan, jantan, berat badan 20-30 gram.

### 3.5.4 Definisi Operasional

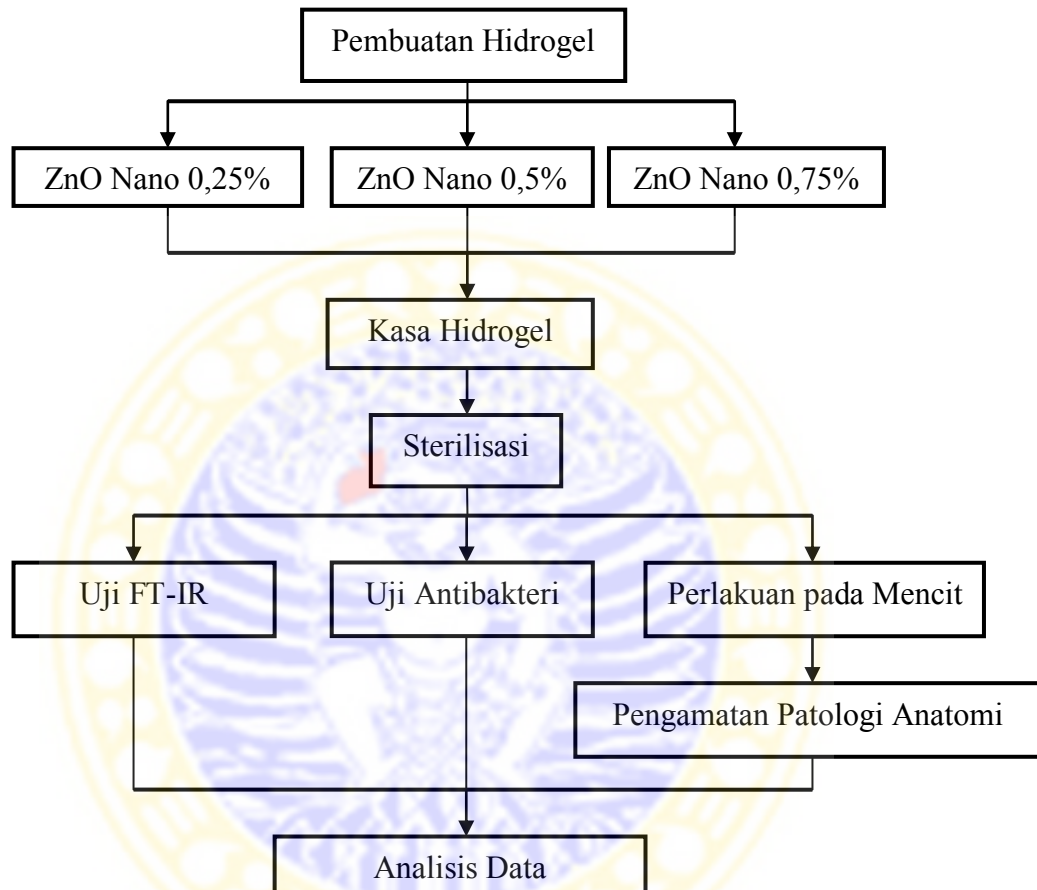
Tabel 3.1 Definisi Operasional dari Setiap Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Skala	Skor
Bebas : Kasa hidrogel alginat-PVA-ZnO nano	16 gram PVA dan 2 gram alginat dibuat dalam 200 ml larutan, dibagi menjadi 4, lalu ditambahkan ZnO nano dengan variasi 0,25%; 0,5%; dan 0,75%. Setelah itu diaduk pada stirrer suhu 70°C selama 60 menit. Larutan dituang dan diratakan pada plat kaca yang sudah dilapisi kasa steril sebelumnya.	Dilakukan perawatan luka akut dengan kasa hidrogel alginat-PVA-ZnO nano pada post insisi 3x1 hari			
Terikat : Aktivitas antibakteri hidrogel alginat-PVA-ZnO nano	Suatu sumuran yang terbentuk ketika ada suatu <i>agent</i> yang dapat menghambat pertumbuhan	Lebar zona inhibisi yang terbentuk	Mikrometer skrup (skala milimeter)	Rasio	Ukuran diameter zona inhibisi yang terbentuk

<p>Penyembuhan luka akut</p>	<p>bakteri, sehingga cenderung menjauh dan dapat pula dikatakan pada daerah tersebut, bakteri tidak dapat hidup.</p> <p>Suatu proses mekanisme tubuh dalam regenerasi jaringan-jaringan baru pada luka.</p>	<p>1. Fase Inflamasi :</p> <p>a. Jarak kemerahan pada tepi luka</p> <p>b. Jarak edema dari tepi luka</p> <p>c. Cairan atau pus: keluarnya cairan atau luka terlihat kering</p> <p>2. Fase Proliferasi</p> <p>a. Adanya granulasi : tampak ada jaringan baru (epitelisasi)</p> <p>b. Tepi luka menyatu dengan tepi luka yang lain</p>	<p>Penggaris</p> <p>Penggaris</p> <p>Lembar Observasi</p> <p>Lembar Observasi</p> <p>Lembar Observasi</p>	<p>Rasio</p> <p>Rasio</p> <p>Ordinal</p> <p>Ordinal</p> <p>Ordinal</p>	<p>Ukuran diameter kemerahan dari tepi luka</p> <p>Ukuran diameter edema dari tepi luka</p> <p>a. Tidak ada cairan = 3 b. Ada cairan = 2 c. Cairan + pus = 1</p> <p>a. Seluruh bagian luka = 3 b. Sebagian luka = 2 c. Tidak ada granulasi = 1</p> <p>a. Menyatu sempurna = 3 b. Terbuka sebagian = 2 c. Tidak menyatu sama sekali = 1</p>
------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.6 Prosedur Penelitian dan Pengambilan Data

Prosedur kerja yang dilakukan pada penelitian ini secara garis besar dapat dibuat dalam skema kerja berikut :



Gambar 3.3 Skema Kerja Penelitian

Prosedur kerja secara lengkap yang dilakukan pada penelitian ini meliputi :

#### 3.6.1 Pembuatan Hidrogel

Paduan 16 gram PVA dan 2 gram alginat dibuat dalam 200 ml larutan, lalu dibagi menjadi sampel K, A, B, dan C dengan ditambahkan variasi komposisi ZnO nano 0%, 0,25%, 0,5%, dan 0,75%. Masing-masing sampel diaduk secara homogen menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 70°C selama 1 jam. Hidrogel yang terbentuk, dituang lalu diratakan pada plat kaca yang sudah dilapisi kasa



steril sebelumnya. Hasil yang didapat dibiarkan pada suhu kamar sampai mengering.

### 3.6.2 Sterilisasi

Kasa hidrogel yang terbentuk dikemas dalam kantung plastik. Kasa disterilisasi menggunakan sinar UV dalam *laminar air flow* lalu disimpan untuk menghindari kontaminasi.

### 3.6.3 Uji FT-IR

Uji FT-IR dilakukan pada rentang bilangan gelombang 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Sebelumnya sampel dan serbuk KBr dihaluskan dalam satu cawan dengan penempa hingga halus dan merata kemudian dicetak dalam cetakan dan diberikan pembebanan hingga diperoleh sampel berbentuk palet tipis dengan ketebalan kurang dari 1 mm. Jika sampel tidak berupa padatan, maka dapat berupa larutan. Data yang diperoleh dari uji FT-IR berupa puncak spektrum serapan karakteristik gugus fungsi yang digambarkan sebagai kurva transmitansi (%) terhadap bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.6.4 Uji Antibakteri

Aktivitas antibakteri pada sampel diuji menggunakan metode cakram kertas dan metode pengenceran dalam tabung.

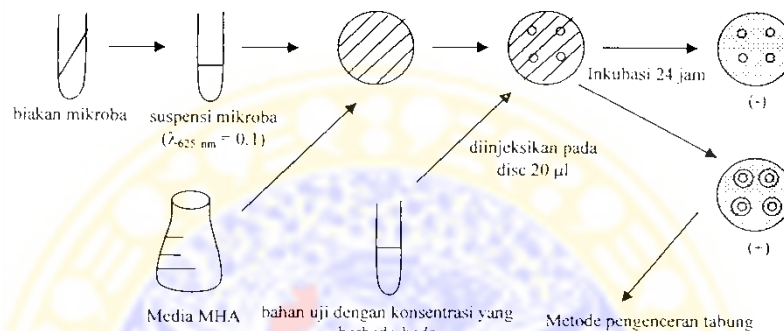
#### 3.6.4.1 Pembuatan Stok Mikroba Uji

Biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diperbanyak dalam tabung reaksi pada media agar miring dengan melarutkan MSA (*Manitol Salt Agar*) (111 g/l). Bakteri ditanam dengan metode gores (*streak*) dan diinkubasi dengan suhu 27°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dengan baik digunakan sebagai stok bakteri selama penelitian berlangsung.

#### 3.6.4.2 Metode Cakram Kertas (*Disc Diffusion Method*)

Media yang digunakan dalam uji cakram kertas adalah *Mueller-Hinton Agar*. Suspensi mikroba uji dibuat dengan OD 0,1 pada  $\lambda_{625 \text{ nm}}$ , sesuai dengan standar 0,5 Mc Farland. Sebanyak 0,1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan dalam cawan petri steril, kemudian ditambah 20 ml media MHA kedalam cawan tersebut dan dihomogenkan. Agar dibiarkan dingin dan memadat. Sebanyak 3 buah kertas cakram steril dengan diameter 0,5 mm dan ketebalan yang sama diletakkan di permukaan agar dengan jarak yang berjauhan dan sama. Pada kertas cakram tersebut diinjeksikan 20  $\mu\text{l}$  hidrogel alginat-PVA-ZnO nano dengan tiap cawan petri mewakili masing-masing konsentrasi (0,25; 0,5; dan 0,75% ZnO nano). Sebagai kontrol, pada kertas cakram diinjeksikan 20  $\mu\text{l}$  larutan alginat-PVA tanpa ZnO nano, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Penghambatan pertumbuhan ditunjukkan dengan terbentuknya daerah hambatan (*halo*) jernih di sekitar *paper disc* (Bailey dan Scott, 1994). Diameter daerah penghambatan diukur dengan mikrometer skrup. Diameter total (diameter *halo* dan diameter *paper disc*) dikurangi dengan diameter *paper disc* sehingga diperoleh nilai akhir

diameter daerah penghambatan. Uji cakram kertas dilanjutkan dengan uji pengenceran dalam tabung (*tube dilution method*) untuk menentukan nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*). Uji penghambatan dengan cakram kertas ditunjukkan pada Gambar 3.4.

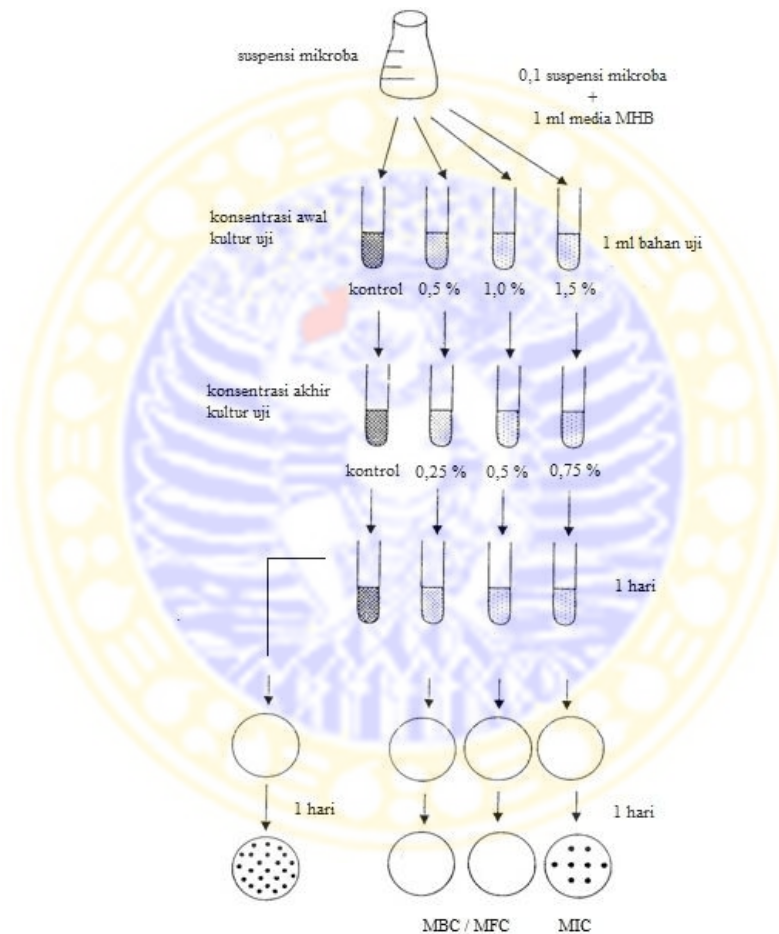


Gambar 3.4 Uji Penghambatan Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Cakram Kertas

### 3.6.4.3 Metode Pengenceran dalam Tabung (*Tube Dilution Method*)

Metode pengenceran dalam tabung dilakukan dengan membuat suspensi mikroba uji dengan OD 0,1 pada  $\lambda_{625 \text{ nm}}$ . Hidrogel alginat-PVA-ZnO nano dengan berbagai konsentrasi (0,5; 1,0; dan 1,5%) masing-masing sebanyak 1 ml diletakkan pada tabung reaksi yang berbeda, lalu 1 ml media MHB (*Mueller-Hinton Broth*) dan 0,1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi sehingga didapatkan konsentrasi akhir kultur uji yaitu 0,25; 0,5; dan 0,75%. Sebagai kontrol digunakan suspensi mikroba tanpa penambahan larutan alginat/PVA/ZnO nano. Kultur dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam. Apabila larutan berubah menjadi jernih, berarti tidak terjadi pertumbuhan sehingga terdapat aktivitas antimikroba. Dari kultur yang jernih diambil sebanyak 0,1 ml untuk ditumbuhkan pada cawan agar dan diinkubasi selama 24 jam. Ketika

terjadi pertumbuhan bakteri pada media agar, maka konsentrasi tersebut merupakan nilai MIC larutan alginat/PVA/ZnO nano dan apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada media agar tersebut, maka pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai MBC (Bailey dan Scott, 1994). Uji penghambatan dengan metode dilusi ditunjukkan pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Uji Penghambatan Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Pengenceran dalam Tabung

### 3.6.5 Perlakuan pada Hewan Coba (Mencit)

Hewan coba (mencit) dibiarkan beradaptasi selama 7 hari tanpa perlakuan apapun. Setelah 7 hari, mencit diberi perlakuan. Sebelum melakukan perlakuan,

mencit dibius terlebih dahulu dengan ketamin serta bulunya dicukur di daerah punggung (daerah yang akan dilukai). Dosis ketamin yang digunakan adalah 0.02 ml per 20 gram bobot badan. Penyayatan dilakukan setelah daerah yang akan disayat tersebut dioles dengan larutan antiseptik (alkohol). Luka yang diberikan sepanjang  $\pm 0,5-1$  cm dengan kedalaman yang sama. Mencit dipelihara dalam kandang individual dan diberi pakan berbentuk pelet serta air minum. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 20 ekor, tiap kelompok 4 ekor. Randomisasi : 20 ekor mencit dikelompokkan secara random lalu dibedakan menjadi 4 kelompok, sesuai tabel 3.2.

Tabel 3.2 Jenis Sampel Berdasarkan Pengelompokan Hewan Coba

No	Nama Sampel	Perlakuan Setelah Dilukai	Jumlah Mencit
1	K	kasa steril + NaCl 0,9%	4 ekor
2	P1	kasa hidrogel sampel A	4 ekor
3	P2	kasa hidrogel sampel B	4 ekor
4	P3	kasa hidrogel sampel C	4 ekor

Pengamatan patologi anatomi sampel dilakukan setiap hari dan perkembangannya dicatat pada lembar observasi.

### 3.7 Analisis Data

Hasil penelitian dari uji FT-IR dianalisis secara deskriptif, sedangkan hasil penelitian dari observasi makroskopis fase inflamasi dan fase proliferasi pada proses penyembuhan luka akut yang telah dilakukan, didapatkan data dari berbagai variasi pada tingkat percepatan waktu yang diperlukan oleh masing-masing fase dalam proses penyembuhan luka. Hasil observasi yang didapatkan,

dianalisa menggunakan uji *Two-Way* ANOVA. Sedangkan diameter zona inhibisi pada uji antibakteri dianalisis peneliti dengan menggunakan uji *One-Way* ANOVA.

### **3.8 Etik (*Etical Clearance*)**

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*). Pada penelitian ini, peneliti memegang prinsip etika hewan coba yaitu hewan coba setelah selesai digunakan sebagai subyek penelitian harus dimusnahkan yaitu dibunuh. Cara ini mudah dan tidak menimbulkan stres pada mencit serta aman (Smith, 1988). Hewan coba setelah dimanfaatkan untuk penelitian, tidak boleh dipergunakan sebagai hewan peliharaan maupun dikonsumsi.

### **3.9 Instrumen Penelitian**

Instrumen yang digunakan untuk menilai proses penyembuhan luka adalah lembar observasi berisi proses penyembuhan luka berdasarkan Gaylene (2000) dalam Watono (2007). Penyembuhan luka ditandai oleh: pada fase inflamasi (1) jarak kemerahan dari tepi luka, (2) jarak edema dari tepi luka, (3) tidak ada cairan/pus = 3, ada cairan = 2, ada cairan dan pus = 1. Sedangkan pada fase proliferasi (1) ada atau tidaknya granulasi jaringan, seluruh bagian luka = 3, sebagian = 2, tidak ada = 1, (2) tepi luka menyatu, menyatu sempurna = 3, terbuka sebagian = 2, tidak menyatu sama sekali = 1. Penilaian ini juga melibatkan dua orang relawan penilai yang sudah memahami proses penyembuhan luka untuk mengurangi bias dan subyektifitas penulis.