

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang akan menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only controlled group design*. Tikus penelitian didapat dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Pemilihan secara *random* yang dibagi menjadi 3 kelompok sebanyak 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur Sprague Dawley berumur 3- 4 bulan, dengan pengulangan sebanyak 6 kali, akan digunakan sebagai subjek penelitian. Adapun kelompok perlakuanya yaitu kelompok

- 1). Kelompok kontrol yaitu tikus yang diberi Luka bakar yang akan dibiarkan sembuh secara normal tanpa pemberian zat aktif,
- 2). Kelompok tikus yang diberi luka bakar, selama proses kesembuhan akan diberikan madu,
- 3). Kelompok tikus yang diberi zat aktif gentamisin topikal selama proses kesembuhan berlangsung.

Tabel 2. Jenis perlakuan penelitian dan dosis yang diberikan pada setiap perlakuan.

| No. | Hewan Percobaan | Jenis Perlakuan | Dosis |
|-----|-------------------------|-----------------|--------------|
| 1 | Tikus dengan Luka bakar | - | - |
| 2 | Tikus dengan Luka Bakar | Madu SNI | 100% |
| 3 | Tikus dengan Luka Bakar | Gentamisin | Gel 0,1%×5gr |

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya akan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Dengan waktu juni-September 2012.

C. Alat dan Bahan

- Pisau cukur dan gagangnya
- Tikus Putih
- Sarung tangan steril
- Bengkok
- Kom Steril
- Perlak
- Besi aluminium dengan diameter 2 cm
- Pemanas api
- Jas Lab
- Gunting Plester

- Pinset anatomis
- Obat anastesi
- Obat analgesic
- Aquadest
- Sduit + jarum
- Kassa steril
- Alkohol
- Arloji
- Madu SNI
- Gentamisin Topikal

D. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti.

Dalam penelitian ini Populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur Sprague Dawley berumur 3- 4 bulan.

2. Sampel

Menurut Frederer (1967), rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini

menggunakan 3 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 sampel ($n > 6$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 3 kelompok sehingga penelitian ini akan menggunakan 9 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Inklusi :

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan aktif).
2. Memiliki berat badan sekitar 200- 250 gram.
3. Berjenis kelamin betina.
4. Berusia sekitar 3- 4 bulan.

Ekslusi :

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
2. Mati selama masa pemberian perlakuan.

F. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

Zat aktif yang diberikan pada tikus putih.

2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Tingkat kesembuhan kulit tikus dengan luka bakar derajat II

G. Prosedur Penelitian

Sebelum dilakukan perlakuan kepada semua tikus laboratorium, terlebih dahulu tikus diadaptasikan dengan lingkungan lab selama tujuh hari kemudian dilanjutkan dengan prosedur penelitian berikutnya.

1. Pembuatan Luka Bakar derajat II

Cukur bagian punggung dari tikus putih. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan dosis 0,2 cc lidokain dalam 2 cc aquadest (Handian, 2006) atau suntikan secara interaperitoneal campuran 80 mg/kg *ketamine* dan 5 mg/kg *xylazine* (Turtay dkk, 2010). Pada Penelitian ini dipilih cara anestesi dengan menggunakan lidokain. Kulit diinduksi dengan logam berdiameter dua centimeter bersuhu tinggi. Tempelkan besi pada kulit tikus yang telah disiapkan selama 7 detik.

2. Prosedur penanganan Luka Bakar Derajat II

Penanganan dilakukan sebanyak dua kali sehari dan selalu dibersihkan sebelum mengaplikasikan madu dan gentamisin topikal ke tikus putih dengan cara, membersihkannya dengan air aquades. Berikut runtutan prosedur penanganan luka bakar yang akan di aplikasikan.

- a. Tempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah lukayang akan dirawat
- b. Atur posisi tikus untuk mempermudah tindakan
- c. Dekatkan bengkok danplastik
- d. Pakai sarung tangan steril
- e. Siapkan kasa
- f. Madu

Olesi bagian luka yang telah terinfeksi dengan kasa yangtelah dibasahi dengan Madu SNI setebal 2 mm hingga menutup seluruhpermukaan luka

Gentamisin Topikal

Olesi bagian luka yang telah terinfeksi dengan menggunakan gentamisin topikal untuk kelompok perlakuan dengan gentamisin topikal setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan gentamisin topikal.

- g. Tutup luka dengan kasasteril
- h. Untuk kelompok kontrol balutan tanpa diberikan apapun.

3. Prosedur operasional pembuatan slide

Metode pembuatan preparat histopatologi Bagian Patologi Anatomi Laboratorium PA Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (2012):

a) Prosedur pembuatan slide :

1) Organ telah dipotong secara representatif dan telah difiksasi menggunakan formalin 10% selama 3 jam.

2) Bilas dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali.

3) Dehidrasi dengan:

- Alkohol 70% selama 0,5 jam
- Alkohol 96% 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
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam

4) *Clearing* dengan menggunakan:

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I dan II masing-masing selama 1 jam.

5) Impregnasi dengan parafin selama 1 jam 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 60°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 5 menit
- Larutan *xylol* II selama 5 menit
- Ethanol absolut selama 1 jam

2) *Hydrasi* dalam:

- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol 70% selama 2 menit
- Air selama 10 menit

3) Pulasan Inti dibuat dengan menggunakan:

- Haris Hematoksilin selama 15 menit
- Air mengalir
- Eosin selama maksimal 1 menit

4) Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan

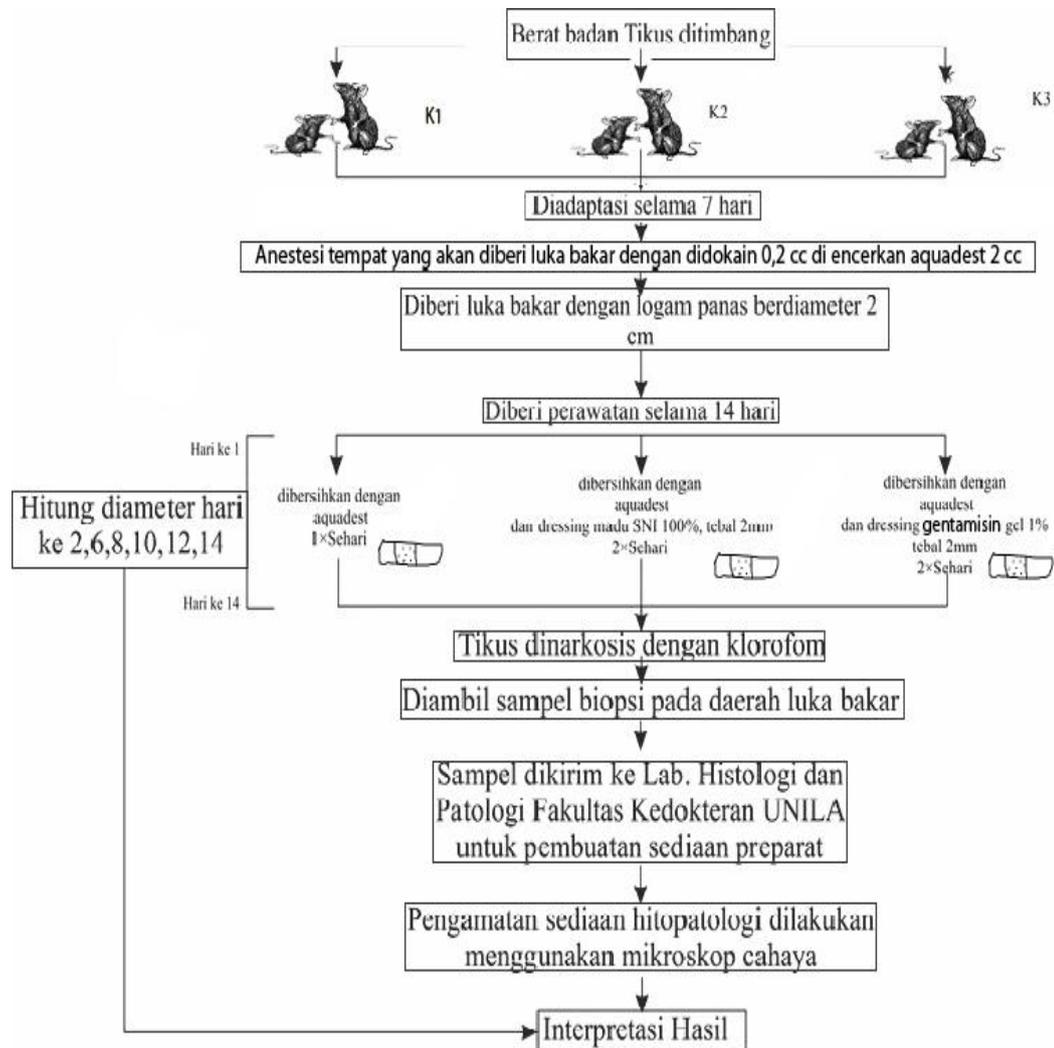
- Alkohol 70% selama 2 menit
- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol absolut 2 menit

5) Penjernihan:

- *Xylol* I selama 2 menit
- *Xylol* II selama 2 menit

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

4. Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram alur penelitian

H. Definisi Operasional

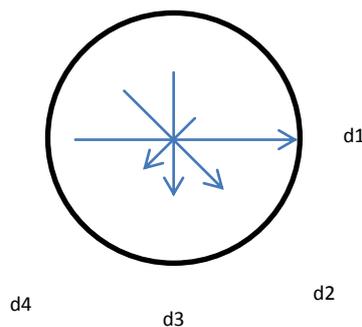
Tabel 3. Defisi Operasional

| Variabel | Definisi | Skala |
|---|--|-----------|
| Dosis madu yang diberikan kepada tikus percobaan | Dosis madu yang diberikan adalah dosis dressing topikal yang dipakai pada manusia yaitu madu dengan konsentrasi 100% yang diaplikasikan secukupnya terhadap luka. | Numerik |
| Gambaran histopatologi kulit Tikus | <p>Sediaan histopatologi dilihat dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang dan diamati apakah terdapat reepitelisasi, sel radang, dan <i>scab</i> pada daerah luka bakar.</p> <p>Skoring untuk reepitelisasi</p> <p>1 : jika tidak ada reepitelisasi 2 : 1/4 area luka bakar 3 : 2/4 area luka bakar 4 : 3/4 area luka bakar 5 : Lebih dari 3/4 area luka bakar</p> <p>Skoring untuk sel radang:</p> <p>1 : sel radang menyebar dengan kepadatan sangat rapat (>79 sel per lapang pandang) 2 : : sel radang menyebar dengan kepadatan rapat (40 sampai 79 sel per lapang pandang) 3 : sel radang menyebar dengan kepadatan sedang (20 sampai 39 sel per lapang pandang) 4 : sel radang menyebar dengan kepadatan rendah (1 sampai 19 sel per lapang pandang) 5. : tidak ada sel radang</p> <p>Skor untuk scab:</p> <p>1 : scab memenuhi >3/4 permukaan epitel 2 : scab memenuhi 3/4 permukaan epitel 3 : scab memenuhi 2/4 permukaan epitel 4 : scab memenuhi 1/4 permukaan epitel 5 : scab memenuhi <1/4 permukaan epitel</p> | Kategorik |
| Gambaran klinis kulit Tikus | <p>Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata diameter penyembuhan luka yang dihitung setiap hari kemudian dihitung persentase dengan rumus</p> $px = \left(\frac{d1-dx}{d1} \right) \times 100\%$ <p>dengan hari pertama sebagai acuan.</p> | Numerik |
| Madu SNI | Madu yang sudah terstandarisasi sesuai dengan kriteria pada BSN (Badan Standarisasi Nasional) yaitu dengan kandungan Aktifitas enzim diastase 3 DN, Hidroksimetilfurfural 50 Mg/kg, Air 22 %b/b, Gula Pereduksi 65 %b/b, Sukrosa 5 %b/b, Keasaman 50 ml NaOH 1 N/kg, Padatan yang tak larut dalam air 0,5 %b/b, Abu 0,5 %b/b, Timbal 1,0 Mg/kg, Tembaga 5,0 Mg/kg, Cemarasi Arsen 0,5 mg/kg | |
| Luka Bakar Derajat II | Lesi mencapai kedalaman dermis namun masih terdapat epitel vital yang bisa menjadi dasar regenerasi dan epitelisasi. Gambaran luka bakar berupa gelembung atau bula yang berisi cairan eksudat dari pembuluh darah karena perubahan permeabilitas dindingnya. Ukuran 2 cm | Ordinal |

I. Cara Pengumpulan Data

1. Makroskopis

Dalam penelitian ini digunakan teknik Observasi eksperimen, dimana sampel dibagi menjadi 3 kelompok kemudian dilakukan pengamatan setiap hari untuk melihat penyembuhan secara makroskopis. Pengamatan ini dilakukan mulai awal dari mulai pemberian terapi sampai hari terakhir penyembuhan untuk mengetahui perubahannya dengan batas waktu penelitian selama 14 hari. Diameter luka bakar rata-rata dihitung dengan cara



Gambar 4. Diameter Luka Bakar

Diameter luka didapat dengan rumus:

$$dx = \frac{d1+d2+d3+d4}{4} \dots (1)$$

Keterangan :

dx = Diameter hari ke x

d1 = Diameter 1

d2 = Diameter 2

d3 = Diameter 3

d4 = Diameter 4

Lalu untuk mengukur persentase kesembuhan dilakukan dengan menggunakan rumus

$$px = \left(\frac{d1-dx}{d1} \right) \times 100\% \dots (2)$$

Keterangan :

Px = Persentase hari ke x

d1= diameter hari ke 1

dx= diameter hari ke x

2. Histopatologi

Penyembuhan diobservasi pada stase penyembuhan satu dan dua yaitu, Fase Inflamasi dan Fase Proliferasi. Sampel biopsi diambil pada hari ke 14. Gambaran yang dinilai adalah panjang reepitelisasi, sel radang dan scab dengan sistem scoring pada pembesaran 40x (scor lesio pada kulit):

Skoring untuk reepitelisasi

- 1 : jika tidak ada reepitelisasi
- 2 : 1/4 area luka bakar
- 3 : 2/4 area luka bakar
- 4 : 3/4 area luka bakar
- 5 : Lebih dari 3/4 area luka bakar

Skoring untuk sel radang:

- 1 : sel radang menyebar dengan kepadatan sangat rapat (>79 sel per lapang pandang)
- 2 : sel radang menyebar dengan kepadatan rapat (40 sampai 79 sel per lapang pandang)
- 3 : sel radang menyebar dengan kepadatan sedang (20 sampai 39 sel per lapang pandang)
- 4 : sel radang menyebar dengan kepadatan rendah (1 sampai 19 sel per lapang pandang)
- 5. : tidak ada sel radang

Skor untuk scab:

- 1 : scab memenuhi $>3/4$ permukaan epitel
- 2 : scab memenuhi $3/4$ permukaan epitel
- 3 : scab memenuhi $2/4$ permukaan epitel
- 4 : scab memenuhi $1/4$ permukaan epitel
- 5 : scab memenuhi $<1/4$ permukaan epitel

Nilai rata-rata pengambilan skor: $\frac{S1+S2+S3}{3} = Sr$

Catatan:

- 1 Apabila hasil rata-rata skor didapatkan bentuk koma 0,33 maka dibulatkan menjadi nilai skor dibawahnya. Contoh: 4,33 maka akan dibulatkan menjadi skor 4.
- 2 Apabila hasil rata-rata skor didapatkan bentuk koma 0,66 maka dibulatkan menjadi nilai skor diatasnya. Contoh: 4,66 maka dibulatkan menjadi skor 5.

J. Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengukuran diameter yang dihasilkan dari penelitian ini selanjutnya dibuat rataannya dan dihitung simpangannya dengan menggunakan standard deviasi (rerata \pm SD). Selanjutnya data yang didapat pada penelitian ini dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$) dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 17.0 for windows (Mattjik dan Sumertajaya 2006).