

III. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan evaluasi baik secara makroskopis ataupun mikroskopis.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian akan dilaksanakan selama 3 minggu. Pengamatan secara makroskopis dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan dan pengamatan preparat secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Proses pembuatan dan pengawetan jaringan ALS-R dilakukan oleh Bank Jaringan Riset Batan (BJRB).

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus galur *Wistary* yang didapatkan dari penyedia fasilitas Balai Penelitian Ternak yang disertai surat keterangan sehat dari Rumah Sakit Hewan Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Indonesia. Alasan penggunaan tikus *Wistar* yaitu adanya kemiripan

permeabilitas kulit tikus dengan kulit manusia terutama pada bagian pipi, leher dan inguinal (Harada *et al.*, 1993). Sampel yang diambil adalah tikus yang memenuhi kriteria berikut :

3.3.1 Kriteria Inklusi

Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur Wistarberjenis kelamin jantan, berat badan tikus normal (190-260 gram), umur 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi, pada pengamatan visual tampak sehat, aktif bergerak dan tidak terdapat kelainan anatomis.

3.3.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) yang memiliki bekas luka di daerah dorsal atau memiliki kelainan pada kulit di bagian dorsal, terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% selama adaptasi, kondisi sakit (penampakan rambut kusam, rontok, aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus genital).

3.3.3 Besar Sampel

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (Federer, 1967), yaitu:

$$(T - 1)(N - 1) \geq 15$$

Keterangan : T = jumlah perlakuan, N = jumlah sampel

Dalam penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan yaitu :

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

$$(2)(N - 1) \geq 15$$

$$(N - 1) \geq \frac{15}{2}$$

$$N - 1 \geq 7,5$$

$$N \geq 8,5, \text{ dibulatkan menjadi } 9$$

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah sampel yang dibutuhkan minimal 9 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah 9 ekor tikus dalam setiap kelompok penelitian sehingga jumlah keseluruhan sampel yang digunakan adalah sebanyak 27 ekor tikus. Jumlah minimal sampel ditambahkan 10 % untuk mengantisipasi adanya *drop out*. Sehingga, dibutuhkan 30 sampel tikus untuk penelitian ini. Secara acak, sampel dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok negatif, dan 1 kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:

- Kelompok Kontrol (K) yang dibersihkan dengan akuades 2x sehari : 9 ekor tikus
- Kelompok Perlakuan 1(P1) yang diberikan salep Silver Sulfadiazin 2x sehari : 9 ekor tikus
- Kelompok Perlakuan 2 (P2) yang diberikan perban ALS-R : 9 ekor tikus

3.4 Identifikasi Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah perban biologis berupa Amnion Liofilisasi Steril Radiasi (ALS-R) dan Silver Sulfadiazine.

3.4.2 Variabel Terikat

Secara makroskopis, variabel terikat penelitian ini berupa waktu penyembuhan luka, infeksi lokal dan reaksi alergi. Secara mikroskopis, variabel terikat berupa derajat re-epitelisasi penyembuhan luka.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas						
1	Perban ALS-R	Selaput ketuban yang diproses secara liofilisasi kemudian disterilkan dengan radiasi sinar γ . ALS-R diperoleh dari Bank Jaringan BATAN	Lembar observasi	Hasil observasi dinilai dengan skor Nagaoka	Parameter kesembuhan terhadap kelompok perlakuan	Kategorik
2	Silver Sulfadiazine	Obat silver sulfadiazine dengan merk dagang Burnazine yang diproduksi oleh Darya-Varia Laboratoria, Gunung Putri, Bogor-Indonesia yang masih tersegel dengan baik dan dipakai secara topikal 2 kali sehari	Lembar observasi	Hasil observasi dinilai dengan skor Nagaoka	Parameter kesembuhan terhadap kelompok kontrol positif	Kategorik

Tabel 1. (Lanjutan)

Variabel Terikat						
3	Waktu Penyembuhan Luka	Waktu perbaikan jaringan luka bakar yang ditandai dengan tidak adanya edema, eritema, bulla, erosi, eksudat, vesikula maupun nekrosis jaringan	Lembar observasi	Hasil observasi dinilai dengan skor Nagaoka	1= di atas 14 hari 2= antara 7-14 hari 3= di bawah 7 hari	Ordinal
4	Infeksi Lokal	Kerusakan jaringan yang spesifik dan terbatas akibat invasi mikroba berupa adanya tanda kalor, rubor, tumor	Lembar observasi	Hasil observasi dinilai dengan skor Nagaoka	1= infeksi lokal disertai dengan pus 2= infeksi lokal tanpa disertai pus 3= tidak ada infeksi lokal	Ordinal
5	Reaksi Alergi	Berupa warna bintik merah di sekitar luka	Lembar observasi	Hasil observasi dinilai dengan skor Nagaoka	1= reaksi alergi lokal berupa warna bintik merah sekitar luka 3= tidak ada reaksi alergi	Ordinal
6	Re-epitelisasi	Tahapan penyembuhan luka yang ditandai dengan pembentukan epitel baru yang menutup sempurna. Penilaian dilakukan oleh spesialis patologi anatomi.	Mikroskop <i>Olympus</i>	Hasil observasi dinilai dengan perbesaran 100x	1= epitel tidak menutup sempurna 2 = epitel menutup sempurna	Nominal

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat Penelitian

1. Plat besi berdiameter 1,5 cm
2. *Hot Plate Magnetic stirrer*
3. *Beker glass*
4. Gunting dan Pinset
5. Pisau cukur
6. Kandang hewan coba
7. Timbangan
8. Termometer
9. Spatula
10. Mikroskop
11. *Object glass* dan penutupnya
12. Sduit dan jarum
13. Penggaris

3.6.2 Bahan Penelitian

1. Amnion Liofilisasi Steril (ALS-R)
2. Salep silver sulfadiazine
3. NaCl Fisiologis
4. Formalin 10%
5. Ketamine
6. Xylazine
7. Eter
8. Etanol

9. Xylol
10. Entelan
11. Alkohol
12. Akuades
13. Kain kasa steril
14. *Hematoxylin Eosin*
15. Pakan dan minum tikus

3. 7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan

3.7.1.1 Aklimatisasi Hewan Uji

Sebelum dilakukan percobaan, dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu pada semua hewan sampel di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama satu minggu. Hewan diadaptasikan dengan lingkungan barunya, makanan dan minumannya. Pemberian makanannya dengan pakan standar secara *ad libitum*.

3.7.1.2 Pembuatan Alat Luka Bakar

Menggunakan plat besi yang mempunyai diameter penampang 1,5 cm disertai gagang yang mempermudah dalam pembuatan luka bakar pada tikus.

3.7.1.3 ALS-R *handling*

Perban ALS-R yang telah melalui proses radiasi dikemas dengan baik dalam kantong plastik poli etilen dan dihindarkan

dari cahaya matahari langsung. ALS-R dikirimkan dari BJRB Jakarta ke Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur darat untuk menghindari kerusakan akibat perubahan tekanan atmosfer. Untuk menjaga kualitas dan sterilitas jaringan, kemasan yang rusak atau terbuka akibat pemakaian (jaringan sisa) tidak boleh digunakan lagi.

3.7.2 Tahap Pengujian

3.7.2.1 Induksi Luka Bakar Derajat II

Sebelum melakukan perlakuan, bulu disekitar punggung dicukur sesuai dengan luas area luka bakar yang diinginkan. Lakukan anestesi eter secara inhalasi sebelum perlakuan. Alat pembuat luka yang terbuat dari plat berukuran diameter 1,5 cm dicelupkan ke air panas 100⁰C selama 5 menit, kemudian ditempelkan pada kulit tikus yang telah dianastesi selama 10 detik. Masing-masing tikus diberikan luka bakar dengan diameter 1,5 cm (Ahliadi, 2014).

3.7.2.2 Pemberian Terapi

Setelah dilakukan perlukaan, perlakuan diberikan sesuai dengan kelompok yang sudah ditentukan. Perlakuan pada kelompok kontrol dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore hari) hingga menutup seluruh permukaan luka kemudian ditutup dengan kasa steril. Kelompok kontrol positif diolesi silver sulfadiazine setebal 2 mm. Pada kelompok perlakuan, luka pada hewan percobaan ditutup dengan amnion liofilisasi steril-radiasi (ALS-R). Perlakuan dilakukan selama

15 hari sesuai dengan durasi kesembuhan luka bakar derajat II. Terapi yang dilakukan secara topikal sesuai dengan luas dari luka.

3.7.2.3 Pengambilan Jaringan

Setelah 14 hari, dilakukan biopsi pada jaringan kulit bekas luka pada hari ke-15. Hewan uji dianastesi dengan menggunakan ketamine-xylazine dengan dosis 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara intraperitoneal dengan durasi 10 – 30 menit, selanjutnya akan dilakukan dislokasi servikal untuk menterminasikan tikus. Bagian tubuh tikus yang tidak diambil untuk sampel jaringan dikuburkan (*American Veterinary Medical Association*, 2013). Pengambilan jaringan menggunakan alat bedah minor yang steril. Kulit kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis dan dimasukkan ke dalam pot sampel yang berisi formalin 10% selama 48 jam. Dikirimkan ketempat pembuatan preparat dibagian Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.7.2.4 Pembuatan Preparat

Metode pembuatan preparat histopatologi Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

a. Prosedur Pembuatan *slide* preparat

- 1) Organ yang telah dipotong secara melintang 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* sisa alkohol dengan menggunakan *xylol* I dan II masing-masing selama 1 jam.

5) Impregnansi dengan parafin selama 1 jam dalam *oven* suhu 65⁰ 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 *Hematoxylin Eosin (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
 - Etanol 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 :
- Hematoksilin selama 15 menit
 - Air mengalir
 - Eosin selama 1 menit
- 4) Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan
- Alkohol 70% selama 2 menit
 - Alkohol 96% selama 2 menit
 - Alkohol absolut selama 2 menit
- 5) Penjernihan :
- *Xylol* I selama 2 menit
 - *Xylol* II selama 2 menit.
- 6) *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*.

3.7.2.5 Pengambilan Gambar Histopatologi

Preparat diamati pada tepi luka dalam proses penyembuhan luka menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* perbesaran 100x. Foto diambil dengan perbesaran 100x.

3.7.2.6 Cara Penilaian Makroskopis

Penilaian gambaran klinis penyembuhan kulit tikus dilakukan setiap hari selama 15 hari masa perlakuan. Penilaian makroskopis mencakup tanda-tanda infeksi, alergi dan lamanya waktu penyembuhandengan memakai kriteria Nagaoka (2000) sebagai berikut:

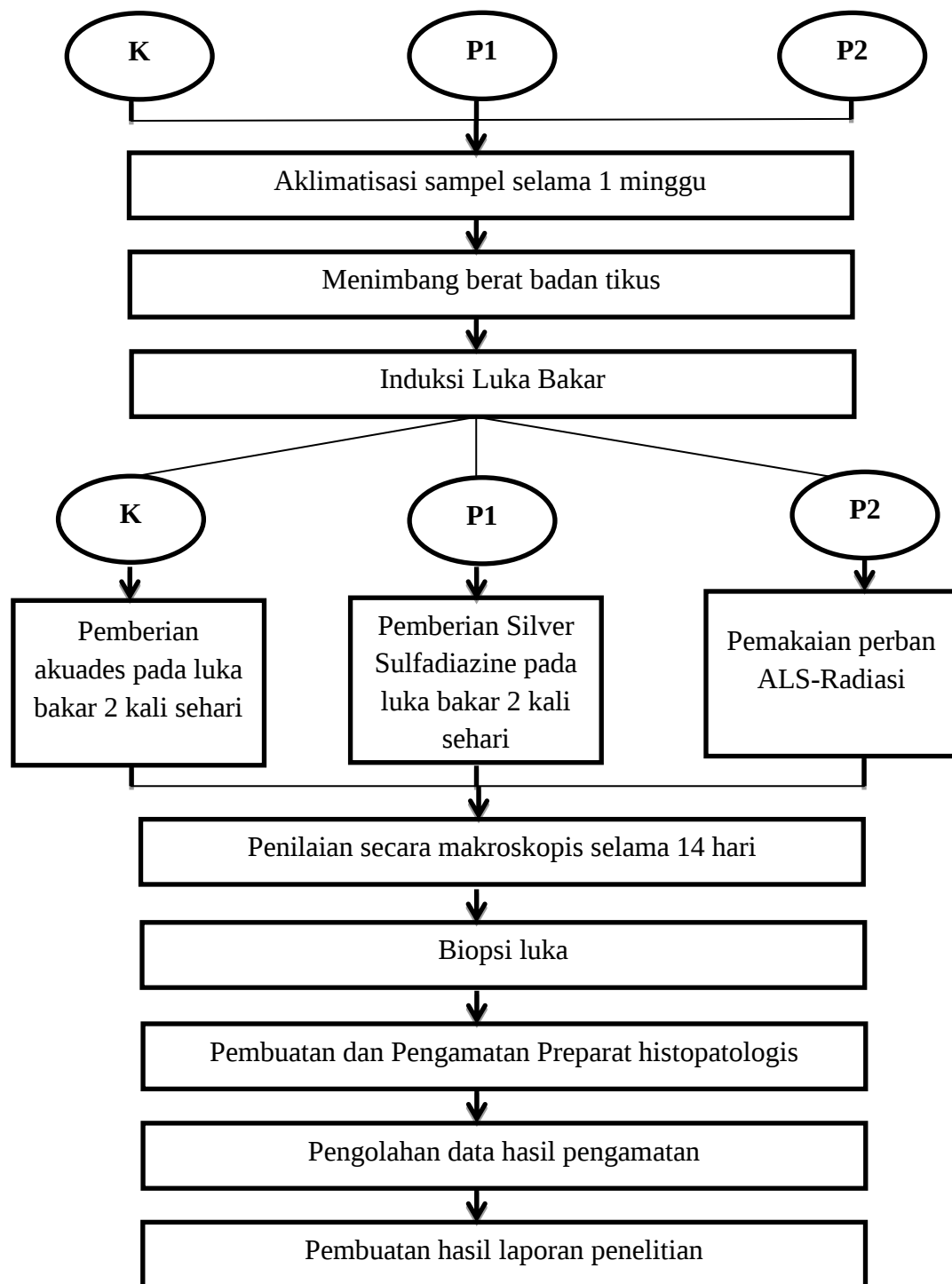
Tabel 2.Skor Penilaian Makroskopis Kriteria Nagaoka (Nagaoka *et al.*, 2000)

Parameter dan Deskripsi	Skor
Waktu Penyembuhan Luka	
▪ Di bawah 7 hari	3
▪ Antara 7 – 14 hari	2
▪ Di atas 14 hari	1
Infeksi Lokal	
▪ Tidak ada tanda infeksi lokal	3
▪ Infeksi lokal tanpa disertai pus	2
▪ Infeksi lokal disertai dengan pus	1
Reaksi Alergi	
▪ Tidak ada reaksi alergi	3
▪ Reaksi alergi lokal berupa warna bintik merah sekitar luka	1

3.7.2.6 Cara Penilaian Mikroskopis

Penilaian mikroskopis penyembuhan luka pada ketiga kelompok binatang percobaan menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari biopsi insisi luka berupa tingkat pembentukan epitelisasi. Sampel biopsi diambil 1 kali dan dilakukan bersamaan pada hari ke-15 (Manjas *et al.*, 2010).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

3. 9 Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian pengaruh amnion liofilisasi steril-radiasi (ALS-R) sebagai perban biologis terhadap kecepatan penyembuhan luka bakar derajat II pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan dianalisis dengan menggunakan *software* statistik. Data pada penelitian ini berupa variabel kategorik-ordinal lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan. Hasil penelitian akan dianalisis menggunakan uji hipotesis komparatif kategorik tidak berpasangan *Chi-square*, bila tidak memenuhi syarat maka data akan dianalisis menggunakan uji alternatifnya yaitu uji Kolmogorov-Smirnov dan uji Fisher.

3.10 Kaji Etik

Pelaksanaan penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan *ethical clearance* nomor 2562/UN26/8/DT/2015 yang dikeluarkan tanggal 1 Desember 2015.