

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *controlled group post test only design* dengan menggunakan hewan percobaan (tikus).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan, bulan November, Desember dan Januari.

2. Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sedangkan pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Dan untuk uji taksonomi tumbuhan jarak pagar dilakukan di laboratorium botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu : alkohol 70%, getah jarak pagar, krim vaselin, tikus putih jantan dewasa galur *Sprague dawley*, pakan dan minum tikus.

2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin meliputi : larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, xylol, pewarna Hematoksilin, Eosin dan Emelan.

3. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01g untuk menimbang berat tikus putih jantan dewasa, pisau cukur dan gagangnya, gunting untuk mencukur rambut tikus, penggaris, sarung tangan steril, bengkok, kom, silet, jas lab, gunting, obat anestesi Ketamine dan Xylazine, plester, pinset anatomis, spuit 1cc dan jarum suntik, kassa steril, arloji, kandang serta botol minum tikus, mikroskop binokuler, *object glass*, *cover glass*, *deck glass*, *tissue cassette*, *rotary microtome*, oven, *water bath*, *platening table*, *autotechnicom processor*, *staining jar*, *staining rak*, kertas saring, histoplast, dan *paraffin dispenser*.

D. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Dalam penelitian ini Populasi yang akan digunakan adalah tikus, yang didapat dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Pemilihan secara *random* yang dibagi menjadi 4 kelompok. Tikus putih jantan galur *Sprague dawley* berumur \pm 4-5 bulan.

2. Sampel penelitian

Hewan penelitian yang dipakai adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* umur \pm 4-5 bulan dengan berat badan rerata antara \pm 200-250 gram. Sampel penelitian dipilih secara *sample random sampling*. Dibagi menjadi 4 kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*. Selama penelitian, semua tikus diberi makan dan minum secukupnya.

Menurut Dahlan (2008) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan: $(t-1)(r-1) > 15$. Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan r merupakan jumlah sampel tiap kelompok.

Penelitian ini akan menggunakan 4 kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi:

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

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

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

$$3r - 3 \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 18/3$$

$$r \geq 6$$

Jadi sampel yang akan digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor tikus dengan 1 tikus putih sebagai cadangan pada masing-masing kelompok sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 28 ekor.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Inklusi :

- Tikus diketahui sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan aktif).
- Memiliki berat badan sekitar $\pm 200-250$ gram.
- Berjenis kelamin jantan.
- Berusia sekitar $\pm 4-5$ bulan.

2. Eksklusi :

- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- b. Mati selama masa pemberian perlakuan.

F. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

Getah jarak pagar secara topikal yang diberikan pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sparaque dawley*.

2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Tingkat penyembuhan terhadap luka iris.

G. Prosedur Penelitian

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

Adapun kelompok perlakuannya yaitu sebagai berikut :

- 1). Kelompok 1 yaitu kelompok yang diberi luka iris dan dirawat lukanya dengan pembersihan luka menggunakan akuades dua kali sehari selama 8 hari.

- 2). Kelompok 2 yaitu kelompok yang diberi luka iris, selama proses penyembuhan akan diberikan getah jarak pagar + vaselin dengan kandungan getah jarak pagar sebesar 75% sebanyak dua kali sehari selama 8 hari.
- 3). Kelompok 3 yaitu kelompok yang diberi luka iris, selama proses penyembuhan akan diberikan getah jarak pagar + vaselin dengan kandungan getah jarak pagar sebesar 100% sebanyak dua kali sehari selama 8 hari.
- 4). Kelompok 4 yaitu kelompok yang diberi luka iris, selama proses penyembuhan akan diberikan Bioplacenton gel sebanyak dua kali sehari selama 8 hari.

1. Pengumpulan Getah Jarak Pagar

Patahkan tangkai daun atau potong tunas muda dari tanaman jarak pagar lalu tampung pada tabung sampel atau wadah yang telah disediakan. Setelah getah cukup untuk dijadikan bahan pengobatan, tabung sampel atau wadah segera ditutup rapat dan masukkan kedalam pendingin agar bisa bertahan. Menurut uji pendahuluan, setelah getah diambil, getah tidak menggumpal ataupun mencair, namun mengalami perubahan warna dari bening sedikit keruh menjadi putih keruh sedikit kemerahan.

Menurut Safriyani (2012), Agar kesegaran getah jarak pagar tetap terjaga, maka getah diambil sehari sebelum perlakuan dimulai. Getah jarak pagar tanpa disimpan dilemari pendingin dan dengan suhu atmosfer ± 28 derajat selsius dapat bertahan selama 5 hari (getah seberat 7 gram) dengan

penyusutan disetiap harinya tanpa perubahan fungsi dari kandungan getah itu sendiri. Sedangkan bila disimpan dalam lemari pendingin dapat bertahan selama ± 15 hari (getah seberat 7 gram) dengan penyusutan yang kurang berarti tanpa mengalami perubahan fungsi dari kandungan getah itu sendiri.

2. Pembuatan Luka Iris

Cukur bagian punggung dari tikus. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka iris dengan Ketamine dosis 100 mg/kg ditambah Xylazine dosis 10 mg/kg (American Veterinary Medical Association (AVMA), 2013). Kulit dilukai dengan skalpel sepanjang 2 cm dengan kedalaman ± 1 mm.

3. Prosedur Penanganan Luka Iris

Penanganan dilakukan sebanyak dua kali sehari dan selalu dibersihkan sebelum mengaplikasikan vaselin getah jarak dan bioplasenton gel dengan cara, membersihkannya dengan air aquades. Berikut runtutan prosedur penanganan luka iris yang akan di aplikasikan.

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

f. Getah jarak pagar

Olesi bagian luka dengan kasa yang telah diberi getah jarak pagar hingga menutupi seluruh penutupan luka.

g. Vaselin getah jarak pagar

Olesi bagian luka yang telah terinfeksi dengan kasa yang telah dibasahi dengan vaselin getah jarak pagar hingga menutupi seluruh permukaan luka.

Bioplasenton gel

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

h. Tutup luka dengan kasa steril.

i. Untuk kelompok kontrol negatif, luka iris hanya dirawat dengan membersihkan luka menggunakan akuades.

4. **Prosedur Operasional Pembuatan *Slide***

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

a. Prosedur pembuatan *slide* :

1. Organ telah dipotong secara melintang 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 absolute selama 1 jam
- Alkohol absolute selama 1 jam
- Alkohol absolute selama 1 jam
- Alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam

4. *Clearing* dengan menggunakan :

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

5. Impregnasi dengan paraffin selama 1 jam dengan oven suhu 65 derajat *celcius*.

6. Pembuatan blok paraffin :

Sebelum dilakukan pemotongan blok paraffin, paraffin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan *rotary microtome* dengan menggunakan *disposable knife*. Pita paraffin dimekarkan pada *water bath* dengan suhu 60 derajat *celcius*. Dilanjutkan pada pewarnaan Hematoksilin dan Eosin.

b. Prosedur pulasan HE :

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan kedalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut

1. Dilakukan deparafinisasi dalam :

- Larutan *xylol* I selama 5 menit
- Larutan *xylol* II selama 5 menit
- Ethanol absolute selama 1 jam

2. Hidrasi dalam :

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

3. Pulasan inti dibuat dengan menggunakan :

- Harris hematoksilin selama 15 menit
- Air mengalir
- Eosin selama maksimal 1 menit

4. Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan :

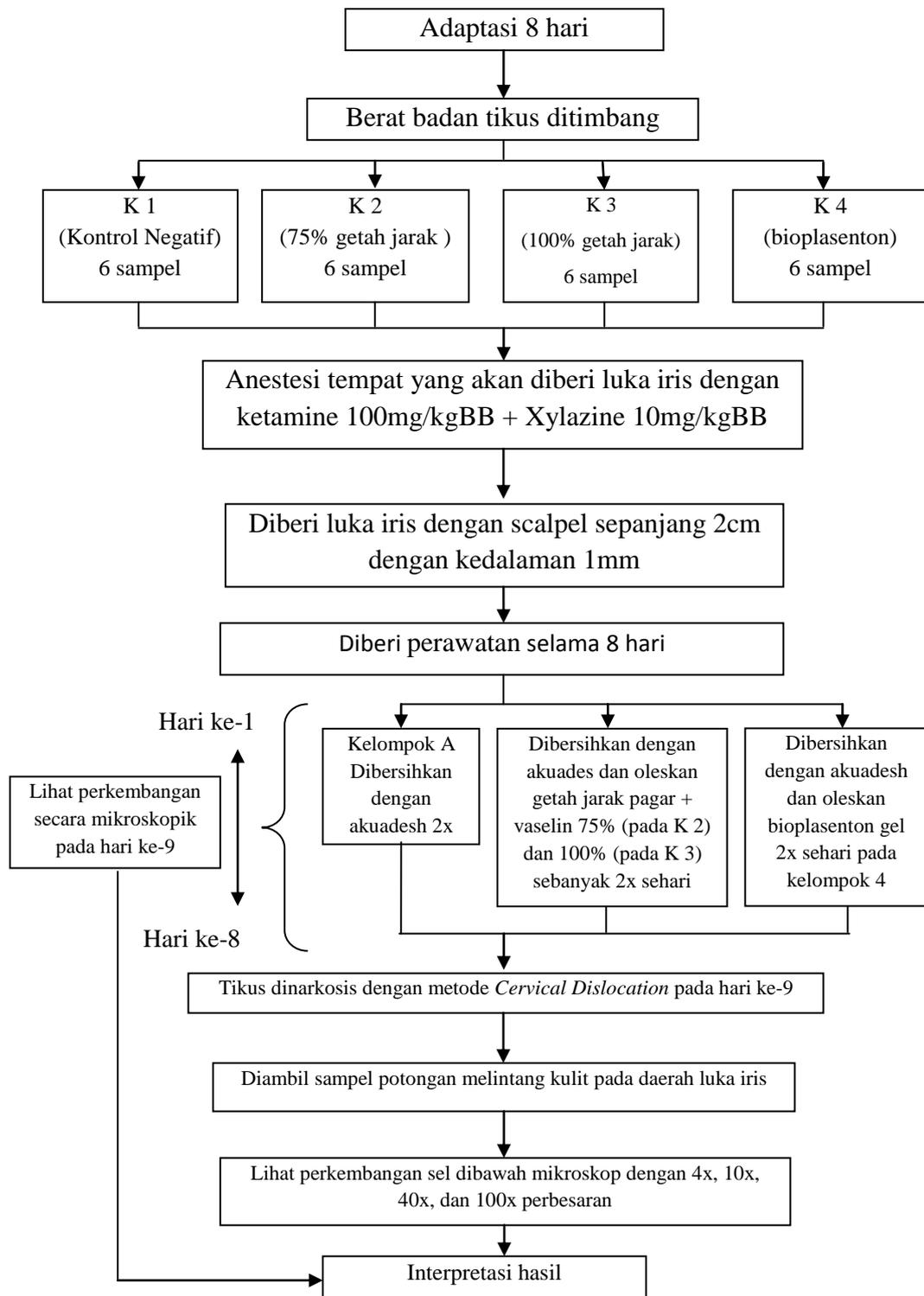
- Alkohol 70% selama 2 menit
- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol absolute selama 2 menit

5. Penjernihan :

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

6. *Mounting* menggunakan entelan, tutup dengan *deck glass*.

5. Alur Penelitian



Gambar 6. Diagram alur penelitian

H. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Getah jarak pagar	<p>Getah jarak pagar diberikan pada tikus</p> <p>Kelompok 1 = luka iris pada tikus hanya dibersihkan dengan akuades</p> <p>Kelompok 2 = luka iris pada tikus diobati getah jarak pagar konsentrasi 75% sebanyak 2 kali sehari</p> <p>Kelompok 3 = luka iris pada tikus diobati getah jarak pagar konsentrasi 100% sebanyak 2 kali sehari</p> <p>Kelompok 4 = luka iris pada tikus diobati bioplasenton gel sebanyak 2 kali sehari</p>	kategorik
Gambaran histologi kulit tikus (Mikroskopis)	<p>Sediaan histopatologi dilihat pada pembesaran 400x pada 5 lapang pandang yang dipilih disetiap preparat dari insisi luka pada hari ke-9 yang mencakup 3 kategori, yaitu tingkat pembentukan epitelisasi, jumlah pembentukan pembuluh darah baru, dan pembentukan kolagen (Tabel 2). Kemudian dibuat skor untuk setiap kategori, lalu skor dari semua kategori tersebut digunakan untuk semua lapang pandang dalam 1 preparat, lalu direratakan untuk tiap kelompok perlakuan.</p>	Numerik

I. Cara Pengumpulan Data

Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan saat hari terakhir perlakuan. Dari setiap kelompok, setiap tikus diambil sampel jaringan kulitnya dibagian perlakuan.

Kemudian jaringan itu dibuat menjadi preparat untuk diteliti lebih lanjut

menggunakan mikroskop cahaya binokuler. Variabel yang diamati adalah perkembangan kesembuhan luka secara histologis, yaitu dengan melakukan pengamatan mikroskopis di daerah epidermis dan dermis, dengan mengidentifikasi pembentukan kolagen, angiogenesis, dan re-epitelisasi.

Tabel 2. Penilaian Mikroskopis (Cyntia, 2012)

Parameter dan deskripsi	skor
Tingkat pembentukan kolagen	
○ Kepadatan kolagen lebih dari jaringan normal/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	3
○ Kepadatan kolagen sama dengan jaringan normal/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	2
○ Kepadatan kolagen kurang dari jaringan normal/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	1
Tingkat pembentukan epitelisasi	
○ Epitelisasi normal/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	3
○ Epitelisasi sedikit/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	2
○ Tak ada epitelisasi/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	1
Jumlah angiogenesis	
○ Lebih dari 2 pembuluh darah baru/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	3
○ 1-2 pembuluh darah baru/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop	2
○ Tidak ada pembuluh darah baru/lapang pandang perbesaran 400x mikroskop.	1

J. Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengukuran berupa skor dengan penilaian 1 sampai 3 setiap lapang pandang tersebut, lalu dijumlah. Dari jumlah tersebut, selanjutnya dibuat rata-ratanya 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 Post Hoc LSD* dengan selang kesalahan 0,5% ($\alpha=0.05$) dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 20.0 for windows (Mattjik *et al*, 2006).

K. Etika Penelitian

Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2006), ilmuwan penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3 R dalam protokol penelitian, yaitu: *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.

Replacement adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

Replacement terbagi menjadi dua bagian, yaitu:

- Relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan,
- Absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).

Reduction diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistik yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.

Refinement adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Yang pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai. Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidak-nyamanan.