

III. METODE PENELITIAN

A.Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik untuk mengetahui perbedaan tingkat kesembuhan antara luka bakar yang diberikan madu murni dan diberikan tumbukan daun pada tikus putih (*rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague Dawley*. Menggunakan *post test only controlled group design*.

B.Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di *Pet House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai tempat adaptasi dan perlakuan pada hewan percobaan, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan November 2013.

C. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini berjumlah 6 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *sprague Dawley* berumur 3-4 bulan yang dipilih secara *random*.

Pemilihan sampel digunakan dengan cara *simple random sampling*. Pada uji eksperimental ini, variabel yang diuji adalah numerik berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus (Dahlan, 2009).

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{(z\alpha + z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

Dengan nilai $\alpha = 5\%$ ($z\alpha = 1,96$), $\beta = 20\%$ ($z\beta = 0,84$), simpangan baku = S dan perbedaan selisih rerata skor histopatologi yang diharapkan sebagai $(x_1 - x_2)$.

$$S = 1,5$$

$x_1 - x_2 = 1$ maka akan didapatkan perhitungan sebagai berikut

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{(z\alpha + z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{(1,96 + 0,84) 1,5}{1} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{4,2}{1} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 17,64$$

$$n_1 = n_2 = 18$$

Maka jumlah minimal sampel adalah 18 ekor tikus. Jadi tiap perlakuan dibutuhkan minimal 6 sampel ($n \geq 6$) untuk masing-masing perlakuan dan jumlah perlakuan sebanyak 3 kali, sehingga total sampel minimal yang dibutuhkan adalah sebanyak 18 sampel yang didapatkan pada 6 ekor tikus putih dari populasi yang ada. Namun pada penelitian ini digunakan 8 ekor tikus putih, sehingga didapatkan 18 sampel dan 6 sampel sebagai cadangan.

Adapun perlakuan yang diberikan pada masing-masing tikus adalah

- 1). Sampel kontrol yaitu bagian tubuh tikus di daerah punggung bawah kanan yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm yang akan dibiarkan sembuh secara normal tanpa pemberian zat aktif.
- 2). Sampel perlakuan madu yaitu bagian tubuh tikus di daerah punggung kiri yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses penyembuhan akan diberikan preparat madu diberikan secara topikal 2–3 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.
- 3). Sampel perlakuan tumbukan daun binahong yaitu bagian tubuh tikus di daerah punggung kanan atas yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses penyembuhan luka diberikan tumbukan daun binahong secara topikal 2–3 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril. 2–3 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.

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

Hewan Percobaan	Jenis Perlakuan	Dosis
Tikus dengan Luka bakar derajat II	Kontrol (tanpa pemberian zat aktif)	Aquades 2x/ hari
	Madu	Topikal 2x/ hari
	Tumbukan daun binahong	Topikal 2x/ hari

D. Kriteria Inklusi dan Ekslusi

Inklusi:

- a. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- b. Berjenis kelamin jantan
- c. Berusia sekitar 3–4 bulan

Ekslusi:

- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium
- b. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital).

E. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu: madu murni, tumbukan daun binahong, plester, kassa steril, aquadest, alkohol, obat anastesi lidokain, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley*, pakan dan minum tikus, larutan formalin 10% untuk fiksasi preparat histopatologi, alkohol, etanol, xylol, pewarna hematoksilin dan eosin, entelan dan kamera digital untuk dokumentasi.

2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah pisau cukur dan gagangnya, gunting untuk mencukur rambut/bulu tikus, penggaris, sarung tangan steril, bengkok, kom, solder listrik (electro cauter) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2cm, kipas angin, gunting plester, pinset anatomis, spuit 1cc dan jarum, kassa steril, kandang serta botol minum tikus, mikroskop cahaya, *object glas*, *cover glass*, *deck glass*, *tissue cassette*, *rotary microtome*, oven, *water bath*, *platening table*, *autotechnicom processor*, *staining jar*, *staining rak*, kertas saring, histoplast, dan parafin dispenser.

F.Variabel Penelitian

1.Variabel bebas (*independent variabel*)

Pemberian zak aktif pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa, yaitu madu murni dan tumbukan daun binahong

2.Variabel Terikat (*Dependent variabel*)

Tingkat kesembuhan luka bakar secara makroskopik dan mikroskopik

G. Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala Ukur
Madu Murni	Madu yang berasal dari petani, tanpa adanya campuran gula maupun air. Yang diberikan pada permukaan luka bakar.	Katagorik
Tumbukan daun binahong	Daun binahong yang telah dehaluskan secara normal dengan cara ditumbuk. Yang diberikan pada permukaan luka bakar	Katagorik
Luka Bakar Derajat II	Luka bakar yang mencapai dermis, dan terbentuk, gelembung atau bula yang berisi cairan eksudat	Ordinal
Gambaran mikroskopik kulit tikus	1. Sediaan dilihat pada pembesaran 40x secara acak di setiap spesimen dari biopsi insisi luka yaitu: pembentukan kolagen, tingkat pembentukan epitelisasi, sel radang dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru.	Numerik
	2. Diameter luka bakar	Numerik

H. Prosedur Penelitian

1. Persiapan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa *Sprague dawley* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini menggunakan 8 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, sebelumnya dilakukan adaptasi di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan diberi pakan standar secukupnya selama 7 hari. Setelah masa adaptasi, tikus dipisahkan dan masing-masing dimasukkan ke dalam kandang.

2. Pembuatan Luka Bakar Derajat II

Cara pembuatan luka bakar derajat II (Handian, 2006) :

- a. Tentukan terlebih dahulu daerah yang akan dibuat luka bakar
- b. Hilangkan bulu dengan mencukur sesuai dengan luas area luka bakar yang diinginkan
- c. Pasang perlak dan alasnya di bawah tikus yang akan dibuat luka bakar
- d. Cuci tangan dan pakai sarung tangan
- e. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan dosis 0,2 cc lidokain
- f. Gunakan solder listrik (*electro cauter*) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2 cm yang telah dipanaskan

selama 30 menit dan tempelkan pada kulit tikus yang telah diberikan anestesi.

3. Prosedur Penanganan Luka Bakar Derajat II

Pada 8 tikus yang masing masing mendapatkan 3 luka bakar akan dilakukan 3 perlakuan yaitu, aquades (kontrol), tumbukan daun binahong, dan madu murni. Sebelum diberikan preparat madu murni pada luka atau pemberian tumbukan daun binahong, luka dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan air aquadest. Berikut prosedur penanganan luka bakar yang akan dilakukan pada tikus percobaan:

- a. Cuci tangan
- b. Tempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka yang akan dirawat.
- c. Pakai sarung tangan steril dan siapkan kasa.
- d. Atur posisi tikus untuk mempermudah tindakan
- e. Olesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan madu setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan madu murni .
- f. Olesi bagian luka dengan tumbukan daun binahong setebal 2mm sampai menutup luka tersebut
- g. Tutup luka dengan kasa steril
- h. Untuk kelompok kontrol tidak diberikan zat aktif apapun, namun dibersihkan dengan aquades.

4. Prosedur Operasional Pembuatan Slide

Metode pembuatan preparat Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

a. Prosedur pembuatan blok parafin :

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 :

a) Alkohol 70% selama 0,5 jam

b) Alkohol 96% selama 0,5 jam

c) Alkohol 96% selama 0,5 jam

d) Alkohol 96% selama 0,5 jam

e) Alkohol absolut selama 1 jam

f) Alkohol absolut selama 1 jam

g) Alkohol absolut selama 1 jam

h) 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 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 hematoxilin eosin.

b. Prosedur pulasan Hematoxylin – Eosin :

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:

- a) Larutan *xylol* I selama 5 menit
- b) Larutan *xylol* II selama 5 menit
- c) Ethanol absolut selama 1 jam

2) *Hydrasi* dalam:

- a) Alkohol 96% selama 2 menit
- b) Alkohol 70% selama 2 menit
- c) Air selama 10 menit

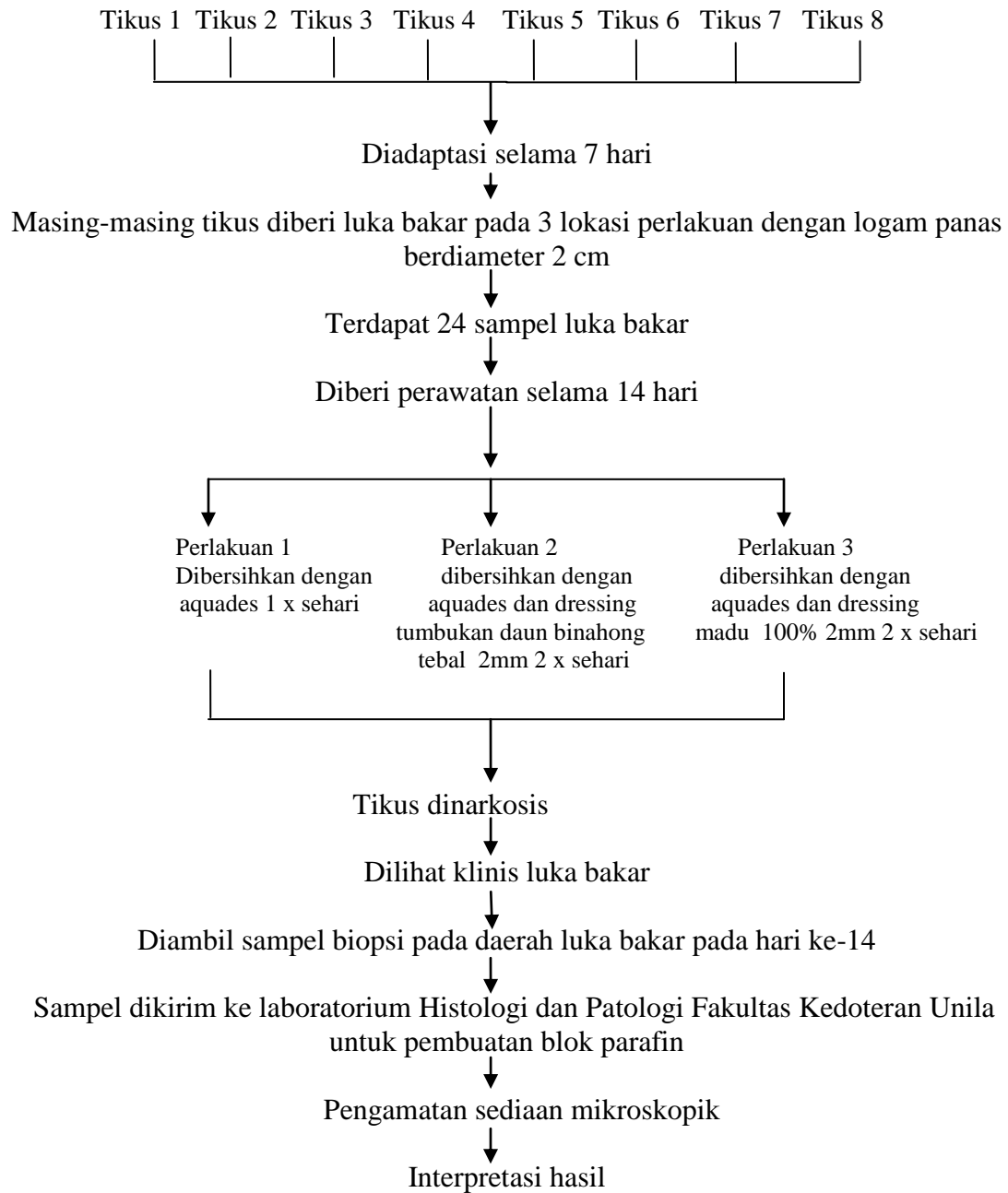
3) Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:

- a) Haris hematoxilin selama 15 menit
- b) Air mengalir
- c) Eosin selama maksimal 1 menit

4) Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan:

- a) Alkohol 70% selama 2 menit
- b) Alkohol 96% selama 2 menit
- c) Alkohol absolut 2 menit

- 5) Penjernihan:
 - a) *Xylol* I selama 2 menit
 - b) *Xylol* II selama 2 menit
- 6) *Mounting* dengan entelan lalu ditutup dengan *deck glass*



Gambar 4. Diagram alur penelitian

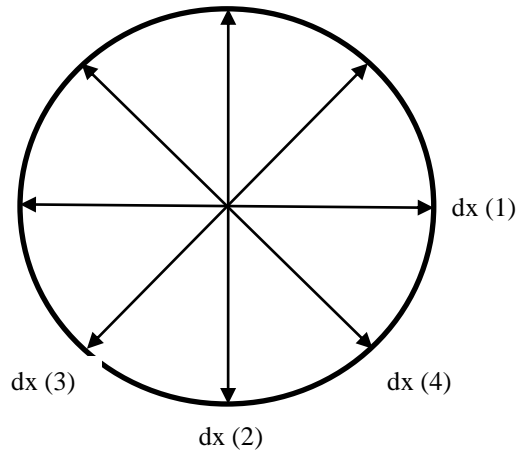
I. Prosedur penelitian makroskopik & mikroskopik

1. Makroskopik

Penyembuhan luka dinilai dengan melakukan pengukuran pada hari pertama dan hari terakhir, untuk melihat penyembuhan luka secara makroskopis. Diameter luka bakar rata-rata dihitung dengan cara seperti dibawah ini (Suratman *et al.*, 1996).

2. Mikroskopik

Penilaian mikroskopis penyembuhan luka dilihat pada pembesaran 10x & 40x pada 5 lapang pandang acak setiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari biopsi insisi luka dengan menghitung tingkat pembentukan kolagen, tingkat pembentukan epitelisasi dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru dengan kriteria yang terdapat pada tabel 3.



Gambar 5. Diameter Luka Bakar.

Luka yang terjadi diukur diameternya seperti gambar 6. Kemudian dihitung diameter rata-ratanya dengan rumus sebagai berikut:

$$dx = \frac{dx(1) + dx(2) + dx(3) + dx(4)}{4}$$

Keterangan : dx = Diameter luka hari ke x

Untuk mengukur persentase kesembuhan dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

Px = Persentase penyembuhan hari ke x

$d1$ = diameter luka hari pertama

dx = diameter luka hari ke x

Tabel 4. Penilaian mikroskopis.

Parameter dan Deskripsi	Skor
Jumlah sel polimor fonuklear per lapangan pandang	
• Terdapat 1-5 sel polimorfonuklear per lapang pandang	3
• Terdapat 6-10 sel polimorfonuklear per lapang pandang	2
• Terdapat 11-15 sel polimorfonuklear per lapang pandang	1
Derajat terjadinya epitelisasi	
• Epitelisasi normal	3
• Epitelisasi sedikit	2
• Tidak ada epitelisasi	1
Jumlah pembentukan pembuluh darah baru	
• Lebih dari 2 pembuluh darah baru	1
• 1-2 pembuluh darah baru	2
• Tidak ada pembuluh darah baru	3
Derajat pembentukan kolagen	
• Kepadatan kolagen lebih dari jaringan normal	3
• Kepadatan kolagen sama dengan jaringan normal	2
• Kepadatan kolagen kurang dari jaringan normal	1

J.Pengolahan dan Analisis Data

Hasil penelitian lalu akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal ($p > 0,05$) atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama ($p > 0,05$) atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, akan dilanjutkan dengan metode uji parametrik *Analyze of Variance* (ANOVA). Apabila tidak memenuhi syarat uji parametrik, akan dilakukan transformasi. Jika pada uji ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Apabila hasil transformasi tidak memenuhi syarat digunakan uji *Friedman* dan dilanjutkan dengan uji *Wilcoxon* (Dahlan, 2011). Pengolahan data menggunakan perangkat lunak komputer.