

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui perbedaan tingkat kesembuhan luka bakar derajat II yang diberi madu topikal nektar kopi dan silver sulfadiazine pada tikus putih. Rancangan penelitian menggunakan metode *post test only controlled group design* dengan sampel sebanyak 10 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur Sprague Dawley berumur 3–4 bulan yang dipilih secara *random* dan variabel yang di uji adalah numerik berpasangan. Pemilihan tikus jantan bertujuan untuk menghindari adanya pengaruh hormonal yang dapat mempengaruhi respon reaksi imunologis.

Adapun perlakuan yang diberikan pada masing-masing tikus adalah:

1. Sampel kontrol yaitu bagian tubuh tikus 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 yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses penyembuhan akan

diberikan madu topikal nektar kopi dengan nama dagang Madu Asli yang dipasarkan oleh Kedai Pramuka Kwarda Lampung dengan izin DEPKES RI. SP. No. : 074/08.01/92 diberikan secara topikal 2–3 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.

3. Sampel perlakuan obat silver sulfadiazine yaitu bagian tubuh tikus yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses penyembuhan luka diberikan obat silver sulfadiazine dengan merek dagang Burnazin yang masih tersegel dan tertutup dengan baik secara topikal 2–3 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.

Tabel 4. 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)	-
	Madu nektar kopi	100%
	Silver sulfadiazine	

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan pada bulan Oktober–November 2012. Tempat penelitian dilaksanakan di 2 tempat yaitu selama adaptasi sampai perlakuan pada hewan percobaan dilakukan di *Pet House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Dalam penelitian ini populasi yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur Sprague Dawley berumur 3–4 bulan yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

2. Sampel

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

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok perlakuan dan n merupakan jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan (sampel). Penelitian ini diperlukan 3 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

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

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \geq 9$$

Jadi dibutuhkan minimal 9 sampel ($n \geq 9$) untuk masing-masing kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan 10 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Inklusi :

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, dan aktif).
2. Memiliki berat badan sekitar 150–250 gram.
3. Berjenis kelamin jantan.
4. Berusia sekitar 3–4 bulan.
5. Luas luka bakar sama, yaitu dengan diameter 2 cm.
6. Nutrisi sama, yaitu jenis dan kuantitas yang sama.

Eksklusi :

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
2. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok dan aktifitas 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 nektar kopi, krim silver sulfadiazine, plaster, kassa steril, aquades, alkohol, obat anestesi lidokain, tikus putih jantan dewasa galur Sprague Dawley, pakan dan minum tikus, larutan formalin 10% untuk fiksasi preperat histopatologis, alkohol, etanol, xylol, pewarna hematoksilin dan eosin, dan entelan.

2. Alat penelitian

a. Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01g untuk menimbang berat tikus, solder listrik (*electro cauter*) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2cm, pisau cukur dan gagangnya, gunting untuk mencukur rambut/bulu tikus, penggaris, sarung tangan steril, jas lab, kipas angin, gunting plester, spuit dan jarum, kassa steril, arloji, kandang serta botol minum tikus, dan kamera digital untuk dokumentasi.

b. Alat pembuat preparat histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, tissue cassette, rotary microtome, oven, water bath, platening table, autotechnicom processor, staining jar, staining rak, kertas saring, histoplast, dan dispenser parafin.*

F. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

- a. Madu
- b. Silver sulfadiazine

2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

- a. Gambaran histopatologi kulit tikus
- b. Gambaran klinis kulit tikus

G. Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Madu nektar kopi	Madu murni yang diperoleh dari petani lebah yang berasal dari sari bunga kopi dan dipasarkan oleh Kedai Pramuka Kwarda Lampung dengan izin DEPKES RI. SP. No. : 074/08.01/92 yang dioles 2 kali sehari.	Kategorik
Silver Sulfadiazine	Obat silver sulfadiazine dengan merek dagang Burnazine yang diproduksi oleh Darya-Varia Laboratoria, Gunung Putri, Bogor-Indonesia yang masih tersegel dan tertutup dengan baik dan dipakai secara topikal 2 kali sehari.	Kategorik
Luka Bakar Derajat II	Luka bakar yang mencapai dermis, tetapi masih ada elemen epitel sehat yang tersisa Gejala yang timbul adalah nyeri, gelembung, atau bula berisi cairan eksudat yang keluar dari pembuluh darah karena permeabilitas dindingnya meninggi.	Ordinal
Gambaran histopatologi kulit tikus	Sediaan histopatologi dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40X dalam 5 lapang pandang dan diamati pembentukan kolagen, reepitelisasi, jumlah pembentukan pembuluh darah baru, dan jumlah sel radang.	Numerik
Gambaran klinis kulit tikus	Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata diameter penyembuhan luka yang dihitung pada hari pertama dan terakhir penelitian kemudian dihitung persentase dengan rumus: $Px = \left(\frac{d1^2 - dx^2}{d1^2} \right) \times 100\%$ dengan hari pertama sebagai acuan.	Numerik

H. Prosedur Penelitian

Sebelum diberikan perlakuan kepada semua tikus laboratorium, 10 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague Dawley dilakukan adaptasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan diberi pakan standar secukupnya selama 7 hari. Sesudah masa adaptasi, tikus dipisahkan menjadi 1 kandang berisi 1 ekor tikus.

1. 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. Cuci tangan.
- d. Pakai sarung tangan.
- e. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan dosis 0,2 cc lidokain dalam 2 cc aquades.
- f. Panaskan solder listrik (*electro cauter*) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2cm yang telah disiapkan selama 30 menit.
- g. Tempelkan solder listrik (*electro cauter*) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2cm pada kulit tikus yang telah disiapkan selama 2 detik.

2. Prosedur perawatan Luka Bakar Derajat II

Perawatan luka bakar derajat II dilakukan 2–3 kali sehari (Dewi, 2008), sebelum dilakukan intervensi luka dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan air aquades. Prosedur perawatan luka bakar yang akan dilakukan pada tikus percobaan adalah sebagai berikut:

- a. Cuci tangan.
- b. Pakai sarung tangan steril.
- c. Siapkan kassa.
- d. Atur posisi tikus untuk mempermudah tindakan.
- e. Olesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan madu nektar kopi setebal 2mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan madu nektar kopi.
- f. Olesi bagian luka dengan menggunakan silver sulfadiazine untuk kelompok perlakuan dengan silver sulfadiazine setebal 2mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan silver sulfadiazine.
- g. Untuk kelompok kontrol tidak diberikan zat aktif apapun.
- h. Tutup luka dengan kasa steril.

3. Prosedur operasional pembuatan slide

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

a. Prosedur pembuatan slide:

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 :
 - 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 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

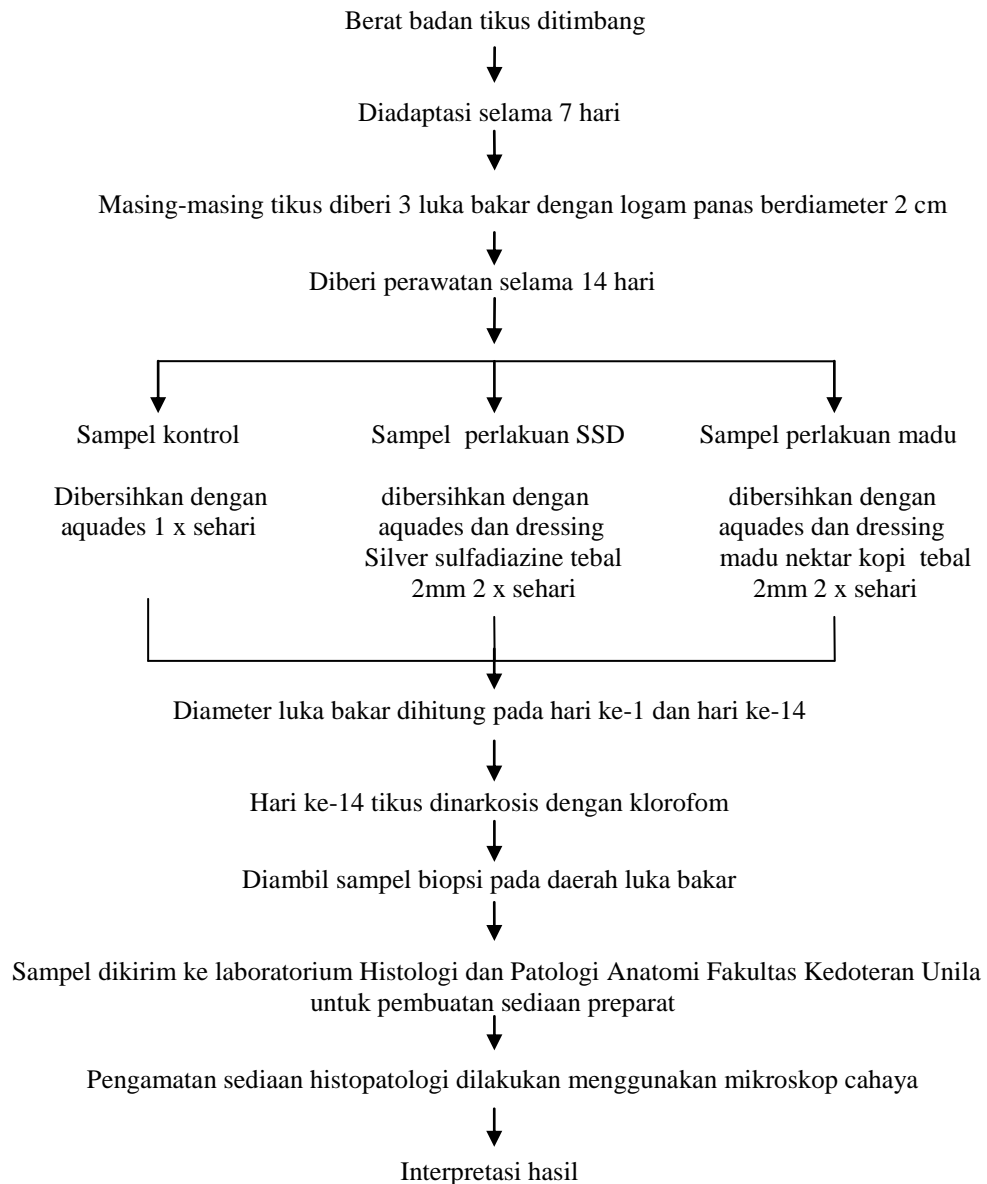
water bath dengan suhu 60°C. Dilanjutkan dengan pewarnaan hematoksilin eosin.

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 :
 - 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) Harris hematoksilin 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

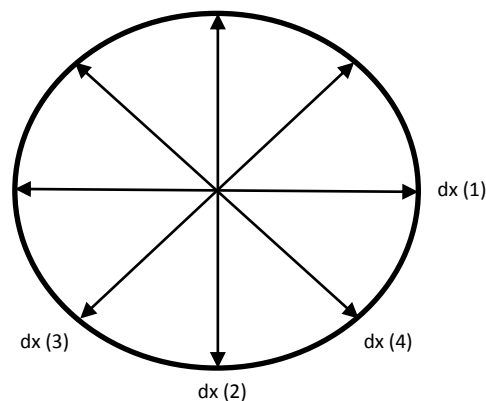
5. Penjernihan:

a) *Xylol* I selama 2 menitb) *Xylol* II selama 2 menit6. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*.**Gambar 12.** Diagram alur penelitian

I. Cara Pengumpulan Data

1. Klinis

Penilaian gambaran klinis penyembuhan kulit tikus dilakukan pada hari pertama dan hari terakhir penyembuhan dengan batas waktu penelitian selama 14 hari, pada hari pertama dan hari terakhir penelitian digunakan teknik observasi eksperimen dimana 3 sampel pada masing-masing tikus dilakukan pengamatan untuk melihat penyembuhan secara makroskopis. Diameter luka bakar rata-rata dihitung dengan cara seperti dibawah ini (Suratman dkk., 1996).



Gambar 13. Diameter Luka Bakar.

Luka yang terjadi diukur diameternya seperti gambar 13. 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

2. Histopatologi

Penilaian mikroskopis penyembuhan luka dilihat pada pembesaran 40x pada 5 lapangan pandang disetiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari biopsi insisi luka yang mencakup tingkat pembentukan kolagen, tingkat pembentukan epitelisasi dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru dengan kriteria modifikasi Nagaoka (2000) dan Hosseini (2011). Sampel biopsi diambil 1 kali dan dilakukan bersamaan pada hari ke-14 (Manjas dkk., 2010).

Tabel 6. Tabel penilaian mikroskopis.

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

Sumber: Nagaoka (2000); Hosseini (2011).

J. Pengolahan dan Analisis Data

Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal ($p > 0,05$) atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Jika varians data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *repeated ANOVA* dan menilai perbandingan pengukuran dengan uji *post-hoc paired wise comparison*. Apabila tidak memenuhi syarat uji parametrik, akan dilakukan transformasi. Jika pada uji ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* LSD. Apabila hasil transformasi tidak memenuhi syarat digunakan uji *Friedman* dan dilanjutkan dengan uji *Wilcoxon*. Pengolahan data menggunakan SPSS versi 19 (Dahlan, 2011).