

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode *post test only controlled group design*.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi 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 selama 3 bulan pada bulan Oktober–Desember 2012.

#### **C. Subjek penelitian**

##### **1. Populasi**

Populasi target meliputi tikus putih jantan galur Sprague Dawley. Populasi terjangkau meliputi tikus putih jantan galur Sprague Dawley yang berusia 3 bulan yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner Bogor.

## 2. Sampel

Pemilihan sampel digunakan dengan cara *simple random sampling*, pada penelitian ini diperlukan 3 kali perlakuan dan variabel yang di uji adalah numerik berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus (Dahlan, 2011):

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

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 10 sampel ekor tikus putih.

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 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 salep hidrogel yaitu bagian tubuh tikus di daerah punggung kanan atas yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses penyembuhan luka diberikan salep hidrogel yang masih tersegel dan tertutup dengan baik secara topikal 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)	-
	Madu Nektar Kopi SNI	100%
	Hidrogel	-

#### **D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

##### **Inklusi:**

- a. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- b. Memiliki berat badan sekitar 150–250 gram
- c. Berjenis kelamin jantan
- d. Berusia sekitar 3–4 bulan

##### **Eksklusi:**

- 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 nektar kopi, alkohol 96%, salep hidrogel, plaster, kassa steril, aquades, alkohol, arloji, obat anestesi lidokain, 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 dan Eosin, dan entelan (FK Unila, 2012).

## 3. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01g untuk menimbang berat mencit, 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, jas lab, kipas angin, gunting plester, pinset anatomis, spuit 1cc dan jarum, kassa steril, arloji, 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. Identifikasi Variabel

### 1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

Pemberian zat aktif pada tikus putih yaitu :

- a. Madu
- b. Hidrogel

### 2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Penilaian kesembuhan kulit tikus dengan luka bakar derajat II yaitu :

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

### G. Definisi Operasional

Adapun definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut

**Tabel 3.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala Ukur
Madu nektar kopi 100%	Madu murni yang diperoleh dari petani lebah yang berasal dari sari bunga kopi dan dipasarkan oleh Kedai Pramukua Kwarda Lampung dengan izin DEPKES RI. SP. No.: 074/08.01/92. Dioleskan 2x sehari	Katagorik
Hidrogel	Obat hidrogel dengan merek dagang Cutimed Gel yang diproduksi oleh BSN medical GmbH, PT BSN medical Indonesia yang masih tersegel dan tertutup dengan baik. Dioleskan 2x sehari	Katagorik
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 pada pembesaran 40x pada lapangan pandang acak disetiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari biopsi insisi luka yang mencakup tingkat pembentukan kolagen, tingkat pembentukan epitelisasi, sel radang dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru.	Numerik
Gambaran klinis kulit tikus	Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata diameter penyembuhan luka yang dihitung pada hari ke 14 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 dilakukan perlakuan kepada semua tikus laboratorium, 10 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue dawley dilakukan adaptasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan diberi pakan standar secukupnya selama 14 hari. Sesudah masa adaptasi, tikus dipisahkan menjadi satu kandang berisi satu ekor tikus. Sebelum dilakukan pembuatan luka bakar pada punggung tikus dilakukan pembiusan lokal dengan lidokain. Dosis lidokain yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 0,2 cc dalam 2 cc aquadest secara subkutan (Farmakologi dan Terapi Universitas Indonesia, 2009).

### 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. 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 dalam 2 cc aquades
- f. Panaskan solder listrik (*electro cauter*) yang ujungnya dimodifikasi dengan logam aluminium berdiameter 2 cm 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 Penanganan Luka Bakar Derajat II

Pada 10 sampel dengan masing-masing sampel dilakukan 3 perlakuan, penanganan luka bakar derajat II dilakukan 2–3 kali sehari (Dewi, 2008), sebelum diberikan preparat madu nektar kopi pada luka atau pemberian preparat hidrogel, 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 Nektar Kopi setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan Madu Nektar Flora .
- f. Olesi bagian luka yang telah terinfeksi dengan menggunakan Hidrogel setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka untuk kelompok perlakuan Hidrogel (Data Obat di Indonesia, 2008).
- g. Tutup luka dengan kasa steril
- h. Untuk kelompok kontrol tanpa balutan dan tidak diberikan zat aktif apapun.

### 3. 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 :

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.

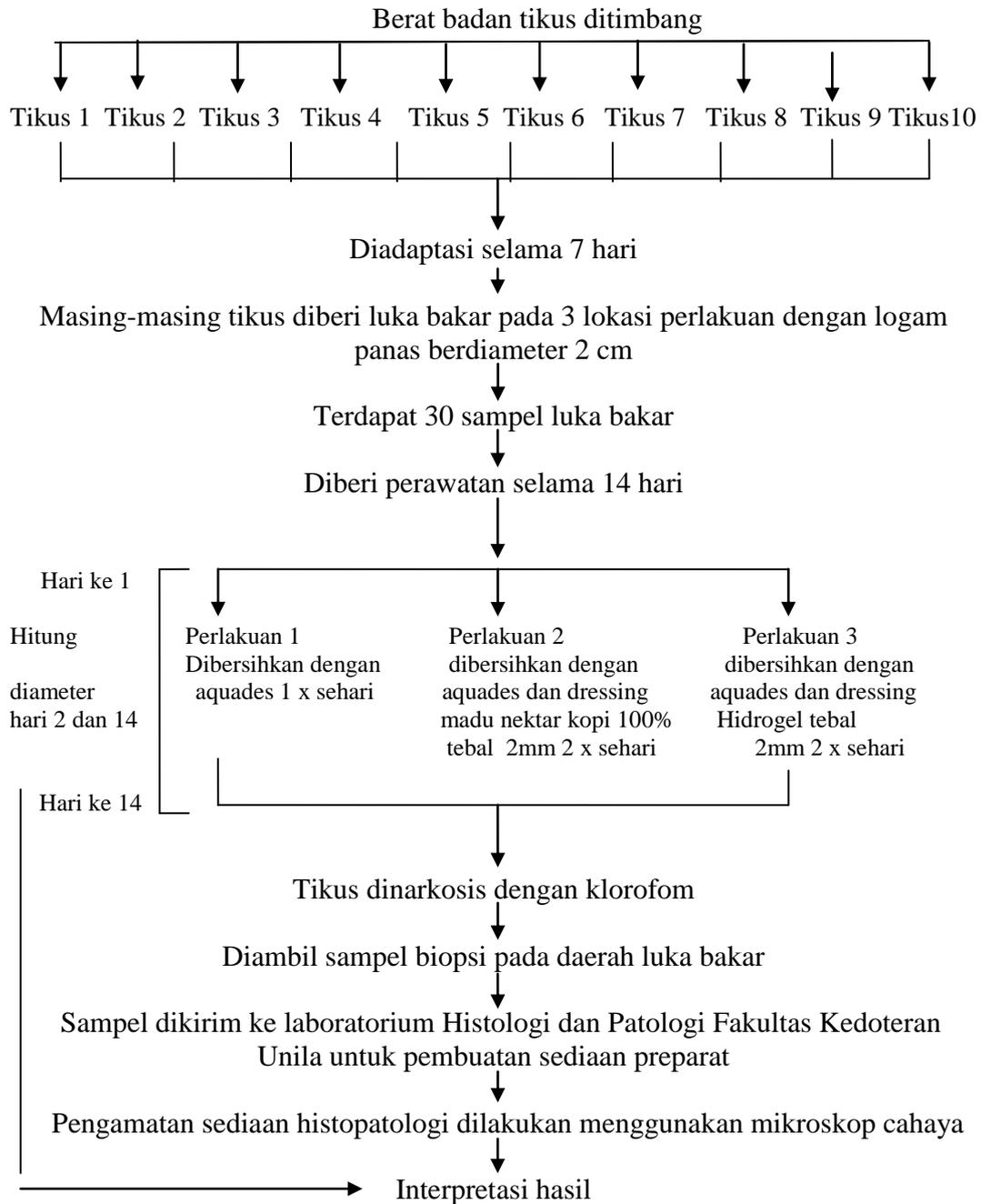
b. Prosedur pulasan HE:

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 menit

b) *Xylol* II selama 2 menit

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

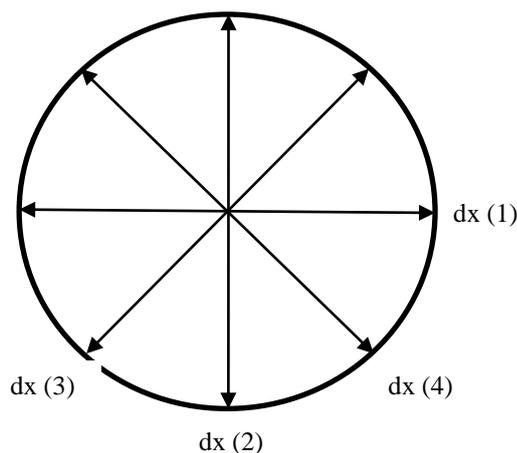


**Gambar 9.** Diagram alur penelitian

## I. Cara Pengumpulan Data

### 1. Klinis

Gambaran klinis penyembuhan luka dinilai dengan dilakukannya 2 kali pengukuran pada hari pertama dan hari terakhir penyembuhan dengan batas waktu penelitian selama 14 hari untuk melihat perbedaannya. Selama penelitian digunakan teknik observasi eksperimen dimana 3 perlakuan pada masing-masing tikus dilakukan pengamatan pada hari ke-2 dan 14 untuk melihat penyembuhan luka secara makroskopis. Diameter luka bakar rata-rata dihitung dengan cara seperti dibawah ini (Suratman *et al.*, 1996).



**Gambar 10.** Diameter Luka Bakar.

Luka yang terjadi diukur diameternya seperti gambar 10. 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 lapangan pandang acak disetiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari biopsi insisi luka yang mencakup tingkat pembentukan kolagen, tingkat pembentukan epitelisasi, sel radang, dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru dengan kriteria modifikasi Nagaoka (2000). Sampel biopsi diambil satu kali dan dilakukan bersamaan pada hari ke-21 (Manjas *et al.*, 2010).

**Tabel 4.** Tabel penilaian mikroskopis.

<b>Parameter dan Deskripsi</b>	<b>Skor</b>
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

## **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  $\leq 50$ . 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 *repeated ANOVA* (Analyze of

Varian). 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.