

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only controlled group design*. Sebanyak 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur *Sprague Dawley* berumur 3-4 bulan yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 3 kelompok, Adapun kelompok perlakuannya yaitu :

- 1). Kelompok kontrol yaitu tikus yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm yang akan dibiarkan sembuh secara normal tanpa pemberian zat aktif.
- 2). Kelompok tikus yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses kesembuhan akan dilakukan *dressing* menggunakan madu 100% (Subrahmanyam, 2001) dengan nama dagang madu apriari.
- 3). Kelompok tikus yang diberi luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm dan dilakukan *dressing* dengan zat aktif mupirosin selama proses kesembuhan berlangsung.

Tabel 3. Jenis perlakuan penelitian dan dosis yang diberikan pada setiap perlakuan.

No.	Hewan Percobaan	Jenis Perlakuan	Dosis
1	Tikus dengan Luka bakar	-	-
2	Tikus dengan Luka Bakar	Madu SNI	100%
3	Tikus dengan Luka Bakar	Mupirosin	-

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Perlakuan hewan coba dilakukan di dua tempat yaitu Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan (April-Juni 2012)

C. Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah pisau cukur dan gagangnya, sarung tangan steril, bengkok, kom steril, perlak, besi solder yang dimodifikasi ujungnya dengan plat, besi aluminium dengan diameter 2 cm, jas lab, gunting plester, pinset anatomis, aquades, spuit dan jarum, kassa steril, alkohol, dan arloji. Pada penelitian ini dibutuhkan bahan berupa madu SNI, mupirosin salep, obat anastesi, dan tikus putih.

D. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti.

Dalam penelitian ini populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini

adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur *Sprague Dawley* berumur 3 - 4 bulan.

2. Sampel

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

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan 3 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi sampel yang akan digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor ($n > 6$) dan jumlah kelompok yang akan digunakan adalah 3 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 18 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Inklusi :

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan aktif).

2. Memiliki berat badan sekitar 150-180 gram.
3. Berjenis kelamin betina.
4. Berusia sekitar 3 - 4 bulan.

Ekslusi :

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
2. Mati selama masa pemberian perlakuan.

F. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent variable*)

Zat aktif yang diberikan pada tikus putih yaitu :

- a. Madu
- b. Mupirosin

2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Tingkat kesembuhan kulit tikus dengan luka bakar derajat II yaitu :

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

G. Prosedur Penelitian

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

1. Pembuatan Luka Bakar derajat II

Cukur bagian punggung dari tikus putih. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan dosis 0,2 cc lidokain dalam 2 cc aquades (Handian, 2006). Kulit diinduksi dengan logam berdiameter dua sentimeter bersuhu tinggi. Tempelkan besi pada kulit tikus yang telah disiapkan selama 2 detik.

2. Prosedur penanganan Luka Bakar Derajat II

Penanganan dilakukan sebanyak dua kali sehari (Handian, 2006) dan selalu dibersihkan sebelum mengaplikasikan madu dan mupirosin ke tikus putih dengan cara, membersihkannya dengan air aquades. Berikut runtutan prosedur penanganan luka bakar yang akan di aplikasikan.

- a. Tempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka yang akan dirawat.
- b. Pakai sarung tangan steril.
- c. Siapkan kasa.
- d. Olesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan madu SNI setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka atau menggunakan mupirosin untuk kelompok perlakuan mupirosin.
- e. Tutup luka dengan kasa steril
- f. Untuk kelompok kontrol balutan tanpa diberikan 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:

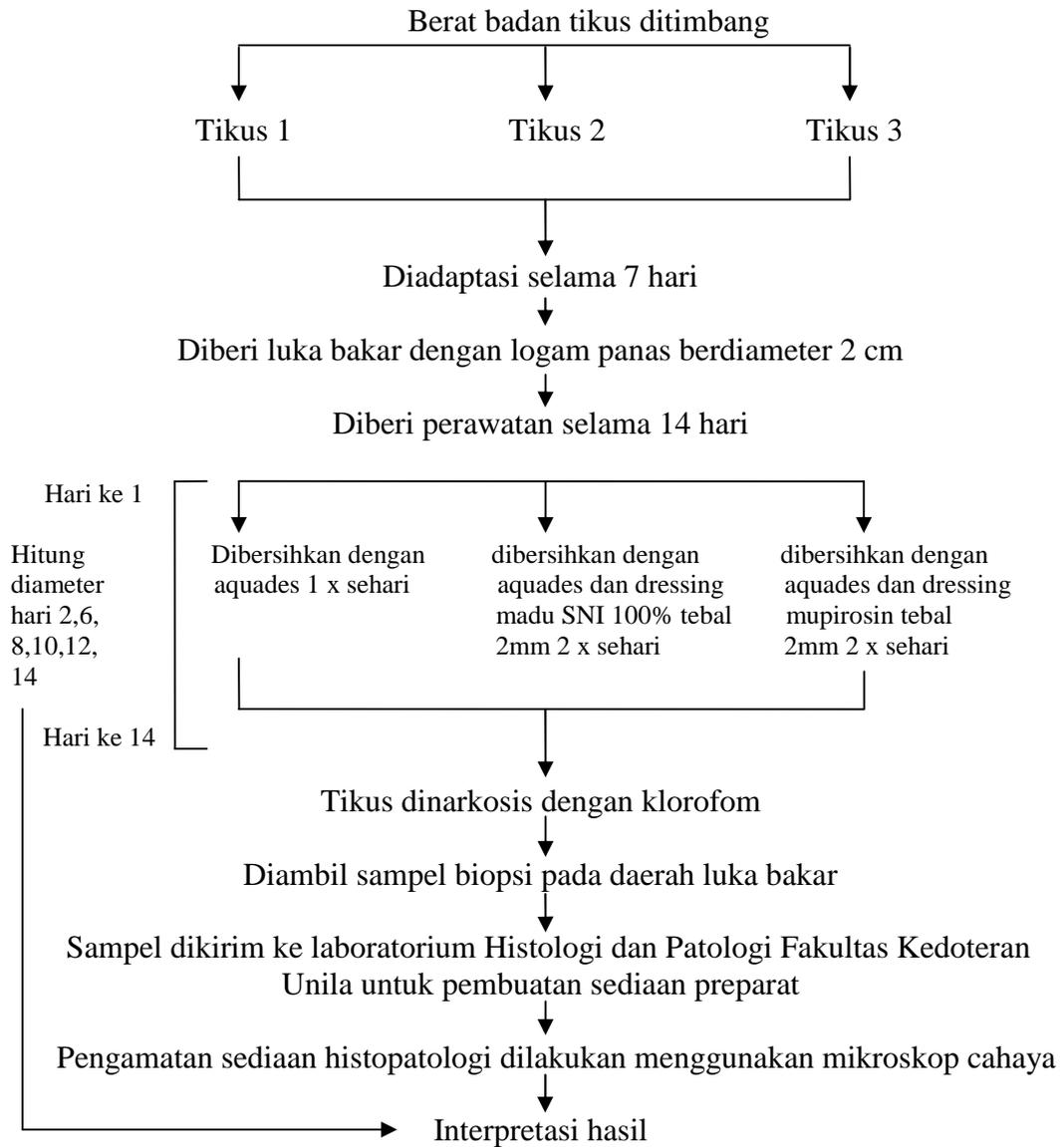
Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I dan II masing-masing selama 1 jam.
- 5) Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam *oven* suhu 65°C.
- 6) Pembuatan blok parafin:

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 8. Diagram alur penelitian

H. Definisi Operasional

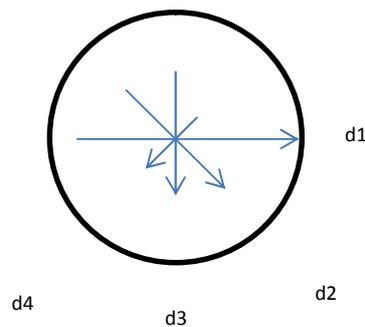
Tabel 4. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis madu yang diberikan kepada tikus percobaan	Dosis madu yang diberikan adalah dosis <i>dressing</i> topikal yang dipakai pada manusia yaitu madu dengan konsentrasi 100% yang diaplikasikan secukupnya terhadap luka.	Numerik
Gambaran histopatologi kulit tikus	Sediaan histopatologi dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x dalam 5 lapang pandang dan diamati reepitelisasi, sel radang, pus dan scap pada daerah luka	Kategorik
Gambaran klinis kulit tikus	Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata diameter penyembuhan luka yang dihitung pada hari ke 2,6,8,10,12, dan 14 kemudian dihitung persentase dengan rumus $p = \left(\frac{d1 - d}{d1} \right) \times 100\%$ dengan hari pertama sebagai acuan.	Numerik
Dressing	Menutupi dan melindungi luka menggunakan mupirosin atau madu SNI	
Madu SNI	Madu yang sudah terstandarisasi sesuai dengan kriteria pada BSN (Badan Standarisasi Nasional) yaitu dengan kandungan aktifitas enzim diastase 3 DN, Hidroksimetilfurfural 50 Mg/kg, Air 22 %b/b, Gula Pereduksi 65 %b/b, Sukrosa 5 %b/b, Keasaman 50 ml NaOH 1 N/kg, Padatan yang tak larut dalam air 0,5 %b/b, Abu 0,5 %b/b, Timbal 1,0 Mg/kg, Tembaga 5,0 Mg/kg, Cemarkan Arsen 0,5 mg/kg	
Luka Bakar Derajat II	Lesi merusak epidermis dan mencapai kedalaman dermis namun masih terdapat epitel vital yang bisa menjadi dasar regenerasi dan epitelisasi. Gambaran luka bakar berupa gelembung atau bula yang berisi cairan eksudat dari pembuluh darah karena perubahan permeabilitas dindingnya. Pada penelitian ini luka berdiameter 2 cm.	Ordinal

I. Cara Pengumpulan Data

1. Klinis

Dalam penelitian ini digunakan teknik observasi eksperimen, dimana sampel dibagi menjadi 3 kelompok kemudian dilakukan dua hari sekali untuk melihat penyembuhan secara makroskopis. Pengamatan ini dilakukan mulai awal dari mulai pemberian terapi sampai hari terakhir penyembuhan untuk mengetahui perubahannya dengan batas waktu penelitian selama 14 hari. Diameter luka bakar rata-rata dihitung dengan cara (Suratman dkk., 1996).



Gambar 9. Diameter Luka Bakar.

Diameter luka didapat dengan rumus:

$$d = \frac{d1 + d2 + d3 + d4}{4}$$

Dimana :

d = Diameter hari ke x

$d1$ = Diameter 1

$d2$ = Diameter 2

$d3$ = Diameter 3

$d4$ = Diameter 4

Lalu untuk mengukur persentase kesembuhan dilakukan dengan menggunakan rumus

$$p = \left(\frac{d1 - d}{d1} \right) \times 100\%$$

Dimana :

p = Persentase hari ke x

$d1$ = diameter hari ke 1

d = diameter hari ke x

2. Histopatologi

Penyembuhan luka bakar diobservasi pada fase proliferasi. Sampel biopsi diambil satu kali dan serentak pada hari ke 14. Gambaran yang dinilai adalah panjang repitelisasi dengan sistem skoring pada pembesaran 40x yaitu :

Skor 5 : Jika ada repitelisasi

Skor -1 : Jika masih didapat sel radang dan kropeng

Skor -2 : Jika didapat pus

Hasil diamati dalam 5 lapang pandang dan diambil reratanya.

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 *one way* 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 *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Pengolahan data menggunakan SPSS versi 20.