III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak. 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, dengan pengulangan sebanyak 6 kali. Adapun kelompok perlakuanya yaitu kelompok

1). Kelompok kontrol yaitu tikus yang diperlakukan luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm yang akan dibiarkan sembuh secara normal tanpa pemberian zat aktif.

2). Kelompok tikus yang diperlakukan luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm, selama proses kesembuhan akan dilakukan perawatan menggunakan madu 100% (Subrahmanyam, 2001) dengan nama dagang Madu Apriari.

3). Kelompok tikus yang diperlakukan luka bakar derajat II dengan diameter 2 cm dan dilakukan perawatan dengan zat aktif klindamisin gel 1%×10gr selama proses kesembuhan berlangsung.

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

No.	Hewan Percobaan	Jenis Perlakuan	Dosis
1	Tikus dengan Luka bakar	Tidak diberikan zat aktif	0
2	Tikus dengan Luka Bakar	Madu SNI	100%
3	Tikus dengan Luka Bakar	Klindamisin	Gel 1%×10gr

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Dengan waktu April-Juni 2012.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau cukur, sarung tangan steril, bengkok, kom steril, perlak,besi solder yang dimodifikasi ujungnya dengan plat logam diameter 2 cm, jas Lab, gunting, plester, pinset anatomis, aquades, spuit dan jarum, kassa steril, alkohol, dan arloji. Pada penelitian ini dubutuhkan bahan berupa Madu SNI, Klindamisin gel, obat anastesi, dan Tikus Putih.

D. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. 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 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 digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 sampel ($n>6$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 3 kelompok sehingga penelitian ini akan menggunakan 9 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Inklusi :

1. Memiliki berat badan sekitar 150-180 gram.
2. Berjenis kelamin betina.
3. 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*)
    - Tikus dengan luka bakar derajat II yang diberi perawatan Klindamisin
    - Tikus dengan luka bakar derajat II yang diberi perawatan Madu
2. Variabel Terikat (*Dependent variable*)

    Tingkat kesembuhan kulit tikus dengan luka bakar derajat II

G. Prosedur Penelitian

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

1. **Pembuatan Luka Bakar Derajat II**

   Bagian punggung dari tikus putih dicukur. Dilakukan anestesi pada area kulit yang dibuat luka bakar dengan dosis 0,2 cc lidokain dalam 2 cc aquadest. Kulit diinduksi dengan logam berdiameter dua centimeter 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 dan selalu dibersihkan sebelum mengaplikasikan madu dan klindamisin ke tikus putih dengan cara, membersihkanya dengan air aquades. Berikut runtutan prosedur penanganan luka bakar yang di aplikasikan.

   a. Tempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka.
   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 klindamisin untuk kelompok perlakuan klindamisin.
   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 Laboratorium PA Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (2012):

a. Prosedur pembuatan *slide* :

1) Organ telah dipotong secara representatif dengan sayatan 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 absolut selama 1 jam
   - Alkohol absolut selama 1 jam
   - Alkohol absolut selama 1 jam
   - 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) Impregnansi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65^{o}C.
6) Pembuatan blok parafin:

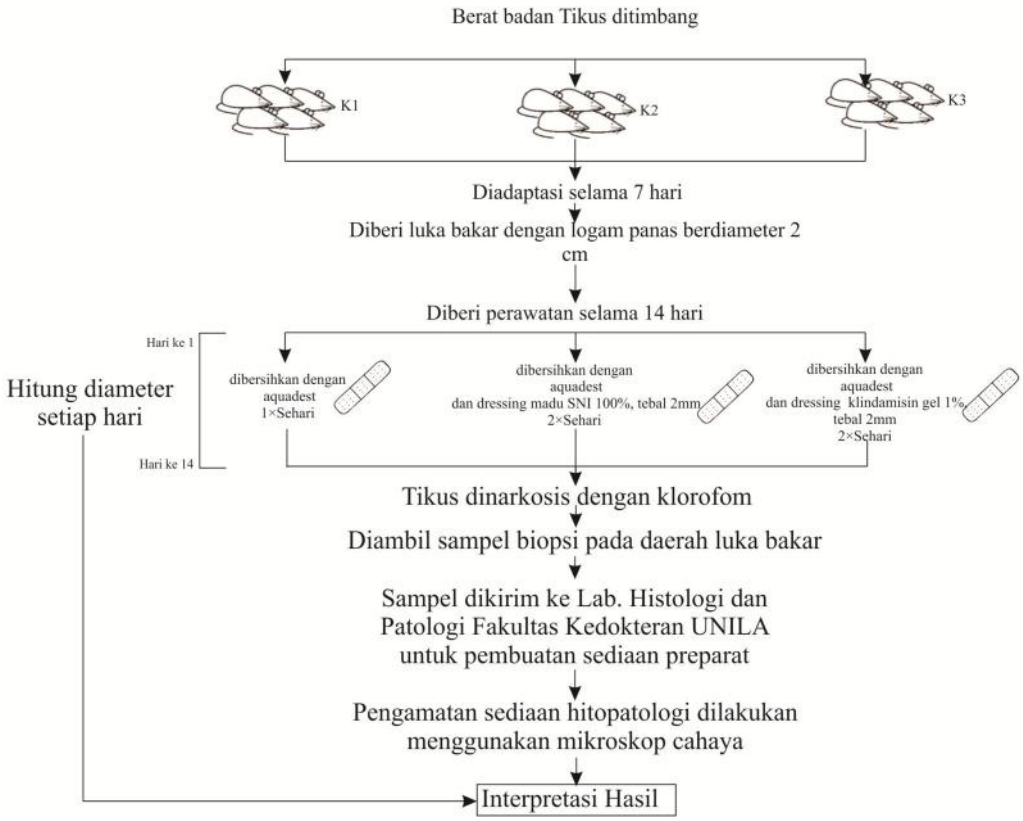
   Sebelum dilakukan pemotongan blok parafin, parafin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan *rotary microtome* dengan menggunakan *disposable knife*. Pita parafin dimekarkan pada *water bath* dengan suhu 60^{o}C. Dilanjutkan dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin.

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:
   - Larutan *xylol* I selama 5 menit
   - Larutan *xylol* II selama 5 menit
   - Ethanol absolut selama 1 jam
2) *Hydrasi* dalam:
   - Alkohol 96% selama 2 menit
   - Alkohol 70% selama 2 menit
   - Air selama 10 menit
3) Pulasan Inti dibuat dengan menggunakan:
   - Haris 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 absolut 2 menit
5) Penjernihan:
   - *Xylol* I selama 2 menit
   - *Xylol* II selama 2 menit
6) *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan deck glass.

4. Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram alur penelitian

H. Definisi Operasional

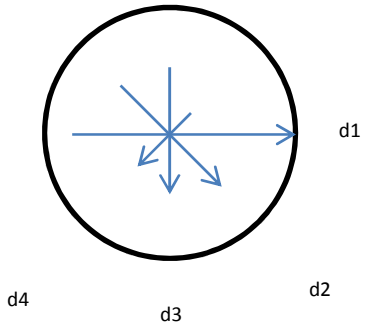
Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis madu yang diberikan kepada tikus percobaan	Dosis madu yang diberikan adalah dosis dressing topikal yang dipakai pada manusia yaitu madu dengan konsentrasi 100% yang diaplikasikan secukupnya terhadap luka.	Numerik
Gambaran histopatologi kulit Tikus	Sediaan histopatologi dilihat dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang dan diamati apakah terdapat reepitelisasi, sel radang, pus dan *scab* pada daerah luka	Kategorik
Gambaran klinis kulit Tikus	Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata diameter penyembuhan luka yang dihitung setiap hari kemudian dihitung persentase dengan rumus $px=\left(\frac{d1-dx}{d1}\right)\times 100\%$ dengan hari pertama sebagai acuan.	Numerik
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, Cemaran Arsen 0,5 mg/kg	
Luka Bakar Derajat II	Lesi 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. Ukuran 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 8. Diameter Luka Bakar.

Diameter luka didapat dengan rumus:

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

Dimana :

dx = 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

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

Dimana :

px = Persentase hari ke x

d1 = diameter hari ke 1

dx = diameter hari ke x

2. Histopatologi

Penyembuhan diobservasi pada hari terakhir penelitian. Gambaran yang dinilai ada atau tidaknya reepitelisasi, sel radang, pus, dan *scab*(keropeng) pada luka bakar setelah 14 hari perawatan menggunakan madu dan klindamisin. Lalu di beri nilai dengan indikator sebagai berikut.

Skor 0 : Jika belum ada reepitelisasi kembali dari kulit

Skor 5 : Jika ada reepitelisasi kembali dari kulit.

Skor -1: Jika masih didapati sel radang.

Skor -1: Jika didapati adanya scab.

Skor -2: Jika didapati adanya pus.

Hasil diamati dalam 5 lapang pandang dan diambil reratanya.

J. Pengolahan dan Analisis Data

Hasil penelitian 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, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, dilakukan transformasi. Jika pada uji ANOVA menghasilkan nilai p<0,05 maka 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.