

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Perlakuan hewan coba dilakukan di dua tempat yaitu Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pada pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan (Desember 2012).

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan yaitu: ethakridin laktat, alkohol 96%, melia propolis, plaster, arloji, anestesi lidokain, kassa steril, aquades tikus putih jantan dewasa galur Sprague Dawley, pakan dan minum tikus.

##### **2. Bahan Kimia**

Bahan yang digunakan untuk membuat preparat histopatologi yaitu dengan metode paraffin meliputi: alkohol absolut, larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, xylol, pewarna Hematoksilin dan Eosin, alkohol 96%, 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, bengkok, kom, silet, jas lab, gunting plester, pinset anatomis, spuit 1cc dan jarum, gunting untuk mencukur rambut/bulu tikus, penggaris, sarung tangan steril, 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.

## C. Subyek Penelitian

### 1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Dalam penelitian ini populasi yang akan digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague Dawley* berumur 3-4 bulan.

### 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 12 sampel ekor tikus putih.

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

##### **Inklusi :**

1. Sehat (aktif, tidak tampak sakit dan rambut/bulu tidak rontok)
2. Memiliki berat badan sekitar 150-180 gram.
3. Berjenis kelamin jantan
4. Berusia sekitar 3-4 bulan

##### **Eksklusi :**

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

## E. Variabel Penelitian

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

Zat aktif yang diberikan pada tikus putih yaitu :

- a. Ethakridin laktate
- b. Propolis

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

Tingkat kesembuhan kulit tikus dengan luka sayat, yaitu :

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

## F. Definisi Operasional

**Tabel 2.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala Ukur
<b>Ethakridin laktat</b>	Ethakridin laktate adalah basa ammonium kuartener disebut juga etakridin, adalah turunan aridin yang berupa serbuk berwarna kuning dan konsentrasi 0,1% kegunaanya sebagai antiseptik borok bernanah, kompres dan irigasi luka terinfeksi	Numerik
<b>Propolis</b>	Propolis adalah suatu zat yang dihasilkan lebah dari berbagai pucuk daun-daun muda yang dicampur dengan air liurnya. Propolis atau lem lebah digunakan untuk menambal dan mensterilkan sarang lebah.	Numerik
<b>Gambaran histopatologi kulit tikus (Mikroskopis)</b>	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 epitelisasi, kolagen dan jumlah pembentukan pembuluh darah baru.	Numerik
<b>Gambaran klinis kulit tikus (Makroskopis)</b>	Gambaran klinis didapat dengan menghitung rata-rata panjang penyembuhan luka yang dihitung pada hari pertama dan ke 6 kemudian dihitung persentase dengan rumus: $px = [(p1-px)/p1] \times 100\%$ dengan hari pertama sebagai acuan.	Numerik

## G. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only controlled group design*. Sebanyak 12 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague Dawley* berumur 3-4 bulan yang dipilih secara *random*. Penelitian ini menggunakan tikus jantan yang bertujuan untuk menghindari adanya pengaruh hormonal yang dapat mempengaruhi respon reaksi imunologis. Adapun penjelasannya :

- 1). Sampel kontrol yaitu bagian tubuh tikus yang diberi luka sayat dengan panjang 2 cm dan sedalam  $\pm 0,5$  cm sampai lapisan subkutan (Muchlas, 2012) yang akan dibiarkan sembuh secara normal tanpa pemberian perlakuan.
- 2). Sampel perlakuan etakridin laktat yaitu bagian tubuh tikus yang diberi luka sayat dengan panjang 2 cm dan sedalam 0,5 cm sampai lapisan subkutan (Muchlas, 2012), selama proses penyembuhan akan diberikan etakridin laktat dengan nama dagang Rivanol yang dibuat oleh PT. Molex Ayus Pharmaceutical, diberikan secara topikal 2 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.
- 3). Sampel perlakuan propolis yaitu bagian tubuh tikus yang diberi luka sayat dengan panjang 2 cm 0,5 cm sampai lapisan subkutan (Muchlas, 2012), selama proses penyembuhan luka diberikan propolis yang diproduksi oleh Herbal Science SDN, BHD Malaysia, yang mengandung 900 mg propolis likuid, dan masih tersegel dan tertutup dengan baik secara topikal 2 kali sehari dan ditutup dengan kassa steril.

## **H. 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 Sayat Terbuka**

Cukur bagian punggung dari tikus putih. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka sayat dengan dosis 0,2 cc lidokain dalam 2 cc aquades (Farmakologi dan Terapi Universitas Indonesia, 2009). Kulit disayat dengan silet sepanjang 2 cm dengan kedalaman kira-kira 0,5 cm.

### **2. Prosedur Penanganan Luka Sayat Terbuka**

Penanganan dilakukan sebanyak dua kali sehari (Handian, 2006) dan selalu dibersihkan sebelum mengaplikasikan ethakridin laktat dan propolis ke tikus putih dengan cara, membersihkannya dengan air aquades. Berikut runtutan prosedur penanganan luka sayat yang akan diaplikasikan.

- a. Tempelkan perlek yang dilapisi kain dibawah luka yang akan dirawat.
- b. Pakai sarung tangan steril
- c. Siapkan kasa.
- d. Olesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan ethakridin laktat setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka dan dengan propolis untuk luka yang lain.
- e. Tutup luka dengan kasa steril
- f. 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 :
  - 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. 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.

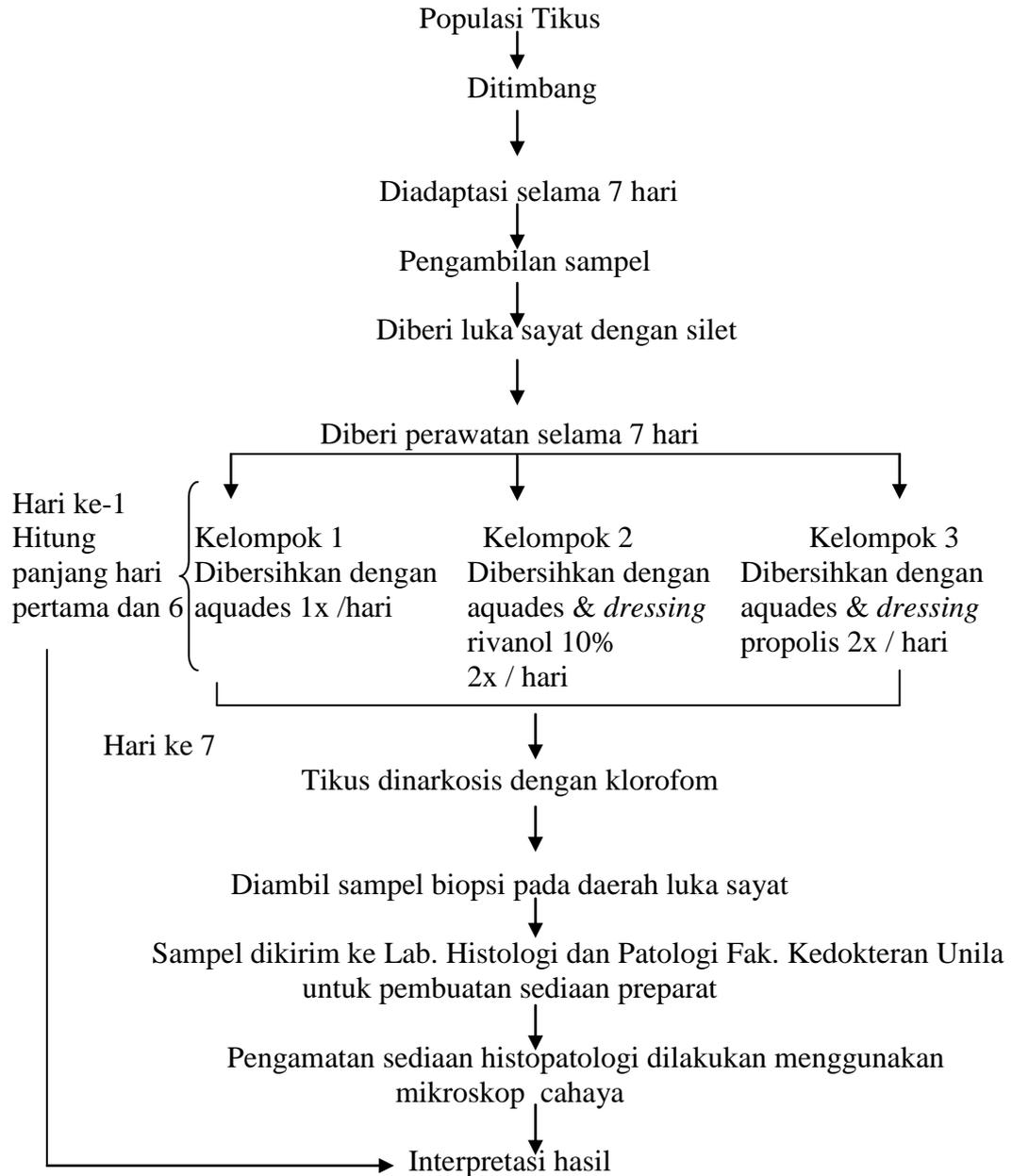
b. Prosedur pulasan HE :

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 :
  - Larutan *xylol* I selama 5 menit
  - Larutan *xylol* II selama 5 menit
  - Etahnol 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*.



**Gambar 6.** Diagram alur penelitian

## I. Cara Pengumpulan Data dan Analisis Data

### 1. Klinis

Dalam penelitian ini digunakan teknik observasi eksperimen, dimana 3 perlakuan pada masing-masing tikus dilakukan pengamatan setiap dua hari sekali untuk melihat penyembuhan secara makroskopis. Pengamatan ini mulai dilakukan dari awal pemberian terapi sampai hari terakhir penyembuhan untuk mengetahui perubahannya dengan batas waktu penelitian selama 7 hari.

Lalu untuk mengukur persentase kesembuhan dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$px = [(p1-px)/p1] \times 100\%$$

dimana :

$px$  = Persentase hari ke  $x$

$p1$  = panjang hari ke 1

$px$  = panjang hari ke  $x$

### 2. Histopatologi

Penyembuhan luka sayat diobservasi pada fase proliferasi. Sampel biopsi diambil satu kali dan serentak pada hari ke 7. Gambaran yang dinilai adalah panjang reepitelisasi dengan sistem skoring pada pembesaran 40x yaitu :

**Tabel 3.** Tabel penilaian mikroskopis.

Parameter dan Diskripsi	Skor
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
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

### 3. 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. 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*. Pengolahan data menggunakan perangkat lunak computer (Dahlan, 2011)