

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini yaitu mencakup bidang ilmu Histologi, Patologi Anatomi dan Farmakologi.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

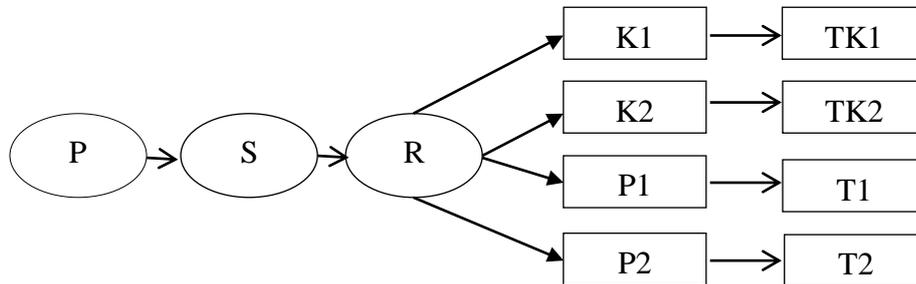
Penelitian, pengumpulan dan analisa data akan dilakukan pada bulan April–Mei 2018. Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat, antara lain :

1. Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk tempat pemeliharaan hewan coba dan pemeriksaan makroskopis kulit pada proses penyembuhan luka bakar hewan coba.
2. Laboratorium Sentral RSND Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebagai tempat pembuatan preparat mikroskopis kulit pada proses penyembuhan luka bakar hewan coba.
3. Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Kariadi sebagai tempat pembacaan preparat mikroskopis kulit penyembuhan luka bakar hewan coba.

3.3. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratory post-test only with control group design* yang menggunakan kelinci (*Oryctolagus*

cuniculus) sebagai hewan coba. Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 7. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

P : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

K1 : Kelompok kontrol negatif, kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka dibersihkan dengan aquades, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke- 10 pada saat perlakuan.

K2 : Kelompok kontrol positif, kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diberi povidone iodine 10% setiap hari, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke- 10 pada saat perlakuan.

P1 : Kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diolesi dengan asap cair 3% setiap hari, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke- 10 pada saat perlakuan.

P2 : Kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diolesi dengan asap cair 6% setiap hari, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke- 10 pada saat perlakuan.

TK1 : Tes kelompok kontrol negatif

TK2 : Tes kelompok kontrol positif

TP1 : Tes kelompok perlakuan 1

TP2 : Tes kelompok perlakuan 2

3.4. Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1. Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

3.4.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang diperoleh dari peternakan di Sumowono dan pasar burung Semarang.

3.4.3. Sampel

3.4.3.1. Kriteria Inklusi

1. Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan.
2. Umur 5-6 bulan.
3. Berat 1-1,5 kg.

4. Kelinci dalam keadaan sehat dan lincah.
5. Tidak terdapat kelainan anatomi

3.4.3.2. Kriteria Eksklusi

1. Mati pada saat perlakuan.

3.4.4. Cara pengambilan sampel

Pemilihan subjek penelitian dilakukan dengan cara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dilakukan karena sampel yang diambil dari kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang sudah diadaptasikan dengan kondisi ruangan laboratorium dan diberi pakan selama 1 minggu.

3.4.5. Besar sampel

Besar sampel dihitung menggunakan rumus Federer, berikut cara perhitungannya :

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

$$(n-1) (4-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

n : banyak pengulangan

t : jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan besar sampel dengan rumus Federer, maka diperlukan 6 sampel untuk setiap kelompok perlakuan dan kontrol. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 6 ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan. Setiap 1 kelinci dilakukan 4 perlakuan, sehingga tiap 1 kelinci dapat mewakili 4 kelompok perlakuan sekaligus yaitu sebagai kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1 dan perlakuan 2.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian asap cair (*liquid smoke*) dengan dosis 3% dan 6%.

3.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran makroskopis dan mikroskopis kulit pada proses penyembuhan luka bakar derajat dua dangkal setelah pemberian asap cair (*liquid smoke*) dengan dosis bertingkat pada hewan coba.

3.6. Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi Operasional Variable

No.	Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Bebas	Pemberian asap cair (<i>liquid smoke</i>)	Asap cair dosis 3% dan 6%	Nominal
2.	Tergantung	Gambaran makroskopis kulit kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Gambaran makroskopis ditentukan berdasarkan Kriteria modifikasi Nagaoka. ^{70,71}	Numerik
3.	Tergantung	Gambaran mikroskopis kulit kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Gambaran mikroskopis kulit pada proses penyembuhan luka bakar pada hewan coba baru dapat dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x kali pada lima lapang pandang di setiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari pengambilan jaringan kulit yang dapat ditentukan penilaiannya berdasarkan kriteria modifikasi Nagaoka. ^{71,72}	Numerik

3.7. Cara Pengumpulan Data

3.7.1. Bahan Penelitian

1. Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan
2. Asap cair (*liquid smoke*) dosis 3% dan 6%
3. Aquades
4. Povidone iodine 10%
5. Eter
6. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a. Larutan buffer formalin 10%.
 - b. Hematoksilin Eosin.
 - c. Larutan xylol.
 - d. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%.
 - e. Larutan aquades.
7. Makanan dan minuman kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

3.7.2. Alat Penelitian

1. Kandang kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) beserta tempat makan dan minumannya.
2. Lempeng logam untuk pembuatan luka bakar
3. Alat biopsi (untuk mengambil jaringan kulit kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)).

4. Alat pembuat preparat histologi : *deck glass*, *object glass*, mikrotom, oven, cetakan paraffin.
5. Mikroskop cahaya.
6. Kamera.

3.7.3. Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran makroskopis dan mikroskopis luka bakarderajat dua dangkal pada kulit kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penilaian dan pengamatan gambaran makroskopis dan mikroskopis luka dilakukan pada hari ke- 10 pada saat perlakuan.

3.7.4. Cara Kerja

Kelinci ditimbang berat badannya terlebih dahulu sebelum dilakukan perlakuan, kemudian dipilih sesuai dengan kriteria inklusi. Enam ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dilakukan adaptasi di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan diberi pakan standar selama 1 minggu. Sesudah dilakukan adaptasi, kelinci dipisahkan menjadi satu kandang yang berisi hanya satu ekor kelinci. Sebelum dilakukan pembuatan luka bakar pada punggung kelinci dilakukan pembiusan inhalasi dengan eter dosis 100 mg/kgBB.

1. Pembuatan Luka Bakar Derajat II Dangkal

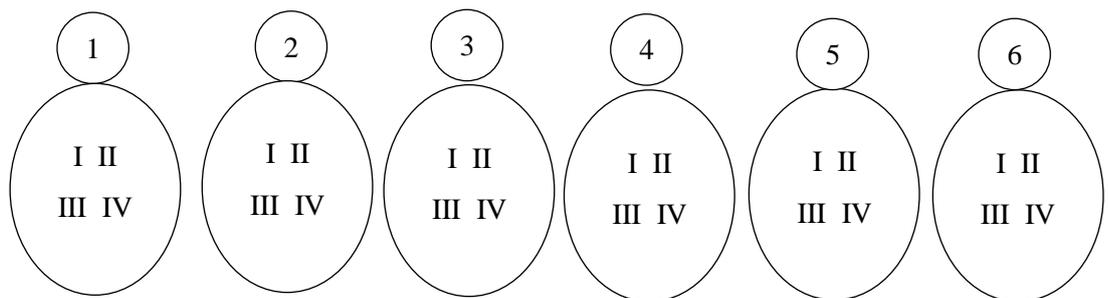
- a. Menentukan terlebih dahulu daerah yang akan dibuat luka bakar
- b. Menghilangkan bulu dengan mencukur sesuai luas area luka bakar yang diinginkan
- c. Memasang perlak dan alasnya di bawah kelinci yang dibuat luka bakar
- d. Mencuci tangan dan memakai sarung tangan
- e. Melakukan anestesi inhalasi pada kelinci yang akan dibuat luka bakar dengan eter pada dosis 100 mg/kgBB
- f. Memberikan desinfeksi dengan alkohol 70% pada kulit yang akan dilukai
- g. Melukai kulit dengan menggunakan lempeng logam diameter 2,5 cm dan tebal 1 mm yang dipanaskan sampai suhu 100°C dengan cara dipanaskan di atas kompor selama 3 menit dan ditempelkan pada punggung kelinci selama 30 detik.

2. Prosedur Penanganan Luka Bakar Derajat II Dangkal

Masing-masing sampel kelinci dilakukan 4 perlakuan, penanganan luka bakar derajat II dilakukan 1 kali sehari, sebelum diberikan asap cair pada luka, luka dibersihkan dahulu menggunakan desinfektan. Berikut prosedur penanganan luka bakar yang akan dilakukan pada kelinci percobaan:

- a. Mencuci tangan.
- b. Menempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka yang akan dirawat.
- c. Memakai *handscoon* dan siapkan kasa.
- d. Mengatur posisi kelinci untuk mempermudah tindakan.
- e. Mengolesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan asap cair dosis bertingkat hingga menutup seluruh permukaan luka bakar untuk setiap kelompok perlakuan.
- f. Kelompok kontrol positif, luka diberikan povidone iodine sedangkan untuk kelompok kontrol negatif luka hanya dibersihkan dengan aquadest.

Berikut rencana perlakuan pada kelinci :



Gambar 8. Rencana Perlakuan pada Kelinci

Keterangan :

I : Kelompok kontrol negatif, kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka dibersihkan dengan aquades.

II : Kelompok kontrol positif, kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diberi povidone iodine 10% setiap hari.

III : Kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diolesi dengan asap cair 3% setiap hari.

IV : Kelinci diberi luka bakar derajat dua dangkal pada daerah punggung dan luka diolesi dengan asap cair 6% setiap hari.

3. Penilaian Makroskopis dan Mikroskopis Luka Bakar

a. Penilaian makroskopis

Penilaian makroskopis luka bakar derajat dua dangkal dilakukan dengan cara skoring menggunakan kriteria Nagaoka yang telah dimodifikasi yaitu sebagai berikut :

Tabel 6. Kriteria Modifikasi Makroskopis Nagaoka

Parameter dan Deskripsi	Skor
Waktu penyembuhan luka	
• Dibawah 7 hari	3
• Antara 7-13 hari	2
• Di atas 14 hari	1
Infeksi lokal	
• Tidak ada infeksi lokal	3
• Infeksi lokal tanpa pus	2
• Infeksi lokal dengan pus	1
Reaksi alergi	
• Tidak ada reaksi alergi	3
• Reaksi alergi berupa warna bintik merah di sekitar luka	1

b. Penilaian Mikroskopis dengan Kriteria Modifikasi Nagaoka

Tabel 7. Kriteria Modifikasi Mikroskopis Nagaoka

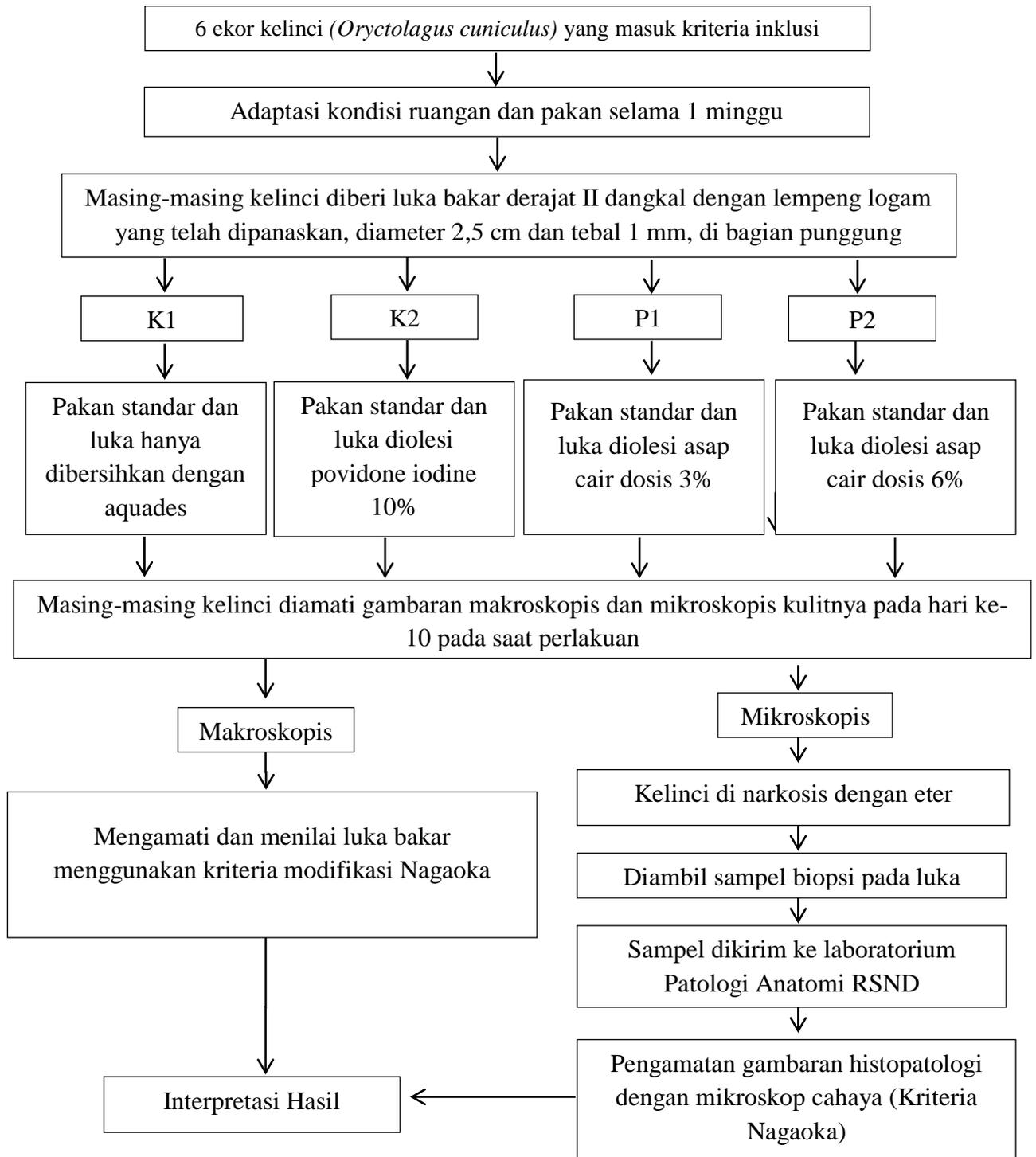
Parameter dan Deskripsi	Skor
Derajat pembentukan kolagen	
• Kepadatan kolagen lebih dari jaringan normal/lapang pandang kecil mikroskop	3
• Kepadatan kolagen sama dengan jaringan normal/ lapang pandang kecil mikroskop	2
• Kepadatan kolagen kurang dari jaringan normal/lapang pandang kecil mikroskop	1
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

4. Prosedur Operasional Pembuatan Slide

- a. Melakukan anestesi inhalasi pada kelinci dengan eter dosis 100 mg/kgBB kemudian dilakukan pengambilan jaringan kulit.

- b. Jaringan kulit selanjutnya dimasukkan pada tabung berisi cairan fiksasi buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian jaringan kulit dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- c. Tempat yang berisi sampel jaringan kulit kelinci ditutup kemudian diserahkan ke analis untuk diolah lebih rinci mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan HE. Dari setiap sampel jaringan kulit dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang dengan perbesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan gambaran mikroskopis pada proses penyembuhan luka bakar jaringan kulit pada kelinci.

3.8. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

3.9. Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan program *software* statistik. Uji normalitas data dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila distribusi data normal, maka dilanjutkan uji statistik parametrik *One-Way ANOVA* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Namun, jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Pada keadaan dimana distribusi data tidak normal, maka uji menggunakan statistik non parametrik *Kruskal-Wallis* yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Pada analisis untuk perbedaan hari yang diamati saat perlakuan, apabila data terdistribusi normal maka dilakukan *Paired t-test* dan dilakukan uji *Wilcoxon* jika data tidak terdistribusi normal. Skoring menggunakan Nagaoka, dilakukan uji statistik non parametrik.

3.10. Etika Penelitian

Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro diajukan sebelum penelitian dilakukan. Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dipelihara di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan coba diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, hewan coba diberikan luka bakar kemudian diolesi asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat .

Hewan dinarkosis dengan eter dosis 100mg/kgBB. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang dikeluarkan untuk penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti.

