

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experiment Design* atau ekpresimental sungguhan dengan menggunakan hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*), dengan *Post Test Only Control Group* karena dalam penelitian ini menggunakan kelompok eksperimen dan kelompok kontrol yang diuji setelah diberikan perlakuan. Kelompok eksperimen dibagi menjadi tiga kelompok, antara lain kelompok krim madu, krim propolis, serta krim kombinasi madu dan propolis. Adapun kelompok yang diterapi betadine sebagai kontrol positif dan kelompok yang diberi basis krim (tanpa bahan aktif) sebagai kontrol negatif. Penelitian ini menggunakan metode *Blind Method* dimana peneliti tidak mengetahui jenis krim yang diberikan pada masing-masing kelompok ketika proses penelitian berlangsung.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Subjek penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* sebanyak 25 ekor, berumur  $\geq 3$  bulan, dengan berat rata-rata 150 - 250 gram dalam keadaan sehat, belum pernah dilakukan penelitian, tidak mempunyai kelainan genetik maupun kelainan anatomis.

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY selama satu minggu.

Menurut Supranto (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana jumlah besar sampel dapat dirumuskan:

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

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah hewan uji untuk setiap kelompok perlakuan

Jumlah perlakuan ada 5 kelompok, maka jumlah sampel untuk tiap kelompok perlakuan dapat dihitung:

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) \geq 15/4$$

$$(r - 1) \geq 3,75$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, dengan waktu penelitian selama 4

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel bebas**

- a. Krim madu
- b. Krim propolis
- c. Krim kombinasi madu dan propolis

##### **2. Variabel kontrol**

- a. Kontrol positif (*Povidone iodine* / betadine)
- b. Kontrol negatif (basis krim atau hanya mengandung bahan dasar tanpa bahan aktif)

##### **3. Variabel tergantung**

- a. Gambaran histologi jumlah fibroblas luka insisi pada setiap kelompok hewan uji.

Hewan uji (tikus putih) dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus (dengan satu tikus sebagai cadangan). Tikus diinduksi luka insisi pada 2 tempat, pada daerah punggung dan paha atas, dengan panjang 15 mm dan kedalaman 1 mm (Nakajima, 2013). Selanjutnya tikus diberi perlakuan sesuai kelompok masing-masing 2x24 jam hingga luka insisi sembuh. Tikus dipilih secara acak atau randomisasi kemudian diberi pakan yang sama dan ditempatkan pada kandang yang terpisah. Pada saat dilakukan perlakuan pada masing-masing kelompok, peneliti tidak mengetahui jenis krim apa yang

sehingga krim yang digunakan akan diberi label berturut-turut, dengan label A, B, C, dan D.

#### **E. Definisi Operasional**

1. Hewan uji adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berumur  $\geq 3$  bulan dengan berat rata-rata 150 – 250 gram, dalam keadaan sehat, belum pernah dilakukan penelitian, tidak mempunyai kelainan genetik maupun kelainan anatomis.
2. Perlakuan olesan krim adalah pemberian aplikasi krim satu oles, yang didalamnya terdapat bahan aktif madu, propolis, kombinasi madu dan propolis, dan tanpa bahan aktif (basis krim) secara topikal pada area luka hewan uji.
3. Perlakuan pemberian betadine adalah pemberian betadine (satu tetes) pada area luka.
4. Krim didefinisikan sebagai bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdespsi dalam bahan dasar yang sesuai. Sediaan ini merupakan sediaan setengah padat (semisolid) dari emulsi yang terdiri dari campuran antara fase minyak dan fase air.
5. Krim kombinasi madu dan propolis merupakan campuran krim yang berbahan aktif madu dan propolis dengan komposisi masing-

masing-masing bahan aktif sebanyak 5 mg/ml.

- 1) Base cream : 4,39 gr (85,74%)
- 2) Bibit minyak wangi : 0,02 ml (2%)
- 3) Propolis cair : 0,11 ml (2,1%)
- 4) Madu : 0,60 gr (11,7%)

6. Krim madu adalah krim dengan bahan yang sama seperti di atas tanpa bahan aktif propolis. Presentasi komposisi propolis diakumulasikan pada basis krim hingga mencapai 100%, begitu juga sebaliknya dengan krim propolis.
7. Basis krim adalah krim dengan kandungan basis krim murni dan bibit minyak wangi, tanpa campuran bahan aktif.
8. Luka insisi dalam penelitian ini adalah luka sayat atau iris yang ditandai dengan tepi luka berupa garis lurus beraturan yang didapatkan dengan menyayat kulit tikus menggunakan pisau anatomis dengan panjang luka 15 mm dan kedalaman luka 1 mm.
9. Terminasi adalah tindakan membunuh hewan uji dengan mengurung tikus ke dalam wadah tertutup yang didalamnya terdapat kloroform dosis tinggi, hingga tikus mati.
10. Indikator kesembuhan secara makroskopik adalah tepi luka terlihat rapat sempurna dengan atau tanpa jaringan parut.
11. Pengamatan mikroskopik adalah pengamatan preparat un

## **F. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat Penelitian :**

#### **a. Alat untuk perlakuan :**

Pisau bedah, alat pencukur bulu tikus, sarung tangan, wadah tertutup untuk anestesi, kandang tikus, timbangan analitik, jangka sorong.

#### **b. Alat untuk pengamatan preparat :**

Mikroskop, dan mikroskop cahaya yang terhubung komputer yang memiliki program optilab.

### **2. Bahan Penelitian**

#### **a. Bahan untuk perlakuan :**

Krim madu, krim propolis, krim kombinasi madu dan propolis, basis krim, betadine (*Povidone iodine*), khloroform, alkohol 70%, *cotton bud*, kapas, tisu.

#### **b. Bahan untuk pembuatan preparat :**

Jaringan kulit, formalin 10%, alkohol 70 – 100 %.

## **G. Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian yang dilaksanakan adalah sebagai berikut :

### **1. Persiapan Sediaan Krim**

Pertama-tama untuk membuat krim kombinasi madu dan propolis bahan-bahan yang diperlukan antara lain:

Basis krim : 1800 gr

Bibit minyak wangi : 10 ml

Propolis cair : 45 ml  
Madu : 250 gr

Semua bahan tersebut (sesuai komposisi diatas) dicampur dan diaduk secara merata hingga kurang lebih 30 menit sampai warna berubah menjadi agak kecoklatan. Untuk mencampurnya, digunakan alat mixer.

Setelah semua bahan benar-benar tercampur dan berwarna agak kecoklatan serta beraroma agak wangi, krim kombinasi madu propolis tersebut sudah siap untuk dikemasi.

Pengemasan dilakukan dalam wadah pot berukuran 5 gram. Pembuatan krim dengan jumlah bahan-bahan diatas, bisa diperoleh kurang lebihnya 410 pc pot ukuran 5 gr.

Basis krim dibeli dalam bentuk bahan jadi langsung yaitu "*Cream Base o/w Moisturizing and Emolient Cream*". Bibit minyak wangi menggunakan jenis/aroma sedap malam yang bisa didapatkan di toko-toko kimia. Propolis cair adalah hasil pembuatan dari peternakan lebah yang telah bekerjasama dengan Arba'in Jaya Mandiri sejak 2002. Sedangkan madu yang digunakan adalah jenis madu bunga karet.

## 2. Pengelompokan Hewan Uji

Persiapan hewan uji berupa penimbangan dan pengelompokan hewan uji sebelum melakukan pada hewan uji

secara random. Hewan uji sebanyak 30 ekor dikelompokkan menjadi lima kelompok yaitu :

Kelompok 1: kelompok uji krim A

Kelompok 2: kelompok uji krim B

Kelompok 3: kelompok uji krim C

Kelompok 4: kelompok uji krim D

Kelompok 5: kelompok kontrol positif (*Povidone iodine/betadine*)

### 3. Induksi Luka Insisi

Tikus yang sudah diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama satu minggu dicukur bersih hingga daerah punggung serta paha kanan dan kiri tikus bersih. Kulit tikus dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70 % dan diberi tanda sepanjang 15 mm pada daerah yang akan dilakukan perlakuan dengan menggunakan jangka sorong.

### 4. Uji efek krim madu, krim propolis, krim kombinasi madu dan propolis, basis krim serta betadine terhadap luka insisi.

Setelah diberi induksi luka insisi, pada kelompok I, II, III, dan IV berturut-turut diolesi krim yang telah dilabeli dengan label A, B, C, dan D sebanyak satu oles untuk masing-masing luka setiap 2x24 jam hingga luka sembuh. Sedangkan untuk kelompok V tikus diberi terapi betadine satu tetes. Kriteria kesembuhan luka pada

## 5. Pembuatan Preparat

Setelah luka pada tikus sembuh, tikus dimuliakan dengan cara mengurungnya di dalam suatu wadah dan menutupnya dengan rapat, yang di dalam wadah tersebut terdapat khloroform dosis tinggi. Setelah tikus mati, bekas luka yang telah terbentuk dieksisi lalu dimasukkan ke dalam pot berisi formalin 10%, kemudian dibawa ke bagian Patologi Anatomi FK UGM untuk dibuat preparat dengan pengecatan HE (Hematocilin Eosin).

Proses pembuatan preparat yaitu :

### a. Penerimaan Jaringan

Jaringan diterima oleh TU Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi adalah jaringan yang diperoleh dengan biopsi insisi/eksisi, nekrosis atau aspirasi yang difiksasi dalam cairan formalin *buffer* 10% dan ditutup dengan rapat. Perbandingan jaringan dengan cairan fiksasi adalah 1:9.

### b. Makroskopis Jaringan

Dokter di Patologi Anatomi mengambil 1 kope dari satu/beberapa tempat. Pengambilan masing-masing kope adalah dengan ukuran 2 x 1, 5 x 0, 2 - 0, 3 cm. Setelah itu jaringan yang diambil tersebut akan dilakukan *processing*.

### c. *Processing* Jaringan

Untuk memproses jaringan memakai alat *tissue processor automatic* yang bekerja  $\pm$  18,5 jam. Proses ini terbagi dalam empat tahap, yaitu :

1) Fiksasi

Fiksasi ini berfungsi mempertahankan struktur gel sehingga stabil secara fisik maupun kimiawi, dan mencegah terjadinya dialisis atau pembengkakan pada ruptur. Fiksasi yang paling sering digunakan adalah formalin 10%, tetapi sebaiknya menggunakan formalin buffer 10%.

2) Dehidrasi

Dehidrasi ini berfungsi untuk menghilangkan/menarik kandungan air dalam jaringan dengan cara memulainya dari konsentrasi yang rendah sampai tinggi. Untuk dehidrasi yang baik memakai alkohol 70% sampai 100%.

3) *Clearing*

*Clearing* berfungsi untuk menarik keluar kandungan alkohol yang terdapat di dalam jaringan, memberikan warna yang bening pada jaringan, dan

Parafin cair dengan suhu 57 - 59°C berfungsi untuk mengisi rongga-rongga atau pori-pori yang ada pada jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan sebelumnya (*xylol*).

d. Pengeblokan / *Embedding*

Jaringan yang sudah selesai di *processing* dikeluarkan dan segera dimasukkan kedalam cetakan blok yang sebelumnya sudah diisi dengan parafin cair. Setelah keras ( $\pm 20$  menit) cetakan dilepas.

e. Pemotongan dengan Mikrotom

Blok dijepitkan pada mikrotom kemudian dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan  $\pm 30^\circ$  terhadap blok parafin setebal 2 - 5 mikron. Hasil pemotongan yang berupa pita kemudian dimasukkan kedalam *waterbath* yang mana sebelumnya sudah diisi dengan air yang dihangatkan  $\pm 50^\circ$  C. Kemudian hasil pemotongan diambil dengan *object glass* dan diberi nomor dengan pensil kaca sesuai dengan nomor registrasi blok. Hasilnya dibiarkan  $\pm 5$  menit dan setelah itu diinkubasi.

f. Inkubasi

Inkubasi ini berfungsi untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan/pita sehingga jaringan menempel kuat pada *object glass*.

g. Pengecatan / *Staining*

Cat yang dipakai dalam pengamatan ini adalah *Hematoxylin-Eosin (HE)*. Adapun proses pengecatannya adalah sebagai berikut:

- 1) **Deparafinisasi** : Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I, II, III, masing-masing selama tiga menit.
- 2) **Rehidrasi** : Preparat dimasukkan ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70%, masing-masing selama dua menit.
- 3) Preparat dimasukkan ke air mengalir
- 4) **Pengecatan Inti** : Preparat dimasukkan ke larutan Mayer Hematoksilin 7 menit.
- 5) Preparat dimasukkan ke air mengalir.
- 6) **Counter Stain** : Preparat dimasukkan ke larutan eosin  $\pm$  30 detik.
- 7) Preparat masuk ke air pada wadah I, II, III, dan masing-masing dilakukan tiga kali pencelupan.
- 8) **Dehidrasi** : Preparat dimasukkan ke alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, masing-masing dicelupkan tiga kali.

10) *Mounting* : Preparat diberi satu tetes entelan dan *deck glass*.

#### 6. Pengamatan Preparat

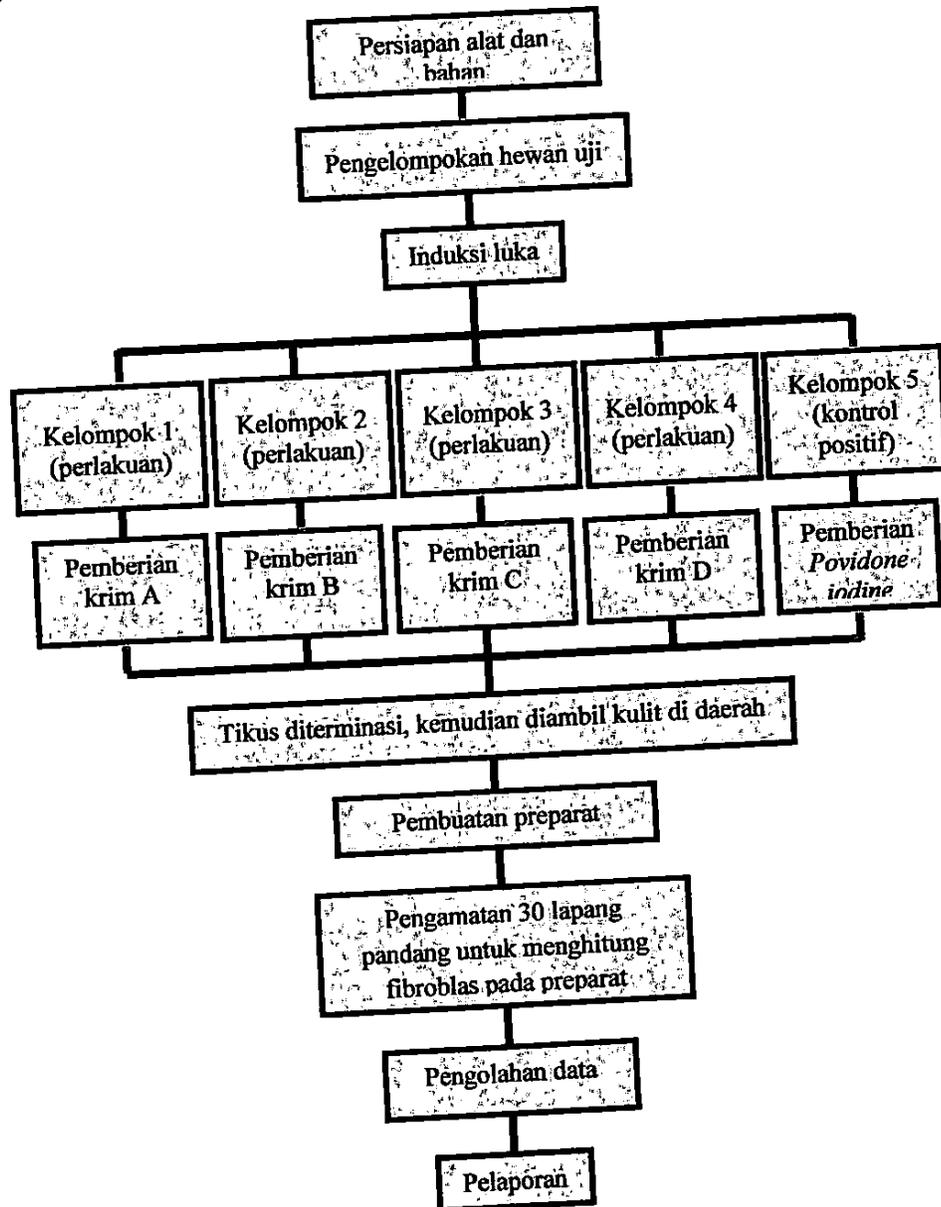
Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat. Untuk setiap preparat dilakukan pengulangan pada 30 lapang pandang.

### H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan jumlah fibroblas merupakan data berskala numerik. Karena dalam penelitian ini menggunakan terdapat 5 kelompok perlakuan (>2 kelompok) dan bukan merupakan variabel yang berpasangan (*independent*) maka untuk menguji hipotesis perbedaan jumlah fibroblas pada semua kelompok perlakuan digunakan analisis statistik *One Way Anova*. Sebelumnya data diuji normalitas dengan menggunakan metode deskriptif dan metode analitik uji *Kolmogorov-Smirnov* karena jumlah sampel 50. Apabila diketahui distribusi data tidak normal, maka uji statistic yang digunakan adalah *Kruskal Wallis*. Kemudian, untuk mengetahui perbandingan pengaruh masing-masing terapi pada setiap kelompok terhadap kelompok yang lain, digunakan uji *Post Hoc Test Multiple Comparison*. Data analisa

luka insisi tikus yang telah mengalami kesembuhan pada semua kelompok, sehingga bisa didapatkan perbedaan kesempurnaan penyembuhan luka.

### I. Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram Alur Penelitian