

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 di uji setelah diberikan perlakuan. Kelompok eksperimen terbagi menjadi tiga kelompok yakni kelompok yang diberi perlakuan olesan krim madu, krim propolis, dan krim kombinasi madu dan propolis. Adapun kelompok kontrol dibagi menjadi dua yaitu kelompok yang diberi betadin 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 apa yang di berikan pada masing – masing kelompok ketika proses penelitian berlangsung.

B. Populasi dan Sampel

Subjek penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan Galur *Wistar* sebanyak 30 ekor, berumur ≥ 3 bulan, dengan berat rata-rata 125 – 250 gram, dalam keadaan sehat, belum pernah dilakukan penelitian, tidak mempunyai kelainan genetik maupun kelainan anatomis.

Hewan uji tersebut sebelumnya diadaptasikan terlebih dahulu di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama 1 minggu. Menurut Supranto J (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan:

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

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah hewan uji

Jumlah perlakuan ada 5 kelompok, maka jumlah sampel untuk tiap 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- 8 minggu (dimulai sejak perlakuan hingga pengamatan preparat).

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 yang hanya mengandung bahan dasarnya tanpa bahan aktif)

3. Variabel tergantung

- a. Gambaran histologi ketebalan epitel luka insisi pada setiap kelompok hewan uji.

Hewan uji (tikus putih) dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus (dengan satu tikus sebagai cadangan) yang diberi perlakuan selama 2x24jam 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 digunakan (kecuali pada kelompok control positif yang diberikan betadine) sehingga krim yang digunakan akan diberi label berturut-turut dengan label A, B, C, dan D.

E. Definisi Operasional

1. Perlakuan olesan krim kombinasi madu dan propolis adalah memberikan aplikasi krim yang didalamnya terdapat kombinasi madu dan propolis secara topikal pada area luka.
2. Krim didefinisikan sebagai bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdepresi dalam bahan dasar yang sesuai. Sediaan ini merupakan sediaan setengah padat (semisolid) dari emulsi yang terdiri dari campuran antara fase minyak dan dan fase air.
3. Krim kombinasi madu dan propolis merupakan campuran krim yang berbahan aktif madu dan propolis dengan komposisi masing-masing bahan per pot uk. 5 gr adalah :

Base cream	: 4.39 gr
Bibit minyak wangi	: 0.02 ml
Propolis cair	: 0.11 ml
Madu	: 0.60 gr

4. Luka insisi dalam penelitian ini adalah luka sayat atau iris yang ditandai dengan tepi luka berupa garis lurus dan beraturan, dilakukan dengan cara menyayat kulit tikus menggunakan pisau anatomis dengan panjang 15 mm dan kedalaman 1 mm.
5. Indikator kesembuhan adalah tepi luka merata baik secara sempurna (hingga tertutup rapat) maupun tidak sempurna (terbentuk jaringan parut dan lesi berwarna pink)

F. Instrumen penelitian

1. Alat :

a. Alat untuk perlakuan :

Jangka sorong, pisau bedah, alat pencukur bulu tikus, handscoon, waadah tertutup untuk anastesi, kandang tikus, timbangan analitik.

b. Alat untuk pengamatan preparat :

Mikroskop cahaya, computer, dan seperangkat alat optilab.

2. Bahan :

a. Bahan perlakuan :

Krim madu, krim propolis, betadine, basis krim, chloroform, cutton bud, alkohol 70%, kapas, tisu.

b. Bahan pemuatan preparat :

Jaringan kulit, formalin 10%, alcohol 70-100%, cat Hematoksilin Eosin (HE).

G. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilaksanakan adalah sebagai berikut :

1. Persiapan Sedian krim

Pertama tama untuk membuat krim kombinasi madu propolis bahan-bahan yang diperlukan adalah :

Base cream : 1800 gr

Bibit minyak wangi : 10 ml

Propolis cair : 45 ml

Madu : 250 gr

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

Selanjutnya setelah semua bahan benar- benar sudah tercampur dan berwarna agak kecoklatan serta beraroma agak wangi, maka krim kombinasi madu propolis tersebut sudah siap untuk dikemasi. Pengemasan dilakukan dalam wadah pot ukuran 5 gr. Dengan jumlah bahan-bahan diatas, bisa diperoleh kurang lebihnya 410 pc pot ukuran 5 gr.

Basis krim dibeli bahan jadi langsung yaitu "Cream Base o/w Moisturizing and Emolient Cream". Bibit minyak wangi, menggunakan jenis/aroma sedap malam yang bias 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 perlakuan pada hewan uji secara random. Hewan uji sebanyak 35 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)

3. Induksi luka insisi

Tikus yang sudah di adaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu di cukur bersih dari daerah punggung serta paha kanan dan kiri tikus terlihat bersih. Kulit tikus dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% dan diberi tanda sepanjang 15mm pada daerah yang akan dilakukan perlukaan

Uji efek krim madu, propolis, kombinasi madu dan propolis, serta betadin 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, D sebanyak satu olesan pada tiap luka sepanjang luka insisi yang diinduksi selama 2x24 jam hingga luka sembuh. Pada kelompok V diberikan betadin satu tetes pada tiap luka. Kriteria penyembuhan luka pada penelitian ini antara lain, secara makroskopik luka terlihat menutup secara sempurna.

4. Pembuatan preparat

Proses pembuatan preparat yaitu :

a. Penerimaan Jaringan

Jaringan yang diterima oleh TU Patologi Anatomi untuk 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

Berfungsi untuk mempertahankan struktur sel sehingga menjadi stabil secara fisik maupun kimiawi dan mencegah terjadinya dialisis atau pembengkakan pada ruptur. Fiksasi yang paling sering digunakan adalah formalin 10%, tetapi sebaiknya formalin buffer 10%.

2) Dehidrasi

Berfungsi untuk menghilangkan/menarik kadar air dalam jaringan dengan cara mulai konsentrasi rendah sampai tinggi. Untuk dehidrasi yang baik memakai alkohol 70% sampai 100%.

3) *Clearing*

Berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan, memberikan warna yang bening pada jaringan dan juga sebagai zat perantara masuknya kedalam parafin.

4) Infiltrasi Parafin

Parafin cair suhu 57 - 59°C berfungsi 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 (± 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 diambil dengan *object glass* dan diberi nomor dengan pensil kaca sesuai dengan nomor registrasi blok, dibiarkan ± 5 menit setelah itu diinkubasi.

f. Inkubasi

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

g. Pengecatan / *Staining*

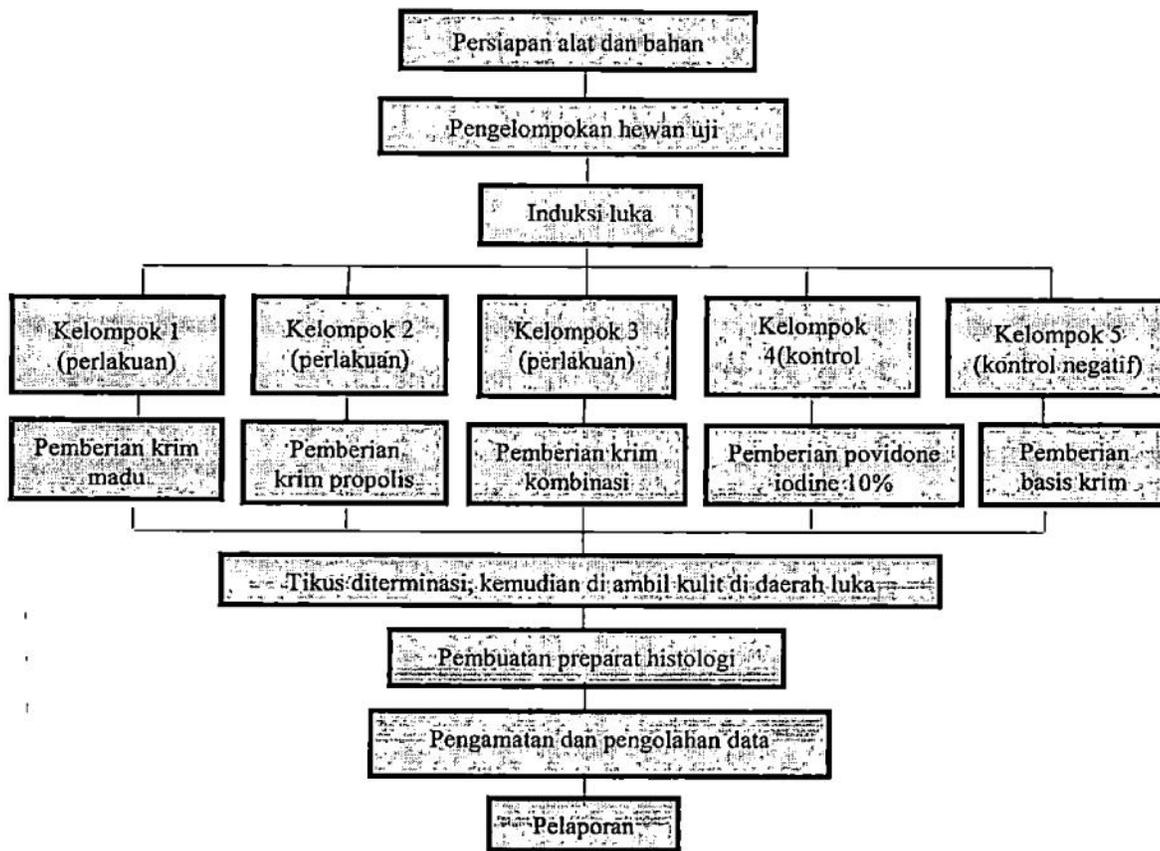
Cat yang dipakai dalam pengamatan ini adalah *Hematoxylin-Eosin (HE)*. Proses pengecatan sebagai berikut :

- 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 selama tujuh menit.
- 5) Preparat dimasukkan ke air mengalir.
- 6) *Counter Stain* : Preparat dimasukkan ke larutan eosin \pm 30 detik.
- 7) Preparat masuk ke air wadah I, II, III, masing-masing tiga kali celup.
- 8) Dehidrasi : Preparat dimasukkan ke alkohol 70%, 80%, 95% 100%, masing-masing tiga kali celup
- 9) *Clearing* : Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I dan II.
- 10) *Mounting* : Preparat diberi satu tetes entelan dan *deck glass*.

5. Pengamatan Epitel

Ketebalan epitel pada permukaan kulit dihitung dengan cara mengukur ketebalan epitel *stratified squamous* yang terlihat berwarna merah jambu dengan inti biru menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan Optilab Viewer melalui media komputer. Setiap satu preparat dilakukan pengukuran sebanyak 30 kali dengan lapang pandang yang berbeda.

6. Alur Penelitian



(Gambar 6.0 Diagram Alur Penelitian)

H. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa ketebalan epitel dalam satuan mikro meter. Data yang terkumpul diuji normalitas dengan *Kolmogorof-Swirnov*, apabila distribusi data normal, dianalisis menggunakan statistik deskriptif *One Way Anova* dengan *Post Hoc*. Jika diketahui sebaran data tidak normal, maka dilakukan analisis dengan metode *Kruskal-Wallis* pada semua kelompok penelitian.