

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

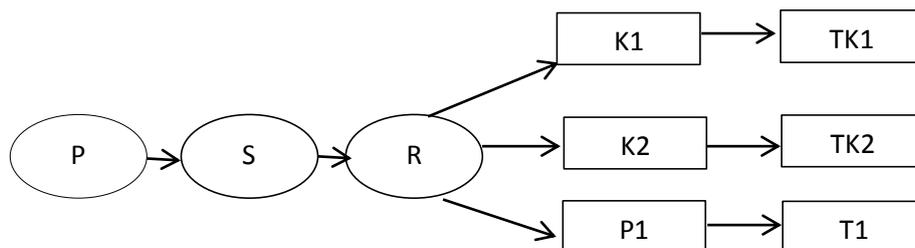
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

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

1. Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebagai tempat pemeliharaan hewan coba serta untuk pemeriksaan makroskopis kulit pada proses penyembuhan luka sayat hewan coba
2. Laboratorium Sentral RSND Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebagai tempat pembuatan preparat serta untuk pemeriksaan mikroskopis kulit pada proses penyembuhan luka sayat hewan coba

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *Eksperimental Laboratorik* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebagai hewan coba. Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 6. Skema rancangan penelitian

Keterangan :

P : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

K1 : Kelompok kontrol negatif, Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat hanya dibersihkan dengan aquades, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke 10 pada saat perlakuan

K2 : Kelompok kontrol positif, Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat diberi povidon iodine 10% setiap hari, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke 10 pada saat perlakuan

P1 : Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat dioleskan sediaan asap cair dengan konsentrasi 3% setiap hari, kemudian diamati gambaran makroskopis dan mikroskopisnya pada hari ke 10 pada saat perlakuan

P2 : Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat dioleskan sediaan asap cair dengan konsentrasi 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 Kelinci Desa Sumowono, Semarang.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a) Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan
- b) Umur 5-6 bulan
- c) Berat 1-1,5 kg

- d) Kelinci dalam keadaan sehat dan lincah
- e) Tidak terdapat kelainan anatomi

3.4.3.2 Kriteria Esklusi

Mati pada saat perlakuan

3.4.4 Cara pengambilan sampel

Pada penelitian ini, pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat 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 pakan selama 1 minggu.

3.4.5 Besar sampel

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer, berikut cara perhitungannya :

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

n : banyak pengulangan

t : jumlah perlakuan

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan besar sampel dengan rumus Federer, maka diperlukan sampel sebanyak 6 untuk setiap kelompok perlakuan dan kontrol. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 6 ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan. Pada setiap 1 kelinci dilakukan 4 perlakuan sayat, sehingga setiap 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*) dosis bertingkat 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 sayat setelah pemberian asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat pada hewan coba

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 6. Definisi operasional variabel

No	Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Bebas	Pemberian asap cair (<i>liquid smoke</i>)	Asap cair dosis bertingkat dengan dosis 3% dan 6%	Nominal
2.	Tergantung	Gambaran makroskopis kulit kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Gambaran makroskopis ditentukan penilaiannya berdasarkan : Kriteria modifikasi Nagaoka. ^{25,26} Mengukur panjang luka (cm) dengan menggunakan penggaris	Numerik Numerik
3.	Tergantung	Gambaran mikroskopis kulit kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Gambaran mikroskopis kulit pada proses penyembuhan luka sayat pada hewan coba baru dapat dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x kali pada 5 lapangan pandang di setiap spesimen menggunakan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari sampel jaringan yang dapat ditentukan penilaiannya berdasarkan kriteria Nagaoka. ^{26,27}	Numerik

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

1. Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan
2. Asap cair (*liquid smoke*) 3% dan 6%

3. Povidon iodine 10%
4. Eter 100mg/kgBB
5. Aquades
6. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - ✓ Larutan buffer formalin 10%
 - ✓ HE
 - ✓ Larutan xylol
 - ✓ Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - ✓ Larutan aquades
7. Makanan dan Minuman kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

3.7.2 Alat Penelitian

- Kandang kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) beserta tempat makan dan minumannya
- Scalpel (untuk mengambil jaringan kulit kelinci (*Oryctolagus cuniculus*))
- Alat pembuatan preparat histologi : deckglass, objekglass, mikrotom, oven, cetakan paraffin
- Mikroskop cahaya
- Kamera

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran makroskopis dan mikroskopis luka sayat pada kulit kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan

kelompok kontrol. Penilaian dan pengamatan gambaran makroskopis dan mikroskopis luka sayat dilakukan pada hari ke 10 pada saat dilakukan perlakuan.

3.7.4 Cara Kerja

Sebelum dilakukan perlakuan kepada semua kelinci laboratorium, melakukan penimbangan berat badan terlebih dahulu pada masing-masing kelinci, kemudian memilih yang sesuai dengan kriteria inklusi. Enam ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang sudah masuk kriteria inklusi kemudian dilakukan adaptasi di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan diberi pakan standar secukupnya selama 1 minggu. Sesudah masa adaptasi, kelinci dipisahkan menjadi satu kandang berisi satu ekor kelinci. Sebelum dilakukan pembuatan luka sayat pada punggung kelinci dilakukan pembiusan inhalasi dengan eter. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 100 mg/kgBB.⁴²

3.7.4.1 Pembuatan Luka Sayat Stadium II

Cara pembuatan luka sayat stadium II :

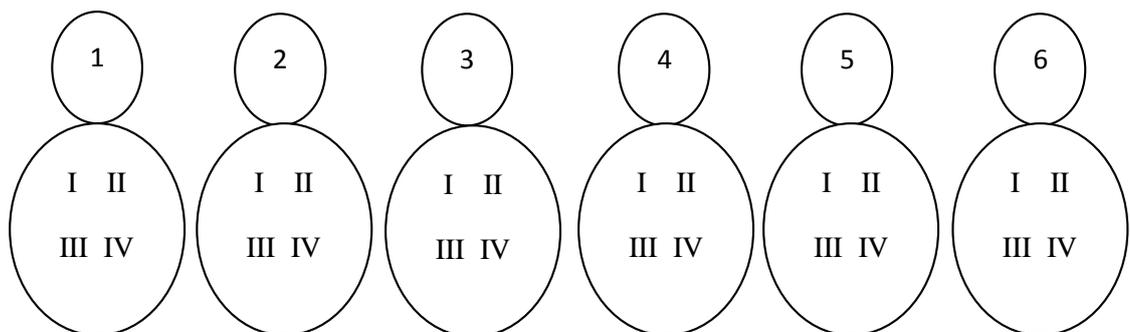
- a. Menentukan terlebih dahulu daerah yang diberi luka sayat
- b. Menghilangkan bulu dengan mencukur sesuai dengan luas area luka sayat yang diinginkan
- c. Memasang perlak dan alasnya di bawah kelinci yang diberi luka sayat
- d. Mencuci tangan dan memakai sarung tangan
- e. Melakukan anestesi inhalasi pada kelinci yang diberi luka sayat dengan eter dosis 100 mg/kgBB kelinci, kemudian menunggu selama 2 menit hingga kelinci terlihat lemah dan tak sadarkan diri

- f. Mengoles kulit kelinci dengan alkohol 70%
- g. Melukai bagian yang diberi luka sayat dengan menggunakan pisau bedah steril dengan kedalaman luka ± 2 mm serta panjang luka 3 cm

3.7.4.2 Prosedur Penanganan Luka Sayat Stadium II

Pada masing-masing sampel kelinci dilakukan 6 perlakuan sayat, penanganan luka sayat derajat II dilakukan 1 kali perhari, sebelum diberikan asap cair pada luka, luka dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan air aquadest. Berikut prosedur penanganan luka sayat yang dilakukan pada kelinci percobaan:

- a. Mencuci tangan
- b. Menempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka yang dirawat.
- c. Memakai sarung tangan steril dan mempersiapkan kasa.
- d. Mengatur posisi kelinci untuk mempermudah tindakan
- e. Mengolesi bagian luka dengan kasa yang telah dibasahi dengan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat setebal 2 mm hingga menutup seluruh permukaan luka sayat untuk setiap kelompok perlakuan, berikut perlakuan dan area luka sayat yang dilakukan pada masing-masing kelompok :



Gambar 7. Rencana perlakuan pada kelinci

I : Kelompok kontrol negatif, Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat hanya dibersihkan dengan aquades

II : Kelompok kontrol positif, Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat diberi povidon iodine 10% setiap hari

III : Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat dioleskan sediaan asap cair dengan konsentrasi 3% setiap hari

III : Kelinci diberi luka sayat pada daerah punggung dengan kedalaman ± 2 mm serta panjang luka 3 cm dan luka sayat dioleskan sediaan asap cair dengan konsentrasi 6% setiap hari

g. Tutup luka dengan kasa bersih dan steril

h. Setelah perlakuan selesai, kelinci dilihat kondisinya untuk ditentukan apakah masih masuk kriteria inklusi atau tidak

3.7.4.3 Penilaian Makroskopis dan Mikroskopis

Gambaran makroskopis ditentukan penilaiannya berdasarkan kriteria modifikasi Nagaoka^{25,26} serta panjang luka (cm) dengan menggunakan penggaris, sedangkan untuk penilaian mikroskopis dilakukan menilai sampel jaringan kulit kelinci terlebih dahulu yang kemudian juga dinilai dengan kriteria modifikasi Nagaoka.^{26,27}

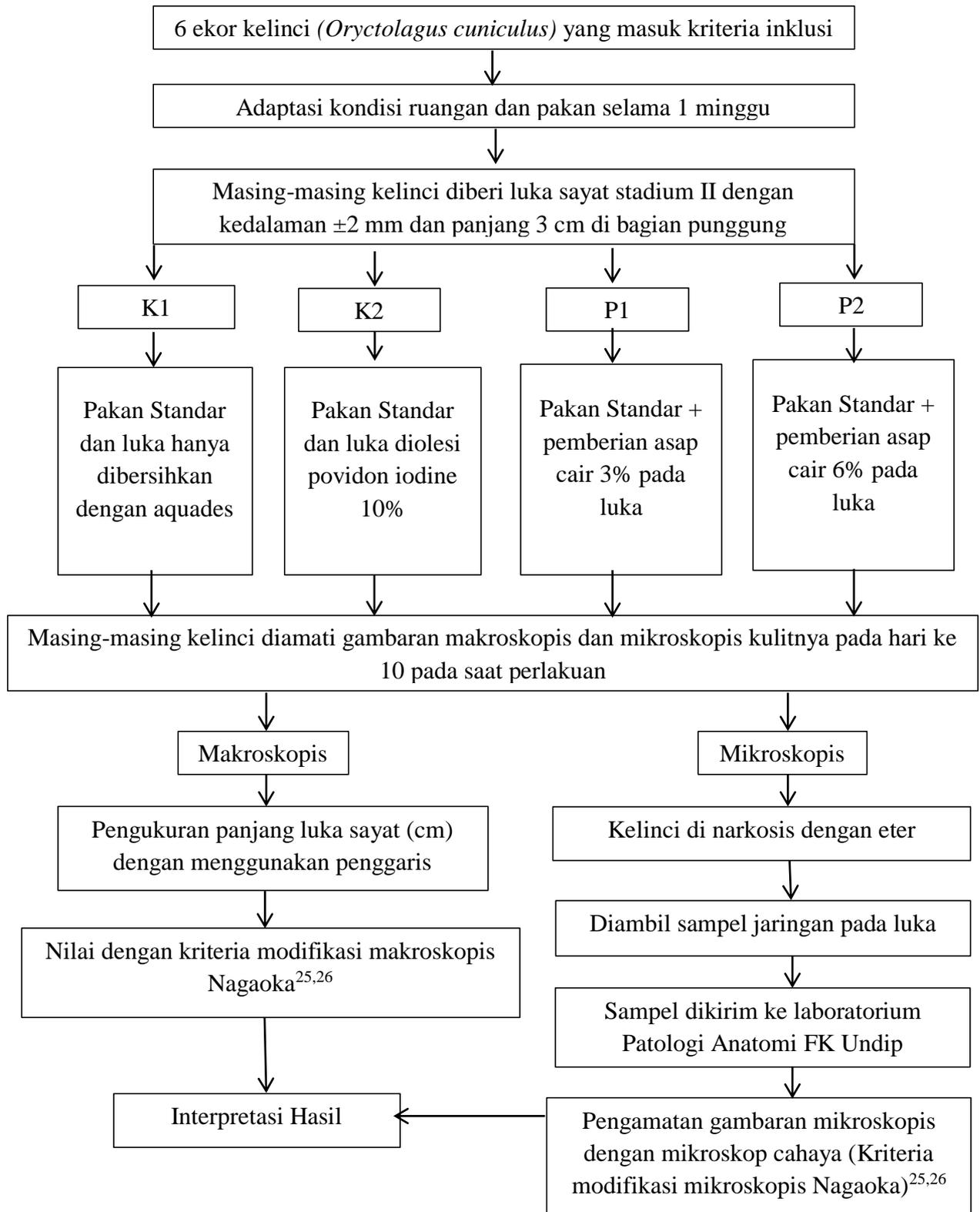
Tabel 2. Kriteria modifikasi makroskopis Nagaoka

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

Tabel 3. 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

3.8 Alur Penelitian



Gambar 8. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Dari hasil penelitian ini dianalisis menggunakan program *software* statistik. Uji normalitas data numerik dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kecil, jika data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan 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 skor modifikasi Nagaoka, dilakukan uji statistik nonparametrik.

- Jika $p \leq 0,05$; terdapat perbedaan yang bermakna
- Jika $p > 0,05$; tidak terdapat perbedaan yang bermakna

Apabila didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka terdapat perbedaan bermakna gambaran makroskopis dan mikroskopis pada kulit kelinci yang diberikan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat dengan yang tidak diberikan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat.

Apabila didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak terdapat perbedaan bermakna gambaran makroskopis dan mikroskopis pada kulit kelinci yang diberikan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat dengan yang tidak diberikan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat.

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 sayat stadium II lalu kemudian diberikan asap cair (*liquid smoke*) dosis bertingkat untuk diamati gambaran makroskopis dan mikroskopis proses penyembuhan luka sayat pada kulit. Untuk mengamati gambaran mikroskopis, hewan coba dinarkosis dengan eter dosis 100mg/kgBB. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang dikeluarkan untuk penelitian ini ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

No.	Jenis Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5				Bulan 6			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Studi literatur																								
2	Penyusunan proposal																								
3	Seminar proposal																								
4	<i>Ethical clearance</i>																								
5	Perizinan instansi terkait																								
6	Persiapan Alat Bahan																								
7	Perlakuan																								
8	Pengambilan data <i>post test</i>																								
9	Analisis data dan penyusunan hasil																								
10	Seminar hasil																								

Gambar 9. Jadwal Penelitian