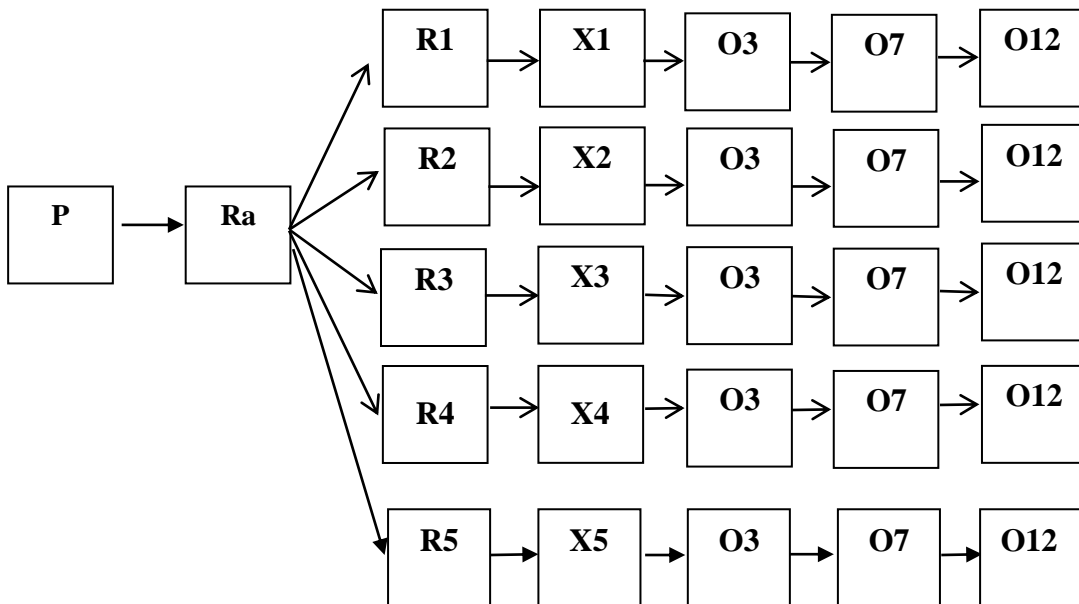


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan desain penelitian *true experimental*. Metode pengamatan dalam penelitian ini menggunakan pengamatan *post-tes only control group design*, yaitu untuk mengukur pengaruh gel lidah buaya dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40% pada kelompok eksperimental dan dibandingkan dengan kelompok kontrol menggunakan *tule-framycetin sulfate* 1% dan NaCl 0,9% . Pada rancangan ini terdapat 2 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Berikut skema *post-tes only control group design*.



Keterangan :

1. P : Populasi
2. Ra: Random Alokasi
3. R1: Kelompok kontrol (-) 1 menggunakan NaCl 0,9%.

4. R2: Kelompok kontrol (+) 2 menggunakan tulle *framycetin sulfate* 1%
5. R3: Kelompok perlakuan 1 menggunakan gel lidah buaya 10%
6. R4: Kelompok perlakuan 2 menggunakan gel lidah buaya 20%
7. R5 : Kelompok perlakuan 3 menggunakan gel lidah buaya 40%
8. X1: Perlakuan pada kelompok kontrol 1 diberikan perawatan menggunakan NaCl 0,9%.
9. X2: Perlakuan pada kelompok kontrol 2 diberikan perawatan menggunakan tulle *framycetin sulfate* 1%
10. X3: Perlakuan pada kelompok perlakuan 1 yang diberikan perawatan menggunakan gel lidah buaya 10%
11. X4: Perlakuan pada kelompok perlakuan 2 yang diberikan perawatan menggunakan gel lidah buaya 20%
12. X5 : Perlakuan pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan perawatan menggunakan gel lidah buaya 40%
13. O3: hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap jumlah peningkatan fibroblas pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-3
14. O7: hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap jumlah peningkatan fibroblas pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-7
15. O12: hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap jumlah peningkatan fibroblas pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-12

3.2 Desain Sampling

3.2.1 Populasi

Populasi merupakan seluruh subjek atau objek dengan karakteristik tertentu yang akan diteliti (Hidayat, 2008). Populasi penelitian pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) sesuai kriteria inklusi.

3.2.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel penelitian adalah sebagian dari keseluruhan obyek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi. Dengan kata lain, sampel adalah elemen – elemen populasi yang dipilih berdasarkan kemampuan mewakilinya (Setiadi 2013).

Penghitungan jumlah tikus yang akan digunakan sebagai hewan coba, dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Federer, 1963) :

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

r = Banyak sampel tiap perlakuan

t = Banyak intervensi pada tiap kelompok

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 5$$

Jadi jumlah sampel untuk setiap kelompok minimal 5 ekor.. Pemeriksaan dilakukan tiga kali yaitu hari ke 3, hari ke 7 dan hari ke 12 pada masing-masing

kelompok dan terdapat 1 cadangan pada tiap kelompoknya. Sehingga pada masing-masing hari observasi dibutuhkan 25 tikus. Jadi total sampel yang diperlukan sebanyak 80 ekor, namun yang dipergunakan untuk pengambilan sampel 75 ekor.

3.2.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi merupakan kriteria yang memenuhi syarat sebagai sampel.

Dalam penelitian ini kriteria inklusi adalah :

1. Jenis tikus adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar usia 2-3 bulan.
2. Berjenis kelamin jantan.
3. Berat badan antara 200-250 gram.
4. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulunya licin, mengkilat dan bersih, bulunya tebal dan tidak ada kerontokan bulu yang berarti, badannya tegap tidak kerempeng, tidak keluar lendir, nanah atau darah dari mata atau telinga, tidak terlalu banyak ludah, tidak mencret dan pernapasan tenang.
5. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya.
6. Tidak ada kecacatan pada bagian punggung tikus.
7. Aklimatisasi selama 7 hari.

3.2.2.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi (kriteria yang tidak layak diteliti) adalah menghilangkan/ mengeluarkan subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan studi karena berbagai sebab (Setiadi, 2013). Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah :

1. Tikus mengalami luka infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah), eksudat yang berlebihan sebelum di aklimatisasi.

2. Tikus mengalami luka bisa karena gigitan, atau benda tajam lainnya sebelum di aklimatisasi.

3.2.3 Teknik Sampling

Sampling adalah suatu proses dalam menyeleksi porsi untuk menjadi sampel dari populasi untuk dapat mewakili populasi (Setiadi, 2013). Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah *Purposive Sampling*, sesuai kriteria inklusi. Kemudian tikus diacak menjadi 5 kelompok pada setiap kelompok masing – masing dibutuhkan sebanyak 6 ekor , sampel diambil dari kelompok kontrol 1 dengan pemberian NaCl 0.9%, kelompok kontrol 2 dengan pemberian *tule-framycetin sulfat* 1%, kelompok perlakuan gel lidah buaya 10%, kelompok perlakuan gel lidah buaya 20%, dan kelompok perlakuan gel lidah buaya 40% yang sesuai dari kriteria Inklusi dan eksklusi yang ditentukan oleh peneliti.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang nilainya menentukan variabel lain (Nursalam, 2008). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perawatan luka sayat menggunakan NaCL 0,9%, *tule-framycetin sulfat* 1% dan gel lidah buaya konsentrasi 10%, 20% dan 40%.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah aspek tingkah laku yang diamati dari suatu organisme yang dikenai stimulus (Nursalam, 2008). Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah fibroblas pada jaringan kulit tikus galur wistar dengan luka sayat

3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional akan dijelaskan secara padat mengenai unsur penelitian yang meliputi bagaimana caranya menentukan variabel dan mengukur suatu variabel (Setiadi, 2013).

Table 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Skala	Skoring
Perawatan luka sayat menggunakan gel lidah buaya	Suatu tindakan perawatan luka sayat menggunakan lidah buaya yang diekstrak dengan etanol menjadi gel lidah buaya 10%, 20%, dan 40% sebagai bahan dalam teknik perawatan luka	Melakukan perawatan luka meliputi : <ol style="list-style-type: none"> 1. Mempersiapkan alat dan bahan 2. Melakukan cuci tangan 6 langkah dan memasang APD 3. Melakukan pembersihan luka atau pencucian luka dengan NaCl 0.9% 4. Mengobservasi keadaan luka 5. Merawat luka dengan diberikan gel lidah buaya 10%, 20%, dan 40% secara topikal 6. Rapikan tikus dan bereskan peralatan 	SOP Perawatan Luka menggunakan gel lidah buaya		
Jumlah jaringan fibroblas	Penilaian yang dilakukan secara mikroskopik di laboratorium pada keadaan luka sayat dimana pemeriksaan laboratorium patologi anatomi di observasi jumlah	Jumlah fibroblas pada jaringan kulit	Lembar observasi	Rasio	Jumlah fibroblas pada jaringan

	fibroblas pada jaringan kulit. Pada hari ke-3,7, dan 12 yang dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Jumlah fibroblas mengalami peningkatan pada hari ke-3 sampai dengan hari ke-24, kemudian akan mengalami penurunan setelah terbentuk serat kolagen. Serat kolagen mulai terbentuk pada hari ke – 21, kecepatan sintesis kolagen yang tinggi mengembalikan luka ke jaringan normal dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. (Potter,2006)				
--	--	--	--	--	--

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan coba, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Malang Malang yang dilaksanakan bulan 17 Desember 2018 – 5 Januari 2019, dan pewarnaan Hematoxilin Eosin di

Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang yang dilaksanakan bulan 17 Desember 2018 – 5 Januari 2019.

3.6 Alat, Bahan, dan Instrumen Penelitian

3.6.1 Pembuatan Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe Vera*)

Proses pembuatan ekstrak lidah buaya (*Aloe Vera*) (terlampir pada lampiran 7).

Alat :

1. Timbangan analitik
2. Gelas ukur
3. Blender
4. alat pembuatan gel ekstrak,
5. alat uji daya lekat gel,
6. alat uji daya sebar gel
7. alat uji viskositas gel,
8. alat pembuatan /formulasi gel

Bahan :

1. daun segar lidah buaya sebagai ekstrak,
2. etanol 70%,
3. Aquades
4. Handscon

3.6.2 Pembuatan Luka Sayat

Prosedur pembuatan luka sayat (terlampir di lampiran 2)

Alat :

1. Handvat mess
2. Pisau cukur
3. Pinset
4. Bengkok

Bahan :

1. Kassa steril
2. Alcohol 70%
3. handscoon
4. Obat anastesi (Chloroform)
5. Kapas

3.6.3 Pengukuran Jumlah Fibroblas

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putra (2012), pengukuran jumlah fibroblas dilakukan dengan cara dilakukan pengambilan kulit mencit untuk dilakukan pemeriksaan histopatologis. Kulit yang sudah diambil difiksasi dalam dalam larutan buffer formalin 10% untuk pewarnaan hematoxilin eosin. Penilaian mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x pada 10 lapang pandang. Kepadatan fibroblas dinilai dengan

cara menghitung jumlah fibroblas pada 10 lapang pandang dan dibandingkan antara kelompok kontrol dan perlakuan.

3.6.4 Perawatan Luka

Prosedur perawatan luka (terlampir pada lampiran 3,4,dan 5)

Alat :

1. Bak instrument
2. Bengkok
3. Pinset Anatomis 2 buah
4. Kom
5. Gunting
6. Handscoon steril
7. Plester
8. Gunting

Bahan :

1. Kassa steril
2. *Transparent film*
3. Gel lidah buaya 10%
4. Gel lidah buaya 20%
5. Tule
6. NaCl 0,9%
7. Cotton Bud

3.6.5 Pemeliharaan Tikus Putih Galur Wistar

Prosedur pemeliharaan (terlampir dilampiran 6)

1. Kandang/bak tikus dan sekam
2. Penutup kandang dari anyaman kawat
3. Botol air
4. Makanan tikus

3.6.6 Teknik Pencegahan Infeksi

1. Tempat cuci tangan/wastafel
2. Sabun cuci tangan
3. *Hand Sanitizer*
4. Kain handuk kecil
5. Sarung tangan bersih/steril
6. Jas lab
7. Masker

8. Sandal lab

3.6.7 Proses Pengerjaan Preparat Histopatologi dilakukan oleh Peneliti Dan Dibantu Oleh Petugas Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang

A. Proses pemotongan jaringan berupa makros

- a) Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10% atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya.
- b) Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
- c) Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
- d) Di masukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti.
- e) Jaringan kemudian di proses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual
- f) Standart di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 menit
- g) Alarm bunyi tanda selesai.

B. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan

- a) Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
- b) Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
- c) Jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron

C. Proses deparafinisasi

Setelah di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, ditaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi) dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

D. Proses pewarnaan Hematoxilin Eosin

- | | |
|---|------------------------------|
| a) Cat utama harris hematoksilin selama | 10-15 menit |
| b) Cuci dengan air mengalir selama | 15 menit |
| c) Alkohol asma 1% | 2-5 celup |
| d) Amonia lithum karbonat | 3-5 celup (bila kurang biru) |
| e) Eosin | 10-15 menit |

E. Alkohol bertingkat

- | | |
|--------------------|---------|
| a) Alkohol 70% | 3 menit |
| b) Alkohol 80% | 3 menit |
| c) Alkohol 96% | 3 menit |
| d) Alkohol absolut | 3 menit |

F. Penjernihan (clearring)

- | | |
|----------|----------|
| a) Xylol | 15 menit |
| b) Xylol | 15 menit |

G. Mounting dengan entelan dan deckglass

Slide/objek glass ditutup dengan cover glass dan biarkan slide kering pada suhu ruangan setelah slide kering siap untuk diamati. (Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang)

3.6.8 Instrumen Penelitian

Instrumen dalam penelitian ini adalah memberikan perlakuan dan lembar observasi. Setelah pemberian ekstrak gel lidah buaya, dilakukan pewarnaan Hematoxilin Eosin untuk melihat jumlah fibroblas secara mikroskopis setelah dilakukan perawatan luka setiap hari. Setelah luka dirawat kemudian diambil specimen kulit pada hari ke 3,7 dan 12 untuk dilakukan observasi jumlah fibroblas. Hasil observasi ini dilampirkan di lembar observasi untuk mengetahui jumlah fibroblas pada jaringan kulit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

3.7 Metode Pengumpulan Data

3.7.1 Perijinan Penelitian

Adapun hal – hal yang harus dilakukan peneliti untuk mengurus izin penelitian adalah sebagai berikut :

1. Peneliti mengurus surat untuk perijinan penelitian menggunakan hewan coba yang ditujukan kepada Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Malang.
2. Peneliti mengurus surat perijinan menggunakan laboratorium untuk penelitian yang ditujukan kepada kepala Laboratorium Poltekkes Kemenkes Malang.
3. Peneliti mengurus perijinan penelitian menggunakan Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

3.7.2 Pembuatan Gel Lidah Buaya

Pembuatan gel lidah buaya dilakukan di UPT Matera Medika Batu. Peneliti menyiapkan lidah buaya yang akan dijadikan gel. Lidah buaya yang digunakan adalah jenis *Aloe Vera Berbandasis Miller*. Pembuatan ekstrak lidah buaya dengan menggunakan teknik maserasi selama 72 jam, kemudian dilakukan

pembuatan gel sesuai konsentrasi. Sebelum dibentuk gel dilakukan analisis fitokimia dengan identifikasi vitamin a, vitamin e, vitamin d, saponin, flavonoid, dan alkaloid. Proses pembuatan gel lidah buaya yaitu ekstrak lidah buaya di tambahkan dengan komposisi lain yaitu TEA 2%, Nipalgin 0,2%, Gliserin 25%, CMC Na 4% dan aquades, sebagai basis pengental gel.

3.7.3 Menentukan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ditentukan sesuai dengan kriteria inklusi masing-masing 5 tikus pada tiap kelompok penelitian.

3.7.4 Pembuatan Luka Sayat

Rambut tikus bagian punggung dicukur sampai permukaan kulit, kemudian didesinfeksi dengan alkohol 70% kemudian dilakukan pembuatan luka sayat, lalu luka sayat dibuat dengan menggunakan handvat mess pada punggung kanan atau kiri. Panjang luka dibuat ± 2 cm, dengan kedalaman sampai subkutis. Prosedur pembuatan luka sayat (terlampir dilampiran 2)

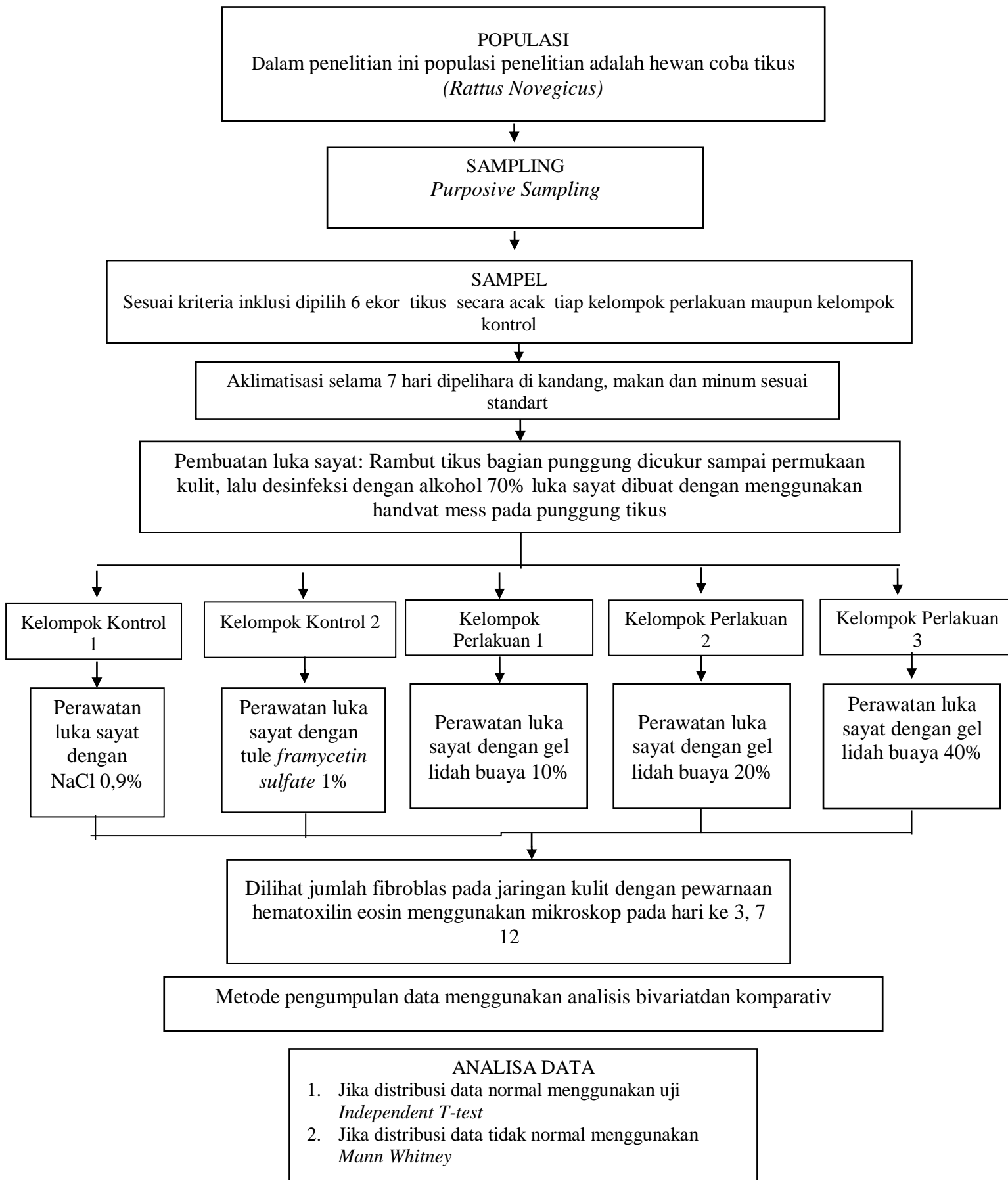
3.7.5 Perawatan Luka Sayat

Perawatan luka sayat dilakukan oleh peneliti menggunakan NaCl 0,9% pada kelompok kontrol 1, tulle *framycetin sulfat* 1% pada kelompok kontrol 2, gel lidah buaya 10% pada kelompok perlakuan 1, gel lidah buaya 20% pada kelompok perlakuan 2 dan gel lidah buaya 40% pada kelompok perlakuan 3.

3.7.6 Pengamatan Jumlah Fibroblas pada Jaringan

Pengamatan jumlah fibroblas pada jaringan dilakukan pada hari ke-3, ke-7 dan ke-12 dengan pewarnaan Hematoxilin Eosin yaitu sampel kulit dari hewan coba akan diambil dan dilakukan pemeriksaan di laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

3.8 Kerangka Kerja



3.9 Pengolahan Data

3.9.1 *Editing*

Editing adalah upaya untuk memeriksa kembali kebenaran data yang diperoleh atau dikumpulkan. Editing dapat dilakukan pada tahap pengumpulan data atau setelah data terkumpul (Hidayat, 2008).

3.9.2 *Coding*

Mengklasifikasikan jawaban – jawaban dari para responden ke dalam bentuk angka/bilangan. Biasanya klasifikasi dilakukan dengan cara memberi tanda/kode berbentuk angka pada masing – masing jawaban (Setiadi, 2013).

Kode kelompok tikus

KA: Kelompok kontrol 1 menggunakan NS 0,9%

KB: Kelompok kontrol 2 tulle *framycetin sulfat* 1%

PA : Kelompok perlakuan 1 gel lidah buaya 10%

PB : Kelompok perlakuan 2 gel lidah buaya 20%

PC : Kelompok perlakuan 3 gel lidah buaya 40%

3.9.3 *Tabulating*

Tabulating yaitu pengelompokan jawaban-jawaban serupa dengan cara yang diteliti dan teratur, kemudian dihitung dan dijumlahkan berapa banyak peristiwa yang termasuk dalam kategori kemudian diwujudkan dalam bentuk tabel-tabel.

3.9.4 *Entri Data*

Data entri adalah kegiatan memasukan data yang telah dikumpulkan kedalam master table atau database komputer, kemudian membuat distribusi frekuensi sederhana atau bias juga dengan membuat tabel kontingensi (Hidayat, 2008).

3.9.5 Analisa Data.

Analisa data yang digunakan untuk untuk jumlah fibroblas adalah uji komparasi bivariat. Sebelumnya data akan akan diuji kenormalitasannya dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov. Suatu data dikatakan memiliki distribusi normal jika nilai p (value) $> 0,05$ dan tidak berdistribusi normal jika nilai p (value) $< 0,05$ (Dahlan, 2009). Jika data yang berdistribusi normal pada jumlah fibroblas akan dilanjutkan dengan uji statistik *Independent T-test* dan jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal pada jumlah fibroblas akan dilanjutkan uji statistik *Mann-Whitney*. P (value) bermakna apabila $< 0,05$ dan tidak bermakna apabila p (value) $\geq 0,05$. Data diolah menggunakan SPSS 16.

3.9.6 Penyajian Data

Data statistik perlu disajikan dalam bentuk yang mudah dibaca dan dimengerti. Tujuannya adalah memberikan informasi dan memudahkan interpretasi hasil analisis (Setiadi, 2013). Hasil dari penelitian ini akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dijelaskan dalam bentuk narasi.

3.10 Etika Penelitian

Dalam melakukan penelitian akan menekankan pada masalah etika (Hidayat, 2008). Dalam penelitian ini mengikuti prinsip 3R (*Replecement, Reduction, Refinement*) sesuai dengan etika penelitian hewan coba.

1. *Replecement*, yaitu dalam penelitian ini menggunakan tikus putih galur wistar (*Rattus novegicus*) sehat serta memiliki berat badan 200-250 gram, kemudian dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang sudah di tetapkan.
2. *Reduction*, besaran sampel yang digunakanakan ditentukan berdasarkan dari jumlah sampel tiap perlakuan dengan jumlah pada kelompok perlakuan.

3. *Refinement*

Pada penelitian ini prinsip yang digunakan yaitu prinsip 5F (Freedom) :

a. *Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus)

Tikus diberi makan dengan komposisi :

- Tepung jagung 12,75 gram
- Tepung ikan 850 gram
- Tepung tulang 170 gram
- Tepung kedelai 1,7 kg
- Tepung kacang tanah 850 gram
- Mineral mix 34 gram
- Vit B kompleks 17 butir
- Minyak goreng 170 gram
- Garam 34 gram

pakan standart diberikan 20 gr/hari pada semua kelompok selama masa penelitian (masa aklimisasi maupun masa perlakuan). Pembuatan makanan tikus dilakukan oleh peneliti di bantu oleh pakar. Minum diletakkan didalam botol khusus dengan kebutuhan per-hari 150 ml per ekor.

b. *Freedom from discomfort* (bebas dari rasa tidak nyaman),) Bebas dari perlukaan dan penyakit, untuk menghindari dari berbagai penyakit, alas sekam diganti setiap 1 hari dan kelembapan ruangan serta temperature diatur pada kisaran suhu antara 27-28°C.

- c. *Freedom from pain, injury and diseases* (bebas dari rasa nyeri, trauma dan penyakit) dilakukan pembiusan paparan yang didampingi oleh tenaga profesional yaitu pembimbing.
- d. *Freedom from fear and distress* (bebas dari ketakutan dan stres jangka panjang), tikus diaklimatisasi selama 7 hari sebelum dilakukan perlakuan.
- e. *Freedom to express natural behavior* (bebas mengekspresikan perilaku tingkah laku alami, diberikan ruang dan fasilitas yang sesuai)