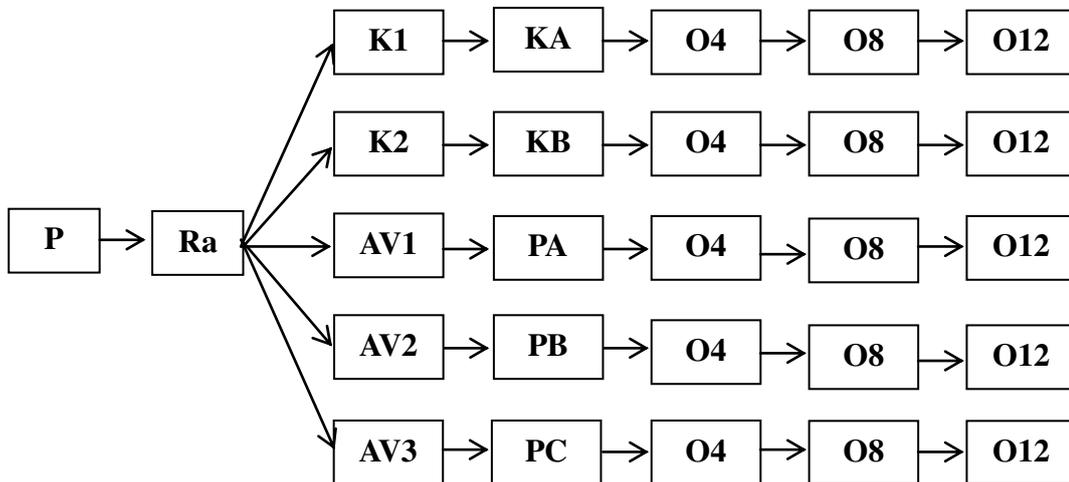


## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experiment*. Metode pengamatan dalam penelitian ini menggunakan pengamatan *post-test only control group design*, yaitu untuk mengukur efektifitas pemberian gel lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40% pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol NaCl 0,9% dan Tule. Pada desain penelitian ini terdapat dua kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol. Berikut skema *post-test only control group design*



**Gambar 3.1** Skema *post-tes only control group design*

## Keterangan :

1. P : Populasi
2. Ra : Random Alokasi
3. K1 : Kelompok kontrol 1 menggunakan NaCl 0,9%
4. K2 : Kelompok kontrol 2 menggunakan Tule
5. AV 1 : Kelompok perlakuan 1 menggunakan ekstrak lidah buaya 10%
6. AV 2 : Kelompok perlakuan 2 menggunakan ekstrak lidah buaya 20%
7. AV 3 : Kelompok perlakuan 3 menggunakan ekstrak lidah buaya 40%
8. KA : Perlakuan pada kelompok kontrol 1 diberikan perawatan menggunakan NaCl 0,9%
9. KB : Perlakuan pada kelompok kontrol 2 diberikan perawatan menggunakan Tule
10. PA : Perlakuan pada kelompok perlakuan 1 diberikan ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) 10%
11. PB : Perlakuan pada kelompok perlakuan 2 menggunakan gel lidah buaya (*Aloe vera*) 20%
12. PC : Perlakuan pada kelompok perlakuan 3 menggunakan gel lidah buaya (*Aloe vera*) 40%
13. O4 : Hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap gambaran mikroskopis luka pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-4
14. O8 : Hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap gambaran mikroskopis luka pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-8

15. O12 : Hasil observasi pemeriksaan post tes terhadap gambaran mikroskopis luka pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke-12

## 3.2 Desain Sampling

### 3.2.1 Populasi

Populasi penelitian pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan luka insisi

### 3.2.2 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). Untuk menghindari faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka, maka ditentukan kriteria inklusi dan eksklusi untuk menghomogenkan sampel.

Dalam penelitian ini mengikuti prinsip 3R (*Replecement, Reduction, Refinement*) sesuai dengan etika penelitian hewan coba yaitu:

1. *Replecement*, yaitu dalam penelitian ini menggunakan tikus putih galur wistar (*Rattus novegicus*) sehat serta memiliki berat badan 150-250 gram, kemudian dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang sudah di tetapkan.
2. *Reduction*, besaran sampel yang digunakan akan ditentukan berdasarkan dari jumlah sampel tiap perlakuan dengan jumlah pada kelompok perlakuan.

Dalam melakukan penghitungan jumlah tikus yang digunakan sebagai hewan penelitian, dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

t = Jumlah intervensi baik perlakuan maupun kontrol

r = Banyak sampel tiap perlakuan

Jika di dalam penelitian ini diketahui pengulangan t = 5, maka didapat nilai n sebagai berikut:

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Jadi jumlah sampel untuk setiap kelompok minimal 5 ekor. Sehingga pada masing-masing hari observasi dibutuhkan sejumlah tikus 25 ekor. Pengukuran dilakukan selama 3 hari, pada hari ke-4, hari ke-8 dan ke-12 pada masing-masing kelompok. Sehingga sampel yang dibutuhkan yaitu sebanyak 75 ekor.

### 3. *Refinement*

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

#### 1) *Freedom of hunger and thirst* (Bebas dari haus dan kelaparan)

Tikus diberi makan standart 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 aklitimasi 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.

- 2) *Freedom from discomfort* (Bebas dari rasa tidak nyaman) untuk menghindari dari berbagai penyakit, alas sekam diganti setiap 1 hari dan kelembapan ruangan serta temperature diatur pada kisaran suhu antara 27-28°C.
- 3) *Freedom of pain, injury or disease* (Bebas dari rasa nyeri, trauma, dan penyakit) dilakukan pembiusan paparan yang didampingi oleh tenaga profesional yaitu pembimbing
- 4) *Freedom to fear and distress* (Bebas dari ketakutan dan stres jangka panjang). Tikus dilakukan aklitimasi selama 7 hari sebelum diberikan perlakuan

- 5) *Freedom to express natural behaviour* (Bebas mengekspresikan tingkah laku alami, diberikan ruang dan fasilitas yang sesuai).  
Tidak ada batasan untuk aktivitas normalnya.

### 3.2.3 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. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berjenis kelamin jantan
3. Berat badan antara 150-250 gram
4. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan kondisi sehat yang 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 mengalami diare dan pernafasan tenang
5. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya
6. Tidak ada kecacatan pada bagian punggung tikus
7. Aklimatisasi selama satu minggu (tujuh hari)

### 3.2.4 Kriteria Eksklusi

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

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar mengalami luka infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah), eksudat yang berlebihan sebelum dilakukan aklimatisasi
2. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar mengalami luka akibat gigitan atau benda tajam lainnya sebelum dilakukan aklimatisasi

### **3.2.5 Teknik Sampling**

Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah *Purposive Sampling*, sampel diambil dari dua kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan yang sesuai dari kriteria inklusi dan eksklusi yang ditentukan oleh peneliti.

### **3.3 Variabel Penelitian**

#### **a. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perawatan luka menggunakan topikal gel ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*)

#### **b. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah peningkatan ketebalan epitel pada perawatan luka insisi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Skala	Skoring
Perawatan luka insisi menggunakan gel Lidah Buaya ( <i>Aloe vera</i> )	Suatu tindakan untuk melakukan perawatan luka insisi menggunakan topikal gel ekstrak lidah buaya ( <i>Aloe vera</i> ) konsentrasi 10%, 20% dan 40% yang diekstrak dengan menggunakan etanol	Perawatan luka insisi sesuai dengan SOP	SOP perawatan luka insisi		
Peningkatan ketebalan epitel	Proses pertumbuhan kembali sel-sel epitel melalui pewarnaan Hematoxilin Eosin.	Pertumbuhan jaringan epitel dilihat dengan menggunakan mikroskop Olympus dengan aplikasi Olyvia dengan pembesaran 400x dimana epitel diukur dari lapisan stratum korneum sampai dengan stratum basale. Dan dilakukan 10 kali penghitungan	Lembar observasi	Rasio	

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

### 3.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium hewan coba Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Malang yang akan dilaksanakan Bulan Desember 2018 - Januari 2019. Dengan pembuatan gel

Lidah buaya (*Aloe vera*) di laboratorium Materia Medika Batu. Kemudian untuk pemeriksaan pewarnaan Hematoxilin Eosin dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

### 3.6 Alat, Bahan, dan Instrumen Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Gel Lidah Buaya (*Aloe vera*)

Pembuatan gel lidah buaya dilakukan oleh peneliti dan dibantu oleh petugas lab Materia Medika Batu.

#### 3.6.2 Pembuatan Luka Insisi

Pembuatan luka insisi dilakukan oleh peneliti dan dibantu oleh petugas lab di lab hewan coba Poltekkes Kemenkes Malang.

Alat :

1. Handvat mess
2. pisau cukur/ gunting
3. pinset
4. bengkok

Bahan :

1. kassa steril
2. Alcohol 70%
3. Handscoon
4. Obat anastesi
5. Kapas

#### 3.6.3 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit

Pengambilan sampel jaringan kulit dilakukan oleh peneliti di lab hewan coba Poltekkes Kemenkes Malang.

1. Urine Vacutainer
2. Handscoon steril
3. Formalin 10%
4. Gunting steril

#### 3.5.4 Perawatan Luka

Alat :

1. Bak instrument
2. Bengkok
3. pinset anatomis
4. kom
5. gunting

Bahan :

1. Kassa steril
2. kassa bersih
3. Gel lidah buaya 10%, 20% dan 40%
4. Transparan film
5. Tulle
6. Nacl 0.9%
7. Cotton bud

### **3.6.5 Pemeliharaan Tikus**

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

### **3.6.7 Instrumen Penelitian**

Instrument yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah lembar observasi untuk mengobservasi re-epitelisasi jaringan menggunakan pewarnaan Hematoxilin Eosin setelah diberikan gel Lidah Buaya (*Aloe vera*) pada hari ke-4, ke-8, dan ke-12 lalu dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## **3.7 Metode Pengumpulan Data**

### **3.7.1 Perijinan Penelitian**

Hal – hal yang akan dilakukan peneliti untuk mengurus izin penelitian adalah sebagai berikut:

- a) Peneliti mengurus surat persetujuan untuk perijinan persetujuan penelitian menggunakan hewan coba yang ditujukan kepada Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Malang.

- b) Peneliti mengurus surat persetujuan perijinan menggunakan Laboratorium untuk persetujuan penelitian yang ditujukan kepada kepala Laboratorium Poltekkes Kemenkes Malang.
- c) Peneliti mengurus surat persetujuan untuk perijinan melakukan pewarnaan Hematoxilin Eosin di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

### **3.7.2 Pembuatan Gel Lidah Buaya (*Aloe vera*)**

Peneliti menyiapkan lidah buaya yang akan dijadikan gel yang mana terlebih dahulu akan dilakukan proses maserasi lalu dilanjutkan untuk membuat ekstrak di Laboratorium Materia Medika Batu. (Terlampir)

### **3.7.3 Menentukan Sampel Penelitian**

Sampel penelitian ditentukan sesuai dengan kriteria inklusi masing-masing 25 tikus pada tiap kelompok penelitian.

### **3.7.4 Pembuatan Luka Insisi Pada Tikus**

1. Masing-masing tikus dicukur bulunya pada bagian punggung
2. Siapkan kapas yang sudah ditetesi dengan 1 cc kloroform dalam toples kaca besar
3. Pilih tikus yang akan digunakan sebagai sampel.
4. Masukkan tikus ke dalam toples sampai tikus terlihat lemah tak berdaya ditandai dengan tikus tidak mampu bergerak namun mata masih terbuka dan masih terdapat gerakan napas
5. Ambil tikus dari toples, letakkan di atas nampan stainless steel
6. Desinfeksi dengan *Alkohol 70%*

7. Buat luka sayat di punggung tikus dengan menggunakan handvat mess pada bagian kanan punggung tikus. Panjang luka dibuat  $\leq 2,5$  cm, kedalaman sampai area subkutis.

### **3.7.5 Perawatan Luka Insisi**

Perawatan luka sayat dilakukan 2 hari sekali pada waktu yang sama oleh peneliti dengan menggunakan NaCl 0,9% pada kelompok kontrol 1, tulle pada kelompok kontrol 2, Gel lidah buaya (*Aloe vera*) 10% pada kelompok perlakuan 1, Gel lidah buaya (*Aloe vera*) 20% pada kelompok perlakuan 2, dan Gel lidah buaya (*Aloe vera*) 40% pada kelompok perlakuan 3. (Terlampir)

### **3.7.6 Pemeriksaan Re-epitelisasi Jaringan dengan Pewarnaan HE**

Setelah dilakukan perawatan kemudian tikus akan diambil darahnya oleh peneliti lain pada hari ke-4, ke-8 dan ke-12, sehingga tikus akan mati. Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan kulit luka sayat dengan cara di gunting sesuai dengan panjang dan kedalaman luka, kemudian dilakukan pemeriksaan re-epitelisasi dengan menggunakan pewarnaan HE.

3.7.6.1 Spesimen (atau jaringan) yang diproses untuk ditempelkan dan dibelah diperlakukan sama dengan spesimen yang dimaksudkan untuk seluruh pemasangan. Fiksatif yang paling umum digunakan adalah buffer formalin 10%. Pemrosesan dengan teknik parafin dilakukan paling cepat dan memberikan hasil terbaik ketika diinginkan bagian tipis atau jaringan lunak. Karena parafin tidak larut dalam air, spesimen didehidrasi dan kemudian dibersihkan dalam larutan yang larut dengan parafin sebelum impregnasi.

Infiltrasi langkah demi langkah oleh reagen yang diperlukan menghasilkan spesimen yang diproses dengan baik. Hasil akhirnya akan menjadi bagian yang sangat mirip dengan keadaan hidup spesimen di mana setiap jenis sel dikenali.

#### 3.7.6.2 Dehidrasi:

Keluarkan air dari spesimen (jaringan) dengan seri EtOH

#### 3.7.6.3 Clearing:

Reagen (xylene) harus bercampur dengan dehidran dan parafin

#### 3.7.6.4 Impregnation:

Penggantian lengkap agen kliring oleh parafin. Gunakan dua atau tiga perubahan mandi parafin. Sebagian besar laboratorium menggunakan parafin dengan titik leleh 56-58°C, tetapi pilihan parafin tergantung pada kekerasan jaringan dan ketebalan bagian yang akan dipotong.

#### 3.7.6.5 Embedding:

Orientasi jaringan pada parafin yang meleleh yang, ketika dipadatkan, menyediakan media yang kuat untuk menjaga jaringan tetap utuh ketika bagian-bagian dipotong.

Sistem penanaman teknologi jaringan

Waktu memproses:

70% EtOH	Holding point
80% EtOH (2 perubahan)	Masing-masing 1 jam
95% EtOH (2 perubahan)	Masing-masing 1 jam
100% EtOH (3 perubahan)	Masing-masing 1 jam

100% EtOH / Xylene (50:50)	1 jam
Xylene	1 jam
Xylene / Paraffin (50:50)	1 jam
Parafin (3 perubahan)	Masing-masing 1 jam

Kosongkan perubahan terakhir. Sematkan dan dinginkan dengan cepat dan potong bagian dengan ketebalan sekitar 5-10 $\mu$ m.

3.7.6.6 Bagian pemasangan. Bagian yang dipotong dipasang pada slide kaca dan kemudian ditutup dengan kaca penutup. Bagian jaringan perlu dipasang pada kaca untuk memberikan dukungan saat pewarnaan atau untuk memungkinkan pemasangan beberapa bagian secara berurutan. Cara biasa memperbaiki bagian ke slide adalah lampiran dengan albumen telur dan air. Dengan satu jari yang dibersihkan dengan alkohol, oleskan selembat tipis fiksasi albumen pada slide, dan dengan jari kedua, bersihkan kelebihan albumen. Setelah bagian telah dipotong, mereka dapat mengambang di bak air (suhu 5°C di bawah titik leleh parafin) dan mengambil ke slide albumenized dengan mencelupkannya di bawah bagian mengambang dan mengeluarkannya dari bak. Pegang bagian di tempatnya dengan jarum saat mengeringkan kelebihan air. Keringkan slide di atas meja pemanasan atau dalam oven di bawah suhu parafin yang meleleh.

### 3.6.7.7 Prosedur pewarnaan hematoxylin dan eosin Mayer rutin.

Biasa digunakan di laboratorium karena ini sederhana dan memberikan hasil yang konsisten ketika pearson mempelajari tekniknya. Solusinya adalah dalam serangkaian wadah yang dapat menampung beberapa slide sekaligus. Slide mungkin dibiarkan dalam hematoxylin selama berjam-jam tanpa overstaining.

- |                              |                         |
|------------------------------|-------------------------|
| 1. Xylene (deparaffinize)    | 2 mnt                   |
| 2. Mutlak EtOH               | 2 mnt                   |
| 3. 95% EtOH                  | 2 mnt                   |
| 4. hematoxylin mayer         | 15 menit                |
| 5. Cuci dalam air leding     | 20 menit                |
| 6. Counterstain dengan eosin | 15 detik hingga 2 menit |
| 7. 95% EtOH                  | 2 mnt                   |
| 8. Alkohol absolut           | 2 menit                 |
| 9. Alkohol absolut           | 2 menit                 |
| 10. Xylene                   | 2 mnt                   |
| 11. Xylene                   | 2 mnt                   |

Pemeriksaan Re-epitelisasi jaringan tersebut dilakukan dengan pewarnaan Hematoxilin Eosin yaitu dimulai dengan proses pemotongan jaringan berupa makros, proses pengeblokan dan pemotongan jaringan, proses deparafinisasi, proses pewarnaan Hematoxilin Eosin dan mounting dengan entelan dan deckglass yang dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

### **3.8 Pengolahan Data**

#### **3.8.1 *Editing***

*Editing* adalah upaya untuk memeriksa kembalikan kebenaran data yang diperoleh atau dikumpulkan (Setiadi, 2013)

#### **3.8.2 *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/hasil (Setiadi, 2013)

Kode kelompok tikus

KA : Kelompok kontrol 1 *NaCl* 0,9 %

KB : Kelompok kontrol 2 *Tule*

PA : Kelompok perlakuan gel lidah buaya (*Aloe vera*) 10%

PB : Kelompok perlakuan gel lidah buaya (*Aloe vera*) 20%

PC : Kelompok perlakuan gel lidah buaya (*Aloe vera*) 40%

#### **3.8.3 *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

#### **3.8.4 *Entri Data***

Data entri adalah kegiatan memasukan data yang telah dikumpulkan ke dalam master tabel atau database komputer, kemudian membuat distribusi

frekuensi sederhana atau bisa juga dengan membuat tabel kontinjensi (Setiadi, 2013).

### **3.8.5 Penyajian Data**

Data akan disajikan dalam bentuk diagram garis dan histogram.

### **3.8.6 Analisa Data**

Dalam penelitian ini analisis bivariat digunakan untuk menjelaskan atau mendiskripsikan angka atau presentase re-epitelisasi jaringan secara mikroskopis melalui pewarnaan Hematoxilin Eosin dengan menggunakan *distribusi frekuensi*. Analisa data yang digunakan adalah dilakukan uji *Kolmogorof Smirnov* untuk menentukan sebaran distribusi data normal. Suatu data dikatakan memiliki sebaran distribusi normal jika nilai  $p$  (value)  $> 0,05$  dan  $p$  (value)  $< 0,05$  maka tidak berdistribusi normal. Jika data yang diperoleh merupakan distribusi normal maka dilanjutkan dengan uji untuk mengetahui adanya perbedaan signifikansi pada masing-masing pemeriksaan maka dilakukan uji *Independent T-Test* dan *Paired T-Test* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok,  $P$  (value) bermakna apabila  $< 0.05$  dan tidak bermakna apabila  $p$  (value)  $\geq 0,05$ .

## **3.9 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. Yaitu :

1. *Replecement*, dalam penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih galur wistar (*Rattus novegicus*) yang sehat dan memiliki berat

badan sekitar 200-250 gram yang kemudian dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan.

2. *Reduction*, besar sampel ditentukan dari jumlah sampel tiap perlakuan pada jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*

Dalam penelitian ini menggunakan prinsip 5F yaitu:

- a. *Freedom from hunger from thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus)
- b. *Freedom from discomfort* (bebas dari rasa tidak nyaman)
- c. *Freedom of pain, injury or disease* (bebas dari rasa nyeri, trauma, dan penyakit)
- d. *Freedom to fear and distress* (bebas dari ketakutan dan stres jangka panjang)
- e. *Freedom to express natural* (bebas untuk mengekspresikan tingkah laku alami, diberikan ruang dan fasilitas yang sesuai).

### 3.10. Kerangka Kerja

