

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang lingkup penelitian**

##### **3.1.1 Ruang lingkup disiplin ilmu**

Disiplin ilmu yang terkait adalah biomedik, bedah plastik, farmakologi, dan histologi.

##### **3.1.2 Ruang lingkup tempat**

Tempat yang digunakan untuk penelitian meliputi :

1. Pembuatan krim dengan campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% dan krim dengan campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% dilakukan di Laboratorium Kimia Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFAR), Semarang.
2. Proses pembuatan luka insisi, perawatan, dan perlakuan terhadap tikus, serta proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Penelitian Hewan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
3. Proses pembuatan preparat dan pewarnaan *Hematoxylin eosin* (HE) dilakukan di Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

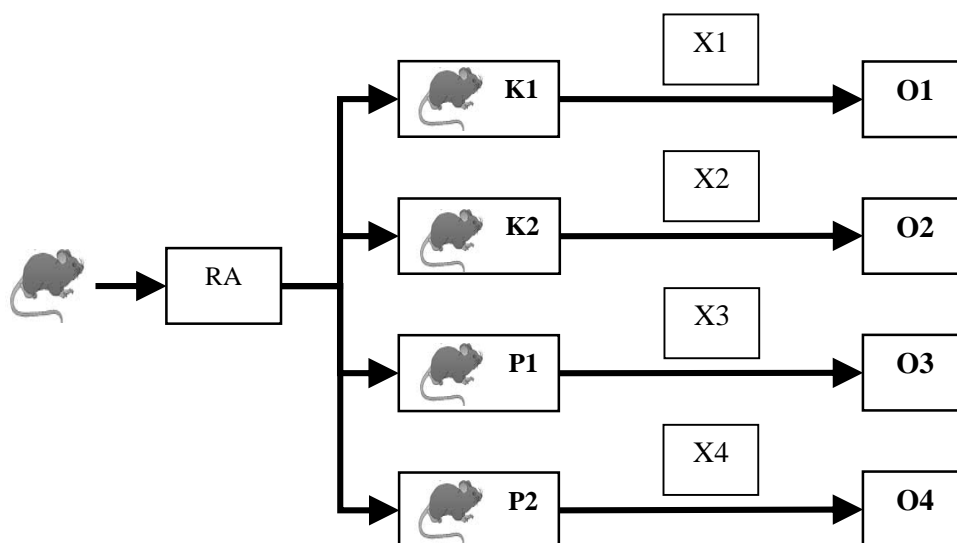
##### **3.1.3 Ruang lingkup waktu**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 4 minggu. Penelitian ini dilakukan selama November 2018 – Desember 2018.

### 3.2 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental hewan dengan desain “*Randomized post test with control group*” yang melibatkan dua grup kontrol dan dua grup intervensi. Subjek hewan percobaan dibagi secara acak menjadi empat grup sama rata. Insisi pada kulit dilakukan pada semua grup. Semua subjek diperlakukan secara sama dari segi post operatif dan diet dalam jumlah normal. Satu grup kontrol menjadi grup kontrol dengan hanya menerima krim tanpa kandungan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.). Satu grup kontrol lainnya menjadi grup kontrol dengan menerima krim antibiotik gentamisin 0,1%, sementara subjek lain sesuai pembagian grup menerima berbagai dosis ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) yang berbeda pada masing – masing grup secara topikal setiap hari selama 7 hari pada punggung yang telah diinsisi.

Gambar 6. Skema Rancangan Penelitian.



Keterangan:

RA: Random Alokasi.

K1: Kelompok kontrol dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat insisi kulit dan diberi krim tanpa campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) secara topikal.

K2: Kelompok kontrol dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat insisi kulit dan diberi krim gentamisin 0,1% secara topikal.

P1: Kelompok perlakuan dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat insisi kulit dan diberi krim dengan campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% secara topikal.

P2: Kelompok perlakuan dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat insisi kulit dan diberi krim dengan campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% secara topikal.

X1: Pemberian krim tanpa ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) pada kelompok K1 2x sehari selama 7 hari.

X2: Pemberian krim gentamisin 0,1% pada kelompok K2 2x sehari selama 7 hari.

X3: Pemberian krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% pada kelompok P1 2x sehari selama 7 hari.

X4: Pemberian krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% pada kelompok P2 2x sehari selama 7 hari.

O1: Pengukuran jumlah neutrofil dan jumlah angiogenesis secara mikroskopis dengan pembesaran 100 x dengan pewarnaan *Hematoxylin eosin*.

O2: Pengukuran jumlah neutrofil dan jumlah angiogenesis secara mikroskopis dengan pembesaran 100 x dengan pewarnaan *Hematoxylin eosin*.

O3: Pengukuran jumlah neutrofil dan jumlah angiogenesis secara mikroskopis dengan pembesaran 100 x dengan pewarnaan *Hematoxylin eosin*.

O4: Pengukuran jumlah neutrofil dan jumlah angiogenesis secara mikroskopis dengan pembesaran 100 x dengan pewarnaan *Hematoxylin eosin*.

### 3.3 Subjek Penelitian

a. Kriteria inklusi :

1. Tikus jantan umur 2-3 bulan
2. Tikus jantan *Sprague Dawley* yang diinsisi pada bagian punggung
3. Berat badan  $\pm$  140 - 200 gram setelah aklimitasi selama seminggu di kandang individual
4. Tidak ada abnormalitas kondisi anatomis yang nampak.

b. Kriteria eksklusi :

Selama induksi dan perlakuan, tikus tampak sakit (gerak tidak aktif) atau mati

c. Besar sampel

Besar sampel menurut WHO untuk tiap kelompok minimal lima ekor hewan coba. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 5 ekor tikus. Setiap tikus kemudian diberi label nomor 1–20. Pembagian kelompok dilakukan secara random dengan pengambilan undian.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Sebagai variabel bebas adalah :

1. Pemberian krim ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) secara topikal sesuai pembagian kelompok.

#### 3.4.2 Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

1. Jumlah neutrofil
2. Jumlah angiogenesis

### 3.5 Definisi operasional

**Tabel 3. Definisi Operasional**

| No | Variabel   | Definisi Operasional  | Skala   | Nilai  |
|----|--|---|---------|--|
| 1  | Pemberian krim ekstrak <i>Apium graveolens</i> (Linn.) | Pemberian krim ekstrak <i>Apium graveolens</i> (Linn.) dengan pengolesan pada luka insisi dengan takaran terukur menggunakan sendok takar plastik sebanyak 2,5 cc, 2 x per hari selama 7 hari setebal 0,5 mm. | Nominal | 1: Diberikan krim tanpa ekstrak <i>Apium graveolens</i> (Linn.)<br>2: Diberikan krim gentamisin 0,1%<br>3: Diberikan krim dengan ekstrak <i>Apium graveolens</i> (Linn.) 50% sebanyak 2 x/hari<br>4: Diberikan krim dengan ekstrak <i>Apium graveolens</i> (Linn.) 70% sebanyak 2 x/hari |
| 2  | Jumlah Neutrofil                                       | Jumlah sel neutrofil dengan bentuk bulat, memiliki 2- 5 lobus dan dihubungkan oleh jembatan inti yang halus, sitoplasma bergranul dan ukuran 12 – 15 mikrometer   | Rasio   | Dihitung rata-rata jumlah neutrofil dari 5 lapangan pandang dengan menggunakan mikroskop binokuler pembesaran 100x dan pewarnaan HE  |
| 3  | Jumlah Angiogenesis                                    | Jumlah pembuluh darah yang bercirikan seperti bentukan berlumen dengan tunika intima yang sangat tipis dengan terdapat sel darah merah di dalamnya  | Rasio   | Dihitung jumlah pembuluh darah pada jaringan luka pada 5 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop binokuler pembesaran 100x dan pewarnaan HE  |

### 3.6 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.6.1 Bahan penelitian

Hewan coba adalah tikus jantan strain *Sprague Dawley* dengan umur 2-3 bulan dan berat  $\pm$  140 - 200 gram. Tikus diperoleh dari peternakan hewan uji UD. Abadi Jaya. Pada tikus dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama satu minggu di kandang individual dengan periode 12 jam terang dan 12 jam gelap. Tikus diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah aklimatisasi, tikus diberi perlakuan.

Krim dengan campuran ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) dibuat di laboratorium kimia STIFAR, Semarang. Krim dibuat dengan cara daun *Apium graveolens* (Linn.) yang diperoleh dikumpulkan dan disortasi basah, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dipisahkan dari tangkainya. Daun yang sudah bersih tersebut lalu dikeringkan, dan ditempatkan di tempat yang tidak terkena sinar matahari. Daun kering kemudian disortasi kering dan dikecilkan ukurannya menjadi serbuk. Serbuk daun dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% (penggantian pelarut hingga pelarutnya bening), kemudian disaring. Setelah proses penyaringan, ekstrak ethanol yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator*, kemudian ekstrak ethanol ditimbang. Ekstrak ethanol yang dipekatkan dalam *waterbath*, kemudian dilarutkan dalam air panas, kemudian disaring. Bahan pembuat krim sebagai fase minyak dicampurkan kemudian dilelehkan dan bahan sebagai fase air dilarutkan dalam air. Kedua campuran tersebut kemudian dicampurkan secara bersamaan dalam kondisi suhu  $\pm$  70°C dengan pengadukan yang kuat dan konstans hingga terbentuk basis krim. Fase aktif ditambahkan dan dilakukan pengadukan hingga homogen.

Komposisi krim:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| 1. Asam Stearat   | 43 g   |
| 2. Glycerin       | 30 g   |
| 3. Na. Tetraborat | 0,75 g |
| 4. TEA            | 3 g    |
| 5. Nipagin        | 1,5 g  |
| 6. Aquadest ad    | 300 g  |

### **3.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Luka**

1. Alat pencukur
2. Alkohol swab 70%
3. Set bedah minor
4. Bisturi no. 11
5. Nacl 0,9%
6. Povidone – iodine
7. Gentamisin krim 0,1%
8. Ketamine
9. Xylazine
10. Spuit 1 cc dan jarum 27 G
11. Penggaris

### 3.6.3 Alat dan bahan pemeriksaan mikroskopis

- a. Inkubator suhu 56<sup>0</sup>C
- b. Mikrotom
- c. Kaca obyek dan kaca penutup
- d. Formalin buffer 10%
- e. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
- f. Xylol
- g. Parafin cair (Histoplast)
- h. Bahan pengecatan *Hematoxylin eosin* (HE)

### 3.6.4 Alat Dokumentasi Sediaan

- a. Mikroskop Leica
- b. Kamera Digital
- c. Personal Komputer

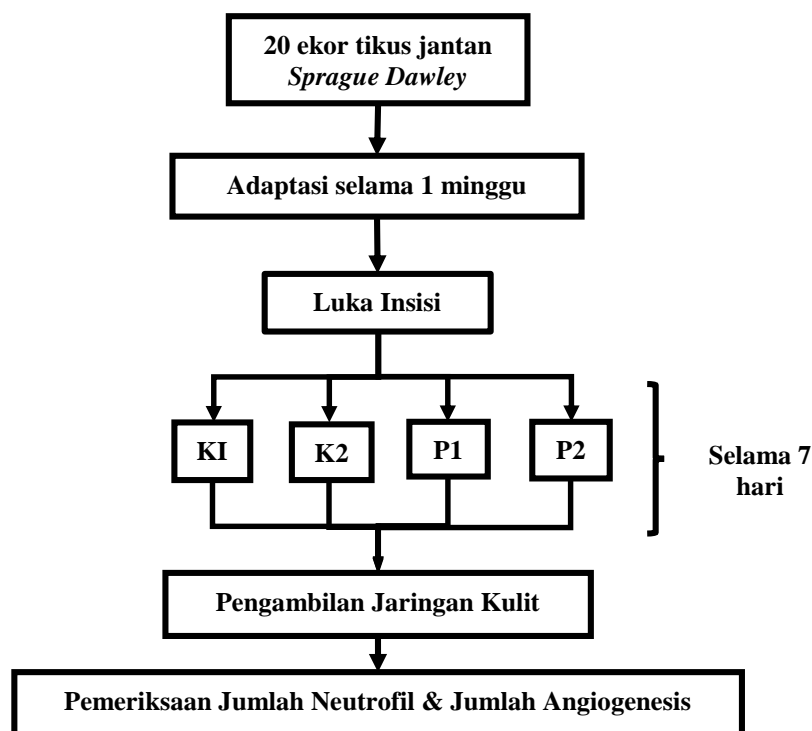
### 3.7 Pelaksanaan Penelitian

20 ekor tikus strain *Sprague Dawley* dengan usia 2-3 bulan dan berat badan  $\pm$  150 - 200 gram dibagi ke dalam 4 kelompok dan dilakukan adaptasi di laboratorium selama satu minggu di kandang individual. Tujuan adaptasi ini adalah agar hewan coba dapat menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan sekitar sehingga tidak terjadi *drop out*. Semua tikus dilakukan insisi pada punggung kanan dan dirawat dalam suhu ruangan 28-32°C, serta mendapatkan makan dan minum secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, tikus diberi anestesi dengan campuran Ketamine-Xylazine (dosis Ketamine 80mg/kgBB; dosis Xylazine 10mg/kgBB secara intraperitoneal. Setelah dilakukan luka insisi, tikus dibagi menjadi 4 kelompok secara random dengan jumlah tikus 5 ekor per kelompok. Perlakuan yang diberikan sesuai dengan



alur kerja. Setiap hari, tikus diberikan topikal krim tanpa ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) (K1), topikal krim gentamisin 0,1% (K2), topikal krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% (P1), dan topikal krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% (P2). Kemudian dilakukan penilaian terhadap status makroskopis luka insisi pada punggung tikus pada hari ke-3 dan ke-7. Pada hari ke-7, terminasi dilakukan pada seluruh tikus dan kemudian dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis. Terminasi dilakukan dengan menggunakan obat anestesi ketamin intraperitoneal. Setelah terminasi, jaringan luka diambil dan diproses untuk diperiksa preparat mikroskopis dengan pewarnaan HE.

### 3.8 Alur kerja



Gambar 7. Alur Kerja

### **3.9 Prosedur Penelitian**

#### **3.9.1 Prosedur Pembuatan Luka Insisi**

1. Tikus di anastesi dengan menggunakan campuran Ketamine-Xylazine (dosis Ketamine 80mg/kgBB; dosis Xylazine 10mg/kgBB) secara intraperitoneal.
2. Tempatkan tikus pada posisi *left lateral decubitus*.
3. Lakukan cubitan pada kaki untuk mengecek sedasi apakah sudah adekuat.
4. Siapkan lokasi yang telah ditentukan untuk dilakukan tindakan insisi dengan cara membasahi dan mencukur bulu pada area punggung ukur dengan ukuran 6 cm x 6 cm, aseptis daerah yang akan dilakukan insisi dengan povidone iodine dan alkohol 70% dan didiamkan sampai kering.
5. Berikan luka insisi pada punggung kanan tikus kurang lebih sepanjang 5cm dengan kedalaman 2-3 mm.

#### **3.9.2 Prosedur perlakuan setelah luka insisi**

1. Lakukan pencucian luka dengan normal saline.
2. Tikus diberikan perlakuan sesuai kelompok yang telah ditentukan.
3. Kelompok kontrol 1 (K1) dengan perlakuan dioleskan krim tanpa ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) setebal 0,5 mm, 2 x sehari dan luka dirawat secara terbuka selama 7 hari.
4. Kelompok kontrol 2 (K2) dengan perlakuan dioleskan krim gentamisin 0,1% setebal 0,5 mm, 2 x sehari dan luka dirawat secara terbuka selama 7 hari.
5. Kelompok ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% (P1) dengan perlakuan dioleskan krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 50% setebal 0,5 mm, 2 x sehari dan luka dirawat secara terbuka selama 7 hari.

6. Kelompok ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% (P2) dengan perlakuan dioleskan krim dengan ekstrak *Apium graveolens* (Linn.) 70% setebal 0,5 mm, 2 x sehari dan luka dirawat secara terbuka selama 7 hari.
7. Tempatkan tikus pada tempat yang bersih dan hangat dengan bantuan lampu sampai bisa pulih dari pengaruh anesthesia.
8. Monitor setiap hari tikus apakah ada tanda – tanda distress dan tanda infeksi.
9. Pada hari ke-7, akan dilakukan terminasi sekaligus pengambilan jaringan luka insisi pada punggung tikus dengan cara : Tikus di anastesi dengan campuran Ketamine-Xylazine (dosis Ketamine 80mg/kgBB; dosis Xylazine 10mg/kgBB secara intraperitoneal dan dilakukan pemotongan jaringan kulit dan subkutan dengan pisau bedah dengan ukuran 6 cm x 1 cm x 1 cm

### **3.9.3 Prosedur pembuatan preparat histopatologi**

#### **a. Fiksasi**

Jaringan luka insisi yang dipotong kemudian dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer natrium asetat sampai mencapai pH 7,0). Dan fiksasi selama 18-24 jam. Setelah itu, jaringan tersebut dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

#### **b. Trimming**

Organ dikecilkan hingga ukuran sekitar 3 mm dan dimasukkan ke dalam embedding cassette.

#### **c. Dehidrasi**

Air dikeringkan dengan menggunakan kertas tisu pada embedding cassette. Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat (80%, 95%, 95%, alkohol absolut I, II, III) masing-masing selama 1 jam.

## d. Clearing

Alkohol dibersihkan menggunakan xylol I, II, III masing-masing selama 1 jam.

## e. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam dalam inkubator dengan suhu 65,1°C.

## f. Embedding.

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, dan ditunggu hingga padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 6 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai parafin mencair.

## g. Cutting

Potongan kasar dilanjutkan dengan potongan halus sebesar 3 mikron. Lembaran potongan yang paling baik diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya. Pindahkan lembaran jaringan ke dalam water bath selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Ambil lembaran jaringan dengan slide bersih dan tempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah jaringan. Keringkan slide, lalu panaskan untuk meratakan jaringan dan sisa paraffin sebelum pewarnaan.

h. Pewarnaan jaringan dengan *HE*

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

- |                     |     |       |
|---------------------|-----|-------|
| 1. Xylol 1          | 5   | menit |
| 2. Xylol 2          | 5   | menit |
| 3. Alkohol absolute | 3x5 | menit |
| 4. Air mengalir     | 1   | menit |
| 5. HE Lillie-Mayer  | 20  | menit |

|                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| 6. Air mengalir | 1 & 15 menit         |
| 7. Alkohol asam | 3 celup              |
| 8. Air mengalir | 1 & 15 menit         |
| 9. Eosin        | 2 menit              |
| 10. Alkohol     | 1x2 menit, 3x3 menit |
| 11. Xylol       | 2x5 menit            |

i. Mounting

Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu kanada balsam kemudian ditutup dengan cover glass dan cegah adanya gelembung udara.

### 3.10 Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data, dengan tahapan :

a. Editing / koreksi

b. Koding / pemberian kode

c. Tabulasi, yaitu memasukkan data ke dalam tabel yang telah disediakan

d. Entry, yaitu memasukkan data ke dalam program SPSS 25.0 for windows

2. Analisis data

Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif variabel tergantung disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik *box plot*.

Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk*.

Data pada penelitian ini berdistribusi normal dan homogen, kemudian data dilanjutkan dengan uji hipotesis *One Way Anova* dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

3. Interpretasi data

Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $p \leq 0,05$  dengan interval kepercayaan 95%.

### **3.11 Persyaratan etik penelitian**

Penelitian menerapkan *animal ethics* dalam mengelola hewan coba. Sebelum penelitian ini dilaksanakan, dilakukan pengajuan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Sebelum percobaan dimulai, peneliti akan melakukan uji coba perlakuan luka insisi pada hewan coba untuk dapat memastikan penelitian dapat berjalan dengan baik. Seluruh hewan coba akan dirawat dan dikelola sesuai standar pemeliharaan hewan.<sup>30</sup>