

## BAB III

### SUBJEK, BAHAN DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek Penelitian dan Populasi Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus Wkistar.

##### 3.1.2 Kriteria Subjek Penelitian

Kriteria subjek penelitian yang digunakan untuk penelitian harus memenuhi kriteria berikut:

a. Kriteria inklusi, yang terdiri dari:

1. Tikus berjenis kelamin jantan
2. Tikus dalam keadaan sehat (1) tikus dalam keadaan tidak adanya tanda infeksi sistemik, 2) tikus dalam keadaan aktif, 3) tikus tidak memiliki bagian tubuh yang pitak)
3. Tikus dengan berat badan 250-300gram
4. Usia tikus 2-3 bulan

b. Kriteria eksklusi, yang terdiri dari:

1. Tikus mati saat penelitian
2. Tikus mengalami penurunan berat badan saat masa adaptasi

### 3.1.3 Sampel Penelitian

Metode random sampling akan dilakukan pada penelitian ini. Pada penelitian ini sampel secara acak (random) dibagi menjadi enam kelompok dan jumlah sampel minimal yang akan digunakan dihitung menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan:

n= jumlah sampel

t= jumlah kelompok perlakuan

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

$$(n - 1)(6 - 1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer, jumlah sampel pada penelitian ini minimal sebanyak 24 ekor hewan coba. Pada penelitian ini saya menggunakan 5 ekor hewan coba perkelompok untuk antipasti adanya *drop out* sehingga total menjadi 30 ekor hewan coba. Tikus tersebut kemudian akan dikelompokkan secara acak untuk pemberian terapi dengan pembagian kelompok A dan D terapi dengan serbuk BN, B dan E terapi dengan bubuk kopi Robusta, dan kelompok C dan F kontrol tanpa terapi.

Tikus tersebut kemudian akan dikelompokkan secara acak untuk pemberian *treatment*. Makanan pakan akan diberikan dan pemberian pengobatan dilakukan sesuai kontrol kelembaban (60mb+/- 2%) dengan temperatur 22 derajat C dengan aliran udara dan pencahayaan cukup. Hanya orang laboratorium yang dapat mengatur lingkungan tersebut.

### 3.1.4 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.1.4.1 Bahan Penelitian

Bahan percobaan tersebut adalah sebagai berikut:

1. Kopi bubuk Robusta. Dibeli di Toko Kopi Aroma Jln. Banceuy No 44, Bandung
2. Serbuk Neomisin-Basitrasin
3. Suspensi standar bakteri *Staphylococcus aureus* (McFarland 0,5) yang berisi  $1.0 \times 10^8$  bakteri yang akan dibubuhkan pada luka tikus
4. Ketamine *hydrochloride*, Anestesi 0,3 ml
5. *Betadine*
6. Nacl fisiologis
7. Bahan pakan normal

Pakan Tikus standar yang diberikan pada hewan coba terbuat dari jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, tepung daun kelor, dan mengandung vitamin, kalsium, fosfat, *trace mineral*, serta antioksidan.

### 3.1.4.2 Alat Penelitian

#### a. Peralatan Umum

1. Kandang Tikus
2. Tempat minum tikus
3. Tempat makan tikus
4. Alat timbangan
5. Sendok
6. Spidol
7. Label nama

#### b. Peralatan insisi

1. Bisturi
2. Pinset *Chirurgis*
3. Duk Bolong
4. Gunting
5. *Hands gloves*
6. Alat cukur rambut
7. Masker

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian uji eksperimental hewan (*animal experimental study*) dengan sampel 30 ekor tikus Wistar jantan, usia 2-3 bulan, berat badan 250-300 gram, yang dipelihara khusus dalam satu kandang, diletakkan pada ruangan suhu kamar, dan diberi pakan standar dan minum secukupnya. Tikus

dipilih secara acak untuk setiap kelompok perlakuan, untuk mengetahui perbedaan dari kecepatan penyembuhan luka yang terinfeksi dari segi; 1) permukaan kering, tidak basah (makroskopis), 2) tepi luka hiperemis, dan 3) jumlah leukosit darah. Observasi dilakukan pada hari ke-7 dan ke-14. Penyembuhan luka yang dirawat dengan terapi bubuk kopi robusta yang diganti secara berkala selama tujuh hari sekali dan dibandingkan dengan kontrol dengan terapi antibiotika Neomisin-Basitrasin yang diganti secara berkala tujuh hari sekali dan dilakukan debridemen dan dibandingkan dengan control tanpa pemberian terapi.

Penelitian ini dirancang untuk mengetahui pengaruh perawatan terhadap terbentuknya permukaan kering, tepi luka hiperemis, dan jumlah leukosit darah pada luka insisi yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada tikus. Pada penelitian ini menggunakan empat kelompok yaitu kelompok tikus A terapi dengan bubuk kopi robusta, kelompok tikus B terapi dengan antibiotika Neomisin-Basitrasin, dan kelompok tikus D sebagai kontrol tanpa terapi. Nilai normal leukosit pada tikus Wistar adalah 5,103- 25,103 sel/ $\mu$ l.<sup>23</sup>

**Tabel 3.1 Penilaian luka secara makroskopis**

Parameter dan deusulan penelitian	Skor
Derajat permukaan kering	
1. Permukaan kering	3
2. Permukaan basah berkurang	2
3. Permukaan basah	1
Derajat tepi luka hiperemis	
1. Tepi hiperemis +	2
2. Tepi hiperemis -	1
Jumlah leukosit	
1. Normal	2
2. Tidak normal	1
Ukuran Luka	
Total skor	

- a. Kecepatan penyembuhan luka dinilai secara makroskopis dengan menilai pembentukan permukaan kering, tepi luka hiperemis, dan jumlah leukosit darah.
- b. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.
- c. Tikus sehat adalah tikus dengan kriteria cukup aktif, tidak ada tanda-tanda infeksi sistemik, berbulu licin, mengkilap, bersih dan tebal.
- d. Tikus tidak sehat adalah tikus dengan kriteria tidak aktif, terdapat tanda-tanda infeksi sistemik, bulu tidak licin, mengkilap, bersih dan tebal.
- e. Luka akut terinfeksi adalah luka yang terpapar/dibubuhi bakteri *Staphylococcus aureus* (McFarland 0,5) yang berisi  $1.0 \times 10^8$  bakteri yang akan dibubuhkan pada luka tikus dan diobservasi selama 24 jam.

### 3.2.4 Variabel Penelitian

#### 3.2.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah efek terapi penyembuhan luka dengan menggunakan kopi Robusta dan antibiotika Neomisin-Basitrasin.

#### 3.2.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kontrol luka tanpa terapi, pembentukan permukaan kering, tepi luka hiperemis, dan jumlah leukosit darah terhadap penyembuhan luka insisi yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*.

### 3.2.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu:

1. Hewan coba belum pernah dilakukan uji coba sebelumnya
2. Jenis kelamin hewan coba
3. Umur hewan coba
4. Berat badan hewan coba
5. Pakan dan minuman hewan coba
6. Tidak adanya luka, 'kulit pitak', infeksi bakteri di kulit tikus sebelum percobaan
7. Terapi yang digunakan untuk hewan coba
8. Jenis insisi yang digunakan pada hewan coba

### 3.2.4.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional pada penelitian ini sebagai berikut:

**Tabel 3.2 Definisi Operasional Variabel Bebas dan Terikat**

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Takaran dosis kopi robusta	Bubuk Kopi Robusta adalah terapi perawatan luka sediaan bubuk yang digunakan pada terapi kulit luka insisi yang terinfeksi. Kemudian dilakukan penutupan dengan kasa kering dan difiksasi dengan plester.	Timbangan	Numerik	Disesuaikan dengan besaran luka hingga merata 40 mg.
Serbuk Antibiotika Neomisin-Basitrasin	BN sebagai kombinasi (Basitrasin Zinc & Neomisin Sulfate) adalah terapi perawatan luka sediaan bubuk yang digunakan pada terapi kulit luka insisi yang terinfeksi. Kemudian dilakukan penutupan dengan kasa kering dan difiksasi dengan plester.	Timbangan	Numerik	Disesuaikan dengan besaran luka hingga merata.
Kontrol (tanpa terapi)	Perlakuan luka insisi dan pemberian bakteri <i>staphylococcus aureus</i> . Kemudian dibiarkan.	Disesuaikan tindakan insisi	Numerik	Dihat dari segi makroskopik

### 3.2.5 Prosedur Penelitian

#### 3.2.5.1 Prosedur Perlakuan Hewan Coba<sup>23</sup>

Tahapan percobaan yang dilakukan pada tikus, yaitu:

1. Tikus akan menjalani proses adaptasi ditempatkan di kandang tunggal dalam disimpan di ruang laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan yang baik dan cukup. Setelah masa adaptasi berakhir, tikus akan

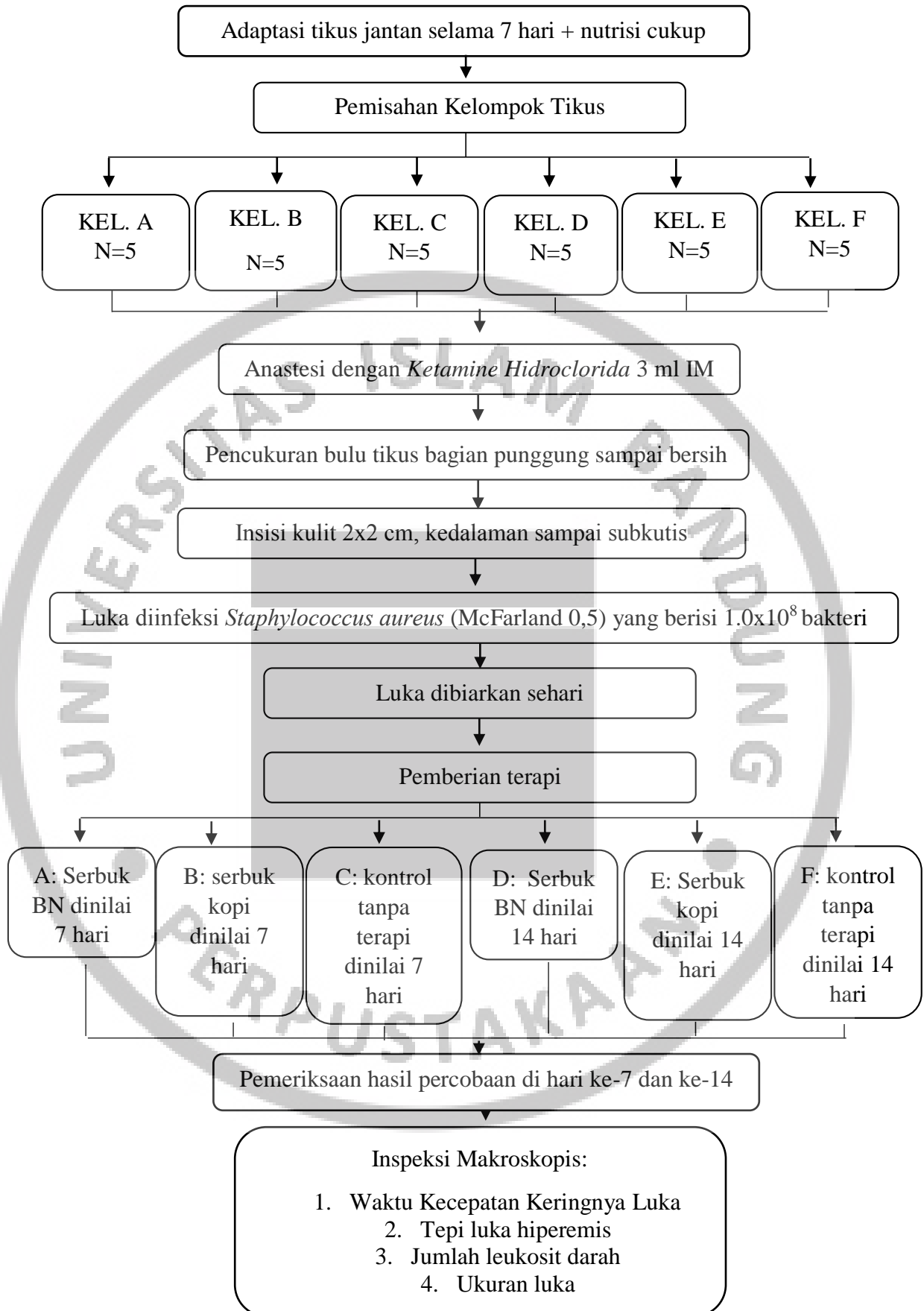


dibagi kedalam 6 kelompok (A, B, C, D, E, dan F) yang masing-masing terdiri dari 5 tikus.

2. Sebelum dilakukan insisi, tikus akan dianastesi terlebih dahulu dengan injeksi IM oleh *ketamine hydrochloride* 3 ml.
3. Setelah terbius, bagian punggung tikus dicukur terlebih dahulu bulunya sampai bersih dan didesinfeksi dengan menggunakan betadine. Selanjutnya dibuat irisan vertikal sepanjang 2 cm x 2 cm dengan kedalaman sampai subkutis.
4. Luka tempat irisan dibersihkan dan dicuci dengan NaCl fisiologis.
5. Kemudian dilakukan pemberian perawatan luka untuk kelompok A dan B dengan dengan pemberian langsung 40 mg bubuk kopi robusta dan diganti selama tujuh hari sekali secara berkala lalu kelompok A akan di ambil darah pada hari ke-7 dan kelompok B diambil darah pada hari ke-14. Kelompok C dan D dengan pemberian secara langsung 40 mg serbuk Neomisin-Basitrasin dan diganti secara berkala dua hari sekali serta dilakukan debridemen lalu kelompok C akan di ambil darah pada hari ke-7 dan kelompok D diambil darah pada hari ke-14.. Kelompok E dan F kontrol tanpa terapi lalu kelompok A akan di ambil darah pada hari ke-7 dan kelompok B diambil darah pada hari ke-14.
6. Setelah dilakukan perawatan, dilanjutkan dengan menginspeksi makroskopik luka insisi dan inspeksi permukaan luka, tepi luka hiperemis, dan menghitung jumlah leukosit pada hari ke-7 dan ke-14. Alur Penelitian dan Analisis Data

### 3.2.5.2 Alur Penelitian

Pada kelompok A, B, C, D, E dan kelompok , luka dirawat dilakukan penggantian kopi Robusta setiap 7 hari sekali dan serbuk Neomisin-Basitrasin setiap 2 hari sekali. Penilaian mikroskopis penyembuhan luka dilakukan pada hari ke-7 dan ke-14 dengan melihat kesembuhan luka secara makroskopis yaitu permukaan kering, tepi luka hiperemis dan hitung jumlah leukosit. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan dilihat secara keseluruhan kriteria tersebut dari luka yang terinfeksi dirawat dengan terapi bubuk kopi robusta dibandingkan dengan terapi serbuk Neomisin-Basitrasin dan dilakukan debridemen dan dibandingkan dengan terapi dengan kontrol (tanpa terapi) pada hari ke-7 dan ke-14.



**Gambar 3.1 Alur Penelitian**

### 3.2.5.3 Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan untuk menguji perbedaan signifikan antara perlakuan satu dengan lainnya menggunakan analisis *one way anova* jika data memiliki distribusi normal dan variasi yang homogen yang sebelumnya dihitung memakai rumus shapiro wilk. Namun jika salah satu tidak terpenuhi, maka analisis menggunakan uji non parametris Kruskal-Wallis. Dengan tingkat kepercayaan 95% dan error 5% dan seluruh penghitungan analisis data menggunakan *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* versi 21.0.

### 3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran. Waktu penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai dengan bulan April 2019.

**Tabel 3.3 Waktu Penelitian**

No	Kegiatan Penelitian	Jan 2019	Feb 2019	Mar 2019	Apr 2019	Mei 2019	Jun 2019	Jul 2019
1	Penyusunan proposal penelitian	■						
2	Proposal penelitian disetujui		■					
3	Pengumpulan data			■				
4	Pengolahan data				■			
5	Analisis data					■		
6	Penulisan hasil						■	■

### 3.2.6. Tenaga Ahli Perlakuan Eksperimen

Tenaga ahli yang terlibat dalam beberapa perlakuan pada eksperimen ini adalah Dokter yang ahli dalam bidangnya.

a. Pemeliharaan hewan coba

Akan dilakukan oleh Pak Mumuh staff dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

b. Perlakuan prosedur anastesi dan insisi

Akan dilakukan oleh Prof. Hendro Sudjono Yuwono, dr., Sp.BV(K), Ph.D

c. Pembacaan jumlah leukosit

Akan dilakukan oleh bagian staff dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

d. Pembunuhan tikus

Akan dilakukan oleh Pak Mumuh staff dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

### 3.2.8 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada hewan, yaitu tikus Wistar jantan. Peneliti melakukan intervensi pada tikus berupa pembuatan luka. Pada kelompok A dirawat dengan terapi bubuk Kopi Robusta. Kelompok B dirawat dengan terapi serbuk Basitasin-Neomisin. Kelompok C luka tanpa perlakuan (control tanpa terapi)

Secara etik, penelitian pada hewan haru memiliki prinsip pemanfaatan hewan coba harus berdasarkan prinsip 3 R, yaitu:

1. *Replacement*, mengganti hewan percobaan dengan alternatif lain yang sudah diperhitungkan dengan baik dari pengalaman maupun literatur sebelumnya. Baiknya tidak menggunakan hewan hidup, namun pada

penelitian yang membutuhkan eksperimen sebelum ke manusia bisa dilakukan dengan hewan tingkat tinggi salah satunya tikus putih..

2. *Reduction*, Pemanfaatan hewan coba dalam penelitian diusahakan dalam jumlah yang sedikit, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal.
3. *Refinement*, meminimalisir penderitaan hewan coba selama penelitian dengan cara memelihara dan memperlakukan hewan secara manusiawi seperti bebas dari rasa lapar dan haus, dengan Anggotaikan akses makanan dan air minum sesuai dengan jumlah dan komposisi yang sesuai untuk kesehatannya, disediakan kandang yang memadai serta lingkungan dengan kebersihan, cahaya, suhu dan kelembapan ruangan yang telah disesuaikan. Selama masa penelitian hewan coba bebas dari ketakutan dan stress yang berkepanjangan antara lain dengan Anggotaikan masa adaptasi/aklimatisasi, hewan coba menjalankan program kesehatan seperti pencegahan, pemantauan, serta pengobatan oleh tenaga terlatih dan berpengalaman dalam merawat/memperlakukan hewan coba selama penelitian berlangsung.