

BAB III
SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian dan Populasi Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 32 ekor tikus (*Rattus norvegicus*).

3.1.2 Kriteria Subjek Penelitian

Kriteria subjek penelitian yang digunakan harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

- a. Kriteria inklusi, yang terdiri dari:
 - b. Tikus berjenis kelamin jantan
 - c. Tikus dalam keadaan sehat
 - d. Tikus dalam keadaan tidak adanya tanda infeksi sistemik
 - e. Tikus dalam keadaan aktif
 - f. Tikus tidak memiliki bagian tubuh yang 'pitak'
 - g. Tikus dengan berat badan 250-300 gram.
 - h. Usia tikus 2-3 bulan
- b. Kriteria eksklusi, yang terdiri dari:
 1. Tikus mati saat penelitian
 2. Tikus yang tidak berespon saat dilakukan percobaan

3.1.3 Sampel Penelitian

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

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15 \quad \text{Federer:}$$

Keterangan:

n= jumlah sampel

t= jumlah kelompok perlakuan

$$(n - 1)(t - 8) \geq 15$$

$$(n - 1)(8 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(7) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer, jumlah sampel pada penelitian ini ditetapkan sebanyak 32 ekor hewan coba. Karena terdapat 8 kelompok perlakuan, maka untuk setiap kelompok perlakuan 4 ekor hewan coba.

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah kelompok dan jumlah perlakuan, disimpulkan bahwa jumlah minimal sampel hewan coba yang dibutuhkan dalam setiap kelompok perlakuan adalah empat ekor, sehingga total keseluruhan dikalikan dengan empat kelompok menjadi 32 ekor tikus. Total keseluruhan hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 32 ekor. Tikus tersebut kemudian akan dikelompokkan secara acak untuk pemberian *treatment*.

3.1.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.4.1 Alat Penelitian

a. Peralatan Umum

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

b. Peralatan Insisi

1. *Hands gloves*
2. Masker
3. Duk
4. Gunting
5. Alat cukur rambut
6. Bahan percobaan bolong
7. Bisturi
8. Pinset *chirurgis*

3.1.4.2 Bahan Penelitian

tersebut adalah sebagai berikut:

1. Kopi bubuk berkafein
2. Kopi bubuk dekafein

3. Suspensi standar bakteri *Staphylococcus aureus* (McFarland 0,5) yang berisi 1.0×10^8 bakteri yang akan dibubuhkan pada luka tikus
4. Serbuk antibiotika *neomisin-basitrasin*
5. *Ketamine hydrochloride*, anastesi 0,3 ml
6. Bahan pakan normal

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

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian bersifat analitik eksperimental, dengan sampel adalah 32 ekor tikus (*Rattus novergicus*), 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. Binatang percobaan dipilih secara acak dan dibagi menjadi delapan kelompok masing-masing terdiri dari empat ekor tikus yaitu kelompok tikus A dengan terapi kopi bubuk berkafein sebanyak 40 gram untuk 7 hari percobaan, kelompok tikus B terapi kopi bubuk dekafein sebanyak 40 gram untuk 7 hari percobaan, kelompok tikus C sebagai control tanpa terapi untuk 7 hari percobaan, kelompok tikus D sebagai pembanding menggunakan antibiotik *neomisin-basitrasin* untuk 7 hari percobaan, kelompok tikus E dengan terapi kopi bubuk berkafein sebanyak 40 gram untuk 14 hari percobaan, kelompok tikus F terapi kopi bubuk dekafein sebanyak 40 gram untuk 14 hari percobaan, kelompok

tikus G sebagai kontrol tanpa terapi untuk 14 hari percobaan, dan kelompok tikus H sebagai pembanding menggunakan antibiotik *neomisin-basitrasin* untuk 14 hari percobaan. Selanjutnya bulu bagian punggung dicukur setelah tikus terbius sampai bersih dan didesinfeksi oleh betadine. Diberi marka 2x2 cm lalu dibuat irisan dengan kedalaman sampai fascia otot dengan menghilangkan lapisan kulit dan lemak subkutis. Dibubuhkan bakteri *Staphylococcus aureus* (McFarland 0,5) yang berisi 1.0×10^8 bakteri. Luka diobservasi selama 24 jam sebelum pemberian terapi

Observasi dilakukan pada hari ke-7, dan ke-14, terhadap: 1) permukaan kering/basah (makroskopis), 2) tepi luka hiperemis, 3) jumlah leukosit darah, dan 4) luas luka. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui pengaruh perawatan terhadap terbentuknya permukaan kering, tepi luka hiperemis, jumlah leukosit darah, dan panjang luka pada luka insisi yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada tikus. Nilai normal leukosit pada tikus (*Rattus novergicus*) adalah 5,103-25,103 sel/ μ l.²⁰

Tabel 3.1 Penilaian Luka Secara Makroskopis

Parameter dan deskripsi	Skor
Derajat kering permukaan luka	
1. Permukaan kering	3
2. Permukaan basah berkurang	2
3. Permukaan basah	1
Derajat hiperemis tepi luka	
1. Tepi hiperemis +	2
2. Tepi hiperemis -	1
Jumlah leukosit	
1. Normal (5,103- 25,103 sel/ μ l)	2
2. Tidak normal	1
Luas luka	
Total Skor	

3.2.2 Variabel Penelitian

3.2.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kopi berkafein, kopi bubuk dekafein

3.2.2.2 Variabel Terikat

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

3.2.2.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu:

1. Hewan coba belum pernah dilakukan uji coba sebelumnya
2. Jenis kelamin hewan coba
3. Usia hewan coba
4. Berat badan hewan coba
5. Pakan dan minum 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

3.2.2.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional pada penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 2.2 Definisi Operasional Variabel Bebas dan Terikat

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Kopi bubuk berkafein	Terapi perawatan luka sediaan bubuk yang digunakan pada terapi kulit luka insisi yang terinfeksi.	Timbangan	Numerik	40 gram
Kopi bubuk dekafein	Terapi perawatan luka sediaan bubuk yang digunakan pada terapi kulit luka insisi yang terinfeksi.	Timbangan	Numerik	40 gram
Kering permukaan	Permukaan kulit yang mengering setelah pemberian terapi	Sejauh mana permukaan kulit insisi dapat mengering	Kategorik	1. Kering 2. Basah berkurang 3. Basah
Hiperemis luka	Meningkatnya volume darah dalam pembuluh yang melebar pada suatu alat atau bagian tubuh	Sejauh mana pembuluh darah sekitar menjadi normal	Kategorik	1. hiperemis + 2. hiperemis -
luas luka	Ukuran permukaan kulit yang mengering setelah pembereian terapi	Penggaris	Kategorik	Sentimeter

Jumlah leukosit	Sel darah putih ini berfungsi untuk membantu tubuh melawan berbagai penyakit infeksi	Mikroskop	Kategorik	1. normal 2. tidak normal
-----------------	--	-----------	-----------	------------------------------

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Prosedur Perlakuan Hewan Coba

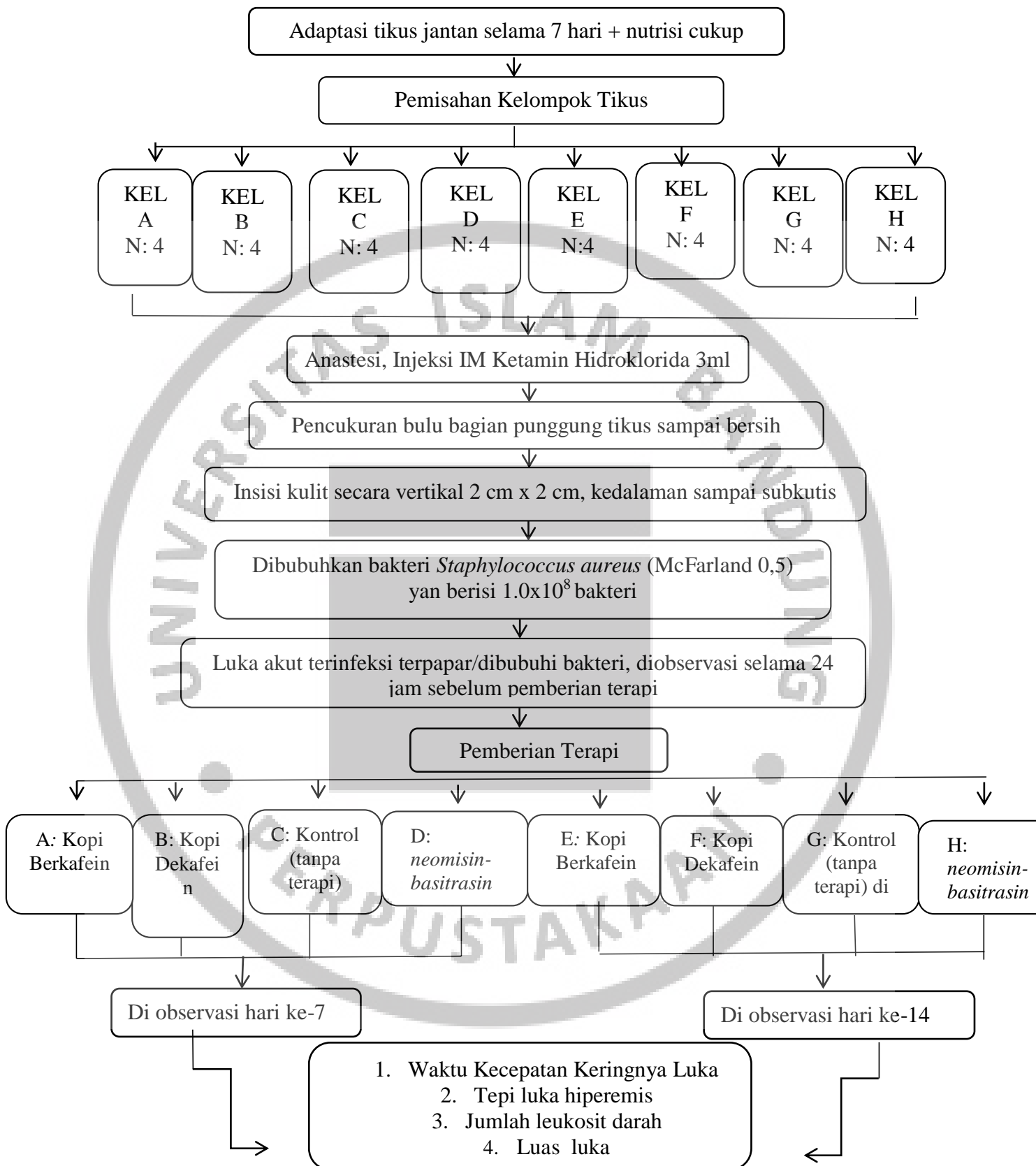
1. Tikus ditempatkan di kandang tunggal di ruang laboratorium untuk menjalani adaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan dan minum yang baik dan cukup.
2. Tikus dikelompokkan menjadi 8 kelompok (A, B, C, D, E, F, G, dan H) masing-masing 4 tikus. Pengelompokan dilakukan pada masa adaptasi terakhir.
3. Tikus dianestesi terlebih dahulu sebelum dilakukan insisi dengan injeksi muskular oleh *Ketamine hydrochloride* 3 ml.
4. Bulu bagian punggung dicukur setelah tikus terbius sampai bersih dan didesinfeksi oleh betadine. Diberi marka 2x2 cm lalu dibuat irisan dengan kedalaman sampai fascia otot dengan menghilangkan lapisan kulit dan lemak subkutis.
5. Dibubuhkan bakteri *Staphylococcus aureus* (McFarland 0,5) yang berisi 1.0×10^8 bakteri
6. Luka akut terinfeksi terpapar/dibubuhi bakteri *Staphylococcus* diobservasi selama 24 jam sebelum pemberian terapi

7. Dilakukan perawatan luka pada kelompok A dan E menggunakan terapi kopi bubuk berkafein sebanyak 40 gram, kelompok B dan F menggunakan kopi kopi bubuk dekafein sebanyak 40 gram, kelompok C dan G menggunakan antibiotika *neomisin-basitrasin* sebagai pembanding, dan kelompok D dan H kontrol tanpa terapi, semuanya di ganti selama 7 hari sekali dan ada yang di teruskan sampai hari ke-14
8. Mengamati luka pada hari ke-7, dan ke-14 untuk melihat permukaan luka, tepi luka hiperemis, menghitung jumlah leukosit, dan luas luka

3.2.4 Alur Penelitian dan Analisis Data

3.2.4.1 Alur Penelitian

Pada kelompok A, B, C, dan D luka dilakukan pengecekan 7 hari dan pada kelompok E, F, G, dan H luka dilakukan pengecekan 14 hari. Penilaian dilakukan pada hari ke-7, dan ke-14, dengan melihat kesembuhan luka secara makroskopis yaitu permukaan kering, tepi luka hiperemis, hitung jumlah leukosit, luas luka. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan kecepatan penyembuhan luka, dilihat secara keseluruhan kriteria tersebut dari luka terinfeksi yang dirawat dengan kopi berkafein, dibandingkan dengan yang dirawat menggunakan kopi dekafein, dibandingkan dengan antibiotika *neomisin-basitrasin* sebagai pembanding obat standar, dan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi terapi.



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.2.4.2 Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah terdiri dari :

Untuk menguji perbedaan signifikan antara perlakuan satu dengan lainnya menggunakan analisis *one way anova* jika data memiliki distribusi normal dan variasi yang homogen. 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.

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Binatang Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Waktu penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai bulan April 2019.

Tabel 3.3 Tabel 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							

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

dilakukan oleh staf dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

b. Perlakuan prosedur anestesi dan insisi

dilakukan oleh Prof. Hendro Sudjono Yuwono, dr., Sp.B(K)V., Ph.D

c. Pembacaan jumlah leukosit

dilakukan oleh bagian staf dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

d. Pembunuhan tikus

dilakukan oleh staf dari Laboratorium Binatang Farmakologi.

3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Pemanfaatan hewan coba harus berdasarkan prinsip 3R, yaitu:

1. *Replacement*

Eksperimen sebaiknya tidak dilakukan pada hewan hidup, tetapi sebelum diuji pada manusia bisa dilakukan terlebih dahulu pada hewan tingkat tinggi, salah satunya adalah tikus putih.

2. *Reduction*

Hewan coba yang digunakan sebaiknya dalam jumlah yang sedikit, namun dapat memberikan hasil yang optimal.

3. *Refinement*

Hewan diperlakukan secara baik seperti memberi pakan yang sehat sesuai komposisi dan minum yang layak sehingga terhindar dari rasa lapar dan haus. Ditempatkan pada kandang bersih dengan cahaya, suhu, dan kelembaban yang telah disesuaikan. Selama masa penelitian hewan coba harus terhindar dari ketakutan dan *stress* yang berkepanjangan, serta memperhatikan kesehatan yang dipantau oleh tenaga terlatih dan berpengalaman dalam merawat hewan coba selama penelitian berlangsung