

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen. Tujuan penelitian eksperimen adalah untuk menunjukkan hubungan sebab-akibat antara dua variabel atau lebih melalui percobaan yang diteliti. Pada penelitian ini menggunakan rancangan *Posttest Only Control Group Design* yang terdiri dari dua kelompok. Kelompok pertama diberi perlakuan yang disebut dengan kelompok eksperimen dan kelompok kedua atau kelompok kontrol yaitu diberi perlakuan cairan isotonis serta povidone iodine. Sebelum intervensi dilakukan, kelompok eksperimen dan kontrol dianggap sama karena mereka dipilih secara random (Anggreni, 2022). Bentuk desain penelitian adalah sebagai berikut:

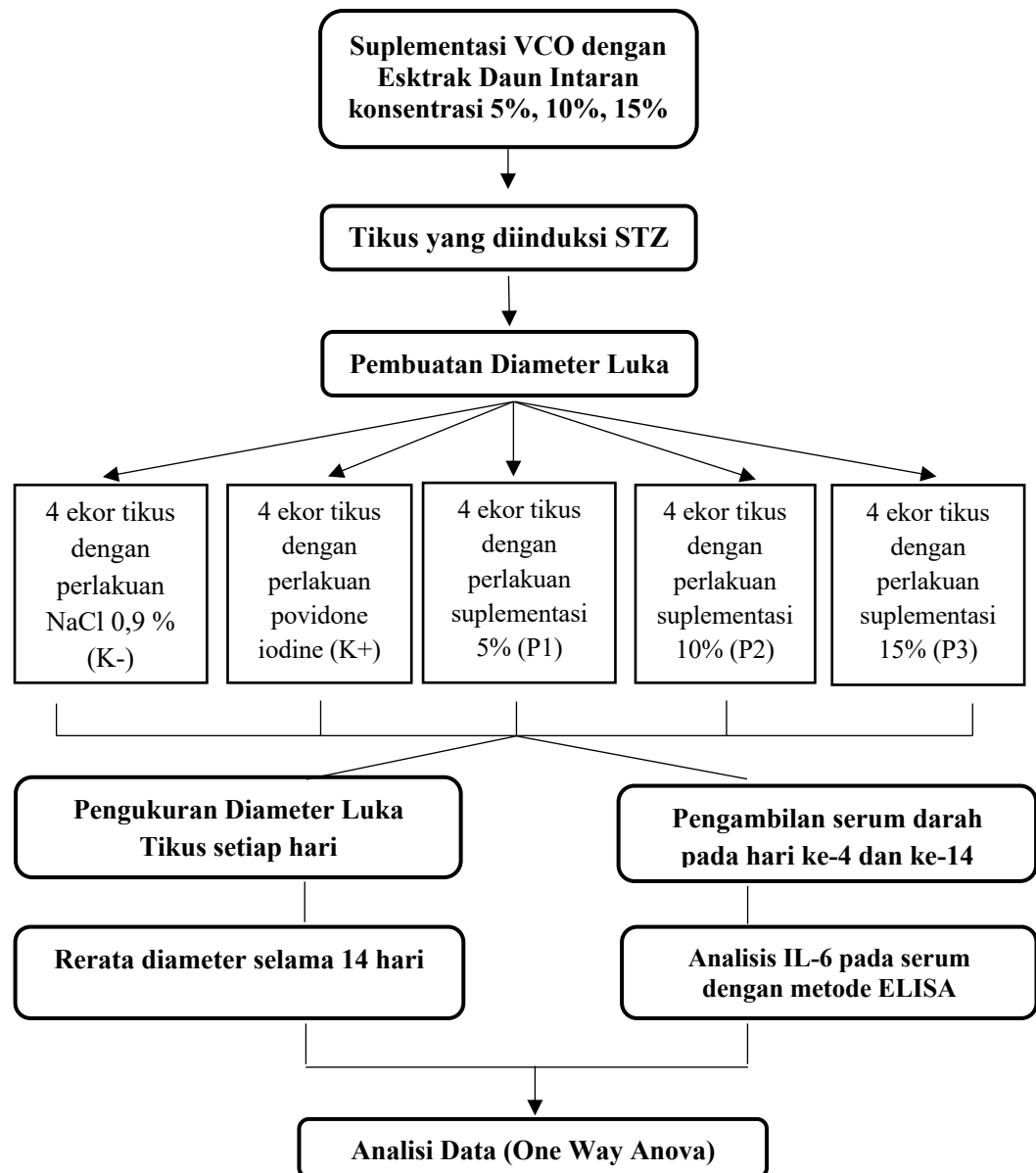
	Perlakuan	Posttest
R1	X	02
R2		02

Gambar 3. Bentuk Rancangan Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

- R1 : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini berupa pemberian suplementasi VCO dengan ekstrak daun intaran konsentrasi 5%, 10% dan 15%.
- R2 : Kelompok kontrol, dalam penelitian pemberian cairan fisiologis (NaCl 0,9%) dan povidone iodine
- X : Perlakuan
- 02 : Kadar IL-6 pada serum dan Diameter Luka

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan yaitu di laboratorium imunologi Poltekkes Kemenkes Denpasar Jl. Sanitasi No. 1, Sidakarya, Denpasar Selatan, Kota Denpasar dan Laboratorium Pemeliharaan dan Pembiakan Hewan Percobaan *Bio Mice and Rat*.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret 2024.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi yang diteliti pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Pemeliharaan dan Pembiakan Hewan Percobaan *Bio Mice and Rat*.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebagian dari populasi tikus putih dengan jenis kelamin jantan karena tikus ini memiliki struktur anatomi dan fisiologi yang mirip dengan manusia serta siklus menstruasi dan kehamilan tikus tidak mempengaruhi tikus jantan (Lahamendu dkk., 2019).

a. Unit analisis

Unit analisis dari penelitian ini yaitu diameter luka dan kadar IL-6 pada penyembuhan luka tikus model DM yang sudah diberi perlakuan.

b. Besar sampel

Penentuan besar sampel pada penelitian ditentukan dengan rumus Federer (1999), yaitu: $(n-1)(t-1) \geq 15$. Dengan keterangan n = besar sampel, t = banyak kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini akan dilakukan 5 kelompok perlakuan, sehingga banyak sampel yang dibutuhkan yaitu:

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 19:4$$

$$n \geq 4,75 = 5$$

$$\begin{aligned} \sum \text{hewan} &= n \times \sum \text{kelompok perlakuan} \\ &= 5 \times 5 \\ &= 25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E (\text{besar sampel}) &= \sum \text{hewan} - \sum \text{kelompok perlakuan} \\ &= 25 - 5 \\ &= 20 \end{aligned}$$

$$n' = \frac{n}{1 - f}$$

$$n' = \frac{5}{1 - 0,1}$$

$$\begin{aligned} n' &= \frac{5}{0,9} \\ &= 5,55 = 6 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Cadangan tiap kelompok} &= n' - n \\ &= 6 - 5 \\ &= 1 \end{aligned}$$

Setelah dirumuskan dengan rumus Federer dan dilanjutkan dengan rumus *Resource Equation Methode* diperoleh 20 ekor tikus atau subyek yang dibutuhkan untuk penelitian. Pada rumus di atas disebutkan cadangan tikus yang digunakan yaitu sebanyak 10% ($f = 0,1$) dari total sampel sehingga didapat 1 ekor tikus untuk cadangan penelitian dalam satu kelompok perlakuan. Jadi, total sampel yang dibutuhkan sekaligus dengan sampel cadangan yaitu 25 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok yang menunjukkan 1 kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dan 1 ekor tikus sebagai cadangan.

c. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah teknik dengan sampel yang relevan terhadap tujuan penelitian dan memiliki ciri-ciri khusus. Ciri khusus tersebut ditentukan oleh keputusan peneliti (Anggreni, 2022).

1) Kriteria inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu tikus putih jenis kelamin jantan umur 2-3 bulan, berat badan 100-120gr, sehat yang ditunjukkan dengan bulu tebal berwarna putih, mata tikus jernih, dan gerakan aktif serta tikus DM.

2) Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini yaitu subyek yang sakit selama eksperimen berlangsung dan subyek yang mati selama eksperimen berlangsung.

d. Alat dan bahan

1) Alat penelitian

Alat pembedah tikus meliputi handscoon, gunting, pinset, silet, dan tabung organ. Alat perawatan tikus yang dibutuhkan meliputi kandang tikus, timbangan, botol air, tempat makan tikus, pinset, dan jangka sorong. Alat pembuatan suplementasi VCO dengan Ekstrak daun intaran yaitu oven, inkubator, rotary, evaporator, kertas saring, blender, pisau, dan pengaduk. Alat lain yaitu kamera digital, spektrofotometer, gelas ukur, dan magnetik stiter.

2) Bahan penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan usia 2-3 bulan dengan berat 100-120 gr, pakan standar dan air untuk minum, NaCl 0,9%, Streptozocin (STZ), perban steril, plester penutup luka. Bahan pembuatan suplementasi terdiri dari daun intaran, Etanol, dan VCO (*Virgin coconut oil*).

e. Prosedur kerja

1) Pembuatan simplisia dan ekstrak daun intaran

Daun intaran yang sudah dipetik dan dicuci bersih kemudian dikeringkan di tempat terbuka yang tidak terpapar sinar matahari langsung selama tujuh hari. Setelah itu daun kering dioven selama 1 hari atau 24 jam dengan suhu 40°C. Setelah

itu haluskan dengan blender dan ayak dengan ayakan 60 mesh. Timbang 150 gr simplisia dan rendam dalam 1000 mL etanol dalam *beaker glass* dan lapisi dengan aluminium foil. Selama tujuh hari, lakukan maserasi pengadukan dengan magnetic stirrer 6 jam per hari. Setelah tujuh hari, saring simplisia dengan kertas saring dan lakukan pemekatan (evaporasi). Evaporasi dilakukan pada suhu waterbath 60°C. Hasil ekstraksi ditampung dalam tabung vial dan massa ekstrak ditimbang (Karta, I. W. & Burhannudin, 2022).

2) Pembuatan suplementasi VCO dengan ekstrak daun intaran 5%, 10%, dan 15%

Dengan menggunakan rumus %b/b untuk membuat konsentrasi suplementasi VCO dengan ekstrak daun intaran 5%, 10%, dan 15% dengan total massa campuran per konsentrasi adalah 5 gr (Karta, I. W. & Burhannudin, 2022).

3) Pengelompokan hewan uji coba

Tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang disebut dengan K(-) yaitu diberi perlakuan NaCl 0,9%, kelompok kontrol positif yang disebut dengan K(+) yaitu diberi perlakuan povidone iodine, kelompok perlakuan dengan konsentrasi 5% (P1), kelompok perlakuan dengan konsentrasi 10% (P2), dan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 15% (P3).

4) Penimbangan berat badan dan pemberian STZ

Penimbangan berat badan tikus menggunakan timbangan digital. Tikus diinjeksi STZ dengan dosis 40 mg/kg berat badan tikus (Firdaus dkk., 2016). Cara kerja STZ yaitu dengan membentuk radikal bebas yang mampu merusak sel beta pankreas, sehingga produksi insulin terganggu. Sel beta pankreas yang terganggu menyebabkan kadar glukosa meningkat (Munjiati, N. E., Retno, S., & Kurniawan,

2021). Selama masa percobaan pakan standar diberikan ke seluruh kelompok perlakuan.

5) Pengukuran gula darah puasa

Pengukuran gula darah puasa tikus dilakukan dengan pengambilan darah melalui pembuluh darah ekor yang dikenal dengan vena lateralis, pengambilan darah menggunakan glucometer. Pengambilan gula darah tikus dilakukan 3 hari setelah diinjeksi STZ dan sudah dipuasakan selama 10 jam. Tikus dinyatakan diabetes apabila kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dL (Firdaus dkk., 2016).

6) Pembuatan luka eksisi

Persiapan eksisi pada tikus dilakukan dengan mencukur rambut pada punggung tikus yang akan dieksisi. Setelah punggung tikus dibersihkan kemudian disterilkan dengan alkohol 70% dan lakukan anestesi pada paha tikus. Luka dibuat berbentuk lingkaran dengan diameter 5 mm, dengan cara besi diameter diputar pada kulit punggung tikus sampai kulit terlepas (Yunitasari, D., Alifiar, I., & Priatna, M., 2016).

7) Pelaksanaan perlakuan dan pengukuran diameter luka

Pemberian perlakuan dan perawatan luka diberikan setiap hari sebanyak satu kali dan dilakukan pada sore hari. Lakukan pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok. Kelompok kontrol negatif diberikan perlakuan dengan cairan fisiologis atau NaCl 0,9%, kelompok kontrol positif diberikan perlakuan dengan povidone iodine, kelompok P1 diberikan dosis konsentrasi 5%, kelompok P2 diberikan dosis konsentrasi 10%, dan kelompok P3 diberikan dosis konsentrasi 15%. Pengamatan luas permukaan luka yaitu dengan cara mengukur rata-rata diameter luka pada arah vertikal, horizontal, dan diagonal.

8) Pengambilan sampel darah

Pada hari ke-4 dan hari ke-14 diambil sampel darah lewat sinus retro orbital menggunakan pipet kapiler. Sebelum darah tikus diambil, tikus dibius dengan larutan eter. Darah ditampung dengan tabung tanpa koagulan dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit (Bogoriani, N., W., Ketut Ratnayani, 2015).

9) Uji ELISA Sandwich

a) Pembuatan Standart dan *wash buffer*

- (1) Letakan semua reagen di suhu ruang sebelum digunakan
- (2) Siapkan 5 buah cup serum sebagai wadah standar, standar diluent dan standar.
- (3) Lakukan pengenceran seperti tabel berikut:

Tabel 3
Pengenceran Standar

Nama	Jumlah	Konsentrasi Standar
Standar No 5	24 ng/L	120 ul standar induk + 120 ul standar diluent
Standar No 4	12 ng/L	120 ul standar no 5 + 120 ul standar diluent
Standar No 3	6 ng/L	120 ul standar no 4 + 120 ul standar diluent
Standar No 2	3 ng/L	120 ul standar no 3 + 120 ul standar diluent
Standar No 1	1.5 ng/L	120 ul standar no 2 + 120 ul standar diluent

Sumber: *Bioassay Technology Laboratory, 2021*

- (4) Pembuatan *wash buffer* yaitu ambil sebanyak 20 mL wash buffer dengan konsentrasi 25x dan add aquades sampai 500 mL untuk membuat wash buffer dengan konsentrasi 1x. Campurkan pelan agar tidak ada gelembung.

b) Uji ELISA

- (1) Siapkan semua reagen, larutan standar, blanko, dan sampel pada suhu ruang.
- (2) Tentukan jumlah sumur yang akan digunakan dan masukan dalam bingkai sumur. Apabila sumur tidak digunakan simpan pada suhu 2-8°C.
- (3) Tambahkan 50 ul standar ke sumur. Catatan: sumur standar sudah mengandung antibodi yang terbiotinilasi, jadi jangan menambahkan reagen antibodi.
- (4) Pipet 40 ul sampel ke dalam sumur sampel dan tambahkan 10 ul reagen antibodi rat IL-6 pada sumur sampel. Kemudian tambahkan 50 ul streptavidin-HRP pada sumur standar dan sampel. Jangan masukan pada sumur kontrol atau blanko. Campurkan dengan baik dan tutup dengan seal lalu inkubasi dengan suhu 37°C selama 60 menit.
- (5) Cuci sumur 5x menggunakan wash buffer sebanyak 300 ul selama 30 detik-1 menit untuk setiap pencucian. Tepuk-tepuk bingkai sumur di atas tisu.
- (6) Pipet 50 ul larutan substrat A ke dalam masing-masing sumur dan pipet 50 ul larutan substrat B ke dalam masing-masing sumur. Tutup dengan seal dan campurkan dengan cara tepuk pinggir bingkai sumur. Inkubasi dengan suhu 37°C selama 10 menit.
- (7) Setelah menambahkan 50 ul *stop solution* ke masing-masing sumur, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
- (8) Setelah itu tentukan nilai *optical density* (nilai OD) setiap sumur menggunakan pada microplate dengan Panjang gelombang 450 nm dalam waktu 10 menit setelah penambahan *stop solution*.

c) Pengukuran Hasil

Pembuatan kurva dilakukan dengan mengukur besarnya absorbansi standar dengan konsentrasi 24, 12, 6, 3, dan 1.5 ng/L.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Jenis data primer yang berasal dari semua jenis data yang diperoleh peneliti selama pemeriksaan di lapangan yang mencakup: berat badan, kadar gula darah puasa, diameter luka, dan kadar IL-6. Data primer lain yang diperoleh berupa hasil pengamatan diameter luka serta diameter luka dan kadar IL-6 pada serum tikus pada saat puncak inflamasi.

b. Data sekunder

Jenis data sekunder diperoleh dari jurnal, artikel, dan buku yang diakses melalui laman pencarian internet.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengukur secara imunologi melalui analisis kuantitatif reaksi antigen-antibodi dengan melihat perubahan warna yang dihasilkan oleh konjugat enzim dan substrat enzim.

3. Instrumen pengumpulan data

- a. Timbangan khusus hewan, yang digunakan untuk mengukur berat badan tikus.
- b. Alat test Hb, digunakan untuk mengukur gula darah puasa tikus.
- c. Jangka sorong, digunakan untuk mengukur diameter luka tikus.
- d. Tabung tanpa antikoagulan, digunakan untuk menyimpan darah tikus.
- e. Cup sampel, digunakan untuk menyimpan serum darah tikus.

- f. Mikropipet, digunakan untuk memipet serum pada cup sampel untuk dipindahkan ke sumur mikroplate.
- g. Sumur Mikroplate, digunakan untuk wadah reaksi antara antigen-antibodi.
- h. Inkubator, digunakan untuk menginkubasi sampel.
- i. Sentrifuge, digunakan untuk memisahkan serum dari darah.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh akan disajikan dalam format tabel dan tekstual, kemudian perangkat lunak komputer akan digunakan untuk melakukan uji statistika.

2. Analisis data

Data yang diperoleh, selanjutnya dianalisis untuk menguji hipotesis sebagai berikut:

- a. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menganalisis atau menentukan data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Jika data berdistribusi tidak normal akan dilanjutkan dengan uji *Kolmogorov Smirnov*.
- b. Setelah data yang dianalisis berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji One Way ANOVA, uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan kadar IL-6 pada tikus antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif dengan kelompok perlakuan pemberian konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Uji *Least Significantly Difference* (LSD) digunakan untuk uji lanjutan konfirmasi apabila terdapat perbedaan.

3. Etika penelitian

Salah satu elemen penting dalam proses kegiatan penelitian adalah etika penelitian; aturan yang tepat dapat membantu menjaga privasi. Kelayakan hewan

coba diperlukan dalam penelitian kesehatan. Dalam penelitian kesehatan, penggunaan hewan coba sangat penting untuk kepentingan ilmiah maupun kesejahteraan hewan. Penelitian yang menggunakan hewan coba harus memenuhi dan menerapkan konsep pengurangan 3R, yang berarti pengurangan, penggantian, dan pengurangan, serta azas 5F, yang berarti kemerdekaan dari sakit, stres, dan ketidaknyamanan. Dalam hal kesehatan dan kesejahteraan hewan coba, konsep pengurangan 3R juga harus dipenuhi (Wahyuwardani dkk., 2021).

Mengembangkan metode alternatif yang memungkinkan penggunaan hewan sebagai subjek penelitian. Penggunaan sistem non-makhluk hidup (inanimate), in-vitro, dan hewan non-tradisional termasuk dalam kategori ini. Dengan mengurangi jumlah hewan yang digunakan, reduksi memungkinkan peneliti untuk mengumpulkan data yang sebanding dari lebih sedikit hewan atau dari jumlah hewan yang sama tanpa meningkatkan rasa sakit atau kesusahan hewan yang dikumpulkan. Refinement memungkinkan peneliti mengurangi atau mengurangi kemungkinan rasa sakit, kesusahan, dan kesejahteraan hewan dengan mengubah metodologi penelitian (Wahyuwardani dkk., 2021).

Prinsip 5F (*Five freedom*) atau lima kebebasan mengacu pada *Farm Animal Welfare Council* yang merupakan penjaminan penerapan kesejahteraan hewan pada hewan secara manusiawi yaitu sebagai berikut (Wahyuwardani dkk., 2021):

- a. Memberikan pakan dan minum yang sesuai dengan diet sehingga hewan tidak merasa lapar atau haus
- b. Memberikan hewan naungan yang nyaman untuk beristirahat dan menghindari rasa panas dan tidak nyaman
- c. Hewan tidak mengalami rasa nyeri, trauma, atau penyakit karena hewan diberikan pencegahan dan perawatan yang sesuai dengan pengobatannya

- d. Bebas rasa takut dan stres dalam jangka panjang, yang berarti mengurangi penderitaan hewan.
- e. dan bebas mengekspresikan tingkah laku alami, yaitu memberi hewan ruang gerak dan fasilitas yang mereka butuhkan.