BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif secara *true experiment* menggunakan desain *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun cincau hijau *(Cylea barbata L. Miers)* terhadap jumlah pembuluh darah luka bakar derajat IIB pada tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar.

Desain *post-test only control group design* untuk membandingkan data yang diperoleh dari kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol. Pada rancangan ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol. Masing-masing kelompok kontrol dilakukan perawatan dengan NaCl (Normal salin 0.9%), hidrogel, dan SSD. Konsentrasi masing-masing kelompok perlakuan perawatan topikal dengan ekstrak daun cincau hijau *(Cylea barbata L. Miers)* yaitu 40%, 50%, dan 60%.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvergicus*) galur wistar yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi:
   a. Umur tikus putih (*Rattus norvergicus*) galur wistar 2,5-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan ini cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.

b. Berjenis kelamin jantan, hal ini digunakan untuk homogenitas dan menghindari kerancuan hasil penyembuhan luka karena pengaruh hormon estrogen dan progesteron yang dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka (angiogenesis) dan menurunkan proses inflamasi (Claire *et al*., 2008).
c. Berat badan tikus antara 150-200 gram.
d. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, jinak, berambut licin, mengkilat dan bersih, rambutnya tebal dan tidak kasap, tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga, serta tidak mencret.
e. Tikus tidak mendapat pengobatan sebelumnya.

2. Kriteria eksklusi:
   a. Tikus sakit sebelum dan selama penelitian.
   b. Tikus mati sebelum dan selama penelitian.

4.2.2 Teknik Sampling dan Penentuan Jumlah Sampel

Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi luka bakar derajat IIB dengan menggunakan dengan plat besi yang berukuran ± 2x2 cm, tebal 2 mm dan bersuhu 80°C.

Pemilihan sampel menggunakan cara *simple random sampling*. Dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok dengan perawatan SSD (Silver sulfadiazin), Normal salin 0,9%, hidrogel, dan

ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata L. Miers*) topikal dengan dosis 40%, 50%, dan 60%.

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebagai berikut (Wibisono, 2008):

p (n-1) ≥ 15

6 (n-1) ≥ 15

6n-6 ≥ 15

6n ≥ 21

n ≥ 21/6

n ≥ 4 (Pembulatan)

Keterangan :

p = Jumlah perlakuan

n = Banyaknya sampel

Penelitian ini memerlukan sampel minimal 4 tikus untuk masing-masing perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan jumlah sampel sebanyak 5 ekor untuk tiap kelompok perlakuan guna menghindari kejadian yang tidak diinginkan bila sewaktu-waktu terdapat sampel yang mati atau tidak masuk dalam kriteria inklusi, sehingga total sampel berjumlah 30 ekor tikus.

4.2.3 Homogenitas Variabel

Menentukan homogenitas dengan menambahkan variabel kendali, yaitu sebagai berikut :

a. Perlukaan pada kulit hewan coba dilakukan dalam 1 waktu.

b. Perawatan tikus diperlakukan sama.

c. Makanan tikus sama yaitu Ayam Buras Super (ABS) comfeed dengan komposisi air 12%, protein 20-25%, lemak 5%, pati 5-50%, serat kasar 5%, vitamin dan mineral 3% sebanyak 12-20 gram/hari.
d. Minuman tikus sama yaitu minuman dalam botol sebanyak 20-45 ml/hari.
e. Bentuk kandang dibuat sama, segi empat dengan luas 650 cm^2. Setiap kandang dilapisi dengan kardus yang dibungkus koran. Lapisan tersebut diganti setiap 1 hari sekali agar tetap bersih dan kering.
f. Luas luka bakar sama atau homogen yaitu ± $4cm^2$.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun cincau hijau *(Cyclea barbata L. Miers)* dengan konsentrasi 40%, 50%, dan 60%.

4.3.2 Variabel Terikat

Jumlah pembuluh darah luka bakar derajat IIB.

4.3.3 Variabel Kontrol

Setiap sampel dilakukan perawatan dengan NS 0,9% saat dilakukan perawatan luka.

1. Kontrol positif

   Perawatan luka secara topikal menggunakan *Silver sulfadiazine* (SSD), hidrogel. Perawatan topikal SSD dan hidrogel

digunakan sebagai standar perawatan luka bakar derajat IIB untuk mengetahui apakah kelompok perlakuan dapat berpengaruh secara positif pada jumlah pembuluh darah apabila didapatkan persentase jumlah pembuluh darah kelompok perlakuan (ekstrak daun cincau hijau) lebih besar daripada kelompok SSD dan hidrogel.

2. Kontrol negatif

Perawatan luka dengan menggunakan *Normal saline* 0,9%. Normal salin digunakan sebagai standar perawatan luka bakar derajat IIB untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh terhadap jumlah pembuluh darah pada kelompok perlakuan. Normal salin 0,9% hanya bersifat melembabkan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Farmako dan Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember tahun 2013.

4.5 Alat dan Bahan serta Prosedur Penelitian

4.5.1 Teknik Sterilisasi

1. Alat dan Bahan

a. Autoclaf 1 buah

b. Korentang 1 buah

2. Prosedur Sterilisasi

Metode sterilisasi alat rawal luka menggunakan autoclaf elektrik (UV) dengan penyetelan timer otomatis. Berikut ini adalah prosedur sterilisasi peralatan penelitian:

a. Siapkan alat-alat yang akan disterilkan yang sudah dicuci dan direndam menggunakan cairan disinfektan selama 30 menit.
b. Siapkan sterilisator.
c. Masukkan alat-alat berbahan logam yang telah kering setelah direndam disinfektan dan alat-alat berbahan non logam sesuai tempatnya dalam sterilisator.
d. Tekan tombol *on* pada sterilisator.
e. Tunggu hingga lampu penanda proses sterilisasi padam.
f. Keluarkan alat-alat dengan menggunakan korentang dengan prinsip steril.

4.5.2 Teknik Pengekstrakan Daun Cincau Hijau

1. Alat dan Bahan

Tabel 4.1 Alat dan bahan untuk ekstraksi daun cincau hijau

No.	Nama Alat	Jumlah
1.	Oven	1 buah
2.	Blender	1 buah
3.	Timbangan	1 buah
4.	Gelas erlenmenyer	2 buah
5.	Corong gelas	1 buah
6.	Kertas saring	1 buah
7.	Labu evaporator	1 buah
8.	Labu penampung etanol	1 buah
9.	Evaporator	1 buah
10.	Pendingin spiral / Rotary evaporator	1 buah
11.	Selang *water pump*	1 buah
12.	*Water bath*	
13.	*Water pump*	
14.	*Vacum pump*	1 buah
15.	Daun cincau hijau	600 gram
16.	Etanol 96% (pelarut)	1 botol
17.	Aquades	1 botol
18.	Botol hasil ekstrak	Secukupnya

2. Prosedur pembuatan ekstrak daun cincau hijau *(Cyclea barbata L. Miers)*

Pelarut etanol digunakan karena memiliki polaritas yang lebih tinggi daripada hexana, dietileter dan aseton sehingga akan lebih banyak melarutkan komponen polar, selain itu etanol memiliki titik didih rendah (Cripps, 1973). Proses ekstraksi dengan suhu tinggi akan lebih cepat tapi banyak senyawa yang rusak.

Angelina *et al.,* (2008) menguji efek toksik dari pemberian ekstrak etanol daun cincau hijau per oral terhadap tikus selama 14 hari dengan pemberian ekstrak etanol daun cincau hijau sampai dosis 30000 mg/kg bb tidak menyebabkan efek toksik yang

bermakna serta tidak ada kematian. Efek toksik ditinjau berdasarkan pengamatan terhadap tingkah laku, reflek spinal, sistem syaraf pusat, urinasi dan defekasi serta jumlah hewan yang mati.

a. Proses pengeringan

Cuci bersih daun cincau hijau yang masih basah, potong kecil-kecil, kemudian masukkan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air).

b. Proses ekstraksi

1) Daun cincau hijau yang telah dikeringkan, kemudian diblender sampai halus.
2) Timbang sebanyak 100 gram sampel kering.
3) Masukkan 100 gram sampel bubuk halus daun cincau hijau kedalam gelas erlenmenyer ukuran +1 liter.
4) Bubuk halus daun cincau hijau tersebut kemudian di rendam dengan etanol 900 ml. Dipilihnya etanol karena mempunyai polaritas yang tinggi sehingga dapat membawa komponen-komponen polar maupun non-polar (Rachmini, 2001).
5) Kocok sampai benar- benar tercampur (± 30 menit).
6) Diamkan selama 1 malam sampai benar–benar mengendap.
7) Ambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).
8) Lakukan proses prendaman ini sampai 3 kali.

c. Proses evaporasi

1) Masukkan daun cincau hijau yang telah diekstrak kedalam labu evaporasi 1 liter.
2) Pasang labu evaporasi pada evaporator.
3) Isi *water bath* dengan air sampai penuh.
4) Pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sesuai dengan titik didih etanol), sambungkan dengan aliran listrik.
5) Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
6) Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampang (+ 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu) + 900 ml.
7) Hasil yang diperoleh kira-kira 1/4 dari bahan alam kering.
8) Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik / kaca.
9) Kemudian simpan dalam *freezer* (Laboratorium Farmakologi FKUB, 2013).

3. Rumus Perhitungan Pembuatan Salep

Perhitungan pembuatan salep ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata L. Miers)* yang dicampur dengan vaselin adalah sebagai berikut (Laboratorium Farmakologi FKUB, 2013):

a) Konsentrasi 40%

$\frac{40}{100}$ x 40mg = 16mg / hari

Total: 5 tikus x 21 hari x 16mg = 1680mg ekstrak

5 tikus x 21 hari x 24mg = 2520mg vaseline

b) Konsentrasi 50%

$\frac{50}{100}$ x 40mg = 20mg / hari

Total: 5 tikus x 21 hari x 20mg = 2100mg ekstrak

5 tikus x 21 hari x 20mg = 2100mg vaseline

c) Konsentrasi 60%

$\frac{60}{100}$ x 40mg = 24mg / hari

Total: 5 tikus x 21 hari x 24mg = 2520mg ekstrak

5 tikus x 21 hari x 16mg = 1680mg vaseline

4.5.3 Teknik Pembuatan Luka Bakar Derajat IIB

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan untuk membuat luka bakar derajat IIB adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2 Alat-alat untuk induksi luka bakar derajat IIB

No.	Nama Alat	Jumlah
1.	Pisau cukur dan gagangnya	1 buah
2.	Lempeng besi ukuran 2x2 cm	1 buah
3.	Korentang	1 buah
4.	Bengkok	1 buah
5.	Kom steril	1 buah
6.	Kasa steril	24 buah
7.	Spiritus	
8.	Pemantik api	1 buah
9.	Alkohol swab	24 buah
10.	Normal saline 0,9%	1 botol
11.	Perlak	1 buah
12.	Sarung tangan bersih	1 pasang
13.	Sarung tangan steril	1 pasang
14.	Jas laboratorium	1 buah
15.	Obat anestesi general (Ketamin)	1 ampul
16.	Spuit 3 cc	30 buah
17.	Aquades injeksi	1 buah
18.	Tikus jantan	30 ekor
19.	Penggaris	1 buah
20.	Pinset anatomis	1 buah

2. Prosedur Pembuatan Luka Bakar Derajat IIB

Tahapan tindakan yang harus dilakukan untuk membuat luka bakar derajat IIB pada hewan coba adalah sebagai berikut:

1. Ditentukan terlebih dahulu daerah yang akan dibuat luka bakar yaitu punggung kanan atas untuk memudahkan perawatan (Erizal, 2008).

2. Bersihkan rambut tikus dan cukur area tersebut dengan luas ±8 cm^2.
3. Pasang perlak atau alas di bawah tubuh tikus yang akan di buat luka bakar.
4. Buka bak instrumen steril.
5. Cuci tangan dan pakai sarung tangan bersih.
6. Desinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan alcohol swab dan tunggu sampai kering.
7. Anastesi tikus dengan Ketamin, berikan dengan metode IM (Intramuskular) pada abdomen bawah dengan dosis 0,5cc yang diencerkan dengan aquades injeksi 3cc dan diinjeksikan ±0,4cc pada tiap tikus
8. Panaskan plat besi dengan ketebalan 2 mm dan luas 2x2 cm hingga mencapai suhu 80°C atau ±8 menit secara konstan dengan menggunakan api bunsen yang sudah diatur tinggi sumbu 1 cm.
9. Tempelkan plat besi menggunakan korentang (klom) pada punggung kanan atas tikus selama 6 detik.
10. Angkat plat besi kemudian kompres luka bakar selama 60 detik dengan kassa yang telah dicelupkan kedalam NS 0,9%.
11. Berikan perawatan pada area luka yang terbentuk sesuai prosedur rawat luka kemudian keringkan dan tutup luka dengan menggunakan kasa steril.
12. Lepas sarung tangan.
13. Rapikan alat dan cuci tangan (Laboratorium Faal FKUB, 2013).

3. Penentuan Luka Bakar Derajat IIB

Penentuan derajat luka bakar yang dibuat atau diinduksikan ke tikus putih betina adalah dengan melakukan eksplorasi dengan menggunakan 2 metode induksi luka bakar. Dua metode tersebut adalah sebagai berikut:

1. Metode 1: menggunakan kompor dihidupkan 20 menit sehingga suhu mencapai 100^0C, kemudian plat besi berukuran 2x2 dan tebal 2 mm ditempelkan ke kompor 13 menit sehingga suhunya 56^0C, yang kemudian ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik dan selanjutnya luka dikompres dengan NS selama 60 detik.
2. Metode 2: menggunakan plat besi berukuran 2x2 cm dan tebal 2 mm dengan menggunakan 2 variasi suhu yaitu 70°C dan 80°C. Pertama plat besi dipanaskan pada bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm selama ±5 menit dan suhu mencapai 70°C yang kemudian ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik, dan selanjutnya luka dikompres dengan NS selama 60 detik. Selanjutnya, plat besi berukuran 2x2 cm dan tebal 2 mm yang dipanaskan pada bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm hingga suhu mencapai 80°C atau pemanasan selama ±8 menit, yang kemudian ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik, dan selanjutnya luka dikompres dengan NS selama 60 detik.

Hasil uji eksplorasi tersebut kemudian dieksisi dan dianalisa. Hasil menunjukkan bahwa metode yang tepat untuk induksi luka bakar derajatIIB adalah dengan metode ketiga yaitu pemaparan plat besi dengan suhu 80°C yang dipanaskan selama ±8 menit dan ditempelkan pada punggung tikus selama 6 detik. Hal ini karena kerusakan yang terjadi karena agen tersebut telah mengenai epidermis dan 1/2-7/8 dermis. Sedangkan kelenjar keringat dan sebasea sebagian masih utuh.

4.5.4 Teknik Perawatan Luka Bakar Derajat IIB

1. **Alat dan bahan**

Tabel 4.3 Alat dan bahan perawatan luka bakar derajat IIB

No.	Nama Alat	Jumlah
1.	Sarung tangan steril	1 pasang
2.	Sarung tangan bersih	1 pasang
3.	Bak instrumen kecil	1 buah
4.	Pinset anatomis	2 buah
5.	Pinset cirurgis	1 buah
6.	Kom steril	2 buah
7.	Kasa steril	24 buah
8.	Kasa gulung	1 buah
9.	Bengkok	1 buah
10.	Perlak/alas	1 buah
11.	Gunting	1 buah
12.	Normal saline 0,9%	1 botol
13.	Spuit 3 cc	1 buah
14.	Ekstrak daun cincau hijau	Secukupnya
15.	Silver sulfadiazine (SSD)	
16.	Hidrogel	
17.	Korentang dan tempatnya	1 buah
18.	Gunting nekrotomi	1 buah
19.	Kapas lidi	24 buah
20.	Cucing	1 buah
21.	Tas plastik pembuang sampah	1 buah

2. Prosedur Perawatan Luka Bakat DerajatIIB

a. Prosedur Perawatandengan Normal Saline 0,9%

1) Cuci tangan.
2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sehingga memudahkan peneliti melakukan perawatan.
4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
5) Buka balutan.
6) Pakai sarung tangan steril.
7) Irigasi luka dengan NS yang dimasukkan kedalam spuit 3cc
8) Basahi kassa dengan NS 0,9% dan peras kemudian bersihkan luka dan keringkan.
9) Tutup semua area luka bakar dengan kassa steril yang telah dibasahi NS 0,9%.
10) Bereskan peralatan.
11) Lepas sarung tangan steril dan buang di plastic.
12) Cuci tangan.

b. Prosedur Perawatan dengan Silver Sulfadiazine 1 % (SSD)

1) Cuci tangan.
2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sehingga memudahkan peneliti melakukan perawatan.
4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
5) Buka balutan.

6) Pakai sarung tangan steril.
7) Irigasi luka dengan NS yang dimasukkan kedalam spuit 3cc.
8) Basahi kassa dengan NS 0,9% dan peras kemudian bersihkan luka dan keringkan.
9) Oleskan krim Silver sulfadiazine secukupnya (menutupi seluruh area luka bakar).
10) Tutup area luka dengan kassa steril.
11) Bereskan peralatan.
12) Lepas sarung tangan steril dan buang di plastik.
13) Cuci tangan.

c. Prosedur Perawatan dengan Hidrogel

1) Cuci tangan.
2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sehingga memudahkan peneliti melakukan perawatan.
4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
5) Buka balutan.
6) Pakai sarung tangan steril.
7) Irigasi luka dengan NS yang dimasukkan kedalam spuit 3cc.
8) Basahi kassa dengan NS 0,9% dan peras kemudian bersihkan luka dan keringkan.
9) Oleskan hidrogel secukupnya (menutupi seluruh area luka bakar).
10) Tutup area luka dengan kassa steril.

11) Bereskan peralatan.
12) Lepas sarung tangan steril dan buang di plastik.
13) Cuci tangan.

d. Prosedur Perawatan dengan ekstrak daun cincau hijau *(Cyclea barbata L. Miers)*

1) Cuci tangan.
2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sehingga memudahkan peneliti melakukan perawatan.
4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
5) Buka balutan.
6) Pakai sarung tangan steril.
7) Irigasi luka dengan NS yang dimasukkan kedalam spuit 3cc.
8) Basahi kassa dengan NS 0,9% dan peras kemudian bersihkan luka dan keringkan.
9) Oleskan ekstrak daun cincau *(Cyclea barbata L.Miers)* sesuai konsentrasi variabel (menutupi seluruh area luka bakar).
10) Tutup area luka dengan kassa steril.
11) Bereskan peralatan.
12) Lepas sarung tangan steril dan buang di plastik.
13) Cuci tangan.

4.5.5 Teknik Pemeliharaan Tikus

1. Alat dan bahan pemeliharaan tikus

a. Kandang tikus.
b. Penutup kandang dari anyaman kawat.
c. Botol air.
d. Makanan tikus.
e. Alas kandang (Kardus dilapis Koran).

2. Cara pemeliharaan tikus

a. Sebelum dan selama penelitian

Sebelum diinduksi luka bakar, tikus diadaptasikan terlebih dahulu di tempat penelitian selama 1 minggu. Masing-masing tikus ditempatkan pada kandang yang berbeda karena bila terlalu berdesakan suhu badan tikus akan meningkat di atas normal dan mengeluarkan banyak ludah. Kandang tikus harus cukup kuat tidak mudah rusak, terbuat dari bak berukuran 20x30x40 cm^3, mudah dibongkar, dibersihkan dan dipasang lagi. Kandang harus tahan gigitan sehingga tikus tidak mudah lepas. Kandang tikus dilengkapi dengan penutup kandang dari anyaman kawat dan botol air. Alas kandang tikus diganti setiap hari sekali agar tetap kering dan tidak lembab.

Setiap hari tikus diberi makan dan minum. Makanan tikus yaitu Ayam Buras Super (ABS) *comfeed* dengan komposisi air 12%, protein 20-25%, lemak 5%, pati 5-50%, serat kasar 5%, vitamin dan mineral 3% sebanyak 12,1-15,6 gram/hari, Tikus

diberikan minum yaitu minuman dalam botol sebanyak 18,2-24,8 ml/hari.

Untuk menghindari kesalahan selama penelitian dalam penilaian penyembuhan luka pada tikus maka masing-masing tikus harus diberi tanda yang tidak mudah hilang. Penandaan ini dilakukan dengan pemberian nomor pada masing-masing kandang tikus dan pada ekornya. Pembagian kelompok tikus dilakukan dengan mekanisme *Simple Random Sampling*. Dimana kelompok dibagi menjadi enam kelompok yaitu kelompok 1 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan Normal salin (NS) 0,9% , Kelompok 2 adalah kelompok perlakuan yang diberikan *silver sulfadiazine* (SSD), kelompok 3 adalah kelompok dengan perlakuan hidrogel, kelompok 4 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak cincau hijau 40%, kelompok 5 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak cincau hijau 50%, kelompok 6 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak cincau hijau 60%.

b. Setelah penelitian

Tikus dimatikan pada hari ke-22 dengan memasukkan tikus ke dalam wadah tertutup yang mengandung zat eter. Setelah tikus dimatikan, dilakukan pengambilan jaringan dengan mengeksisi jaringan luka menggunakan pisau bedah hingga mencapai batas lapisan otot 5-10mm batas kulit normal.

Kemudian jaringan direndam dalam larutan fiksasi formalin 10% yang sebelumnya dibungkus dengan kertas saring lalu dimasukan kedalam larutan etanol 70% selama 24 jam. Tikus yang sudah mati dilakukan penguburan.

4.5.6 Teknik *Embedding* dan Pembuatan Preparat Jaringan Luka

1. Alat dan Bahan

a. Alat dan bahan untuk eksisi jaringan:

1) Papan bedah
2) Pisau bedah
3) Pinset

b. Alat untuk pembuatan preparat

1) Mikrotom
2) Beaker glass 250 ml
3) Kuas
4) Obyek glass
5) Inkubator
6) *Hot plate* 38-40°C
7) Wadah

c. Bahan pembuatan preparat

1) Larutan fiksatif
2) Larutan xilol
3) Paraffin blok

4) Etanol, air
5) Air hangat 38-40°C
6) Aquades

2. Cara Embeding dan Pembuatan

a. Tikus dimatikan sesuai prosedur pada hari ke-22 dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup yang mengandung zat eter.
b. Jaringan luka mencapai batas lapisan otot dieksisi menggunakan pisau bedah 5-10mm batas kulit normal.
c. Jaringan direndam dalam larutan fiksasi formalin 10% yang sebelumnya dibungkus dengan kertas saring lalu dimasukan kedalam larutan etanol 70% selama 24 jam.
d. Memindahkan jaringan tersebut ke dalam larutan etanol 60% selama 2 jam; larutan etanol 90% selama 20 menit; dan larutan etanol absolut selam 20 menit, dengan 3 kali perlakuan.
e. Memindahkan jaringan luka pada larutan xitol 1 dan 2 masing-masing selama 20 menit. Dilanjutkan pada larutan xitol 3 pada suhu 60-63°C selama 30 menit.
f. Mencelupkan jaringan luka pada parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah.
g. Menunggu sampai memadai dimana jaringan luka berada dalam blok paraffin (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2013).

4.5.7 Teknik Pewarnaan Hematoksilin-eosin

1. Alat dan Bahan

a. Preparat jaringan periartikular
b. Hematoksilin
c. Eosin
d. Alkohol 1%
e. Pipet
f. *Cover glass*

2. Cara Pewarnaan

a. Masukkan spesimen kedalam hematoksilin selama 5 menit dan dibilas dengan air.
b. Memasukkan ke dalam alkohol 1% selama beberapa detik dibilas dengan air kembali.
c. Memasukkan kedalam eosin selama 5 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2013).

4.6 Definisi Operasional

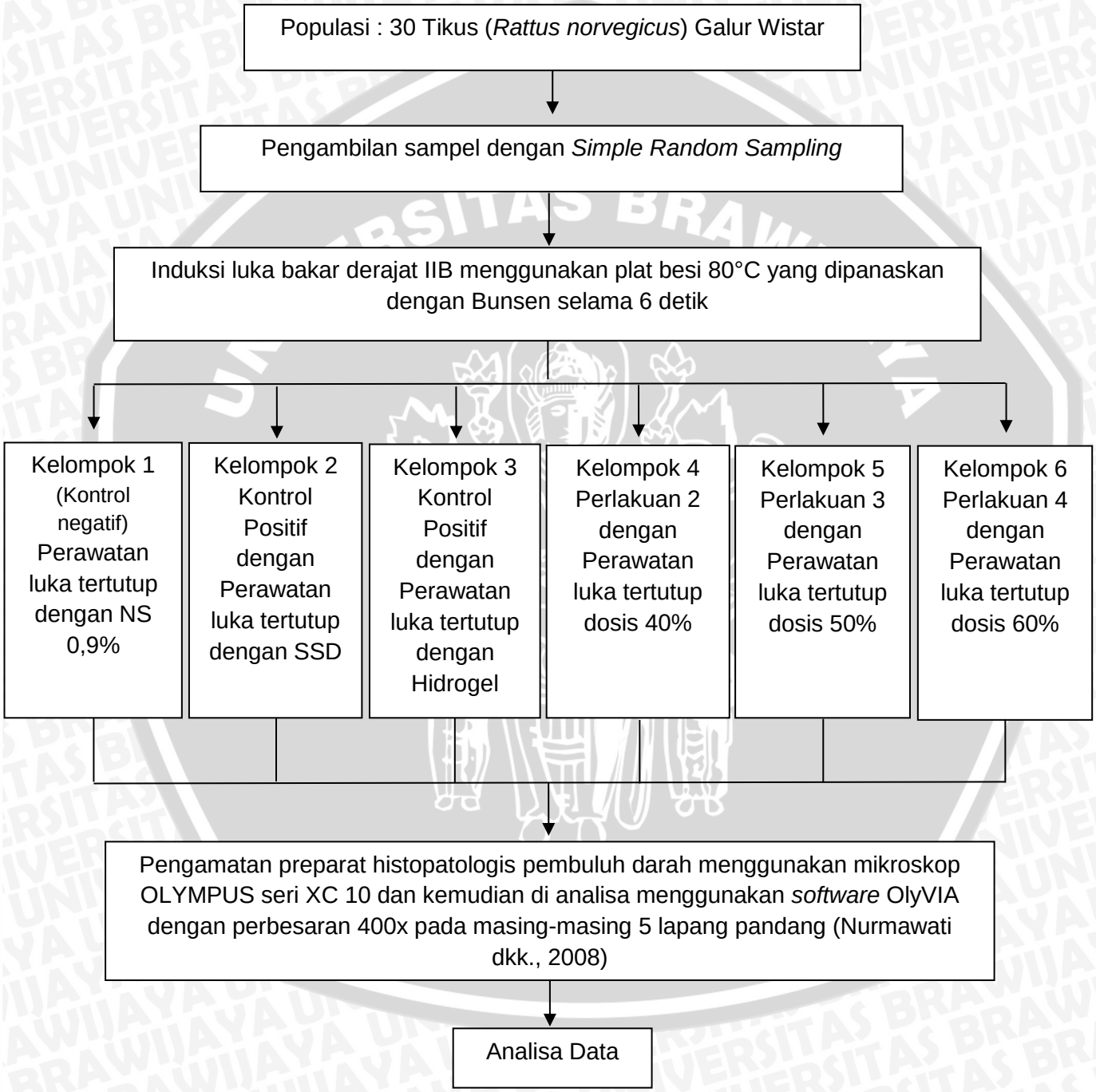
Tabel 4.4 Definsi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Dosis Ekstrak Daun Cincau Hijau yang Digunakan untuk Perawatan Luka Bakar Derajat IIB	Perawatan luka bakar derajat IIB dari ekstrak daun cincau hijau yang dibuat dengan metode ekstraksi dengan pelarut etanol 96% dengan konsentrasi 40 %, 50 %, 60 % yang dibuat dengan campuran vaseline menggunakan rumus pengenceran yang sesuai. Sebelum diberikan olesan ekstrak daun cincau hijau, luka dibersihkan dulu dengan Normal saline 0,9% kemudian ekstrak diberikan secara topikal. Kemudian uka ditutup dengan kassa steril	miligram (mg)	Rasio
Jumlah Pembuluh Darah	Proses interpretasi pembuluh darah yang terbentuk diidentifikasi dari preparat histopatologis pada hari ke-22. Pembuluh darah diamatai pada penampang potongan melintang, membujur ataupun miring dengan penampang bulat berwarna merah muda dengan ada atau tidak adanya eritrosit di dalam lumen serta terdapat lapisan sel-sel endotel disekitar lumennya. Pewarnaan preparat histopatologis menggunakan *Hematoxylin Eosin* dan dikonversikan dalam bentuk file *image* menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC 10 dan kemudian di analisa menggunakan *software* OlyVIA dengan perbesaran 400x pada masing-masing 5 lapang pandang (Nurmawati dkk., 2008)	Jumlah Pembuluh Darah	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

1. Alur Kerja Penelitian

Post-test Only, Control Group Design



2. Pengumpulan Data

a. Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan teknik observasi eksperimen, yang mana sample dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol. Kemudian dilakukan perawatan luka dengan batas waktu penelitian selama 21 hari. Setelah itu pada hari ke 22 tikus dimatikan dan diambil sampel untuk pemeriksaan preparat di laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Pemeriksaan dan penghitungan jumlah pembuluh darah menggunakan software OlyVIA dengan perbesaran 400 kali.

b. Identifikasi Pembuluh Darah

Identifikasi pembuluh darah dilakukan pada hari ke-22 setelah luka dibersihkan. Pengamatan jumlah pembuluh darah diidentifikasi secara tampilan yaitu dari arteriol, venula, dan kapiler. Arteriol yang tampak penampang melintang dengan bentuk bulat atau pipih dengan ada ata tidak ada eritrosit berwarna merah disertai beberapa lapisan endotel dan terdapat lapisan-lapisan tunika. Venula diidentifikasi dengan bentuk pipih atau bulat merah muda dengan lumen dengan ada atau tidak adanya eritrosit seperti pada arteriol dengan diameter secara keseluruhan lebih besar daripada arteriol terdekat. Dinding yang tipis dan terdapat endotel dengan tunika intima dan media serta tunika adventia. Kapiler sebagai pembuluh darah terkecil setelah arteriol diidentifikasi tampak lebih kecil daripada arteriol maupun venule dengan beberapa sel endotel yang mengelilingi tepi dari kapiler.

4.8 Analisa Data

1. Uji Normalitas dan Homogenitas

Hasil perhitungan jumlah pembuluh darah luka bakar derajatIIB pada masing-masing sampel di setiap perlakuan akan diuji asumsi statistik *IBM SPSS Statistic 20 for Windows* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel kecil (≤ 50) dengan α = 0,05. Jika data menunjukkan *p value* > 0,05, maka data berdistribusi normal (Dahlan, 2009). Kemudian pada uji homogenitas menggunakan uji *Levene test* dengan α = 0,05. Jika data menunjukkan *p value* > 0,05, maka data adalah homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One-way ANOVA* (Dahlan, 2009).

2. Uji *One way ANOVA*

Data hasil penelitian diuji *One-way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi *p value* < α (0,05), maka terdapat per bedaan *yang* signifikan terhadap jumlah total pembuluh darah luka bakar derajat IIB antar kelompok (Dahlan, 2009).

3. *Uji* Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*)

Jika setelah diuji *One-way ANOVA* didapatkan hasil yang berbeda maka dilanjutkan dengan *uji Post Hoc Test* yang digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang signifikan di antara kelompok-kelompok uji coba. Nilai signifikansi antar kelompok yang paling

bermakna adalah yang memiliki nilai signifikansi paling kecil dengan nilai *p value* < α (0,05) (Dahlan, 2009).

4.9 Kode Etik

Penelitian dalam bidang kesehatan yang memanfaatkan hewan coba wajib menggunakan prinsip 3R, yaitu replacement, reduction, dan refinement (Hume and Rusel, 1957).

1. ***Replacement***

   Ada dua alternatif untuk *replacement* yaitu *replacement relative* dan *replacement absolute*.

   a. *Replacement relative,* yaitu tetap menggunakan hewan percobaan sebagai donor organ, jaringan, atau sel.

   b. *Replacement absolute,* yaitu tidak memerlukan bahan dari hewan coba, melainkan memanfaatkan galur sel (*cell lines*) atau program computer.

2. ***Reduction***

   Mengurangi pemanfaatan jumlah hewan percobaan sehingga sesedikit mungkin dengan bantuan ilmu statistik, program computer, dan teknik-teknik biokimia .

3. ***Refinement***

   Mengurangi ketidaknyamanan yang diderita oleh hewan percobaan sebelum, selama, dan setelah penelitian, misalnya dengan pemberian analgesik.