

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian eksperimental ini merupakan *True Experiment* dengan pengamatan *Posttest Only Control Group Design* (Wood dan Haber, 2006) untuk mengetahui perbandingan antara efektifitas balutan luka menggunakan terapi standar konvensional dengan balutan modern kombinasi hidrogel binahong.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons biologis yang mendekati manusia. Untuk menghindari faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka, maka ditentukan kriteria inklusi untuk menghomogenkan sampel.

Kriteria Inklusi :

1. Jenis tikus adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur Wistar.
2. Jenis kelamin jantan.
3. Umur 2,5-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.
4. Berat badan 180-250 gram.
5. Kondisi sehat, ditandai dengan pergerakan aktif; jinak; berbulu licin, mengkilat, dan bersih; rambut tebal dan tidak kusam; badan tegap; tidak

ada luka; tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga; tidak terlalu banyak ludah; tidak diare; dan pernapasan tenang.

6. Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya.
7. Pada tikus yang di induksi STZ terjadi peningkatan gula darah > 126 mg/dl.

Kriteria Eksklusi :

1. Luka mengalami infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah), eksudat yang berlebihan, bau busuk.
2. Luka menjadi lebar karena digigit, atau terkena benda tajam lain.
3. Tikus mati.

4.2.2 Besar Sampel

Terdapat 6 kelompok dimana kesemuanya di bedah pada hari ke-12.

Selanjutnya jumlah tikus dihitung dengan rumus :

$$p(n-1) > 15$$

Keterangan : n = jumlah sampel tiap perlakuan p = jumlah perlakuan.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 12, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 4 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut :

$$6(n-1) > 15$$

$$n-1 > 2,5$$

$$n > 3,5$$

$$n > 4 \text{ (hasil pembulatan)}$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 4 ekor tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 24 ekor. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan. Sehingga tikus yang digunakan dalam penelitian ini sejumlah 30.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah NS, basis hidrogel, hidrogel binahong 2,5%, 5%, 7,5%. Setiap dilakukan perawatan luka, sebelumnya telah dibersihkan dengan NS 0,9%.

4.3.2. Variabel Kontrol

Sebelum dilakukan perawatan, sebelumnya luka dibersihkan dengan NS 0,9%. Kontrol negatif : perawatan luka pada tikus sehat dengan NS. Untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh penyembuhan luka terbuka pada kondisi hiperglikemi. Kontrol positif : perawatan luka hiperglikemi dengan NS. Pada penelitian ini, terapi dengan NS digunakan untuk mengetahui apakah kelompok perlakuan dapat berpengaruh positif pada proses penyembuhan luka hiperglikemi.

4.3.3. Variabel Tergantung

Variable tergantung pada penelitian ini adalah nekrosis yang mempunyai 3 indikator sebagai berikut:

1. Penurunan sel debris
2. Peningkatan plasma sel
3. Penurunan jumlah PMN

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biokimia-Biomolekular dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan selama tiga bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Pembuatan Ekstrak Binahong

Alat untuk pembuatan ekstrak daun binahong adalah 1 buah botol hasil ekstrak (1 L), oven, kapas, timbangan, 2 buah gelas *erlenmeyer*, 1 buah corong gelas, 1 buah kertas saring, 1 buah labu evaporator, 1 buah labu penampung etanol, 1 buah evaporator, 1 buah pendingin spiral atau *rotary evaporator*, 1 buah selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, dan 1 buah *vacum pump*. Sedangkan bahan untuk pembuatan ekstrak daun binahong adalah 2,5 kg daun binahong, etanol 95%, dan 1 botol.

4.5.2. Pembuatan Hidrogel Binahong

Alat untuk pembuatan ekstrak daun binahong adalah (Laboratorium Farmakologi FKUB, 2012) :

1. Daun Binahong: 2,5 kg
2. Etanol 95%
3. Aquades: 1 botol
4. Botol hasil ekstrak: 1 botol, 1 L
5. Oven: 1 buah

6. Kapas
7. Timbangan: 1 buah
8. Gelas *Erlenmeyer*: 2 buah
9. Corong gelas: 1 buah
10. Kertas saring: 1 buah
11. Labu evapator: 1 buah
12. Labu penampung etanol: 1 buah
13. Evapator: 1 buah
14. Pendingin spiral atau *rotary evapator*: 1 buah
15. Selang *water pump*: 1 buah
16. *Water pump*
17. *Water bath*
18. *Vacum pump*: 1 buah

Bahan :

1. Daun binahong 2,5 kg
2. Etanol 95%

4.5.3. Pembuatan Luka Hiperglikemi

Alat dan bahan untuk pembuatan luka pada kondisi hiperglikemia adalah bak steril (berisi sarung tangan), spuit, 2 buah pinset antomis, pisau bedah/scapel, alat cukur, kom steril berisi kapas, STZ, ketamin, air steril, alkohol 70%, penggaris, alat tulis, kapas, perlak, gunting, bengkok, arloji, dan cetakan batang logam dengan diameter 1,5 cm.

4.5.4. Pembuatan Tikus Hiperglikemi

Tikus atau kelinci sebagai hewan model untuk kondisi hiperglikemia dapat terjadi secara spontan atau dari hasil induksi eksperimental. Cara membuat hiperglikemia eksperimental pada hewan model antara lain dengan pankreatektomi dan menggunakan bahan kimia diabetogenik seperti Streptozotocin (STZ).

Sifat diabetogenik Streptozotocin (STZ, 2-deoksi-2-(3-metil-3- (nitrosoureido)-D-glukopiranos), memiliki mekanisme kerja yang diduga melalui kerusakan DNA dalam sel-sel β pankreas sebagai akibat adanya proses alkilasi DNA. Kerusakan DNA juga diakibatkan oleh aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan dari Nitric Oxide (NO) yang bersumber dari STZ. Dalam mitokondria, NO akan meningkatkan aktivitas xanthin oksidase dan menurunkan konsumsi yang berdampak pada produksi ATP yang berakibat pada kerusakan DNA.

Alat dan Bahan :

1. Sarung tangan
2. Spuit
3. Alkohol 70%
4. Streptozotocin (STZ 55 mg/kgBB 0.1 ml dalam 10 mmol/l buffer sitrat, pH 4.5)
5. Glukometer
6. Stick

4.5.5. Perawatan Luka

Alat yang digunakan untuk melakukan perawatan luka pada hewan coba adalah 1 set perawatan luka steril, sarung tangan steril, kassa steril, bengkok, perlak, pinset anatomis steril, pinset anatomis bersih, deeper / kapas, plester, gunting, NS, kom, basis hidrogel, dan hidrogel Binahong 2,5%, 5% dan 7,5%.

4.5.6. Pemeliharaan Tikus

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan tikus adalah kandang/bak tikus, penutup kandang dari anyaman kawat, botol air, makanan tikus (dedak), sekam dan alas tidur.

4.5.7. Embedding dan Pembuatan Jaringan Luka

Alat yang digunakan untuk eksisi jaringan adalah papan bedah, pisau bedah, dan pinset. Alat yang digunakan untuk pembuatan preparat adalah mikrotom, beaker glass 250 mL, kuas, obyek glass, *incubator*, *hot plate* 38-40°C, dan wadah. Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan preparat adalah larutan fiksatif, larutan xilol, parafin blok, etanol, air, air hangat 38-40°C, dan aquades.

4.5.8 Pewarnaan Immunohistokimia (HE)

I. Proses Pematangan Jaringan Berupa Makros

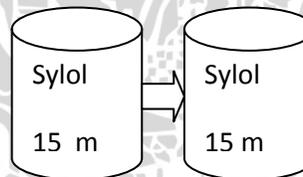
1. Gross hasil bedah dimasukan ke larutan formalin 10 (fiksasi) semalam
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti
3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter

4. Di masukan ke kaset dan di beri kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Dimasukan ke larutan formalin 10 % sebelum di proses / dimasukan ke alat *Tissue Tex Prosesor*
6. Di proses menggunakan alat/mesin *Tissue Tex Prosesor* selama 90 Menit, Alarm Berbunyi tanda selesai.

II. Poses Pengeblokan dan Pematangan Jaringan

1. Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan di potong dengan alat *microtome* ketebalan 3-5 mikron

III. Proses Deparafinisasi



Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron , di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 drajat , kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit

IV. Proses Pewarnaan (HE)

1. Cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 Menit
2. Cuci dengan air mengalir selama 15 Menit

- 3. Alkohol asam 1 % 2-5 Celup
- 4. Amonia air 3-5 Celup
- 5. Cat pembanding :
 - Eosin 1% selama 10-15 Menit

V. Dehidrasi ;

- Alkohol 70% 3 menit
- Alkohol 80% 3 menit
- Alkohol 96% 3 menit
- Alkohol Absolut 3 menit

VI. Penjernihan (*Clearing*) :

- Xylol 60 menit

VII. *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

- Biarkan slide kering pada suhu ruangan
- Setelah slide kring siap untuk diamati

4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur dan Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Nekrosis	Sel kulit mati yang mengalami pengecilan intisel dan atau hilangnya intisel yang serta berwarna kecoklatan pada pengecakatan HE. pada penelitian ini menggunakan 3 indikator yaitu debris sel, plasma sel dan PMN	Alat Ukur : Mikroskop Cahaya perbesaran 40x (dilihat secara subjektif, kemudian dihitung secara manual indikator nekrosis sel) Analisa menggunakan uji statistik one way ANOVA.	Didapatkan rata-rata penurunan nekrosis pada masing-masing perlakuan dengan mengacu pada indikator nekrosis	Rasio

			jaringan yaitu: debris sel, PMN dan plasma sel	
Daun Binahong	Daun Binahong mengandung berbagai macam zat kimia yaitu saponin, flavonoid, alkaloid, terpenoid, polifenol, asam ursolat, antosianin, asam askorbat.	<p>Cara Ukur : Metode maserasi, dan dicampurkan dengan basis hidrogel untuk pembuatan hidrogel binahong. Ekstraksi murni binahong dapat diukur menggunakan rumus : V1 x N = V2 x N2</p> <p>Alat Ukur : Maserator Gelas Ukur Timbangan Cawan Penguap</p>	Ekstrasi ethanol 95%, konsentrasi 40%,	Rasio
Hidrogel binahong	Daun Binahong mengandung berbagai macam zat kimia yaitu saponin, flavonoid, alkaloid, terpenoid, polifenol, asam ursolat, antosianin, asam askorbat.	<p>Cara Ukur : Metode maserasi, dan dicampurkan dengan basis hidrogel untuk pembuatan hidrogel binahong. Konsentrasi/dosis pembuatan hidrogel binahong dapat dihitung menggunakan rumus : V1.N1 = V2.N2</p> <p>Alat Ukur : Maserator Gelas Ukur Timbangan Cawan Penguap</p>		
Pembuatan luka hiperglikemi	Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons			

	<p>biologis yang mendekati manusia. Umur 2,5-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka, dan memiliki berat badan 180-250 gram.</p>			
<p>Pembuatan tikus hiperglikemi</p>	<p>Pemberian streptozotocin dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya hiperglikemi dengan merusak sel beta pancreas dan selanjutnya menginduksi kerusakan fungsi renal akibat kondisi hiperglikemia yang dihasilkan</p>	<p>Cara Ukur : Tikus diinjeksi intraperitoneal Streptozotocin (STZ 55 mg/kgBB 0.2 ml dalam 10 mmol/l buffer sitrat, pH 4.5). Pada hari ke-5 dan ke-11 di cek gula darah. Dianggap diabetik sampai konsentrasi glukosa darah mencapai > 126 mg/dl.</p> <p>Alat Ukur : Glukometer Stick Sput</p>	<p>Glukosa darah mencapai > 250 mg/dl.</p>	<p>Nominal</p>
<p>Plasma sel</p>	<p>Merupakan membran berwarna ungu (pada hasil pengecatan HE) yang mengelilingi inti sel.</p>	<p>Alat Ukur : Mikroskop Cahaya perbesaran 40x (dilihat secara subjektif, kemudian dihitung secara manual plasma sel yang ada dalam setiap preparat jaringan luka) Analisa menggunakan uji statistik one way ANOVA.</p>	<p>Didapat penurunan plasma sel pada tikus dengan hiperglikemi dimana seharusnya disetiap inti sel memiliki plasma sel pada tikus sehat.</p> <p>Disetiap perhitungan jaringan luka standart</p>	<p>Rasio</p>

			<p>maksimal nilai plasma sel adalah 30 plasma sel, apabila ditemukan lebih dari 30 plasma sel dalam setiap jaringan luka pada maka hasil perhitungan dituliskan sesuai dengan nilai maksimal jumlah plasma sel yaitu 30 plasma sel</p>	
Debris sel	<p>Merupakan jaringan atau sel mati yang terdapat pada jaringan luka, berwarna abu-abu dengan bentuk tidak jelas karena telah mengalami kerusakan sel seperti pecahnya inti sel, hilangnya membran sel (pada pengecatan HE)</p>	<p>Alat Ukur : Mikroskop Cahaya perbesaran 40x (dilihat secara subjektif, kemudian dihitung secara manual debris sel yang ada dalam setiap preparat jaringan luka) Analisa menggunakan uji statistik one way ANOVA.</p>	<p>Didapat peningkatan debris sel pada tikus dengan hiperglikemi.</p> <p>Disetiap perhitungan jaringan luka standart maksimal nilai debris sel adalah 30 debris sel, apabila ditemukan lebih dari 30 debris sel dalam setiap jaringan luka pada maka hasil perhitungan dituliskan</p>	Rasio



			sesuai dengan nilai maksimal jumlah debris sel yaitu 30 debris sel	
PMN (Polimorfo nuklear)	Merupakan sel neutrofil yang mempunyai fungsi memfagosit sel mati, berwarna ungu gelap yang dikelilingi oleh plasma sel, berbentuk seperti tapal kuda (pada pengecatan HE)	Alat Ukur : Mikroskop Cahaya perbesaran 40x (dilihat secara subjektif, kemudian dihitung secara manual PMN yang ada dalam setiap preparat jaringan luka) Analisa menggunakan uji statistik one way ANOVA.	Didapat peningkatan PMN pada tikus dengan hiperglikemi seiring meningkatkn ya jumlah sel mati karena hiperglikemi.	Rasio

4.7. Proses Penelitian

4.7.1. Pembuatan Ekstrak Binahong

1. Proses pengeringan

Daun binahong diperoleh dari Sentra Medika, Batu sebagai lembaga penyedia bahan herbal pada bulan Juni 2013. Daun Binahong yang diambil adalah daun berwarna hijau muda sampai hijau tua. Daun binahong dicuci secara terpisah dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian daun sirih dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari di Sentra Medika, Batu. Setelah daun binahong kering dilakukan proses penghalusan menggunakan *Blender* sehingga menjadi bentuk serbuk.



Gambar 4.1a Daun Binahong yang telah dikeringkan



Gambar 4.1b Daun Binahong yang telah dihaluskan

2. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar ekstraksi Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya dan dilakukan oleh laboran yaitu

B. Ferida

- a. Serbuk daun binahong ditimbang sebanyak 500 gram
- b. Serbuk daun binahong 500 gram ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter
- c. Rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
- d. Campuran serbuk daun binahong dan etanol dikocok hingga tercampur
- e. Diamkan selama 24 jam hingga menguap

3. Proses Evaporasi

- a. Pengambilan lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif
- b. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter
- c. Pasang labu evaporasi pada evaporator
- d. Isi *Water Bath* dengan air sampai penuh

- e. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *Rotary Evaporator*, pemanas *Water Bath* (atur suhu pada 70°C – 80°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.
- f. Diamkan agar larutan etanol mendidih lalu memisah ke dalam labu penampung
- g. Tunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 jam hingga 2 jam)
- h. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol hasil ekstrak
- i. Simpan hasil ekstraksi ke dalam *Freezer* kulkas

4.7.2 Pembuatan Hidrogel Binahong

Proses hidrogel binahong mengikuti standar ekstraksi Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya dan dilakukan oleh laboran yaitu Ferrida, SP (staf Laboratorium Farmakologi FKUB). Langkah-langkah pembuatannya adalah basis hidrogel dan ekstrak daun Binahong disiapkan dengan jumlah yang dibutuhkan untuk pencampuran sesuai dengan konsentrasi yang ditetapkan (2,5%, 5% dan 7,5%). Kemudian basis hidrogel ditambahkan dengan ekstrak daun binahong dan diaduk hingga homogen dengan menggunakan cawan dan sendok pengaduk (Niswah Paju, 2013). Formula standar dasar hidrogel binahong yang digunakan menurut Sri Hastuti (2008) :

Basis hidrogel dicampurkan dengan ekstraksi murni binahong dan di hitung dengan rumus $V1 \times N1 = V2 \times N2$, sehingga didapatkan hasil :

1. Untuk pengambilan jaringan hari ke-12

a. Hidrogel binahong 2,5%

$$V1 \times 100\% (\text{ekstrak murni}) = 400 \text{ mg} \times 2,5\%$$

$V1 = 10/\text{hari}$ mg ekstrak binahong dan di campurkan dengan 390 mg basis hidrogel.

$$\text{Untuk 12 hari} = 10 \text{ mg} \times 12 = 120 \text{ mg/ekor}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 120 \text{ mg} \times 5 = 600 \text{ mg} \rightarrow \text{ekstrak binahong}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 390 \times 5 = 1.950 \text{ mg} \rightarrow \text{hidrogel}$$

b. Hidrogel binahong 5%

$$V1 \times 100\% (\text{ekstrak murni}) = 400 \text{ mg} \times 5\%$$

$V1 = 20 \text{ mg/hari}$ ekstrak binahong dan di campurkan dengan 380 mg basis hidrogel.

$$\text{Untuk 12 hari} = 20 \text{ mg} \times 12 = 240 \text{ mg/ekor}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 240 \text{ mg} \times 5 = 1.200 \text{ mg} \rightarrow \text{ekstrak binahong}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 380 \times 5 = 1.900 \text{ mg} \rightarrow \text{hidrogel}$$

c. Hidrogel binahong 7,5%

$$V1 \times 100\% (\text{ekstrak murni}) = 400 \text{ mg} \times 7,5\%$$

$V1 = 30 \text{ g}$ ekstrak binahong dan di campurkan dengan 370 mg basis hidrogel.

$$\text{Untuk 12 hari} = 30 \text{ mg} \times 12 = 360 \text{ mg/ekor}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 360 \text{ mg} \times 5 = 1.800 \text{ mg} \rightarrow \text{ekstrak binahong}$$

$$5 \text{ ekor tikus} = 370 \text{ mg} \times 5 = 1.850 \text{ mg} \rightarrow \text{hidrogel}$$

$$\text{Total Hidrogel} = 4.560 \text{ mg}$$

$$\text{Total Ekstrak Binahong} :$$

2,5 %	= 120 mg	}	720 mg
5 %	= 240 mg		
7,5 %	= 360 mg		

Total Hidrogel dalam Ekstrak Binahong :

2,5 %	= 2.750 mg	}	9.500 mg
5 %	= 3.100 mg		
7,5 %	= 3.650 mg		

4.7.3 Pembuatan Tikus Kondisi Hiperglikemi

1. Timbang berat badan tikus
2. Mengukur kadar glukosa dengan menggunakan glukometer
3. Larutkan STZ pada buffer sitrat 0.2 ml dalam 10 mmol sehingga pH larutan menjadi 4.5
4. Menyuntikkan STZ pada tikus secara intraperitoneal dosis 50mg/kgBB
5. Tiga hari kemudian tiga dilakukan pengukuran kadar glukosa darah ekor dengan glucometer (Agus Yuwono, *et al* 2011). Tikus yang menjadi hiperglikemia (>126 mg/dL) akan digunakan dalam penelitian .

4.7.4 Pembuatan Luka Hiperglikemia

Lakukan cek kadar gula darah sebelum dilakukan pembuatan luka. Dilakukan pembuatan luka hiperglikemia jika kadar gula darah puasa mencapai > 126 mg/dL diukur dengan glukometer

1. Tandai daerah yang akan dibuat luka dengan ukuran 2 x 1 cm dengan kedalaman < 2 mm
2. Lakukan pencukuran dengan menggunakan *Mesh* pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5 x 3 cm
3. Anastesi umum pada hewan coba dengan *Ketamine Hydrochloride* 1 ml (120 mg/Kg) secara Intraperitoneal.
4. Masukkan hewan coba pada kandang dan tunggu selama 5 menit hingga hewan coba hilang kesadaran
5. Kemudian disinfeksi menggunakan Povidon Iodine dibagian yang akan dilukai
6. Cubit bagian kulit dengan pinset kemudian eksisi bagian kulit yang sudah ditandai menggunakan gunting bedah
7. Setelah luka dibuat lakukan perawatan luka dengan prosedur yang sudah ditentukan
8. Masukkan tikus ke dalam kandang dan biarkan kesadarannya kembali.



Gambar 4.2. Model Luka Eksisi pada Tikus Galur Wistar (Zuber and Anusha, 2013)

4.7.5. Pembagian Kelompok Tikus

Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok, dua kelompok kontrol, dan 4 kelompok dan dilakukan pembedahan hari ke-12. Kelompok kontrol negatif yaitu menggunakan perawatan luka tikus sehat menggunakan NS. Kelompok kontrol positif yaitu perawatan luka hiperglikemi dengan terapi NS. Kelompok perlakuan 1 menggunakan basis hidrogel, kelompok perlakuan 2 menggunakan kombinasi hidrogel binahong 2,5%, kelompok perlakuan 3 menggunakan kombinasi hidrogel binahong 5%, kelompok perlakuan 4 menggunakan kombinasi hidrogel binahong 7,5%.

4.7.6. Perawatan Luka

Perawatan luka dilakukan satu kali sehari setiap jam 12.00 WIB. Luka pada semua kelompok dibersihkan terlebih dahulu dengan lalu diberikan perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok I (kontrol negatif) luka tikus sehat dirawat dengan NS
- b. Kelompok II (kontrol positif) luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan NS
- c. Kelompok III luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel
- d. Kelompok IV luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 2,5%
- e. Kelompok V luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 5%
- f. Kelompok VI luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 7,5%

Prosedur yang dilakukan yaitu :

1. Persiapan alat :
 - a. Semua peralatan yang diperlukan disiapkan
 - 1) *Underpad*
 - 2) Bak steril yang berisi kom, pinset anatomis dan sirurgis, gunting anatomis dan nekrotomi, kassa husada ukuran 2x3 cm dan 5x5 cm, lidi kapas.
 - 3) Bengkok
 - 4) Tempat sampah
 - b. Cuci tangan
2. Perawatan luka (dengan prinsip steril)
 - a. Pakai sarung tangan
 - b. Buka balutan
 - c. Perawatan :
 - 1) Kelompok 1 (Kelompok perlakuan tikus sehat dengan perawatan menggunakan kassa husada yang dibasahi dengan normal salin 0,9%)
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).
 - c) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.

- d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
- e) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Model Balutan Gurita

- 2) Kelompok 2 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemi dengan perawatan menggunakan kassa husada yang dibasahi dengan normal salin 0,9%)
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).
 - c) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - e) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.3.

3) Kelompok 3 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemi dengan perawatan menggunakan hidrogel yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa husada yang dibasahi normal salin 0,9%)

a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.

b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).

c) Oleskan hidrogel sebanyak 10 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.

d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.

e) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.

f) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.4.

4) Kelompok 4 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemi dengan perawatan menggunakan hidrogel binahong dosis 2,5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa husada yang dibasahi normal salin 0,9%)

a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.

- b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).
 - c) Oleskan hidrogel dan ekstrak binahong dosis 2,5% sebanyak 10 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.4.
- 5) Kelompok 5 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemi dengan perawatan menggunakan hidrogel binahong dosis 5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa husada yang dibasahi normal salin 0,9%)
- a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).
 - c) Oleskan hidrogel binahong dosis 5% sebanyak 20 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.

- e) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.3.
- 6) Kelompok 6 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemi dengan perawatan menggunakan hidrogel binahong dosis 7,5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa husada yang dibasahi normal salin 0,9%)
- a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal salin 0,9%.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa husada (kassa steril).
 - c) Oleskan hidrogel binahong dosis 7,5% sebanyak 30 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa husada (kassa steril ukuran 5x5 cm) yang telah di basahi dengan normal salin 0,9% pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa gulung n ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi yang dapat dilihat pada gambar 4.3.

- g) Bersihkan peralatan dan rendam menggunakan saflon 20 ml dalam 1 liter air selama 1 jam
- h) Lepaskan sarung tangan
- i) Cuci tangan
- j) Perawatan luka dilakukan setiap 24 jam sekali di Laboratorium Farmakologi FKUB.

4.7.7 Prosedur Pemeliharaan Tikus

1. Penandaan tikus

Untuk menghindari kesalahan dalam penilaian penyembuhan luka pada tikus, maka masing-masing tikus diberi penandaan dengan memberikan nomor pada kandang tikus berdasarkan kelompok pengambilan jaringan kulit hari ke-12 yakni K1 (1-4) untuk luka tikus sehat dirawat dengan NS, K2 (1-4) untuk luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan NS, P1 (1-4) untuk luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel, P2 (1-4) luka kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 2,5%, P3 (1-4) luka kondisi hiperglikemia dirawat hidrogel binahong 5%, P4 (1-4) luka kondisi hiperglikemia dirawat hidrogel binahong 7,5%.

2. Tempat perawatan tikus

Kandang tempat perawatan tikus cukup kuat dan tidak mudah rusak. Masing-masing tikus percobaan dibuatkan kandang tersendiri karena bila terlalu berdesakan menyebabkan suhu badan meningkat di atas normal dan

dapat mengurangi kenyamanan. Kandang tikus dilengkapi dengan penutup kandang dari anyaman kawat dan botol air.



Gambar 4.4 Kandang Tikus di Laboratorium Farmakologi FKUB (2013)

3. Nutrisi tikus

Tikus diberikan makanan dan air minum yang sama di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Makanan tikus sebanyak 30 gram/hari. Komposisi makanan yang diberikan kepada tikus adalah makanan ayam beras (campuran jagung, katul, pollard, DDGS, repressed, copra meal, biji batu, CPO, vitamin dan mineral) dan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1. Minuman tikus adalah air biasa (air kran) yang ditambah dengan 1 sendok makan air gula dalam botol sebanyak 20-45 ml/hari.

4. Perlakuan pada tikus setelah penelitian selesai dilakukan

Setelah penelitian selesai dilakukan, tikus diterminasi (euthanasia) dengan cara dimasukkan dalam toples yang berisi kapas yang mengandung eter, kemudian toples ditutup. Setelah tikus mati, jaringan luka diambil dan dimasukkan kedalam formalin untuk persiapan pengecatan H&E dan imunohistokimia. Kemudian tikus dikubur secara layak.

4.7.8 Eksisi Jaringan Luka dan Pembuatan Preparat Jaringan

1. Tikus dikorbankan pada hari ke 3 dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup yang mengandung zat eter.
2. Tikus dikorbankan pada hari ke 12 dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup yang mengandung zat eter.
3. Jaringan luka mencapai batas lapisan otot dieksisi menggunakan pisau bedah sampai 5-10 mm batas kulit normal.
4. Jaringan direndam dalam larutan fiksatif formalin 10% lalu dimasukkan ke dalam larutan etanol 70% selama 24 jam
5. Memindahkan jaringan tersebut ke dalam larutan etanol 80% selama 2 jam; larutan etanol 90% selama 20 menit; larutan etanol 95% selama 20 menit; dan larutan ethanol absolut selama 20 menit, dengan 3 kali perlakuan.
6. Memindahkan jaringan luka pada larutan xilol 1 dan 2 masing-masing selama 20 menit. Dilanjutkan pada larutan xilol 3 pada suhu 60-63°C selama 30 menit.
7. Mencelupkan jaringan luka pada parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah.
8. Menunggu sampai memadat dimana jaringan luka berada dalam blok paraffin (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2012).

4.7.9 Pewarnaan Hematoksilin-eosin.

1. Memasukkan spesimen kedalam hematoksilin selama 5 menit.
2. Membilas dengan air.

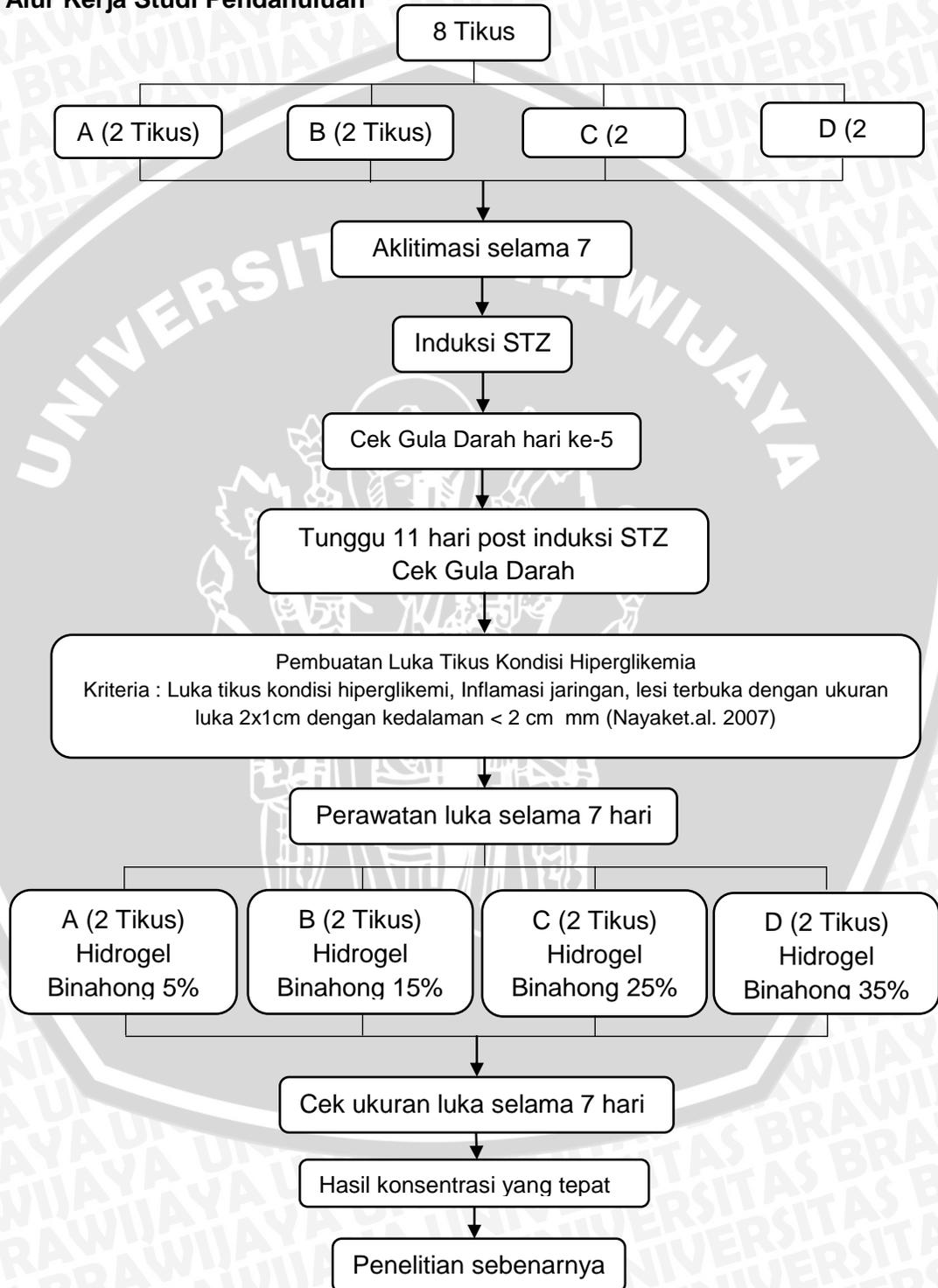
3. Memasukkan kedalam alkohol 1% selama beberapa detik.
4. Membilas dengan air.
5. Memasukkan kedalam eosin selama 5 menit.
6. Membilas dengan air.
7. Dikeringkan.
8. Dilihat menggunakan Mikroskop cahaya binokuler perbesaran 40x dan Olivia

4.7.9 Pengukuran Indeks Nekrosis

Pada penelitian ini pengukuran indeks nekrosis menggunakan 3 indikator yaitu penurunan sel debris dan PMN serta peningkatan plasma sel karena untuk mengukur secara langsung nekrosis atau kematian sel sangat sulit karena pada sel mengalami nekrosis akan langsung difagosit oleh makrofag.

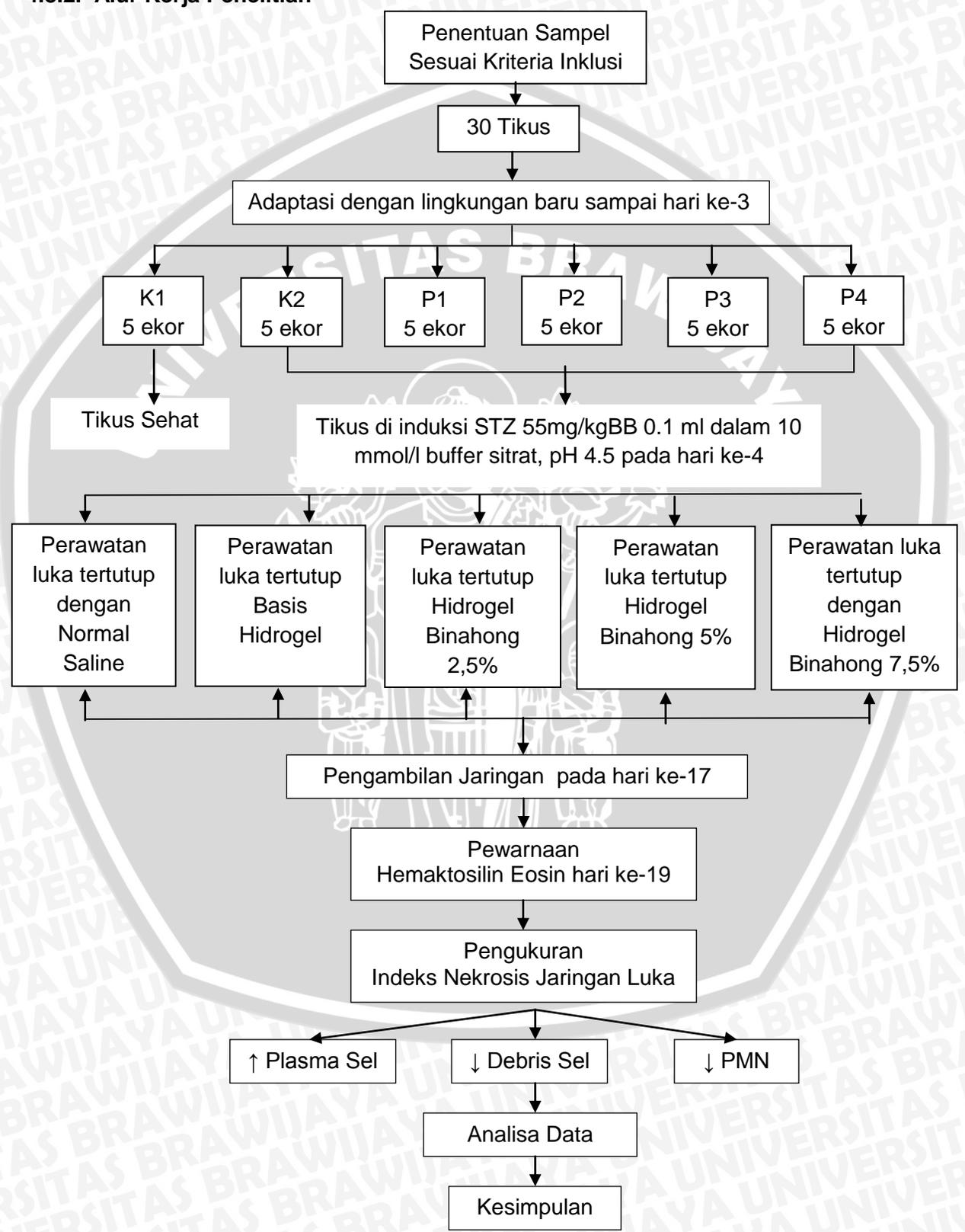
4.8. Alur Kerja

4.8.1. Alur Kerja Studi Pendahuluan



Gambar 4.5. Alur Kerja Studi Pendahuluan

4.8.2. Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.6 Alur Kerja Penelitian

4.9. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah parametric test, yaitu *One-way-analysis of variance* (ANOVA) dengan menggunakan selang kepercayaan 95% dan diolah dengan menggunakan program SPSS 20.0 for Windows. Sebelum melakukan analisis data menggunakan *one way ANOVA*, diperlukan pemenuhan atas beberapa asumsi data, yaitu data harus mempunyai distribusi normal, ragam yang homogen, error percobaan bersifat acak dan bebas. Distribusi normal merupakan distribusi teoritis dari variabel random yang kontinyu (Dajan, 1995). Kurva yang menggambarkan distribusi normal adalah kurva yang berbentuk simetris. Untuk menguji apakah sampel penelitian merupakan jenis distribusi normal digunakan pengujian *Kolmogorov-Smirnov* terhadap masing-masing variabel. Pada uji *Kolmogorov-Smirnov*, suatu data dikatakan memiliki sebaran distribusi normal jika nilai p (value) $> 0,05$. Apabila p (value) $< 0,05$, maka data tidak berdistribusi normal (Dahlan, 2004). Setelah didapatkan distribusi normal, kemudian dilakukan pengujian homogenitas dengan uji *levene statistic*. Data homogen atau memiliki varian yang normal apabila p (value) $> 0,05$ (Dahlan, 2004). Kemudian dilanjutkan dengan pengujian *one way ANOVA*. Setelah itu, dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* (HSD) untuk mengetahui adanya perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok. Untuk uji ANOVA dan *Post Hoc Test*, p (value) bermakna apabila $< 0,05$ dan tidak bermakna apabila p (value) $> 0,05$.