

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah *true experiment* (eksperimental murni) untuk mengetahui perbandingan antara efektifitas balutan luka menggunakan terapi standar konvensional dengan balutan modern hidrogel binahong. Penelitian eksperimental ini menggunakan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design* dimana setiap hewan coba memiliki probabilitas yang sama untuk mendapatkan perlakuan, sehingga dapat menjaga validitas generalisasi ke populasi. Pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai (Nursalam, 2008).

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 puasa > 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

Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling* (Nursalam, 2008). Selanjutnya jumlah tikus dihitung dengan rumus:

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

Keterangan :
n = jumlah sampel tiap perlakuan
P = jumlah perlakuan
15 = sebagai jumlah sampel minimal yang dibutuhkan dalam penelitian *true-experiment*.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 6 yang dibedah pada hari ke-12, sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

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

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

$$n-1 \geq 2,5$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4 \text{ (pembulatan)}$$

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah *normal saline*, basis hidrogel, hidrogel binahong 2,5%, hidrogel binahong 5%, dan hidrogel binahong 7,5%. (Setiap dilakukan perawatan luka, sebelumnya telah dibersihkan dengan *normal saline*).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah makrofag pada lapisan dermis kulit tikus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Hidrogel 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 Alat dan Bahan Pembuatan Tikus dengan Kondisi Hiperglikemia

Tikus sebagai hewan model dapat terjadi secara spontan atau dari hasil induksi eksperimental. Cara membuat diabetes 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 (Elsner, *et al.*, 2000).

Alat dan Bahan :

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

4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Luka

Alat dan bahan untuk pembuatan luka pada kondisi hiperglikemia adalah bak steril (berisi sarung tangan), spuit, 2 buah pinset anatomis, 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 Alat dan Bahan Perawatan Luka

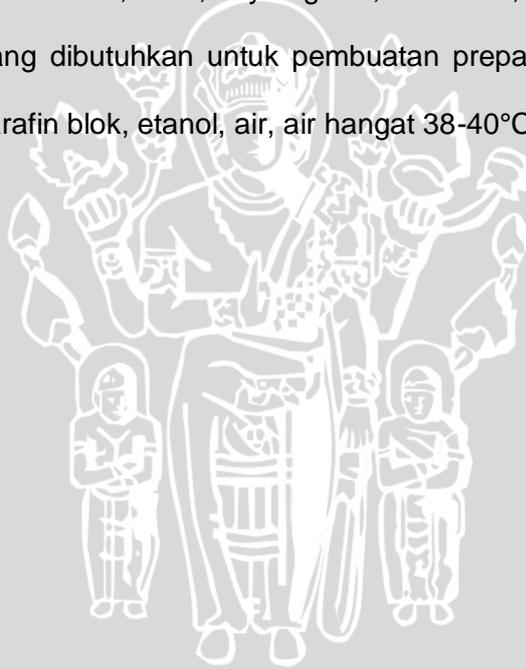
Alat yang digunakan untuk melakukan perawatan luka pada hewan coba adalah 1 set perawatan luka steril, sarung tangan steril, kassa steril, bengkok, perlak, pinset anatomis steril, pinset anatomis bersih, deeper / kapas, plester, gunting, NS, kom, basis hidrogel, dan hidrogel Binahong 2,5%, 5% dan 7,5%.

4.5.5 Alat dan Bahan 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.

4.5.6 Alat dan Bahan Embeding 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.



4.6 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Parameter	Skala Ukur
Jumlah Makrofag	<p>Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Pada potongan melintang di jaringan dermis, interpretasi hasil pengamatan banyaknya sel yang berbentuk gelendong, memiliki inti satu atau lebih berukuran 10-30 μm, inti lonjong atau bentuk ginjal, mengandung granula azurofilik, dan tercat ungu pada pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> pada saat dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop Olympus XC10 yang dilengkapi kamera digital dengan perbesaran 400 kali dengan 5 kali lapang pandang, Gambaran yang diperoleh dalam pengamatan di bawah mikroskop didokumentasikan. Hasil dokumentasi dari pengamatan di bawah mikroskop dihitung secara manual menggunakan <i>Corel Photo Paint 12</i> untuk melihat rata-rata derajat warna keunguan yang di deteksi dari pengamatan dengan pembesaran yang sama untuk menjaga keakuratan hasil</p>	Jumlah sel	Rasio

<p>Ekstrak Binahong dicampurkan dengan hidrogel</p>	<p>Bahan perawatan luka kondisi hiperglikemia dari daun binahong yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 95% kemudian dicampurkan dengan basis hidrogel dan dibuat dosis 2,5%, 5% dan 7,5% di hitung dengan rumus:</p> $V1 \times N1 = V2 \times N2$ <p>di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.</p>	<p>%</p>	<p>Rasio</p>
<p>Pembuatan luka kondisi hiperglikemia</p>	<p>Tikus diinjeksi intraperitoneal <i>Streptozotocin</i> (STZ 55 mg/kgBB dilarutkan 0,1 ml dalam 10 mmol/l buffer sitrat, pH 4.5). Glukosa diukur 3 hari setelah injeksi. Dianggap hiperglikemia jika konsentrasi glukosa darah mencapai > 126 mg/dL.</p> <p>Pembuatan luka dilakukan pada hari ke-11 setelah induksi STZ. Tikus dicukur di bagian punggung kemudian dibius dengan <i>ketamin hydrochloride</i> 1 ml (120 mg/kg) dan dilukai menggunakan gunting dan mesh dengan ukuran 2x1cm² dan kedalaman hingga lapisan subcutan</p>	<p>cm²</p>	<p>Rasio</p>
<p>Perawatan luka pada tikus kondisi hiperglikemia dengan hidrogel</p>	<p>Proses membersihkan area luka terlebih dahulu dengan NS lalu diberi hidrogel binahong secara topikal sebanyak 3 mg dengan</p>	<p>mg</p>	<p>Rasio</p>

binahong	dosis 2,5%, 5%, dan 7,5% pada masing-masing perlakuan dan ditutup dengan menggunakan balutan kassa steril yang dibasahi dengan NS setelah itu diikat menggunakan kassa panjang dengan model gurita bayi. Balutan dibuka pada hari berikutnya (24 jam) untuk dilakukan perawatan luka kembali.		
Perawatan luka pada tikus kondisi sehat dan luka pada tikus kondisi hiperglikemia dengan <i>normal saline</i> .	Proses membersihkan area luka kelompok kontrol dengan NS sesuai dengan perawatan luka yang dilakukan di klinik kemudian dibalut menggunakan kassa steril yang telah dibasahi dengan NS lalu diikat menggunakan kassa panjang dengan model gurita.	cc	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Pembuatan Hidrogel 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 binahong dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari di Matera Medika, Batu. Setelah daun

binahong kering dilakukan proses penghalusan menggunakan *blender* sehingga menjadi bentuk serbuk.



Gambar 4.1 Daun binahong yang telah dikeringkan



Gambar 4.2 Daun binahong yang telah dihaluskan

2. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar ekstraksi dan dilakukan oleh staf Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran (Ferrida, SP):

- 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*.
4. Proses Pembuatan Hidrogel Binahong
- a. Persiapkan hidrogel dengan jumlah sesuai konsentrasi yang dibutuhkan untuk pencampuran.
 - b. Persiapkan ekstrak daun binahong.
 - c. Hidrogel ditambahkan dengan ekstrak daun binahong dan diaduk hingga homogen dengan menggunakan cawan dan sendok pengaduk.
 - d. Sediaan hidrogel yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi 2,5%; 5%; 7,5% dan dibuat sebanyak 5.700 mg dan ekstrak daun binahong sebanyak 3.600 mg.
 - e. Formula standar dasar hidrogel binahong yang digunakan menurut Astuti (2011) :

Basis hidrogel dicampurkan dengan ekstraksi murni binahong dan dihitung dengan rumus $V1 \times N1 = V2 \times N2$.

Untuk pembedahan hari ke-12:

a. Hidrogel binahong 2,5%

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

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

Untuk 13 hari 5 ekor tikus:

$$\text{Ekstrak binahong} = 10 \text{ mg} \times 12 \text{ hari} \times 5 \text{ ekor tikus} = 600 \text{ mg}$$

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

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.

Untuk 13 hari 5 ekor tikus:

$$\text{Ekstrak binahong} = 20 \text{ mg} \times 12 \text{ hari} \times 5 \text{ ekor tikus} = 1.200 \text{ mg}$$

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

c. Hidrogel binahong 7,5%

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

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

Untuk 13 hari 5 ekor tikus:

$$\text{Ekstrak binahong} = 30 \text{ mg} \times 12 \text{ hari} \times 5 \text{ ekor tikus} = 1.800 \text{ mg}$$

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

4.7.2 Prosedur Pembuatan Tikus Kondisi Hiperglikemia

1. Timbang berat badan tikus.
2. Mengukur kadar glukosa dengan menggunakan glukometer.
3. Larutkan STZ pada buffer sitrat 0.1 ml dalam 10 mmol sehingga pH larutan menjadi 4,5.
4. Menyuntikkan STZ pada tikus secara intraperitoneal dosis 55mg/kgBB.
5. Lima hari kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah menggunakan glukometer dengan cara mengambil darah dari ujung ekor tikus. Tikus yang menjadi hiperglikemia (> 126 mg/dl) akan digunakan dalam penelitian (Agus Yuwono *et al.*, 2011).

4.7.3 Prosedur Pembuatan Luka pada Kondisi Hiperglikemia

1. Lakukan cek kadar gula darah sebelum dilakukan pembuatan luka. Dilakukan pembuatan luka kondisi hiperglikemia jika kadar gula darah puasa mencapai > 126 mg/dL diukur dengan glukometer.
2. Tandai daerah yang akan dibuat luka dengan ukuran 2x1 cm² dengan kedalaman subcutan $< 0,2$ cm.
3. Lakukan pencukuran dengan menggunakan *Mesh* pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5 x 3 cm.
4. Anastesi umum pada hewan coba dengan *ketamine hydrochloride* 1 ml (120 mg/kg) secara intraperitoneal.
5. Masukkan hewan coba pada kandang dan tunggu selama 5 menit hingga hewan coba hilang kesadaran.
6. Kemudian bagian yang akan dilukai di disinfektan menggunakan *povidon iodine*.

7. Cubit bagian kulit dengan pinset kemudian eksisi bagian kulit yang sudah ditandai menggunakan gunting bedah.
8. Setelah luka dibuat lakukan perawatan luka dengan prosedur yang sudah ditentukan.
9. Masukkan tikus ke dalam kandang dan biarkan kesadarannya kembali



Gambar 4.3 Model Luka Eksisi pada Tikus Galur Wistar

4.7.4 Prosedur Pembagian Kelompok Tikus

Pada penelitian ini terdapat 8 kelompok, dua kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan dilakukan pembedahan pada hari ke-12. Kelompok kontrol ke-1 yaitu menggunakan perawatan luka tikus sehat menggunakan *normal saline*. Kelompok kontrol ke-2 yaitu perawatan luka pada kondisi hiperglikemia dengan terapi *normal saline*. Pada kelompok perlakuan ke-1 menggunakan basis hidrogel, kelompok perlakuan ke-2 menggunakan hidrogel binahong 2,5%, kelompok perlakuan ke-3 dengan hidrogel binahong 5%, dan kelompok perlakuan ke-4 dengan hidrogel binahong 7,5%.

4.7.5 Prosedur Perawatan Luka

1. Persiapan alat :

a. Semua peralatan yang diperlukan disiapkan

- 1) Perlak.
- 2) Bak steril yang berisi kom, pinset anatomis dan cirurgis, gunting anatomis dan nekrotomi, kassa steril 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 K1 (Kelompok perlakuan tikus kondisi sehat dengan perawatan menggunakan kassa yang dibasahi dengan *normal saline*)
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - d) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Balut luka dengan kassa ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).

- 2) Kelompok K2 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemia dengan perawatan menggunakan kassa yang dibasahi dengan *normal saline*).
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - d) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Balut luka dengan kassa bersih ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).
- 3) Kelompok P1 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemia dengan perawatan menggunakan hidrogel yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa steril yang dibasahi *normal saline*).
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Oleskan hidrogel sebanyak 3 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa bersih ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).

- 4) Kelompok P2 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemia dengan perawatan menggunakan kombinasi hidrogel dan ekstrak binahong (hidrogel binahong) dosis 2,5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa steril yang dibasahi *normal saline*).
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Oleskan hidrogel binahong dosis 2,5% sebanyak 3 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa bersih ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).
- 5) Kelompok P3 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemia dengan perawatan menggunakan kombinasi hidrogel dan ekstrak binahong (hidrogel binahong) dosis 5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa steril yang dibasahi *normal saline*).
 - a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Oleskan hidrogel binahong dosis 5% sebanyak 3 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.

- d) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa gulung dengan ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).
- 6) Kelompok P4 (Kelompok perlakuan tikus kondisi hiperglikemia dengan perawatan menggunakan kombinasi hidrogel dan ekstrak binahong dosis 7,5% yang dioleskan pada area luka dan ditutup dengan kassa steril yang dibasahi *normal saline*).
- a) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan *normal saline*.
 - b) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa steril.
 - c) Oleskan hidrogel binahong dosis 7,5% sebanyak 3 mg pada area luka dengan menggunakan lidi kapas steril.
 - d) Tempelkan kassa steril ukuran 2x3 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - e) Tempelkan kassa steril ukuran 5x5 cm yang telah di basahi dengan *normal saline* pada area luka.
 - f) Balut luka dengan kassa bersih ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi (gambar 4.4).
3. Bersihkan peralatan dan rendam menggunakan saflon 20 ml dalam 1 liter air selama 1 jam.
 4. Lepaskan sarung tangan
 5. Cuci tangan

6. Perawatan luka dilakukan setiap 24 jam sekali di Laboratorium Farmakologi FKUB



Gambar 4.4 Bentuk Balutan Luka dengan Model Gurita

4.7.6 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 yakni A (1-5) untuk luka tikus kondisi sehat dirawat dengan *normal saline*, B (1-5) untuk luka tikus kondisi hiperglikemia dirawat dengan *normal saline*, C (1-5) untuk luka tikus kondisi hiperglikemia dirawat dengan basis hidrogel, D (1-5) untuk luka tikus kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 2,5%, E (1-5) untuk luka tikus kondisi hiperglikemia dirawat dengan hidrogel binahong 5%, F (1-5) untuk luka tikus kondisi hiperglikemia dirawat dengan 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 4.5 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 untuk mempertahankan tikus dalam kondisi hiperglikemia.

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 *Hematoxylin Eosin*. Kemudian tikus dikubur secara layak di halaman samping laboratorium farmakologi .

4.7.7 Prosedur Eksisi Jaringan Luka dan Pembuatan Preparat Jaringan

1. Tikus dikorbankan pada hari ke-12 dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup yang mengandung zat eter.
2. Jaringan luka mencapai batas lapisan otot dieksisi menggunakan pisau bedah sampai 5-10 mm batas kulit normal.
3. Jaringan direndam dalam larutan fiksatif formalin 10% lalu dimasukkan ke dalam larutan etanol 70% selama 24 jam
4. 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.
5. 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.
6. Mencilupkan jaringan luka pada parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah.

7. Menunggu sampai memadat dimana jaringan luka berada dalam blok paraffin (Sumber: Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2012).

4.7.8 Pewarnaan dengan Metode *Hematoxylin Eosin*

A. Proses Pematangan Jaringan Berupa Makros

1. Gross hasil bedah dimasukkan 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 kekaset 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.

B. Proses 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

C. 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 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol 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.

D. Proses Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

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

E. Dehidrasi

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

F. Penjernihan (*Clearing*) :

- Xylol 60 menit

G. *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

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

4.8 Prosedur Pengumpulan Data

4.8.1 Teknik Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini digunakan teknik observasi eksperimen dimana sampel dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 4 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol yang dilakukan perawatan setiap hari sampai hari ke-12. Pengamatan dan pengukuran jumlah makrofag dilakukan sesudah pemberian perlakuan pada hari ke-12 baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

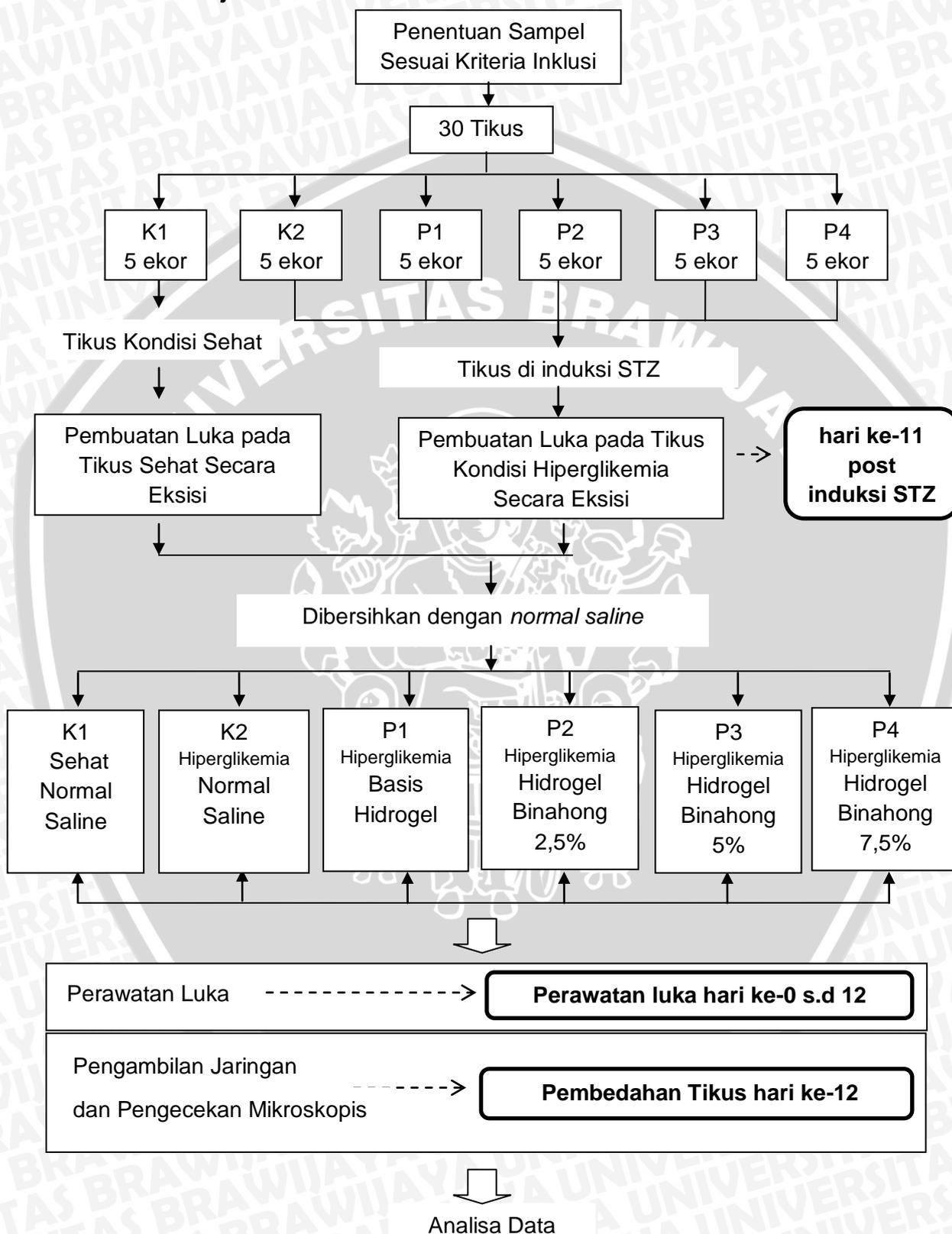
4.8.2 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dengan menghitung jumlah makrofag menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 dengan perbesaran 400 kali yang dilengkapi kamera digital dan didokumentasikan dengan mengambil 5 lapang pandang dan dianalisa menggunakan software Olyvia dimana setiap sediaan diperiksa pada luas pandang 5 area kemudian dirata-rata. Hasil dokumentasi dari pengamatan di bawah mikroskop dihitung secara manual menggunakan *Corel Photo Paint 12* disetiap lapang pandang kemudian dirata-rata.

4.8.3 Identifikasi Makrofag

Proses identifikasi makrofag dilakukan pada hari ke-12 setelah luka dibersihkan. Makrofag pada dinding endotel aorta merupakan sel yang berbentuk gelendong, memiliki inti satu atau lebih berukuran 10-30 μm , inti lonjong atau bentuk ginjal, mengandung granula azurofilikn dan tercatat ungu pada pewarnaan *Hematoxylin Eosin* pada saat dilakukan pengamatan.

4.8.4 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.6 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisa Data

4.9.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Dari hasil analisa terhadap jumlah makrofag luka tikus putih kondisi hiperglikemia pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan kemudian dilakukan uji asumsi statistik *SPSS version 17.00 for windows* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan statistik uji *Shapiro-Wilk* dengan $\alpha = 0,05$. Jika data menunjukkan p value $> 0,05$, maka data terdistribusi normal. Kemudian pada uji homogenitas/keragaman data menggunakan *test of homogeneity of variances*, jika nilai F hasil $<$ nilai F tabel, maka data adalah homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One Way ANOVA* (Santoso, 2007).

4.9.2 Uji One Way ANOVA

Analisis data yang digunakan adalah test parametrik, yaitu *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan menggunakan selang kepercayaan 95% dan diolah dengan menggunakan program *SPSS version 17.00 for windows* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi $< \alpha$ (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah makrofag pada luka tikus kondisi hiperglikemia antar kelompok (Santoso, 2007).

4.9.3 Uji Perbandingan Berganda (Metode Tukey)

Uji perbandingan berganda atau *Post Hoc Test* digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang paling signifikan di antara kelompok-kelompok uji coba. Nilai signifikansi antar kelompok yang paling

bermakna adalah yang memiliki nilai signifikansi paling kecil, p (value) bermakna apabila $< 0,05$ dan tidak bermakna apabila p (value) $> 0,05$.

