

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode *randomized posttest only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yang dipilih menggunakan teknik acak. Pada kelompok-kelompok tersebut tidak diawali dengan pra-tes. Pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai (Nursalam, 2003).

#### 4.2 Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar. Tikus termasuk hewan mamalia dan memiliki metabolisme tubuh yang mirip dengan manusia. Tikus merupakan hewan laboratorium yang banyak digunakan dalam penelitian dan percobaan antara lain untuk mempelajari pengaruh obat-obatan, toksisitas, metabolisme, embriologi maupun dalam mempelajari tingkah laku (Hendriyani, 2003). Untuk menghindari faktor perancu maka perlu ditentukan kriteria inklusi dan menghomogenkan sampel.

##### 4.2.1 Kriteria Inklusi

Sampel yang digunakan adalah sampel yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Umur tikus 2,5 – 3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan ini cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.

- b. Berat badan tikus antara 150-200 gram.
- c. Jenis kelamin jantan, untuk menghindari kerancuan hasil penelitian dikarenakan pengaruh hormon estrogen dan progesteron yang dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka dan mempercepat proses inflamasi (Routley *et al*, 2009).
- d. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif; bulu bersih; mata jernih; tidak ada luka, tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga; tidak terlalu banyak ludah; tidak diare; dan pernapasan tenang.
- e. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya atau perlakuan sebelumnya.

#### 4.2.2 Homogenitas Sampel

Untuk menjaga *homogenitas* sampel maka *variable* kendali yang ditambahkan adalah sebagai berikut:

- a. Induksi luka bakar derajat 2B pada hewan coba dilakukan dengan cara dan waktu yang sama.
- b. Makanan tikus sama yaitu makanan yang disediakan oleh laboratorium farmakologi setiap hari 12-20 gram/hari.
- c. Minuman tikus sama yaitu air yang diisi dalam botol sebanyak 20-45 ml/hari.
- d. Bentuk kandang dibuat sama, segi empat dengan luas  $\pm 900 \text{ cm}^2$ , dilapisi sekam yang diganti ketika sudah nampak kotor.
- e. Luas luka bakar sama yaitu  $\pm 4 \text{ cm}^2$ .

### 4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel dan Penentuan Jumlah Sampel

Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling* agar setiap anggota kelompok memiliki peluang yang sama untuk dijadikan subyek penelitian serta sebagai salah satu syarat terlaksananya jenis penelitian *True Eksperimental* (Nursalam, 2003). Sampel dalam penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu 3 kelompok dengan pemberian normal saline 0,9%, *silver sulfadiazine* 1%, dan basis vaselin serta 3 kelompok dengan pemberian ekstrak daun dewa dengan dosis 2,5%, 5%, 10%. Perhitungan jumlah sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut (Alimul, 2009)

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

Keterangan:

$r$  = jumlah sampel tiap kelompok

$t$  = jumlah perlakuan

15 = sebagai jumlah sampel minimal yang dibutuhkan dalam penelitian *true-experiment*.

Dalam penelitian ini diketahui 6 perlakuan ( $t$ ) = 6, maka didapat nilai  $r$  sebagai berikut:

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

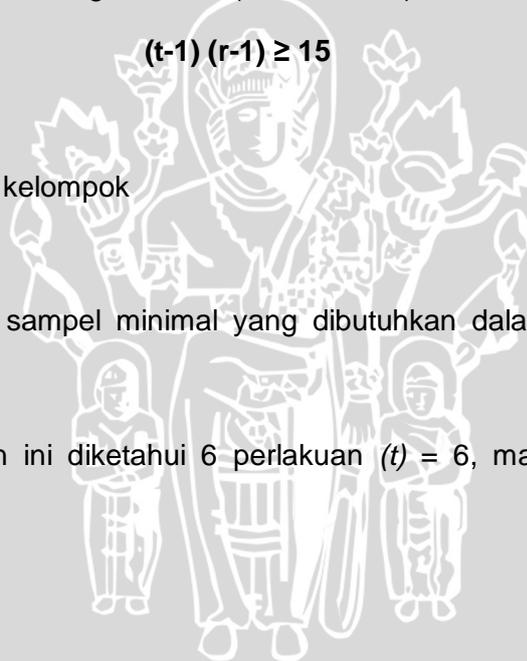
$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$r-1 \geq 3$$

$$r-1 \geq 4$$

$$r \geq 4$$



Jadi jumlah minimal sampel yang dibutuhkan setiap kelompok adalah 4 ekor, sehingga total sampel yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 24 ekor tikus.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas (*Variabel Independent*)**

Perawatan luka bakar derajat 2B dengan ekstrak daun dewa.

#### **4.3.2 Variabel Terikat (*Variabel Dependent*)**

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah makrofag luka bakar derajat 2B.

### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Farmakologi dan laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama 5 hari.

### **4.5 Alat Bahan dan Prosedur Penelitian**

#### **4.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun Dewa**

Ekstrak daun dewa dibuat dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Proses ekstraksi daun dewa bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa dari campuran bahan-bahan lain dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang larut air dan dibuat dengan evaporator sehingga didapatkan senyawa yang diinginkan.

#### **1. Alat dan Bahan**

Oven (1 buah), timbangan (1 buah), gelas erlenmeyer (2 buah), corong gelas (1 buah), kertas saring (1 buah), labu evaporator (1 buah), labu

penampung etanol (1 buah), evaporator (1 buah), pendingin spiral (1 buah), selang water pump (1 buah), vacuum pump (1 buah), water bath (secukupnya), daun dewa (secukupnya), etanol 96% (secukupnya), aquades (secukupnya), botol hasil ekstrak (secukupnya).

## 2. Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Dewa

### a. Proses Pengeringan

Daun dewa diperoleh dari Balai Materia Medika Batu. Daun dewa yang diambil adalah daun berwarna hijau muda sampai hijau tua. Daun dewa dicuci secara terpisah dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian daun dewa dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari atau dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80°C. Setelah daun dewa kering dilakukan proses penghalusan menggunakan blender sehingga menjadi bentuk serbuk.

### b. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang dan dilakukan oleh laboran Laboratorium Farmakologi yang sudah berkompeten.

- 1) Serbuk daun dewa ditimbang sebanyak 100 gram.
- 2) Masukkan 100 gram serbuk ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 3) Rendam dengan etanol sampai volume 1000 mL.
- 4) Kocok sampai benar-benar tercampur.
- 5) Diamkan 1 malam sampai mengendap.

### c. Proses Evaporasi

- 1) Ambil lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).

- 2) Masukkan dalam labu evaporasi ukuran 1 liter.
- 3) Pasang labu evaporasi pada evaporator.
- 4) Isi water bath dengan air sampai penuh.
- 5) Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur suhu pada 70°C - 80°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.
- 6) Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
- 7) Tunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk satu labu).
- 8) Hasil yang diperoleh kira-kira sepertiga dari bahan alam kering
- 9) Masukkan hasil ekstraksi dalam botol hasil ekstrak.

### 3. Pencampuran Vaseline dengan Ekstrak Daun Dewa

Ekstrak daun dewa yang ada kemudian akan dibedakan menjadi 3 dosis konsentrasi antara lain 2,5%, 5%, dan 10% (Anjelin, 2008). Penentuan konsentrasi tersebut dilakukan dengan cara pencampuran ekstrak dengan pelarut vaseline. Berat olesan 50 mg berdasarkan luas luka yang akan diberikan yaitu  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  (Negara, 2015). Ekstrak daun dewa dicampurkan dengan vaseline menggunakan rumus sebagai berikut:

$$L = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

L = Konsentrasi larutan (%)

a = Massa zat terlarut (mg)

b = Massa zat pelarut (mg)

Bila dimasukkan rumus penambahan vaselin seperti diatas maka didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Konsentrasi 2,5%

$$2,5/100 \times 50 \text{ mg} = 1,25 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Total} : 4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times 1,25 \text{ mg} = 25 \text{ mg ekstrak daun dewa.}$$

$$4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times (50-1,25) \text{ mg} = 975 \text{ mg vaseline}$$

Sehingga dalam ekstrak daun dewa konsentrasi 2,5% terdapat 1,25 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 50 mg vaseline untuk setiap sampel. Dalam ekstrak daun dewa 2,5% terdapat 25 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 975 mg vaseline untuk seluruh sampel kelompok 4 yaitu sebanyak 4 ekor selama 5 hari.

2. Konsentrasi 5%

$$5/100 \times 50 \text{ mg} = 2,5 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Total} : 4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times 2,5 \text{ mg} = 50 \text{ mg ekstrak daun dewa.}$$

$$4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times (50-2,5) \text{ mg} = 950 \text{ mg vaseline}$$

Sehingga dalam ekstrak daun dewa konsentrasi 5% terdapat 2,5 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 50 mg vaseline untuk setiap sampel. Dalam ekstrak daun dewa konsentrasi 5% terdapat 50 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 950 mg vaseline untuk seluruh sampel kelompok 5 yaitu sebanyak 4 ekor selama 5 hari.

3. Konsentrasi 10%

$$10/100 \times 50 \text{ mg} = 5 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Total} : 4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times 5 \text{ mg} = 100 \text{ mg ekstrak daun dewa.}$$

$$4 \text{ tikus} \times 5 \text{ hari} \times (50-5) \text{ mg} = 900 \text{ mg Vaseline.}$$

Sehingga dalam ekstrak daun dewa konsentrasi 10% terdapat 5 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 50 mg vaseline untuk setiap sampel. Dalam ekstrak daun dewa 10% terdapat 100 mg ekstrak daun dewa dicampurkan dengan 900 mg vaseline untuk seluruh sampel kelompok 6 yaitu sebanyak 4 ekor selama 5 hari.

#### **4. Penyimpanan Campuran Vaseline dengan Daun Dewa**

Hasil campuran vaseline dengan daun dewa yang sudah jadi kemudian akan disimpan didalam almari pendingin.

##### **4.5.2 Pembuatan Luka Bakar Derajat 2B**

Pembuatan luka bakar derajat 2B mengikuti penelitian Dewi, *et al.*, 2013 dimana metode yang tepat untuk induksi luka bakar derajat 2B adalah dengan metode penggunaan plat besi dengan suhu 80°C yang dipanaskan dengan bunsen selama  $\pm 8$  menit dan ditempelkan pada punggung tikus selama 6 detik. Hal ini karena setelah dianalisa secara mikroskopis kerusakan yang terjadi mengenai epidermis dan 2/3 bagian dermis. Sisa lapisan dermis sekitar 1/3 bagian, namun kelenjar keringat dan kelenjar sebacea sebagian masih utuh.

##### **1. Alat dan Bahan**

Pisau cukur dan gagangnya (1 buah), besi ukuran 2x2 cm (1 buah), korentang dan tempatnya (1 buah), kassa steril (secukupnya), spiritus (secukupnya), pemantik api (1 buah), alcohol 70% (secukupnya), normal salin (secukupnya), perlak (1 buah), sarung tangan bersih (1 pasang), jas lab (1 buah), obat anestesi (ketamine) (secukupnya), bengkok (1 buah), spuit 3 cc (1 buah), aquades injeksi (secukupnya), dan arloji.

## 2. Prosedur Pembuatan Luka Bakar Derajat 2B

1. Ditentukan area yang akan dibuat luka yaitu punggung kanan atas tikus.
2. Bersihkan bulu dan cukur area tersebut sampai jarak 3 cm dari area yang akan dibuat luka bakar.
3. Pasang perlak/alas di bawah tubuh tikus.
4. Buka bak instrument steril
5. Cuci tangan dan pakai sarung tangan bersih.
6. Desinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar, tunggu sampai alkohol kering.
7. Lakukan anastesi menggunakan ketamine pada area kulit yang akan di buat luka bakar dengan dosis (60 mg/kgBB) (Fatemi *et al.*, 2014).
8. Panaskan plat besi dengan ketebalan 2mm hingga mencapai suhu 80°C atau selama 8 menit secara konstan dengan menggunakan api bunsen yang diatur tinggi sumbu 1 cm.
9. Tempelkan plat besi pada punggung tikus selama 6 detik.
10. Angkat besi kemudian dikompres dengan kassa yang telah dicelupkan kedalam NS 0,9% sekitar 30 detik setelahnya untuk mencegah perluasan luka.
11. Tutup luka dengan kassa dan ikatkan ke tubuh tikus.
12. Lepas sarung tangan
13. Rapikan alat dan cuci tangan.

### 4.5.3 Perawatan Luka

Perawatan luka bakar dilakukan selama 5 hari. Tindakan yang dilakukan untuk merawat luka bakar derajat 2B dimulai pada hari pertama setelah tikus diinduksi luka bakar.

## 1. Alat dan Bahan

Sarung tangan steril (1 pasang), sarung tangan bersih (1 pasang), bak instrument kecil (1 buah), pinset anatomis (2 buah), kom steril (2 buah), kassa steril (secukupnya), kassa gulung (secukupnya), kasa + NaCl 0,9% (secukupnya), bengkok (1 buah), perlak (1 buah), plester (1 roll), gunting plester (1 buah), gunting kassa (1 buah), lidi cotton (secukupnya), normal salin 0,9% (1 botol), spuit 3 cc (1 buah), ekstrak daun dewa konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10% yang telah dicampur dengan vaseline (secukupnya), korentang dan tempatnya (1 buah), tas plastik pembuang sampah (1 buah), *silver sulfadiazine* (secukupnya), dan vaseline (secukupnya).

## 2. Prosedur Perawatan Luka

### a. Kelompok 1 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan normal salin 0,9%)

- 1) Cuci tangan
- 2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
- 3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- 4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- 5) Buka balutan
- 6) Pakai sarung tangan steril.
- 7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.
- 8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan peras, kemudian bersihkan luka dan keringkan.
- 9) Tutup semua area luka bakar dengan kassa steril yang telah dibasahi NaCl 0,9% kemudian balut luka dengan kassa gulung.

10) Bereskan peralatan.

11) Lepas sarung tangan dan buang ke tas plastik dan cuci tangan.

**b. Kelompok 2 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan *silver sulfadiazine*)**

1) Cuci tangan

2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.

3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.

4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.

5) Buka balutan.

6) Pakai sarung tangan steril.

7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.

8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan peras, kemudian bersihkan luka dan keringkan.

9) Oleskan *silver sulfadiazine* (SSD) sebanyak 50 mg secara merata menggunakan lidi cotton.

10) Tutup dengan kasa steril dan plester dan balut luka dengan kassa gulung.

11) Bereskan peralatan.

12) Lepas sarung tangan buang di plastik dan cuci tangan.

**c. Kelompok 3 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan basis vaseline)**

1) Cuci tangan

2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.

3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.

- 4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- 5) Buka balutan.
- 6) Pakai sarung tangan steril.
- 7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.
- 8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan peras, kemudian bersihkan luka dan keringkan.
- 9) Oleskann vaseline sebanyak 50 mg secara merata menggunakan lidi cotton.
- 10) Tutup dengan kasa steril dan plester dan balut luka dengan kassa gulung.
- 11) Bereskan peralatan.
- 12) Lepas sarung tangan buang di plastik dan cuci tangan.

**d. Kelompok 4 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Ekstrak Daun Dewa Konsentrasi 2,5%)**

- 1) Cuci tangan
- 2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
- 3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- 4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- 5) Buka balutan.
- 6) Pakai sarung tangan steril.
- 7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.
- 8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan peras, kemudian bersihkan luka dan keringkan.

- 9) Oleskan salep ekstrak daun dewa konsentrasi 2,5% sebanyak 50 mg secara merata menggunakan lidi cotton.
- 10) Tutup dengan kasa steril dan plester dan balut luka dengan kassa gulung
- 11) Bereskan peralatan.
- 12) Lepas sarung tangan buang di plastik dan cuci tangan.

**e. Kelompok 5 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Ekstrak Daun**

**Dewa Konsentrasi 5%)**

- 1) Cuci tangan
- 2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
- 3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- 4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- 5) Buka balutan.
- 6) Pakai sarung tangan steril.
- 7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.
- 8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan perasa, kemudian bersihkan luka dan keringkan.
- 9) Oleskan salep ekstrak daun dewa konsentrasi 5% sebanyak 50 mg secara merata menggunakan lidi cotton.
- 10) Tutup dengan kasa steril dan plester dan balut luka dengan kassa gulung.
- 11) Bereskan peralatan.
- 12) Lepas sarung tangan buang di plastik dan cuci tangan.

**f. Kelompok 6 (Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Ekstrak Daun****Dewa Konsentrasi 10%)**

- 1) Cuci tangan
- 2) Tempatkan perlak dibawah tikus yang akan dirawat.
- 3) Atur posisi tikus senyaman mungkin sebelum memfiksasi sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- 4) Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- 5) Buka balutan.
- 6) Pakai sarung tangan steril.
- 7) Irigasi luka dengan NaCl 0,9% yang dimasukkan ke dalam spuit 3 cc.
- 8) Basahi kassa dengan NaCl 0,9% dan perasa, kemudian bersihkan luka dan keringkan.
- 9) Oleskan salep ekstrak daun dewa konsentrasi 10% sebanyak 50 mg secara merata menggunakan lidi cotton.
- 10) Tutup dengan kasa steril dan plester dan balut luka dengan kassa gulung.
- 11) Bereskan peralatan.
- 12) Lepas sarung tangan buang di plastik dan cuci tangan.

(Sumber: Maslahatun, 2014)

**4.5.4 Teknik Sterilisasi****1. Alat dan Bahan Sterilisasi**

Alat dan bahan yang digunakan dalam teknik sterilisasi adalah autoklaf dan korentang.

## 2. Prosedur Sterilisasi

Metode sterilisasi peralatan perawatan luka terhadap alat-alat logam menggunakan *autoklast* elektrik (UV) dengan timer otomatis. Prosedur setrilisasinya yaitu mesin autoklaf dihidupkan, masukkan alat yang sudah dikeringkan dan bungkus dengan kain, lalu putar tombol *timer* pada angka 30 menit. Jika tombol *timer* sudah menunjukkan angka nol maka proses sterilisasi selesai. Setelah itu, alat-alat yang sudah disterilisasikan dikeluarkan dengan menggunakan korentang. Sedangkan untuk sterilisasi peralatan non logam (misalnya kasa, sarung tangan, dan lain-lain) menggunakan teknik panas kering yaitu udara panas oleh oven listrik dengan menggunakan *menmert* pada suhu 160-170°C selama  $\geq 1$  jam (Kusumawati, 2010).

### 4.5.5 Pemeliharaan Tikus

#### 1. Alat dan Bahan Pemeliharaan Tikus

Alat dan bahan pemeliharaan tikus adalah kandang tikus, penutup kandang dari anyaman kawat, botol air minum, makanan tikus, sekam dan alas tidur tikus.

#### 2. Cara Pemeliharaan Tikus

Sebelum diinduksi luka bakar, tikus diadaptasikan dahulu di tempat penelitian selama 1 minggu. Masing – masing tikus ditempatkan pada kandang yang berbeda. Kandang tikus harus cukup kuat (tahan gigitan), dan mudah dibersihkan serta dilengkapi dengan penutup kandang dari anyaman kawat. Alas tidur tikus diganti setiap 3 hari.

Pemberian makan dan minum pada tikus sebelum dan selama penelitian dilakukan setiap hari. Untuk menghindari kesalahan pada

penelitian maka setiap kandang dan ekor tikus diberi tanda. Selama penelitian tikus dibuat luka bakar derajat 2B dan dirawat sesuai kelompok perlakuan setiap satu hari sekali. Pada akhir penelitian tikus dikorbankan dengan cara inhalasi eter kloroform. Tujuan tindakan ini adalah untuk meminimalkan rasa penderitaan hewan coba saat proses kematian. Tikus yang sudah mati dilakukan penguburan.

#### **4.5.6 Pembuatan Sediaan Histologi Kulit Luka Bakar pada Tikus**

##### **1. Alat dan Bahan**

Papan bedah (1 buah), pisau bedah (1 buah), pinset (2 buah), mikrotom (1 buah), beaker glass 250 mL (secukupnya), kuas (1 buah), obyek glass (secukupnya), inkubator (1 buah), hot plate 38-40°C (1 buah), wadah larutan fiksatif (1 buah), larutan xilol (secukupnya), paraffin blok (secukupnya), etanol (secukupnya), air (secukupnya), aquades (secukupnya), dan air hangat 38-40°C (secukupnya).

##### **2. Prosedur Pembuatan Sediaan Histologi Kulit Luka Bakar Pada Tikus**

###### **a. Prosedur Eksisi Pengambilan Jaringan**

Pada hari terakhir penelitian yaitu pada hari ke 5, hewan coba pada tiap kelompok akan dilakukan proses eksisi pengambilan jaringan luka oleh teknisi laboratorium farmakologi yang berkompeten untuk dilihat secara histologi terkait jumlah makrofag. Proses eksisi jaringan dimulai dengan euthanasia hewan coba dengan inhalasi ether kloroform. Hewan coba akan terbius dan perlahan mati. Setelah hewan coba mati, secepat mungkin bulu disekitar punggung yang telah dieksisi dan dirawat dicukur hingga bersih dan didesinfeksi

dengan alcohol 70% selanjutnya dibuat eksisi menggunakan pisau bedah mencapai batas lapisan otot. Tiap jaringan yang telah dieksisi akan disimpan dalam botol yang berisi larutan formalin buffer agar tetap awet hingga dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk dilakukan pewarnaan.

**b. Fiksasi**

Jaringan luka yang telah dieksisi dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam *Phosphat Buffer Saline* pada pH 7,0) selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

**c. Dehidrasi**

Pada tahap ini potongan jaringan eksisi dimasukkan dalam alcohol dengan konsentrasi bertingkat agar jaringan menjadi lebih jernih dan transparan, kemudian dimasukkan dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

**d. Impregnasi**

Pada tahap ini jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2 x 2 jam.

**e. Embedding**

Setelah tahap impregnasi, jaringan akan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C. setelah itu, tunggu hingga paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong secara vertical setebal 4 mikro dengan menggunakan mikrotom. Potongan-potongan jaringan tersebut kemudian ditempelkan pada kaca obyek yang

sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C hingga paraffin mencair.

#### 4.5.7 Pewarnaan Hematoksilin Eosin

##### 1. Alat dan Bahan

Hematoksilin (secukupnya), eosin (secukupnya), preparat jaringan periatikular (secukupnya), alkohol 1% (secukupnya), cover glass (secukupnya), dan pipet (2 buah).

##### 2. Prosedur Pewarnaan Hematoksilin eosin

Pada tahap *staining*, *object glass* dimasukkan pada xylol selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Hematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. *Object glass* dimasukkan pada *lithium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarna *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3, dan xylol selama 15 menit x 3. Tahap terakhir adalah preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan*.

Metode pewarnaan ini berdasar pada 3 warna (*Trichrom*) yaitu asam pikrat dan asam fuchsin dengan hematoksilin. Jaringan pada kaca obyek dilakukan deparafinisasi sampai alkohol 70%, kemudian diberi larutan *Hematoxylin* dan diamkan selama 5 menit, kemudian dilarutkan dalam air hangat 60°C agar berwarna merah kurang lebih selama 3-10 menit. Lalu dibilas dengan menggunakan *aquadest*, dan dilanjutkan dengan memberi larutan *eosin* dengan cepat (1x celup). Kemudian

dilakukan dehidrasi alkohol 96% 2x, absolute 2x, xylol 2x, lalu diberi balsam *Canada* dan ditutup dengan kaca penutup (Prayogi, 2014).

#### 4.5.8 Identifikasi Sel Makrofag

Proses identifikasi makrofag dilakukan setelah 5 hari perawatan. Tikus dikorbankan terlebih dahulu kemudian luka dibersihkan dan dibuat sediaan histologi. Makrofag adalah sel khusus yang terdapat di dekat pembuluh darah, memiliki inti satu berukuran 10-30  $\mu\text{m}$ , inti lonjong atau bentuk ginjal (adanya lekukan ke dalam/tapal kuda), mengandung granula azurofilik (Suwanti, 2008). Pada pewarnaan histopatologi menggunakan *hematoxylin-eosin* (HE), makrofag tampak sebagai sel berbentuk ireguler dan memanjang, dengan ukuran yang lebih besar daripada fibroblast serta memiliki sitoplasma lebih banyak. Pada pewarnaan ini, inti sel makrofag tampak berwarna biru keunguan. Secara lebih spesifik, makrofag dapat dikenali melalui aktivitas fagositosisnya yakni dengan didapatkannya granul berpigmen coklat tua di dalam sitoplasma yang merupakan debris yang difagositosis olehnya (Slomianka, 2009; King, 2010). Penghitungan jumlah makrofag dilakukan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri CX 21 dengan perbesaran 400 kali, setiap sediaan diperiksa pada lapang pandang 5 area dan dianalisa dengan menggunakan *software OlyVIA (viewer for histological examination)* yang dihubungkan dengan komputer.

#### 4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
1. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Normal Salin (NaCl 0,9%)	Proses membersihkan area luka dengan normal salin lalu luka ditutup dengan menggunakan balutan kassa steril. Balutan dibuka pada hari berikutnya untuk dilakukan perawatan luka kembali.	-	-	-
2. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan <i>Silver sulfadiazine</i> (SSD)	Proses membersihkan area luka dengan normal salin, kemudian diolesi SSD dan ditutup dengan menggunakan balutan kassa steril. Balutan dibuka pada hari berikutnya untuk dilakukan perawatan luka kembali.		mg	Rasio
3. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Basis Vaseline	Proses membersihkan luka dengan normal salin lalu diolesi vaselin dan ditutup dengan menggunakan balutan kassa steril. Balutan dibuka pada hari berikutnya untuk dilakukan perawatan luka kembali.		mg	Rasio

<p>4. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Ekstrak Daun Dewa</p>	<p>Proses membersihkan area luka dengan normal salin lalu diberi ekstrak daun dewa pada masing-masing perlakuan dan ditutup dengan menggunakan balutan kassa steril. Balutan dibuka pada hari berikutnya untuk dilakukan perawatan luka kembali.</p>		<p>mg</p>	<p>Rasio</p>
<p>5. Ekstrak Daun Dewa</p>	<p>Serbuk daun dewa didapatkan dari Materia Medika Batu. Serbuk Serbuk daun dewa menjadi ekstrak melalui prosedur ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak daun dewa dibuat dalam bentuk sediaan salep dengan cara dicampurkan dengan vaseline, kemudian dibagi menjadi tiga konsentrasi yaitu 2,5%, 5%, dan 10%.</p>	<p>Dosis</p>	<p>%</p>	<p>Rasio</p>
<p>Jumlah makrofag</p>	<p>Makrofag memiliki inti satu berukuran 10-30 µm, inti lonjong atau bentuk ginjal (adanya lekukan ke dalam/tapal kuda), mengandung</p>	<p>Jumlah total rata-rata sel makrofag</p>	<p>Jumlah sel</p>	<p>Rasio</p>

granula azurofilik.	Perhitungan	pada	
jumlah makrofag	dilakukan 5	masing-	
lapang pandang	dalam satu	masing	
sediaan histologi	kulit luka bakar	kelompok	
tikus, kemudian	hasil setiap		
perhitungan	dirata-ratakan		

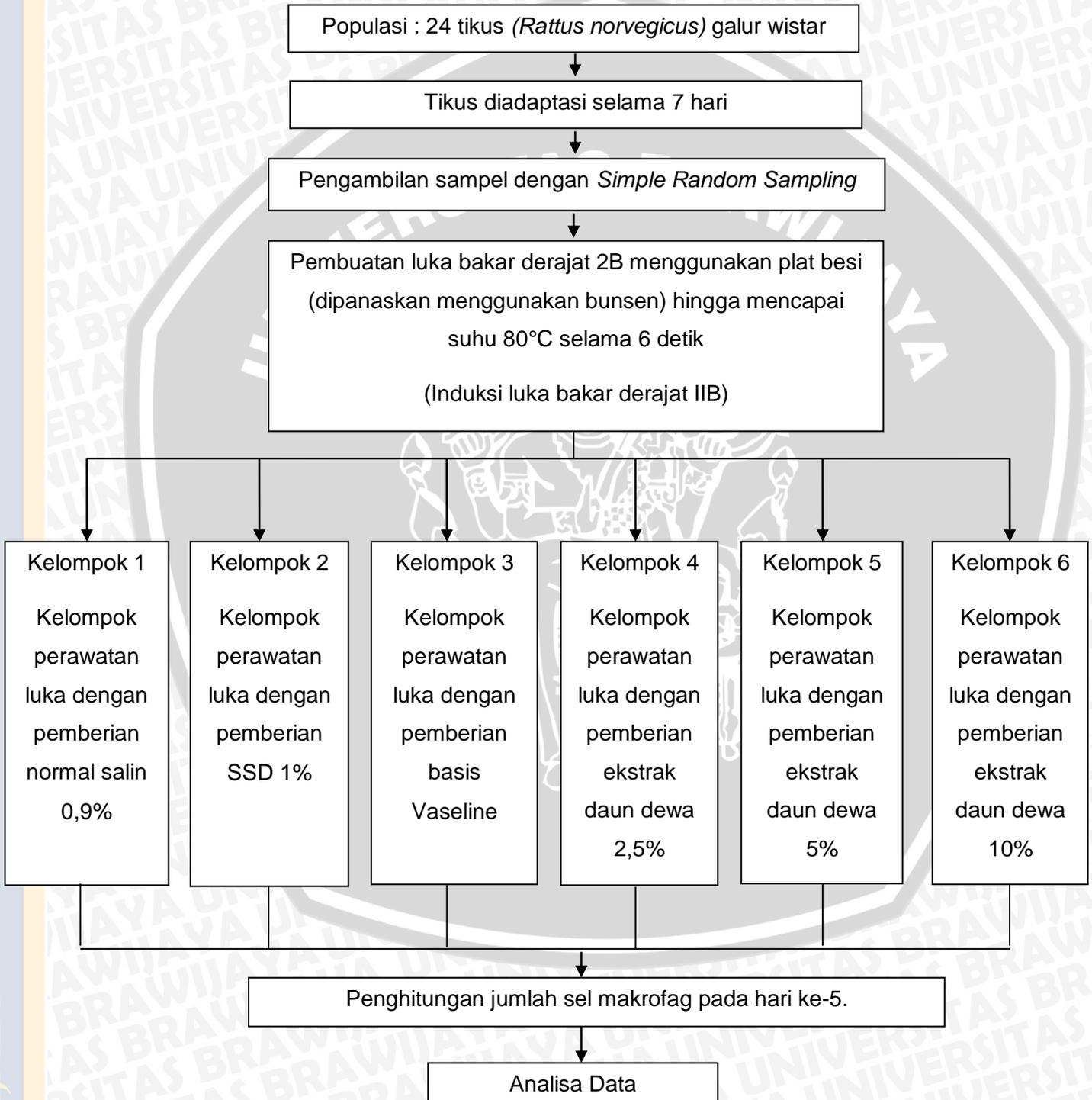
Tabel 4.6 Definisi Operasional Penelitian



4.7 **Prosedur Penelitian**

4.7.1 **Alur Kerja Penelitian**

*Post-test Only, Control Group Design*



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian



## 4.7.2 Pengumpulan Data

### 1. Teknik Pengumpulan data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu 3 kelompok dengan pemberian normal salin 0,9%, *silver sulfadiazine* (SSD), dan basis vaseline serta 3 kelompok dengan pemberian ekstrak daun dewa pada konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Pengumpulan data dilakukan selama perawatan luka dari hari pertama setelah diinduksi luka bakar, sampai hari ke-4. Penghitungan jumlah makrofag dilakukan sesudah tikus dikorbankan pada hari ke-5.

### 2. Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dengan melakukan pengamatan jumlah makrofag dalam preparat HE jaringan kulit tersebut dianalisa menggunakan software *OlyVIA (viewer for histology examination)* dengan perbesaran 400 kali.

## 4.8 Analisa Data

### 4.8.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Hasil analisa terhadap jumlah makrofag luka bakar derajat 2B pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan dilakukan uji statistik *SPSS version 21* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dengan  $\alpha=0,05$ . Jika didapatkan data menunjukkan p value > 0,05, maka data terdistribusi normal. Kemudian pada uji homogenitas / keragaman data menggunakan uji *Test of Homogeneity of Variance*, jika nilai F hasil > nilai F tabel, maka data adalah homogeny, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA*.

#### 4.8.2 Uji Hasil Penelitian

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan *One Way ANOVA SPSS version 21* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi  $< \alpha$  (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah makrofag luka bakar pada luka bakar derajat 2B kelompok uji coba.

#### 4.8.3 Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*)

Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*) merupakan metode pengujian lanjutan apabila pengujian ANOVA terdapat nilai beda atau ketidaksamaan nilai tengah pada data yang diajukan. Metode ini berfungsi untuk mengetahui nilai tengah mana yang memiliki perbedaan yang signifikan. Biasanya dilakukan dengan melihat besar variasi dari tiap kombinasi perbandingan nilai tengah yang diamati. Kelompok dengan nilai signifikansi paling kecil, mempunyai nilai signifikansi paling bermakna dalam kelompok-kelompok uji coba.

