

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2016 yang bertempat di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Fisiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, sarung tangan (glove), scalpel, pinset anatomis, pinset chirurgis, kain kasa, gunting tajam-tajam, gunting tajam-tumpul, *object glass*, *cover glass* rak kaca objek, autoclave, timbangan, blender, penyaring karet, gelas ukur, wadah kaca tertutup, inkubator, kapas, papan fiksasi, pot organ, mikroskop cahaya (Olympus BX51), *water bath*, *software* Optilab viewer, *Immunoratio* dan aplikasi *Image Raster 3*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* dengan berat 150-180 gram, pakan standar dan minum tikus, NaCl fisiologis, alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, formula salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*), minyak emersi, pewarnaan *Masson's Trichrome*, formalin 10%, jaringan kulit tikus, aquades, parafin,

ketamin, xylol, susu sapi segar, biji kefir, lidah buaya (*Aloe vera*), PBS, antibodi TNF- α (V1q), larutan xylol, parafin cair, antibodi sekunder *Goat Anti Rat* berlabel biotin, pewarna kromogen *DAB*.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba.
2. Pembuatan salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%, 37,5% dan 50%.
3. Perlakuan luka insisi dengan panjang 2 cm pada daerah punggung.
4. Terapi salep kombinasi kefir kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%, 37,5% dan 50%.
5. Pengambilan dan pembuatan preparat kulit.
6. Ekspresi TNF- α dengan metode Immunohistokimia (IHK).
7. Pengamatan kerapatan kolagen dengan pewarnaan *Masson's Trichrome*.
8. Analisis data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing 4 ulangan berdasarkan rumus menurut Kusrieningrum (2008):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan diantaranya, kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok P1 (terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%), kelompok P2 (terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 37,5%), dan kelompok P3 (terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 50%). Kelompok K(-) merupakan kelompok tikus sehat tanpa diberi perlakuan apapun, kelompok K(+) merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi tanpa diberi terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*), kelompok P1 merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%, kelompok P2 merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 37,5%, dan kelompok P3 merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 50%.

Tabel 4.4 Rancangan Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kelompok K(-)	Tikus sehat tanpa diberi perlakuan apapun.
Kelompok K(+)	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi tanpa dilakukan pemberian terapi dan ditutup menggunakan kasa steril.
Kelompok P1	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan <i>Aloe vera</i> dengan konsentrasi 25% dan ditutup menggunakan kasa steril.
Kelompok P2	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan <i>Aloe vera</i> dengan konsentrasi 37,5% dan ditutup menggunakan kasa steril.
Kelompok P3	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan <i>Aloe vera</i> dengan konsentrasi 50% dan ditutup menggunakan kasa steril.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : luka insisi dan konsentrasi terapi kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*).

Variabel terikat : ekspresi TNF- α dan kerapatan kolagen.

Variabel kontrol : tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu, pakan, dan kandang.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Pada percobaan ini digunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan berat badan berkisar antara 150-180 gram. Tikus dibagi

dalam 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan terdapat 4 ekor tikus. Kelompok 1 adalah kelompok tikus sehat tanpa dilakukan perlakuan apapun (kontrol negatif / K-), kelompok 2 adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi tanpa dilakukan pemberian terapi (kontrol positif / K+), kelompok 3 adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%, kelompok 4 adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 37,5%, dan kelompok 5 adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi serta terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi 50% (Lampiran 3).

Sebelum mendapatkan perlakuan, hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan terhadap lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar dan minum pada semua tikus. Pemberian pakan dan minum dilakukan sebanyak dua kali dalam sehari. Komposisi pakan yang diberikan berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) 2005, yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin dan air 12%.

4.6.1 Pembuatan Kefir Kombinasi Lidah Buaya

Panaskan susu sapi segar pada suhu 85-90 °C selama 30 menit kemudian dinginkan pada suhu kamar sekitar 27 °C, masukkan 3% butir biji kefir dan aduk hingga merata, inkubasi pada suhu kamar selama 20-24 jam, apabila telah menggumpal saring dengan penyaring plastik untuk mendapatkan kefir segar (Usmiati, 2007). Cuci bersih lidah buaya (*Aloe vera*) sebanyak 500 gram dengan

menggunakan air mengalir. Potong lidah buaya menjadi beberapa bagian yang kecil dan blender. Ambil sari lidah buaya sebanyak 250 ml dan campurkan pada 750 ml susu sapi segar.

4.6.2 Pembuatan Salep Kombinasi Kefir dan Lidah Buaya (*Aloe vera*)

Salep dibuat dengan bahan dasar vaselin album dan cera alba. Menurut Naibaho *et al.*, (2013), salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi tinggi dibandingkan dengan basis salep lainnya. Selain itu, basis hidrokarbon menunjukkan daya antimikroba yang lebih besar dibandingkan dengan basis lainnya, ditandai dengan penyembuhan infeksi pada luka kulit yang lebih cepat. Pembuatan salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) menggunakan formulasi salep vaselin album 95% dan cera alba 5%. Prosedur pembuatannya yaitu cera alba dileburkan pada cawan penguap menggunakan *waterbath* kemudian tambahkan vaselin album 95% dan aduk hingga merata, angkat cawan dari *waterbath* dan masukkan kefir sebanyak 3 g dan lidah buaya (*Aloe vera*) sebanyak 1 g, aduk hingga menjadi salep.

4.6.3 Perlakuan Luka Insisi pada Hewan Coba

Lakukan anestesi umum pada hewan coba menggunakan ketamin dengan dengan dosis 10 mg/kg BB secara IM (Danu, 2012). Lakukan pencukuran pada daerah punggung yang sebelumnya telah dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%. Buat insisi sepanjang 2 cm menggunakan scalpel-blade hingga mencapai subkutan. Bersihkan bagian luka insisi menggunakan kapas, setelah itu lakukan pemberian terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya

(*Aloe vera*) dengan konsentrasi 25%, 37,5% dan 50% sesuai dengan kelompok perlakuan. Tutup bagian luka menggunakan kasa steril dan perekat *Hypafix*®.

4.6.5 Terapi Salep Kombinasi Kefir dan Lidah Buaya (*Aloe vera*)

Konsentrasi terapi pemberian salep kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) didapatkan pada hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan menggunakan dua perbandingan yaitu perbandingan kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) 3:1 dan 5:1. Konsentrasi terapi yang digunakan terdiri dari 12%, 25%, 50% dan 75%. Hasil penelitian pendahuluan yang didapatkan yaitu pemberian terapi salep kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan perbandingan 3:1 serta konsentrasi 25% dan 50% menunjukkan adanya perbaikan jaringan luka dengan ditandai luka insisi mulai menutup secara sempurna, sehingga pada penelitian dilakukan pemberian salep kombinasi kefir dan lidah buaya dengan perbandingan 3:1 dan konsentrasi 25%, 37,5% dan 50%. Pemberian terapi salep kombinasi kefir dan lidah buaya (*Aloe vera*) dilakukan sebanyak satu kali sehari selama 7 hari pasca perlakuan dengan cara mengoleskan salep pada area luka insisi.

4.6.6 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Hewan coba dieuthanasi dengan cara dislokasi leher, kemudian dilakukan pembedahan diatas papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada daerah punggung, tikus diletakkan dengan posisi rebah ventral. Kulit disekitar insisi kemudian diambil dan dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%. Kulit direndam pada larutan formalin 10% selama 24 jam. Tahapan pembuatan preparat histopatologi

kulit terdiri dari fiksasi, dehidrasi, clearing, impregnasi, dan *embedding* (Ashari, 2013).

A. Fiksasi

Jaringan dimasukkan dalam larutan formalin 10%. Lamanya fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam agar larutan fiksasi hilang. Fiksasi bertujuan sebagai pengawetan jaringan dan menghambat proses pembusukan, serta untuk mempertahankan sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran.

B. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol konsentrasi bertingkat (alkohol 70, 80, 90, 95%, dan alkohol absolut) dengan menggunakan alat *dehydrator autotechnicon* selama 2 jam. Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari dalam jaringan. Tujuan dari dehidrasi adalah agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan molekul parafin. Dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari presentase rendah ke presentase tinggi. Hal ini dilakukan untuk menjaga agar tidak terjadi perubahan tiba-tiba pada sel dan jaringan.

C. Clearing

Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan *alkohol-xylol* selama 1 jam, kemudian larutan *xylol* murni selama 4 jam. *Clearing* adalah proses penjernihan atau mentransparankan jaringan. *Clearing* berfungsi untuk menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan oleh molekul parafin.

D. Impregnasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam parafin cair. Impregnasi dapat juga disebut infiltrasi parafin yaitu proses pengeluaran *xylol* dari dalam jaringan yang akan digantikan oleh parafin cair.

E. *Embedding*

Potongan jaringan dalam parafin padat dengan titik lebur 56-58 °C, ditunggu hingga parafin menjadi padat. Jaringan dalam parafin dipotong 4 mikron dan ditempelkan pada *object glass* dan dipanaskan dalam inkubator dengan suhu 60 °C hingga parafin mencair. *Embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke media parafin. Tujuannya adalah untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan sampel.

F. Pewarnaan dengan metode *Masson's Trichrome*

Fiksasi preparat dengan formalin 10%, kemudian dilakukan deparafinisasi dengan aquades, dimasukkan ke dalam larutan *boin's* selama 1 jam pada suhu 56 °C, didinginkan dan dicuci dengan air mengalir kemudian bilas dengan aquades. Masukkan preparat ke dalam larutan *weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama 10 menit dan bilas menggunakan aquades. Preparat kemudian direndam ke dalam larutan *biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 2 menit, kemudian bilas kembali menggunakan aquades, kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam *phosphomolybdic-phosphotungstic* selama 10 menit lalu larutan *aniline blue* selama 5 menit, kemudian bilas dengan aquades, kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam *glasial aasetat* selama 3 menit. Lakukan dehidrasi menggunakan alkohol 95% dan 100%, kemudian dibersihkan

dengan *xylene* sebanyak dua kali, kemudian dilakukan *mounting* dengan balsam kanada, preparat diberi entelan dan ditutup dengan *object glass*.

Pengecatan *Masson's Trichrome* merupakan pengecatan khusus untuk serat elastin dan retikulin (serat jaringan ikat yang ada dalam organ), serat retikulin adalah serat kolagen yang kaya akan selubung glikoprotein, serat kolagen akan nampak berwarna biru pada pewarnaan ini (Cotran, 2003). Pengukuran area kerapatan kolagen dilakukan dengan menggunakan *software Image Raster*. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *SPSS for Windows 22* untuk uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur atau uji *Tukey* dengan tingkat signifikansi $\alpha = 5\%$.

4.6.7 Ekspresi TNF- α dengan Imunohistokimia (IHK)

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman *slide* preparat pada *xylol 1*, *xylol 2*, dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selanjutnya ditetesi dengan 3% H_2O_2 selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat TNF- α* (pengenceran 1:50) selama semalam pada suhu 40°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder

berlabel *rabbit anti rat igG* berlabel biotin selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromagen *Diamano Benzidine* (DAB) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan cover glass. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Hasil pengamatan ekspresi TNF- α akan tampak warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel (Junquiera dan Carneiro, 2007).

Pengukuran presentase area ekspresi TNF- α dilakukan dengan menggunakan *software Immunoratio*. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *SPSS for Windows 22* untuk uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dan uji Beda Nyata Jujur atau uji *Tukey* dengan tingkat signifikansi $\alpha=5\%$.

4.7 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan kerapatan kolagen. Analisis data dilakukan secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *SPSS for Window 22*. Selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan

tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$) untuk mengetahui kemaknaan perbedaan antara kelompok perlakuan.

