

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2017 di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan dengan berat badan antara 150-200 gram umur 8-12 minggu, ketamin HCl 10%, Xylazin 2%, daun singkong, adeps lanae, *underpad*, tisu, kasa, plaster luka, es batu dan air mineral, *glove* steril, sekam, masker, kapas, aquades pro-inj., PFA 10%, NaCl fisiologis, buffer formalin 4%, alkohol 30%, 50%, 70%, 80% dan 90%, *xylol*, parafin, polilisin, Canada balsem, pewarna HE dan kit SOD.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, jas laboratorium, kandang dan tempat minum tikus, kain *handling*, alat bedah, papan bedah, pot organ, *object glass*, *cover glass*, lumping, timbangan, solder modifikasi, rotavapor, oven, kandang pemeliharaan, spektrofotometer, mikrotom, mikroskop *Olympus BX51*, kamera *Olympus DP20*.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, serum darah hewan coba untuk perhitungan kadar SOD dan organ kulit luka bakar tikus model.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu membagi subyek menjadi lima kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari lima tikus. Kelompok A adalah tikus sehat sebagai kontrol negatif, kelompok B adalah tikus yang diberi luka bakar tanpa terapi (kontrol positif), kelompok C, D, E (kelompok terapi) adalah kelompok tikus yang diberi luka bakar dan diterapi dengan salep daun singkong dengan konsentrasi masing-masing 4%, 8%, dan 12% (**Lampiran 1**).

Penelitian ini menggunakan besaran sampel dengan rumus Frederer:

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

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

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5.$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 5 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

Variable bebas : konsentrasi salep daun singkong

Variable tergantung : histopatologi kulit dan kadar SOD

Variable kontrol : hewan coba strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan, minum, lingkungan, dan suhu kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparat Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar. Air minum untuk tikus diberikan secara *ad libitum*. Tikus diletakkan dalam kandang plastik yang disekat menjadi 4 ruang dengan jumlah empat ekor tikus perkandang. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan.

4.6.2 Hewan Model Luka Bakar

Area kulit yang akan dibuat luka bakar dicukur sepanjang 3 cm dan lebar 3 cm agar kulit dapat terekspos dalam pembuatan luka bakar seluas 2 cm. Kulit kemudian disterilisasi menggunakan alkohol 70% dan dilakukan anestesi umum. Anestesi yang digunakan adalah kombinasi antara ketamin HCL 1% dengan *xylazine* 2% (**Lampiran 2**). Kombinasi antara ketamin dengan *xylazine* merupakan kombinasi yang baik, ketamin memberikan efek analgesik sedangkan *xylazine* memberikan efek sebagai muskulorelaksan (Yudaniayanti, dkk., 2010). Induksi luka bakar dilakukan dengan memanaskan terlebih dahulu solder modifikasi selama 5 menit, kemudian ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 5 detik. Luka bakar dikompres dengan air es selama 60 detik agar luka

bakar tidak meluas. Perlakuan ini membentuk luka bakar derajat II yang ditandai dengan kerusakan jaringan hingga lapisan dermis kulit (Balqis, dkk.,2014).

4.6.3 Pembuatan Salep Daun Singkong

4.6.3.1 Ekstraksi Daun Singkong

Daun singkong yang basah kemudian dicuci dan dipotong kecil-kecil. Daun singkong yang digunakan adalah daun yang berada pada bagian tengah pohon, yaitu pada helai ke-4 hingga ke-7, untuk menghindari kandungan sianida, daun singkong yang digunakan sebanyak ± 6 kg yang kemudian dijemur dioven selama sehari hingga kering. Daun kemudian ditimbang dan diambil seberat ± 100 gram. Daun singkong kering tersebut selanjutnya diekstraksi dengan maserasi etanol 95% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap harinya. Larutan tersebut kemudian dipekatkan dengan rotavapor dengan suhu $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan putaran 90 rpm menjadi ekstraksi daun singkong konsentrasi 100% (Dewi, 2014 ; Nisa, 2013).

4.6.3.2 Pembuatan Konsentrasi Salep

Total sediaan salep yang digunakan pada penelitian ini dibuat sebanyak 20 gram yang masing-masing mengandung 4%, 8%, dan 12% ekstrak daun singkong. Jumlah sediaan disesuaikan dengan perhitungan salep yang diberikan, yaitu untuk setiap olesan pada luka bakar seluas 2×2 cm akan digunakan $\pm 0,1$ gram salep yang diberikan 2 kali sehari selama 14 hari berturut-turut dengan jumlah tikus tiap kelompok terapi sebanyak 5 ekor. Masing-masing bahan ditimbang dan dicampur dengan adeps lanae hingga homogen (**lampiran 3**). Sediaan disimpan dalam wadah plastik yang tertutup rapat dan ditaruh pada tempat yang kering dan tidak terkena sinar matahari secara langsung.

4.6.4 Pemberian Terapi Salep Daun Singkong

Pemberian terapi salep daun singkong diberikan pada hewan coba langsung setelah dilakukan perlakuan sesuai dengan konsentrasi kelompok yang sudah ditentukan. Terapi dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore hari) selama 14 hari secara topikal sesuai dengan luas luka bakar.

4.6.5 Pengukuran Kadar SOD Serum

Semua tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dianestesi menggunakan ketamine 1% pada hari ke-15 kemudian dilakukan pengambilan darah dengan rute *intracardial* menggunakan *disposable syringe* ukuran 5 ml dan disimpan dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan. Sampel darah (**Lampiran 5**) diambil seberat 200mg, dihomogenasi dengan bufer fosfat+protease inhibitor sebanyak 2cc, kemudian disentrifus dengan kecepatan 400rpm dalam suhu 4⁰C selama 15 menit (Abubakar, *et al.*, 2004). Supernatan diambil sebanyak 200 µl + EDTA 100 µl + NBT + xanthine 100 µl + xanthine oxidase 100 µl + buffer fosfat dan diinkubasi dengan suhu 37⁰C selama 30 menit. Supernatan disentrifus dan ditambahkan buffer fosfat hingga 3cc. Sampel siap diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580nm. Penentuan kadar dilakukan menggunakan kurva baku (Rukmini, *et al.*, 2004).

4.6.6 Pengambilan Sampel Kulit

Pengambilan sampel kulit luka bakar dilakukan dengan mengubah posisi tikus menjadi rebah ventral. Kulit bagian punggung dicubit dengan pinset chirurgis, kulit digunting menggunakan gunting tajam-tajam mengelilingi bagian kulit yang diinduksi luka bakar diikuti dengan bagian kulit yang normal sebagai

perbandingan antara kondisi kulit yang sehat dengan kulit yang sedang dalam fase penyembuhan. Bagian kulit yang akan dijadikan sebagai preparat histopatologi dipisahkan dengan muskulus. Pemisahan ini dilakukan dengan cara menguakkan secara perlahan bagian subkutan. Sampel dimasukkan ke dalam pot berisi PFA 40%, disimpan pada suhu ruang dan dikirim ke tempat pembuatan preparat histopatologi, yaitu laboratorium Histopatologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Pembuatan preparat histopatologi (**lampiran 4**) menggunakan pewarnaan HE berdasarkan studi yang dilakukan oleh Muntiha (2001). Jaringan kulit dengan panjang 2 cm dicuci dengan NaCl fisiologis, dilanjutkan dengan fiksasi menggunakan *buffer* formalin 10%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 70% selama 24 jam, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 jam dan terakhir ke dalam alkohol 90% dan alkohol absolut masing masing 20 menit. Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan dengan memindahkan jaringan ke dalam larutan xylol I selama 20 menit, xylol II selama 30 menit, dan dilanjutkan dengan proses infiltrasi dalam *paraffin* cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60⁰C. Proses selanjutnya adalah *embedding* yaitu memasukkan jaringan ke dalam *paraffin* cair yang telah dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga memadat, dilanjutkan ke proses pemotongan blok *paraffin* dengan menggunakan mikrotom setebal 4 mikron secara membujur dan melintang. Irisan ditelakkan ke

atas *object glass* yang telah diolesi dengan polilisin. Preparat diinkubasi untuk penguapan *paraffin*. Preparat diwarnai dengan menggunakan pewarna HE. *Canada balsam* dioleskan setelah preparat kering. Preparat diamati pada bagian sel epitel kulit (re-epitelisasi kulit) menggunakan mikroskop cahaya.

4.6.8 Pengamatan dan Pengambilan Gambar Histopatologi Kulit

Preparat diamati pada tepi luka dalam proses penyembuhan luka menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51*[®] perbesaran 100x dan 400x, kemudian gambar diambil menggunakan kamera mikroskop *Olympus DP20*[®].

4.6.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan analisis kuantitatif statistik dan kualitatif deskriptif. Analisis kuantitatif statistik untuk kadar enzim SOD dengan menggunakan program SPSS 22.0 dengan uji analisis ragam *One-Way ANOVA* untuk melihat efektifitas bermakna pada setiap kelompok uji yang terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif dan terapi dengan masing-masing konsentrasi salep daun singkong, kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey $\alpha = 5\%$ untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap perlakuan. Analisis kualitatif deskriptif untuk pengamatan histopatologi kulit dengan mengamati re-epitelisasi kulit pada perbesaran 100x dan 400x.