

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental* menggunakan *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh perawatan topikal ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dalam meningkatkan jumlah makrofag luka bakar derajat 2B pada tikus putih (*Rattus norvegicus Strain Wistar*). Pada rancangan penelitian ini terdapat 1 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dirawat dengan kompres NaCl 0,9%. Kelompok perlakuan dirawat dengan *Silver Sulfadiazine* (SSD), hidrogel, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) konsentrasi 40%, 50%, dan 60%.

4.2 Sampel Penelitian**4.2.1 Sampel**

Sampel yang digunakan termasuk dalam kriteria inklusi. Hal ini untuk menghindari faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka. Peneliti membuat kriteria inklusi untuk homogenisasi sampel. Kriteria inklusinya sebagai berikut:

1. Umur tikus putih (*Rattus norvegicus Strain Wistar*) adalah 2,5 – 3 bulan
2. Berjenis kelamin jantan. Hal ini merupakan upaya menghomogenkan dan menghindari kerancuan hasil penyembuhan luka karena pengaruh

hormon esterogen dan progesteron yang dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah dan menurunkan sekresi TNF- α (Claire & Gillian, 2008).

3. Berat badan tikus antara 150 – 200 gram.
4. Kondisi tikus sehat ditandai dengan pergerakan aktif, jinak, berbulu licin, mengkilat dan bersih, rambutnya tebal, tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga, serta tidak mencret.
5. Tidak mendapat pengobatan atau perlakuan sebelumnya.

Kriteria eksklusi:

1. Tikus sakit sebelum dan selama perlakuan.
2. Tikus mati sebelum dan selama perlakuan.

Untuk homogenitas maka variabel kendali yang ditambahkan adalah sebagai berikut :

- Perlukaan pada kulit hewan coba dilakukan dalam 1 waktu.
- Perawatan tikus dilakukan dengan prosedur yang sama.
- Makanan tikus sama yaitu, ayam buras super (ABS) *comfeed* dengan komposisi air 12%, protein 20-25%, lemak 5%, pati 5-50%, serat kasar 5%, vitamin, dan mineral 3% sebanyak 12-20 gram/hari.
- Jenis dan volume air minum tikus disamakan dengan menggunakan botol 20–45 ml/hari.
- Bentuk kandang dibuat sama, segi empat dengan luas $\pm 650 \text{ cm}^2$. Setiap kandang diberi alas dari kardus yang dibungkus dengan koran. Alas tidur tikus diganti setiap hari agar tetap bersih dan kering.
- Luas luka bakar homogen yaitu $\pm 4 \text{ cm}^2$.

4.2.2 Teknik Sampling dan Penentuan Jumlah Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar). Pemilihan sampel dengan cara *simple random* sampling yang dibagi dalam 6 kelompok dengan perhitungan sebagai berikut (Hidayat, 2009).

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

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:
t: banyaknya perlakuan
r: banyaknya sampel

Dari perhitungan di atas menunjukkan bahwa sampel minimal yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok adalah 4 ekor tikus. Pada penelitian ini menggunakan sejumlah 4 ekor tikus untuk tiap kelompoknya, sehingga total tikus yang dibutuhkan ada 24 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung (*Variable Dependent*)

Jumlah makrofag luka bakar derajat 2B.

4.3.2 Variabel Bebas (*Variable Independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah topikal hidrogel, topikal SSD, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) konsentrasi 40%, 50%, dan 60%.

4.3.3 Variabel Kontrol

Kontrol negatif pada penelitian ini adalah NaCl 0,9%.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 3 Januari sampai 7 Januari 2014.

4.5 Bahan dan Alat serta Prosedur Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat Pembuatan Luka Bakar Derajat 2B

Alat dan bahan yang harus dipersiapkan untuk pembuatan luka bakar derajat 2B pada hewan coba adalah pisau cukur dan gagangnya, plat besi ukuran 2 x 2 cm tebal 2 mm, pemantik api, spiritus, penggaris, sarung tangan bersih, bengkok, kom steril, perlak, jas lab, obat anastesi general (Ketamin), NaCl 0,9%, kassa steril, silet, arloji, spuit, dan jarumnya.

4.5.2 Eksplorasi Pembuatan Luka Bakar Derajat 2B

Pembuatan luka bakar derajat 2B dilakukan dengan melakukan studi eksplorasi menggunakan dua metode induksi luka bakar. Masing-masing metode tersebut dibedakan berdasarkan sumber panas dan suhu. Metode dalam studi eksplorasi penentuan luka bakar derajat 2B dilakukan pada tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar. Dua metode tersebut antara lain:

1. Sumber Panas Menggunakan Kompor Listrik

Tikus 1: menggunakan kompor listrik yang dihidupkan selama 20 menit sehingga suhu kompor mencapai 100°C. Setelah itu, plat besi berukuran 2 x 2 cm dengan ketebalan 2 mm ditempelkan ke kompor listrik selama

13 menit sehingga suhu plat besi menjadi 56°C . Kemudian plat besi ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik. Luka yang telah diinduksi luka bakar selanjutnya dikompres dengan NaCl 0,9% selama 60 detik.

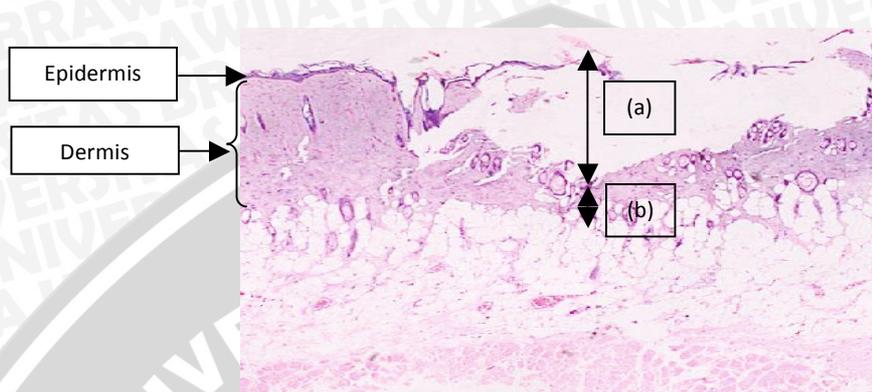
2. Sumber Panas Menggunakan Bunsen

Tikus 2: menggunakan plat besi berukuran 2 x 2 cm dengan ketebalan 2mm yang dipanaskan pada api bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm sampai suhu mencapai 80°C atau dipanaskan selama ± 8 menit. Kemudian plat besi ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik. Luka yang telah diinduksi luka bakar dikompres dengan NaCl 0,9% selama 60 detik.

Tikus 3: menggunakan plat besi berukuran 2 x 2 cm dengan ketebalan 2mm yang dipanaskan pada api bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm selama ± 5 menit dan suhunya mencapai 70°C . Kemudian plat besi tersebut ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik. Luka yang telah diinduksi luka bakar dikompres dengan NaCl 0,9% selama 60 detik.

Hasil uji eksplorasi (induksi pada jaringan kulit) kemudian dieksisi dan dibuatkan sediaan histopatologis dengan pewarnaan *Hematoksilin eosin* untuk dianalisis menggunakan mikroskop cahaya. Setelah dianalisis, hasil yang menunjukkan metode paling tepat untuk induksi luka bakar derajat 2B adalah metode kedua, yaitu menggunakan plat besi dengan suhu 80°C yang dipanaskan selama ± 8 menit dan ditempelkan pada punggung tikus selama 6 detik. Hal ini karena kerusakan kulit yang terjadi telah mengenai seluruh epidermis dan 2/3 bagian dermis (lihat gambar 4.1, kode (a)). Sedangkan kelenjar keringat dan

kelenjar sebacea tampak masih utuh sebagian pada 1/3 bagian lapisan dermis sisanya (lihat gambar 4.1, kode (b)).



Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Histologi Luka Bakar Derajat 2B

4.5.3 Prosedur Pembuatan Luka Bakar Derajat 2B

Berdasarkan hasil studi eksplorasi yang sudah dilakukan sebelumnya, tindakan yang harus dilakukan untuk membuat luka bakar derajat 2B pada hewan coba adalah menentukan terlebih dahulu daerah mana yang akan diinduksi luka bakar, yaitu punggung kanan atas. Setelah itu, bulu tikus dicukur seluas 3-4 cm pada area yang akan dibuat luka bakar. Selanjutnya mencuci tangan menggunakan sabun, membuka bak instrumen, memasang perlatk atau alas di bawah tubuh tikus, dan memakai sarung tangan bersih. Setelah itu, mendesinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan alkohol dan ditunggu sampai kering.

Lakukan anestesi pada tikus yang akan diinduksi luka bakar dengan Ketamin secara IM (intramuskular) pada abdomen bawah. Dosis yang dipakai adalah dengan mengencerkan 0,5 cc ketamin ke dalam 2,5 cc aquabides kemudian diinjeksikan \pm 0,5 cc pada tiap-tiap tikus. Setelah tikus dianestesi, plat besi yang berukuran 2 x 2 cm dengan ketebalan 2mm dipanaskan selama 8 menit hingga mencapai suhu 80°C menggunakan api bunsen dengan tinggi

sumbu 1 cm. Tempelkan plat besi tersebut menggunakan korentang pada punggung kanan tikus selama 6 detik dengan tekanan minimal. Angkat besi lalu kompres luka dengan NaCl 0,9% selama 60 detik untuk mencegah penyebaran luka bakar. Setelah itu, luka dikeringkan dan ditutup menggunakan kassa steril.

4.5.4 Perawatan Luka Bakar Derajat 2B

1. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang harus dipersiapkan untuk perawatan luka bakar derajat 2B pada hewan coba adalah bak instrumen, kassa steril, pinset anatomi steril, pinset chirurgis, gunting nekrotomi, sarung tangan steril, sarung tangan bersih, spuit 3 cc, pinset anatomi bersih, kassa gulung, bengkok, cacing, perlak, NaCl 0,9%, *Silver Sulfadiazine* (SSD), hidrogel, ekstrak etanol daun cincau hijau konsentrasi 40%, 50%, dan 60%.

2. Prosedur Perawatan Luka Bakar Derajat 2B

Perawatan luka bakar derajat 2B pada hewan coba menggunakan teknik perawatan luka tertutup. Langkah-langkah yang harus dilakukan antara lain:

a. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan NaCl 0,9%

Prosedur perawatan luka bakar derajat 2B yang dilakukan pada kelompok NaCl 0,9% adalah cuci tangan terlebih dahulu kemudian perlak ditempatkan di bawah luka yang akan dirawat. Setelah itu, mengatur posisi tikus senyaman mungkin sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan. Kemudian bengkok dan set perawatan diletakkan dekat dengan luka yang akan dirawat dan balutan dibuka. Irigasi balutan terlebih dahulu jika diperlukan dengan NaCl 0,9% agar balutan mudah dibuka. Setelah itu, sarung tangan steril dipakai dan luka

dibersihkan dengan NaCl 0,9% menggunakan spuit 3 cc. Selanjutnya, luka ditutup dengan kassa steril yang telah dibasahi NaCl 0,9%. Luka dibalut kassa gulung yang agak panjang dan lebar sehingga tertutup dengan baik.

b. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B Menggunakan *Silver Sulfadiazine*

Prosedur perawatan luka bakar derajat 2B yang dilakukan pada hewan coba dengan menggunakan SSD adalah cuci tangan terlebih dahulu kemudian perlak ditempatkan di bawah luka yang akan dirawat. Setelah itu, posisi tikus diatur senyaman mungkin sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan. Kemudian bengkak dan set perawatan diletakkan dekat dengan luka yang akan dirawat dan balutan dibuka. Irigasi balutan terlebih dahulu jika diperlukan dengan NaCl 0,9% agar balutan mudah dibuka. Setelah itu, sarung tangan steril dipakai dan luka dibersihkan dengan NaCl 0,9% menggunakan spuit 3 cc. Selanjutnya krim SSD dioleskan secara merata pada luka sebanyak 75 mg. Luka ditutup kassa steril dan dibalut kassa gulung yang agak panjang dan lebar sehingga tertutup dengan baik.

c. Perawatan Luka Bakar Derajat 2B Menggunakan Hidrogel

Prosedur perawatan luka bakar derajat 2B yang dilakukan pada hewan coba dengan menggunakan hidrogel adalah cuci tangan terlebih dahulu kemudian perlak ditempatkan di bawah luka yang akan dirawat. Setelah itu, posisi tikus diatur senyaman mungkin sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan. Kemudian bengkak dan set perawatan diletakkan dekat dengan luka yang akan dirawat dan balutan dibuka. Irigasi balutan terlebih dahulu jika diperlukan dengan NaCl 0,9% agar balutan mudah dibuka. Setelah itu, sarung

tangan steril dipakai dan luka dibersihkan dengan NaCl 0,9% menggunakan spuit 3 cc. Selanjutnya hidrogel dioleskan secara merata pada luka sebanyak 75 mg. Luka ditutup kassa steril dan dibalut kassa gulung yang agak panjang dan lebar sehingga tertutup dengan baik.

d. Prosedur Perawatan Luka Bakar Derajat 2B dengan Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*)

Prosedur perawatan luka bakar derajat 2B yang dilakukan pada hewan coba dengan menggunakan ekstrak etanol daun cincau hijau adalah cuci tangan terlebih dahulu kemudian perlak ditempatkan di bawah luka yang akan dirawat. Setelah itu, posisi tikus diatur senyaman mungkin sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan. Kemudian bengkok dan set perawatan diletakkan dekat dengan luka yang akan dirawat dan balutan dibuka. Irigasi balutan terlebih dahulu jika diperlukan dengan NaCl 0,9% agar balutan mudah dibuka. Setelah itu, sarung tangan steril dipakai dan luka dibersihkan dengan NaCl 0,9% menggunakan spuit 3 cc. Selanjutnya, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dioleskan secara merata pada area luka sebanyak 75 mg. Luka ditutup kassa steril dan dibalut kassa gulung yang agak panjang dan lebar sehingga tertutup dengan baik.

4.5.5 Preparasi Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*)

Alat dan bahan ekstraksi daun cincau hijau adalah oven, timbangan, gelas *erlenmeyer*, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, pendingin spiral atau *Rotary evaporator*, selang *water pump*, *water bath*, *vacum pump*, daun cincau hijau kering, etanol 96%, aquades, dan

botol hasil ekstrak. Proses pembuatan ekstrak etanol daun cincau hijau adalah sebagai berikut (Laboratorium Farmakologi FKUB, 2013):

1. Proses Pengeringan

Daun cincau hijau yang akan dikeringkan dicuci terlebih dahulu sampai bersih, kemudian dikeringkan dengan panas matahari (bebas kandungan air) atau dioven dengan suhu 80°C.

2. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi daun cincau hijau adalah daun cincau hijau kering dihaluskan dulu dengan blender. Setelah itu, sebanyak 100 gram sampel bubuk halus daun cincau hijau kering ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas *erlenmeyer* ukuran 1 liter. Kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volume 1000 ml, dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit), dan didiamkan selama 24 jam sampai mengendap. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% karena lebih selektif, tidak beracun, dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas.

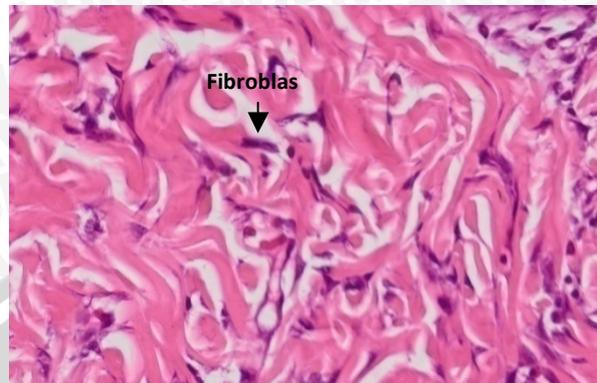
3. Proses Evaporasi

Proses evaporasi daun cincau hijau adalah mengambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil, kemudian dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter. Labu evaporasi dipasang pada evaporator. Setelah itu, mengisi *water bath* dengan air sampai penuh. Semua alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C) lalu disambungkan dengan aliran listrik. Kemudian larutan etanol dibiarkan berpisah

dengan zat aktif yang sudah ada di labu dan ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 bagian dari bubuk halus cincau hijau kering. Setelah itu, hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik dan simpan di kulkas.

4. Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau dengan Vaseline

Studi eksplorasi dosis untuk menentukan konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) pada penelitian ini dilakukan ke 10 ekor tikus (*Rattus norvegicus Strain Wistar*). Tikus tersebut diinduksi luka bakar derajat 2B sesuai prosedur dari hasil studi eksplorasi pembuatan luka. Tikus tersebut diberikan perawatan selama 7 hari menggunakan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70% dan 100%. Masing-masing kelompok uji eksplorasi konsentrasi dilakukan terhadap 2 ekor tikus. Setelah hari ke-7 dilakukan pengambilan jaringan dan dibuat slide jaringan dengan pewarnaan *Hematoksilin eosin* (HE). Kemudian jumlah fibroblas dihitung pada setiap sampel dengan menggunakan bantuan *software OlyVIA*. Hasil dari perhitungan tersebut dianalisa menggunakan program *SPSS statistic 20 for windows* pada uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikan pada dosis 50%, sehingga peneliti menggunakan konsentrasi 40% (1 tingkat dibawah nilai dosis yang signifikan), konsentrasi 50% (dosis signifikan tersebut), dan konsentrasi 60% (1 tingkat diatas nilai dosis yang signifikan).



Gambar 4.2 Hasil Pengamatan Histologi Fibroblas

Pengenceran ekstrak etanol daun cincau hijau dilakukan beberapa hari sebelum perawatan luka. Besarnya konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi 40%, 50%, dan 60%. Hasil ekstrak etanol daun cincau hijau diencerkan menggunakan vaselin dengan perhitungan sebagai berikut:

- Konsentrasi 40%

$$= \text{Konsentrasi ekstrak} \times \text{jumlah tikus} \times \text{jumlah hari perawatan} \times 75$$

$$= 40 \times 4 \times 4 \times 75$$

$$= 480 \text{ mg}$$

Jumlah ekstrak yang dibutuhkan untuk perawatan luka tikus selama 4 hari adalah 480 mg yang dicampur dengan vaselin sebanyak 720 mg.

- Konsentrasi 50%

$$= \text{Konsentrasi ekstrak} \times \text{jumlah tikus} \times \text{jumlah hari perawatan} \times 75$$

$$= 50 \times 4 \times 4 \times 75$$

$$= 600 \text{ mg}$$

Jumlah ekstrak yang dibutuhkan untuk perawatan luka tikus selama 4 hari adalah 600 mg yang dicampur dengan vaselin sebanyak 600 mg.

- Konsentrasi 60%

= Konsentrasi ekstrak x jumlah tikus x jumlah hari perawatan x 75

= $60 \times 4 \times 4 \times 75$

= 720 mg

Jumlah ekstrak yang dibutuhkan untuk perawatan luka tikus selama 4 hari adalah 720 mg yang dicampur dengan vaselin sebanyak 480 mg.

4.5.6 Teknik Sterilisasi

Alat-alat rawat luka disterilkan menggunakan autoklaf elektrik (UV) dengan *timer* otomatis. Prosedurnya yaitu mesin autoklaf dihidupkan, alat yang akan disterilkan dimasukkan, dan putar tombol *timer* pada angka 30 menit. Jika tombol *timer* sudah menunjukkan angka nol maka proses sterilisasi selesai. Setelah itu, alat-alat yang sudah disterilisasi diambil menggunakan korentang.

4.5.7 Teknik Pemeliharaan Tikus dan Pembagian Kelompok

1. Alat dan Bahan Pemeliharaan Tikus

Alat dan bahan pemeliharaan tikus adalah kandang tikus dengan luas $\pm 650 \text{ cm}^2$, penutup kandang dari anyaman kawat, botol air minum, makanan tikus, dan alas tidur tikus (terbuat dari kardus dibungkus koran).

2. Cara Pemeliharaan Tikus

Tikus ditempatkan pada kandang persegi panjang dengan luas $\pm 650 \text{ cm}^2$ dialasi kardus yang dibungkus koran. Alas tidur tikus diganti setiap hari agar tetap kering dan tidak lembab. Satu kandang ditempati satu ekor tikus untuk

menghindari perkelahian atau timbulnya luka baru pada hewan coba. Tikus diberi makan berupa ayam buras super (ABS) *comfeed* sebanyak 12-20 gram/hari dan diberi minum sebanyak 20-45 ml/hari.

3. Penandaan Tikus

Untuk menghindari kesalahan dalam penilaian penyembuhan luka pada tikus, maka masing-masing tikus diberi tatto pada ekornya dan nama pada kandang tikus.

4. Pembagian Kelompok

Pembagian kelompok pada tikus dilakukan dengan *simple random sampling*. Pada penelitian ini terdapat 24 ekor tikus dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok 1 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan NaCl 0,9%.
- b. Kelompok 2 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan *Silver Sulfadiazine* (SSD).
- c. Kelompok 3 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan hidrogel.
- d. Kelompok 4 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau 40%.
- e. Kelompok 5 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau 50%.
- f. Kelompok 6 adalah kelompok tikus yang diberikan perlakuan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau 60%.

4.5.8 Embeding dan Pembuatan Preparat Jaringan

1. Alat dan bahan Pembuatan Preparat Jaringan

Alat dan bahan untuk pembuatan preparat jaringan meliputi papan bedah, pisau bedah, pinset, mikrotom, *beaker glass* 250 ml, kuas, *obyek glass*, inkubator, *hot plate* 38-40°C, wadah larutan fiksatif, larutan xilol, parafin blok, etanol, air dingin, dan air hangat 38-40°C.

2. Cara Embeding dan Pembuatan Preparat Jaringan

Tikus dikorbankan pada hari ke-4 fase inflamasi. Tikus dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang mengandung zat eter. Setelah tikus mati, dilakukan pengambilan jaringan kulit. Pengambilan jaringan luka mencapai batas lapisan otot yang dieksisi menggunakan pisau bedah dengan luas 3x3 cm. Luas jaringan kulit yang luka hanya sebesar 2 x 2 cm, tetapi pengambilan jaringan kulit tersebut dilebihi kulit yang sehat sebanyak 0,5 cm pada tiap sisinya untuk menghindari kerusakan pada tiap-tiap area luka. Jaringan direndam dalam larutan fiksasi formalin 10% yang sebelumnya dibungkus dengan kertas saring dahulu.

Kemudian jaringan tersebut dipindahkan ke dalam larutan etanol 60% selama 2 jam; larutan etanol 90% selama 20 menit; dan larutan etanol absolut selama 20 menit. Jaringan luka dipindahkan pada larutan xilol ke-1 dan ke-2 masing-masing selama 20 menit. Dilanjutkan pada larutan xilol ke-3 pada suhu 60-63 °C selama 30 menit. Setelah itu jaringan luka dicelupkan ke parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah dan ditunggu sampai jaringan luka berada dalam blok parafin (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2013).

4.5.9 Pewarnaan Imunohistokimia Makrofag

Hari pertama deparafinisasi dilakukan dengan merendam slide jaringan ke larutan xilol selama 1 x 5 menit, selanjutnya direndam kembali dengan xilol selama 1 x 10 menit. Setelah itu, direndam alkohol 100% selama 2 x 10 menit, kemudian jaringan disimpan dalam suhu 4°C selama sehari. Hari kedua jaringan dicuci dengan PBS selama 5 menit, selanjutnya jaringan direndam menggunakan *blocking protein* selama 5 menit. Slide jaringan dicuci dengan menggunakan PBS selama 3 x 5 menit kemudian direndam menggunakan H₂O₂ (*peroksidase block*) selama 10 menit. Setelah itu, slide jaringan dicuci menggunakan PBS kembali selama 3 x 5 menit, jaringan dibersihkan, dan diberi antibodi primer, yaitu "*Macrophage Marker (MAC387): sc-66204*" keluaran *Santa Cruz Biotechnology Inc.*

Aplikasi antibodi primer didiamkan selama 2 jam. Slide jaringan dicuci PBS selama 3 x 5 menit, selanjutnya aplikasi antibodi sekunder (*post primary*) diberikan dan didiamkan selama 1,5 jam. Setelah itu, jaringan dicuci PBS selama 3 x 5 menit. Aplikasi SAHRP diberikan selama 40 menit, jaringan dicuci dengan PBS 2 x 5 menit, kemudian dicuci kembali menggunakan aquades selama 2 x 5 menit. Aplikasi DAB kromogen diberikan selama 15 menit sambil dilihat dibawah mikroskop berwarna coklat. Selanjutnya jaringan dicuci menggunakan aquades selama 3 x 5 menit dan dikeringkan.

Aplikasi *counter stain mayer* dengan dicuci dengan aquades selama 2 x 5 menit. Jaringan ditetesi *Mayer's Hematoxylin Solution* dan diamati menggunakan mikroskop. Setelah sel target terlihat, slide didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya jaringan direndam aquades selama 10 menit lalu jaringan ditetesi aquades selama 3 x 5 menit dan dikeringkan. Pemasangan *cover glass* pada

slide diberikan menggunakan *entellan*. Setelah *cover glass* ditempelkan jaringan siap untuk diamati.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah proses perumusan atau pemberian arti atau makna pada masing-masing variabel (Nursalam, 2008).

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Perawatan luka bakar derajat 2B dengan ekstrak etanol daun cincau hijau (<i>Cyclea barbata Miers</i>)	Perawatan luka bakar derajat 2B menggunakan daun cincau hijau yang dibuat dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% di Laboratorium Farmakologi FKUB Malang. Pembuatan konsentrasi 40%, 50%, 60% dicampurkan dengan vaselin menggunakan rumus pengenceran sesuai dengan konsentrasinya. Masing–masing konsentrasi diberikan secara topikal sebanyak 75 mg pada area luka yang sebelumnya telah dibersihkan terlebih dahulu dengan NaCl 0,9%. Luka ditutup kassa steril dan perawatan dilakukan sehari sekali (pukul 08.00-12.30 WIB).		Miligram (75 mg)	Rasio

Jumlah makrofag	Hasil perhitungan sel makrofag di jaringan ikat pada area granulasi luka (lapisan dermis) yang dilihat secara histologis melalui pewarnaan imunohistokimia (IHK) dengan “ <i>Macrophage Marker (MAC387): sc-66204</i> ” keluaran <i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i> Sel tersebut terlihat bulat atau oval dengan pinggir sel yang tidak teratur (Cui <i>et al.</i> , 2011). Penampakkannya berwarna coklat pada area sitoplasma dengan inti sel berwarna biru keunguan ketika dilihat menggunakan mikroskop cahaya yang dikonversikan melalui <i>software OlyVIA</i> pembesaran 400x sebanyak 10 lapang pandang (Firestein <i>et al.</i> , 2013; Sunaryati, 2010).	<i>software OlyVIA</i>	Sel	Rasio
-----------------	--	------------------------	-----	-------

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengumpulan Data

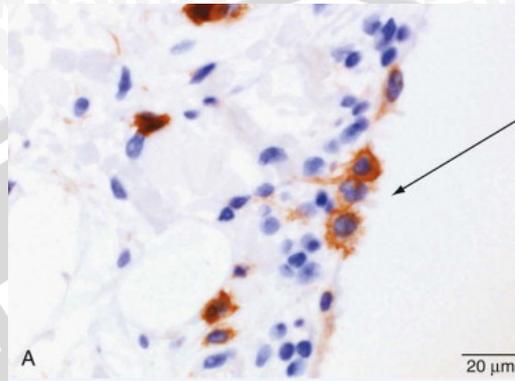
Penelitian ini menggunakan metode observasi eksperimen dimana sampel dibagi menjadi 6 kelompok dengan total sampel 24 ekor tikus. Perhitungan jumlah makrofag dilakukan dengan cara melakukan pengambilan preparat pada jaringan kulit tikus sebesar 3 x 3 cm pada hari ke-4 pasca induksi. Jaringan kulit diambil untuk dijadikan preparat dan dibuat slide histologi dengan

pemotongan vertikal di Laboratorium GDC RSU DR. Soetomo Surabaya. Pengamatan mikroskopik jumlah makrofag dilakukan pada preparat jaringan kulit yang telah diwarnai dengan immunohistokimia menggunakan “*Macrophage Marker (MAC387): sc-66204*” keluaran *Santa Cruz Biotechnology Inc.* dan dianalisis menggunakan *software OlyVIA (Viewer for histological examination)*. Penghitungan jumlah sel makrofag dilakukan dengan cara penghitungan *counter*, dicatat, dan diambil rata-rata dari masing-masing lapang pandang (Asmaningsih *et al.*, 2013).

4.7.2 Identifikasi Jumlah makrofag

Identifikasi makrofag dilihat secara histologi sewaktu melihat peningkatan jumlah makrofag yang ada pada hari ke-4 (fase inflamasi) sebagai indikasi penyembuhan luka yang baik. *Slide* jaringan dilihat menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x yang kemudian discan dan dikonversikan ke dalam *software OlyVIA (viewer for histological examination)* sehingga scan gambar dapat terhubung dengan komputer. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah makrofag yang mengekspresikan antibodi makrofag (sitoplasmanya berwarna coklat) dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada sepuluh lapang pandang (Sunaryati, 2010).

Penampakan histologi makrofag dengan perawanaan immunohistokimia dapat dilihat pada gambar 4.3 yang ditunjukkan oleh tanda panah.

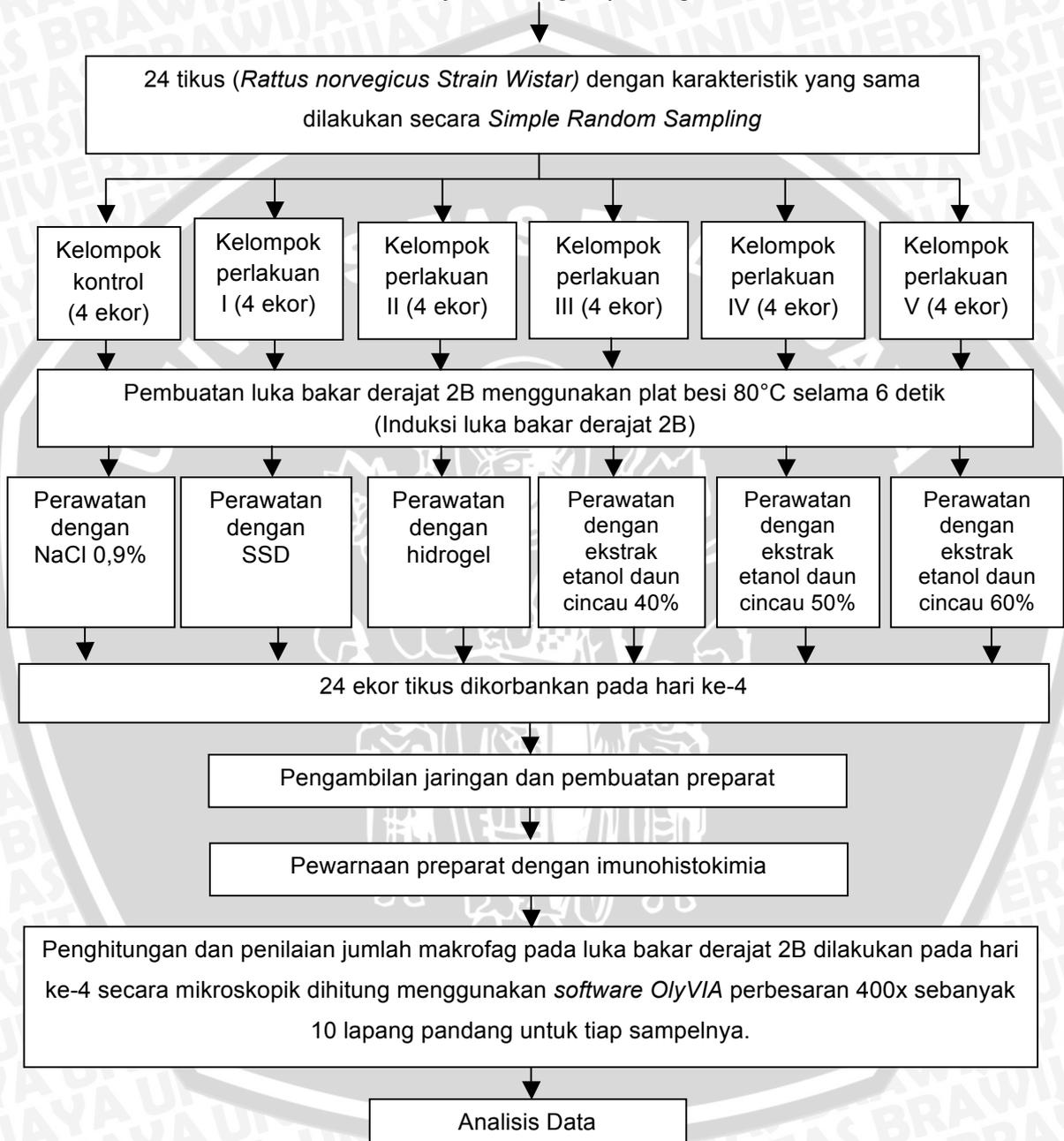


Gambar 4.3 Contoh Hasil Histologi Makrofag dengan Perawanaan Immunohistokimia (Firestein *et al.*, 2013)



4.7.3 Prosedur Penelitian

Post-test only, control group design



4.8 Analisis Data

4.8.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Jumlah makrofag pada luka bakar derajat 2B dianalisis pada hari ke-4 menggunakan software *IBM SPSS Statistics 20*. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kecil (≤ 50) dengan $\alpha = 0.05$. Jika data menunjukkan *p-value* > 0.05 ; maka data berdistribusi normal. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene (Levene test homogeneity of variances)* dengan $\alpha = 0.05$. Jika data menunjukkan *p-value* > 0.05 , maka data adalah homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan uji *One Way ANOVA* (Dahlan, 2009; Sarjono & Julianita, 2011).

4.8.2 Uji *One Way ANOVA*

Data hasil penelitian kemudian dianalisis menggunakan uji *One way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi *p-value* $\leq \alpha$ (0.05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah makrofag pada luka bakar derajat 2B antar kelompok (Dahlan, 2009). Dengan kata lain, jika nilai probabilitas lebih kecil daripada atau sama dengan nilai signifikansi ($0.05 \leq \text{sig.}$), maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah makrofag pada luka bakar derajat 2B antar kelompok (Sarjono & Julianita, 2009)

4.8.3 Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*)

Setelah data hasil penelitian dianalisis dengan uji *One way ANOVA*, kemudian dianalisis dengan uji *Post Hoc Test*. Uji ini untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang berbeda signifikan di antara kelompok-kelompok uji coba.

Nilai signifikansi antar kelompok yang bermakna adalah yang memiliki nilai signifikansi paling kecil dengan nilai $Sig. \leq \alpha$ (0.05) (Sarjono & Julianita, 2011).

4.8.4 Uji *Pearson Correlation*

Setelah data hasil penelitian dianalisis dengan uji *Post Hoc Test*, kemudian dianalisis menggunakan uji *Pearson Correlation* untuk mengetahui keeratan hubungan antara jumlah makrofag dengan konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*). Pada uji *Pearson Correlation* dua variabel dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi ($p < 0.05$). Untuk mengetahui kekuatan hubungan antar variabel dapat dilihat dari nilai *Pearson Correlation* pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Interpretasi Nilai Korelasi

Interval nilai <i>Pearson Correlation</i>	Hubungan Variabel
0,00 – 0,119	Sangat Rendah
0,20 – 0,399	Rendah
0,40 – 0,599	Sedang
0,60 – 0,799	Kuat
0,80 – 1,000	Sangat Kuat

Sumber: Nursalam, (2008)

Analisis korelasi perlu dilakukan sebelum peneliti melakukan analisis regresi. Sebab, jika di antara variabel tidak mempunyai korelasi (tidak mempunyai hubungan) maka dapat dipastikan variabel tersebut tidak mempunyai pengaruh. Oleh karena itu, uji korelasi perlu dilakukan untuk memastikan bahwa variabel-variabel yang diteliti mempunyai hubungan. Suatu variabel yang mempunyai hubungan belum tentu mempunyai pengaruh, tetapi jika suatu

variabel mempunyai pengaruh terhadap variabel lain maka dapat dipastikan variabel tersebut mempunyai hubungan (Sarjono & Julianita, 2011).

4.8.5 Uji Regresi Linier Berganda

Uji regresi linier berganda digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh ketiga konsentrasi ekstrak daun cincau terhadap jumlah makrofag pada luka bakar derajat 2B. Besarnya nilai koefisien determinasi (R^2) adalah kontribusi perawatan menggunakan ekstrak daun cincau dalam meningkatkan jumlah makrofag, sedangkan sisanya merupakan faktor-faktor selain dari besarnya konsentrasi ekstrak daun cincau (Sarjono & Julianita, 2011).

