

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimen murni (*true experimental*) yang dikerjakan di laboratorium dengan menggunakan hewan coba yaitu tikus putih galur wistar, untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dalam peningkatan ekspresi VEGF pada luka bakar derajat II B dan sebagai kontrol negatif dilakukan perawatan luka dengan menggunakan *Normal* saline, sedangkan kontrol positif dilakukan perawatan menggunakan *Silver sulfadiazine* dan hidrogel.

Penelitian ini menggunakan *Posttest-Only Control Group Design* karena ada lebih dari 2 kelompok yang masing-masing dipilih secara acak atau *random* (R). kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak diberikan perlakuan. Kelompok yang diberi perlakuan disebut *kelompok eksperimen* dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut *kelompok kontrol*. Pengaruh adanya perlakuan (*treatment*) adalah ( $O_1 : O_2$ ). Dalam penelitian ini pengaruh *treatment* dianalisis dengan uji berbeda, memakai statistik *One way Anova*. Jika terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, maka perlakuan yang diberikan berpengaruh secara signifikan.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih galur wistar betina. Alasan digunakan hewan coba jenis mamalia karena mempunyai

persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respon biologis yang mendekati manusia. Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar. Untuk menghindari faktor-faktor perancu yang bisa mempengaruhi proses penyembuhan luka, maka dibuat kriteria inklusi dengan menghomogenkan sampel penelitian, oleh karena itu harus diseragamkan:

1. Umur tikus putih galur wistar 2-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan ini cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.
2. Menggunakan tikus betina karena tikus jantan cenderung lebih aktif dan agresif sehingga potensial menimbulkan luka baru.
3. Berat tikus antara 150-200 gram.
4. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif.
5. Diberi minum dan nutrisi dengan jumlah dan jenis yang sama.
6. Tikus ditempatkan pada kandang yang sama yaitu dengan dilapisi kerdus dan koran serta diganti tiap 1 hari sekali agar tetap kering, tidak lembab dan 1 kandang ditempati 1 tikus supaya tikus tidak berkelahi dan menimbulkan luka baru.
7. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### **4.2.1 Kriteria Sampel**

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang mengalami infeksi ditandai dengan adanya pus atau nanah, eksudat yang berlebihan dan bau busuk.
2. Tikus mati.

Dalam penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih galur wistar karena memiliki alat pencernaan, kebutuhan nutrisi dan memiliki hemostatis yang serupa dengan manusia (Prasasti, 2010).

#### 4.2.2 Teknik Sampling

Cara pemilihan sampel dengan *Simpel Random Sampling*, agar setiap anggota populasi memiliki peluang untuk dijadikan subyek penelitian.

#### 4.2.3 Penentuan Jumlah Sampel

Pada penelitian ini diperlukan 6 kelompok yaitu perawatan luka dengan menggunakan normal salin 0,9% sebagai kelompok control negatif, perawatan luka dengan menggunakan krim *Silver sulfadiazine* 1% 0,5 gr dan hidrogel sebagai pembanding atau kontrol positif, dan perawatan luka dengan menggunakan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata*) 40%, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata*) 50%, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata*) 60% sebagai kelompok perlakuan. Jumlah subjek penelitian tiap kelompok dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan : “t” banyak kelompok perlakuan  
“r” jumlah perlakuan / replikasi

(Hidayat, 2009)

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

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

$$r-1 \geq \frac{15}{5}$$

$$r \geq 3+1$$

$$r \geq 4$$

$$r \geq 4$$



Sehingga dalam penelitian ini menggunakan sampel minimal yaitu 4 sampel pada masing-masing kelompok perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini ada dua variable yaitu variable bebas (*Independent*) dan variable tergantung (*Dependent*).

#### 1. Variable Bebas (*Independent*)

Dalam penelitian ini variable bebasnya adalah :

Perawatan luka bakar derajat II B dengan menggunakan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata*) dengan konsentrasi 40%, 50% dan 60%.

#### 2. Variable Tergantung (*Dependent*)

Pada penelitian ini variable tergantungnya adalah peningkatan ekspresi VEGF pada luka bakar derajat II B yang dilakukan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sekitar luka.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2013

### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.5.1 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Daun Cincau Hijau

Bahan dan alat pembuatan ekstrak daun cincau hijau meliputi 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 *spirall/rotary* evaporator 1 buah, selang *water pump*

1 buah, *water bath*, *vacum pump* 1 buah, tepung daun cincau hijau kering 500 gram, etanol 96%, aquades 1 botol dan pelarut etanol bisa diganti dengan pelarut lain, misalnya methanol atau n-heksa.

#### **4.5.2 Bahan dan Alat Pembuatan Luka Bakar Derajat II**

Bahan dan alat yang diperlukan dalam pembuatan luka bakar derajat II B meliputi pisau cukur dan gagangnya, besi ukuran 2 x 2 cm, korentang, kapas, kassa steril, spiritus, pemantik api, alkohol 70%, *normal saline* 0,9%, perlak, sarung tangan bersih, jas lab, plester, gunting, obat anestesi general (Ketamin) dan bengkok

#### **4.5.3 Eksplorasi Penentuan Luka Bakar Derajat IIB**

Penentuan luka bakar derajat II B dilakukan dengan melakukan studi eksplorasi menggunakan dua metode induksi luka bakar. Masing-masing metode tersebut dibedakan berdasarkan sumber panas dan suhu. Metode studi eksplorasi penentuan luka bakar derajat IIB dilakukan pada tikus betina galur wistar. Dua metode tersebut adalah sebagai berikut:

##### **1. Sumber Panas Menggunakan Kompor Listrik**

Tikus 1: menggunakan kompor listrik yang dihidupkan selama 20 menit sehingga suhu kompor listrik mencapai 100°C. Setelah itu, plat besi berukuran 2x2 dan tebal 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 NS selama 60 detik.

##### **2. Sumber Panas Menggunakan Bunsen**

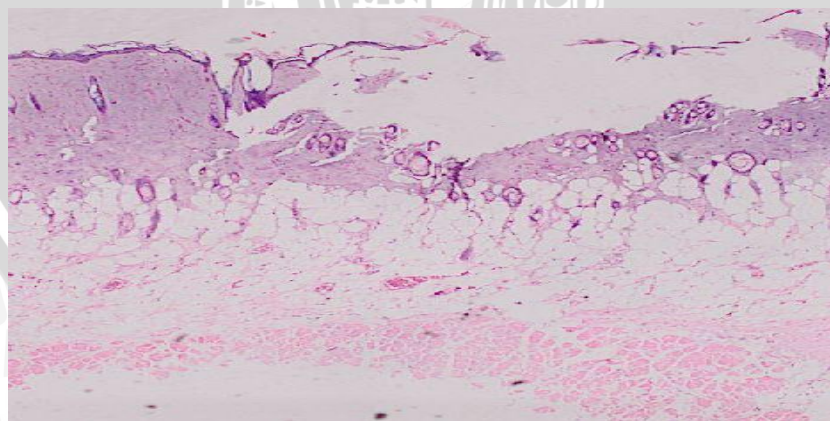
Tikus 2: menggunakan plat besi berukuran 2x2 cm dan tebal 2 mm yang dipanaskan pada api bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm hingga suhu mencapai



80°C atau pemanasan selama  $\pm 8$  menit, kemudian plat besi ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik. Luka yang telah diinduksi luka bakar selanjutnya dikompres dengan NS selama 60 detik

Tikus 3: menggunakan plat besi berukuran 2x2 cm dan tebal 2 mm yang dipanaskan pada api bunsen dengan tinggi sumbu 1 cm selama  $\pm 5$  menit dan suhunya mencapai 70°C, kemudian ditempelkan ke punggung tikus selama 6 detik. Luka yang telah diinduksi luka bakar selanjutnya dikompres dengan NS selama 60 detik.

Hasil uji eksplorasi tersebut kemudian dieksisi dan dibuat sediaan histopatologis dengan pewarnaan *Hematoksilin eosin* untuk dianalisis menggunakan mikroskop cahaya. Setelah dianalisis, hasilnya menunjukkan bahwa metode yang tepat untuk induksi luka bakar derajat IIB adalah dengan metode kedua, yaitu menggunakan plat besi dengan suhu 80°C yang dipanaskan selama  $\pm 8$  menit dan ditempelkan pada punggung tikus selama 6 detik. Hal ini karena kerusakan yang terjadi mengenai epidermis dan 2/3 bagian dermis, namun kelenjar keringat dan kelenjar sebacea sebagian masih utuh.



**Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Histologi Luka Bakar Derajat IIB**

#### 4.5.4 Bahan dan Alat Perawatan Luka Bakar

Bahan dan alat yang diperlukan dalam merawat luka yang telah dibuat pada punggung hewan coba yaitu bak steril yang berisi (sarung tangan, kassa, pinset anatomi 2 buah), kom berisi NaCl 0,9%, kom berisi *Silver sulfadiazine*, kom berisi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 40%, 50% dan 60%, bengkok, perlak, perban, plester, gunting dan korentang.

#### 4.5.5 Eksplorasi Untuk Penentuan Dosis

Penentuan dosis ekstrak etanol daun cincau hijau dengan melakukan studi eksplorasi dosis pada 10 ekor tikus yang telah diinduksi luka bakar derajat IIB. Konsentrasi yang digunakan pada eksplorasi yaitu konsentrasi 10%,30%, 50%, 70% dan 100%. Tiap konsentrasi digunakan 2 ekor tikus untuk mengurangi *loos of control*. Studi eklorasi dosis dilakukan selama 7 hari perawatan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun cincau hijau yang paling efektif. Penentuan konsentrasi yang paling efektif dilakukan dengan cara membuat sediaan preparat jaringan kulit dan dilakukan pewarnaan menggunakan *Hematoxilin eosin*, kemudian jaringan dilihat menggunakan fotomikroskopik OLYMPUS XC 10 yang dilengkapi *software OlyVia* dan menghitung jumlah fibroblats pada masing-masing sampel. Jumlah fibroblast pada masing-masing sampel dianalisa menggunakan uji SPSS *statistic* meliputi uji normalitas, homogenitas, *one way annova* dan *post hoc test*. Hasil uji SPSS *statistic* didapatkan beda yang signifikan pada kelompok ekstrak daun cincau hijau konsentrasi 50%, sehingga konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk meningkatkan jumlah fibroblast. Oleh karena itu, pada penelitian digunakan ekstrak daun cincau



hijau konsentrasi batas bawah 50% yaitu konsentrasi 40% dan batas atas konsentrasi 50% yaitu konsentrasi 60%.

#### 4.5.6 Teknik Pencegahan Infeksi

Alat dan bahan pada teknik pencegahan infeksi yaitu tempat cuci tangan, sarung tangan dan jas laboratorium.

#### 4.5.7 Pemeliharaan dan Penimbangan Tikus

##### 1. Penandaan Tikus

Untuk menghindari kesalahan dalam penilaian penyembuhan luka pada tikus maka masing-masing tikus harus diberi tanda yang tidak mudah hilang. Biasanya tikus diberi nomor pada ekornya atau memasang *ear tag* (anting) bernomor dengan melindungi daun telinga. Akan tetapi pada penelitian ini penandaan akan dilakukan dengan pemberian nomor pada masing-masing kandang tikus dan pada ekornya dengan menggunakan spidol permanen.

##### 2. Tempat Perawatan Tikus

Kandang perawatan tikus harus cukup kuat tidak mudah rusak. Kandang ini terbuat dari bak, mudah dibongkar, mudah dibersihkan dan mudah dipasang lagi. Kandang harus tahan gigitan, sehingga tikus tidak lepas, tetapi tikus harus tampak dari luar. Masing-masing tikus dibuatkan kandang tersendiri, karena bila terlalu berdesakan suhu badan akan meningkat di atas normal, tikus akan banyak mengeluarkan banyak ludah dan menutupi bulunya dengan ludah. Kandang tikus dilengkapi dengan penutup kandang dari anyaman kawat dan botol air. Alas tidur diganti setiap hari sekali. Kandang yang digunakan adalah bak plastik berukuran 1200 cm<sup>3</sup> ditempati oleh satu tikus, dilengkapi dengan penutup dari anyaman kawat. Hal ini memungkinkan tikus mendengar suara tikus yang lain (kontak auditorial).



### 3. Nutrisi Tikus

Tikus diberikan makanan dengan jumlah yang sama setiap hari. Tiga hari tikus dewasa makan 12-20 gr makanan. Makanan yang diberikan Ayam Buras Super (ABS), *Comfeed* dengan komposisi air maksimal 12% protein kasar minimal 11%, lemak kasar 4 %, serat kasar 7%, abu maksimal 3%, kalsium 0,9-1,1%, fosfor 0,7-0,9% dan *Coccidiostat*.

### 4. Penimbangan Tikus

Untuk mengukur berat badan tikus digunakan alat penimbang sartorius yang dilakukan sebelum prosedur eksperimen dilakukan.

#### 4.5.8 Embedding dan Pembuatan Preparat Jaringan

Alat yang diperlukan peneliti untuk eksisi jaringan antara lain: papan bedah, pisau bedah, pinset. Sedangkan alat yang diperlukan untuk pembuatan preparat, antara lain: mikrotom, beaker glass 250 mL, kuas, obyek glass, incubator, *hot plate* 38-40°C, wadah. Kemudian bahan pembuat preparat yang diperlukan oleh peneliti antara lain: larutan fiksatif, larutan xilol, parafin blok, etanol, air, air hangat 38-40°C, aquades.

#### 4.5.9 Perwarnaan Imunohistokimia

Alat dan bahan pewarnaan imunohistokimia untuk pewarnaan ekspresi VEGF antara lain: xilol, alkohol 100%, aquades, *phosphate-bufferedsaline* (PBS), *Peroksidase block* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Antibodi VEGF, Anti Mouse HRP Conjugated, *Diamino Benzidine* (DAB) *cromogen*, *Mayer's Hematoxylin Solution*, *Tap Water*, *Cover Glass*, Mikroskop Cahaya.

#### 4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah mendefinisikan variable secara operasional berdasarkan karakteristik yang diamati, sehingga memungkinkan peneliti untuk melakukan observasi atau pengukuran secara cermat terhadap suatu objek atau fenomena (Hidayat, 2009).

Table 4.1. Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Parameter (satuan)	Skala ukur
1	Perawatan luka bakar derajat II B dengan ekstrak daun cincau hijau ( <i>Cyclea barbata</i> )	Perawatan luka bakar tertutup yang dilakukan pada pagi hari dengan membersihkan luka terlebih dahulu dengan larutan normal salin. Luka kemudian diberikan tambahan ekstrak etanol daun cincau hijau ( <i>Cyclea barbata</i> ) sesuai dosis eksplorasi yang dioleskan secara topikal. Kemudian, luka ditutup dengan kassa steril. Jenis balutan yang digunakan adalah balutan basah-kering untuk menghindari faktor perancu. Luka dirawat 1 kali sehari selama 4 hari.	Miligram (75 mg pada setiap tikus kelompok perlakuan)	Rasio
2	Jumlah ekspresi VEGF	Jumlah sel yang mengekspresikan VEGF pada luka bakar derajat II B yang dilakukan pewarnaan <i>imunohistokimia</i> menggunakan polyclonal Ab VEGF (A-20) : sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Incorporation. Jumlah sel yang mengekspresikan VEGF sebagai warna coklat yang terakumulasi pada sitoplasma yang berdifusi keluar sel. Ekspresi VEGF dihitung dengan banyaknya sitoplasma pada sel yang tercatat positif pada 20 lapang pandang dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pada fotomikroskop OLYMPUS seri XC 10 yang dilengkapi <i>software OlyVia</i> .	Sel per lapang pandang	Rasio



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Metode Dengumpulan Data

Metode pengumpulan data dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan VEGF melalui pengamatan preparat histologi jaringan kulit menggunakan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OlyVIA (*Viewer for Imaging Application*) dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pandang pada 20 lapang pandang dan setiap sediaan diperiksa pada luas pandang 20 area kemudian dirata-rata. Penghitungan data juga menggunakan metode *Double blind* yaitu perhitungan yang dilakukan oleh dua orang peneliti kemudian hasilnya dirata-rata dimana peneliti lain tidak mengetahui perlakuan mana yang diberikan pada suatu sampel data (tidak teridentifikasi). Metode ini dilakukan untuk menghindari kebiasaan data.

### 4.7.2 Identifikasi Ekspresi VEGF

Proses identifikasi ekspresi VEGF dilakukan setelah perawatan luka selesai. Sel yang mengekspresikan VEGF sebagai warna coklat yang terakumulasi pada sitoplasma yang berdifusi ke ekstra seluler. Ekspresi VEGF dihitung dengan banyaknya sitoplasma yang tercatat positif pada 20 lapang pandang dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pada fotomikroskop OLYMPUS seri XC 10 yang dilengkapi *software OlyVia (Viewer for Imaging Application)*.

### 4.7.3 Prosedur Pembuatan Ekstraksi Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*)

Cara pembuaan ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) terdiri dari:

#### a. Proses pengeringan

Mencuci bersih daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) yang akan dikeringkan, kemudian memotong daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) kecil-

kecil, setelah itu memasukkan daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) ke dalam oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)

b. Proses ekstraksi

Setelah daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) kering, kemudian menghaluskan daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan blender sampai halus. Menimbang daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) kering sebanyak 100 gram. Kemudian memasukkan 100 gram daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) kering ke dalam enlenmeyer ukuran  $\pm 1$  L, selanjutnya merendamnya dengan etanol 900 mL menjadi 1 L. Setelah itu, mengocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit). Mendinginkannya selama 1 malam sampai mengendap. Mengambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring). Proses perendaman ini dilakukan 3 kali secara berturut-turut.

c. Proses evaporasi

Memasukkan dalam evaporasi 1 L, kemudian pasang labu evaporasi pada evaporator. Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh. Memasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* (diatur sampai 90°C atau sesuai dengan titik didih pelarut), menyambungkan dengan aliran listrik. Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi. Kemudian membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu epavorasi. Setelah itu, menunggu samapai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk 1 labu)  $\pm 900$  mL. Hasil yang diperoleh kira-kira  $\frac{1}{4}$  dari bahan alam kering (100 gram bahan alam menghasilkan ekstrak  $\pm 25$  gram). Selanjutnya



memasukkan hasil ekstraksi daun cincau hijau ke dalam botol plastik/kaca. Kemudian menyimpannya dalam freezer.

#### 4.7.4 Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*)

Pengenceran ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dilakukan beberapa hari sebelum perawatan luka. Konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) yang dilakukan pada penelitian ini adalah konsentrasi 40%, 50% dan 60%. Hasil ekstrak daun etanol cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) diencerkan menggunakan vaseline dengan perhitungan sebagai berikut:

- Konsentrasi 40%

(konsentrasi x jumlah tikus x lama perawatan x 75 mg)

$$= 40\% \times 4 \times 4 \times 75 \text{ mg}$$

$$= 480 \text{ mg}$$

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

- Konsentrasi 50%

(konsentrasi x jumlah tikus x lama perawatan x 75 mg)

$$= 50\% \times 4 \times 4 \times 75 \text{ mg} = 600 \text{ mg}$$

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

- Konsentrasi 60%

(konsentrasi x jumlah tikus x lama perawatan x 75 mg)

$$= 60\% \times 4 \times 4 \times 75 \text{ mg}$$

$$= 720 \text{ mg}$$

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

Penggunaan ekstrak etanol daun cincau hijau menjadi konsentrasi yang diinginkan dilakukan dengan menambahkan gel dengan jumlah yang telah didapatkan melalui rumus diatas. Pengenceran dilakukan setiap hari, sisa ekstrak yang sudah jadi diletakkan di dalam lemari es.

Studi eksperimen ini merupakan studi eksplorasi, tujuannya untuk mengetahui konsentrasi efektif yang dapat menimbulkan efek optimum. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 40%, 50% dan 60% untuk mengetahui apakah dengan konsentrasi sebesar itu akan menimbulkan efek yang optimum.

#### **4.7.5 Pembagian Kelompok Tikus**

Pembagian sampel tikus yang lebih dipilih melalui *simple random sampling* dilakukan dengan cara pengundian di setiap kandang yang telah diberi nomer. Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan atau hanya dilakukan perawatan menggunakan normal salin 0,9%. Kelompok II adalah kelompok kontrol positif yang diberi krim *Silver sulfadiazine* 1% 0,5 mg. Kelompok III adalah kelompok yang diberi hidrogel. Kelompok IV adalah yang diberi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 40%. Kelompok V adalah yang diberi ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 50%. Kelompok VI adalah yang diberi ekstrak daun etanol cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 60%.

#### **4.7.6 Prosedur Pembuatan Luka Bakar**

Perlakuan yang harus dilakukan untuk membuat luka bakar pada hewan coba yaitu menentukan area pembuatan luka, dalam percobaan ini pembuatan



luka dilakukan pada punggung sebelah kanan atas tikus agar terhindar dari kemungkinan digigit oleh dirinya sendiri yang dapat memperluas luka. Setelah menentukan area pembuatan luka, kemudian membersihkan dan mencukur area tersebut sampai jarak 5 cm dari area yang dapat dibuat luka. Memasang perlak dan alasnya dibawah tubuh tikus yang akan dibuat luka bakar. Kemudian mencuci tangan, setelah selesai mencuci tangan, kemudian membuka bak steril, selanjutnya memakai sarung tangan steril. Setelah itu, melakukan desinfeksi pada area yang akan dibuat luka dengan menggunakan alkohol. Melakukan anastesi dengan *Ketamin* sebanyak 1-1,5 cc pada area kulit yang akan dibuat luka bakar. Setelah itu, menempelkan besi yang telah dipanaskan selama 8 menit diatas pemantik api dengan menggunakan korentang (klom) pada punggung tikus. Besi tersebut ditempelkan pada punggung tikus selama 6 detik dengan tekanan minimal dan konstan. Setelah 6 detik, besi diangkat kemudian dikompres dengan kassa yang telah dicelupkan kedalam air steril (*Normal saline*). Sekitar 3 detik setelahnya, luka ditutup dengan kassa dan diplester (Azizah, 2012).

#### 4.7.7 Prosedur Perawatan Luka

Perawatan dilakukan 1 kali sehari setiap pagi selama 4 hari. Semua kelompok dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan normal salin 0,9% kemudian diberi perlakuan. Perlakuan pada kelompok pertama hanya diberikan perawatan dengan menggunakan normal salin 0,9%. Perlakuan kelompok kedua diberikan perawatan dengan menggunakan *Silver sulfadiazine* 1% 5 mg, sedangkan perlakuan pada kelompok ketiga diberikan perawatan dengan menggunakan hidrogel. Perlakuan pada kelompok keempat diberikan perawatan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan

konsentrasi 40%. Kelompok kelima diberikan perawatan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 50% dan kelompok keenam diberikan perawatan dengan ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) dengan konsentrasi 60%.

Prosedur yang dilakukan dalam perawatan luka adalah mempersiapkan semua peralatan, kemudian mendekatkan alat, mencuci tangan dan membuka pembungkus dan penutup steril. Setelah itu, memindahkan alat yang diperlukan dari tromol ke dalam bak steril. Kemudian menuangkan alkohol, normal salin 0,9%, hidrogel, *Silver sulfadiazine* dan ekstrak daun cincau hijau ke dalam masing-masing kom atau tempat khusus yang tersedia.

Langkah selanjutnya dalam perawatan luka yaitu melepaskan balutan dengan cara memasang perlak dan alas dibawah area yang akan dilakukan perawatan, mendekatkan bengkok dan tempat sampah. Lalu membuka bagian pinggir perekat dengan kapas yang telah dicelup alkohol. Selanjutnya membuka seluruh balutan dengan cara menggulung ke arah luar dari proximal ke distal dengan pinset. melepaskan ikatan dan kassa yang telah digunakan dengan hati-hati. Meletakkan kassa balutan ke dalam tempat khusus yang telah diberi label untuk ditimbang. Kemudian membuang kassa pengikat ke dalam bengkok.

Langkah berikutnya dalam perawatan luka yaitu membersihkan luka dengan memakai sarung tangan steril. Kemudian, mengkaji luka dengan menginspeksi (kemerahan, pemulihan jaringan, edema), melakukan palpasi terbentuknya kolagen pada bagian dalam, mempalpasi adanya pus. Selanjutnya, mengambil kasa deepres dengan pinset. Kemudian membalut luka dengan balutan normal salin. Untuk kelompok perlakuan 1 diberikan normal salin 0,9%, kelompok perlakuan 2 diberikan krim *Silver sulfadiazine* 1% 5 mg sedangkan



kelompok perlakuan 3 diberikan hidrogel dan kelompok perlakuan 4,5, dan 6 diberikan ekstrak daun cincau hijau sebanyak dosis eksplorasi dengan perawatan luka 1 kali sehari setiap pagi selama 3 hari.

Langkah terakhir dalam perawatan luka yaitu memasang balutan, mengukur kassa sesuai dengan luas luka. Kemudian, melipat kassa ke arah dalam, menambahkan kassa bagian luar dan meletakkan lipatannya dibagian dalam serta memfiksasi balutan dengan plester.

#### **4.7.8 Eksisi Jaringan Luka dan Pembuatan Preparat Jaringan**

Eksisi jaringan luka dan pembuaan preparat jaringan tikus dilakukan dengan cara tikus dikorbankan pada hari ke-4 dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup yang mengandung zat ester. Jaringan luka mencapai batas lapisan otot dieksisi menggunakan pisau bedah 5-10mm batas kulit normal. Jaringan direndam dalam larutan fiksasi formalin 10% kemudian dimasukan kedalam larutan etanol 70% selama 24 jam. Selanjutnya, memindahkan jaringan tersebut ke dalam larutan etanol 60% selama 2 jam, larutan etanol 90% selama 20 menit dan larutan etanol absolut selama 20 menit, dengan 3 kali perlakuan. Memindahkan jaringan luka pada larutan xylol 1 dan 2 masing-masing selama 20 menit. Dilanjutkan pada larutan xylol 3 pada suhu 60-63 °C selama 30 menit. Mencilupkan jaringan luka pada parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah. Menunggu sampai memadai dimana jaringan luka berada dalam blok paraffin (Sumber: Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2012).

#### 4.7.9 Pewarnaan Imunohistokimia

Langkah perwarnaan Immunostaining (Imunohistokimia) antara lain : (1). Hari pertama melakukan defarafinisasi dengan merendam xylol 1 x 5 menit, selanjutnya direndam kembali dengan xylol selama 1x10 menit. Setelah itu, di rendam alcohol 100 % selama 2 x 10 menit, kemudian jaringan disimpan dalam suhu 4°C selama sehari, (2). Hari kedua jaringan dicuci dengan PBS selama 5 menit, selanjutnya jaringan direndam menggunakan *Blocking protein* selama 5 menit. Jaringan dicuci dengan menggunakan PBS selama 3x5 menit, jaringan direndam menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Peroksidase block*) selama 10 menit, kemudian jaringan dicuci menggunakan PBS selama 3 x 5 menit, selanjutnya jaringan dibersihkan dan diberi Antibodi primer (VEGF). Aplikasi Antibodi pertama didiamkan selama 2 jam, jaringan dicuci PBS selama 3 x 5 menit, selanjutnya aplikasi Antibodi sekunder (*Post primary*) selama 1,5 jam, kemudian jaringan dicuci PBS selama 3 x 5 menit. Aplikasi SAHRP selama 40 menit, jaringan dicuci dengan PBS 2 x 5 menit, kemudian dicuci kembali menggunakan aquades selama 2 x 5 menit. Aplikasi DAB cromogen selama 15 menit sambil dilihat dibawah mikroskop berwarna coklat. Selanjutnya jaringan dicuci menggunakan aquades selama 3 x 5 menit dan dikeringkan. (3). 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. (4). Aplikasi *mounting* jaringan dicover dengan menggunakan entelan. Entelan dicampur xylol dengan perbandingan 1:1, kemudian campuran



etelan dan xylol didiamkan terlebih dahulu selama 30 menit. Slide jaringan ditetesi entelan sebanyak 2 tetes. Setelah itu, *cover glass* ditempelkan dan jaringan siap untuk diamati.

#### **4.8 Analisis Data**

##### **4.8.1. Uji Normalitas dan Homogenitas**

Dari hasil penghitungan jumlah ekspresi VEGF luka bakar derajat II B pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan. Kemudian dilakukan uji asumsi statistik *SPSS statistic20 for windows* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel yang diuji kecil ( $\leq 50$ ) dengan  $\alpha = 0,05$ . Jika data menunjukkan *p value*  $> 0,05$ , maka data berdistribusi normal (Sarjono & Julianita, 2011). Kemudian pada uji homogenitas menggunakan uji *Test of Homogeneity of Variance* dengan  $\alpha = 0,05$ . Jika data menunjukkan *p value*  $> 0,05$ , maka data adalah homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One Way ANOVA* (Dahlan, 2009).

##### **4.8.2. Uji One Way ANOVA**

Data hasil penelitian kemudian dianalisa *One way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi *p value*  $< \alpha$  (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi VEGF luka bakar derajat II B antar kelompok (Dahlan, 2009).

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

Setelah hasil penelitian dianalisa dengan *One way ANOVA* kemudian dianalisa dengan *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 dengan nilai  $p \text{ value} < \alpha$  (0,05) (Dahlan, 2009).

#### 4.8.4 Uji Korelasi Person Product Moment

Uji ini digunakan untuk mengetahui derajat hubungan antara variable independen dengan variable dependen dengan menggunakan data interval dan rasio yang dipilih secara acak dan terdistribusi normal yang berpola linear (Hidayat, 2009).

Teknik pengukuran *Pearson Product Moment* ini menggunakan tingkat signifikansi sebesar 5% dengan kriteria jika probabilitas kurang dari 0,05, maka instrumen tersebut dinyatakan valid (Arkunto, 2002). Jika  $t \text{ hitung} \geq t \text{ tabel}$  maka  $H_0$  ditolak artinya terdapat perbedaan yang signifikan, seedangkan  $t \text{ hitung} \leq t \text{ tabel}$  maka  $H_0$  diterima artinya tidak ada perbedaan yang signifikan. Nilai  $t \text{ tabel}$  dapat ditentukan dengan  $dk = n - 1$ , dengan  $\alpha = 0,05$  (Hidayat, 2009).

#### 4.8.5 Uji Regresi Linier Berganda

Uji regresi linier berganda digunakan untuk mengetahui pengaruh satu atau beberapa variable bebas terhadap variable terikat (Sarjono & Julianita, 2013).

#### 4.9 Kode Etik Penelitian

Saat pembuatan luka bakar derajat II tikus akan mengalami rasa nyeri, akan tetapi hal ini akan diantisipasi dengan pemberian anastesi general dengan ketamin sebelum pembuatan luka bakar derajat II B dilakukan. Perdarahan saat pembuatan luka juga dapat terjadi, untuk mengatasinya dilakukan penekanan pada luka menggunakan kassa. Kemungkinan terdapat bahaya potensial yang dapat terjadi dalam penelitian ini yaitu resiko terjadinya infeksi pada luka bakar



derajat II B. Untuk mencegah infeksi, balutan harus diinspeksi dan diganti setiap hari dan apabila terjadi infeksi maka luka diberikan antibiotik (gentamicin salep).

Hal ini didasarkan terhadap prinsip dasar etik penelitian dengan hewan coba. Dalam memanfaatkan hewan percobaan untuk penelitian kesehatan digunakan prinsip 3 R yaitu *Replacement*, *Reduction* dan *Refinement*.

### 1. *Replacement*

Ada dua alternatif untuk *replacement* yaitu :

- a. *Replacement* relatif yaitu tetap melaksanakan hewan percobaan sebagai donor organ, jaringan atau sel.
- b. *Replacement* absolute yaitu tidak memerlukan bahan dari hewan, melainkan memanfaatkan galur cell (*cell lines*) atau program computer.

### 2. *Reduction*

Mengurangi pemanfaatan jumlah hewan percobaan sehingga sesedikit mungkin dengan bantuan ilmu statistic, program computer dan teknik-teknik biokimia serta tidak mengurangi penelitian dengan hewan percobaan apabila tidak perlu.

### 3. *Refinement*

Mengurangi ketidaknyamanan yang diderita oleh hewan percobaan sebelum, selama dan setelah penelitian, misalnya dengan pemberian analgetik.

4.10 Alur Kerja Penelitian

*Post-test Only, Control Group Design*

