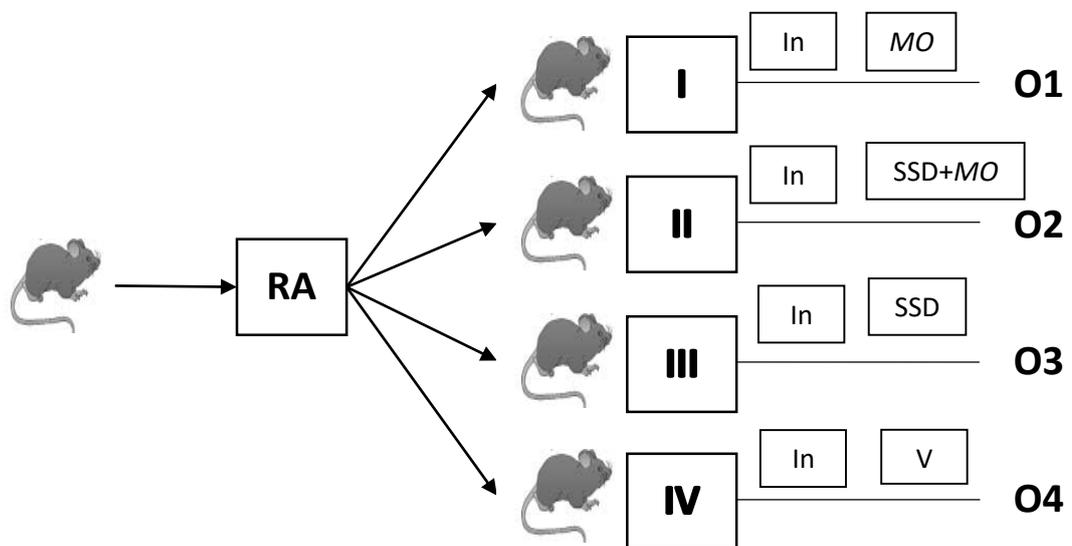


BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Randomized post test with control group*”.

Skema rancangan penelitian :



Keterangan:

RA : Random Alokasi.

In : Induksi luka bakar: adalah perlakuan induksi luka bakar dengan menggunakan besi panas berukuran 2cm x 2cm yang telah direndam dalam air panas bersuhu 100°C selama 2 menit dilakukan dengan ditempelkan ke badan tikus yang telah dicukur bulunya.

I : Kelompok perlakuan dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat induksi (In) dan diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* 10% secara topikal.

II : Kelompok perlakuan dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat induksi (In) dan diberi Silver sulfadiazin secara topikal dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 10% secara topikal.

- III : Kelompok perlakuan dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat induksi (In) dan diberi Silver sulfadiazin secara topikal.
- IV : Kelompok kontrol dari randomisasi sampel, kelompok yang mendapat induksi (In) serta diberikan vehiculum murni secara topikal.
- O1 : Pengukuran sebulan makrofag dengan pewarnaan HE pada pembesaran 400x dan imunohistokimia VEGF dengan pembesaran 100x
- O2 : Pengukuran sebulan makrofag dengan pewarnaan HE pada pembesaran 400x dan imunohistokimia VEGF dengan pembesaran 100x
- O3 : Pengukuran sebulan makrofag dengan pewarnaan HE pada pembesaran 400x dan imunohistokimia VEGF dengan pembesaran 100x
- O4 : Pengukuran sebulan makrofag dengan pewarnaan HE pada pembesaran 400x dan imunohistokimia VEGF dengan pembesaran 100x

4.2 Ruang Lingkup Penelitian

4.2.1 Ruang lingkup disiplin ilmu

Disiplin ilmu yang terkait adalah biomedik, bedah plastik, imunologi, farmakologi, dan histologi.

4.2.2 Ruang lingkup tempat

Tempat yang digunakan untuk penelitian meliputi :

1. Pembuatan ekstrak daun *Moringa oleifera* dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Diponegoro (UNDIP), Semarang
2. Pembuatan krim ekstrak daun *Moringa oleifera* dilakukan di Laboratorium Teknologi Sekolah Tinggi Farmasi (STIFAR), Yayasan Farmasi, Semarang
3. Proses induksi luka bakar, perawatan, dan perlakuan terhadap hewan coba, serta proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) IV Universitas Gajah Mada (UGM), Yogyakarta
4. Proses pembuatan preparat dan pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi (PA) Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret (UNS), Solo.

4.2.3 Ruang lingkup waktu

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 4 minggu. Penelitian ini rencana dilakukan selama bulan September 2018 – Oktober 2018.

4.3 Sampel Penelitian

a) Kriteria inklusi :

1. Tikus jantan umur 2 bulan
2. Strain Wistar yang diinduksi luka bakar *partial thickness*
3. Berat badan \pm 150 - 200 gram setelah aklimitasi selama seminggu di kandang individual
4. Tidak ada abnormalitas anatomis yang nampak

b) Kriteria eksklusi :

Tidak terjadi luka bakar *partial thickness*

c) Kriteria *drop-out* :

Selama induksi dan perlakuan, tikus tampak sakit (gerak tidak aktif) atau mati

c) Besar sampel

Besar sampel menurut WHO untuk tiap kelompok minimal lima ekor hewan coba, dengan cadangan 10% (1 ekor). Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 6 ekor tikus. Setiap tikus kemudian diberi label nomor 1 – 24. Pembagian kelompok dilakukan secara random dengan pengambilan undian.³⁶

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun *Moringa oleifera* 10%

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

1. Pemeriksaan sebukan makrofag
2. Pemeriksaan ekspresi VEGF

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala	Nilai
1.	Ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i> 10%	Pemberian cream yang mengandung ekstrak daun kelor 10 % dengan cara pengolesan pada luka bakar 1x per hari selama 10 hari setebal 1-2 mm	Nominal	1 : diberikan ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i> 10% 2 : diberikan silver sulfadiazin 1% + ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i> 10%
2.	Sebukan makrofag	Jumlah sel dengan nucleus tunggal bentuk bulat, oval, dan lekukan kecil yang diukur pada preparat jaringan luka dengan pewarnaan HE dan dihitung per 5 lapangan pandang di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x pada hari ke-7	Rasio	
3.	Ekspresi VEGF	Ekspresi VEGF diperoleh dari pengecatan secara imunohistokimia VEGF-A. Ekspresi VEGF diukur secara semikuantitatif dengan menggunakan "Allred score" melihat proporsi per 100 sel yang terwarnai dan intensitas dari pewarnaan.	Numerik (Interval)	Skor proporsi (A): 0: 0 % sel terwarnai 1: <1 % sel terwarnai 2: 1-10% sel terwarnai 3: 11-33% sel terwarnai 4: 34-66% sel terwarnai 5: $\geq 67\%$ sel terwarnai Skor intensitas (B): 0: tidak terwarnai 1: intensitas lemah 2: intensitas sedang

3: intensitas kuat

Skor akhir: $A + B = 0-$

8

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah tikus jantan strain Wistar dengan umur 2 bulan dan berat $\pm 150 - 200$ gram. Tikus diperoleh dari LPPT UGM. Tikus dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama satu minggu di kandang individual dengan periode 12 jam terang dan 12 jam gelap. Tikus diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah aklimatisasi, tikus diberi perlakuan.

Ekstrak daun *Moringa oleifera* diperoleh dari Fakultas MIPA UNDIP, bahan yang digunakan adalah ekstrak daun *Moringa oleifera* yang diperoleh dengan cara :^{19,37}

1. Daun *Moringa oleifera* yang diperoleh dikumpulkan dan disortasi basah, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dipisahkan dari tangkainya.
2. Daun *Moringa oleifera* yang sudah bersih dikeringkan, jangan sampai terkena sinar matahari.
3. Setelah kering, daun *Moringa oleifera* disortasi kering dan dikecilkan ukurannya.
4. Serbuk daun dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% (penggantian pelarut hingga pelarutnya bening), kemudian disaring.
5. Setelah penyaringan, ekstrak ethanol yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator*, kemudian ekstrak ethanol ditimbang.
6. Ekstrak ethanol yang dipekatkan dalam *waterbath*, kemudian dilarutkan dalam air panas, kemudian disaring.
7. Ekstrak kental yang didapat dicampur dengan campuran krim sampai didapatkan sediaan ekstrak daun *Moringa oleifera* 10%.

Pembuatan sediaan krim ekstrak daun *Moringa oleifera* 10% dilakukan di Laboratorium Teknologi STIFAR, Yayasan Farmasi, Semarang, dengan formulasi sesuai dengan tabel 5.

Tabel 5. Formula krim ekstrak daun *Moringa oleifera*

Nama Bahan	Komposisi (%)
Asam stearate	15
Setil alcohol	6
Potassium hidroksida	0,7
Metil paraben	0,3
Propil paraben	0,06
Gliserin	5,0
Propilen glikol	3,0
Ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i>	10,0
Aquades (g)	Add 100

Sumber : Sugihartini, 2017³⁸

4.6.2 Alat dan bahan untuk induksi luka bakar pada tikus

1. Alat pencukur
2. Alkohol swab 70%
3. Ketamine 10%
4. Spuit + needle
5. Logam dengan ukuran 20 mm x 20 mm
6. Bejana + air + pemanas
7. Thermometer

4.6.3 Alat dan bahan untuk pemeriksaan mikroskopis (histopatologi)

1. Formalin buffer 10%
2. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
3. Xylol
4. Parafin cair (Histoplast)
5. Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE)
6. Bahan pengecatan imunohistokimia VEGF

7. Kaca obyek atau kaca penutup
8. Kanada balsam

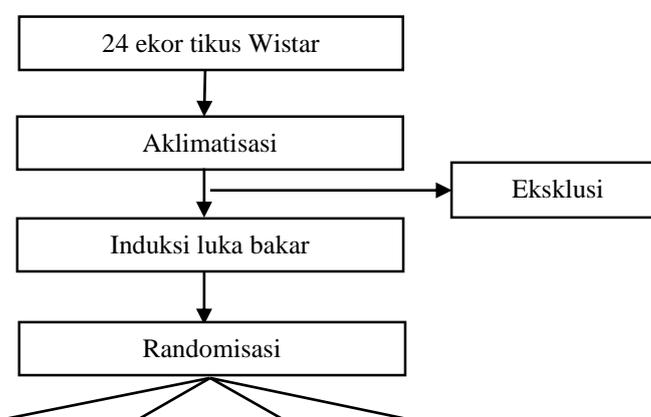
4.6.4 Alat untuk dokumentasi sediaan

1. Mikroskop Olympus seri BX 41
2. Kamera Digital
3. Personal Komputer

4.7 Pelaksanaan Penelitian

Tikus strain Wistar sejumlah 24 ekor dan terbagi dalam 4 kelompok dengan usia 2 bulan dan berat badan \pm 150 - 200 gram, sebelumnya dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama satu minggu di kandang individual. Aklimatisasi ini bertujuan agar hewan coba dapat menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan sekitar sehingga tidak terjadi *drop out*. Seluruh tikus lalu diinduksi luka bakar *partial thickness*. Tikus dirawat dalam suhu ruangan 28-32°C selama aklimatisasi, serta mendapatkan makan dan minum secara *ad libitum*. Tikus diberi anestesi ketamine intramuscular, kemudian diinduksi. Tikus lalu dibagi menjadi 4 kelompok secara random dengan jumlah tikus 6 ekor per kelompok. Perlakuan yang diberikan sesuai dengan alur kerja. Tikus dirawat luka secara terbuka dengan perlakuan masing masing. Tikus diberikan topikal *Moringa oleifera* 10% (I), kombinasi topical Silver sulfadiazine dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 10% (II), topical silver sulfadiazine 1% (III), topical vehiculum murni (IV) sekali setiap hari. Hari ke-7 dan 10 penelitian dilakukan penilaian terhadap status makroskopis luka bakar pada tikus. Hari ke-7 penelitian tikus dilakukan pengambilan jaringan dan pemeriksaan mikroskopis dan imunohistokimia. Hari ke-10 penelitian seluruh tikus diterminasi. Terminasi tikus dilakukan menggunakan obat anestesi ketamin intramuskular.

4.8 Alur Kerja



Imunohistokimia VEGF

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Prosedur induksi luka bakar^{30,31}

1. Tikus diaklimatisasi selama 1 minggu dalam kondisi 12 jam terang dan 12 jam gelap; diberi makan dan minum ad libitum; dalam kandang individual.
2. Setelah aklimatisasi selesai, tikus diberi anestesi dengan ketamine 10% (60mg/kgBB) secara intramuskular.
3. Punggung tikus wistar dicukur seluas 2x2 cm menggunakan alat pencukur.
4. Antiseptis daerah yang akan diinduksi dengan povidone iodine 1% / alcohol 70% dan didiamkan sampai kering.

5. Luka bakar diinduksi menggunakan logam dengan ukuran 2cm x 2cm yang sebelumnya dipanaskan pada air mendidih 100°C dan diukur dengan thermometer.
6. Logam ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 10 detik dengan tekanan \pm 50 gram (berat logam).

4.9.2 Prosedur perawatan luka dan perlakuan

1. Setelah diinduksi, luka bakar pada tikus dibersihkan dengan normal saline setelah bula dan jaringan nekrotik dibersihkan.
2. Tikus diberi perlakuan sesuai kelompok perlakuan.
3. Kelompok kontrol dioleskan vehiculum murni setebal 1-2 mm 1 x sehari selama 14 hari dan dilakukan perawatan secara terbuka.
4. Kelompok perlakuan 1 (I) dioleskan ekstrak daun *Moringa oleifera* 10 % setebal 1-2 mm 1 x sehari dan dirawat terbuka selama 10 hari.
5. Kelompok perlakuan 2 (II) dioleskan krim silver sulfadiazine 1% dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 10% setebal 1-2 mm 1x sehari dan dirawat terbuka selama 7 hari.
6. Kelompok perlakuan 3 (III) dioleskan krim silver sulfadiazine 1% setebal 1-2 mm 1 x sehari dan dirawat terbuka selama 7 hari.
7. Kelompok perlakuan 4 (IV) dioleskan vehiculum murni setebal 1-2 mm 1x sehari dan dirawat terbuka selama 7 hari.
8. Pada hari ke-7, akan dilakukan pengambilan jaringan luka bakar I pada punggung tikus dengan cara :
 - Tikus diberi anestesi dengan ketamine 10% (50 – 75 mg/kgBB) secara intramuscular
 - Dilakukan pemotongan jaringan kulit dan subkutan dengan pisau bedah dengan ukuran 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm
9. Setelah pengambilan jaringan I, tikus diberi analgetik dengan injeksi tramadol (12,5 mg/ kg BB) secara subkutan 1x per hari dan luka bakar I akan diberikan gentamisin topikal dan dilakukan perawatan luka secara tertutup⁽³⁹⁾

4.9.3 Prosedur pembuatan preparat mikroskopis (histopatologi)⁴⁰

a. Fiksasi

Potongan jaringan luka bakar dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0).

Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Trimming

Organ dicecilkan hingga ukuran sekitar 3 mm dan dimasukkan ke dalam embedding cassette.

c. Dehidrasi

Air dikeringkan dengan menggunakan kertas tisu pada embedding cassette. Potongan jaringan luka bakar dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat (80%, 95%, 95%, alkohol absolut I, II, III) masing-masing selama 1 jam.

d. Clearing

Alkohol dibersihkan menggunakan xylol I, II, III masing-masing selama 1 jam.

e. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam dalam incubator dengan suhu 65,1°C.

f. Embedding

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 6 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58°C sampai paraffin mencair.

g. Cutting

Potongan kasar dilanjutkan dengan potongan halus sebesar 3 mikron. Lembaran potongan yang paling baik diapungkan pada air dan dihilangkan

kerutannya. Pindahkan lembaran jaringan ke dalam water bath selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Ambil lembaran jaringan dengan slide bersih dan tempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah jaringan. Keringkan slide, lalu panaskan untuk meratakan jaringan dan sisa paraffin sebelum pewarnaan

h. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca objek dimasukkan dalam:

- | | | |
|---------------------|--------|------------|
| 1. Xylol 1 | 5 | menit |
| 2. Xylol 2 | 5 | menit |
| 3. Alkohol absolute | 3x5 | menit |
| 4. Air mengalir | 1 | menit |
| 5. HE Lilie-Mayer | 20 | menit |
| 6. Air mengalir | 1 | menit |
| 7. Alkohol asam | 3 | celup |
| 8. Air mengalir | 1 & 15 | menit |
| 9. Eosin | 2 | menit |
| 10. Alkohol | 1x2 | menit, 3x3 |
| 11. Xylol | 2x5 | menit |

i. Mounting

Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu kanada balsam kemudian ditutup dengan cover glass dan cegah adanya gelembung udara.

j. Prosedur pulasan imunohistokimia VEGF yaitu:

1. Potong blok parafin menggunakan mikrotom Leica RM 2125 dengan ketebalan 3 μm , kemudian direkatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan poly-L-lysine, merk Sigma, dengan ukuran lebar 1 inchi, panjang 3 inchi dan tebal 1,2 mm.
2. Letakkan gelas objek dalam inkubator dengan suhu 37⁰C selama 1 malam.
3. Deparafinisasi dengan xylol, preparat dicelupkan ke dalam xylol sebanyak 3 kali, masing-masing celupan selama 3 menit.

4. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol absolut 2 kali, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70%, masing-masing selama 3 menit.
5. Cuci dengan aquadest selama 10 menit
6. Teteskan H₂O₂ dalam metanol 3% sampai menutupi seluruh permukaan jaringan selama 15 menit.
7. Cuci dengan aquadest selama 10 menit.
8. Cuci dengan phosphate buffer saline (BPS) sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
9. Rendam dengan bufer sitrat 0,01 M, pH 6,0. Kemudian panaskan di dalam microwave selama 15 menit, mula-mula dengan pemanasan tinggi (80⁰C) sampai tepat mendidih, kemudian dengan pemanasan sedang (50⁰C) selama 5 menit.
10. Dinginkan pada suhu kamar kurang lebih selama 30 menit.
11. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
12. Teteskan 100 µl antibodi primer menggunakan monoclonal mouse antibody *VEGF*, Biologend, yang telah diencerkan (pengenceran 1:100) selama 30 menit pada suhu kamar atau semalam pada suhu 40⁰C.
13. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
14. Teteskan biotinylated Anti Polyvalent selama 10 menit.
15. Cuci dengan buffer saline (BS) sebanyak 2 kali, masing-masing 10 menit.
16. Teteskan streptavidin peroxidase selama 10 menit.
17. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
18. Teteskan dengan reagen DAB selama 10 menit.
19. Cuci dengan air mengalir.
20. Counterstain dengan Mayer Hematoksilin selama 2 menit.
21. Cuci dengan air mengalir.
22. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, dan alkohol absolut 2 kali, masing-masing selama 3 menit.

23. Celupkan ke dalam xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit.
24. Tutup dengan cover glass

4.10 Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data, dengan tahapan :
 - a. Editing / koreksi
 - b. Koding / pemberian kode
 - c. Tabulasi, yaitu memasukkan data ke dalam table yang telah disediakan
 - d. Entry, yaitu memasukkan data ke dalam program *SPSS 25.0 for windows*

2. Analisis data

Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Variabel tergantung disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, dan grafik *box plot*, kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas.

Uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitas, didapatkan distribusi data tidak normal pada variabel ekspresi VEGF, sedangkan pada sebukan makrofag, didapatkan distribusi data normal dan homogen.

Sebukan makrofag dianalisis dengan uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test Bonferoni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Ekspresi VEGF dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Uji ini tidak dilanjutkan dengan analisis perbedaan antar kelompok perlakuan karena didapatkan hasil tidak bermakna.

Uji korelasi dilakukan antara variabel sebukan makrofag dan ekspresi VEGF. Hasil uji normalitas data adalah distribusi data tidak normal, sehingga dilakukan uji korelasi *Spearman*.

3. Interpretasi data

Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

4.11 Persyaratan Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba dengan menerapkan *animal ethics*, yang diperoleh dengan cara pengajuan persetujuan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, sebelum penelitian dimulai. Seluruh hewan coba diberi perlakuan dan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.