

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif secara *true experimental in vivo* menggunakan *post-test only controlled group design* untuk mengetahui efektifitas perawatan ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) terhadap peningkatan kontraksi luka ulkus diabetik derajat II pada tikus Wistar. Pada rancangan ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Masing-masing kelompok kontrol mendapatkan perawatan menggunakan NaCl 0,9% dan hidrogel (Duoderm *Hydroactive Gel*<sup>®</sup>) dengan kandungan *sodium carboxymethylcellulose*. Kelompok perlakuan pertama mendapatkan perawatan menggunakan ekstrak cacing tanah secara topikal pada konsentrasi 100 µg/ml, kelompok perlakuan kedua mendapatkan perawatan menggunakan ekstrak cacing tanah secara oral pada dosis 100 mg/kgBB dan kelompok perlakuan ketiga mendapatkan perawatan menggunakan ekstrak cacing tanah secara topikal dan oral pada konsentrasi 100 µg/ml dan dosis 100mg/kgBB.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

##### 4.2.2 Sampel

Sampel Sampel yang digunakan adalah masuk kriteria inklusi. Hal ini untuk menghindari faktor-faktor perancu yang mempengaruhi proses

penyembuhan luka. Peneliti menghomogenkan sampel dengan memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

#### **Kriteria Inklusi**

- a. Jenis tikus adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.
- b. Jenis kelamin jantan, karena sel  $\beta$  islet pankreas tikus jantan lebih sensitif terhadap *cytotoxicity* STZ dibandingkan dengan tikus betina sehingga meminimalkan kegagalan induksi tikus model DM (Mendes *et al.*, 2012).
- c. Umur 8-10 minggu (usia pertumbuhan), karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan ini cepat sehingga mendukung proses kontraksi luka.
- d. Kondisi sehat, ditandai dengan pergerakan aktif; jinak; berbulu licin, mengkilat, dan bersih; rambut tebal dan tidak kusam; badan tegap; tidak ada luka; tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga; tidak terlalu banyak ludah; tidak diare; dan pernapasan tenang.
- e. Berat badan antara 150-200 gram.
- f. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya.

#### **Kriteria Eksklusi**

- a. Tikus sakit selama periode aklimatisasi atau pada saat penelitian.
- b. Luka mengalami infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah), eksudat yang berlebihan, bau busuk.
- c. Tikus mati.

### 4.2.3 Besar Sampel

Perlakuan pada penelitian ini sebanyak 5 jenis, sehingga perhitungan jumlah sampel untuk rancangan acak kelompok secara sederhana dapat dirumuskan sebagai berikut (Hidayat, 2009):

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 20$$

$$r \geq 5$$

Keterangan: "t" adalah banyaknya perlakuan dan "r" adalah banyaknya sampel. Jadi dalam penelitian ini diperlukan jumlah sampel minimal 5 tikus untuk masing-masing perlakuan, sehingga total sampel berjumlah 25 ekor tikus.

## 4.3 Variabel Penelitian

### 4.3.1 Variabel Tergantung Penelitian

Kontraksi luka pada ulkus diabetik derajat II.

### 4.3.2 Variabel Bebas Penelitian

Ekstrak cacing tanah secara topikal (konsentrasi 100 µg/ml), oral (dosis 100 mg/kgBB), dan topikal-oral (konsentrasi 100 µg/ml dan dosis 100 mg/kgBB).

## 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 1 April - 30 Juli 2013. Validasi sampel cacing tanah spesies *Pheretima aspergillum* dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

## 4.5 Alat dan Bahan/Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Pembuatan Ekstrak Cacing Tanah

#### 4.5.1.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi cacing tanah antara lain: oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, pendingin spiral/rotary evaporator, selang *water pump*, *water bath*, *vacum pump*. Bahan yang digunakan antara lain: cacing tanah (*Pheretima aspergillum*), etanol 70%, aquades, dan botol hasil ekstrak.

#### 4.5.1.2 Cara Kerja

Proses ekstraksi mengikuti standardisasi Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Malang, dengan cara kerja sebagai berikut :

- a. Cacing tanah dikeringkan dan diblender untuk menghasilkan bubuk halus.
- b. Metode ekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 70%.
- c. Tuangkan pelarut dengan perbandingan (1:3) yaitu 1 kilogram bahan dalam 3 liter pelarut.
- d. Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk.
- e. Setelah 2x24 jam, saring bahan dengan kertas saring whatman no 40.
- f. Pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut.

- g. Oven sisa pelarut yang masih tersisa pada suhu rendah (40°C) hingga bahan benar-benar tidak mengandung pelarut.
- h. Stok ekstrak cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) yang ada kemudian diencerkan dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1 : konsentrasi sebelum pengenceran (100%)

V1 : volume sebelum pengenceran (volume ekstrak yang dicari)

M2 : konsentrasi sesudah pengenceran (konsentrasi yang dicari)

V2 : volume sesudah pengenceran (volume ekstrak yang diteteskan)

Proses ekstraksi maserasi 500 gram cacing tanah (*Pheretima aspergillum*) menghasilkan ekstrak etanol cacing tanah berbentuk pasta sebanyak 36 gram. Pengenceran stok ekstrak cacing tanah menjadi konsentrasi yang diinginkan dilakukan dengan menambahkan aquades dengan jumlah yang telah didapatkan melalui rumus di atas. Pengenceran dilakukan setiap hari. Sisa ekstrak yang sudah jadi disimpan dalam lemari pendingin.

Hasil dari perhitungan dengan rumus menghasilkan komposisi volume ekstrak dan aquades sebagai berikut :

- a. Konsentrasi 100 µg/ml

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \mu\text{g/ml} \times V1 = 100 \mu\text{g/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,1 \text{ ml add aquades } 1 \text{ ml}$$

b. Dosis 100 mg/kgBB

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ mg/ml} \times V1 = 100 \text{ mg/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,1 \text{ ml add aquades 1 ml}$$

Pada perhitungan dosis 100 mg/kgBB terlebih dahulu dihitung dengan konsentrasi 100 mg/ml oleh karena pemberian ekstrak dilakukan dengan sonde sebanyak 1 ml, selanjutnya ekstrak diberikan sesuai dengan berat badan tikus coba.

#### 4.5.2 Induksi Diabetes Melitus (DM)

##### 4.5.2.1 Dosis *Streptozotocin* (STZ)

Induksi DM dilakukan dengan injeksi STZ (*streptozotocin*) intraperitoneal dalam buffer sodium sitrat 0,1 M pH 4,5 (Mendes *et al.*, 2012). Penelitian Arora *et al* (2009) pada mencit menggunakan STZ dosis tunggal 180 mg/kgBB dapat menginduksi DM tipe I sedangkan STZ dosis 40 mg/kgBB yang diberikan selama 5 hari berturut-turut dapat menyebabkan DM tipe II. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sobrevilla *et al* (2011) pada mencit menggunakan STZ dosis tinggi tunggal (130 mg/kgBB dan 150 mg/kgBB) serta dosis rendah berulang (40 mg/kgBB) sebanyak 4 kali atau lebih dapat menginduksi DM tipe I sedangkan STZ dosis rendah (40 mg/kgBB) yang diberikan sebanyak 3 kali berturut-turut dapat menginduksi DM tipe II. Sementara itu, penelitian Wang *et al* (2013) pada tikus diabetik tipe 2 menggunakan injeksi STZ dosis tunggal 35 mg/kgBB. Dosis STZ yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Zangiabadi *et al* (2011) tentang efek melatonin terhadap pencegahan neuropati pada tikus diabetik yaitu menggunakan injeksi STZ dosis tunggal 45 mg/kgBB.

#### 4.5.2.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan tikus model DM menurut Wu dan Huan (2008) adalah sebagai berikut: tikus, diet nutrisi hewan pengerat standar (Harlan), kandang tikus, spuit 3 cc, *needle* 23-G, alat tes glukosa darah (*glukometer*, *blood lancet*, *test strips*), timbangan, 1,5 ml *microcentrifuge tubes*, aluminium foil, STZ, buffer sodium sitrat 0,1 M pH 4.5 (natrium sitrat, asam sitrat, aquades, pH meter), sukrosa 10%.

#### 4.5.2.3 Cara Kerja

Tindakan yang harus dilakukan untuk membuat tikus model DM adalah sebagai berikut (Wu dan Huan, 2008; Zangiabadi *et al.*, 2011).

- a. Selama 5 hari menjelang eksperimen, tempatkan 2 hingga 5 ekor tikus per kandang dengan suhu  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dan kelembapan  $55\% \pm 5\%$ , dengan siklus gelap terang selama 12 jam (lampu dinyalakan pada pukul 08.00 dan dimatikan pada pukul 20.00). Berikan akses makan dan minum secara bebas.
- b. Timbang semua tikus secara akurat hingga 1 gram. Secara acak bagi tikus kedalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.
- c. Pada hari pertama eksperimen, puasakan semua tikus selama 6-8 jam sebelum induksi STZ. Sediakan minum secara normal.
- d. Siapkan buffer sodium sitrat 0,1 M pH 4,5 (natrium sitrat 2,94 gram ditambahkan asam sitrat dan aquades, homogenasi, ukur pH 4,5, *add* aquades 100 ml).
- e. Tempatkan 1 ml buffer kedalam masing-masing 1,5 ml *microcentrifuge tubes* dan tutupi dengan aluminium foil untuk melindungi STZ dari cahaya (STZ sensitif terhadap cahaya).

- f. Larutkan STZ kedalam buffer sodium sitrat hingga konsentrasi akhir 10 mg/ml. STZ harus disiapkan segar (*fresh*) untuk masing-masing injeksi dan diinjeksikan dalam 5 menit setelah dilarutkan karena STZ akan terurai dalam buffer sitrat dalam waktu 15-20 menit. STZ harus disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk menghindari proses *desiccation*.
- g. Gunakan spuit 3 cc dan *needle* 23-G, injeksikan larutan STZ intraperitoneal dosis 45 mg/kg pada kelompok perlakuan. Injeksikan volume buffer sitrat yang setara pada kelompok kontrol intraperitoneal.
- h. Kembalikan tikus ke kandang. Sediakan pakan secara normal dan air yang mengandung sukrosa 10%. Beberapa tikus dapat mati secara mendadak akibat nekrosis sel  $\beta$  islet pankreas secara masif sehingga menyebabkan hipoglikemia yang fatal dalam 1-2 hari setelah induksi STZ. Untuk mencegah hal ini maka perlu diberikan air yang mengandung sukrosa 10%.
- i. Pada hari ke-2, ganti 10% air sukrosa dengan air biasa.
- j. Tiga hari setelah injeksi STZ, glukosa darah diukur melalui vena ekor dengan menggunakan glukometer. Tikus dengan kadar glukosa darah acak  $>200$  mg/dL atau kadar glukosa darah puasa  $>150$  mg/dL dinyatakan sebagai diabetik.

### 4.5.3 Induksi Ulkus Diabetik Derajat II

#### 4.5.3.1 Alat dan Bahan

Induksi ulkus diabetik derajat II pada penelitian ini menggunakan eksisi seluruh lapisan kulit (*full thickness*) dengan menghilangkan lapisan subkutan



pada kulit berukuran standar 15x15 mm<sup>2</sup> mengacu pada penelitian Ukong *et al* (2008). Peneliti yang melakukan induksi ulkus diabetik merupakan orang yang sama untuk semua tikus guna menghindari bias. Alat dan bahan yang digunakan dalam induksi ulkus diabetik adalah sebagai berikut (Mendes *et al.*, 2012; Ukong *et al.*, 2008): sarung tangan steril, kom steril, kasa steril, perlak, bengkok, alat cukur, penggaris, pinset anatomis, pisau bedah, spuit 1cc, *signet*, obat anestesi *ketamine hydrochloride*, NaCl 0,9%, alkohol.

#### 4.5.3.2 Cara Kerja

Tindakan yang harus dilakukan untuk membuat ulkus diabetik derajat II adalah sebagai berikut (Mendes *et al.*, 2012; Ukong *et al.*, 2008).

- a. Pada hari induksi luka (disebut hari ke-0), masing-masing tikus dianestesi dengan injeksi *ketamine hydrochloride* 25 mg/kg
- b. Tentukan area yang akan diinduksi yaitu bagian punggung (*dorsal skin*). Bersihkan dan cukur area tersebut sampai jarak 3 cm dari area yang akan dibuat luka.
- c. Pasang perlak tikus, buka bak steril, dan pakai sarung tangan steril.
- d. Desinfeksi area yang akan dibuat luka, tunggu sampai alkohol kering.
- e. Lakukan eksisi seluruh lapisan kulit (*full thickness*) hingga lapisan subkutan menggunakan pisau bedah dengan bantuan *signet* (pola) berukuran standar 15x15 mm<sup>2</sup>.
- f. Bersihkan luka dengan NaCl 0,9%, keringkan, dan tutup luka dengan kasa.

#### 4.5.4 Perawatan Ulkus Diabetik Derajat II

##### 4.5.4.1 Alat dan Bahan

Perawatan ulkus dilakukan selama 21 hari sesuai penelitian Juranek *et al* (2013) tentang injuri saraf *sciatic*. Alat dan Bahan untuk perawatan ulkus diabetik derajat II adalah sebagai berikut (Rainey, 2002; Dealey, 2005): masker, sarung tangan steril, bak instrumen kecil, pinset anatomis, kom steril, kasa steril, lidi kapas steril, bengkok, perlak dan alasnya, plester, gunting plester, korentang dan tempatnya, NaCl 0,9%, Hidrogel, sediaan ekstrak cacing tanah konsentrasi 100 µg/ml dan dosis 100 mg/kgBB. Perawatan ulkus secara oral menggunakan sonde.

##### 4.5.4.2 Cara Kerja

- a. Cuci tangan.
- b. Tempatkan perlak yang dilapisi kain di bawah luka yang akan dirawat.
- c. Atur posisi tikus sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- d. Tempatkan bengkok dekat dengan luka yang akan dirawat.
- e. Pakai masker dan sarung tangan steril.
- f. Siapkan ukuran kasa sesuai dengan besarnya ulkus.
- g. Debridemen ulkus dengan NaCl 0,9%.
- h. Pada kelompok kontrol negatif, kompres ulkus dengan kasa yang dibasahi dengan NaCl 0,9% sebanyak 1 cc.
- i. Pada kelompok kontrol positif, oleskan Hidrogel secara merata pada ulkus dengan menggunakan lidi kapas steril.

- j. Pada kelompok perlakuan topikal, tetesi 1 cc ekstrak cacing tanah (konsentrasi 100 µg/ml) pada area ulkus menggunakan spuit tanpa jarum.
- k. Pada kelompok perlakuan oral, berikan 1 cc ekstrak cacing tanah (dosis 100 mg/kgBB) menggunakan sonde. Ulkus dikompres dengan kasa yang dibasahi dengan NaCl 0,9% sebanyak 1 cc.
- l. Pada kelompok perlakuan topikal-oral, tetesi 1 cc ekstrak cacing tanah (konsentrasi 100 µg/ml) pada area ulkus menggunakan spuit tanpa jarum dan berikan 1 cc ekstrak cacing tanah (dosis 100 mg/kgBB) dengan sonde.
- m. Tutup ulkus dengan kasa steril berukuran sesuai dengan luas ulkus kemudian tutup kembali dengan kasa steril berukuran lebih besar.
- n. Plester dengan *autoclave tape* (plester berbahan dasar karet dan resin)
- o. Rapikan alat.
- p. Cuci tangan.

#### 4.5.5 Teknik Sterilisasi

##### 4.5.5.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut (Rutala *et al.*, 2008): *autoclave* dan korentang.

##### 4.5.5.2 Cara Kerja

*Autoclave* digunakan untuk mensterilkan instrumen dan obyek lain menggunakan tekanan uap (*steam under pressure*). Dua tipe dasar *autoclave* meliputi *gravity displacement autoclave* dan *high-speed prevacuum sterilizer*.

Prinsip dasar sterilisasi uap dengan *autoclave* adalah dengan memapar masing-masing item pada uap secara langsung pada suhu dan tekanan tertentu dalam waktu tertentu. Empat parameter sterilisasi uap *autoclave* meliputi uap, tekanan, suhu, dan waktu. Uap ideal untuk proses sterilisasi adalah uap kering yang tersaturasi (*dry saturated steam*) dan *entrained water* (fraksi kering  $\geq 97\%$ ). Dua suhu uap umum yang digunakan adalah  $121^{\circ}\text{C}$  ( $250^{\circ}\text{F}$ ) dan  $132^{\circ}\text{C}$  ( $270^{\circ}\text{C}$ ). Periode sterilisasi alat yang terbungkus dengan *autoclave* adalah 30 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  ( $250^{\circ}\text{F}$ ) dalam *gravity displacement sterilizer* atau 4 menit pada suhu  $132^{\circ}\text{C}$  ( $270^{\circ}\text{C}$ ) dalam *prevacuum sterilizer* (Rutala *et al.*, 2008). Sterilisasi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Malang (untuk ekstrak) dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (untuk peralatan logam, kasa, sarung tangan, dan lidi kapas).

#### 4.5.6 Aklimatisasi dan Pemeliharaan Sampel

##### 4.5.6.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan untuk pemeliharaan tikus adalah kandang tikus, penutup kandang, botol air, makanan tikus, alas tidur, kertas label, dan spidol *marker*.

##### 4.5.6.2 Cara Kerja

Pada periode aklimatisasi selama 7 hari pertama, tikus ditempatkan dalam 6 kandang besar, masing-masing berisi 5 ekor tikus, untuk memulai adaptasi. Kemudian pada 11 hari selanjutnya, tikus ditempatkan dengan cara satu kandang untuk satu tikus. Satu kandang yang disediakan ditempati satu tikus untuk menghindari perkelahan antar hewan coba dan menimbulkan luka baru (National Academy of Science, 2010). Tikus ditempatkan pada kandang persegi panjang dengan luas  $\pm 650 \text{ cm}^2$ , dilapisi kertas kardus sebagai pengganti

sekam yang diganti setiap 1 hari sekali agar tetap kering dan tidak lembab, dan diberi penutup kandang. Alas tidak menggunakan sekam untuk mencegah kontaminasi serbuk-serbuk sekam pada ulkus diabetik yang rentan terhadap infeksi. Tikus diberikan akses bebas terhadap makanan dan minuman yaitu *comfeed* 15-20 gram dan air mineral 15-30 ml/hari. Tikus diberi tanda pada ekornya dan pemberian kode pada kandang tikus untuk menghindari kesalahan penilaian atau tikus tertukar.



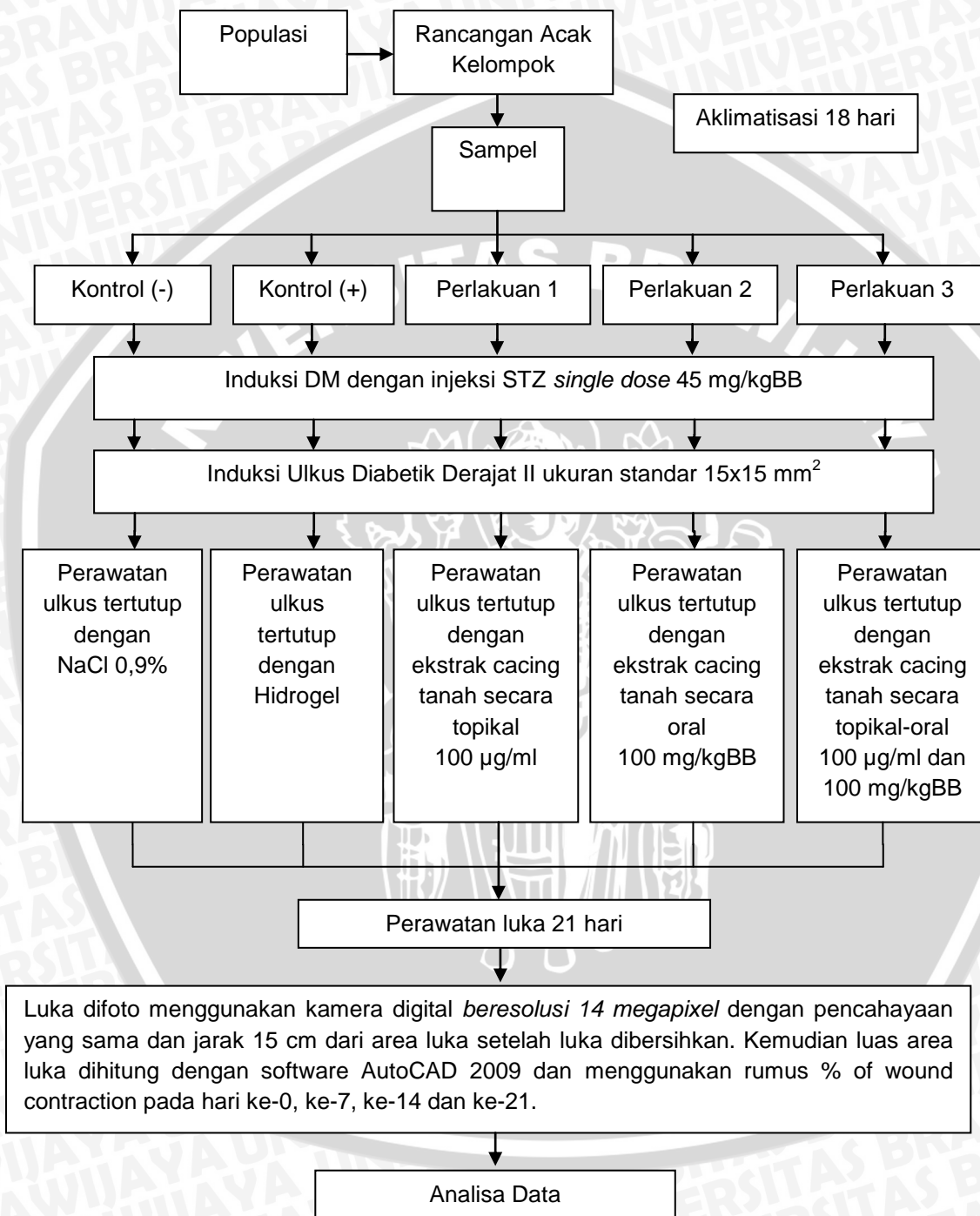
#### 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Satuan	Skala
1	Kontraksi Luka	Proses terjadinya kontraksi luka dengan menghitung pengurangan luas area luka mulai hari ke-0 setelah diinduksi ulkus diabetik derajat II yang digunakan sebagai ukuran luka awal sebelum diberi perlakuan kemudian diukur dan diamati pada hari ke-4, ke-7, ke-14 dan ke-21 setelah luka dirawat dan diberi perlakuan (Halim et al., 2011). Luka difoto menggunakan kamera digital <i>beresolusi 14 megapixel</i> dengan pencahayaan yang sama dan jarak 15 cm dari area luka setelah luka dibersihkan. Kemudian diukur panjang lukanya menggunakan skala ukur 1:100, artinya adalah 1 cm pada penggaris dibandingkan 100 pada garis yang di buat pada software AutoCAD 2009 kemudian luas area luka dihitung dengan software AutoCAD 2009 (Pirbalouti et al., 2009). Setelah itu, dihitung kontraksi luka menggunakan rumus % of wound contraction pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21 (Halim et al., 2011).	Analisa luas luka dengan software <i>Auto CAD 2009</i>	Prosentase (%)	Rasio
2	Metode Ekstraksi Cacing Tanah	Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, bahan direndam dan didiamkan pada suhu kamar selama 2x24 jam, kemudian disaring dengan kertas saring whatman no. 40, dan selanjutnya dilaku-kan proses evaporasi menggunakan suhu 40°C. Hasil ekstraksi disimpan dalam botol plastik pada suhu 4°C.	-	-	-
3	Induksi Ulkus Diabetik Derajat II	Tikus diabetik dilakukan eksisi seluruh lapisan kulit ( <i>full thickness</i> ) hingga lapisan subkutan pada kulit bagian punggung ( <i>dorsal skin</i> ) menggunakan pisau bedah dan <i>signet</i> (pola) ber-ukuran standar 15x15 mm <sup>2</sup> .	-	-	-
4	Perawatan Ulkus Diabetik Derajat II	Perawatan ulkus diabetik derajat II menggunakan ekstrak etanol cacing tanah yang diencerkan dalam konsentrasi 100 µg/ml dan dosis 100 mg/kgBB menggunakan aquades berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus pengenceran dan diberikan secara topikal, oral, topikal-oral pada area ulkus berukuran 15x15 mm <sup>2</sup> dengan sebelumnya ulkus dibersihkan menggunakan NaCl 0,9%. Setelah perawatan ulkus ditutup dengan kasa steril, perawatan ulkus dilakukan setiap hari pada pukul 14.00-17.00 WIB selama 21 hari.	Skala volume pada spuit 1cc	Mililiter	Rasio

## 4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

### 4.7.1 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

## 4.7.2 Pengumpulan Data

### 4.7.2.1 Metode Pengumpulan Data

Peneliti langsung mengamati hasil penelitian secara berulang. Pengumpulan data dilakukan sekali setiap hari pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21 pada saat perawatan luka di Laboratorium Faal FKUB pada pukul 14.00–17.00 WIB.

### 4.7.2.2 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan teknik observasi eksperimen, dimana sampel dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Perawatan luka dilakukan pada masing-masing sampel setiap hari hingga hari ke-21. Pengukuran luas area luka dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan, yaitu pada hari ke-0 setelah tikus diinduksi ulkus diabetik derajat II yang digunakan sebagai ukuran luas awal area luka sebelum diberi perlakuan kemudian luka diukur pada hari ke-7, ke-14 dan ke-21 baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol untuk melihat proses kontraksi luka (Halim et al., 2011).

### 4.7.2.3 Identifikasi Kontraksi Luka

Proses identifikasi kontraksi luka diukur berdasarkan luas luka. Karakteristik dasar luka seperti luas luka, kedalaman dan durasi penyembuhan merupakan indikator yang prediktif untuk menganalisis laju penyembuhan luka (Margolis dan kantor, 2009). Proses identifikasi luas luka dilakukan pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21. Setelah luka dibersihkan kemudian difoto menggunakan kamera digital *beresolusi 14 megapixel* dengan pencahayaan yang sama dan jarak 15 cm dari luka, kemudian diukur panjang lukanya menggunakan penggaris sebagai skala ukur 1:100. Ukuran luas area luka dianalisis menggunakan *software AutoCAD 2009* karena lebih *presisi* guna



memperoleh data kuantitatif (Pirbalouti *et al.*, 2009). Prosedur penghitungan luas area luka dengan software AutoCAD 2009, yaitu :

1. Buka software AutoCAD 2009
2. Masukkan gambar klik Insert pilih Raster Image Referencee, select image file dan open, muncul image tekan OK, kemudian enter dan klik pada layar model AutoCAD 2009. Gambar bisa diperkecil dan diperbesar menggunakan mouse pointer.
3. Klik line letakkan pada layar model AutoCAD 2009, tarik garis lurus pada sudut 0° dan ketik angka 100 kemudian enter dan ESC.
4. Pindahkan garis lurus sepanjang 100 ke dalam gambar sejajar penggaris 1 cm dengan cara klik garis lurus, klik move, tarik garis lurus dan klik pada penggaris. Garis disesuaikan dengan panjang penggaris 1 cm. Jika garis terlalu panjang, gambar dikecilkan dan sebaliknya. Apabila garis tidak sejajar penggaris dilakukan rotate pada gambar untuk menyesuaikan garis sepanjang 100 pada penggaris 1 cm.
5. Hitung luas luka dengan cara klik polyline kemudian membuat garis sesuai luas area luka, tekan enter dan ESC, klik pada salah satu titik garis, klik kanan dan pilih properti akan muncul hasil luas area lukanya dalam satuan mm<sup>2</sup>.

Kontraksi luka dihitung menggunakan rumus ( Bairy *et al.*, 2012) :

$$\% \text{ of wound contraction} = \frac{\text{Initial wound size} - \text{Specific day wound size}}{\text{Initial wound size}} \times 100$$

## 4.8 Analisis Data

### 4.8.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Dari hasil penghitungan kontraksi luka ulkus diabetik derajat II pada masing-masing sampel setiap perlakuan, dilakukan uji asumsi statistik *SPSS statistic18 for windows* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan statistik uji *Shapiro-Wilk* dengan  $\alpha = 0,05$ , karena jumlah sampel kurang dari 30. Jika data menunjukkan *p value*  $> 0,05$ , maka data berdistribusi normal. Kemudian pada uji homogenitas/keragaman data menggunakan uji *Lavene Statistic* dengan  $\alpha = 0,05$ , jika pada tabel *test of Homogeneity of Variance* menunjukkan nilai signifikansi *p value*  $> 0,05$ , maka data adalah homogen dan memiliki varian sama, sehingga dapat dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA* (Dahlan, 2009).

### 4.8.2 Uji Perbedaan Antar Kelompok

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan uji statistik *One way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok uji coba. Jika diperoleh nilai signifikansi *p value*  $< \alpha$  (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap proses kontraksi luka ulkus diabetik derajat II pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21 (Dahlan, 2009).

### 4.8.3 Uji Perbandingan Berganda

Setelah hasil penelitian dianalisa dengan *One way ANOVA* kemudian dianalisa dengan *Post Hoc Test* (Bairy et al, 2012) 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 value*  $< \alpha$  (0,05) (Dahlan, 2009).