

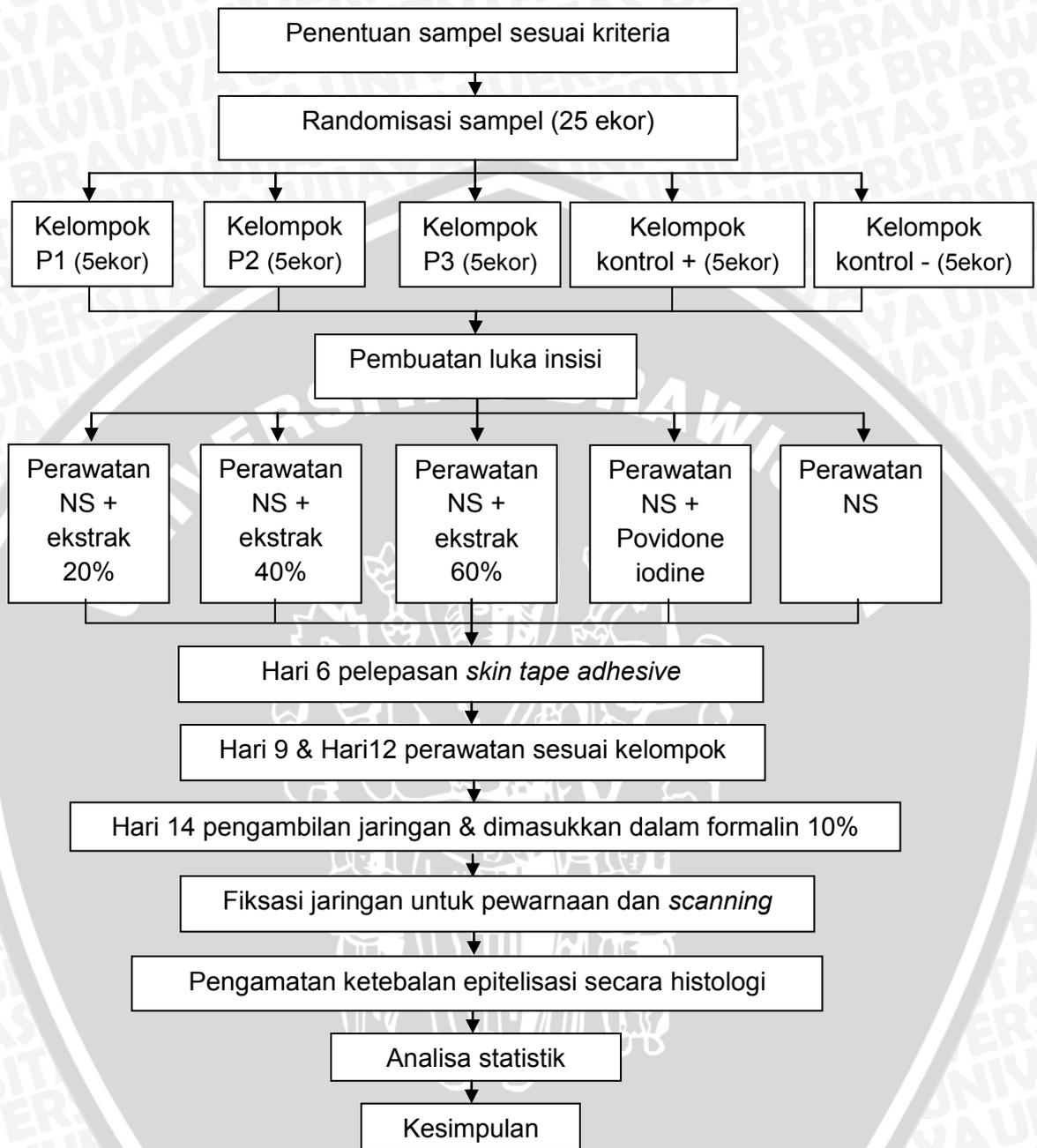
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *True-experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group* sehingga pengambilan data hanya akan dilakukan sekali, yakni pada akhir penelitian (Notoatmodjo, 2012). Selain itu dalam pemilihan sample kelompok menggunakan metode *simple random sampling* hal ini dilakukan untuk meminimalka bias yang mungkin terjadi.

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar. Dalam penelitian ini terdapat 2 kelompok, yakni kelompok perlakuan dengan 3 jenis konsentrasi ekstrak bunga cengkeh (20%, 40%, dan 60%) dalam sediaan cair, kelompok kontrol positif dengan *povidone iodine* dan larutan *normal saline*, dan kelompok kontrol negatif dengan larutan *normal saline*. Dengan keluaran yang akan dijadikan patokan pengukuran adalah ketebalan epitelisasi pada luka. Bagan rancangan kerja penelitian dapat dilihat pada gambar bagan 4.1.



Gambar 4.1 Rancangan Kerja Penelitian

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novvergicus*) galur wistar yang merupakan salah satu jenis mamalia. Pemilihan hewan coba ini didasarkan pada kemiripan respons fisiologis dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respon biologis yang hampir sama dengan manusia. Untuk meminimalisir faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka maka peneliti mencantumkan kriteria inklusi dan eksklusi serta memastikan bahwa sampel homogen.

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi yang harus dipenuhi dalam menentukan sampel antara lain :

a. Kriteria inklusi:

- Tikus galur wistar
- Umur 2 – 2,5 bulan karena pada usia ini proliferasi cepat sehingga mendukung proses penyembuhan luka.
- Berat badan 150-200 gram
- Kondisi sehat ditandai dengan tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak; pergerakan aktif; jinak; rambutnya licin, mengkilat, bersih, tidak rontok, tebal dan tidak kasap; tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga; tidak terlalu banyak ludah; tidak mencret; dan pernafasan tenang
- Tikus tidak mendapat pengobatan sebelumnya

b. Kriteria eksklusi :

- Tikus yang mengalami penurunan kondisi fisik
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

Untuk meminimalkan atau menghilangkan faktor perancu yang timbul dari lingkungan pemeliharaan tikus selama masa penelitian maka, akan dilakukan perawatan dasar penyediaan lingkungan yang sama pada semua sampel antara lain:

1. Tikus pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan (restrain) dan diletakkan pada kandang, dengan kapasitas 1 kandang 1 tikus.
2. Sekam pada kandang diganti sebanyak 3 hari satu kali
3. Tikus diberi minum dan nutrisi dengan jumlah dan jenis yang sama di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Makanan tikus sebanyak 40 gram/hari terbuat dari makanan ayam buras (campuran jagung, bekatul, pollard, DDGS, rapeseed, copra meal, CPO, vitamin, dan mineral) dan tepung terigu dengan perbandingan 3:1. Minuman tikus adalah air masak biasa dalam botol sebanyak 20-45 ml.
4. Semua tikus diberikan anastesi dengan lidokain sebanyak 0,5 ml dalam 1 ml akuades secara intramuskular sebelum dilakukan perlakuan untuk menghindari adanya nyeri.
5. Semua tikus diberi perlakuan yang sama, yaitu dilakukan perlakuan secara insisi pada bagian punggung dorsolateral, lalu diberikan *adhesive tape closure* untuk menyatukan tepi luka, kemudian diberi perawatan luka sesuai kelompok dan dibalut dengan menggunakan *transparent film dressing*.

4.2.2 Teknik Sampling

Pada penelitian ini menggunakan teknik sampling berupa *Simple Random Sampling*. Hal ini dilakukan untuk memberikan kesempatan yang sama pada setiap anggota populasi untuk dijadikan sampel penelitian. Lebih jelasnya dalam

pemilihan sample peneliti menggunakan *lottery technique* atau teknik undian untuk menentukan setiap sample untuk tiap kelompoknya (Notoatmodjo, 2012).

4.2.3 Besar Sampel

Untuk penelitian pada laboratorium dan menggunakan metode *sampling* acak (random) maka dapat digunakan rumus Federer. Pada penelitian ini terdapat lima kelompok dengan perhitungan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(n-1) (t-1) > 15$$

dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan (Hidayat, 2008; Supranto, 2000).

$$(n-1) (t-1) > 15$$

$$(n-1) (5-1) > 15$$

$$(n-1) 4 > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 15 + 4$$

$$n > 19/4$$

$$n > 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Dari hasil perhitungan tersebut dapat disimpulkan jumlah sampel minimal pada masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini terdiri dari 5 tikus.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tanggal 21 Februari – 07 Maret 2014.

4.4 Variabel Penelitian

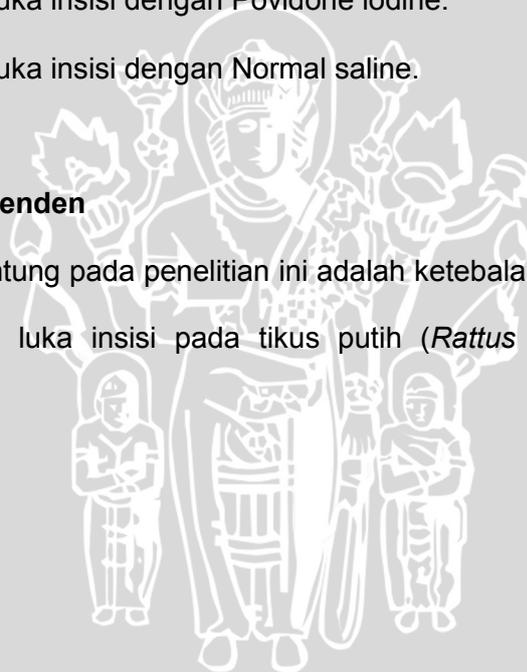
4.4.1 Variabel Independen

Variabel independen pada penelitian ini adalah:

- Perawatan luka insisi dengan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 20%, 40%, dan 60%.
- Perawatan luka insisi dengan Povidone iodine.
- Perawatan luka insisi dengan Normal saline.

4.4.2 Variabel Dependen

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ketebalan epitelisasi dalam proses penyembuhan luka insisi pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar.



4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Tabel Definisi Operasional

No.	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Luka Insisi	Luka insisi dibuat pada punggung tikus dengan panjang 4 cm dan dengan kedalaman ± 1 mm lalu dilakukan penyatuan tepi luka dengan menggunakan <i>skin tape adhesive</i> dengan jarak antar stripsnya $\pm 0,5$ cm.	Terdapat luka insisi dengan panjang 4 cm dan kedalaman ± 1 mm	-
2.	Ekstrak bunga cengkeh	Bahan perawatan luka insisi dari bunga cengkeh yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 95%, ekstrak yang sudah jadi lalu diencerkan dengan akuades steril dan dibuat konsentrasi 20%, 40%, dan 60%.	%	Rasio
3	Ketebalan Epitelisasi	Pengukuran ketebalan epitel dilakukan pada hari ke-14. Ketebalan epitel diukur dengan membuat preparat histologi jaringan kulit yang dipotong secara vertikal kemudian dilakukan pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> . Kemudian hasil pewarnaan akan dilakukan proses scanning terlebih dahulu dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC 10 dan bantuan software <i>dotSlide</i> . Dengan gambar hasil scanning inilah pengukuran ketebalan epitel akan dilakukan. Jaringan epitel adalah jaringan yang mempunyai susunan yang rapat, dan terletak atau bertempat di atas membran basalis (<i>stratum basale</i>) Pengamatan ketebalan epitel menggunakan mikroskop perbesaran 100x. ketebalan lapisan epitel diukur menggunakan micrometer, dari lapisan <i>stratum korneum</i> sampai dengan <i>stratum basale</i> (Aryenti dalam Trisnangingtyas, 2013).	Tebal Epitelisasi	Numerik

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh (Gennaro, 2003)

- a. Bunga cengkeh
- b. Etanol 95%
- c. Akuades
- d. Oven : 1 buah
- e. Penggiling/*blender* : 1 buah
- f. Timbangan/neraca analitik : 1 buah
- g. Gelas *Erlenmeyer* : 2 buah
- h. Corong gelas : 1 buah
- i. Kertas saring : 1 buah
- j. Labu *evaporator* : 1 buah
- k. Labu penampung etanol : 1 buah
- l. *Evaporator* : 1 buah
- m. Pendingin *spiral* atau *rotary evaporator* : 1 buah
- n. Selang *water pump* : 1 buah
- o. *Water pump* : 1 buah
- p. *Water bath* : 1 buah
- q. *Vakum pump* : 1 buah
- r. Lemari pendingin/*freezer* : 1 buah
- s. Pemanas air : 1 buah
- t. Botol hasil ekstrak : 3 botol

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Luka Insisi (Gaylene, 2000)

- a. Tikus *Rattus novergicus* Galur Wistar : 25 ekor

- b. Pisau cukur dan gagangnya : 1 buah
- c. Pisau bedah : 1 buah
- d. Penggaris dan spidol : 1 buah
- e. Kassa steril : 25 buah
- f. Alkohol swab : 25 buah
- g. Perlak : 1 buah
- h. Sarung tangan steril : 1 buah
- i. Jas lab : 1 buah
- j. Obat anaestesi (Lidokain) : 5 ampul
- k. Spuit 3 cc dan jarum steril : 25 buah
- l. Bengkok : 1 buah

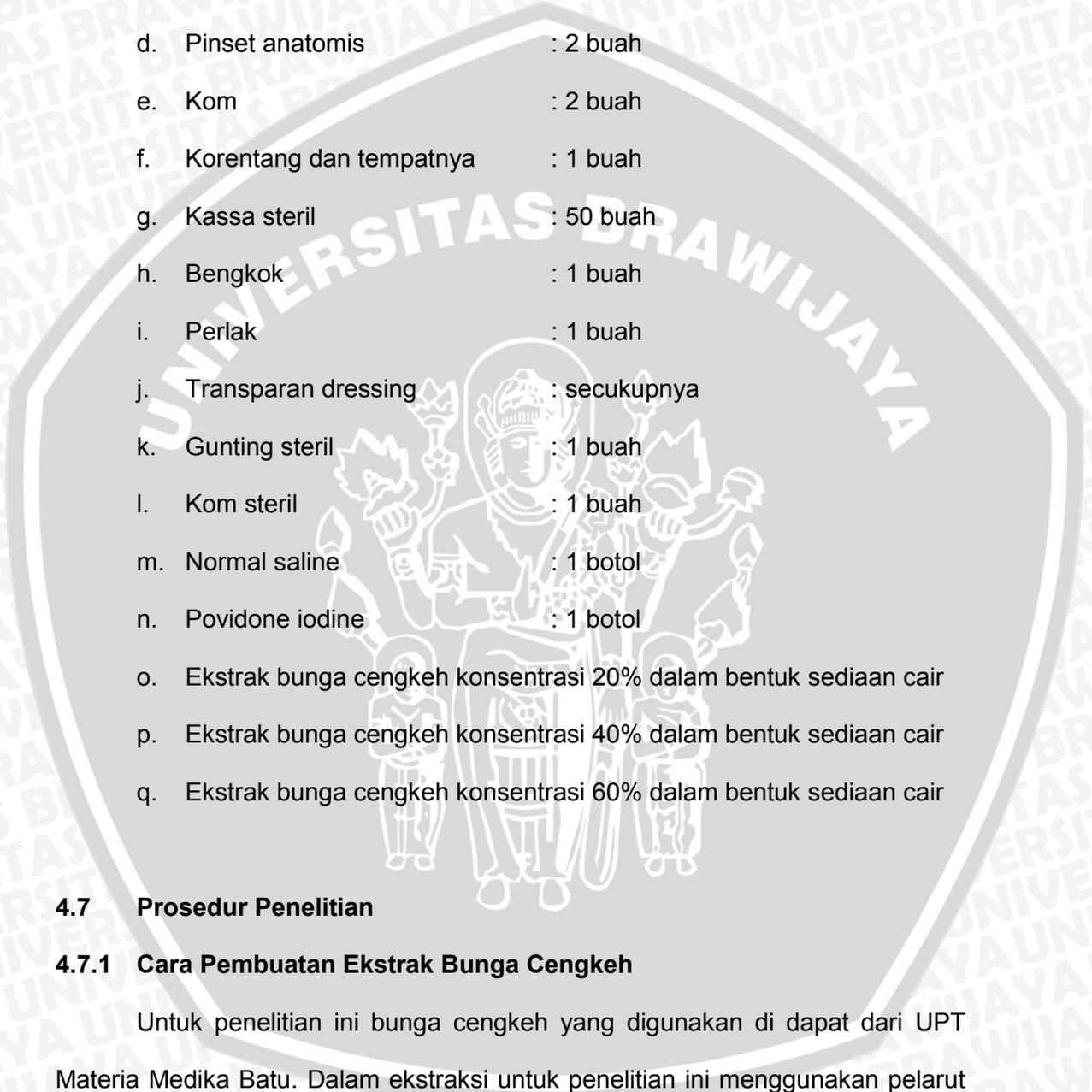
4.6.3 Alat dan Bahan Penyatuan Luka (Dunn, 2005)

- a. Sarung tangan steril : 1 pasang
- b. Pinset anatomis : 1 buah
- c. Gunting steril : 1 buah
- d. *Skin Tape Adhesive* : untuk 20 tikus
- e. Bengkok : 1 buah

4.6.4 Alat dan Bahan Pelepasan *Skin Tape Adhesive* (Dunn, 2005)

- a. Sarung tangan : 1 pasang
- b. Pinset : 1 buah
- c. Gunting : 1 buah
- d. Mangkok steril (cucing steril) : 1 buah
- e. Kapas alkohol : secukupnya
- f. Bengkok : 1 buah

4.6.5 Alat dan Bahan Perawatan Luka (Gaylene, 2000)

- 
- a. Sarung tangan steril : 1 pasang
 - b. Jas laboratorium : 1 buah
 - c. Bak instrumen : 1 buah
 - d. Pinset anatomis : 2 buah
 - e. Kom : 2 buah
 - f. Korentang dan tempatnya : 1 buah
 - g. Kassa steril : 50 buah
 - h. Bengkok : 1 buah
 - i. Perlak : 1 buah
 - j. Transparan dressing : secukupnya
 - k. Gunting steril : 1 buah
 - l. Kom steril : 1 buah
 - m. Normal saline : 1 botol
 - n. Povidone iodine : 1 botol
 - o. Ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 20% dalam bentuk sediaan cair
 - p. Ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 40% dalam bentuk sediaan cair
 - q. Ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 60% dalam bentuk sediaan cair

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cara Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh

Untuk penelitian ini bunga cengkeh yang digunakan di dapat dari UPT Materia Medika Batu. Dalam ekstraksi untuk penelitian ini menggunakan pelarut Etanol 95%.

Pembuatan ekstrak bunga cengkeh mengikuti standar pembuatan ekstrak Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, meliputi :

a. Proses Pengeringan (Gennaro, 2003)

- Mencuci kuncup bunga cengkeh yang akan dikeringkan
- Mengeringkan kuncup bunga cengkeh dengan suhu 40-80°C di dalam oven hingga kering (bebas kandungan air)

b. Proses Ekstraksi (Gennaro, 2003)

- Setelah kering kuncup bunga cengkeh dihaluskan dengan blender
- Menimbang kuncup bunga cengkeh sebanyak 100 gram (sampel kering)
- Memasukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmayer ukuran 1 L
- Rendam dengan etanol sampai volume 900 ml.
- Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
- Diamkan satu malam sampai benar-benar mengendap
- Ambil lapisan atas campuran campuran kuncup bunga cengkeh dengan etanol (bisa menggunakan kertas saring untuk menghindari ikutnya ampas)
- Lakukan proses perendaman sampai 3 kali

c. Proses Evaporasi (Gennaro, 2003)

- Cairan yang sudah disaring dimasukkan dalam labu evaporasi ukuran satu liter
- Isi water bath dengan air sampai penuh.
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90° C), sambungkan dengan aliran listrik.

- Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
 - Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk satu labu)
 - Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari jumlah bunga cengkeh
 - Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik
 - Ekstrak disimpan di dalam lemari pendingin/ freezer untuk dipakai saat penelitian.
- d. Tahap Pemberian Label
- Ekstrak kuncup bunga cengkeh konsentrasi 20% dalam bentuk sediaan cair diberi label I
 - Ekstrak kuncup bunga cengkeh konsentrasi 40% dalam bentuk sediaan cair diberi label II
 - Ekstrak kuncup bunga cengkeh konsentrasi 60% dalam bentuk sediaan cair diberi label III

4.7.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Bunga Cengkeh

Penentuan penggunaan konsentrasi dosis 20%, 40%, dan 60% didapatkan dari data yang diperoleh melalui studi eksplorasi yang telah dilakukan pada bulan Oktober 2013 sebelumnya. Dosis yang digunakan pada studi eksplorasi ini merupakan modifikasi dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh B C Nzeako, Zahra S N Al-Kharousi and Zahra Al-Mahrooqui pada tahun 2006 mengenai ekstrak cengkeh sebagai anti mikroba (Nzeako, *et.al*, 2006).

Berikut ini merupakan hasil perhitungan konsentrasi dengan pelarut atau pengenceran menggunakan akuades steril :

- 1 tikus membutuhkan 0,2 ml ekstrak bunga cengkeh cair (yang sudah dilarutkan dengan akuades steril).
- Dalam sehari, 1 kelompok (terdiri dari 5 tikus) membutuhkan :
5 tikus x 0,2 ml ekstrak bunga cengkeh cair = 1,0 ml ekstrak bunga cengkeh sediaan cair
- Selama 14 hari ada 5 kali perawatan luka maka dibutuhkan :
5 kali perawatan x 1,0 ml ekstrak bunga cengkeh cair = 5,0 ml ekstrak bunga cengkeh sediaan cair (sudah dicampur dengan akuades steril).
- Perhitungan pembuatan konsentrasi menurut Purba (2006) dilakukan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

M1 = konsentrasi ekstrak awal

M2 = konsentrasi ekstrak akhir

V1 = Volume ekstrak awal

V2 = Volume ekstrak akhir

- a. Konsentrasi 20 %

$$\begin{aligned} M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 100\% \times V1 &= 20\% \times 5 \text{ ml} \\ V1 &= 0,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat konsentrasi 20% dalam bentuk sediaan cair maka dicampurkan 1 ml ekstrak bunga cengkeh murni dengan 4 ml akuades steril.

- b. Konsentrasi 40%

$$\begin{aligned} M1 \times V1 &= M2 \times V2 \\ 100\% \times V1 &= 40\% \times 4 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$V1 = 2 \text{ ml}$$

Jadi untuk membuat konsentrasi 40% dalam bentuk sediaan cair maka dicampurkan 2 ml ekstrak bunga cengkeh murni dengan 3 ml akuades steril.

c. Konsentrasi 60%

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

$$100\% \times V1 = 60\% \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = 3 \text{ ml}$$

Jadi untuk membuat konsentrasi 60% dalam bentuk sediaan cair maka dicampurkan 3 ml ekstrak bunga cengkeh murni dengan 2 ml akuades steril.

4.7.3 Prosedur Pembuatan Luka Insisi (Gaylene, 2000)

- Memasang perlak di bawah tubuh tikus yang akan dibuat luka insisi.
- Menentukan area pencukuran rambut tikus di daerah punggung tikus.
- Menghilangkan rambut dengan cara mencukurnya sampai sekitar 8x6 cm di sekitar area kulit yang akan dibuat luka insisi.
- Memberikan tanda tempat luka dengan panjang 4 cm pada punggung tikus dengan menggunakan spidol dan penggaris.
- Mencuci tangan.
- Memakai sarung tangan.
- Melakukan anaestesi di area kulit yang akan dibuat luka insisi dengan menyuntikkan 0,5 ml Lidokain non adrenalin yang sebelumnya sudah diencerkan terlebih dahulu dengan 1 ml akuades. Anaestesi diberikan secara intra muskular dengan menggunakan spuit berkapasitas 3 ml.
- Desinfeksi area kulit yang akan dilakukan insisi dengan menggunakan kapas dan alkohol 70%.

- Melakukan penyayatan pada punggung tikus dengan menggunakan pisau bedah, panjang 4 cm dan kedalaman sampai area subkutan yaitu sekitar 1 mm.
- Membersihkan darah dan serum yang keluar dari luka menggunakan kassa steril.
- Melakukan persiapan prosedur menyatukan tepi luka dengan *skin adhesive tape*

4.7.4 Prosedur Pemasangan Skin Tape Adhesive (Dunn, 2005)

- Persiapan alat dan bahan, dilakukan sebelum pembuatan luka insisi
- Persiapan asisten dan operator, baik asisten maupun operator menggunakan teknik aseptik
- Membersihkan luka insisi yang telah dibuat dengan normal saline dan kassa steril
- Menghubungkan kedua tepi luka
- Menempelkan skin adhesive tape dengan arah berseberangan dengan luka dan jarak antar strips $\pm 0,5$ cm.
- Melakukan prosedur perawatan luka sesuai dengan kelompoknya dan setelah itu dilakukan penutupan luka dengan transparan dressing.

4.7.5 Prosedur Pelepasan Skin Tape Adhesive (Dunn, 2005)

Pelepasan wound closure strips dilakukan pada hari ke 6 bersamaan dengan perawatan dengan memastikan terlebih dahulu kedua tepi luka dipastikan telah menyatu. Berikut ini langkah-langkah dalam prosedur pelepasan *skin tape adhesive*:

- Mempersiapkan alat
- Menggunakan teknik aseptik

- Memastikan jaringan telah rapat
- Untuk mempermudah pelepasan skin tape adhesive terlebih dahulu dibasahi dengan normal saline, sekaligus untuk membersihkan luka
- Melepas strips dengan menggunakan pinset
- Mengkaji kembali kondisi luka setelah skin tape adhesive dilepas
- Melakukan perawatan luka sesuai dengan kelompoknya

4.7.6 Prosedur Perawatan Luka

Perawatan luka dilakukan selama 3 hari sekali pada pukul 08.00 s.d. 11.00 WIB. Tikus pada semua kelompok dibersihkan terlebih dahulu dengan *Normal saline* lalu diberikan perlakuan :

- a. Kelompok P1 diberikan perawatan dengan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 20% bentuk sediaan cair sebanyak 0,2 ml setiap tikus.
- b. Kelompok P2 diberikan perawatan dengan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 40% bentuk sediaan cair sebanyak 0,2 ml setiap tikus.
- c. Kelompok P3 diberikan perawatan dengan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 60% bentuk sediaan cair sebanyak 0,2 ml setiap tikus.
- d. Kelompok kontrol positif diberikan perawatan dengan menggunakan Povidone iodine sebanyak 0,2 ml setiap tikus.
- e. Kelompok kontrol negatif diberikan perawatan dengan hanya dibersihkan menggunakan *Normal saline* saja.

Prosedur yang dilakukan :

- a. Persiapan
 - Mempersiapkan peralatan
 - Mendekatkan alat
 - Mencuci tangan

- Menyiapkan sediaan ekstrak bunga cengkeh sesuai konsentrasinya
 - Menyiapkan povidone iodine
 - Membuka pembungkus dan tutup steril
 - Menggunakan sarung tangan steril
 - Memindahkan alat yang diperlukan ke dalam bak steril.
 - Menuangkan Normal saline 0.9%
 - Untuk asisten menggunakan sarung tangan bersih
- b. Melepas balutan *transparan dressing*
- Asisten memasang perlak di bawah area yang dilakukan perawatan
 - Asisten mendekatkan bengkok dan tempat sampah dan memberikan kapas alkohol pada tepi transparan dressing
 - Asisten membuka balutan transparan dressing
 - Asisten membuka seluruh balutan dengan cara menggulung ke arah luar dari proksimal ke distal dengan pinset
 - Membuang balutan ke dalam bengkok
- c. Membersihkan luka
- Operator mengkaji luka : inspeksi (kemerahan, tanda penyambungan/ pemulihan jaringan, pembengkakan/ edema, peregangan pada luka, lepasnya skin tape adhesive) dan palpasi adanya pus.
 - Membersihkan semua luka dengan menggunakan larutan normal saline dengan teknik irigasi

- Meringkakan luka dengan kassa steril
- d. Memberikan perlakuan sesuai kelompok
 - Setelah semua luka sudah dibersihkan dengan *normal saline*, lalu saatnya diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya.
- e. Memasang balutan
 - Operator mengukur kassa yang digunakan sesuai luas luka.
 - Operator meletakkan kassa pada luka
 - Kassa diletakkan dengan lipatannya dibagian dalam.
 - Asisten memasang transparan dressing sesuai luas luka

4.8 Prosedur Pemeriksaan

4.8.1 Prosedur Pengambilan Jaringan

Pengambilan jaringan dilakukan dengan terlebih dahulu tikus diberikan injeksi *Phenobarbital* dengan dosis 100mg/kgBB secara intra muskular pada paha bagian atas. Setelah penginjeksian selesai maka dilanjutkan dengan mengambil cairan intrakardial dari tikus. Setelah cairan ini diambil tikus akan mati dan pengambilan jaringan kulit dapat dilakukan. Pengambilan jaringan kulit dengan cara melakukan eksisi pada jaringan kulit dengan panjang 4 cm, lebar 1 cm, dan kedalaman sampai subkutis. Tikus yang telah mati kemudian akan dikuburkan di dalam tanah. Jaringan kulit direndam dalam larutan formalin 10% untuk kemudian dilakukan proses pewarnaan dan pengamatan ketebalan epitelisasi secara histologi.

4.8.2 Prosedur Pembuatan Preparat

a. Fiksasi

Jaringan eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin *buffer* (larutan formalin 10% dalam *Phospat Buffer Saline* pada pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18 – 24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan akuades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-*xylol* selama 1 jam dan kemudian larutan *xylol* murni selama 2x2 jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam

d. Embedding

e. Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-580° C, ditunggu sampai parafin padat. Dapat dipercepat dengan meletakkannya pada bongkahan es.

f. Penyayatan

- Tempelkan blok pada cakram *microtome rotary* kemudian sayat jaringan kulit secara vertikal dengan ukuran 3-5 micron.
- Ambil sayatan jaringan kulit yang berbentuk pita dengan menggunakan kuas kecil kemudian letakkan pada water bath yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C.
- Setelah sayatan jaringan kulit merentang, ambil sayatan dengan menggunakan object glass.

- Diamkan selama 24 jam.

g. Pewarnaan dengan *Hematoxylin Eosin*

Pada tahap staning, *object glass* dimasukkan pada *Xylo* selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Hematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.

Object glass dimasukkan pada *Lithium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarna *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *xylo* selama 15 menit x 3.

Tahap terakhir adalah preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan*. Metode pewarnaan ini berdasar pada 3 warna (*Trichrom*) yaitu asam pikrat dan asam *fuchsin* dengan hematoksilin. Jaringan pada kaca obyek dilakukan deparafinisasi sampai alkohol 70%, kemudian diberi larutan hematoksilin diamkan selama 5 menit, kemudian dilarutkan dalam air hangat 600°C agar berwarna biru kurang lebih selama 3- 10 menit. Bilas dengan menggunakan akuades dan dilanjutkan dengan memberi larutan eosin dengan cepat (1x celup). Kemudian dilakukan dehidrasi alkohol 96% sebanyak 2 kali, absolut sebanyak 2 kali, dan *xylo* sebanyak 2 kali. Lalu diberi balsem *Canada* dan ditutup dengan kaca penutup.

4.8.3 Identifikasi Ketebalan Epitelisasi Luka

Identifikasi ketebalan epitelisasi pada jaringan dimulai pada hari ke-14. Hal ini dikarenakan fase proliferasi pada penyembuhan luka berakhir pada hari ke-14 untuk kemudian dilanjutkan dengan fase remodeling pada hari ke-15 s.d. 2

tahun (Velnat *et.al*, 2009; Suryadi *et.al*, 2013). Ketebalan epitel diukur dengan membuat preparat histologi jaringan kulit yang dipotong secara vertikal untuk kemudian dilakukan pewarnaan dengan HE dan dilakukan *scanning* dengan mikroskop OLYMPUS seri XC 10 dan dengan bantuan *software* dotSlide . Jaringan epitel adalah jaringan dengan susunan yang rapat, dan terletak pada membran basalis dan tercatat ungu kebiruan pada pewarnaan HE pada saat dilakukan pengamatan. Pengamatan ketebalan epitel menggunakan mikroskop perbesaran 100x. Ketebalan epitel diukur menggunakan mikrometer dari lapisan *stratum korneum* sampai dengan *stratum basale* dan dalam 1 slide dilakukan pengukuran sebanyak lima kali. Pengukuran dilakukan di dalam batas luka, yang ditandai dengan pergerakan sel pada dermis (Trisnaningtyas, 2013; Eroschenko, 2013).

4.9 Analisa Data

4.9.1 Normalitas dan Homogenitas

Hasil analisa ketebalan epitelisasi pada luka insisi pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan dilakukan uji statistik *SPSS version 20* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 dan dengan kriteria pengujian :

- Angka signifikansi $p(\text{value}) > 0.05$, maka data berdistribusi normal
- Angka signifikansi $p(\text{value}) < 0.05$, maka data tidak berdistribusi normal

Uji homogenitas menggunakan *Test of Homogeneity of Variance* ($p > 0,05$). Jika signifikansi lebih dari 0,05 maka data adalah homogen sehingga dapat dilanjutkan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One Way ANOVA*.

4.9.2 Uji One Way Anova

Data hasil penelitian kemudian dianalisa dengan One way ANOVA SPSS *version 20* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi $p < (0,05)$, maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan ketebalan epitelisasi luka insisi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (Sugiyono, 2011).

4.9.3 Uji Perbandingan Berganda (Post Hoc Test)

Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*) merupakan metode pengujian lanjutan apabila hasil pengujian *One Way ANOVA*. Uji ini untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memberikan hasil paling signifikan jika dibandingkan dengan kelompok uji coba. Nilai signifikansi antar kelompok dilihat dari tabel *Multiple Comparison* dan nilai *Sign* $< 0,05$ adalah kelompok yang memiliki perbedaan paling signifikan. Kelompok dengan nilai signifikansi paling kecil, mempunyai nilai signifikansi paling bermakna dalam kelompok – kelompok uji coba (Sugiyono, 2011).

