

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *True Experimental Laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design* (Nursalam, 2008). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Pada desain penelitian ini menggunakan dua jenis kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dan masing-masing terdapat 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak dimanipulasi sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberi perlakuan standard dan dimanipulasi oleh peneliti. Semua kelompok pada penelitian ini tidak diawali dengan pre-test. Pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai.

Adapun pembagian kelompok ini, yaitu:

- a. N (kontrol negatif): tikus dalam kondisi normal, tidak dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan diberikan diet standard tikus
- b. Po (kontrol positif): tikus dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan diberikan diet standar tikus secara oral

- c. PS (perlakuan standar): tikus dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan diberikan suplemen diabetes komersial, yaitu *chitosan* secara oral (sonde)
- d. P1 (perlakuan 1): tikus dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara oral (sonde) diberikan ekstrak cumi-cumi (*Loligo* sp) sebanyak 450 miligram per 200 gram berat badan dengan pemberian dua hari sekali (pagi)
- e. P2 (perlakuan 2): tikus dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara oral (sonde) diberikan ekstrak cumi-cumi (*Loligo* sp) sebanyak 450 miligram per 200 gram berat badan dengan pemberian satu kali sehari (pagi)
- f. P3 (perlakuan 3): tikus dalam keadaan hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara oral (sonde) diberikan ekstrak cumi-cumi (*Loligo* sp) sebanyak 450 miligram per 200 gram berat badan dengan pemberian dua kali sehari (pagi dan sore)

4.2.1.1 Inklusi

- 1) Jenis tikus adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*)
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 2,5-3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada usia pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka
- 4) Berat badan 200-300 gram
- 5) 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
- 6) Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya
- 7) Kadar glukosa darah awal ≤ 110 mg/dL
- 8) Kadar glukosa darah puasa setelah pemberian STZ ≥ 150 mg/dL (S. Marta et al., 2009; Strunz et al., 2011).

4.2.1.2 Eksklusi

Kriteria eksklusi dari sampel yaitu tikus yang sakit selama aklimatisasi

4.2.1.3 Cara perlakuan sampel

Tikus pada penelitian ini tidak dilakukan pengekangan (*restrain*) dan dipelihara di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang, pada kandang berbentuk balok terbuat dari plastik yang terbuka dibagian atasnya, ditutup dengan kotak yang terbuat dari jaring kawat dan dibebani dengan pemberat untuk mencegah tikus keluar dari kandang. Kandang berukuran 900 cm², dilapisi dengan sekam dan kardus pada bagian bawahnya dan diganti 3 hari sekali untuk sekam, dan diganti satu hari sekali untuk lapisan kardus agar tetap kering dan tidak

lembab. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38°C (sedang). Masing-masing kandang diisi dengan 2-3 ekor tikus saat aklimatisasi, namun saat masa perlakuan, satu kandang diisi 1 tikus.

Tikus diberi makanan dan air minum yang sama. Makanan tikus berbentuk serbuk yang komposisinya terdiri dari jagung, katul, *pollard*, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 2:1. Makanan dibentuk bulatan padat seberat 45 gram. Air dan makanan diberikan secara *ad libitum*.

4.2.2 Cara Pemilihan Jumlah Sampel

Sampel diambil secara acak (*simple random sampling*) dengan cara peneliti menulis 6 jenis kelompok perlakuan pada 6 kertas kecil, kemudian dibuat undian. Lalu, satu persatu subjek penelitian diangkat, lalu diambil satu undian untuk menentukan masing-masing subjek masuk ke dalam kelompok. (Wasis, 2008). Besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku dalam penetapan jumlah sampel yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus menurut Hidayat (2008):

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

Keterangan:

t = banyak perlakuan

r = banyak sampel pada tiap kelompok

Pada penelitian ini besar "t" adalah 6 (3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), sehingga didapatkan nilai "r" sebagai berikut:

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Jadi jumlah sampel minimal dalam penelitian ini adalah 4 ekor tikus pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 24 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Untuk mengantisipasi kemungkinan adanya *drop out*, diberikan penambahan tikus yang jumlahnya ditentukan dengan penghitungan:

$$\text{Subjek tambahan} = 10\% \times \text{jumlah sampel setiap kelompok}$$

$$= 10\% \times 4$$

$$= 0,4 = 1 \text{ ekor}$$

Jadi, pada penelitian ini digunakan 30 ekor tikus jantan galur wistar. Kriteria dropout adalah tikus yang tidak mau makan selama penelitian, luka mengalami infeksi, luka menjadi lebar karena digigit atau terkena benda tajam lainnya, tikus sakit dan tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan laboratorium teknik kimia Politeknik Negeri Malang selama 4 bulan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variable bebas dalam penelitian ini adalah Ekstrak cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pemberian oral sebanyak 450 miligram/ 200kgBB dengan pemberian dua hari sekali (pagi), satu kali sehari (pagi), serta dua kali sehari (pagi dan sore).

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel *fibroblast* pada luka.

4.5 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Independen: Ekstrak cumi-cumi (<i>Loligo indica</i>)	Ekstrak cumi-cumi utuh (daging dan <i>viscera</i>) dalam bentuk ekstrak kasar yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96% dan diberikan dua hari sekali, satu hari sekali, dan satu hari dua kali dengan dosis 450 mg/ 200gr BB. Prosedur pembuatan ekstrak cumi-cumi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.	gram	Rasio
Variabel Dependen: Jumlah <i>fibroblast</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Interpretasi hasil pengamatan banyaknya sel <i>fibroblast</i> yang terlihat pada sediaan mikroskopis luka • Sel <i>fibroblast</i> berbentuk gelondong, memiliki satu inti atau lebih, bersifat basofilik, dan tercatat ungu pada preparat jaringan kulit dengan pewarnaan HE • Preparat diambil dari jaringan kulit pada hari ke-14 untuk dibuat slide histologi dengan pemotongan vertikal ukuran 4 	Jumlah sel tiap lapang pandang g	Rasio

	<p>mikron dan menggunakan pewarnaan HE (Hematoksin-Eosin)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Penghitungan jumlah sel <i>fibroblast</i> pada tiap-tiap sediaan dilihat dengan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OlyVIA (Viewer for Imaging Applications) dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pandang. Satu slide diambil 5 lapang pandang kemudian dirata-ratakan. 	
--	--	--

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstraksi

Alat dan bahan pembuatan ekstraksi dijelaskan pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Cumi-Cumi

Alat dan Bahan	Jumlah
Cumi-cumi (<i>Loligo sp</i>) seluruh bagian (daging dan <i>viscera</i> /jeroan)	±8 kg
Etanol 96%	Secukupnya
Aquadess	1 botol
Botol hasil ekstrak	1 botol, 1L
Oven	1 buah
Kapas	Secukupnya
Timbangan	1 buah
Gelas <i>Erlenmeyer</i>	2 buah
Corong gelas	1 buah
Kertas saring	1 buah
Labu <i>evaporator</i>	1 buah
Labu penampung etanol	1 buah
Evaporator	1 buah
Pendingin <i>spiral</i> atau <i>rotary evaporator</i>	1 buah
Selang <i>water pump</i>	1 buah
<i>Water pump</i>	1 buah
<i>Water bath</i>	Secukupnya

(Patmawati, 2010)

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Luka

Alat dan bahan dalam pembuatan luka pada tikus penelitian adalah gunting bedah, mezt, underpad, sarung tangan, pinset anatomis 2 buah, agen anastesi Zoletil, kassa, povidone iodine, spuit 1 cc, bak steril, alat cukur, alkohol 70%, bengkok, penggaris, alat tulis, mika yang sudah dipotong berukuran 1,5 cm x 1,5 cm untuk membuat pola pada punggung tikus yang akan dilukai.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Perawatan Luka

Alat dan bahan perawatan luka tikus dijelaskan pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.2 Alat dan Bahan Perawatan Luka

Alat dan Bahan	Jumlah
Sarung tangan	1 pasang
Jas laboratorium	1 buah
Bak instrument	1 buah
Pinset anatomis	2 buah
Kom	2 buah
Korentang dan tempatnya	1 buah
Kassa steril	25 buah
Kassa + NS 0,9%	25 buah
Bengkok	1 buah
Perlak	3 lembar
Plester	1 roll
Gunting plester	1 buah
Gunting kassa	1 buah
<i>Cotton bud</i>	9 buah
Gunting jaringan nekrotik	1 buah
Spuit 3 cc	4 buah
Normal salin 0,9%	2 botol

4.6.4 Alat dan Bahan Sonde

Sonde lambung tikus yang ujungnya terbuat dari karet, sarung tangan, dan kain untuk memegang tikus.

4.6.5 Alat dan Bahan Pengukuran Glukosa Darah Tikus

Alat dan bahan yang digunakan untuk mengukur glukosa darah tikus dalam penentuan status diabetik tikus percobaan adalah dengan *glucose meter* (Gluco-DR Nesco) dan *stick glucosure*.

4.6.6 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Kulit

4.6.6.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan preparat histologi jaringan kulit adalah jaringan luka yang telah difiksasi dengan *Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%*, *Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%*, etanol absolut, Xylol, glycerin 99,5%, ewit (albumin), larutan Hematoxilin, lithium karbonat, larutan eosin, DPX, parafin cair (histoplat).

4.6.6.2 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan preparat histologi jaringan kulit adalah talenan, pisau scalpet, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin prosesor otomatis, mesin vakum, mesin bloking, *freezer* (-20⁰ C), mesin *microtome*, pisau *microtome*, *Water bath* 46⁰ C, kaca objek dan kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60⁰ C (Muntiha, 2001).

4.6.7 Alat dan Bahan Pengumpul Data (Instrumen Penelitian)

Pengumpulan data untuk histologi luka yaitu dengan menggunakan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software Olyvia (Viewer for Imaging Applications) dengan perbesaran 400 kali tiap lapang pandang.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Cumi-cumi

4.7.1.1 Proses Pengeringan

Cumi-cumi (*Loligo sp*) segar didapat dari nelayan di Pasuruan, Jawa Timur dan dikirim ke laboratorium dengan es. Bagian cumi-cumi yang diekstrak adalah bagian daging dan *viscera* (jeroan). Kemudian, cumi-cumi-cumi dicuci dengan air mengalir sampai bersih, lalu dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan oven dengan suhu 45°C selama \pm 48 jam. Setelah cumi-cumi kering dilakukan proses penghalusan menggunakan *blender* sehingga menjadi bentuk serbuk (Patmawati, 2010). Kurang lebih 5 kg cumi menghasilkan 500 gram tepung.

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti protokol standar ekstraksi Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang. Prosedur ekstraksi adalah sebagai berikut :

- 1) Menimbang serbuk cumi-cumi sebanyak 500 gram
- 2) Memasukkan serbuk cumi-cumi 500 gram ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 3) Merendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
- 4) Campuran Cumi-cumi dan etanol dikocok hingga tercampur
- 5) Mendinginkan selama 24 jam hingga menguap

4.7.1.3 Proses Evaporasi

- 1) Pengambilan lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif
- 2) Memasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
- 3) Memasang labu evaporasi pada evaporator
- 4) Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh
- 5) Memasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur suhu pada 70°C – 80°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.
- 6) Mendinginkan agar larutan etanol mendidih lalu memisah ke dalam labu penampung
- 7) Menunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 jam hingga 2 jam)
- 8) Memasukkan hasil ekstraksi dalam botol hasil ekstrak
- 9) Menyimpan hasil ekstraksi ke dalam *freezer*/kulkas

4.7.2 Pembuatan Dosis

4.7.2.1 Pembuatan Dosis Ekstrak Cumi-cumi

Cumi-cumi yang digunakan cumi-cumi utuh (daging dan *viscera*) yang masih segar. Kolesterol diabetes yang dianjurkan *American Diabetes Association* (2007), yaitu <200 mg/hari untuk mencegah resiko komplikasi kardiovaskular. Cumi-cumi segar sebanyak 100 gram mengandung kolesterol sebesar 233 mg. Pada penelitian ini menggunakan 25 gram cumi-cumi (kolesterol \pm 58 mg) sekali pemberian oral. Kemudian dosis ini dikonversi dengan dosis untuk tikus adalah $25 \text{ gr} \times 0,018 = 0,45 \text{ gram} = 450 \text{ mg}$ (Harmita, 2006). Dosis kg/bb tikus = $1000/200 \times 450 \text{ mg} = 2.225 \text{ mg} = 2,225 \text{ gr/kg bb}$. Kemudian timbang 2,225 g ekstrak cumi dan masukan ke dalam lumpang dengan campuran CMC 0,5% hingga 10 ml, kocok

hingga homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah = $450 \text{ mg}/2.225 \text{ mg} \times 10 \text{ ml}$
= 2 ml per pemberian oral.

4.7.2.2 Pembuatan Larutan Chitosan

Suplemen untuk diabetes dan perbaikan luka diabetes yang digunakan dalam penelitian ini adalah **CHITOSAN®** 150 mg. Dengan dosis pada manusia dewasa perhari adalah 600 mg (anjuan pakai 2 x 2 kapsul), maka dosis *Chitosan* untuk tikus adalah $600 \text{ mg} \times 0,018 = 10,8 \text{ mg}$. Dosis untuk 1000 gram tikus = $1000/200 \times 10,8 \text{ mg} = 54 \text{ mg/kg bb}$. Kemudian timbang 54 mg kapsul chitosan yang sudah digerus halus, masukan kedalam lumpang + CMC 0,5% gerus *homogeny* kemudian masukan ke dalam labu 10 ml tambahkan CMC 0,5% sampai 10 ml, kocok homogen. Dosis pemakaian pada tikus adalah = $10,8 \text{ mg}/54 \text{ mg} \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$ per pemberian oral.

4.7.3 Perlakuan Hewan Coba

4.7.3.1 Sebelum Penelitian

- 1) Tikus diseleksi sesuai dengan kriteria sampel dan didapatkan sebanyak 30 ekor tikus
- 2) Melakukan persiapan pemeliharaan yang dimulai dengan mempersiapkan kandang yang bersih, tempat minum yang tidak bocor, jarring kawat penutup kandang, pemberat tutup, sekam dan kardus untuk alas kandang, makanan dan minuman, timbangan dalam gram, wadah, pengaduk makanan, dan pembersihan rak tempat kandang.
- 3) Melakukan aklimatisasi tikus (penyesuaian lingkungan) selama tujuh hari di Laboratorium Fisiologi FKUB

- 4) Selama aklimatisasi, tikus dimasukkan ke dalam kandang (1 kandang berisi 2-3 ekor tikus)
- 5) Kandang dalam keadaan bersih, sirkulasi udara dan pencahayaan yang baik
- 6) Melakukan pembersihan kandang setiap hari dan penggantian sekam dilakukan setiap tiga hari sekali
- 7) Memberikan makanan dan minuman tikus sesuai dengan standard laboratorium, penimbangan berat badan tikus dilakukan diawal masuk sebelum aklimatisasi dan di akhir aklimatisasi.

4.7.3.2 Selama Penelitian

A. Prosedur induksi diabetes

Setelah 7 hari aklimatisasi dengan lingkungan sekitar dan pemberian diet standar tikus, sebelum melakukan induksi diabetes, tikus dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi air minum. Hal ini dilakukan karena disesuaikan dengan protokol percobaan yang menyebutkan bahwa hewan uji yang dipuasakan selama 8-12 jam lebih rentan mengalami hiperglikemia dibandingkan hewan uji yang tidak dipuasakan. Sebelum dilakukan induksi, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa terlebih dahulu untuk mengetahui kadar darah puasa sebelum diinduksi STZ (Srinivasan dan Ramarao, 2007; Mendes, 2012).

STZ sebelumnya dilarutkan dengan 0,1 M citrate dengan pH 4,5 dan diinjeksikan 45 mg/kgBB intraperitoneal. Untuk injeksi STZ, tikus dipegang dengan satu tangan pada posisi dorsal, bagian yang diinjeksi kemudian diusap dengan *alcohol swab*. Injeksi STZ dilakukan masuk ke ruang abdomen bagian kaudal menggunakan spuit 1 cc dan *needle* 23-G. pemberian STZ akan merusak sel beta pankreas, menyebabkan peningkatan kadar glukosa serta penurunan jumlah

serum insulin pada tikus secara progresif dan persisten selama hingga 45 hari (Krishna et al., 2012). Pada 24 jam pertama setelah injeksi STZ, tikus akan mengalami hiperinsulinemia yang berdampak pada hipoglikemia dan dapat menyebabkan tikus mati, oleh karena itu tikus diberikan pakan secara normal dan air minum yang mengandung sukrosa 10% 24 jam pertama. Pada hari ke-2 dan seterusnya ganti dengan air biasa (Pak et al., 2010)

Tanda diabetes akan terlihat pada tikus dalam 3 hari setelah pemberian injeksi intraperitoneal dari STZ melalui pengukuran gula darah yang dilakukan dengan pengambilan darah vena di ekor tikus menggunakan glukometer. Tikus dikatakan diabetes apabila kadar glukosa darah puasa ≥ 150 mg/dL atau dengan kadar glukosa darah acak ≥ 200 mg/dL (Frode dan Medeiros, 2008; Zangiabadi et al, 2011; Ramzy et al, 2014). Pembuatan tikus model diabetes mellitus hanya dilakukan pada 5 kelompok tikus (PS,P0,P1,P2,P3) yaitu sebanyak 25 tikus.

B. Prosedur Pengukuran Glukosa Darah Tikus

Pengukuran glukosa darah puasa tikus dilakukan 3 hari setelah pemberian dosis tunggal STZ. Pengukuran glukosa darah dilakukan dengan pengambilan darah vena di ekor tikus lalu diukur dengan menggunakan glukometer (Abeeleh, 2009).

C. Prosedur Pembuatan Luka

Induksi luka pada penelitian ini menggunakan eksisi seluruh lapisan kulit dengan menghilangkan lapisan subkutan pada kulit berukuran standard $1,5 \times 1,5$ cm² mengacu pada penelitian Ukong et al. (2008). Peneliti yang melakukan induksi diabetes merupakan orang yang sama untuk semua tikus guna menghindari bias. Pada hari dimana tikus telah dikonfirmasi mengalami diabetes mellitus dengan

kondisi hiperglikemia, 25 tikus diabetes dan 5 tikus tanpa diabetes dianestesi dengan injeksi *Zoletil* (50mg/kgBB) intramuscular (Machado et al., 2009). Setelah menunggu beberapa saat sampai efek anestesi bekerja dan tikus mulai berada di bawah pengaruh anestesi, rambut bagian dorsal dipangkas menggunakan gunting steril. Bagian dorsal dari tikus dibilas dengan NaCl 0,9% dan setelah dikeringkan serta dibersihkan, lalu dilakukan tindakan berikut:

- a) Menyiapkan alat dan bahan : *Zoletil*, gunting, pinset cirurgis, silet, mesh kasa steril, kasa gulung, mika bentuk kotak berukuran 1,5 x 1,5 cm, NaCl 90%
- b) Menggunakan sarung tangan
- c) Mengambil tikus dari kandang
- d) Memberikan anestesi tikus dengan injeksi *zoletil* (50mg/kg)
- e) Mendinginkan tikus sejenak, setelah sedikit tersedasi/teranestesi
- f) Setelah tikus mengalami paralisis, lalu menggunting dan mencukur bulu tikus bagian dorsal menggunakan gunting dan silet, lalu membuat pola dengan bentuk persegi sebesar 1,5 x 1,5 cm dengan kedalaman ± 2 mm hingga epidermis dan dermis, tidak sampai otot)
- g) Menggunakan mesh untuk memotong kulit bagian dorsal
- h) Membuat perlukaan mengikuti pola yang telah dibuat dari mika yang dipotong kotak berukuran 1,5x1,5 cm yang telah dibuat menggunakan mesh, dan tidak sampai mengenai bagian otot
- i) Setelah selesai, membersihkan luka menggunakan normal saline 0,9 % dan kasa steril sesuai protokol perawatan luka yang sudah dilampirkan
- j) Melakukan perawatan standard luka dengan normal saline dan dibalut kasa steril (menggunakan sarung tangan steril) pada semua tikus kontrol maupun perlakuan (n=6)

D. Perawatan Luka

Semua kelompok dengan perawatan luka menggunakan normal saline 0,9% sebanyak 1 kali sehari. Prosedur perawatan luka dapat dilihat pada lampiran 1.

E. Prosedur Sonde Tikus

Memulai prosedur dengan mengambil ekstrak cumi-cumi sebanyak 2 ml dengan sonde yang ujungnya terbuat dari karet. Mulut tikus dihadapkan ke atas dengan cara memegang tikus pada kulit bagian kepala kemudian sonde dimasukkan melalui mulut dan ekstrak cumi-cumi disemprotkan.

4.7.3.3 Sesudah Penelitian

1. Melakukan pembedahan pada hari ke 14 dengan mematikan tikus (*sacrificed*)
2. *Sacrificed* tikus dilakukan dengan pemberian klorofom berlebihan secara inhalasi yaitu dengan memasukkan tikus ke dalam wadah yang sudah diberi klorofom berlebihan lalu mengubur tikus. Tanda tikus percobaan sudah mati yaitu tidak adanya pergerakan nafas, denyut jantung (palpasi dada atau gunakan stetoskop), serta kehilangan reflek palpebral dan kornea (reflex kornea positif apabila bola mata disentuh dan reflex palpebral positif ketika kelopak mata diusap. Kematian ditandai dengan mata yang tetap terbuka dan kelopak mata tidak bergerak).
3. Mengambil sampel jaringan luka dan memfiksasi dengan formalin
4. Setelah mengambil spesimen, lalu membersihkan tubuh tikus dan melakukan tindakan aseptik dengan alkohol 70% kemudian diautoklaf. Setelah itu tikus dikubur dengan baik.
5. Membuat preparat histopatologi jaringan kulit luka pada tikus

6. Melakukan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk melihat jumlah *fibroblast*

4.7.4 Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Kulit

Sebelum membuat preparat histologi jaringan kulit, sampel dimatikan terlebih dahulu dengan cara memasukkan sampel dalam tabung tertutup berisi *Chlorofoam* hingga sampel terlihat lemas dan mati. Kemudian dilakukan pengambilan jaringan kulit area bekas luka dan diproses untuk pembuatan preparat histologi jaringan kulit. Tahap-tahap pembuatan preparat histologi jaringan kulit adalah sebagai berikut:

4.7.4.1 Persyaratan Melakukan Pengambilan Sampel

- a. Sampel harus segar, artinya pengambilan jaringan luka harus segera dilakukan setelah hewan mati. Keterlambatan pengambilan terlebih pada suhu yang panas mengakibatkan jaringan cepat rusak.
- b. Jaringan yang diambil adalah jaringan pada perbatasan antara jaringan luka dan jaringan sehat.
- c. Ukuran jaringan yang diambil sekitar 1 cm³. Setelah itu, jaringan harus segera difiksasi. Potongan jaringan yang terlalu besar menyebabkan jaringan yang terletak didalamnya tidak terfiksasi dengan sempurna sehingga akan dengan mudah rusak (Muntiha, 2001).

4.7.4.2 Fiksasi Jaringan

Melakukan fiksasi jaringan dengan cara merendam jaringan di dalam zat-zat kimia yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari pencernaan enzim-enzim (autolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Bahan

pengawet yang rutin digunakan adalah larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan pH berkisar antara 6.5 - 7.5. pH ideal adalah 7.0 (Muntiha, 2001).

Untuk membuat 1 liter BNF 10% yaitu dengan menimbang garam PO_4 . H_2O sebanyak 4,0 gram, dan Na_2HPO_4 . $2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 6,5 gram larutkan dengan akuades 1 liter kemudian tambahkan 100 ml formaldehyde (37%-40%). Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1 : 10, sedangkan lamanya fiksasi minimal 2 hari (Muntiha, 2001).

4.7.4.3 Pemotongan Jaringan Luka

Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan fiksatif matang, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (Muntiha, 2001).

4.7.4.4 Proses Dehidrasi

Keranjang (basket) yang di dalamnya berisi jaringan luka, dimasukkan ke dalam mesin processor otomatis. Selanjutnya, jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut : ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), ethanol 90 % (2 jam), ethanol absolute (2 jam), ethanol absolute (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), paraffin cair (2jam). Kemudian, keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya (Muntiha, 2001).

4.7.4.5 Vakum

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur (59 - 60°C) di vakum selama 30 menit. Lalu, Keranjang diangkat, *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60° C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair (Munthi, 2001).

4.7.4.6 Pencetakan Blok Paraffin

Cetakan dari bahan stainless steel dihangatkan di atas api Bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara An ditempat lain telah disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan difreezer (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan (Munthi, 2001).

4.7.4.7 Pemotongan Blok Jaringan

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3 – 4 µm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46° C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi ewith, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan

dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwamai (Muntiha, 2001).

4.7.4.8 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut, larutan xylol selama 3 menit, xylol 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol 90% 3 menit, ethanol 80% selama 3 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan hematoksilin 6-7 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan pembiru 1 menit, air keran 1 menit, larutan eosin 1 - 5 menit, bilas dengan air keran 1 menit, ethanol 80 % 10 celupan, ethanol 90 % 10 celupan, ethanol absolut 10 celupan, ethanol absolut 1 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit, dan terakhir xylol 3 menit. Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop (Muntiha, 2001).

4.8 Metode Pengumpulan Data

4.8.1 Sumber Data

Data didapatkan dari sampel yang di bagi menjadi 6 kelompok, yaitu 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif dengan tikus tanpa diabetes dan kontrol positif dengan tikus diabetes yang dilakukan pemberian perawatan dengan Normal Saline (NaCl 0,9%), serta kelompok kontrol perlakuan standard dengan pemberian diet suplemen *chitosan* dan Normal Saline (NaCl 0,9%). Data juga diperoleh dari 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak cumi-cumi (*Loligo sp*) dan Normal Saline (NaCl 0,9%). Sampel diberikan perlakuan perawatan luka dari hari pertama setelah diberi perlakuan dengan

kondisi diabetes sampai hari ke-14. Pengamatan dan penghitungan jumlah *fibroblast* dilakukan sesudah pemberian perlakuan, lalu hasilnya dimasukkan dalam instrumen penelitian.

4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

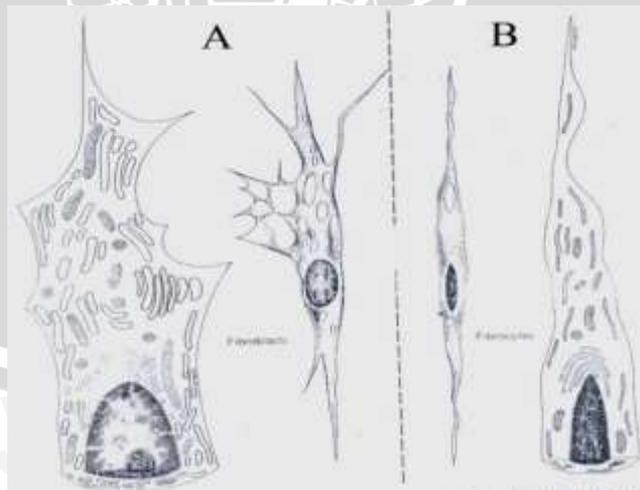
Pada hari ke-14 kulit pasca luka hiperglikemia tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan histologi. Kulit tikus tersebut diperoleh setelah dilakukan anestesi dengan menggunakan *Chlorofoam*. Preparat diambil dari jaringan kulit dengan pemotongan vertikal ukuran 4 mikron. Kulit yang sudah diambil difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% untuk dilakukan pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin). Metode pengumpulan data dilakukan dengan penilaian mikroskopis. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah *fibroblast* dan dibandingkan antara kelompok kontrol dan perlakuan, serta antar kelompok perlakuan (Wahyuda, *et al.*, 2013). Pengamatan preparat histologi jaringan kulit menggunakan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OlyVIA (Viewer for Imaging Application) dengan perbesaran 400x tiap lapang pandang. Hasil penghitungan dilakukan dengan penghitungan counter, yaitu satu slide diambil 5 lapang pandang kemudian dirata-ratakan dengan cara menjumlah temuan *fibroblast* pada semua lapang pandang kemudian dibagi 5 dan dibandingkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, serta antar kelompok perlakuan. Data diambil dari hasil pembacaan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB Malang.

4.8.3 Identifikasi Pembentukan *Fibroblast* Luka

Identifikasi *fibroblast* luka dilakukan setelah perawatan luka selesai. *Fibroblast* adalah sel yang berbentuk gelendong, memiliki satu inti atau lebih, bersifat basofilik, dan berwarna biru-ungu pada pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) pada saat dilakukan pengamatan. *Fibroblast* diamati di lapisan kulit dermis.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OlyVIA (Viewer for Imaging Applications) dengan pembesaran 400x pada tiap lapang pandang. Satu slide diambil 5 lapang pandang kemudian dirata-rata. Jumlah sel dilihat pada monitor dan dihitung secara manual. Jumlah sel akan dinyatakan dalam satuan sel.

Cara membedakan antara *fibroblast* aktif dengan fibrosit adalah melalui perbedaan morfologi. *Fibroblast* mempunyai sitoplasma bercabang yang tidak teratur dan banyak, nukleusnya berbentuk seperti bujur telur (*ovoid*), lebar, dan berwarna pucat pada pewarnaan dengan nukleus kromatik, sitoplasma kaya akan retikulum endoplasma kasar, dan kompleks golgi berkembang dengan baik di dekat nukleus. Sedangkan *fibroblast* yang tidak aktif atau fibrosit mempunyai nukleus heterokromatik. Bentuknya lebih kecil daripada *fibroblast*, cenderung berbentuk gelondong (*spindle-shaped*), mempunyai prosesus yang lebih sedikit, lebih kecil, lebih gelap, nukleus memanjang, sitoplasma tipis dengan sedikit retikulum endoplasma berglanula (Mazyala, 2008).



Gambar 4.2 (A) *Fibroblast* dan (B) Fibrosit

Sumber: Harjana (2011)

4.9 Analisa Data

4.9.1 Tahap Pre-analisa Data

Data hasil penelitian yang telah diperoleh, tidak bisa langsung diolah melainkan harus melewati dahulu tahap persiapan sebelum dilakukan analisis. Pada tahap ini, ada tiga langkah yang harus dipenuhi yaitu editing dan koding. Tahap editing, data yang telah dikumpulkan dipilah dan dipilih data-data penting yang nantinya perlu untuk dilakukan analisis. Selain itu data juga dibersihkan dari kemungkinan adanya kesalahan peneliti sebagai pengumpul data (*human error*). Tahap koding (pemberian kode), data yang telah dipilah dan dipilih diberi kode berupa angka-angka (misal angka 1, 2, 3) dan selanjutnya dilakukan tahap tabulasi dengan tujuan untuk mempermudah proses analisa data yang dilakukan.

4.9.2 Uji Normalitas dan Homogenitas

Hasil analisa terhadap jumlah *fibroblast* luka pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan dilakukan uji statistik *SPSS version 20* dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji statistik *Shapiro Wilk* karena sampel kecil yaitu ≤ 50 , dan uji homogenitas menggunakan *Homogeneity of Variance: Lavene test*.

Data terdistribusi normal dapat diketahui menggunakan *Shapiro Wilk-Test* pada taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ dengan hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut:

1. H_0 : Data jumlah *fibroblast* terdistribusi normal
2. H_a : Data jumlah *fibroblast* tidak terdistribusi normal

Dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut:

1. H_0 diterima apabila nilai signifikansi $P > 0,05$

2. H_0 ditolak apabila nilai signifikansi $P < 0,05$

Apabila data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan uji *Homogeneity of Variance* pada taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ dengan hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut:

1. H_0 : Data jumlah *fibroblast* mempunyai varians yang sama atau homogen
2. H_a : Data jumlah *fibroblast* mempunyai varians tidak sama atau tidak homogen

Dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut :

1. H_0 diterima apabila nilai signifikansi $P > 0,05$
2. H_0 ditolak apabila nilai signifikansi $P < 0,05$

Apabila data homogen dan terdistribusi normal, dilakukan uji lanjutan yaitu uji One Way ANOVA.

4.9.3 Uji One Way ANOVA

Data penelitian berupa jumlah *fibroblast* pada jaringan tikus putih yang dianalisis statistika dengan uji *one way analysis of variant* (ANOVA) menggunakan program SPSS *version* 20. Nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan. Apabila terdapat perbedaan nyata dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% dengan ($\alpha=0,05$).

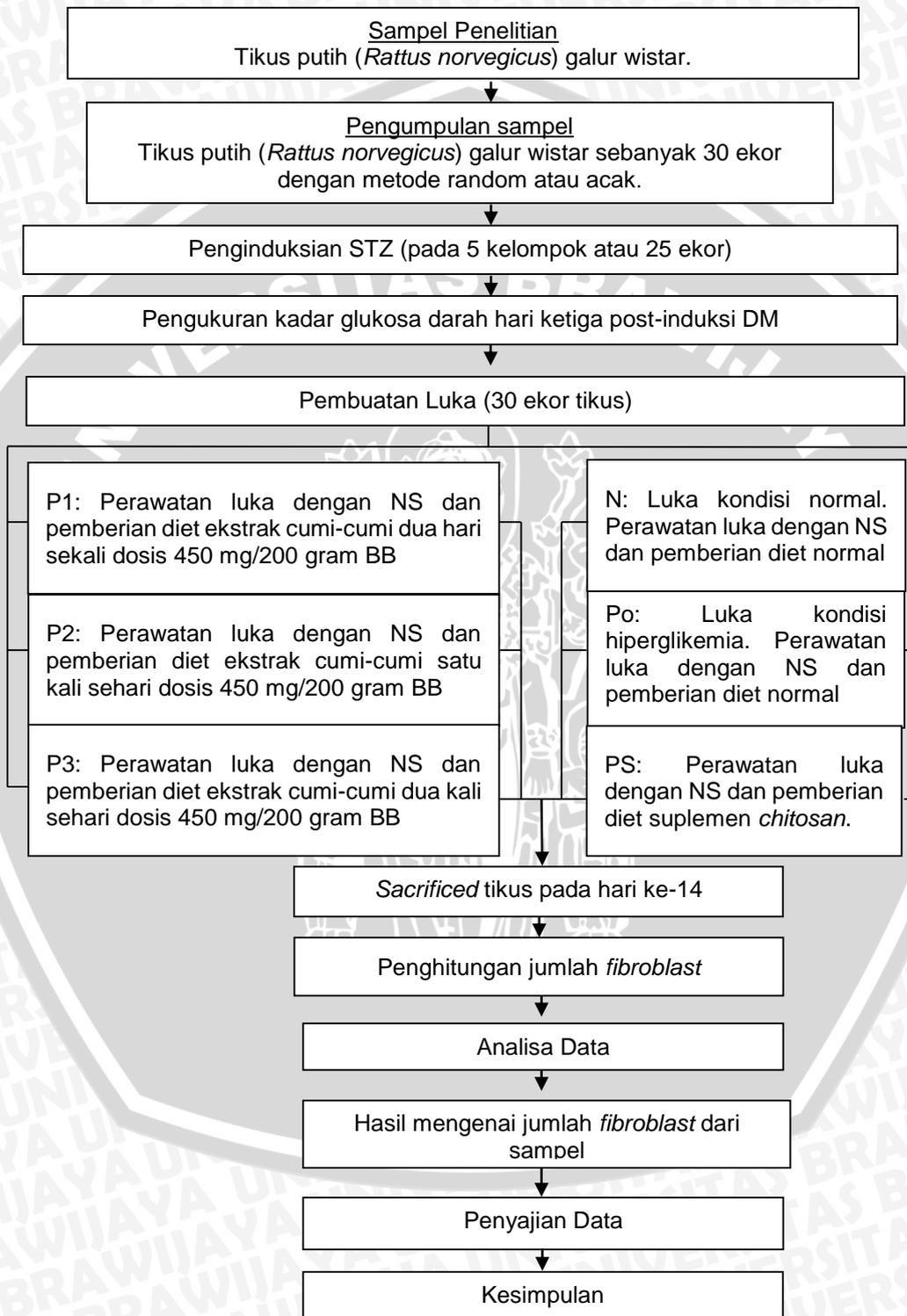
4.9.4 Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*)

Uji Perbandingan Berganda (*Post Hoc Test*) merupakan metode pengujian lanjutan apabila hasil pengujian ANOVA terdapat nilai beda atau ketidaksamaan nilai tengah pada data yang diujikan. Metode ini berfungsi untuk mengetahui nilai tengah mana yang memiliki perbedaan yang signifikan. Biasanya dilakukan

dengan melihat besar variasi dari tiap kombinasi perbandingan nilai tengah yang diamati. Kelompok dengan nilai signifikansi paling kecil, mempunyai nilai signifikansi paling bermakna dalam kelompok – kelompok uji coba.



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian

