

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental laboratory*) untuk mengetahui perbandingan antara perawatan menggunakan terapi standar konvensional dengan perawatan secara oral dan topikal menggunakan ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostratus*). Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratory* dengan pengamatan *post-test only control group design*, untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostratus*) terhadap peningkatan ketebalan epitel luka hiperglikemi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar (Nursalam, 2008). Pada rancangan ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons biologis yang mendekati manusia. Penelitian yang juga pernah dilakukan menggunakan *Rattus norvegicus* adalah penelitian tentang hipertensi, diabetes insipidus, katarak, obesitas, diabetes mellitus, dan lain-lain (Sirois, 2005). Untuk menghindari faktor-faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka, maka ditentukan kriteria inklusi untuk menghomogenkan sampel.

### Kriteria Inklusi

1. Jenis tikus adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar.
2. Berjenis kelamin jantan.
3. Berat badan antara 200-250 gram.
4. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulunya licin, mengkilat dan bersih, bulunya tebal dan tak ada kerontokan bulu yang berarti, badannya tegap tidak kerempeng, tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga, tidak terlalu banyak ludah, tidak mencret dan pernafasan tenang.
5. Diberi minum dan nutrisi dengan jumlah dan jenis yang sama.
6. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya.
7. Masing-masing tikus ditempatkan pada kandang yang sama yaitu dengan dialasi sekam dan diganti tiap 1 hari sekali agar tetap kering, tidak lembab dan 1 kandang ditempati 1 tikus supaya tikus tidak berkelahi dan menimbulkan luka baru
8. Aklimatisasi selama 12 hari.

### Kriteria Ekslusi

1. Luka mengalami infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah), eksudat yang berlebihan, bau busuk,
2. Luka menjadi lebar karena digigit, atau benda tajam lain
3. Tikus mati

#### 4.2.2 Besar Sampel

Untuk menghitung jumlah tikus yang diperlukan sebagai hewan coba, dapat digunakan rumus Friedman sebagai berikut (Supranto, 2000):

$(t-1)(r-1) \geq 15$ , dengan  $t$  = banyaknya kelompok perlakuan,

$r$  = jumlah sampel tiap perlakuan

Jika di dalam penelitian ini diketahui perlakuan ( $t$ ) = 6, yaitu, 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai  $n$  sebagai berikut:

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

$$n-1 > 15/5$$

$$n \geq 3+ 1$$

$$n \geq 4$$

Jadi jumlah sampel untuk tiap kelompok perlakuan minimal 4 ekor tikus, sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan adalah 24 ekor tikus.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dibedakan menjadi variabel dependen (variabel tergantung) dan variabel independen (variabel bebas).

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak jamur tiram oral dengan dosis 200 mg/kgBB dan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20%. Setiap dilakukan perawatan luka, sebelumnya telah dibersihkan dengan normal saline.

##### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah peningkatan ketebalan epitel dalam proses penyembuhan luka hiperglikemi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratoium FAAL, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan selama 5 bulan.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Pembuatan Ekstrak Jamur tiram

1. Oven
2. Penggiling/blender
3. Timbangan/neraca analitik
4. Gelas erlenmeyer
5. Corong gelas
6. Kertas saring
7. Labu evaporator
8. Labu penampung etanol
9. Evaporator
10. Pendingin spiral/*rotary evaporator*
11. Selang *water pump*
12. *Water pump*
13. *Water bath*
14. *Vacum pump*
15. Lemari pendingin/*freezer*
16. Pemanas air
17. Botol hasil ekstrak
18. Jamur Tiram
19. Aquades

20. Etanol 96%

#### 4.5.2 Pembuatan Tikus Model Hiperglikemi

1. Sarung tangan
2. Spuit 1 cc
3. Alkohol 70%
4. *Streptozotocin* (STZ 45 mg/kgBB dalam pelarut buffer sitrat 0,1 M pH 4.5)
5. Larutan Glukosa 5%
6. Glukometer
7. Glukostick

#### 4.5.3 Pembuatan Luka Hiperglikemi

1. Gunting bedah
2. Mezt
3. Underpad
4. Sarung tangan
5. Pinset anatomis 2 buah
6. Kassa
7. Spuit
8. *Ketamine hydrochloride*
9. Bak steril
10. Alat cukur
11. Air Steril
12. Alkhohol 70%
13. Bengkok
14. Penggaris

#### 4.5.4 Pengenceran Ekstrak Jamur Tiram dan Metformin

1. Timbangan OHAUS dengan kapasitas maksimal penimbangan 610 gr dengan ketelitian 0,1 mg.
2. Mortar
3. Sput
4. Gelas ukur
5. Pengaduk
6. Aquades
7. Ekstrak jamur tiram
8. Metformin tablet

#### 4.5.5 Perawatan Luka

1. Bak instrument
2. Sarung tangan steril
3. Kassa steril
4. Kassa bersih
5. Bengkok
6. Perlak
7. Hipafix
8. Pinset anatomis 2 buah
9. *Normal saline*
10. Ekstrak jamur tiram konsentrasi 20%
11. Ekstrak jamur tiram dosis 200 mg/kgBB
12. Gunting nekrotomi
13. Gunting
14. Kom steril

15. Sonde lambung tikus

16. Sduit 1cc

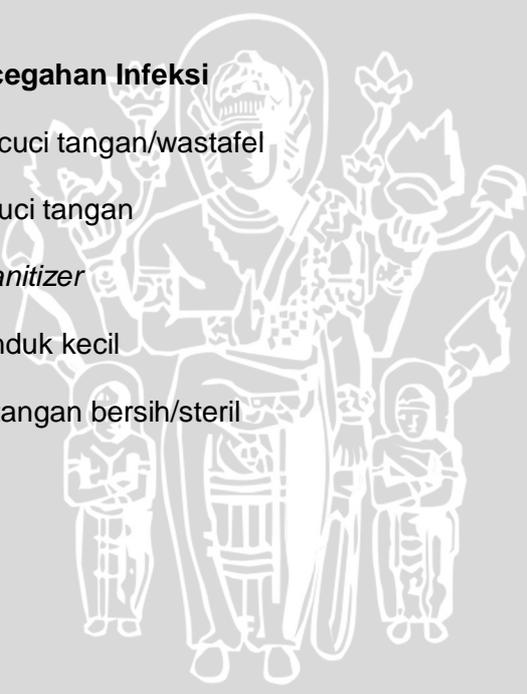
17. Sduit 10cc

#### 4.5.5 Pemeliharaan Tikus

1. Kandang/bak tikus
2. Penutup kandang dari anyaman kawat
3. Botol air
4. Makanan tikus (katul)
5. Sekam

#### 4.5.6 Teknik Pencegahan Infeksi

1. Tempat cuci tangan/wastafel
2. Sabun cuci tangan
3. *Hand Sanitizer*
4. Kain handuk kecil
5. Sarung tangan bersih/steril



#### 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak Jamur tiram	Jamur Tiram yang digunakan yaitu Jamur dengan Jenis <i>Pleurotus ostreatus</i> . Jamur ini diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Selanjutnya jamur tiram ini diekstrak dengan pelarut etanol 96% kemudian direndam (maserasi) selama 4 hari. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja. Kemudian hasil maserasi dimasukkan dalam labu ekstraksi. <i>Water bath</i> dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70° C. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Kemudian disimpan dalam suhu 5°.	-	-
2	Variabel Dependen: Peningkatan ketebalan epitel	<p>Perhitungan ketebalan sel epitel dilakukan dengan pengambilan preparat jaringan kulit pada hari ke 14 untuk pembuatan slide histologi dengan pemotongan vertikal dan menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin).</p> <p>Slide histologi kemudian dilakukan scanning menggunakan software Olyvia. Dari hasil scan preparat tersebut selanjutnya dilakukan penghitungan peningkatan ketebalan epitel. Jaringan epitel mempunyai susunan rapat dan terletak diatas membrane basal. Pengamatan ketebalan lapisan epitel diukur menggunakan mikroskop perbesaran 100x dan software Dotslide, ketebalan lapisan epitel diukur menggunakan micrometer, dari lapisan stratum korneum sampai dengan stratum basale. (Aryenti, 2008). Klasifikasi luka adalah grade 2 skala wagner yaitu ulkus mencapai tendon dan tulang. (Neuvong &amp; Armstrong, 2011)</p>	ketebalan sel epitel	Nominal

## Lanjutan Tabel 4.1 Definisi Operasional

3	Perawatan luka Hiperglikemi	Perawatan luka menggunakan ekstrak jamur tiram oral dengan dosis 200 mg/kgBB melalui sonde lambung dan Pemberian ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20 % (Jayakumar <i>et al.</i> ,2006). Ekstrak jamur tiram di berikan secara topikal, oral, dan topikal-oral. Sebelumnya luka dibersihkan dahulu dengan larutan <i>Normal Saline</i> dan ditutup dengan kassa steril, perawatan luka dilakukan setiap hari selama 14 hari. Klasifikasi luka adalah grade 2 skala wagner yaitu ulkus mencapai tendon dan tulang. (Neuvong & Armstrong, 2011)	-	-
---	-----------------------------	--	---	---

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Cara Membuat Ekstrak Jamur Tiram

Metode yang digunakan untuk pembuatan ekstrak jamur tiram ini adalah metode ekstraksi maserasi. Metode ini merupakan salah satu cara untuk memisahkan campuran padat-cair. Ekstraksi jamur tiram diproses melalui pemisahan senyawa-senyawa dari campuran bahan-bahan lain dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang larut dengan air dan dibuat dengan evaporator.

Pembuatan ekstrak jamur tiram mengikuti standar pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, meliputi :

#### 1. Tahap pengeringan

- a. Mencuci bersih jamur tiram yang akan dikeringkan.
- b. Memasukkan ke dalam oven dengan suhu 80° C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

## 2. Tahap Ekstraksi

- a. Setelah kering, menghaluskan dengan blender sampai halus.
- b. Menimbang sebanyak 300 gram (sampel kering).
- c. Memasukkan 300 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran  $\pm 1$  liter.
- d. Merendam dengan etanol 96% sampai volume menjadi 1 liter.
- e. Mengocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit).
- f. Diamkan satu malam sampai benar-benar mengendap.

## 3. Tahap Evaporasi

- a. Mengambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).
- b. Masukkan dalam labu evaporasi ukuran satu liter.
- c. Isi water bath dengan air sampai penuh.
- d. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas water bath (atur sampai  $70^{\circ}$  C atau sesuai dengan titik didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik.
- e. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
- f. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk satu labu)  $\pm 900$  mL.
- g. Hasil yang diperoleh kira-kira  $1/4$  dari jumlah
- h. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik/kaca.
- i. Ekstrak disimpan di dalam lemari pendingin/*freezer* untuk dipakai saat penelitian.

#### 4.7.2 Cara Membuat Konsentrasi Ekstrak Jamur Tiram

Berdasarkan Lacher (2008), ekstrak jamur tiram topical akan diencerkan dengan menggunakan rumus:

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

Keterangan:

$N1$  : Konsentrasi awal

$N2$  : Konsentrasi akhir

$V1$  : Volum awal

$V2$  : Volum akhir

Pengenceran 20%

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100 \% \cdot V1 = 20 \% \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V1 = 20 \% : 100 \%$$

$$V1 = 0,2 \text{ ml}$$

(0,2 ml ekstrak jamur tiram, 0,8 ml aquadest).

Pengenceran ekstrak jamur tiram menjadi konsentrasi yang diinginkan dilakukan dengan menambahkan aquades steril dengan jumlah yang telah didapatkan melalui rumus diatas. Pengenceran dilakukan setiap hari. Sisa ekstrak yang sudah jadi disimpan di lemari es.

#### 4.7.3 Pembuatan Tikus Model Hiperglikemi

Tikus diinduksi DM dengan injeksi Streptozotocin (STZ) intraperitoneal *single dose* 45 mg/kgBB dalam pelarut buffer sitrat 0,1 M pH 4.5 setelah sebelumnya dipuasakan selama 12 jam. Setelah 24 jam injeksi STZ, tikus diberikan larutan glukosa 5 % untuk menghindari kematian akibat hipoglikemia. Tujuh hari setelah injeksi STZ, glukosa darah diukur melalui vena ekor dengan menggunakan glukometer dan tikus dengan

glukosa darah diatas 250 mg/dL dinyatakan sebagai diabetes (Lodhi, 2010; Mekala *et al.*, 2011).

#### 4.7.4 Pembuatan Luka pada Tikus Model Hiperglikemi

1. Lakukan cek kadar gula darah sebelum dilakukan pembuatan luka. Dilakukan pembuatan luka jika kadar gula darah puasa mencapai >250 mg/dL diukur dengan glukometer.
2. Tandai daerah yang akan dibuat luka dengan ukuran 1,5x1,5 cm dengan kedalaman epidermis hingga hipodermis
3. Lakukan pencukuran dengan menggunakan Mesh pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5x3 cm
4. Anastesi umum pada hewan coba dengan *Ketamine hydrochloride* 25 mg/kgBB secara intraperitoneal
5. Masukkan hewan coba pada kandang dan tunggu selama 5 menit hingga hewan coba hilang kesadaran
6. Kemudian desinfeksi menggunakan alkohol 70% dibagian yang akan dilukai
7. Cubit bagian kulit dengan pinset kemudian eksisi bagian kulit yang sudah ditandai menggunakan gunting bedah
8. Setelah luka dibuat lakukan perawatan luka dengan prosedur yang telah ditentukan
9. Masukkan tikus kedalam kandang dan biarkan kesadarannya kembali.

#### 4.7.5 Perawatan luka menggunakan ekstrak jamur tiram

Perawatan luka dilakukan satu kali sehari. Luka pada semua kelompok dibersihkan terlebih dahulu dengan normal saline lalu diberikan perlakuan sebagai berikut

- Kelompok kontrol 1 luka tikus sehat dirawat dengan normal saline.
- Kelompok kontrol 2 luka tikus hiperglikemi dirawat dengan normal saline.
- Kelompok kontrol 3 luka tikus hiperglikemi dirawat dengan pemberian obat oral metformin (*Merupakan Gold Standart obat Diabet*) 63 mg/kgBB
- Kelompok P1 luka tikus hiperglikemi s dirawat dengan ekstrak jamur tiram oral dengan dosis 200 mg/kgBB
- Kelompok P2 luka tikus hiperglikemi dirawat dengan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20%
- Kelompok P3 luka tikus hiperglikemi dirawat dengan ekstrak jamur tiram oral dosis 200 mg/kgBB dan ekstrak jamur tiram topikal konsentrasi 20%

**Prosedur perawatan luka:**

- a) Cuci tangan.
- b) Tempatkan Perlak yang dilapisi kain dibawah 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 kassa sesuai besarnya luka

**Kelompok kontrol 1 & 2**

- 1) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal saline.
- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).

- 3) Tempelkan kassa (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah dibasahi dengan normal saline pada area luka.
- 4) Tempelkan hipafix untuk mempertahankan balutan primer.
- 5) Balut luka dengan kassa gulung ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi.

#### Kelompok kontrol 3

- 1) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal saline.
- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).
- 3) Tempelkan kassa (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah dibasahi dengan normal saline pada area luka.
- 4) Tempelkan hipafix untuk mempertahankan balutan primer.
- 5) Balut luka dengan kassa gulung ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi.
- 6) Berikan obat metformin 63 mg/kgBB menggunakan sonde lambung.

#### Kelompok P1

- 1) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal saline.
- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).
- 3) Tempelkan kassa (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah dibasahi dengan normal saline pada area luka.
- 4) Tempelkan hipafix untuk mempertahankan balutan primer.

- 5) Balut luka dengan kassa gulung ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi.
- 6) Berikan ekstrak jamur tiram oral 200 mg/kgBB menggunakan sonde lambung.

#### Kelompok P2

- 1) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal saline.
- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).
- 3) Berikan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20% pada area luka menggunakan spuit 1cc
- 4) Tempelkan kassa (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah dibasahi dengan normal saline pada area luka.
- 5) Tempelkan hipafix untuk mempertahankan balutan primer.
- 6) Balut luka dengan kassa gulung ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi.

#### Kelompok P3

- 1) Bersihkan luka dengan cara mengirigasi daerah luka menggunakan normal saline.
- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).
- 3) Berikan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20% pada area luka menggunakan spuit 1cc
- 4) Tempelkan kassa (kassa steril ukuran 2x3 cm) yang telah dibasahi dengan normal saline pada area luka.

- 5) Tempelkan hipafix untuk mempertahankan balutan primer.
- 6) Balut luka dengan kassa gulung ukuran 6x50 cm. Bentuk balutan seperti gurita bayi.
- 7) Berikan ekstrak jamur tiram oral 200 mg/kgBB sonde lambung.

#### **4.8 Prosedur Pemeriksaan**

##### **4.8.1 Prosedur Eksisi Pengambilan Jaringan**

Pada hari terakhir penelitian yaitu pada hari ke 14, hewan coba pada tiap kelompok akan diambil jaringan luka yang telah dirawat luka untuk dilihat secara histologi mengenai peningkatan ketebalan epitel. Proses eksisi jaringan dimulai dengan pematian hewan coba dengan cara dieutanasia dengan inhalasi ether kloroform. Dalam keadaan ini hewan coba akan terbius dan perlahan akan mati. Hal ini ditujukan untuk meminimalkan rasa penderitaan hewan coba saat proses kematian.

Setelah hewan coba mati, secepat mungkin bulu disekitar punggung yang telah dieksisi dan dirawat dicukur hingga bersih dan didesinfeksi dengan alkohol 70% selanjutnya dibuat eksisi menggunakan pisau bedah mencapai batas lapisan otot. Tiap jaringan yang telah dieksisi akan disimpan dalam botol yang berisi larutan formalin buffer agar tetap awet hingga dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk dilakukan pewarnaan.

##### **4.8.2 Prosedur Pembuatan Preparat**

###### **a. Fiksasi**

Jaringan luka yang telah eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam *Phospat*

*Buffer Saline* pada pH 7,0) selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

**b. Dehidrasi**

Pada tahap ini potongan jaringan eksisi dimasukkan dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat agar jaringan menjadi lebih jernih dan transparan, kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan *xylol* murni selama 2 x 2 jam.

**c. Impregnasi**

Pada tahap ini jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam

**d. Embedding**

Setelah impregnasi, jaringan akan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C. Setelah ditanam, parafin ditunggu hingga padat. Jaringan dalam parafin dipotong secara vertikal setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan-potongan jaringan tersebut kemudian ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai parafin mencair.

**e. Pewarnaan dengan *Hematoxylin Eosin (HE)***

Pada tahap *staining*, *object glass* dimasukkan pada *Xylol* 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 pewarnaan Eosin selama 15menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *xylol* 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 *Hematoxylin* dan diamkan selama 5 menit, kemudian dilarutkan dalam air hangat 60°C agar berwarna *merah* kurang lebih selama 3-10 menit. Lalu dibilas dengan menggunakan *aquadest*, dan dilanjutkan dengan memberi larutan *eosin* dengan cepat (1x celup). Kemudian dilakukan dehidrasi alkohol 96% 2x, absolute 2x, *xylol* 2x, lalu diberi balsam *Canada* dan ditutup dengan kaca penutup.

#### 4.8.3 Identifikasi peningkatan ketebalan epitel

Identifikasi pembentukan jaringan epitel luka dilakukan setelah perawatan luka. Jaringan epitel merupakan jaringan yang mempunyai susunan yang rapat dan terletak diatas membrane basalis. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan foto mikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software

OlyVia (Viewer for Imaging Application). Pengamatan ketebalan lapisan epitel diukur menggunakan mikroskop perbesaran 100x dan Software Dotslide. 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).

#### 4.8.4 Cara Pengumpulan Data

Pada hari terakhir penelitian, hewan coba baik kelompok eksperimental maupun kontrol diambil jaringan lukanya dengan cara eksisi. Selanjutnya jaringan yang telah dieksisi dilakukan fiksasi dengan blok parafin kemudian diwarnai dengan *Hematoxylin Eosin*. Pembacaan hasil peningkatan ketebalan epitelisasi dilakukan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software Olyvia (Viewer for Imaging Applications) dengan perbesaran 100 serta software Dotslide. Setelah diamati, jaringan dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan itu sendiri. Data diambil dari hasil pembacaan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

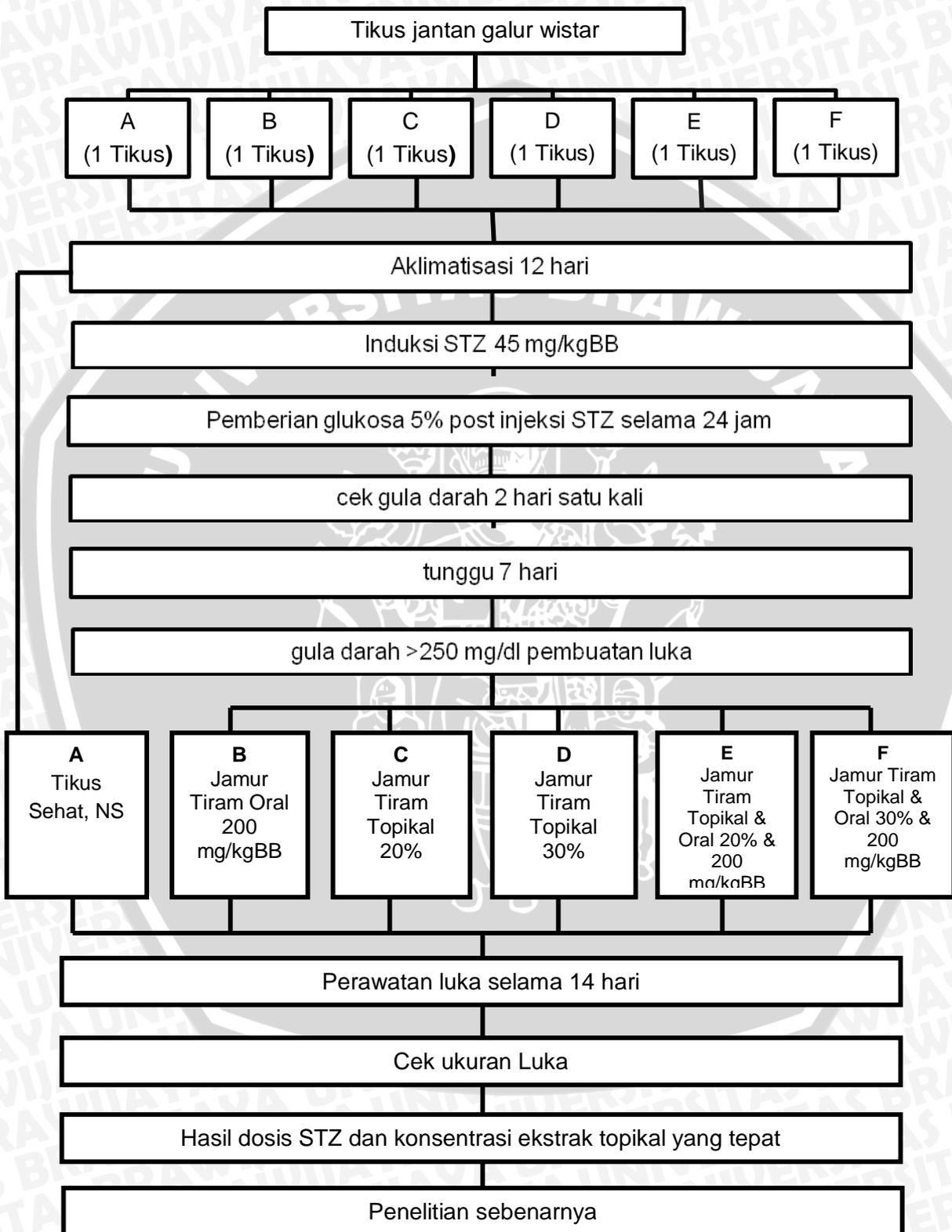
$$\text{Rumus Ketebalan Epitel} = \frac{\text{Perhitungan (1+2+3+4+5)}}{5}$$

(Trisnaningtyas, 2013)

#### 4.9 Analisis Data

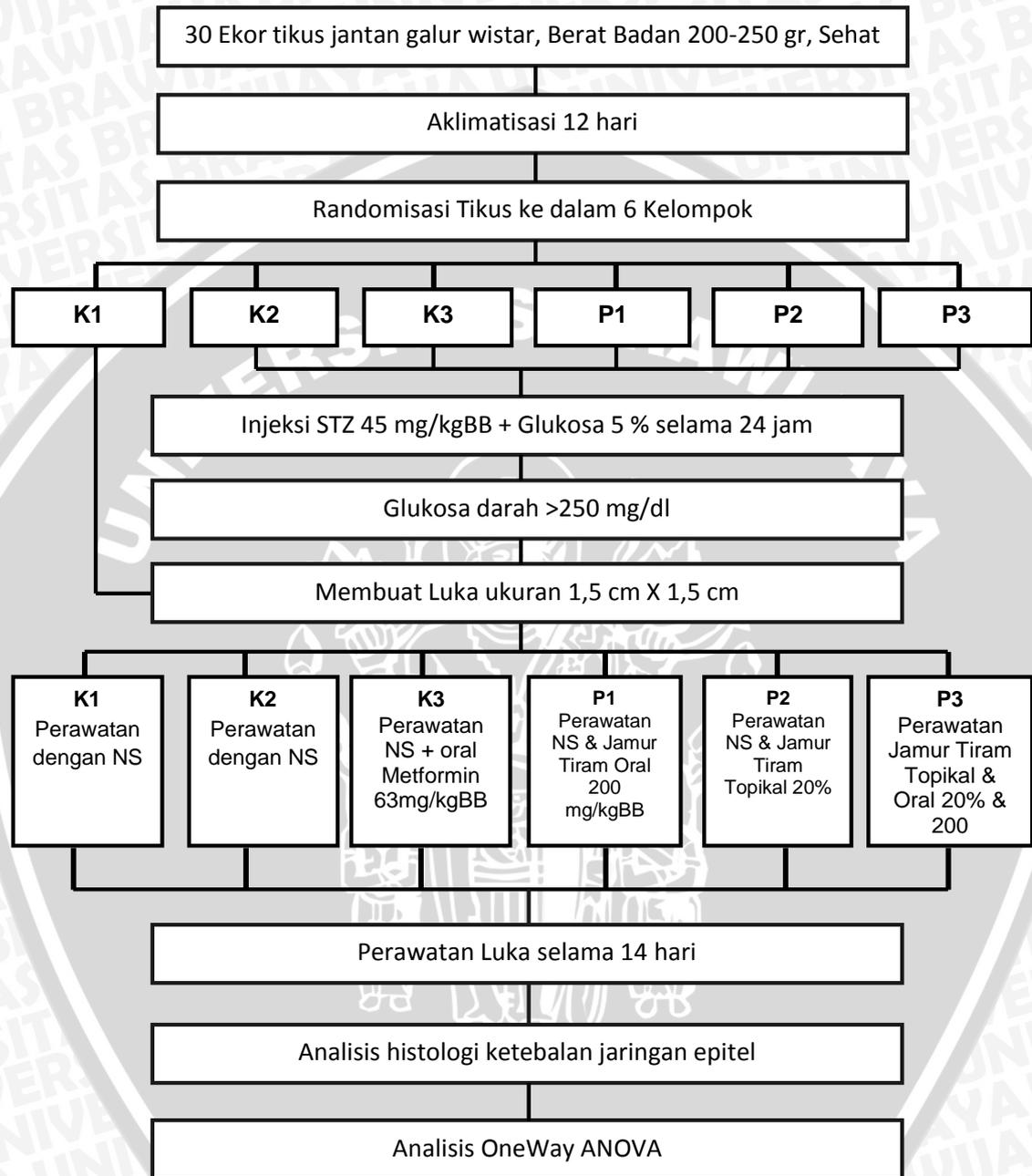
Analisa data yang digunakan adalah *parametric test*, yaitu *One-way analysis of variance* (ANOVA) dan diolah dengan menggunakan program SPSS 16. Sebelum melakukan analisa data menggunakan one way ANOVA, diperlukan pemenuhan atas beberapa asumsi data, yaitu data harus mempunyai distribusi normal, ragam yang homogen, error percobaan bersifat acak dan bebas. Distribusi normal merupakan distribusi teoritis dari variabel random yang kontinyu (Dahlan, 2009). Kurva yang menggambarkan distribusi normal adalah kurva yang berbentuk simetris. Untuk menguji apakah sampel penelitian merupakan jenis distribusi normal digunakan pengujian Shapiro-Wilk terhadap masing-masing variabel. Pada uji Shapiro-Wilk, suatu data dikatakan memiliki sebaran distribusi normal jika nilai  $p$  (value)  $> 0,05$ . Apabila  $p$  (value)  $< 0,05$ , maka data tidak berdistribusi normal (Dahlan, 2009). Setelah didapatkan distribusi normal, kemudian dilakukan pengujian homogenitas dengan uji levene statistic. Data homogen atau memiliki varian yang normal apabila  $p$  (value)  $> 0,05$  (Dahlan, 2009). Kemudian dilanjutkan dengan pengujian one way ANOVA. Setelah itu, dilanjutkan dengan Post Hoc Test (Tuckey) untuk mengetahui adanya perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok. Untuk uji ANOVA dan Post Hoc Test,  $p$  (value) bermakna apabila  $< 0,05$  dan tidak bermakna apabila  $p$  (value)  $> 0,05$ .

#### 4.10 Alur Kerja Studi Pendahuluan



Gambar 4.1 Alur kerja Studi Pendahuluan

4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian