

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *true experimental laboratory* yang menggunakan pengamatan *post-test only control group design* untuk mengetahui perbandingan antara perawatan menggunakan terapi standar konvensional dengan perawatan secara oral dan topikal menggunakan ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostratus*) (Nursalam, 2011). Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostratus*) terhadap peningkatan kepadatan jaringan kolagen pada luka tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar model hiperglikemia. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus (*Rattus novegicus*) galur wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons biologis yang mendekati manusia (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 1 hari sekali agar tetap kering, tidak lembab dan 1 kandang ditempati 1 tikus agar 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, dan 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 luka dibersihkan terlebih dahulu dengan normal saline.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kepadatan jaringan kolagen dalam proses penyembuhan luka hiperglikemia pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratoium FAAL, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan selama 3 bulan.



#### 4.4 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat dan Bahan 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%

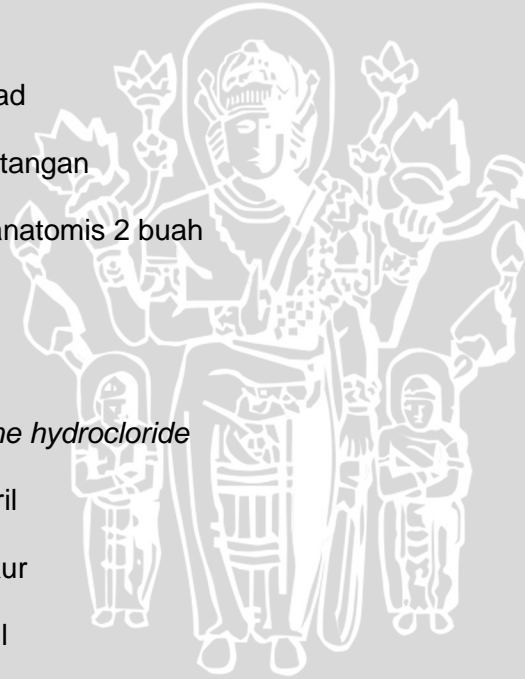
##### 4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Tikus Model Hiperglikemia

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 Alat dan Bahan Pembuatan Luka

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



#### 4.5.4 Alat dan Bahan Pengenceran Ekstrak Jamur Tiram dan Metformin

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

#### 4.5.5 Alat dan Bahan 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. Spuit 1cc
17. Spuit 10cc

#### 4.5.5 Alat dan Bahan 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

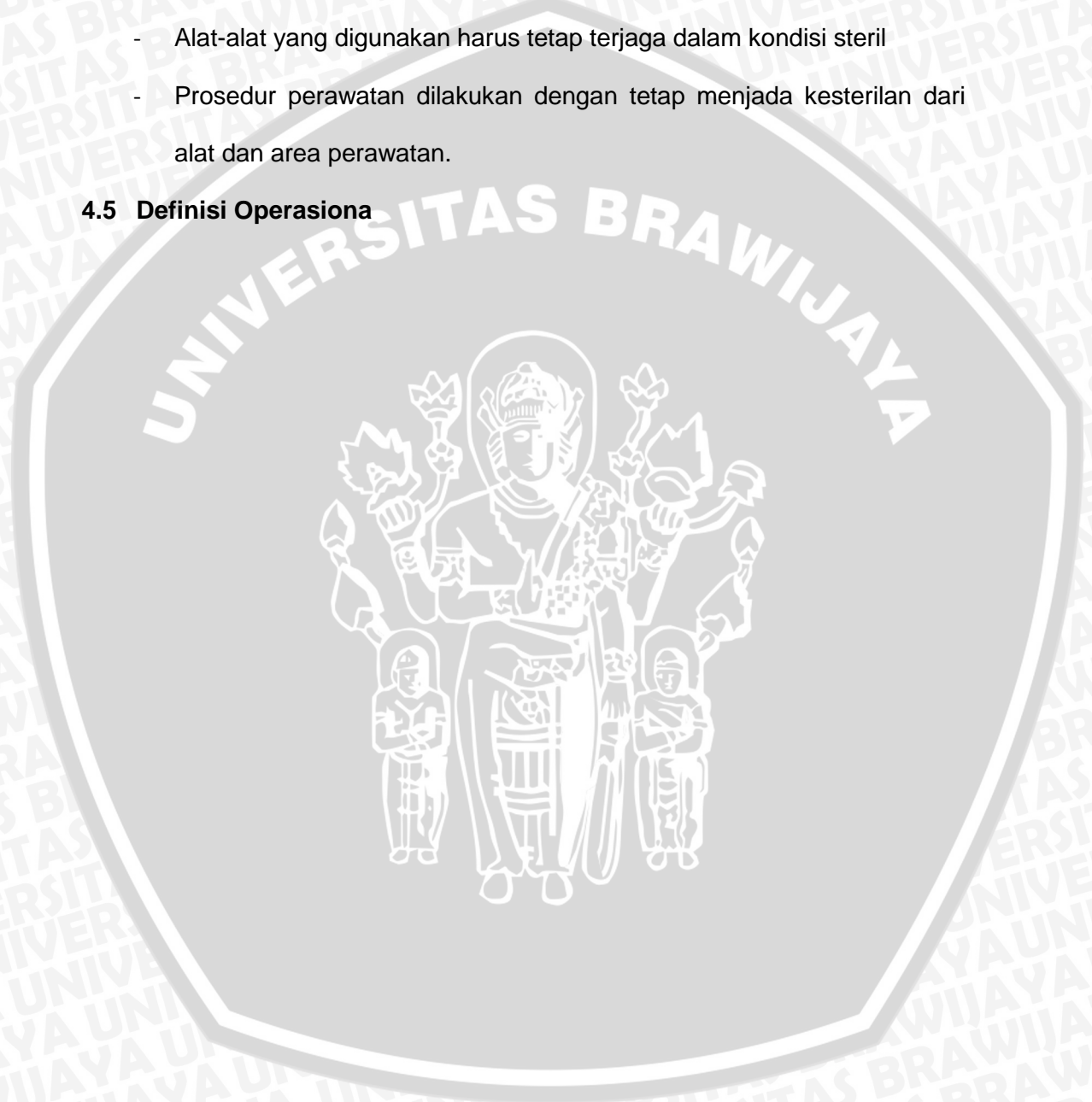
1. Tempat cuci tangan/wastafel
2. Sabun cuci tangan
3. *Hand Sanitizer*
4. Kain handuk kecil
5. Sarung tangan bersih/steril

Pencegahan infeksi dilakukan dengan teknik aseptik. Teknik aseptik berarti “tanpa mikroorganisme” yang pada prinsipnya teknik ini bertujuan untuk mencegah adanya kontaminasi dari organisme patogen selama prosedur perawatan luka agar luka tidak terinfeksi (NHS, 2013). Hal yang harus diperhatikan pada perawatan dengan teknik steril adalah suplai, instrumen, sarung tangan, dan lingkungan tempat perawatan harus dalam kondisi steril (Agosti, 2010).

Prinsip teknik Aseptik menurut WOCN (2012) yaitu:

- Menggunakan APD (jas lab, sarung tangan steril, dan masker *disposable*)
- Lingkungan tempat perawatan harus terhindar dari kontaminasi
- Alat-alat yang digunakan harus tetap terjaga dalam kondisi steril
- Prosedur perawatan dilakukan dengan tetap menjaga kesterilan dari alat dan area perawatan.

#### 4.5 Definisi Operasional





Tabel 4.1 Definisi Operasiona

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak Jamur tiram	Bahan perawatan luka hiperglikemia Jamur Tiram dengan Jenis <i>Pleurotus ostreatus</i> dalam bentuk ekstraks. Jamur ini diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Ekstraksi jamur tiram dibuat dengan metode maserasi (perendaman selama 4 hari) menggunakan pelarut etanol 96%. Evaporator dipasang pada tiang permanen kemudian digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja. Selanjutnya hasil maserasi dimasukkan dalam labu ekstraksi. <i>Water bath</i> dihubungkan dengan sumber listrik dan diatur suhunya sampai 70° C. Hasil akhir evaporasi berupa cairan kental yang kemudian disimpan dalam suhu 5°C (Arifin, 2006).	Miligram (Mg)	-
2	Kepadatan kolagen	Merupakan jumlah serabut berwarna pink muda. Perhitungan jaringan kolagen dilakukan dengan pengambilan preparat jaringan kulit pada hari ke 14 untuk pembuatan slide histologi dengan pemotongan vertikal ukuran 4 mikron dan menggunakan <i>Hematoksilin Eosin</i> (HE) (Ashkani-Esfahani et al., 2012). Slide histologi kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 dengan pembesaran 400 kali pada 5 lapang pandang dengan menggunakan software Olyvia, lokasi pengamatan adalah daerah bekas luka diabetes. Selanjutnya densitas atau kepadatan jaringan kolagen diinterpretasikan secara kuantitatif dengan menggunakan <i>grid of line</i> sesuai dengan metode histopatologi internasional (Hajiaghaalipour et al., 2013).	%	Rasio
3	Perawatan luka diabetes	Luka dirawat dengan menggunakan ekstrak jamur tiram yang diberikan secara oral dengan dosis 200 mg/kgBB melalui sonde lambung dan dengan pemberian ekstrak jamur tiram secara topikal dengan konsentrasi 20 % (Jayakumar et al., 2006). Ekstrak jamur tiram di berikan secara topikal, oral, dan topikal-oral. Sebelum diberikan ekstraks, luka dibersihkan dahulu dengan larutan <i>Normal Saline</i> dan setelah diberikan ekstrak secara topikal, luka kemudian ditutup dengan kassa steril. Perawatan luka dilakukan selama 14 hari, dengan penggantian balutan dan pemberian ekstraks setiap hari.	-	-

## 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 :

#### Tahap pengeringan

- Jamur tiram yang akan dikeringkan dicuci bersih terlebih dahulu.
- Jamur yang sudah bersih kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80° C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

#### Tahap Ekstraksi

- Setelah kering, kemudian dihaluskan dengan blender.
- Jamur yang sudah halus ditimbang sebanyak 300 gram (sampel kering).
- 300 gram sampel kering dimasukan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran  $\pm 1$  liter.
- Rendam dengan etanol 96% sampai volume menjadi 1 liter.
- Selanjutnya dikocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit).

- f. Diamkan satu malam sampai benar-benar mengendap.

### Tahap Evaporasi

- a. Lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur diambil (bisa dengan cara disaring menggunakan kertas saring).
- b. Masukkan kedalam 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° 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 sebelumnya
- h. Hasil ekstraksi dimasukkan 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

Ekstrak jamur tiram yang ada kemudian diencerkan berdasarkan rumus

Lacher (2008), yaitu sebagai berikut :

$$V1XN1=V2XN2$$

Keterangan:

$N1$  : Konsentrasi awal

$N2$  : Konsentrasi akhir

$V1$  : Volum awal

$V2$  : Volum akhir



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 Hiperglikemia**

Tikus diinduksi DM dengan diinjeksi 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 dengan mengambil darah melalui vena di ekor tikus dan diukur dengan menggunakan glukometer, tikus dengan glukosa darah diatas 250 mg/dL dinyatakan sebagai hiperglikemia(Lodhi, 2010; Nagmoti, 2015).

#### **4.7.4 Pembuatan Luka pada Tikus Model Hiperglikemia**

Pembuatan luka dilakukan setelah tikus dalam kondisi hiperglikemiadan sebelum dilakukan pembautan luka, tikus dianastesi untuk mengurangi kesakitan.

Prosedur pembautan luka adalah sebagai berikut (Kant, 2014) :

1. Kadar gula darah tikus di cek terlebih dahulu sebelum dilakukan pembuatan luka. Pembuatan luka dilakukan jika kadar gula darah puasa mencapai >250 mg/dL diukur dengan glukometer.
2. Daerah yang akan dibuat luka ditandai dengan ukuran 1,5x1,5 cm dengan kedalaman epidermis hingga hipodermis
3. Pencukuran dilakukan dengan menggunakan Mesh pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5x3 cm

4. Hewan coba dianestesi general dengan *Ketamine hydrochloride* 25 mg/kgBB secara intraperitoneal
5. Hewan coba yang sudah di anestesi dimasuka ke dalam kandang dan ditunggu selama 5 menit hingga hewan coba hilang kesadaran.
6. Kemudian desinfeksi menggunakan alkohol 70% dibagian yang akan dilukai
7. Cubit bagian kulit denga 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 hiperglikemia dirawat dengan normal saline.
- Kelompok kontrol 3 luka tikus hiperglikemia dirawat dengan pemberian obat oral metformin 63 mg/kgBB
- Kelompok P1 luka tikus hiperglikemia dirawat dengan ekstrak jamur tiram oral dengan dosis 200 mg/kgBB
- Kelompok P2 luka tikus hiperglikemia dirawat dengan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20%

- Kelompok P3 luka tikus hiperglikemia dirawat dengan ekstrak jamur tiram oral dosis 200 mg/kgBB dan ekstrak jamur tiram topikal konsentrasi 20%

#### **Prosedur perawatan luka:**

Perawatan luka dilakukan dengan memperhatikan teknik aseptik untuk mencegah terjadinya infeksi, perawatan luka dilakukan dengan prosedur sebagai berikut (Agosti, 2010) :

- a) Cuci tangan.
- b) Tempatkan Perlak yang dilapisi kain dibawah luka yang akan dirawat.
- c) Atur posisi tikus sehingga memudahkan pelaksanaan tindakan.
- d) Tempatkan bengkak 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 diirigasi 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 menggunakan 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 kepadatan jaringan kolagen. Proses eksisi jaringan dimulai dengan pematian hewan coba dengan cara dikorbankan 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 *Phosphat Buffer Saline* dengan pH 7,0) selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi (Kerr, 2010).

#### 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 (Kerr, 2010).

#### c. Impregnasi

Pada tahap impregnasi, jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam (Kerr, 2010).

#### d. Embedding

Setelah selesai tahap impregnasi, selanjutnya jaringan akan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58<sup>o</sup>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<sup>o</sup>C sampai parafin mencair (Kerr, 2010).

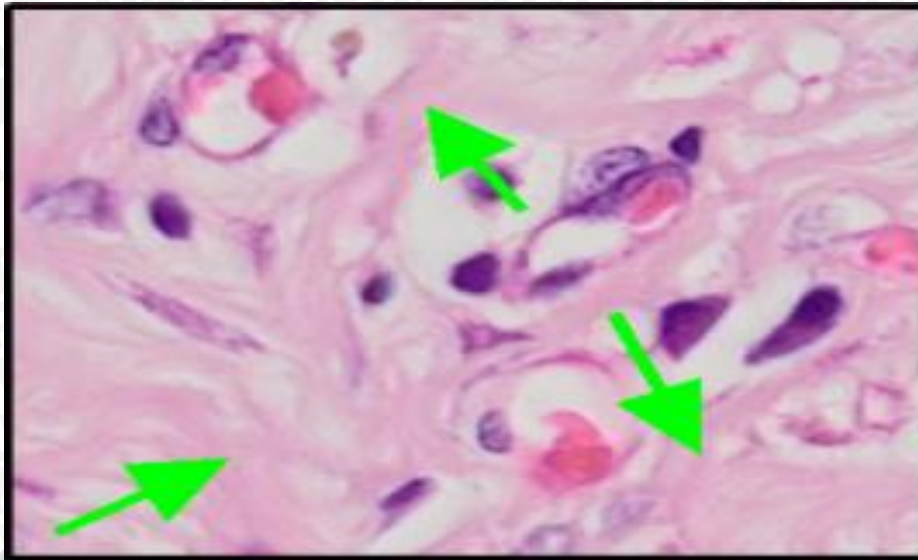
#### e. Pewarnaan dengan *Hematoxylin Eosin (HE)*

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 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *xylol* selama 15 menit x 3. Tahap terakhir adalah preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan* (Kerr, 2010).

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 (Kerr, 2010).

#### f. Identifikasi jumlah kolagen

Identifikasi kepadatan kolagen dilihat secara histologi untuk menganalisa presentase densitas/kepadatan kolagen yang berada di tengah luka (*Centre of wound*) pada hari ke 14 yang diadaptasi dari metode histopatologi standar (Ashkani-Esafahani *et al*, 2012). Identifikasi kolagen luka dilakukan setelah perawatan luka selesai. Kolagen adalah serabut berwarna pink muda pada pewarnaan HE (*Hematoxylin-Eosin*). Pada pemotongan memanjang terlihat terdiri atas serat-serat tebal yang tersusun padat, tidak berlubang dan terdapat inti fibrosit yang terjepit oleh serat padat.

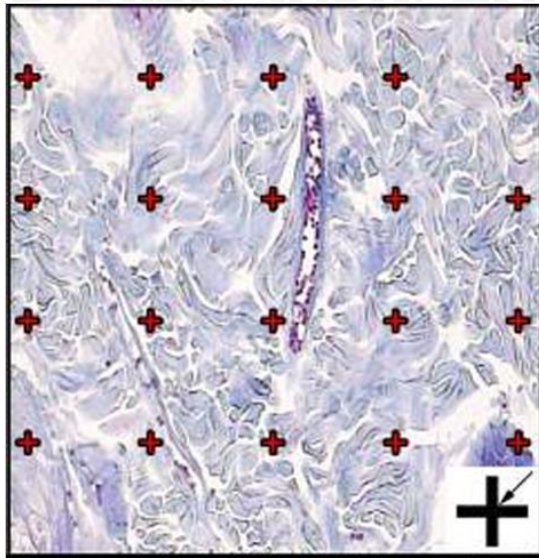


**Gambar 4.1 Serabut Kolagen**

Keterangan : Pada pewarnaan H&E jaringan kolagen (tanda panah hijau) tampak sekumpulan serabut yang berwarna merah muda (Mescher, 2009)

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan fotomikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi software OlyVia (Viewer for Imaging Application) dengan pembesaran 400x pada tiap lapang pandang. Satu slide diambil 5 lapang pandang secara zig zag kemudian dirata-rata. Jumlah jaringan dilihat pada monitor dan dihitung menggunakan *grid of line* (Hajiaghaalipour et al., 2013).





**Gambar 4.2 Penentuan 16 Titik pada Setiap 5 Lapang Pandang.**

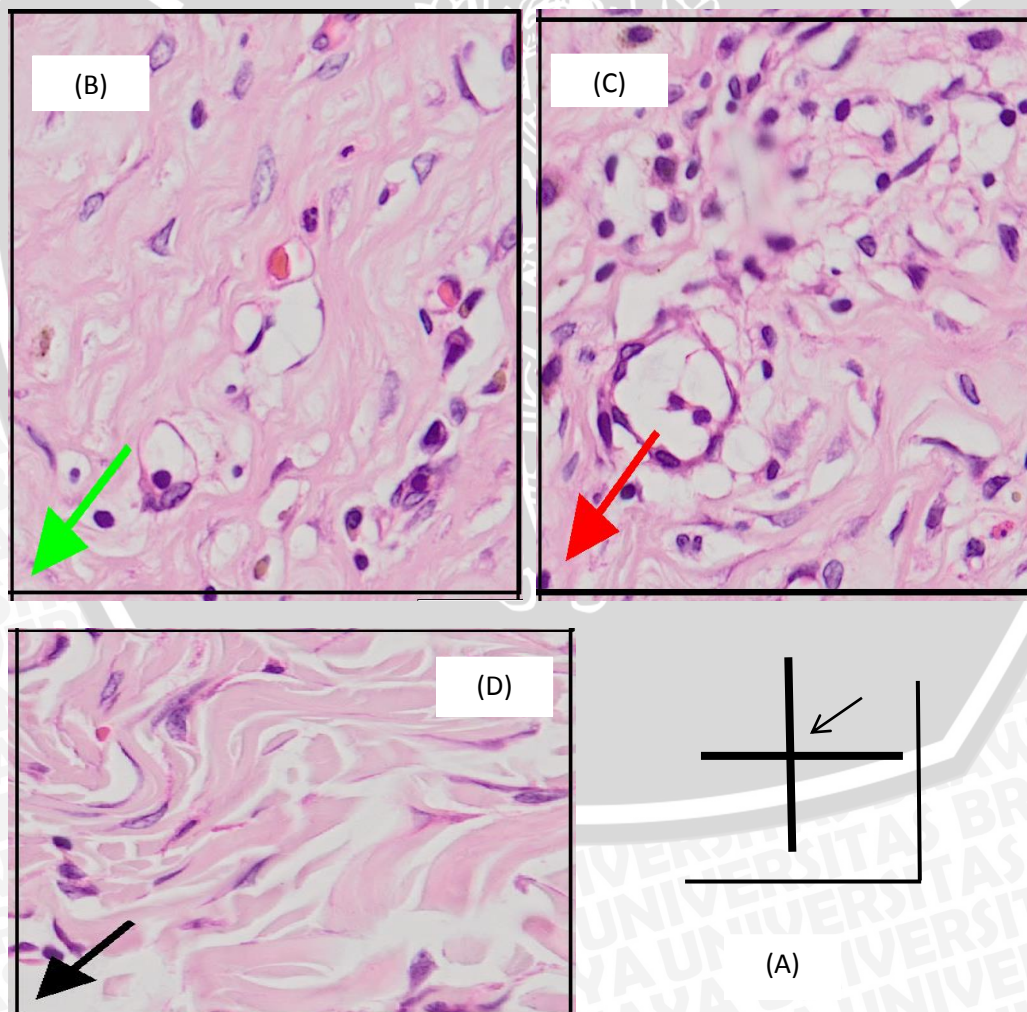
Keterangan : Titik (tanda '+') merupakan titik untuk menentukan berkas kolagen dan titik space dermis penampang kulit (diadaptasi dari Eshafani *et al.*, 2012). Titik yang dimaksud adalah titik yang terbentuk oleh pertemuan antara garis vertikal-horizontal, dimana garis vertikal diidentifikasi sebagai tepi luka.

Berikut adalah langkah-langkahnya:

- Buka slide file preparat pemotongan vertikal hasil pewarnaan HE (dalam format.vsi) yang dikonversikan pada software *Olyvia*.
- Kemudian tentukan perbesaran 40x dengan mengklik bagian zoom. Bagian lapang pandang tengah luka (*centre of wound*) ditentukan, kemudian dilakukan pembesaran lanjutan 100x.
- Lapang pandang tengah luka dibuat seluas 0.6 x 0.6 mm dengan cara mengklik *toolbar (line)* / garis dan membentuk gambar kotak yang disesuaikan dengan panjangnya pada *toolbar ruler* pada *Olyvia*. Satu lapang pandang tengah luka tersebut kemudian dibagi menjadi 9

lapang pandang dengan luas masing-masing 0,2 x 0,2 mm dengan cara yang sama dan dipilih 5 lapang pandang secara zig zag untuk diidentifikasi kepadatannya.

- d. Lakukan perbesaran 100x pada masing-masing 5 lapang pandang terpilih. Enam belas titik dengan jarak yang sama selanjutnya ditandai dengan garis pada setiap 5 lapang pandang tersebut, kemudian dilakukan analisa dengan menghitung titik yang mengenai serabut kolagen dengan jumlah seluruh titik pada daerah epidermis yang diobservasi.



Gambar 4.3 Identifikasi Serabut Kolagen



Keterangan :

- A. Tanda panah pada gambar (A) menunjukkan titik yang dipakai untuk penghitungan kolagen, yaitu titik yang terbentuk dari pertemuan antara garis vertikal-horizontal.
- B. Tanda panah (hijau) di pojok kiri pada titik pertemuan garis vertikal-horizontal mengenai serabut kolagen sehingga dihitung 1
- C. Tanda panah (merah) di pojok kiri pada titik pertemuan garis vertikal-horizontal mengenai selain serabut kolagen sehingga tidak dihitung atau dihitung 0
- D. Tanda panah (hitam) di pojok kiri pada titik pertemuan garis vertikal-horizontal tidak mengenai serabut kolagen karena berada di ruang kosong sehingga tidak dihitung atau dianggap 0.

Presentase kepadatan jaringan kolagen pada tiap lapang pandang yang diobservasi kemudian dihitung dengan mengadaptasi rumus Ashkani-Eshafani *et al* (2012) berikut :

$$\frac{\text{Jumlah titik yang mengenai kolagen}}{\text{Jumlah seluruh titik yang diobservasi}} \times 100\%$$

#### 4.8.3 Cara Pengumpulan Data

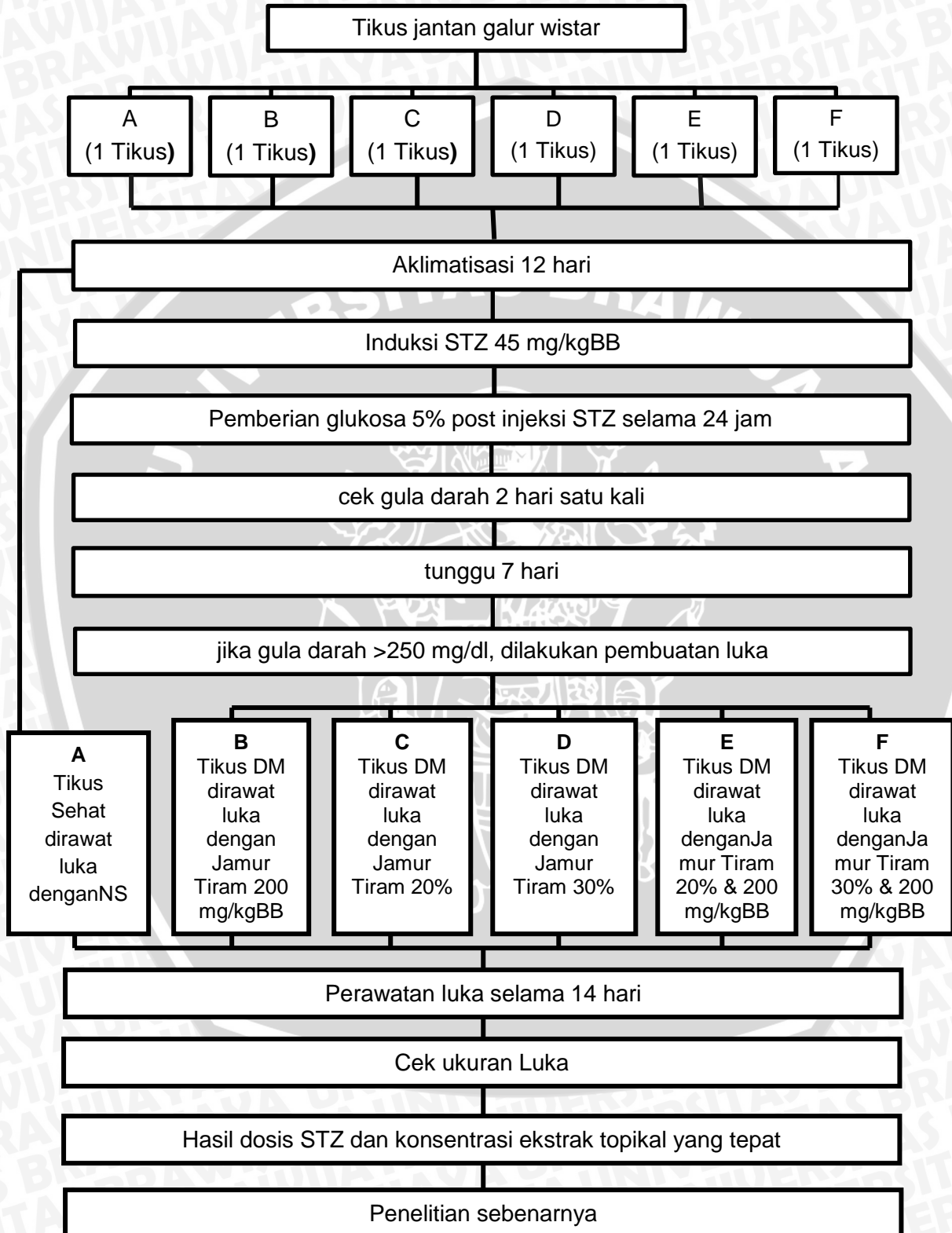
Pada hari terakhir penelitian, hewan coba baik kelompok eksperimental maupun kontrol diambil jaringan lukanya dengan cara eksisi. Selanjutnya jaringan yang telah dieksisi dilakukan fiksasi dengan blok parafin kemudian diwarnai dengan *Hematoxylin Eosin*. Pembacaan hasil pembentukan jaringan granulasi dilakukan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10 yang dilengkapi *software Olyvia (Viewer for Imaging Applications)* dengan perbesaran 400 (Hajiaghaalipour *et al.*, 2013). 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.



#### 4.9 Analisa Data

Analisa data yang digunakan adalah *parametric test*, yaitu *One-way analysis of variance* (ANOVA) dengan menggunakan selang kepercayaan 95% dan diolah dengan menggunakan program SPSS 21 for windows. 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)  $> 0,05$  (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 (LSD) 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



### 4.11 Alur Penelitian

