

## 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 ostreatus*). Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratory* dengan pengamatan *post-test only control group design* (Nursalam, 2011), untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) terhadap peningkatan jumlah fibroblas luka tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar model diabetes mellitus. Pada rancangan 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. Penelitian yang telah pernah dilakukan menggunakan *Rattus novegicus* 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 norvegicus*) 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 Eksklusi

1. Luka menjadi lebar karena digigit, atau benda tajam lain
2. Tikus mati

#### 4.2.2 Besar Sampel

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

$$(t-1)(n-1) \geq 15, \text{ dengan } t = \text{banyaknya kelompok perlakuan,}$$

$$n = \text{jumlah sampel tiap perlakuan}$$

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

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

$$n-1 \geq 15/5$$

$$n \geq 3+ 1$$

$$n \geq 4$$

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 Kontrol

Sebelum dilakukan perawatan, sebelumnya luka dibersihkan dengan normal saline. Kontrol 1: perawatan luka pada tikus sehat dengan normal saline. Kontrol 2: perawatan luka pada tikus diabetes dengan normal saline. Kontrol 3: perawatan luka pada diabetes dengan pemberian obat metformin 63 mg/kgBB

#### 4.3.3 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah fibroblas dalam proses penyembuhan luka diabetes pada tikus putis (*Rattus novvergicus*) galur wistar.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium FAAL, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan selama 3 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 Diabetes Mellitus

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 Diabetes

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. Alkohohl 70%
13. Bengkok
14. Penggaris
15. Alat Tulis

#### 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. Spuit 1cc
17. Spuit 10cc

#### 4.5.6 Pemeliharaan Tikus

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

#### 4.5.7 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. Jamur tiram akan diekstrak sesuai dengan metode yang ada di Laboratorium Farmakologi FKUB, yaitu dengan cara jamur tiram yang kering kemudian dihaluskan. Setelah halus dicampur 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° (Arifin, 2006)	-	-
2	Pembuatan Luka Diabetes Mellitus	Tikus dianastesi ketamine intraperitoneal 25 mg/kgBB dengan posisi pronasi. Bulu daerah punggung dicukur dengan ukuran 5x3, lalu dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70%. Kemudian dibuat luka dengan ukuran 1,5x1,5 cm kemudian eksisi bagian kulit dengan kedalaman epidermis hingga hypodermis. Klafikasi luka yang dibuat adalah klasifikasi wagner skala 2 yaitu hingga jaringan subkutan (Li <i>et al</i> , 2011).	-	-
3	Jumlah Fibroblas	Perhitungan sel fibroblas dilakukan dengan pengambilan preparat jaringan kulit pada hari ke 14 untuk pembuatan slide histologi dengan pemotongan vertikal ukuran 4 mikron dan menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin). Slide histologi kemudian dilakukan scanning menggunakan software Olyvia. Dari hasil scan preparat tersebut selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah sel fibroblas dilakukan dengan cara penghitungan counter yaitu diambil rata-rata dari masing-masing lapang pandang (Mazzyala, 2008).	Jumlah sel fibroblas	Nominal

Tabel 4.1 Definisi Operasional (Lanjutan)

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
4	Perawatan luka diabetes	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.	-	-

## 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

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

#### 2. Tahap Ekstraksi

- 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 3-4 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° 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 jamur tiram kering.
- 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 Pengenceran Ekstrak Jamur Tiram Topikal

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

$$N1XV1=N2XV2$$

Keterangan:

$N1$  : Konsentrasi awal

$N2$  : Konsentrasi akhir

$V1$  : Volum awal

$V2$  : Volum akhir

Pengenceran 20%

$$N1.V1 = N2.V2$$

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

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

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

( 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 Diabetes Mellitus

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 itu tikus diberikan larutan glukosa 5 % selama 24 jam untuk menghindari kematian akibat hipoglikemia. Tujuh hari setelah injeksi STZ, glukosa darah diukur melalui vena ekor dengan menggunakan glukometer dan tikus dengan

glukosa darah di atas 250 mg/dL dinyatakan sebagai diabetes (Mekala *et al*, 2014; Nagmoti, 2015).

#### 4.7.4 Pembuatan Luka pada Tikus Model Diabetes Mellitus

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. Anestesi umum pada hewan coba dengan *Ketamine hydrochloride* 25 mg/kgBB secara intraperitoneal
3. Masukkan hewan coba pada kandang dan tunggu selama 5 menit hingga hewan coba hilang kesadaran
4. Lakukan pencukuran dengan menggunakan Mesh pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5x3 cm.
5. Tandai daerah yang akan dibuat luka dengan ukuran 1,5x1,5 cm
6. Kemudian desinfeksi menggunakan alkohol 70% dibagian yang akan dilukai
7. Cubit bagian kulit dengan pinset kemudian eksisi bagian kulit dengan kedalaman epidermis hingga hipodermis, 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

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 diabetes dirawat dengan normal saline.

Kelompok kontrol 3 luka tikus diabetes dirawat dengan pemberian obat oral metformin 63 mg/kgBB

Kelompok P1 luka tikus diabetes dirawat dengan ekstrak jamur tiram oral dengan dosis 200 mg/kgBB

Kelompok P2 luka tikus diabetes dirawat dengan ekstrak jamur tiram topikal dengan konsentrasi 20%

Kelompok P3 luka tikus diabetes 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 ulkus menggunakan normal saline.

- 2) Keringkan daerah luka yang telah di irigasi dengan kassa (kassa steril).
- 3) Tempelkan 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 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 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 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 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 jumlah fibroblas.

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 (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-xylool selama 1 jam dan kemudian larutan *xylool* murni selama 2 x 2 jam (Kerr, 2010).

##### c. Impregnasi

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

##### d. Embedding

Setelah impregnasi, jaringan akan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58<sup>0</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°C sampai parafin mencair (Kerr, 2010).

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

Pada tahap *staining*, *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 pewarnaan Eosin selama 15menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *xylo* 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, *xylo* 2x, lalu diberi balsam *Canada* dan ditutup dengan kaca penutup (Kerr, 2010).

#### f. Identifikasi jumlah fibroblas

Identifikasi fibroblas luka dilakukan setelah perawatan luka selesai. Fibroblas adalah sel yang berbentuk gelondong, memiliki satu inti atau lebih, bersifat basofilik, dan berwarna biru-ungu pada pewarnaan HE (*Hematoxylin-Eosin*) pada saat dilakukan pengamatan. Fibroblas diamati di lapisan kulit dermis. 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 kemudian dirata-rata. Jumlah sel dilihat pada monitor dan dihidung secara manual. Jumlah sel akan dinyatakan dalam satuan sel.

Cara membedakan antara fibroblas aktif dengan fibrosit adalah perbedaan morfologi. Fibroblas mempunyai sitoplasma bercabang yang tidak teratur dan banyak, nukleusnya berbentuk seperti bujur telur (*ovoid*), lebar dan berwarna pucat pada pewarnaan dengan nukleus krommatik. Sitoplasma kaya akan retikulum endoplasma kasar, dan kompleks golgi berkembang dengan baik didekat nukleus. Sedangkan fibroblas yang tidak aktif atau fibroblas, cenderung berbentuk gelondong (*spindle-shaped*), mempunyai prosesus yang lebih sedikit, lebih kecil, lebih gelap, nukleus memanjang, sitoplasma tipis dengan sedikit retikulum endoplasma berglanula (Mazzyala, 2008)

#### 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. 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.

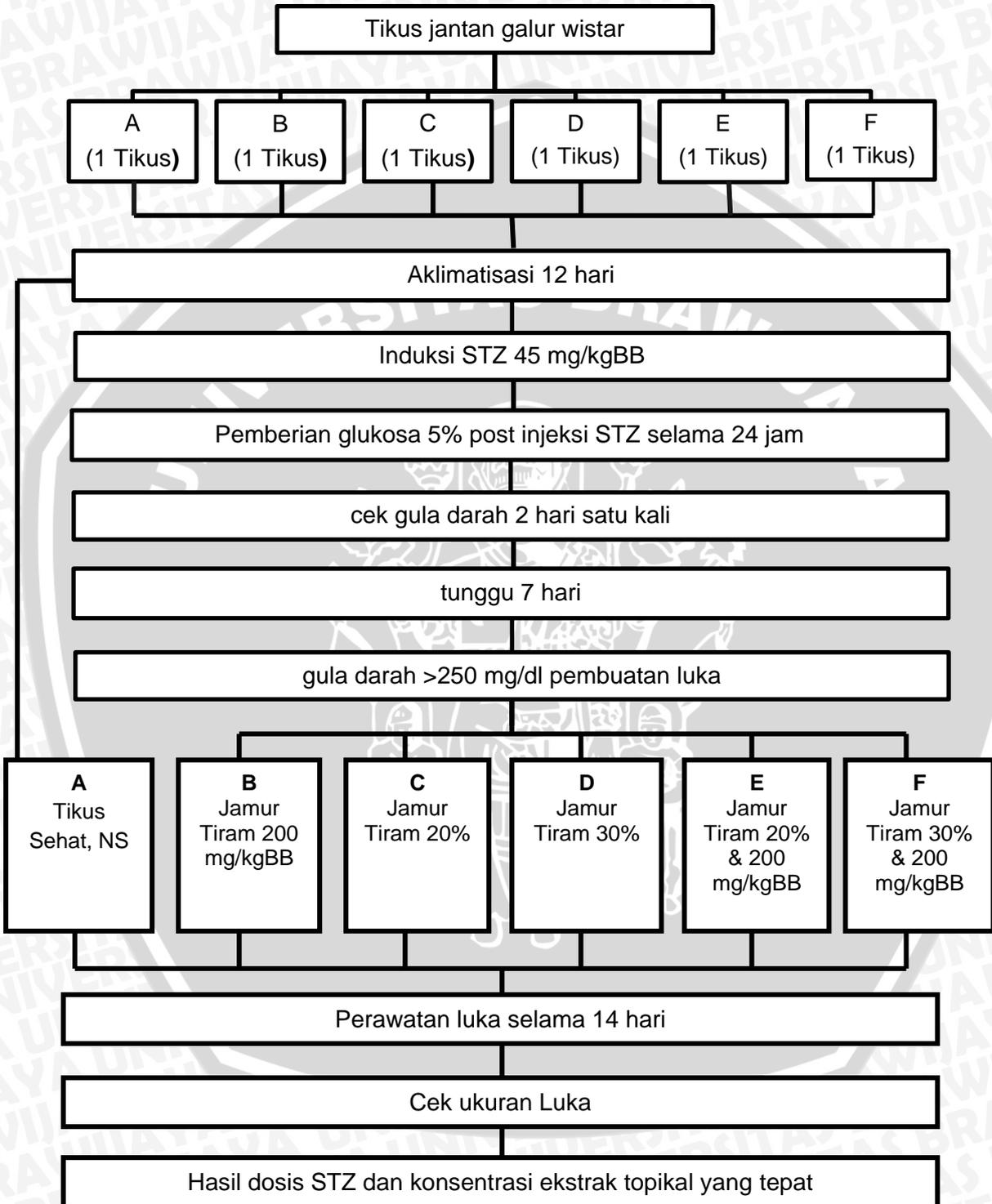
#### 4.9 Analisis Statistik

Analisa statistik 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 statistik 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 mengujikan 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 HSD) 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*)  $> 0,05$ .

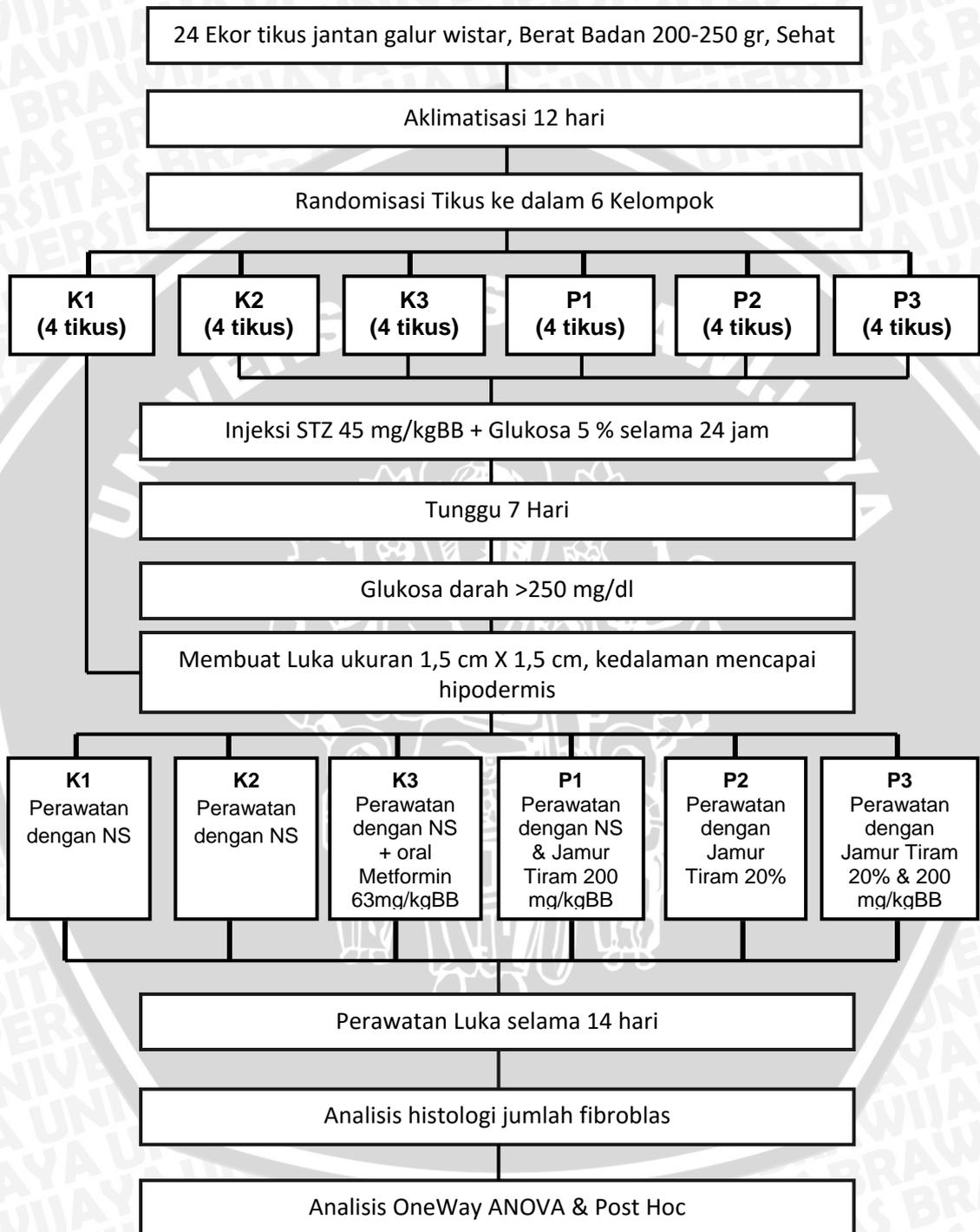


#### 4.10 Alur Kerja Studi Pendahuluan



Gambar 4.1 Alur Studi Pendahuluan

#### 4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian