

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) dengan pengamatan *posttest only-controlled design* untuk membandingkan jumlah pembuluh darah baru antara perawatan luka standar konvensional dengan perawatan menggunakan ekstrak jamur tiram (*Pleurotus oostratus*) pada tikus model hiperglikemia. Penelitian ini menggunakan enam kelompok yang terdiri dari tiga kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Dimana kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak dimanipulasi atau dimanipulasi dengan perlakuan standar, sedangkan kelompok perlakuan diberikan manipulasi. Setiap hewan coba memiliki probabilitas yang sama untuk mendapatkan perlakuan, sehingga dapat menjaga validitas generalisasi ke populasi. Pemilihan subyek penelitian dilakukan secara acak, tanpa pretest, dengan *random sampling* dan data diambil setelah penelitian usai (Nursalam, 2011).

Kelompok penelitian tersebut diberi nama dengan ketentuan sebagai berikut:

K1: Merupakan kelompok kontrol dimana tikus sehat dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain, perawatan dilakukan dengan standar konvensional, yaitu *normal saline*.

K2: Merupakan kelompok kontrol dimana tikus dengan kondisi hiperglikemia dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain,

perawatan dilakukan dengan standar konvensional yaitu *normal saline*.

K3: Merupakan kelompok kontrol dimana tikus dengan kondisi hiperglikemia dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain, perawatan dilakukan dengan standar konvensional yaitu *normal saline* dan peroral (sonde) dengan obat penurun hiperglikemia yaitu Metformin.

P1: Merupakan kelompok perlakuan dimana tikus dengan kondisi hiperglikemia dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain, perawatan dilakukan dengan standar konvensional yaitu *normal saline* dan peroral (sonde) dengan ekstrak jamur tiram 200 mg/Kg BB

P2: Merupakan kelompok perlakuan dimana tikus dengan kondisi hiperglikemia dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain, perawatan dilakukan dengan topikal ekstrak jamur tiram 200 mg/Kg BB.

P3: Merupakan kelompok perlakuan dimana tikus dengan kondisi hiperglikemia dilukai dengan pola yang sama seperti kelompok lain, perawatan dilakukan dengan topikal ekstrak jamur tiram 200 mg/Kg BB dan peroral (sonde) dengan ekstrak jamur tiram 200 mg/Kg BB.

## 4.2 Sample Penelitian

### 4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus (*Rattus novvegicus*) galur wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons biologis yang mendekati manusia.

Penelitian yang telah pernah dilakukan menggunakan *Rattus novogicus* adalah penelitian tentang hipertensi, diabetes insipidus, katarak, obesitas, diabetes melitus, 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 novogicus*) 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 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:

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

$$r-1 > 15/5$$

$$r \geq 3+ 1$$

$$r \geq 4$$

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 terikat), variabel kontrol, 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% (Jayakumar *et al.*,2006). Setiap dilakukan perawatan luka, sebelumnya 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 hiperglikemia dengan *normal saline*. Kontrol 3: perawatan luka pada hiperglikemia dengan pemberian obat standar hiperglikemia, metformin 63 mg/kgBB (Cahyani, 2014).

#### 4.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah dalam proses penyembuhan luka hiperglikemia pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratoium FAAL, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Farmakologi yang ada di 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 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 Pembuatan Luka pada Tikus Putih Galur Wistar

1. Gunting bedah
2. Mezt
3. Underpad
4. Sarung tangan

5. Pinset anatomis 2 buah
6. Kassa
7. Sputit
8. *Ketamine hydrochloride*
9. Bak steril
10. Alat cukur
11. Air sabun
12. Alkohohol 70%
13. Bengkok
14. Pola luka 1,5 cm x 1,5 cm

#### 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. Sputit
4. Gelas ukur
5. Pengaduk
6. Aquades
7. Ekstrak jamur tiram
8. Metformin tablet

#### 4.5.5 Perawatan Luka pada Tikus Putih Galur Wistar

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	Ekstrak jamur tiram ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) yang digunakan adalah ekstrak jamur tiram kasar yang dilarutkan dengan etanol 96%. Jamur ini diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Prosedur pembuatan ekstrak sesuai dengan metode yang ada di Laboratorium Farmakologi FKUB. Ekstrak jamur tiram diberikan secara oral dengan dosis 200 mg/KgBB dan untuk topikal dengan konsentrasi 20% (Jayakumar <i>et al.</i> , 2006).	-	-
2	Jumlah pembuluh darah	Pembuluh darah yang dihitung adalah pembuluh darah baru yang pada pewarnaan HE diinterpretasikan dengan bentuk lumen berwarna ungu dengan ataupun tanpa eritrosit berwarna merah pada lapisan sel-sel endotel. Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke-14 yang kemudian dilakukan pembuatan slide histologi dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin. Pengamatan dilakukan dengan pembesaran 400x pada 5 lapang pandang menggunakan software Olyvia.	Jumlah pembuluh darah baru	Nominal
3	Perawatan luka	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). Luka dibersihkan dengan <i>Normal saline</i> kemudian ekstrak jamur tiram di berikan secara topikal, oral, dan topikal-oral. Lalu luka ditutup dengan kassa steril, kemudian hipafix. 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

- 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 ± 1 liter.
- d. Merendam dengan etanol 96% sampai volume menjadi 1 liter.
- e. Mengocok sampai benar-benar tercampur (± 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° 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 Membuat Konsentrasi Ekstrak Jamur Tiram

Berdasarkan Laboratium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (2015), ekstrak jamur tiram yang ada kemudian diencerkan dengan menggunakan rumus :

$$V1XN1=V2XN2$$

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 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 melalui vena ekor dengan menggunakan glukometer dan tikus dengan glukosa darah diatas 250mg/dL dinyatakan sebagai hiperglikemia (Lodhi, 2010; Nagmoti, 2015).

#### 4.7.4 Pembuatan Luka pada Tikus Putih Galur Wistar

1. Lakukan cek kadar gula darah sebelum dilakukan pembuatan luka. Dilakukan pembuatan luka jika kadar gula darah puasa pada kelompok K2, K3, P1, P2, dan P3 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 alat cukur pada bagian punggung hewan coba dengan ukuran 5x3 cm
5. Tandai daerah yang akan dibuat luka dengan ukuran 1,5x1,5 cm dengan kedalaman epidermis hingga hypodermis (Li et al, 2011)
6. Kemudian desinfeksi menggunakan alkohol 70% dibagian yang akan dilukai

7. Cubit bagian kulit dengan pinset kemudian eksisi bagian kulit menggunakan *mezt* pada daerah yang sudah ditandai
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 pada Tikus Putih Galur Wistar

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:**

- 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 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 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 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 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 salin 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 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 salin 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 pembuluh darah baru.

Proses eksisi jaringan dimulai dengan mengorbankan hewan coba dengan cara 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* 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<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.

#### 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*.

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.

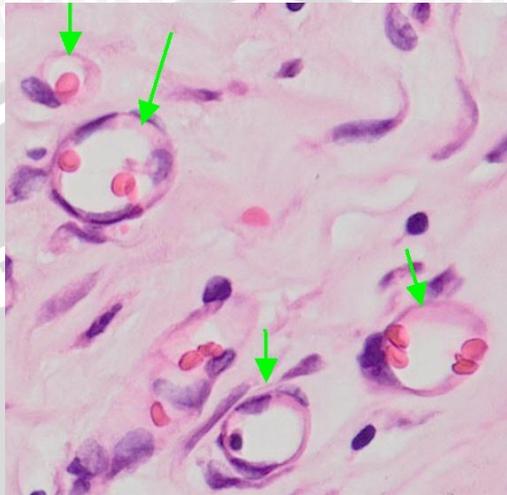
#### 4.8.3 Pengukuran Jumlah Pembuluh Darah

Setelah 14 hari, 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*.

Pada pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, pembuluh darah baru diinterpretasikan dengan bentuk lumen bewarna ungu dengan ataupun tanpa eritrosit berwarna merah pada sel-sel endothel (Galeano et al., 2004). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri XC10, kamera digital Canon Ixus 105 yang dilengkapi *software* Olyvia (*Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang (Liao et al., 2009).

Rata-rata jumlah pembuluh darah ditentukan dengan membagi jumlah total pembuluh darah yang teridentifikasi dengan jumlah lapang pandang (Pamungkas, 2015). Setelah diamati, jaringan dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan itu sendiri. Prosedur pembuatan hingga pemindaian preparat

dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Gambaran histologi pembuluh darah dapat dilihat pada gambar 4.1



**Gambar 4.1 Penampakan Pembuluh Darah pada Kelompok K1**

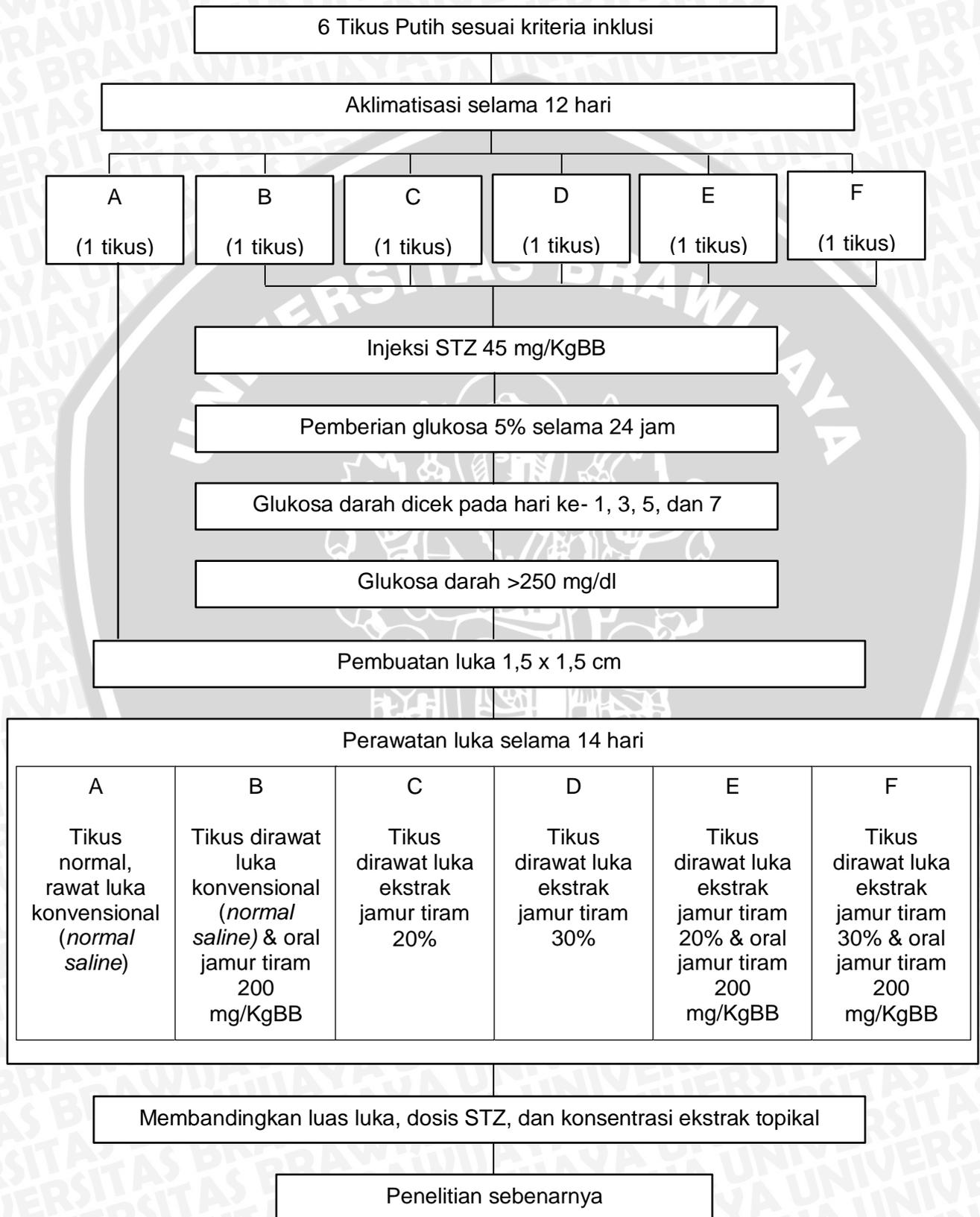
#### 4.9 Analisa Data

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 22 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*)  $> 0,05$ . Apabila  $p$  (*value*)  $< 0,05$ , maka data tidak

berdistribusi normal (Dahlan, 2009). Setelah didapatkan distribusi normal, kemudian dilakukan pengujian homogenitas dengan uji *homogeneity of variance*. Data homogen atau memiliki varian yang normal apabila  $p$  (*value*)  $> 0,05$  (Dahlan, 2009). Kemudian dilanjutkan dengan pengujian one way ANOVA. Apabila nilai  $p$  (*value*)  $< 0,05$  berarti nilai uji ANOVA signifikan dan terdapat perbedaan antar kelompok sehingga dapat dilanjutkan dengan uji Post Hoc Test (Tukey HSD).



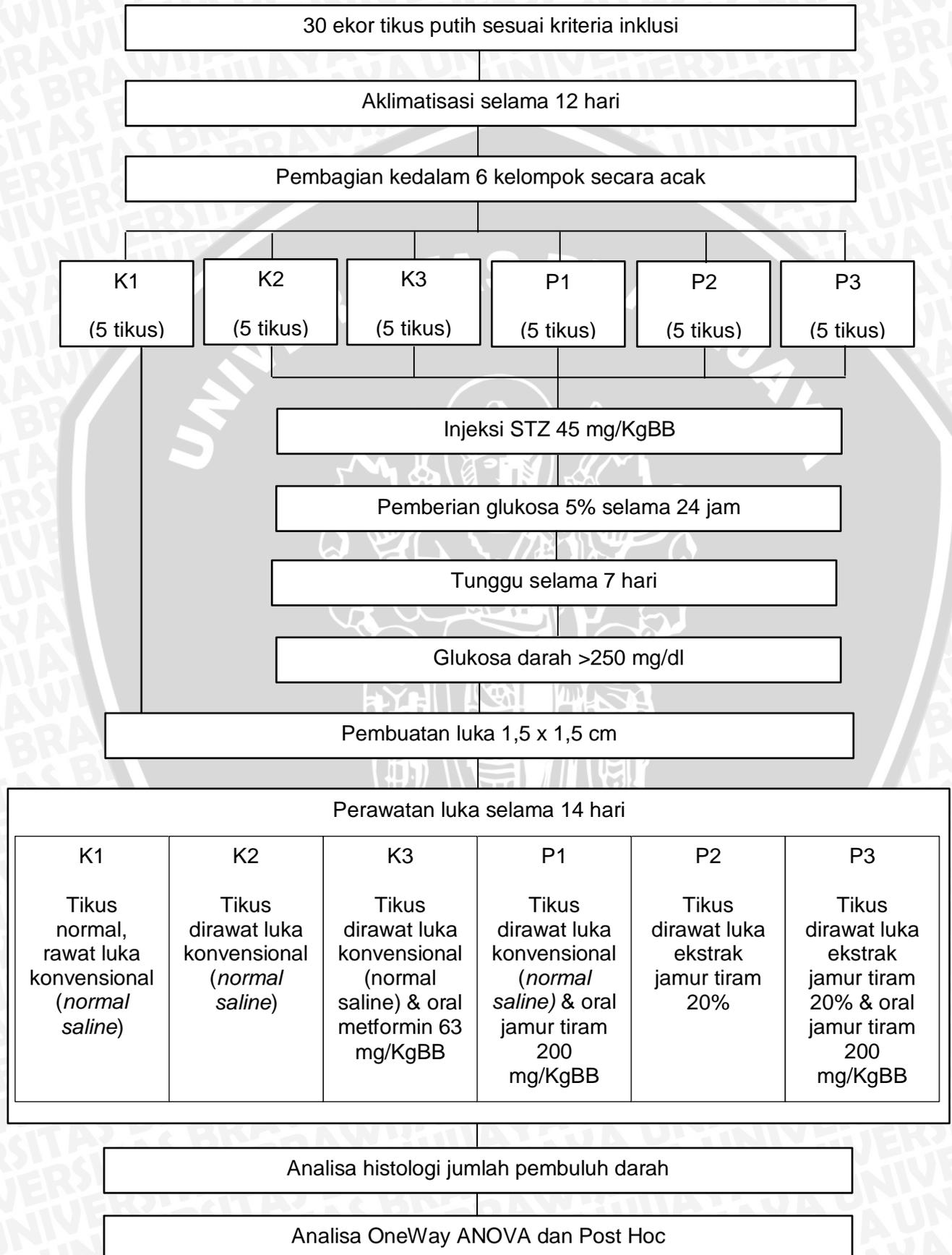
#### 4.10 Alur Kerja Studi Pendahuluan



Gambar 4.2 Alur Studi Pendahuluan



### 4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian