

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kulit merupakan organ terbesar pada tubuh hewan dan manusia yang berfungsi menutupi bagian luar dari tubuh. Sebagai pelindung (*barrier*) dari paparan pertama dari luar, kulit mudah mengalami luka (*vulnus*) baik secara mekanik maupun kimiawi. Luka dapat mengakibatkan berbagai kerugian pada hewan yaitu hewan bisa sakit, nafsu makan menurun, kondisi tubuh menurun sehingga memungkinkan terjadinya infeksi sekunder (Azaria *et al.*, 2017). Respon tubuh setelah terjadi luka diatur sedemikian rupa dalam proses yang disebut penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka terdiri atas beberapa tahapan yang cukup kompleks. Pada awal terjadinya luka, akan dimulai dengan fase hemostasis, dilanjutkan dengan fase inflamasi, kemudian proliferasi, dan terakhir fase remodeling. Fase-fase ini dipengaruhi oleh berbagai interaksi seluler, serta diatur oleh pelepasan sinyal-sinyal kimia lokal seperti sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, dan faktor penghambat (Febry *et al.*, 2017).

Dalam proses penyembuhan luka, faktor imunitas dan kondisi hewan adalah pengatur dan pemain kunci dalam penyembuhan luka. Dalam hal ini berbagai kondisi dapat menjadi tantangan dan hambatan dalam penyembuhan luka (Raziyeva *et al.*, 2021). Kondisi immunosupresi menunda penyembuhan luka dengan mengurangi produksi kolagen dan mengganggu aktivasi sel T, terutama sel T CD8+, yang sangat penting untuk proses penyembuhan. Salah satunya adalah kondisi immunosupresif yang disebabkan oleh penggunaan obat kortikosteroid seperti deksametason (Koochpayma *et al.*, 2015). Dekametason dapat menimbulkan pengurangan jumlah imunitas yang berakibat terhadap pelemahan aktivitas sel imun. Dalam hal ini terkait dengan efek penghambatan sel limfoid dan myeloid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wu *et al.* (2024), deksametason dalam dosis tinggi pada tikus memberikan efek immunosupresif dengan secara signifikan mengurangi jumlah dan aktivitas sel imun, termasuk sekitar 90% pengurangan makrofag, sel dendritik, dan monosit, dan sekitar 70% dalam sel B, terutama melalui pengikatan afinitas tinggi ke reseptor glukokortikoid. Hal ini menyebabkan efek immunosupresif yang luas, mempengaruhi ekspresi gen dan fungsi dalam sel imun.

Proses perawatan dan pengobatan luka adalah hal yang penting dalam mempercepat penyembuhan luka. Saat ini, berbagai penelitian telah dilakukan dengan menggunakan herbal sebagai pengobatan alternatif dalam mempercepat penyembuhan luka. Salah satu diantaranya ialah menggunakan madu alami yang kaya akan beberapa senyawa fenolik, enzim, dan gula dengan potensi antioksidan, antikarsinogenik, antiinflamasi, dan antimikroba. Beberapa studi kasus dan uji coba terkontrol acak memberikan bukti yang cukup mengenai efektivitas madu dalam menyembuhkan berbagai jenis luka. Waktu penyembuhan luka dengan menggunakan madu atau turunan madu bervariasi dari beberapa hari hingga beberapa bulan tergantung pada jenis, kedalaman, lokasi anatomi, dan kronisitas luka (Scepankova *et al.*, 2021).

Untuk memastikan keaslian penelitian berdasarkan pengetahuan peneliti sebagai penulis penelitian dengan judul “Gambaran Histopatologi Kesembuhan Luka Eksisi Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Deksametason Dengan Pemberian Gel Madu Topikal” belum pernah dilakukan sebelumnya. Adapun penelitian serupa yang dilakukan oleh Gill, *et al.* (2019) dengan judul *Comparative Evaluation of Wound Healing Potential of Manuka and Acacia Honey in Diabetic and Nondiabetic Rats*. Penelitian ini terkait efektifitas penggunaan madu topikal dalam penyembuhan luka tikus yang memiliki kondisi kesehatan yang berbeda. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk memahami bagaimana efek induksi deksametason dan pemberian gel madu topikal terhadap gambaran mikroskopis kulit setelah perlakuan.

1.2 Teori

1.2.1 Tikus Wistar

Menurut Rejeki *et al.* (2018), klasifikasi taksonomi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordate
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Murinane
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 1. Tampilan morfologi tikus wistar *Rattus norvegicus* (Rosidah *et al.*, 2020)

Tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar merupakan tikus albino yang biasanya digunakan dalam penelitian. Strain ini berasal dari perkawinan tikus wistar dengan tikus jantan liar Norwegia yang ditangkap di Berkeley, California. Melalui seleksi keturunan dan perkawinan silang, tikus Wistar berkembang menjadi strain yang genetiknya stabil sehingga dapat digunakan sebagai animal model penelitian (Wati *et al.*, 2024).

Tikus jenis ini berukuran lebih besar daripada mencit serta memiliki sifat lebih tenang, tidak terlalu takut terhadap cahaya serta tidak begitu cenderung berkumpul sesama jenis. Tingkah laku tikus umumnya menggali, mengunyah, menyelidiki tanda

aroma sesuatu, memanjat, bersarang serta mencari makan (Rejeki *et al.*, 2018). Morfologi tikus ini yaitu memiliki kepala yang lebar, telinga yang panjang, ekor yang panjangnya proporsional dengan tubuhnya (panjangnya kurang dari panjang tubuh). Fenotip albino pada tikus wistar termanifestasi dalam warna bulu yang pucat, dengan mata yang menonjol berwarna merah muda atau merah. Selain itu, tikus ini memiliki usia reproduksi pada 7-10 minggu dengan berat badan 100-227 gram dan lama kebuntingan 19-22 hari (Schröder *et al.*, 2020).

1.2.2 Madu

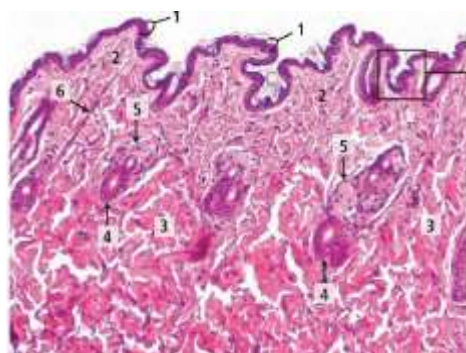
Madu adalah cairan manis yang dihasilkan lebah madu dari nektar tanaman. Madu merupakan makanan yang memiliki banyak manfaat seperti berguna bagi pemeliharaan kesehatan, kosmetika dan farmasi. Serta memiliki efek meningkatkan daya tahan tubuh, menyembuhkan darah tinggi dan darah rendah, mengobati rematik, memperlancar fungsi otak serta menyembuhkan luka (Rompas *et al.*, 2023). Madu memiliki komposisi yang terdiri dari air, levulosa (Fruktosa), dekstrosa (Glukosa), sukrosa, mineral, dekstrin serta mengandung mineral dan vitamin. Mineral yang terkandung di dalam madu antara lain: natrium, kalsium, magnesium, cuprum, aluminium, ferum, Kalium dan fosfor. Sedangkan Vitamin yang terkandung dalam madu antara lain: Vitamin B1, B2, B3, BP, Be, H, K, C, dan asam pantotenat (Rompas *et al.*, 2023).

Selain itu, madu memiliki senyawa seperti hidrogen peroksida, senyawa fenolik, metilglioksal, atau peptida defensin-1 yang berkaitan dengan peran madu sebagai antiinflamasi, antioksidan, antibakteri dan mediator sistem imun (Scepankova *et al.*, 2021). Madu memiliki tekanan osmotik tinggi yang berperan sebagai medium hiperosmolar sehingga dapat menyebabkan terjadinya aktivitas pembersihan luka dan mencegah pertumbuhan bakteri (Sherlock *et al.*, 2010). Penyembuhan luka dengan pemberian madu topikal juga dapat menginisiasi proses perbaikan luka dengan merangsang pembentukan jaringan granulasi (Kalangi, 2012)

1.2.3 Induksi Deksametason

Deksametason adalah glukokortikoid sintetis yang umumnya digunakan dalam praktik medis manusia maupun hewan sebagai agen anti inflamasi, immunosupresan, dan analgesik. Obat ini memiliki efek mendalam pada hampir semua jenis sel dan sistem organ karena memiliki efek pada beberapa jalur biokimia penting dan mekanisme transportasi seluler termasuk transportasi natrium seluler, sintesis glikogen, dan respons anti-inflamasi (Yahi *et al.*, 2017). Deksametason akan mempengaruhi metabolisme karbohidrat, protein, lemak yang dapat kinerja sistem kardiovaskular otot polos, sistem saraf dan organ lainnya (Syukriah, 2017). Deksametason sebagai obat yang bersifat immunosupresan bekerja dengan cara menurunkan dan menghambat limfosit dan makrofag perifer, sehingga efek dari kerja deksametason tersebut dapat menyebabkan kematian sel pada folikel limfoid (Ulfa *et al.*, 2020)

1.2.4 Kulit



Gambar 2. Histologi kulit tikus *Rattus norvegicus*: (1) Epidermis, (2) *Stratum papillare*, (3) *Stratum reticulare*, (4) *Hair follicle*, (5) *Sebaceous gland*, (6) *M. arrector pili* (Maynard dan Downes, 2019)

Kulit adalah bagian dari sistem integument yang merupakan penghalang luar dan zona kontak dengan lingkungan. Sebagai organ tubuh terbesar, kulit memiliki sejumlah fungsi utama yaitu perlindungan dan pemeliharaan integritas tubuh. Integumen umumnya berperan sebagai penghalang terhadap cedera mekanis, termal, kimiawi, radiologis, atau biologis dari luar. Integumen ini juga secara aktif terlibat dalam termoregulasi tubuh dan penerimaan rangsangan sensorik (tekanan, sentuhan, getaran, rasa sakit, panas, dan dingin), berpartisipasi dalam respons kekebalan tubuh dan merupakan tempat penampungan zat-zat yang berbeda (air, elektrolit, vitamin, dan lipid), memproduksi beberapa di antaranya secara langsung (vitamin D) atau mensekresikannya melalui kelenjar sebacea dan keringat (Ruberte *et al.*, 2017).

Histologi kulit tikus terdiri dari dermis, epidermis, dan subkutis (hipodermis). Epidermis adalah epitel skuamosa berlapis yang terkornifikasi yang umumnya hanya setebal satu atau dua sel, jauh lebih tipis daripada manusia. Dermis adalah lapisan jaringan ikat tebal yang menyokong epidermis dan disuplai dengan baik dengan pembuluh darah, pembuluh limfatik, dan serabut saraf. Dermis juga menjadi tempat folikel rambut, kelenjar sebacea dan kelenjar keringat. Epidermis dan dermis bertemu pada antar batasan yang agak datar. Antar batasan ini lebih rumit pada manusia, dengan tonjolan kulit dan papila yang menjorok ke atas, dan proyeksi epidermis ke bawah. (Maynard dan Downes, 2019)

1.2.5 Fase Penyembuhan Luka

Luka adalah cedera fisik yang mengganggu kelangsungan normal struktur anatomi. Proses penyembuhan luka terdiri dari pemulihan kontinuitas jaringan yang mengalami gangguan. Penyembuhan luka terkait dengan fungsi fisiologis normal yang mengembalikan kesinambungan jaringan setelah cedera. Ini adalah proses kompleks yang ditandai dengan peristiwa makroskopis, mikroskopis, dan biokimia. Secara mikroskopis, penyembuhan luka dijelaskan dalam beberapa fase yaitu hemostasis, peradangan, proliferasi dan pematangan (Williams dan Moores, 2017).

Fase hemostasis (Koagulasi) terjadi setelah cedera pada kulit, hemostasis dicapai melalui vasokonstriksi dan aktivasi kaskade pembekuan intrinsik yang dimediasi trombosit, yang berakhir dengan pembentukan bekuan fibrin. Pelepasan sitokin proinflamasi dari jaringan yang rusak dan bekuan darah yang baru terbentuk

bertindak sebagai sinyal kemotaktik yang kuat untuk merekrut neutrofil, sel endotel, dan fibroblas ke dalam luka. Oleh karena itu, pembentukan bekuan fibrin merupakan langkah penting dalam mendorong timbulnya fase inflamasi dan perbaikan (Mickelson *et al.*, 2016).

Fase inflamasi ditandai dengan peningkatan permeabilitas kapiler dan infiltrasi neutrofil, makrofag, dan limfosit ke dalam luka. Kebanyakan skema klasifikasi luka modern mencakup fase debridement dalam fase inflamasi karena tumpang tindih waktu dan fungsi leukosit dalam luka. Setelah vasokonstriksi awal selama hemostasis, terjadi vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Peningkatan aliran darah dan ekstrasvasasi cairan dikombinasikan dengan penyumbatan drainase limfatik menyebabkan tanda-tanda klasik peradangan, termasuk panas, kemerahan, dan bengkak. Respon inflamasi akut ini biasanya berlangsung selama 1-2 hari namun dapat bertahan pada kondisi luka yang buruk (Mickelson *et al.*, 2016).

Fase proliferasi atau perbaikan dimulai sekitar 3-4 hari setelah cedera dan ditandai dengan fibroplasia, angiogenesis, dan epitelisasi. Di bawah pengaruh faktor pertumbuhan (terutama PDGF), fibroblast dermal berproliferasi, bermigrasi, dan berdiferensiasi menjadi miofibroblas kontraktile. Fibroblas sangat penting untuk produksi matriks ekstraseluler (ECM), yang terdiri dari kolagen, glikosaminoglikan, proteoglikan, fibronectin, dan elastin. TGF- β adalah salah satu mediator terpenting pembentukan matriks kolagen. Ini merangsang fibroblas untuk memproduksi fibronectin, yang sangat penting untuk memfasilitasi pengikatan sel dan pergerakan fibroblast (Mickelson *et al.*, 2016).

Fase remodelling atau pematangan biasanya dimulai satu minggu setelah cedera setelah deposisi kolagen pada luka dan merupakan fase penyembuhan luka yang paling lama, berlanjut selama berminggu-minggu hingga berbulan-bulan setelah cedera. Aktivitas utama yang terjadi pada fase ini adalah penguatan dan remodeling kolagen yang baru terbentuk. Terjadi penurunan proliferasi dan inflamasi serta regresi kapiler yang baru terbentuk pada dasar luka. Kolagen tipe III digantikan oleh kolagen tipe I. Serat kolagen diubah bentuknya dengan menyelaraskan dengan garis ketegangan tubuh dan memperoleh kekuatan melalui ikatan silang. Bekas luka akhirnya menjadi kurang seluler, rata, dan melunak. Kekuatan jaringan normal tidak pernah pulih kembali, dengan sekitar 80% kekuatan asli diperoleh paling baik (Mickelson *et al.*, 2016).

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan penelitian

Untuk mengetahui gambaran histopatologi kesembuhan luka eksisi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dexamethasone dengan pemberian gel madu topikal

1.4.2 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi terkait gambaran histopatologi kesembuhan luka eksisi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi deksametason dengan pemberian gel madu topikal sehingga dapat menjadi rujukan untuk penelitian berikutnya.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 hingga Februari 2025. Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa *Rattus norvegicus* galur wistar berkelamin jantan. Aklimatisasi dan perlakuan dilakukan di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Serta pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah *blade*, botol minum tikus, *cassette*, *cover glass*, gelas ukur, gunting, *handscoon*, *incubator*, kandang ukuran 45 cm x 35 cm, kompor *portable*, label nama, mikroskop olympus CX22 beserta optilab 22, mikrotom, nampan, *object glass*, pemanas, pinset, *sput* 1 ml, *sput* 3 ml, tabung reaksi, tempat spesimen, dan timbangan elektrik (Ohaus). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 200-300 gram, air, alkohol bertingkat (75%, 80%, 90%), anestesi eter, alkohol absolut I, alkohol absolut II, asam sulfat, *betadine*, gelatin, *Hematoksin-Eosin* (HE), madu hutan, pakan konsentrat, *paraffin*, *tissue embedding* dan *xylol*.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat gambaran histopatologi kesembuhan luka eksisi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi deksametason dengan pemberian gel madu topikal. Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif yang berfokus untuk mengamati gambaran mikroskopis dan memberikan skoring beberapa parameter yaitu inflamasi, vaskularisasi, keropeng dan epitelisasi pada setiap kelompok perlakuan yang terbagi atas 8 kelompok. Serta pengamatan histopatologi kepadatan kolagen tiap perlakuan secara deskriptif. Analisis data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel dan data hasil skoring histopatologi akan disajikan secara deskriptif disertai bentuk tabel dan gambar.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Pemeliharaan hewan coba

Kandang tikus terlebih dahulu disterilkan dengan cara dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian diberi sekam padi sebagai alas kandang. Setelah kandang steril, tikus langsung ditempatkan dan diberi pakan *pellet* standar serta minum secara *ad libitum*. Kandang juga diberi anyaman kawat sebagai penutup dan kemudian tikus diaklimatisasi selama 14 hari.

2.4.2 Pembuatan gel madu

Pembuatan gel madu yang digunakan dalam penelitian ini dikutip dari Lestari *et al.* (2021), dimana pembuatan sediaan gel dilakukan dengan menyiapkan semua

bahan. Basis Na-CMC dimasukkan ke dalam wadah, dikembangkan menggunakan aquades dengan cara dipanaskan dalam suhu 70°C dan dilakukan pengadukan diatas *magnetic stirrer* dengan kecepatan pengadukan 400 rpm secara konstan hingga terbentuknya massa gel yang homogen. Tambahkan metil paraben yang telah dilarutkan dengan aquades yang telah dipanaskan, selanjutnya ditambahkan gliserin dan propilen glikol dengan dimasukkan kedalam wadah dan diaduk hingga homogen. Madu ditambahkan sesuai formulasi serta aquades secara perlahan, sambil terus diaduk hingga homogen dan terbentuknya massa gel yang sesuai.

Tabel 1. Formulasi Gel Madu

Bahan	Formulasi	
	F1	F2
Madu	10%	20%
Na-CMC	3 g	3 g
Gliserin	5 g	5 g
Propilen Glikol	10 g	10 g
Metil Paraben	0,2 g	0,2 g
Aquades	Ad 100 g	Ad 100 g

Lestari *et al.* (2021). PHARMASIPHA 5(2): 32-40
<https://doi.org/10.21111/pharmasipha.v5i2.6521>

2.4.3 Evaluasi stabilitas fisik sediaan gel

Menurut Lestari *et al.* (2021), evaluasi stabilitas gel dilakukan dengan untuk mengetahui perubahan fisik dari sediaan pada awal, tengah dan akhir pengujian yang meliputi organoleptis, homogenitas, dan pH.

- Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, bau dan warna gel. Gel dikatakan stabil jika tidak mengalami perubahan secara signifikan setelah dilakukan penyimpanan.

- Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan mengamati campuran bahan dalam sediaan gel pada kaca objek yang menunjukkan terdapatnya butiran kasar atau tidak.

- Uji pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan alat pH meter dengan mencelupkannya elektroda pH meter ke dalam sediaan. Sediaan gel dinyatakan memenuhi standar jika memiliki nilai pH pada interval 4,5-6,5 yang merupakan nilai pH kulit.

2.4.4 Perlakuan sampel

Rumus yang digunakan untuk menentukan besar sampel yaitu menggunakan rumus *federer*. Digunakannya rumus ini untuk mencari tahu berapa jumlah sampel yang dapat diberikan dalam satu kelompok dan berapa banyak jumlah pengelompokan yang dapat dilakukan.

Rumus Federer

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

n = jumlah sampel per kelompok

t = jumlah pengelompokan

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

$$8(n - 1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 15 + 8$$

$$n \geq \frac{23}{8}$$

$$n \geq 2,8$$

$$n \geq 3$$

Besar sampel pada penelitian ini yaitu 24 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 8 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan terdapat 3 ekor tikus wistar.

- K- merupakan kelompok tikus wistar dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang tidak diberikan obat topikal.
- K-2 merupakan kelompok tikus wistar induksi deksametason dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang tidak diberikan obat topikal.
- K+ merupakan kelompok tikus wistar dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan *povidone iodine*.
- K+2 merupakan kelompok tikus wistar induksi deksametason dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan *povidone iodine*.
- KP1 merupakan kelompok tikus wistar induksi deksametason dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 10%.
- KP2 merupakan kelompok tikus wistar deksametason dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 20%.
- KP3 merupakan kelompok tikus wistar dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 10%.
- KP4 merupakan kelompok tikus wistar dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 20%.

Mekanisme perlakuan yaitu melakukan induksi deksametason secara intraperitoneal selama 6 hari. Kemudian, dilakukan pembuatan luka dengan metode yang sudah disebutkan sebelumnya pada masing-masing kelompok tikus. Pemberian gel madu dilakukan sebanyak 2 kali sehari pada siang dan sore hari selama 14 hari secara topikal. Tikus diberikan pemberian standar sebanyak 2 kali sehari (pagi dan sore) dengan pemberian minum secara *ad libitum*.

2.4.5 Penginduksian deksametason

Perlakuan induksi deksametason diberikan dengan dosis tinggi 10 mg/kg berat badan melalui rute intraperitoneal (rongga perut) selama 6 hari. Menurut IM *et al.* (2021) pemberian deksametason dengan dosis tinggi (8 mg/kg atau 16 mg/kg BB) bersifat immunosupresan hingga dapat menimbulkan efek katabolisme otot, peningkatan adipositas, dan peningkatan resistensi insulin.

2.4.6 Pembuatan luka

Pembuatan model luka dilakukan dengan model *excision* menggunakan *punch biopsy* dengan ukuran diameter 4.0mm yang terletak di area *dorsal* hewan uji.

2.4.7 Pembuatan preparat histopatologi

Tahapan pembuatan preparat histopatologi meliputi fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *cutting*, *staining*, *mounting*, dan *skoring*.

1. Preparat histopatologi kulit dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang digunakan adalah larutan 10% *neutral buffered formalin*. Tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi adalah melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm. Pisau yang digunakan untuk *trimming* adalah pisau *scalpel* No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ.
2. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau isopropil alkohol. Etanol yang digunakan yaitu konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan cara dimasukkan dalam larutan parafin cair. Parafin yang digunakan mempunyai titik cair 56-58°C.
3. *Embedding* dilakukan setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan parafin cair dan dilekatkan pada *embedding cassette* yang disebut blok.
4. *Cutting* dilakukan pada jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 5 µm dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada *object glass* kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar.
5. *Staining*, dilakukan setelah preparat mikroskop anatomi kering. Pewarnaan dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.
6. *Mounting*, dilakukan dengan meneteskan entelan secukupnya pada *object glass* yang telah berisi preparat dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis usus halus antar kelompok perlakuan.
7. *Skoring* Histopatologi, preparat histologi diperiksa di bawah mikroskop dengan memperhatikan beberapa parameter yaitu inflamasi, vaskularisasi, keropeng dan epitelisasi pada preparat organ kulit. Parameter skoring histopatologi pada kesembuhan luka eksisi dilakukan dengan membandingkan kriteria skoring pada kelompok kontrol dan kelompok yang mendapatkan perlakuan. Adapun jenis *skoring* yang digunakan (tabel 2) sebagai berikut:

Tabel 2. Skoring Penilaian untuk histopatologi penyembuhan luka

Skor/ Parameter	0	1	2	3
Inflamasi	Tidak ada inflamasi	<i>Discrete</i>	<i>Moderate</i>	<i>Severe</i>
Vaskularisasi	normal vaskularisasi	<i>Discrete</i>	<i>Moderate</i>	<i>Severe</i>
Keropeng	Tidak ada	<i>Discrete</i>	<i>Moderate</i>	<i>Severe</i>
Epitelisasi	Seluruh epitel utuh	Epitelisasi parsial yang menempati paling banyak $\frac{1}{3}$ celah luka	Epitelisasi parsial yang menempati lebih dari $\frac{1}{3}$ celah luka	Epitelisasi lengkap diseluruh permukaan luka

Estevão *et al.* (2019). Bio-protocol 9(13). DOI:10.21769/BioProtoc.3285

2.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini yaitu secara deskriptif kualitatif yaitu dengan memberikan skor untuk lima lapang pandang. Pengamatan histopatologi kulit dengan mengamati inflamasi, vaskularisasi, keropeng dan epitelisasi yang kemudian diberikan skoring dari skor 0 (tidak ada perubahan) hingga 3. Hasil skoring yang diperoleh dianalisis statistik dengan menggunakan analisis non-parametrik Kruskal-Wallis, kemudian di lakukan uji lanjut *dunn-bonferroni* dengan menggunakan fasilitas SPSS.