

## BAB I PENDAHULUAN

### 3.1. Latar Belakang

Penyembuhan luka adalah proses biologis yang sangat penting untuk mengembalikan integritas kulit setelah cedera. Saat ini, perawatan luka menjadi masalah kesehatan yang serius karena tantangan yang ditimbulkan oleh luka kronis pada kondisi penyakit lain yang menyertainya (Miranda et al., 2024). Penyembuhan luka sangat kompleks dan melibatkan kerja sama berbagai jenis sel. Proses ini dapat dibagi menjadi empat fase yang saling berhubungan, yaitu koagulasi, peradangan, proliferasi, dan remodelling. Cedera pada kulit mengakibatkan, antara lain, gangguan integritas sel endotel dan epitel (Kyczka dan Boncela, 2015). Proses penyembuhan luka merupakan proses biologis yang kompleks dan melibatkan berbagai jenis sel, termasuk leukosit, yang berperan penting dalam respon imun tubuh. Leukosit, atau sel darah putih, berfungsi sebagai komponen utama dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi dan peradangan. Profil leukogram, yang mencakup jumlah dan jenis leukosit, dapat memberikan informasi penting mengenai status kesehatan dan respon imun hewan terhadap berbagai perlakuan (Purnomo et al., 2015). Meskipun penyembuhan luka adalah fenomena umum yang telah banyak diteliti, terdapat banyak faktor yang mempengaruhi proses ini, termasuk penggunaan obat-obatan dan terapi tambahan.

*Dexamethasone*, sebagai glukokortikoid sintetis yang memiliki aktivitas anti-inflamasi dan anti-alergi sering digunakan dalam pengobatan untuk mengurangi peradangan dan mengendalikan respon imun. Kortikosteroid sintetis, termasuk *dexamethasone*, digunakan terutama untuk efek anti-inflamasinya. Dalam dosis tinggi, kortikosteroid ini dapat mengurangi respon imun (Nkono et al., 2023). Penggunaan *dexamethasone* dapat mengganggu proses penyembuhan luka dengan menekan aktivitas leukosit, yang berpotensi memperlambat proses regenerasi jaringan (Majrashi et al., 2023). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan *dexamethasone* dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit, yang berdampak negatif pada penyembuhan luka (Chen et al., 2023). Dengan adanya pengaruh *dexamethasone* terhadap respon imun, penting untuk mengeksplorasi metode alternatif yang dapat mendukung penyembuhan luka, seperti penggunaan gel madu topikal yang dikenal memiliki sifat antibakteri dan penyembuhan.

Salah satu cara pengobatan penyembuhan luka adalah dengan terapi antibiotik topikal karena terbentuknya luka terbuka dapat menginisiasi pertumbuhan bakteri. Madu telah dikenal memiliki sifat penyembuhan yang baik, termasuk efek anti-inflamasi dan antibakteri. Pemberian gel madu topikal pada luka dapat meningkatkan proses penyembuhan dengan merangsang aktivitas leukosit dan mempercepat regenerasi jaringan. Madu dapat berperan sebagai agen antimikroba karena kandungan gulanya yang tinggi dengan pH yang relatif asam dan kandungan protein yang rendah. Oleh karena itu, madu membatasi jumlah air yang tersedia untuk pertumbuhan mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Beberapa

penelitian melaporkan bahwa madu dapat digunakan untuk menyembuhkan luka (Scepankova et al., 2021). Madu bersifat antibakteri, antioksidan dan memiliki kandungan nutrisi yang tinggi sehingga baik untuk proses penyembuhan luka dengan mengubahnya menjadi gel. Gel didefinisikan sebagai sistem semi padat yang terdiri dari dispersi baik yang terdiri dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar, ditembus oleh cairan, dapat berupa massa transparan atau buram yang digunakan secara topikal memiliki beberapa jenis keunggulan seperti pembuatannya yang sederhana; memberikan rasa dingin, mudah tercuci setelah diolesi dan lapisan tipis yang terbentuk dapat memberikan perlindungan (Febriyenti et al., 2019).

Meskipun ada penelitian yang mengkaji efek *dexamethasone* dan gel madu secara terpisah, belum ada studi yang secara khusus mengeksplorasi interaksi antara kedua terapi ini dalam konteks penyembuhan luka eksisi pada tikus Wistar. Hal ini menciptakan celah yang perlu diteliti untuk memahami bagaimana kombinasi terapi ini dapat mempengaruhi profil leukogram dalam proses penyembuhan luka. Dengan itu, penelitian ini dilakukan untuk memberikan wawasan baru tentang bagaimana kombinasi terapi dapat mempengaruhi imunitas lokal dan proses penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel madu topikal terhadap profil leukogram tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang mengalami kondisi immunosupresi akibat induksi *dexamethasone* dengan luka eksisi. Dengan pendekatan kuantitatif, penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai interaksi antara pengobatan dengan gel madu dan pengaruhnya terhadap profil leukogram, khususnya dalam konteks penyembuhan luka yang terhambat oleh kondisi sistem imun yang menurun. Melalui penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh data yang signifikan mengenai perubahan profil leukogram sebagai respons terhadap perlakuan yang diberikan, serta memberikan kontribusi terhadap pengembangan terapi penyembuhan luka yang lebih efektif dan aman.

## 1.2 Teori

### 1.2.1 Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

*Rattus norvegicus* merupakan hewan laboratorium yang sering digunakan dalam penelitian praklinis dan laboratorium (Fitria et al., 2019). Tikus merupakan hewan model yang paling sering digunakan karena masa reproduksinya yang singkat, umurnya yang relatif pendek, sifatnya yang jinak, serta latar belakang kesehatan dan genetiknya yang telah diketahui. Genom tikus berkerabat dekat dengan genom manusia, sehingga memungkinkan manipulasi genom tikus untuk menghasilkan model hewan dengan fenotipe yang mirip dengan penyakit manusia (Husna et al., 2019). Tikus telah banyak digunakan sebagai hewan model karena laju metabolismenya yang cepat, sehingga cocok untuk digunakan dalam penelitian metabolik (Fitria et al., 2019).



**Gambar 1.** Tampilan Morfologi Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) (Al-hajj et al., 2023).

Klasifikasi *Rattus novergicus* menurut Suckow et al. (2020) adalah antara lain sebagai berikut:

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| Kingdom    | : Animalia                 |
| Filum      | : Chordata                 |
| Subfilum   | : Vetebrata                |
| Infrakelas | : Eutheria                 |
| Ordo       | : Rodentia                 |
| Subordo    | : Myomorpha                |
| Famili     | : Muridae                  |
| Subfamili  | : Murinae                  |
| Genus      | : <i>Rattus</i>            |
| Spesies    | : <i>Rattus norvegicus</i> |

*Rattus norvegicus* termasuk dalam famili mamalia kecil. Tikus ini memiliki laju metabolisme yang tinggi, aktif, dan mobilitas yang tinggi. *Rattus novergicus* jantan biasanya lebih besar daripada betina. Moncongnya tumpul, telinga dan mata kecil, serta menghasilkan kotoran berbentuk kapsul berukuran 2 cm. Tikus dapat hidup selama 5-12 bulan dan bahkan dapat hidup hingga 3 tahun. Tikus terhitung dewasa pada usia 2-3 bulan dengan 8-12 kelahiran per kelahiran. *Rattus novergicus* memiliki rambut kasar yang agak panjang, dan tubuh silinder yang melebar ke arah belakang. Panjang ekornya 160-210 mm, panjang totalnya 310-460 mm, cuping telinganya selebar 18-24 mm (dengan rambut), kaki belakangnya sepanjang 40-47 mm, dan giginya selebar 3,5 mm. *Rattus novergicus* dapat berkembang biak hingga 7 kali per tahun (Schweinfurth, 2020).

### 1.2.2 Madu

Madu merupakan cairan alami yang dihasilkan oleh lebah atau tawon, yang umumnya memiliki rasa manis dan digunakan sebagai pemanis alami. Madu juga telah digunakan sebagai obat sejak ribuan tahun yang lalu. Beberapa penelitian melaporkan bahwa madu dapat digunakan untuk menyembuhkan luka. Madu menyediakan lingkungan lembab yang mendorong penyembuhan dan merangsang regenerasi jaringan, serta memiliki osmolaritas yang tinggi, kadar glukosa yang tinggi, dan beberapa komponen organik lainnya. Madu juga memiliki komposisi yang

mirip dengan zat yang dibutuhkan manusia, sehingga tidak dianggap sebagai benda asing. Madu bersifat antibakteri, antioksidan dan memiliki kandungan nutrisi tinggi yang baik untuk proses penyembuhan luka (Febriyenti et al., 2019).

Madu memiliki efek debridemen yang secara kimiawi mempercepat proses penyembuhan luka. Madu juga memiliki efek anti-inflamasi yang dapat mengurangi edema dan eksudat, memberikan efek menenangkan, serta meminimalkan pembentukan jaringan parut. Diduga bahwa komponen antioksidan dalam madu, seperti flavonoid, monophenolik, polifenol, dan vitamin C, tekanan osmotik yang tinggi pada madu, serta kandungan hidrogen peroksida berperan dalam temuan ini. Osmolaritas yang tinggi dapat menarik air dari dasar luka dan menciptakan aliran keluar dari getah bening, sehingga mengurangi edema jaringan di sekitar luka. Kemampuan madu untuk merangsang granulasikan dan epitelisasi pada pengobatan luka kronis disebabkan oleh komposisi nutrisi seperti karbohidrat, asam amino, vitamin, dan mineral yang mudah dimetabolisme. Madu menyediakan glukosa untuk sel epitel, leukosit, dan glikolisis. Dalam proses epitelisasi, sel-sel membutuhkan karbohidrat untuk bermigrasi ke permukaan luka agar dapat menutup luka tersebut. Selain itu, madu juga memiliki tingkat keasaman yang tinggi yang dapat memaksimalkan proses penyembuhan luka dengan meningkatkan pelepasan oksigen dari hemoglobin dan meminimalkan kerusakan yang disebabkan oleh aktivitas matriks protease. Prinsip dasar dalam manajemen luka umumnya diketahui bahwa oksigen dibutuhkan untuk metabolisme dan sintesis jaringan kolagen (Kefani et al., 2018).

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa khasiat penyembuhan madu disebabkan oleh aktivitas antibakterinya, kemampuannya untuk mempertahankan kondisi luka yang lembab, serta viskositasnya yang tinggi yang membantu memberikan penghalang pelindung untuk mencegah infeksi. Sifat imunomodulator madu juga relevan dalam perbaikan luka. Aktivitas antimikroba pada sebagian besar madu disebabkan oleh produksi hidrogen peroksida secara enzimatik. Mekanisme ini mungkin terkait dengan tingkat pH rendah pada madu dan kandungan gula yang tinggi (osmolaritas tinggi) yang cukup untuk menghambat pertumbuhan mikroba. Madu medis memiliki aktivitas bakterisidal yang kuat terhadap bakteri resisten antibiotik yang menyebabkan beberapa infeksi yang mengancam jiwa pada manusia (Kefani et al., 2018).

### **1.2.3 Induksi *Dexamethasone***

*Dexamethasone* merupakan salah satu obat kortikosteroid yang masuk ke dalam kelompok glukokortikoid sintetik yang memiliki efek anti inflamasi dan immunosupresif (Insani et al., 2015). Glukokortikoid (GC) adalah sekelompok hormon steroid yang dihasilkan sebagai respons terhadap stres. Hormon ini bekerja melalui reseptor glukokortikoid (GR) dan mempengaruhi berbagai proses fisiologis, termasuk metabolisme energi, nasib sel, dan sistem kekebalan tubuh. Glukokortikoid memiliki sifat anti-inflamasi yang kuat, setidaknya sebagian dengan cara menghambat fungsi efektor sel-sel imun, seperti sel T, makrofag, dan sel NK. Sel natural killer (NK) adalah limfosit yang memiliki peran penting dalam respons imun bawaan dengan

cara mengeluarkan sitokin inflamasi dan menghancurkan sel-sel yang terinfeksi virus atau sel-sel neoplastik (Morgan dan Davis, 2017).

Oleh karena itu, kekurangan sel NK atau memiliki aktivitas sel NK yang rendah menunjukkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi dan perkembangan kanker. Hal ini menjadikan glukokortikoid banyak digunakan dalam pengobatan gangguan inflamasi dan kanker. Namun, ada juga beberapa bukti yang menunjukkan bahwa glukokortikoid dapat memiliki efek stimulasi pada sel-sel imun, termasuk makrofag dan sel T (Morgan dan Davis, 2017). Glukokortikoid dalam banyak penelitian juga dapat menyebabkan resistensi insulin dan kelainan lipid pada penggunaan jangka panjang yang dapat berujung pada perkembangan diabetes tipe II, penyakit kardiovaskular, hipertensi, penyakit ovarium polikistik, penyakit hati berlemak non-alkohol, dan lain-lain. Glukokortikoid juga dapat memengaruhi elektrolit dan ekskresi air karena aksi mineralokortikoidnya pada hewan percobaan. Penggunaan Dex dalam jumlah berlebihan atau secara kronis dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti katabolisme otot, peningkatan adipositas, dan peningkatan resistensi insulin (IM et al., 2021).

#### **1.2.4 Leukosit**

Leukosit merupakan sel-sel aktif yang terdapat dalam darah dan memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap berbagai penyakit. Selain itu, leukosit juga berfungsi sebagai indikator kesehatan dan kondisi fisiologis hewan. Fungsi utama dari leukosit adalah melindungi tubuh dari infeksi patogen melalui proses fagositosis dan produksi antibodi. Jumlah total leukosit dalam darah dapat mencerminkan keadaan kesehatan individu dan dipengaruhi oleh berbagai faktor internal, seperti jenis kelamin, usia, kondisi kesehatan, dan hormon. Selain itu, faktor eksternal seperti tingkat aktivitas, lingkungan, stres, dan asupan nutrisi juga dapat memengaruhi jumlah leukosit. Perubahan dalam jumlah leukosit, baik peningkatan maupun penurunan, merupakan respons tubuh terhadap serangan patogen (Purnomo et al., 2015). Leukosit dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama, yaitu agranulosit dan granulosit. Agranulosit terdiri dari limfosit dan monosit, sedangkan granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil, dan basofil (Siagian et al., 2022).

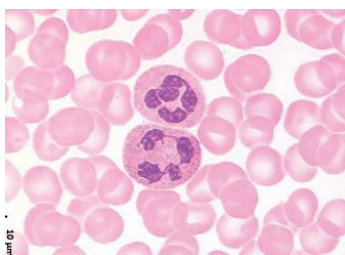
##### **1.2.4.1 Granulosit**

###### **a. Neutrofil**

Neutrofil merupakan jenis leukosit yang memiliki inti berjumlah tiga sampai lima lobus dengan granula berwarna merah. Bersama dengan makrofag, neutrofil memiliki kemampuan fagositosis terhadap organisme patogen dan sel debris (Utami et al., 2020). Neutrofil merupakan *first line* yang berfungsi sebagai pertahanan awal terhadap penyakit yang dapat mengakibatkan infeksi atau peradangan (Nuryanti et al., 2022). Neutrofil pertama kali muncul di lokasi luka. Neutrofil mulai melakukan fagositosis terhadap bakteri yang menyerang dan sel nekrotik yang rusak untuk membersihkan luka, mempersiapkannya untuk regenerasi dan pemulihan homeostasis melalui pembentukan jaringan parut (Kryzcka dan Boncella, 2015).

Neutrofil memiliki granula yang mengeluarkan zat kimia sitotoksik yang

berfungsi melakukan fagositosis khususnya pada infeksi bakteri. Neutrofil juga berperan dalam infeksi luka dengan membersihkan luka dari patogen dan menciptakan lingkungan yang sangat teroksidasi melalui produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Adrenalin et al., 2021). Persentase normal neutrofil pada tikus berkisar antara 12-38% (Dewi et al., 2022). Penghilangan neutrofil dari lokasi luka terjadi setelah 24–36 jam melalui proses apoptosis, ketika monosit yang beredar memasuki luka dan berdiferensiasi menjadi makrofag (Fernandez-Guarino et al., 2023).

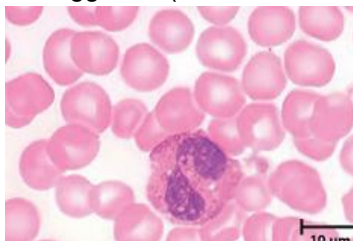


**Gambar 2.** Tampilan mikroskopis neutrofil. Morfologi neutrofil menunjukkan inti sel seperti batang yang melengkung dan memiliki granul (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

#### b. Eosinofil

Eosinofil merupakan komponen dari leukosit yang dihasilkan di sumsum tulang dan berperan dalam merespon infeksi parasit, peradangan, dan reaksi alergi (Nuryanti et al., 2022). Granula primer (azurofilik) pada eosinofil mengandung enzim hidrolase asam dan enzim lainnya, seperti kathepsin. Sementara itu, granula eosinofil yang lebih besar (spesifik) mengandung protein dasar utama, peroksidase eosinofil, protein kationik eosinofil, dan neurotoksin yang berasal dari eosinofil. Ketika eosinofil mengalami degranulasi, zat-zat ini tidak hanya bersifat toksik, tetapi juga dapat merangsang degranulasi sel-sel imun lainnya, seperti basofil dan sel mast. Hal ini dapat menyebabkan efek berantai di lokasi infeksi (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

Eosinofil merupakan sel fagosit yang menghasilkan antihistamin. Eosinofil akan mengalami kenaikan jumlah pada saat terjadi reaksi alergi dan infeksi parasit di dalam tubuh (Adrenalin et al., 2021). Persentase normal eosinofil dalam darah tikus berada dalam kisaran 0 hingga 6% (Dewi et al., 2022).

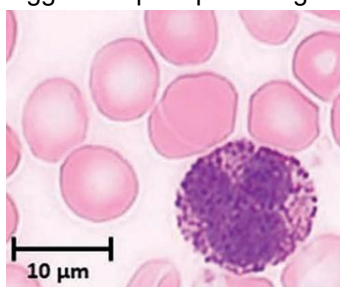


**Gambar 3.** Tampilan mikroskopis eosinofil. Morfologi eosinofil menunjukkan inti sel dengan dua lobus dan memiliki granul (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

### c. Basofil

Basofil memiliki granula spesifik yang relatif besar dan berwarna gelap, yang mengandung histamin, heparin, dan protease serin seperti kimase dan triptase. Kehadiran mediator vasoaktif ini menunjukkan bahwa sel ini terlibat dalam respons inflamasi akut. Sel mast memiliki kemiripan dengan basofil, tetapi ditemukan di dalam jaringan. Sel mast berasal dari prekursor yang telah terkomitmen di sumsum tulang, yang beredar sebagai sel agranular untuk periode waktu yang relatif singkat sebelum keluar dari aliran darah dan menetap di jaringan, di mana mereka mengembangkan granula yang mirip dengan yang ditemukan pada basofil (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

Persentase basofil dalam tikus yang normal berada dalam kisaran 0 hingga 2%. Basofil merupakan salah satu jenis leukosit yang jumlahnya sangat sedikit, yakni sekitar kurang dari 2% dari total leukosit (Dewi et al., 2022). Basofil memiliki inti ganda atau berbentuk huruf S (Utami et al., 2020). Peningkatan jumlah basofil dapat mengindikasikan adanya gangguan seperti peradangan (Nuryanti et al., 2022).



**Gambar 4.** Tampilan mikroskopis basofil. Morfologi basofil menunjukkan inti sel yang tidak teratur dan memiliki granul (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

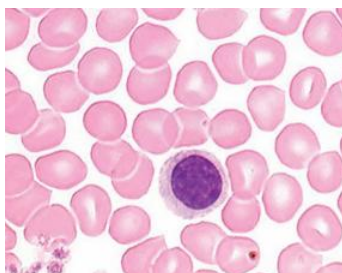
### 1.2.4.2 Agranulosit

#### a. Limfosit

Persentase normal limfosit dalam darah tikus berada dalam rentang antara 60 hingga 75% (Dewi et al., 2022). Limfosit memiliki inti yang agak bulat dan sitoplasma tanpa granula. Menariknya, limfosit merupakan satu-satunya jenis leukosit yang tidak memiliki kemampuan fagositosis (Utami et al., 2020). Fungsi utama limfosit adalah merespon antigen dengan cara membentuk antibodi (Nuryanti et al., 2022). Limfosit yang direkrut ke jaringan yang terluka diaktifkan melalui berbagai antigen. Setelah tiba di lokasi luka, sel-sel ini menghasilkan limfokin, yang selanjutnya mengaktifkan sel inflamasi lainnya, seperti makrofag (Kryzcka dan Boncella, 2015).

Sel imfosit terdiri dari kelas yang berbeda-beda dengan produk protein dan fungsinya masing-masing. Limfosit adalah salah satu jenis utama sel darah putih yang berperan penting dalam sistem imun, khususnya dalam imunitas adaptif. Limfosit terdiri dari beberapa sub tipe, seperti limfosit T (termasuk CD4+ dan CD8+), limfosit B, dan sel natural killer (NK), yang masing-masing memiliki fungsi spesifik dalam melawan infeksi dan mengatur respons imun (Adrenalin et al., 2021). Seiring berjalannya waktu dan luka mulai menutup, jumlah limfosit, khususnya limfosit T,

akan menurun, sementara proporsi limfosit B dapat meningkat (Seraphim et al., 2020).

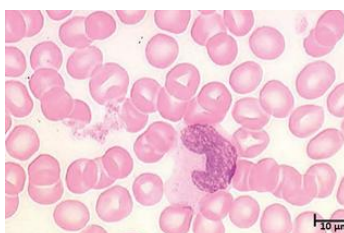


**Gambar 5.** Tampakkan mikroskopis limfosit. Morfologi limfosit menunjukkan inti sel yang bulat besar dan tidak memiliki granul (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

#### b. Monosit

Monosit adalah jenis sel darah putih yang tidak memiliki granula dan memiliki satu inti. Sel ini beredar dalam bentuk imatur dan hanya akan berkembang sepenuhnya setelah keluar dari pembuluh darah dan masuk ke jaringan tubuh. Monosit dapat berubah menjadi beberapa jenis sel, termasuk makrofag dan sel dendritik. Beberapa monosit juga dapat menjadi jenis sel khusus yang tidak terkait dengan sistem imun, seperti osteoklas, yang berfungsi dalam proses perubahan bentuk tulang. Di dalam populasi makrofag jaringan, terdapat berbagai sub tipe. Makrofag M1 cenderung lebih pro-inflamasi dan memiliki fungsi untuk melawan mikroba, sedangkan makrofag M2 lebih bersifat anti-inflamasi dan berperan dalam perbaikan jaringan serta penyembuhan luka.

Persentase normal monosit dalam darah tikus berada dalam kisaran 1 hingga 6% (Dewi et al., 2022). Monosit memiliki inti yang berlekuk berbentuk "C" dan sitoplasma yang tidak mengandung granula (Utami et al., 2020). Peran utama monosit adalah sebagai makrofag, artinya memiliki kemampuan menelan dan menghancurkan sel, mikroorganisme, serta benda asing yang bersifat patogen (Nuryanti et al., 2022). Makrofag mencapai area lesi setelah 48 hingga 72 jam yang dipicu oleh pelepasan sinyal kimiawi yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel. Di dalam granulanya, makrofag mengandung faktor pertumbuhan, seperti TGF-beta dan Epidermal Growth Factor (EGF), yang berperan dalam respons inflamasi, angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru), dan pembentukan jaringan granulasian.



**Gambar 6.** Tampakkan mikroskopis monosit. Morfologi monosit (Catchpole dan Hogenesch, 2023).

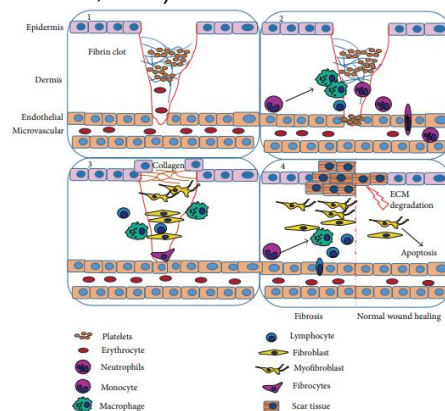
### 1.2.5 Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah proses dinamis yang bertujuan untuk mengembalikan homeostasis dan fungsionalitas jaringan yang rusak. Proses ini sangat kompleks, bersifat multi-tahap, dan gangguan dalam proses ini dapat menyebabkan komplikasi serta masalah kesehatan pada pasien yang terluka (Orlinska et al., 2023). Penyembuhan luka dibagi menjadi empat fase yang saling berkaitan, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodelling/maturasi (Fernández-Guarino et al., 2023). Fase pertama, hemostasis, dimulai setelah luka terjadi, di mana tubuh memulai mekanisme untuk menghentikan perdarahan. Trombosit berkumpul di lokasi luka dan membentuk bekuan darah yang mengandung fibrin, yang memperkuat agregat trombosit. Proses koagulasi ini juga melibatkan pengaktifan faktor pembekuan dalam darah, yang bertujuan untuk menutup luka. Fase ini disertai dengan masuknya monosit, neutrofil, dan sel mast ke lokasi kerusakan, yang fungsi utamanya adalah menghilangkan mikroorganisme, serpihan jaringan, serta merangsang angiogenesis dan regenerasi jaringan. Fase tersebut adalah fase hemostasis primer yang berlangsung selama 3–5 menit, diikuti oleh fase hemostasis sekunder. Esensi dari fase kedua ini adalah transisi protein plasma terlarut yaitu fibrinogen menjadi jaringan spasial fibrin yang tidak larut untuk memperkuat agregat trombosit primer. Mekanisme hemostasis sekunder sangat terkait dengan hemostasis primer karena proses koagulasi terjadi pada trombosit yang teraktivasi, yang menghasilkan pembentukan bekuan fibrin (Orlinska et al., 2023).

Fase berikutnya adalah inflamasi, yang dimulai pada hari pertama setelah luka dan berlangsung selama sekitar 48 jam. Fase ini ditandai dengan peradangan di sekitar luka, yang ditandai dengan kemerahan, pembengkakan, dan nyeri. Jumlah neutrofil tertinggi diamati sekitar hari pertama setelah cedera, setelah itu jumlahnya menurun setelah sekitar 48–72 jam (sebagai hasil dari apoptosis). Selanjutnya, monosit muncul dan berkembang menjadi makrofag akibat aksi TGF- $\beta$ , produk pemecahan fibrin, dan fibronectin yang dilepaskan dari matriks sementara yang terbentuk pada fase hemostasis. Makrofag bertanggung jawab untuk melanjutkan aktivitas neutrofil yaitu fagositosis, degradasi, dan pencernaan patogen, serta penghilangan serpihan jaringan melalui sekresi enzim (kolagenase, elastase, kathepsin G) (Orlinska et al., 2023).

Fase proliferasi dimulai sekitar 2–3 hari setelah dimulainya proses penyembuhan dan berlangsung selama sekitar 14 hari. Fase ini ditandai dengan intensitas yang signifikan berupa jumlah sel, yaitu fibroblas, keratinosit, dan sel endotel, meningkat di tempat luka. Fibroblas berasal dari sel mesenkimial yang tidak terdiferensiasi di dermis, yang melalui pengaruh sitokin dan faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh trombosit, neutrofil, dan makrofag, berubah menjadi fibroblas. Selama proses pembentukan jaringan granulasi, biosintesis (terutama oleh fibroblas) kolagen (tipe I dan III), elastin, glikosaminoglikan, dan proteoglikan terjadi. Epitelisasi adalah proses multi-tahap dalam membangun kembali epidermis yang rusak. Proses ini meliputi tahap migrasi keratinosit ke dalam luka, proliferasi dan diferensiasi keratinosit, serta pemulihan membran basal yang menghubungkan epidermis dengan dermis. Pada fase proliferasi, juga terjadi angiogenesis, yaitu proses

pembentukan pembuluh darah baru. Pemulihan sirkulasi darah di lokasi kerusakan mencegah terjadinya nekrosis akibat iskemia, sekaligus merangsang proses perbaikan jaringan. Fase terakhir adalah remodelling, yang berlangsung lebih lama, dari satu hingga dua tahun, atau bahkan lebih. Pada fase ini, jaringan parut terbentuk dan memperkuat diri, dengan pengurangan pembuluh darah kecil serta penurunan kandungan glikosaminoglikan dan proteoglikan di jaringan. Selama proses ini, jaringan yang terbentuk menjadi lebih kuat dan lebih stabil, meskipun tekstur dan fungsi jaringan yang sembuh mungkin tidak sepenuhnya kembali seperti semula. Proses remodelling memastikan pemulihan kekuatan mekanik pada jaringan yang telah diperbaiki (Orlinska et al., 2023).



**Gambar 7.** Tahapan penyembuhan luka. 1, koagulasi: setelah cedera, terbentuk gumpalan fibrin. Platelet yang terperangkap mengalami degranulasi dan melepaskan kemokin inflamasi. 2, inflamasi: leukosit memasuki lokasi luka. Neutrofil muncul pertama kali, diikuti oleh makrofag dan limfosit. Leukosit membersihkan luka dari bakteri dan benda asing, serta merekrut fibroblas. 3, proliferasi: fibroblas yang teraktivasi, myofibroblas, memproduksi dan menyimpan komponen ECM (matriks ekstraseluler) yang berfungsi sebagai kerangka selama proses regenerasi jaringan. 4, remodelasi, tahap terakhir dalam penyembuhan luka normal: jumlah ECM yang berlebih didegradasi, fibroblas dan myofibroblas mengalami apoptosis, dan sel-sel inflamasi meninggalkan jaringan yang telah terregenerasi. Namun, selama fibrosis, peradangan berlangsung lama dan deposisi ECM meningkat pesat oleh myofibroblas (Kryzcka dan Boncella, 2015).

### 1.2.6 Imunitas

Sistem kekebalan tubuh atau imunitas adalah sistem pertahanan tubuh terhadap patogen dan cedera, yang melibatkan respons innate/alami/bawaan (non-spesifik) dan respons adaptif (spesifik) (Sharif et al., 2015). Sistem kekebalan secara intrinsik terlibat dalam proses perbaikan peradangan dan jaringan tubuh terhadap sel-sel abnormal yang muncul selama transformasi neoplastik atau yang mungkin ditransplantasikan secara tidak tepat ke dalam tubuh (Adrenalin et al., 2021). Mekanisme respon imun bawaan memiliki kapasitas untuk mengembangkan respons yang diinduksi selama infeksi primer dan menciptakan kondisi inflamasi. Pada saat

terjadi kerusakan pada jaringan, tubuh memulai respons inflamasi akut yang ditandai dengan rasa sakit, bengkak, panas, kemerahan, dan hilangnya fungsi jaringan yang baik. Neutrofil dan makrofag dengan cepat bermigrasi ke lokasi luka, yang menyebabkan peningkatan jumlah granulosit dan monosit yang beredar, yang tercermin dalam peningkatan jumlah pada leukogram. Sel-sel ini membersihkan sisa-sisa jaringan, melawan infeksi, dan melepaskan sitokin yang mengatur proses perbaikan jaringan (Ellis et al., 2018).

Imunitas lokal merujuk pada respons imun yang terjadi secara spesifik di jaringan atau organ tertentu, misalnya di kulit atau saluran pernapasan, untuk mencegah penyebaran patogen sebelum terjadi infeksi sistemik. Sel-sel darah putih (leukosit) seperti neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil berperan penting dalam kedua jenis imunitas ini, baik secara sistemik maupun lokal (Darwin et al., 2021). Imunitas lokal sangat penting dalam proses penyembuhan luka dan pertahanan awal terhadap infeksi, di mana sel-sel imun akan bermigrasi ke lokasi cedera atau infeksi untuk melakukan fagositosis, sekresi sitokin, dan aktivasi respons imun lanjutan (Abukanna et al., 2022). Perubahan nilai sel-sel darah putih mencerminkan aktivitas dan status sistem imun tubuh. Misalnya, peningkatan jumlah leukosit (leukositosis) sering terjadi saat infeksi, inflamasi, atau stres fisiologis, sedangkan penurunan (leukopenia) dapat menandakan gangguan imunitas atau efek samping obat. Proporsi masing-masing jenis leukosit juga dapat berubah sesuai kondisi; neutrofil biasanya meningkat pada infeksi bakteri, sedangkan limfosit lebih dominan pada infeksi virus atau proses imun adaptif (Qian et al., 2023).

### 1.3 Tujuan dan Manfaat

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh pemberian gel madu topikal terhadap profil leukogram tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan *dexamethasone* yang mengalami luka eksisi. Manfaat penelitian ini terdiri dari manfaat pengembangan ilmu dan manfaat aplikasi. Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah untuk memberikan informasi ilmiah dan menjadi literatur untuk penelitian selanjutnya terkait dengan profil leukogram dari tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan model luka eksisi yang diinduksi *Dexamethasone* dengan pemberian gel madu secara topikal. Manfaat aplikasi pada penelitian ini agar dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya.

## BAB II METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 hingga bulan Februari 2025. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba berupa *Rattus norvegicus* atau tikus galur wistar berkelamin jantan. Hewan coba kemudian diaklimatisasi dan diberikan perlakuan di *Animal Lab* Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Tempat pengambilan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk penggunaan hewan model dalam penelitian dengan nomor surat No. 012/UN4.1.RSHUH/B/PP36/2025.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat tulis, *blade*, botol minum tikus, *cover glass*, gelas ukur, *handscoon*, jas laboratorium, kandang tikus ukuran 45 x 35 cm, kaca transparan, kaca objek, kamar hitung *improved neubauer*, kertas grafik, label nama, masker, mikroskop, *object glass*, oven, pH meter, pinset, pipet leukosit, pipet mikrohematokrit, pipet tetes, pipet volumetrik, *punch biopsy* 4.0 mm, rak tabung, *refrigerator*, *sput* 1cc, *sput* 3cc, *stopwatch*, tabung *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA), tabung reaksi, dan toples kaca bertutup plastik. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 200-300 gram, air, alkohol 70%, *Aquadest*, *Dexamethasone* cair, gliserin, *ketamine*, larutan turk, madu, *methylene blue*, metil paraben, minyak imersi, Na-CMC (Sodium-Carboxymethyl Cellulose), pakan konsentrat, pewarna eosin, *povidone iodine*, *propylene glycol*, *tissue*, dan *xylazine*.

### 2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat profil leukogram tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan model luka eksisi yang diinduksi dexamethasone terhadap pemberian gel madu topikal. Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif yang berfokus untuk melihat nilai pemeriksaan sel darah putih yang terdiri dari nilai total leukosit (WBC), nilai *Lymph*, nilai *Gran* dan nilai *Mid* pada setiap kelompok perlakuan yang terbagi atas 6 kelompok. Analisis data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik nilai leukosit yang diperoleh. Menurut Adrenalin et al. (2021), nilai total WBC, nilai *Lymph*, nilai *Gran*, dan nilai *Mid* dalam penelitian ini didasarkan pada relevansinya terhadap penilaian respons imun, pemantauan peradangan, dan proses penyembuhan luka, memberikan pemahaman yang komprehensif tentang efek *dexamethasone* dan gel madu dalam model eksperimental.

## 2.4 Pelaksanaan Penelitian

### 2.4.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang tikus disterilkan dengan cara dicuci bersih menggunakan air mengalir dan sabun serta dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian diberi sekam padi sebagai alas kandang. Setelah kandang steril, tikus langsung ditempatkan dan diberi pakan konsentrat 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. Metil paraben yang telah dilarutkan dengan aquades yang telah dipanaskan ditambahkan ke massa gel yang telah terbentuk, selanjutnya ditambahkan gliserin dan propilen glikol dengan dimasukkan kedalam wadah dan diaduk hingga homogen. Madu ditambahkan sesuai formula 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            | 10g       | 20g      |
| Na-CMC          | 3g        | 3g       |
| Gliserin        | 5g        | 5g       |
| Propilen Glikol | 10g       | 10g      |
| Metil Paraben   | 0,2g      | 0,2g     |
| Aquades         | ad 100ml  | ad 100ml |

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 untuk mengetahui perubahan fisik dari sediaan pada awal, tengah dan akhir pengujian yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH dan daya sebar.

#### a. Uji Organoleptis

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

#### b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan mengamati campuran bahan dalam sediaan

gel pada kaca objek yang menunjukkan terdapatnya butiran kasar atau tidak.

c. 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

Penentuan banyak sampel penelitian yang digunakan dalam satu kelompok serta jumlah pengelompokan yang dilakukan dihitung dengan menggunakan rumus *federer*.

$$\begin{aligned} \text{Rumus Federer: } t(n-1) &\geq 15 \\ n &= \text{jumlah sampel perkelompok} \\ t &= \text{jumlah pengelompokan} \end{aligned}$$

Penelitian menggunakan 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok yang diberi perlakuan. Oleh karena itu, nilai  $t$  pada rumus Federer yang digunakan adalah 4 dan diperoleh hasil sebagai berikut:

$$\begin{aligned} 4(n-1) &\geq 15 \\ 4n-4 &\geq 15 \\ 4n &\geq 15 + 4 \\ 4n &\geq 19 \\ n &\geq 19/4 \\ n &\geq 5 \end{aligned}$$

Jumlah sampel pada penelitian ini yaitu 20 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, untuk setiap kelompok perlakuan terdapat 5 ekor tikus wistar.

- $K^-$  merupakan kelompok tikus wistar yang diinduksi *Dexamethasone* dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang tidak diberikan obat topikal.
- $K^+$  merupakan kelompok tikus wistar yang diinduksi *dexamethasone* dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan obat topikal *povidone iodine*
- $KP^1$  merupakan kelompok tikus wistar yang diinduksi *dexamethasone* dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 10%.
- $KP^2$  merupakan kelompok tikus wistar yang diinduksi *dexamethasone* dengan model luka eksisi *punch biopsy* yang diberikan gel madu dengan konsentrasi 20%.

Pelaksanaan penelitian menerapkan prinsip 3R, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*. *Replacement* berarti menggantikan penggunaan hewan dengan metode alternatif untuk mengurangi ketergantungan pada hewan hidup. *Reduction* menekankan penggunaan jumlah hewan seminimal mungkin dengan desain eksperimen dan analisis statistik yang efisien, tanpa mengorbankan validitas ilmiah. *Refinement* mengacu pada perbaikan prosedur dan kondisi pemeliharaan untuk meminimalkan rasa sakit, stres, dan penderitaan hewan, misalnya dengan penggunaan analgesik atau teknik invasif minimal (Graham et al., 2015). Dengan mengintegrasikan prinsip 3R, penentuan jumlah sampel dilakukan dengan

pendekatan *resource equation*. Menurut Arifin dan Zahiruddin (2017), pada desain penelitian grup dengan *repeated measure* atau pengukuran berulang, jumlah sampel minimal dan maksimal dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$n = \frac{DF}{kr} + 1$$

n = jumlah sampel per kelompok

DF = jumlah minimal dan maksimal hewan per-kelompok (10-20)

k = jumlah kelompok

r = jumlah pengukuran berulang

- Nilai n minimal

$$n = \frac{10}{4 \cdot 3} + 1 = 1.83 = 2$$

- Nilai n maksimal

$$n = \frac{20}{4 \cdot 3} + 1 = 2.67 = 3$$

Perhitungan jumlah sampel (N), dilakukan dengan rumus:

- Nilai n minimal = n minimal × k  
= 2 × 4  
= 8 total sampel minimal
- Nilai n maksimal = n maksimal × k  
= 3 × 4  
= 12 total sampel maksimal

Sehingga, berdasarkan perhitungan tersebut, total jumlah sampel yang digunakan yaitu minimal 8 sampel dan maksimal 12 sampel. Jumlah sampel yang diambil dalam penelitian ini, yaitu sebanyak 12 sampel yang terdiri dari 4 kelompok dengan 3 ekor tikus wistar dalam setiap kelompok perlakuan. Perlakuan yang dilakukan terhadap sampel, yaitu dengan menginjeksikan *dexamethasone* secara intraperitoneal pada kelompok K-, K+, KP1, dan KP2 selama 6 hari. Pada hari ke-7, injeksi dihentikan pada kelompok tersebut dan dilakukan pembuatan luka pada setiap kelompok penelitian. Pemberian pengobatan dilakukan dengan menggunakan ge madu untuk kelompok KP1 dan KP2 serta pengobatan secara topikal menggunakan *povidone iodine* untuk kelompok K+. Pengobatan dilakukan sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore hari selama 14 hari secara topikal disertai pemberian pakan konsentrat 2 kali sehari dan air secara *ad libitum*.

#### 2.4.5 Penginduksian *Dexamethasone*

Penginduksian *dexamethasone* dilakukan dengan mengutip penelitian dari IM et al. (2021), dimana pemberian *dexamethasone* dengan dosis tinggi 8 mg/kg per hari dalam jangka pendek menghasilkan hiperglikemia maksimum, hiperinsulinemia, dan dislipidemia berat, yang merupakan tanda kunci dari resistensi insulin. Dosis *dexamethasone* diberikan melalui rute *intraperitoneal* (i.p) selama 6 hari. Setiap tikus hanya diperbolehkan mengonsumsi pelet makanan standar dan air secara *ad libitum*.

#### 2.4.6 Pembuatan Luka

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

#### 2.4.7 Pengambilan Sampel Darah

Pada hari ke 1, 7 dan 14 masing-masing tikus diambil darahnya. Tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine* dengan dosis 75 mg/kg dan *xylazine* dengan dosis 8 mg/kg dengan rute *Intraperitoneal* (IP) (Budde dan McCluskey, 2023), kemudian menusukkan pipet mikrohematokrit pada *plexus retro-orbitalis* yang selanjutnya darah akan mengalir keluar melalui pipet mikrohematokrit dan langsung dimasukkan ke dalam tabung EDTA.

### 2.5 Pengamatan dan Pengukuran

Profil leukogram dihitung secara manual. Sampel yang digunakan merupakan sampel darah tikus wistar yang telah dikoleksi di dalam tabung EDTA. Pemeriksaan profil leukogram yang dimaksud berupa *White Blood Cell* (WBC) atau total leukosit, nilai *Lymph* (limfosit), nilai Granulosit (*Gran*) yang terdiri dari neutrofil, eosinofil, dan basofil, serta nilai monosit (*Mid*) .

#### 2.5.1 Perhitungan Nilai Total Leukosit

Perhitungan nilai total leukosit dilakukan dengan pertama-tama mengambil sampel darah hingga angka 0.5 pada pipet pengencer menggunakan spuit yang ditautkan dengan selang. Ujung pipet pengencer dicelupkan ke dalam cairan pengencer dan dihisap menggunakan spuit dan selang sampai di batas angka 11 pada pipet pengencer. Pipet diangkat, lalu ditutup ujungnya dengan jempol dan pangkalnya ditutup dengan jari tengah dalam posisi mendatar. Darah dan larutan dihomogenkan dalam pipet pengencer dengan cara membuat gerakan angka delapan mendatar.

Setelah homogen, sebagian larutan dibuang sebanyak 3-5 tetes. Kaca penutup diletakkan di atas tangkai kamar hitung, lalu larutan enceran diisi ke dalam kamar hitung dengan berhati-hati. Kamar hitung yang telah diisi dengan larutan enceran, didiamkan selama beberapa menit dalam posisi mendatar hingga sel darah mengendap dengan baik. Setelah itu, bagian dataran yang terisi pada kamar hitung diposisikan tepat di bawah lensa objektif mikroskop, lalu sel leukosit dihitung berdasarkan jumlah sel yang terlihat dalam empat kotak besar di pojok. Hasil perhitungan akhir leukosit dihitung dengan menggunakan rumus  $n \times 50$  dimana  $n$  merupakan jumlah dari sel yang terlihat dari keempat kotak yang dihitung.

#### 2.5.2 Diferensiasi Leukosit

Diferensiasi leukosit dilakukan dengan menggunakan metode *diff-quick*. Metode ini dilakukan dengan cara meletakkan setitik darah di atas *object glass*, lalu darah tersebut diulas menggunakan *object glass* lainnya hingga terbentuk ulasan darah tipis. Setelah terbentuk ulasan darah tipis, darah ditunggu untuk kering, lalu hasil ulas darah difiksasi dengan cara dimasukkan ke dalam larutan metanol. Setelah dimasukkan ke dalam metanol, ulas darah sekali lagi di tunggu hingga kering.

Setelah kering, maka hasilulas darah yang sudah di fiksasi dapat dimasukkan ke dalam pewarna ulas darah berupa eosin. Perendaman hasilulas darah dalam eosin dilakukan selama 5 detik dan dapat diulang sebanyak 2 kali. Setelah itu, ulas darah yang sudah diberikan pewarna eosin dicelupkan lagi ke dalam pewarna *methylene blue* selama 5 detik. Pada saat hasilulasan darah yang sudah diwarnai kering, maka hasilulas darah dapat diperiksa dibawah mikroskop dan diperlukan minyak emersi untuk melihat inti sel darah putih dengan lebih jelas. Perhitungan diferensiasi leukosit, dapat dilakukan dengan menghitung 100 jenis leukosit yang dapat diidentifikasi, lalu dihitung dengan menggunakan rumus  $n/100\%$  untuk mengetahui persen jenis leukosit yang ditemukan pada setiap hasilulasan darah.

**Tabel 2.** Sistem penilaian untuk analisis komparatif leukogram

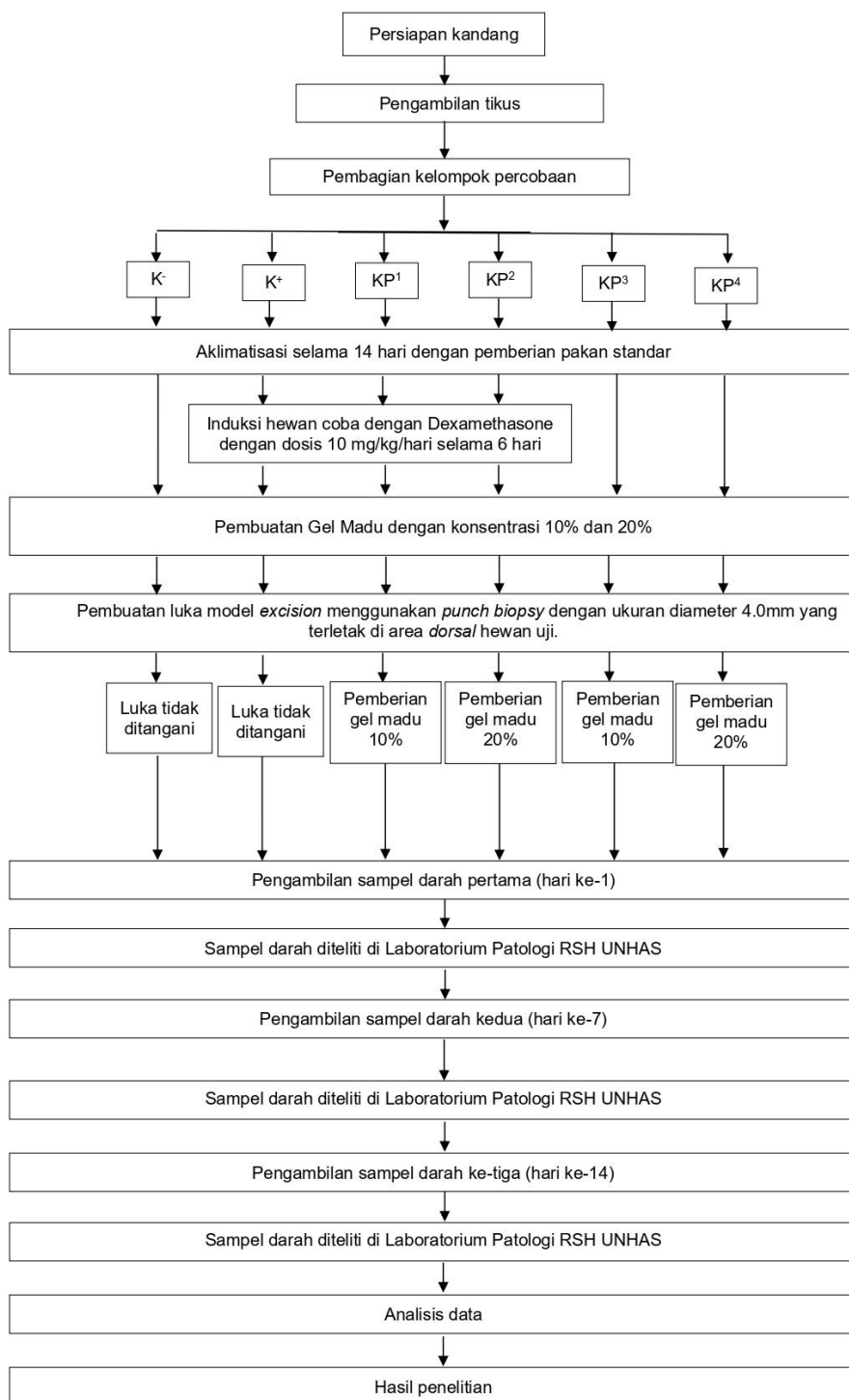
| Penilaian                                                                                                                                               | Keterangan Penilaian |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Total Leukosit (WBC) ( $10^9$ /L)                                                                                                                       | 2.9 – 15.3           |
| Limfosit (%)                                                                                                                                            | 63.7 – 90.1          |
| Gran (%)                                                                                                                                                | 7.3 – 30.1           |
| Mid (%)                                                                                                                                                 | 1.5 – 4.5            |
| Messias et al. (2017). R. bras. Ci. Vet 24(2), 77-80. <a href="https://doi.org/10.22409/RBCV.V24I2.1602">https://doi.org/10.22409/RBCV.V24I2.1602</a> . |                      |

## 2.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Statistical Program for Social Science* (SPSS). Uji statistik yang digunakan adalah uji *Repeated Measure ANOVA*. Data yang telah diperoleh diuji terlebih dahulu dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk memastikan data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak normal. Data yang terdistribusi normal ditandai dengan nilai *p-value* > 0.05, sedangkan data yang tidak normal ditandai dengan nilai *p-value* < 0.05. Setelah itu, dilakukan uji *Sphericity* untuk untuk membandingkan variansi antar kelompok waktu. Jika nilai *p-value* > 0.05, maka asumsi *Sphericity* terpenuhi, sedangkan jika nilai *p-value* < 0.05, maka diketahui bahwa asumsi *Sphericity* tidak terpenuhi. Untuk mengetahui asumsi dari uji *Sphericity*, dilakukan uji *Mauchly* untuk menguji asumsi *Sphericity*, jika nilai *p-value* > 0.05, maka nilai yang digunakan yaitu nilai yang ada pada baris *Sphericity Assume* dan jika nilai *p-value* < 0.05 maka nilai yang digunakan yaitu nilai yang ada pada baris *Greenhouse-Geisser*.

Selanjutnya, uji parametrik *Repeated Measure ANOVA* dilakukan untuk melihat pengaruh waktu, perlakuan dan kombinasi waktu serta perlakuan antar kelompok yang dilihat dari nilai rata-rata antar kelompok. Jika nilai, jika nilai *p-value* < 0.05 artinya ada perbedaan bermakna antara rata-rata kelompok. Sedangkan, jika nilai *p-value* > 0.05, artinya tidak ada perbedaan bermakna antara rata-rata kelompok. Uji *Post-hoc* dilakukan dengan uji *Bonferroni* juga dilakukan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok secara detail. Jika hasil uji *Post-hoc* bernilai *p-value* < 0.05 maka diketahui bahwa rata-rata antar kelompok berbeda secara signifikan, sedangkan jika *p-value* > 0.05, maka diketahui bahwa rata-rata antar kelompok tidak berbeda secara signifikan.

## 2.7 Alur Penelitian



**Gambar 8.** Alur Penelitian