

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari sampai dengan bulan Juli 2012. Pembuatan hidrogel paduan bahan kitosan-glutaraldehid dilakukan di Laboratorium Fisika Material Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Uji FT-IR dilakukan di Universitas Surabaya dan uji kemampuan absorpsi dilakukan di Laboratorium Material Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

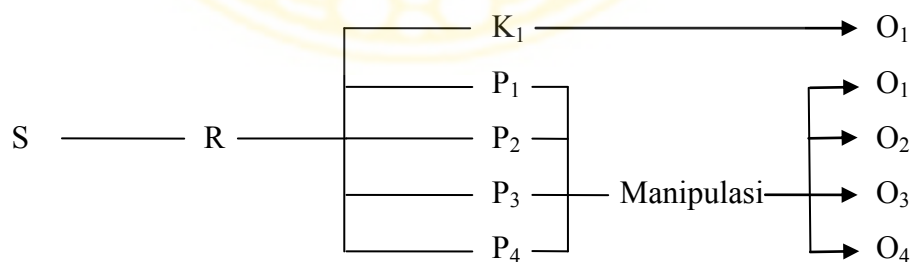
Alat yang digunakan untuk pembuatan dan pengujian kasa hidrogel antara lain gelas beaker, gelas ukur, plat kaca, spatula, magnet, magnetic stirrer, cetakan sagon, kasa, neraca digital, dan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Alat yang digunakan untuk pembiusan antara lain kasa steril dan sarung tangan. Alat yang digunakan untuk pembuatan luka insisi antara lain pisau cukur, pisau bedah dan alat ukur (penggaris). Alat yang digunakan untuk perawatan luka antara lain gunting, alat ukur (penggaris) dan kamera digital.

### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pembuatan dan pengujian kasa hidrogel antara lain kitosan, glutaraldehid, asam asetat, aquades, dan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Bahan yang digunakan untuk pembiusan antara lain obat anestesi. Bahan yang digunakan untuk pembuatan luka insisi antara lain alkohol, mencit, kasa steril, hypafix, plester, dan perlak. Bahan yang digunakan untuk perawatan luka antara lain sarung tangan steril, sarung tangan unsteril, kasa steril, hypafix, perlak, kasa hidrogel yang telah disintesis, normal saline, gunting, plester.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian pada uji *in vivo* merupakan penelitian eksperimen murni (*True Experimental*). Kriteria penelitian *true experimental* terdiri dari adanya perlakuan, kontrol, replikasi, dan juga terdapat randomisasi. Desain penelitian ini menggunakan desain penelitian *Post-Test Control Group Design*. Skema desain penelitian yang dipakai sebagai berikut:



Gambar 3.1 Desain Penelitian Karakterisasi *In Vivo* Komposit Kitosan - Glutaraldehid Sebagai *Wound Dressing*.

Keterangan :

- S : Sampel penelitian (hewan coba).
- R : Randomisasi (acak).
- K<sub>1</sub> : Kelompok kontrol negatif. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa konvensional dan dibasahi air untuk menjaga kelembaban.
- P<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan pertama. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel kitosan
- P<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan kedua. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel kitosan – glutaraldehid 2 ml.
- P<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan ketiga. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel kitosan – glutaraldehid 3 ml.
- P<sub>4</sub> : Kelompok perlakuan keempat. Mencit yang mengalami luka akut akibat insisi pada punggung lalu luka ditutup menggunakan kasa hidrogel kitosan – glutaraldehid 4 ml.
- O<sub>1234</sub> : Observasi (pengukuran) *post-test*.

### 3.4 Sampel Penelitian

Populasi adalah setiap subyek yang memenuhi kriteria yang telah ditetapkan (Nursalam, 2008). Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau

obyek yang diteliti tersebut. Populasi penelitian pada uji *in vivo* ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan dari koloni yang sama, umur 2-3 bulan, berat 20-30 gram. Pembagian kelompok dilakukan dengan cara *sampling*. *Sampling* adalah proses menyeleksi porsi dari populasi untuk mewakili populasi. Teknik *sampling* merupakan cara-cara yang ditempuh dalam pengambilan sampel, agar memperoleh sampel yang benar-benar sesuai dengan keseluruhan obyek penelitian. Pemilihan sampel pada penelitian ini menggunakan cara *simple random sampling*. *Simple random sampling* merupakan pemilihan sampel dengan cara menyeleksi setiap elemen secara acak (Nursalam, 2008). Penjabaran rumus besar sampel:

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi di dalam penelitian ini didapatkan jumlah sampel dari tiap kelompok adalah 4 ekor mencit (*Mus musculus*). Jumlah sampel secara keseluruhan dibutuhkan 20 ekor mencit (*Mus musculus*). Hal tersebut diterapkan untuk mendukung terlaksananya penelitian ini sampai selesai dan menghindari terjadinya *drop out* pada sampel. Peneliti telah menetapkan kriteria sampel subyek penelitian sebagai berikut :

1. Usia sekitar 2-3 bulan.
2. Jenis kelamin yaitu jantan.

3. Berat badan antara 20-30 gram.
4. Sehat (mata jernih, bulu bersih, gerakan aktif).

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Independen (bebas) Penelitian**

Variabel independen adalah variabel yang nilainya menentukan variabel lain dan biasanya pada variabel ini dimanipulasi, diamati, dan diukur untuk diketahui hubungannya atau pengaruhnya terhadap variabel lain (Nursalam, 2008). Dalam penelitian ini variabel independennya adalah kasa hidrogel paduan dari kitosan dan glutaraldehid dengan masing-masing komposisi glutaraldehid sebanyak 2 ml, 3 ml, dan 4 ml serta hari penyembuhan pada mencit.

#### **3.5.2 Variabel Dependen (tergantung) Penelitian**

Variabel dependen merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena variabel bebas . Dalam penelitian ini variabel dependennya adalah kemampuan absorb dan penyembuhan luka insisi pada :

Fase inflamasi :

1. Kemerahan pada luka dan sekitarnya
2. Edema jaringan sekitarnya
3. Cairan pada luka

Fase proliferasi :

1. Granulasi pada jaringan luka
2. Tepi luka insisi menyatu dengan tepi luka lain.

Tabel 3.1 Variabel penelitian, definisi operasional, parameter, alat ukur, skala dan skoring.

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Skala	Skoring (Rainey (2002))
Independen : Kasa hidrogel Kitosan – Glutaraldehyd	Prosedur pembuatan hidrogel sebagai berikut : larutan glutaraldehyd 1 % dengan rasio mol berbeda ditambahkan ke dalam larutan kitosan. Larutan tersebut diaduk selama 30 menit dalam suhu ruang sampai viskositasnya meningkat. Hidrogel yang terbentuk, dituang lalu diratakan pada plat kaca yang sudah dilapisi kasa steril sebelumnya. Dan kemudian dikeringkan dalam suhu ruang selama 7 hari (proses dilakukan dengan keadaan lingkungan steril).	Dilakukan perawatan luka akut dengan menggunakan kasa hidrogel Kitosan - Glutaraldehyd pada post insisi hari pertama			
Dependen : Kemampuan	Kemampuan absorpsi dari hidrogel		Neraca digital		

absorpsi	ditentukan dengan menginkubasi hidrogel pada pH 7,4 di phosphate buffer saline (PBS) pada suhu ruang. Berat basah hidrogel dihitung selama beberapa kali dengan memberi <i>sponge filter paper</i> untuk menghilangkan air yang diserap pada permukaan kemudian segera ditimbang dengan timbangan digital.				
Penyembuhan luka insisi	Suatu proses mekanisme tubuh dalam regenerasi jaringan-jaringan baru pada luka	<p>1. Fase Inflamasi :</p> <p>a. Jarak kemerahan pada tepi luka</p> <p>b. Jarak edema dari tepi luka</p> <p>c. Cairan atau pus: keluarnya cairan atau luka terlihat kering</p>	<p>Penggaris</p> <p>Penggaris</p> <p>Lembar Observasi</p>	<p>Rasio</p> <p>Rasio</p> <p>Ordinal</p>	<p>Ukuran diameter kemerahan dari tepi luka</p> <p>Ukuran diameter edema dari tepi luka</p> <p>a. Tidak ada pus / cairan = 3 b. Ada cairan = 2 c. Cairan dengan pus = 1</p>

		2. Fase Proliferasi a. Adanya granulasi pada jaringan luka : tampak ada jaringan baru (epitelisasi)	Lembar Observasi	Ordinal	a. Seluruh bagian luka = 3 b. Sebagian = 2 c. Tidak ada granulasi = 1
		b. Tepi luka menyatu dengan tepi luka yang lain	Lembar Observasi	Ordinal	a. Menyatu sempurna = 3 b. Terbuka sebagian = 2 c. Tidak menyatu sama sekali = 1

### 3.6 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan data

Tahap awal dari penelitian ini yaitu menetapkan subyek penelitian yang sesuai persyaratan sampel yang telah ditentukan. Kemudian dilakukan pengelompokan dalam lima kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan cara random (Nursalam, 2008). Random adalah setiap sampel dengan jumlah yang sama mempunyai tingkat kemungkinan terpilih yang sama. Pada penelitian ini perandoman dilakukan secara acak pada sampel.

Pada tahap perlakuan selanjutnya sampel dibagi menjadi lima kelompok, kemudian dilakukan insisi menggunakan pisau bedah pada punggung sampel dengan panjang antara 0,5 – 1 cm dan kedalaman sampai area *Musculus Gluteus Medius*/ kemudian sampel diberikan perlakuan sesuai dengan rencana penelitian, yaitu pada kelompok kontrol negatif (kelompok perlakuan pertama) hanya dibalut



kasa konvensional, kelompok perlakuan yang kedua dibalut kasa hidrogel yang terdiri dari kitosan, kelompok perlakuan yang ketiga dibalut kasa hidrogel yang terdiri dari kitosan + glutaraldehid 2 ml, perlakuan yang keempat dibalut kasa hidrogel yang terdiri dari kitosan + glutaraldehid 3 ml, perlakuan yang kelima dibalut kasa hidrogel yang terdiri dari kitosan + glutaraldehid 4 ml. kelima kelompok dilakukan penilaian terhadap kesembuhan luka insisi. Pada sampel dilakukan perawatan luka secara steril setiap hari dan dilakukan penilaian kesembuhan luka pada hari ketiga, kelima dan hari keenam setelah diberi luka insisi.

### **3.6.1 Prosedur Pembuatan Kasa Hidrogel**

#### **3.6.1.1 Tahap Pembuatan Larutan Kitosan**

Prosedur pembuatan larutan kitosan adalah sebagai berikut : kitosan dilarutkan ke dalam asam asetat 1% pada temperatur ruang dan dibiarkan semalam dengan pengadukan mekanik terus menerus untuk mendapatkan larutan 1% (b/v). larutan kitosan kental berwarna kuning pucat disaring untuk menghilangkan materi yang tidak larut.

#### **3.6.1.2 Tahap Pembuatan Hidrogel**

Prosedur pembuatan hidrogel sebagai berikut : larutan glutaraldehid 1 % dengan rasio mol berbeda ditambahkan ke dalam larutan kitosan. Larutan tersebut diaduk selama 30 menit dalam suhu ruang sampai viskositasnya meningkat. Hidrogel yang terbentuk, dituang lalu diratakan pada plat kaca yang sudah dilapisi kasa steril sebelumnya. Dan kemudian dikeringkan dalam suhu ruang selama 7 hari (proses dilakukan dengan keadaan lingkungan steril).

### 3.6.2 Karakterisasi Hidrogel

#### 3.6.2.1 Uji FT-IR

Untuk mengetahui apakah kitosan dan glutaraldehid telah bercampur (dengan harapan kedua bahan telah berikatan silang) dilakukan pengujian dengan FT-IR untuk mengetahui ada tidaknya gugus fungsi senyawa glutaraldehid dan kitosan. Sebelum dilakukan uji, terlebih dahulu sampel dibentuk pelet dengan ketebalan 1 cm. Setelah itu sampel dimasukkan tabung dalam perangkat FT-IR dan disinari.

Dalam spektrum FT-IR kitosan, puncak penyerapan dari peregangan vibrasi karbonil dalam kelompok  $\text{O}=\text{C}-\text{NHR}$  telah diamati pada  $1664\text{ cm}^{-1}$  dan puncak penyerapan pada  $1593\text{ cm}^{-1}$  berkaitan dengan ikatan vibrasi N-H pada kelompok amina. Puncak penyerapan O-H dan N-H peregangan vibrasi muncul di  $3449\text{ cm}^{-1}$ .

Hasil spektra infra merah dari ikat silang kitosan menunjukkan serapan pada bilangan gelombang  $3445,1\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan daerah  $-\text{OH}$  dan air. Pita serapan pada bilangan gelombang  $2928\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan daerah puncak untuk gugus C-H. Adanya serapan pada bilangan gelombang  $1659,7$  dan  $1376,1\text{ cm}^{-1}$  mungkin merupakan daerah puncak untuk gugus N-H dari gugus amina dan gugus C-H pada  $\text{CH}_3$  (Muzzarelli, 1978).

### 3.6.2.2 Uji Kemampuan Absorpsi dari Hidrogel.

Kemampuan absorpsi dari hidrogel ditentukan dengan menginkubasi hidrogel pada pH 7,4 di *phosphate buffer saline* (PBS) pada suhu ruang. Berat basah hidrogel dihitung selama beberapa kali dengan memberi *sponge filter paper* untuk menghilangkan air yang diserap pada permukaan kemudian segera ditimbang dengan timbangan digital.

Banyaknya air yang terserap pada hidrogel dapat dihitung menggunakan persamaan 2.1. Dimana E adalah persentase absorpsi air pada hidrogel.  $W_e$  menunjukkan berat hidrogel yang telah menyerap PBS dan  $W_0$  adalah berat mula-mula. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan rata-ratanya yang digunakan.

### 3.6.3 Prosedur Kerja Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi hewan coba dilakukan selama tujuh hari dengan hanya diberikan pakan dan minum (Smith, 2008). Adaptasi hewan coba ini bertujuan untuk mengadaptasikan hewan tersebut agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan dapat bertahan hidup selama penelitian dilakukan. Kandang hewan coba dibersihkan dan diganti sekam setiap dua hari sekali.

### 3.6.4 Prosedur Kerja Pembuatan Luka Insisi

Prosedur kerja pembuatan luka insisi antara lain terlebih dahulu ditentukan daerah mana yang akan diinsisi yaitu memilih daerah punggung dengan pertimbangan tidak digaruk atau dijilat oleh mencit, tangan dicuci terlebih dahulu sebelum memakai sarung tangan, bulu di daerah punggung dicukur  $\pm 1-3$  cm disekitar area kulit yang akan dibuat luka insisi, perlak dipasang dan dialaskan pada mencit yang akan diinsisi, tangan kembali dicuci dan kemudian dipasang

sarung tangan steril, duk lubang steril dipasang pada area yang akan diinsisi, disinfeksi dilakukan pada area yang akan diinsisi dengan alkohol 70%, penyayatan dilakukan pada kulit dengan cara yang steril dengan menggunakan pisau bedah dengan panjang luka  $\pm 0,5 - 1$  cm dan kedalaman luka sampai pada *Musculus Gluteus Medius*. Setelah diberi luka insisi, kemudian dibalut menggunakan kasa hidrogel yang telah disterilisasi sebelumnya menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF) kemudian ditutup dengan hypafix, agar tidak mudah lepas maka dibalut dengan plester setelahnya.

### 3.6.5 Prosedur Kerja Perawatan Luka

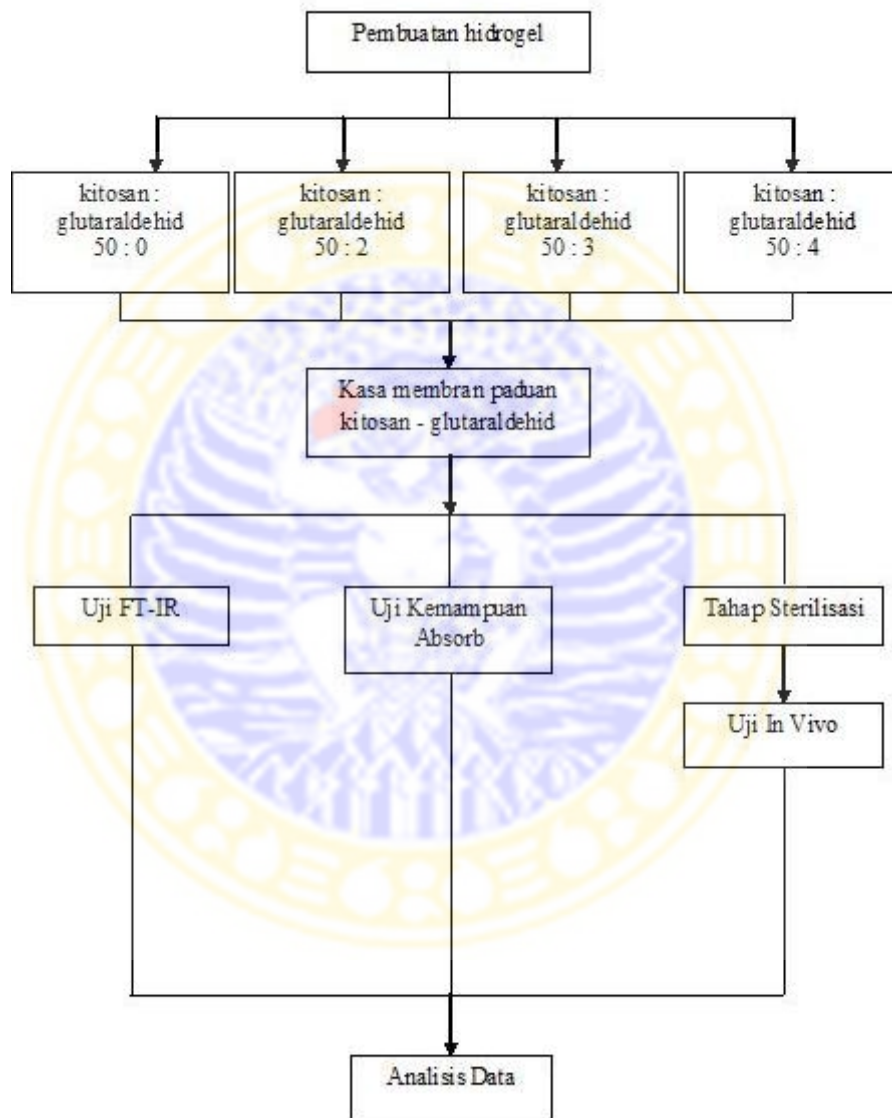
Prosedur kerja perawatan luka antara lain tangan dicuci terlebih dahulu, setelah itu memakai sarung tangan nonsteril, perlak yang dilapisi kain ditempatkan di bawah luka yang dirawat, mencit dipegang senyaman mungkin untuk memudahkan perlakuan tindakan perawatan luka, kemudian perban luka dilepas, sarung tangan nonsteril dilepas, tangan dicuci, kemudian sarung tangan steril dipasang, dilakukan observasi makroskopis mengenai kondisi luka, cek bila ada cairan yang tidak normal kaji jumlah, warna, bau dari cairan (menggunakan alat bantu kamera digital), luka dibersihkan dengan bahan pembersih luka normal saline 0,9% menggunakan kasa steril dengan arah dari atas ke bawah tanpa mengusap area luka. Kasa steril digunakan setiap satu kali pembersihan dibuang dan pelaksanaan perawatan luka dijaga sterilitasnya, diberikan kasa hidrogel kitosan pada kelompok kedua, kemudian memberikan kasa hidrogel paduan kitosan + glutaraldehid 2 ml pada kelompok ketiga, memberikan kasa hidrogel paduan kitosan + glutaraldehid 3 ml pada kelompok keempat, memberikan kasa

hidrogel paduan kitosan + glutaraldehid 4 ml pada kelompok kelima, sedangkan pada kelompok pertama diberikan *normal saline* 0,9% dalam proses perawatnya kemudian dibalut menggunakan kasa konvensional, setelah itu luka ditutup menggunakan hypafix kemudian dibalut dengan plester, peralatan yang telah dipakai dirapikan, Memastikan posisi perban luka dalam keadaan aman, sarung tangan dilepas, tangan kembali dicuci.



### 3.7 Diagram Alir Penelitian

Secara garis besar diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

### **3.8 Analisis Data**

#### **3.8.1 Analisis Uji Kemampuan Absorpsi dari Hidrogel**

Banyaknya air yang terserap pada hidrogel dapat dihitung menggunakan persamaan 2.1.

Selanjutnya dapat dilakukan analisis pengaruh variasi komposisi kitosan – glutaraldehid terhadap kemampuan absorpsi dari hidrogel. Sehingga dapat diketahui komposisi kitosan – glutaraldehid yang dapat menghasilkan hidrogel dengan kemampuan absorpsi terbaik.

#### **3.8.2 Analisis Uji In vivo**

Hasil penelitian dari observasi makroskopis pada fase inflamasi dan fase proliferasi pada proses penyembuhan luka insisi yang telah dilakukan dalam penelitian ini, didapatkan data berbagai variasi pada tingkat percepatan waktu yang diperlukan atau dilalui oleh masing-masing fase dan banyaknya perlakuan dalam proses penyembuhan luka insisi. Untuk mengetahui beda signifikansi waktu dan perlakuan pada fase inflamasi (kemerahan) dan pada waktu fase proliferasi (luka kering, granulasi dan tepi luka menyatu) peneliti melakukan analisis data dengan menggunakan uji *Two Way ANOVA*. Sedangkan fase inflamasi (edema) tidak dapat dilakukan uji statistika karena pada penelitian tidak terjadi edema.

Tujuan dari analisis dua-arah adalah untuk mengestimasi dan membandingkan pengaruh dari berbagai perlakuan yang berbeda-beda terhadap variabel bebas atau variabel respon. Bergantung pada situasi tertentu, kita dapat melakukan pengujian untuk melihat apakah terdapat perbedaan nyata atau signifikan (*significant differences*) pengaruh :

1. Antar-level dari faktor 1
2. Antar-level dari faktor 2
3. Antar-kombinasi faktor 1 dan 2.

Apabila terdapat perbedaan nyata, kita akan mengestimasi seberapa tinggi tingkat perbedaan tersebut dalam kerangka untuk mengetahui apakah ada keuntungan praktik dari perbedaan tersebut. Selanjutnya, kita bisa mengestimasi pengaruh dari perlakuan tertentu terhadap rata-rata (*mean*) respons (variabel bebas), dan kita bisa memprediksikan nilai individu dari variabel respons atau variabel bebas.

Metode yang kita terapkan untuk tujuan tersebut adalah analisis keragaman dua - arah atau analisis keragaman dua-faktor (*two-way analysis of variance or two-factor analysis of variance*). Sebelum lebih lanjut membicarakan analisis tersebut, kita terlebih dahulu lihat dua definisi berikut.

Eksperimen faktorial lengkap (*complete factorial experiment*) bisa dilakukan jika kita memilih sebuah sampel yang berkaitan dengan masing-masing dan setiap perlakuan (yakni kombinasi antar-level dari masing-masing faktor). Apabila ukuran sampel yang diterapkan untuk semua perlakuan adalah sama, maka eksperimen demikian dikategorikan sebagai eksperimen faktorial lengkap seimbang (*balanced complete factorial experiment*).

Anova dua-arah atau dua-faktor harus memenuhi asumsi-asumsi berikut.

- a. Kita melakukan suatu eksperimen faktorial lengkap seimbang (*balanced complete factorial experiment*)



- b. Kita menerapkan rancangan eksperimen acak lengkap (*complete randomized experimental design*), yakni sampel acak bebas dari unit eksperimen dikaitkan pada perlakuan (*treatment*) (Sugiharto S., 2009).
- c. Populasi dari semua nilai yang memungkinkan dari variabel respon berkaitan dengan semua perlakuan terdistribusi secara normal. Semua populasi tersebut memiliki varians yang sama.

Langkah-langkah penyelesaian analisis varian dua arah

1. Penentuan hipotesis nol ( $H_0$ ) baik antar kolom maupun antar baris.
2. Penentuan tingkat signifikansi ( $\alpha$ ).

Tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) yang dipilih adalah 0,05 (5%).

3. Penghitungan jumlah kuadrat antar kolom ( $JK_k$ ).

Dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$JK_k = \sum_{k=1}^K \frac{T_k^2}{n_k} - \frac{T^2}{N}$$

Dimana,

$JK_k$  : jumlah kuadrat antar kolom.

$K$  : kolom (*column*).

$n_k$  : jumlah data dalam masing-masing kolom.

$N$  : jumlah data keseluruhan.

$T_k^2$  : kuadrat jumlah masing-masing kolom.

$T^2$  : kuadrat jumlah keseluruhan.

4. Penghitungan jumlah kuadrat antar baris ( $JK_b$ ).

$$JK_b = \sum_{b=1}^B \frac{T_b^2}{n_b} - \frac{T^2}{N}$$

Dimana,

$JK_b$  : jumlah kuadrat antar baris .

$B$  : baris.

$N_b$  : jumlah data dalam masing-masing baris.

$N$  : jumlah data keseluruhan.

$T_b^2$  : kuadrat jumlah masing-masing baris.

$T^2$  : kuadrat jumlah keseluruhan .

5. Penghitungan jumlah kuadrat keseluruhan ( $JK_t$ ).

$$JK_t = \sum_{b=1}^B \sum_{k=1}^K X_{bk}^2 - \frac{T^2}{N}$$

Dimana,

$JK_t$  : jumlah kuadrat keseluruhan.

$B$  : baris.

$K$  : kolom.

$X_{bk}$  : data dalam baris-b dan kolom-k.

$N$  : jumlah data keseluruhan.

$T^2$  : kuadrat jumlah keseluruhan.

6. Penghitungan jumlah kuadrat kesalahan (galat atau error).

$$JK_e = JK_t - (JK_k + JK_b)$$

Dimana

$JK_e$  : jumlah kuadrat galat.

$JK_t$  : jumlah kuadrat kesleuruhan.

$JK_k$  : jumlah kudrat kolom.

$JK_b$  : jumlah kuadrat baris.

7. Penghitungan derajat bebas.

a. Derajat bebas kolom ( $db_k$ ).

$db_k = k - 1$  dimana  $k$  adalah jumlah kolom.

b. Derajat bebas baris ( $db_b$ ).

$db_b = b - 1$  dimana  $b$  adalah jumlah baris.

c. Derajat bebas galat atau eror ( $db_e$ ).

$db_e = (b - 1)(k - 1)$  dimana  $k$  adalah jumlah kolom dan  $b$  adalah jumlah baris.

d. Derajat bebas keseluruhan ( $db_t$ ).

$db_t = N - 1$  dimana  $N$  adalah keseluruhan data ( $b \times k$ ).

8. Penghitungan kuadrat rata-rata.

a. Kuadrat rata-rata kolom ( $KR_k$ ).

$$KR_k = \frac{JK_k}{db_k}$$

b. Kuadrat rata-rata baris ( $KR_b$ ).

$$KR_b = \frac{JK_b}{db_b}$$

c. Kuadrat rata-rata galat ( $KR_e$ ).

$$KRe = \frac{JK_e}{db_e}$$

9. Penghitungan rasio F atau F-hitung.

a. F-hitung kolom (F-h<sub>k</sub>).

$$F-h_k = \frac{KR_k}{KR_e}$$

b. F-hitung baris (F-h<sub>b</sub>).

$$c. F-h_b = \frac{KR_b}{KR_e}$$

### 3.9 Penanganan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian hewan coba mencit. Peneliti melakukan penelitian dengan memegang berbagai prinsip etika penelitian hewan coba yaitu hewan coba yang telah selesai digunakan sebagai subyek penelitian harus dimusnahkan yaitu dibunuh, tidak boleh digunakan sebagai hewan peliharaan maupun dikonsumsi. Hewan di laboratorium harus menerima setiap pertimbangan untuk kenyamanannya; mereka harus dikandangkan dengan benar, diberi pakan dan lingkungannya harus tetap dalam kondisi sehat. Selain itu, pemberian anestesi yang benar harus digunakan untuk mengeliminasi sensibilitas atas nyeri selama seluruh prosedur bedah. Perawatan pasca operasi hewan harus sedemikian rupa untuk meminimumkan ketidaknyamanan dan nyeri dan selalu setara dengan praktik yang dapat diterima di sekolah kedokteran hewan.