

**TERAPI SALEP EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle*  
Linn.) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN JUMLAH SEL  
RADANG PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL  
LUKA INSISI YANG DIINFEKSI *Methicillin-*  
*Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**DUANTI RAHMA FARDILA**  
**145130100111024**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



**TERAPI SALEP EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle*  
Linn.) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN JUMLAH SEL  
RADANG PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL  
LUKA INSISI YANG DIINFEKSI *Methicillin-*  
*Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**DUANTI RAHMA FARDILA**

**145130100111024**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**TERAPI SALEP EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle* Linn.)  
TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN JUMLAH SEL RADANG  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL LUKA INSISI  
YANG DIINFEKSI DENGAN *Methicillin-Resistant*  
*Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**Oleh :**

**DUANTI RAHMA FARDILA**

**145130100111024**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 2 Agustus 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Sri Murwani, drh., MP**  
NIP. 19630101 198903 2 001

**drh. Dahliatul Qosimah, M. Kes**  
NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 00



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah:

Nama : Duanti Rahma Fardila  
NIM : 145130100111024  
Program Studi : Fakultas Kedokteran Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

**Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Jumlah Sel Radang Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi Yang Diinfeksi dengan Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.
3. Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 Juli 2018

Yang menyatakan,

**Duanti Rahma Fardila**  
NIM. 145130100111024

**Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Jumlah Sel Radang Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi Yang Diinfeksi dengan Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**ABSTRAK**

Infeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang bersifat *multi drug resistant* pada luka dapat memperpanjang fase inflamasi dari kesembuhan luka dengan meningkatnya jumlah sel radang dan sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$ . Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) diketahui memiliki aktivitas dalam penyembuhan luka, antiinflamasi dan antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi bakteri MRSA. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan tikus jantan BB 150 g dengan umur 8 minggu yang dibagi dalam lima kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (perlakuan luka insisi tanpa infeksi dengan terapi standar luka), kontrol positif (perlakuan luka insisi diinfeksi MRSA dengan terapi salep plasebo), perlakuan 1, 2, dan 3 dilakukan luka insisi diinfeksi MRSA dengan terapi salep ekstrak daun sirih hijau masing masing konsentrasi 2.5%, 5% dan 7.5%. Pengamatan TNF- $\alpha$  menggunakan metode IHK, sedangkan jumlah sel radang menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Analisis data menggunakan uji ANOVA satu arah tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan terapi salep ekstrak daun sirih hijau dengan konsentrasi 7.5% merupakan konsentrasi terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi salep ekstrak daun sirih hijau mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi bakteri MRSA.

Kata Kunci : *Luka infeksi, MRSA, Daun Sirih Hijau, TNF- $\alpha$ , Sel radang.*

***Piper betle* Linn. Leaves Extract Ointment Therapy on The Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and Inflammatory Cells in Rat with Incision Wound Infected by *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**ABSTRACT**

*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) infection which is a multi-drug resistant bacteria in a wound can prolonged inflammation phase by increased inflammatory cells and pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ . *Piper betle* Linn. is known with its activity in wound healing, anti-inflammatory and antibacterial. The aim of this study was finding out whether *Piper betle* Linn. leaves extract ointment therapy is able to decrease TNF- $\alpha$  expression and inflammatory cells in wistar rat (*Rattus norvegicus*) with incision wound infection by MRSA. This study is experimental by using Completely Randomized Design (CRD) with male rats weighing 150 g and 8 weeks old divided into five treatment groups, negative control (rat with incision wound without MRSA infection and wound standart therapy), positive control (rat with incision wound infected with MRSA and placebo ointment therapy), 1, 2, and 3 group were rat with incision wound and infected with MRSA and treated with *Piper betle* Linn leaves extract ointment topically with concentration 2.5%, 5 % and 7.5% for 7 days. TNF- $\alpha$  level was measured by immunochemistry method, while inflammatory cells was counted by Hematoxylene-Eosin (HE) staining. Data analysis was performed using one way ANOVA test with 95% confidence level (P <0,05). The research proves that *Piper betle* Linn. leaves extract ointment 7.5% therapy is effective in decreasing TNF- $\alpha$  expression and inflammatory cells. The conclusion from this research is *Piper betle* Linn. leaves extract ointment is able to decrease TNF- $\alpha$  expression and inflammatory cells in wound healing infected by MRSA.

Key words : *Infected wound, MRSA, Piper betle Linn., TNF- $\alpha$ , Inflammatory cells.*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan SKRIPSI ini yang berjudul **“Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* Linn.) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Jumlah Sel Radang Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Luka Insisi Yang Diinfeksi dengan *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA)”**. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, halangan dan rintangan terus menerus terjadi pada diri penulis, sehingga dalam penulisannya melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP. selaku pembimbing I dan drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan dengan sabar kepada penulis.
2. drh. Albiruni Haryo M.Sc dan drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas KedokteranHewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
4. Orang tua yang penulis cintai, Edi Sutjahjono dan Tuti Riyani serta kakak yang penulis banggakan Damanti Cahya Fahria yang begitu ikhlas menyayangi, memberikan semangat, doa dan dukungan yang tak terhingga

kepada penulis selama menempuh kuliah di Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya Malang

5. Sahabat dalam penelitian skripsi Athifah Royani Ma'sum, Aulia Rahadian,  
dan Desrizal Wildan Al-Kindy teman seperjuangan melaksanakan  
penelitian atas segala dukungan, semangat dan motivasi.
6. Kepada keluarga besar FKH UB 2014 A "Amaze" yang telah memberikan  
dukungan dan semangat yang tiada hentinya selama 4 tahun ini.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan  
semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis  
dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT meridhoi dan dicatat  
sebagai ibadah disisi-Nya, Amin.

Malang, 16 Juli 2018

Duanti Rahma Fardila

NIM. 145130100111024



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Luka.....	7
2.2 Fase Kesembuhan Luka .....	8
2.3 Jaringan Kulit .....	13
2.4 Luka Infeksi.....	16
2.5 <i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.6 <i>Tumor Necrosis Factor (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	20
2.7 Sel Rada pada Penyembuhan Luka .....	20
2.8 Daun Sirih Hijau ( <i>Piper betle</i> L.).....	22
2.9 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	25
2.10 Salep .....	27
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	29
3.2 Hipotesa Penelitian .....	32
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	33
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	33



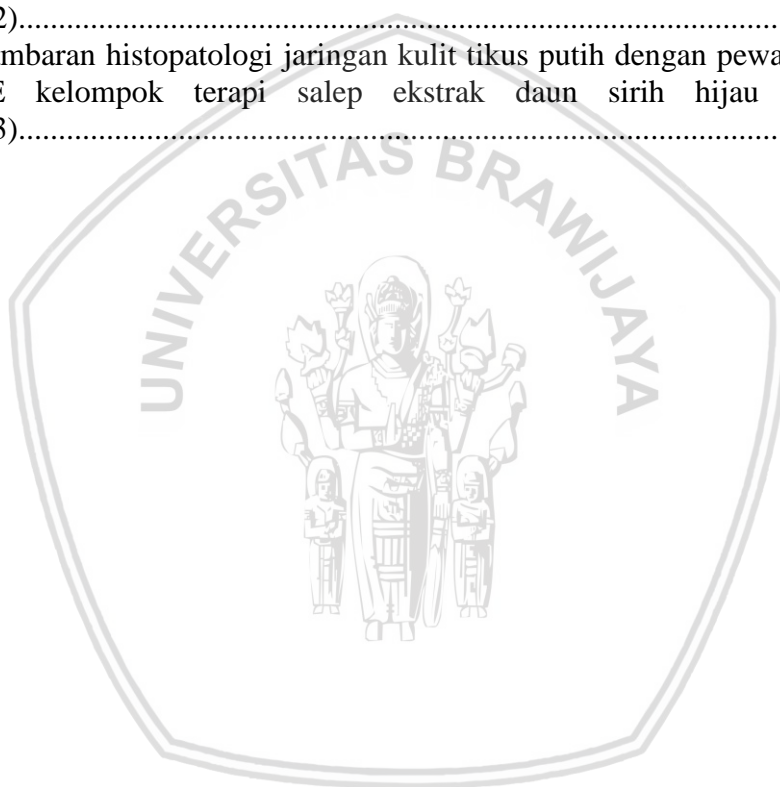
4.3 Tahapan Penelitian .....	35
4.4 Rancangan Penelitian .....	34
4.5 Variabel Penelitian .....	36
4.6 Prosedur Kerja.....	37
4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....	37
4.6.2 Pembuatan Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau .....	38
4.6.3 Pembuatan suspensi bakteri.....	38
4.6.4 Pembuatan Luka Infeksi pada Tikus .....	39
4.6.5 Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau .....	39
4.6.6 Pengambilan Jaringan Kulit .....	39
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit.....	40
4.6.8 Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan metode Imunohistokimia (IHK).....	42
4.6.9 Analisis Data .....	43
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Efek Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) terhadap Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- $\alpha$ ) pada Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Luka Insisi yang Diinfeksi <i>Methicillin</i> <i>Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....	49
5.2 Efek Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) terhadap Jumlah Sel Radang pada Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Luka Insisi yang Diinfeksi <i>Methicillin Resistant Staphylo</i> <i>coccus aureus</i> (MRSA).....	57
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1 Kesimpulan.....	66
6.2 Saran.....	66
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>67</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>72</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur Lapisan Kulit.....	14
2.2. Tanaman Sirih ( <i>Piper betle</i> Linn.).....	23
2.3. Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	26
3.1 Kerangka Konsep.....	30
5.1 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka insisi kelompok kontrol negatif (K-)......	47
5.2 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok kontrol positif(K+)......	48
5.3 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1)......	48
5.4 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2)......	48
5.5 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3)......	49
5.6 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang dari kulit tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pasca luka insisi kelompok kontrol negatif (K-)......	50
5.7 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang dari kulit tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pasca luka insisi kelompok kontrol positif (K+)......	50
5.8 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang dari kulit tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1)......	51
5.9 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang dari kulit tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2)......	51
5.10 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang dari kulit tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3)......	51



5.11	Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok kontrol negatif (K-)	59
5.12	Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok kontrol positif (K+)	59
5.13	Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1)	60
5.14	Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2)	60
5.15	Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3)	60



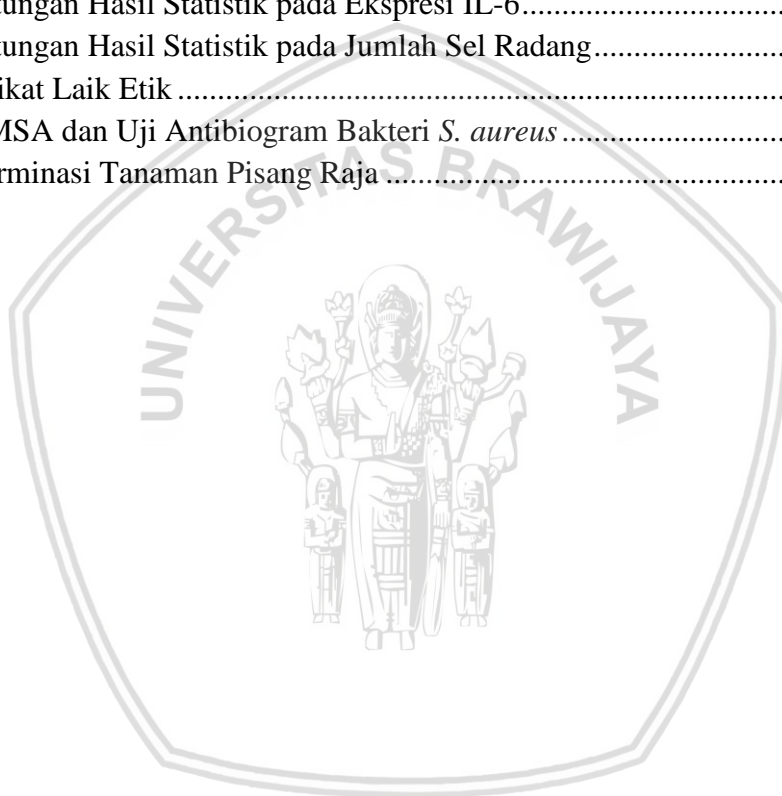
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1. Rancangan Penelitian .....	37
5.1 Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Kulit Luka Infeksi MRSA dan Hasil Uji BNJ ( $\alpha=0.05$ ).....	56
5.1 Rata-rata Jumlah Sel Radang pada Kulit Luka Infeksi MRSA dan Hasil Uji BNJ ( $\alpha=0.05$ ).....	65



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian .....	57
2. Perhitungan Konsentrasi Salep Ekstrak Kulit Pisang Raja .....	58
3. Perhitungan Volume Obat Anestesi .....	59
4. Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Raja.....	60
5. Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan.....	61
6. Pembuatan Imunohistokimia Ekspresi IL-6 .....	62
7. Perhitungan Hasil Statistik pada Ekspresi IL-6.....	63
8. Perhitungan Hasil Statistik pada Jumlah Sel Radang.....	66
9. Sertifikat Laik Etik .....	69
10. Uji MSA dan Uji Antibiogram Bakteri <i>S. aureus</i> .....	70
11. Determinasi Tanaman Pisang Raja .....	71



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: persen
±	: plus-minus
μL	: mikroliter
ADP	: <i>adenosine diphosphate</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: Association of Analytical Communities
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
C5a	: <i>Complement componen 5a</i>
CAMRSA	: <i>Community associated methicillin resistant staphylococcus aureus</i>
CD	: <i>Cluster of Diferentiation</i>
CFU	: <i>colony-forming unit</i>
DAB	: <i>Diamano Benzidine</i>
DNA	: <i>deoxybonucleic acid</i>
ECM	: <i>extraceluller matrix</i>
FGF	: <i>fibroblas growth factor</i>

GAG	: <i>glycosaminoglican</i>
GAG	: <i>glycosaminoglycan</i>
HAMRSA	: <i>Hospital associated methicillin resistant staphylococcus aureus</i>
HCL	: <i>Hydrochloric</i>
HE	: <i>Hematoksilin Eosin</i>
ICAM	: <i>intercellular adhesion moleculer</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
IL	: <i>interleukin</i>
LPS	: <i>lipopolisakarida</i>
MCP-1	: <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
mg/kgBB	: <i>miligram per kilogram berat badan</i>
ml	: <i>mililiter</i>
MMP	: <i>matrix metalloproteinase</i>
MRSA	: <i>methicillin-resistant staphylococcus aureus</i>
NA	: <i>Nutrient agar</i>
NaCl	: <i>Natrium klorida</i>



NB	: <i>Nutrient broth</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
°C	: derajat celcius
PBP2a	: <i>penicillin-binding protein 2a</i>
PBS	: <i>phospat buffer saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PF3	: <i>platelet factor 3</i>
PGE2	: <i>Ptostaglandin E2</i>
pH	: <i>power oh hidrogen</i>
PMN	: <i>polimorfonuklear</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	: <i>reactive oxygen space</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horrse Peroxidase</i>
TGF- $\beta$	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Luka merupakan suatu kondisi dimana kulit mengalami kerusakan pada komponen jaringannya. Luka dapat disebabkan oleh mikroba, trauma mekanik, kimia atau suhu yang mengenai jaringan sehingga mengakibatkan terbakarnya atau hancurnya kulit serta ketidakseimbangan fungsi dan anatomi kulit (Mercandetti *and* Cohen, 2002). Luka dapat diklasifikasikan berdasar struktur anatomis, sifat, proses penyembuhan serta lama penyembuhan. Luka insisi merupakan salah satu jenis luka terbuka yang sengaja dibuat dalam tindakan pembedahan atau operasi. Tubuh akan merespon luka melalui proses peradangan dengan karakteristik tumor, rubor, dolor, calor serta functio laesa (Stankov, 2012). Proses penyembuhan luka yang lama dapat disebabkan oleh terjadinya suatu komplikasi yang menimbulkan berbagai dampak negatif.

Penyembuhan luka merupakan proses yang berkesinambungan antara sel inflamasi, epitel, endotel, trombosit dan fibroblas yang berinteraksi untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Proses penyembuhan luka terdiri dari tiga fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase *remodelling*. Mediator kimiawi akan dilepaskan oleh sel imunitas sebagai respon adanya kerusakan jaringan yang berupa kemoatraktan dan sitokin. Sitokin yang diproduksi sebagai respon antigen dan mikroba maupun inflamasi meliputi TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 dan TGF- $\beta$  yang akan bekerja dengan faktor pertumbuhan seperti PDGF dan FGF (Mercandetti *and* Cohen, 2002). *Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) merupakan salah satu sitokin yang bersifat pro-inflamasi, berperan penting dalam respon imun serta proses

apoptosis. TNF- $\alpha$  memiliki efek yang menguntungkan pada konsentrasi rendah, tetapi pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan inflamasi yang berlebih dan kerusakan jaringan (Enoch *and* John 2008).

Penyembuhan luka insisi dapat terhambat apabila terjadi penurunan dari kemampuan alami jaringan untuk memperbaiki diri dan didukung dengan penanganan luka yang kurang baik. Salah satu komplikasi pada penyembuhan luka insisi dapat berupa terjadinya infeksi. Hilangnya integritas kulit saat mengalami luka terutama jenis luka insisi, menyebabkan terjadinya perubahan struktur dan fungsi normal dari jaringan sehingga mendukung terjadinya infeksi bakteri pada luka (Enoch *and* John 2008). Luka yang terinfeksi oleh bakteri akan menunjukkan gejala kemerahan, bengkak serta menghasilkan pus atau nanah. *Staphylococcus aureus* merupakan organisme yang paling umum diisolasi dari luka akut atau kronis dari bermacam-macam etiologi (Pastar, *et al.*, 2013). *Saphylococcus aureus* diketahui mampu beradaptasi dengan cepat terhadap antibiotik selektif, sehingga menghasilkan kemunculan dan penyebaran *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang bersifat *multi drug resistant*. Luka infeksi MRSA menjadi salah satu masalah yang penting di dunia kedokteran hewan beberapa tahun terakhir. Menurut Middleton (2005), 14% dari 65 pasien pada tujuh rumah sakit hewan di US mengalami luka infeksi MRSA. Hewan dapat terinfeksi MRSA melalui manusia yang terinfeksi MRSA ataupun sebaliknya, sedangkan tingkat prevalensi infeksi MRSA pada manusia sendiri adalah 30% hingga 70% (Stacey, *et al.*, 2010). Toksin yang dihasilkan oleh bakteri MRSA dapat menghambat proses fagositosis oleh makrofag pada fase

inflamasi sehingga memperlambat proses inflamasi dan menghambat proses penyembuhan luka (Foster, 2005).

Proses penyembuhan luka insisi yang terinfeksi bakteri MRSA biasa ditangani dengan antiseptik dan antibiotik. Antiseptik dan antibiotik yang digunakan dapat berupa obat kimia ataupun obat herbal alami. Antiseptik luka yang sering digunakan adalah *povidone iodine*, sedangkan antibiotik yang biasa digunakan adalah antibiotik topikal seperti mupirocin. Penggunaan *povidone iodine* memiliki beberapa efek samping seperti menimbulkan iritasi kulit, reaksi alergi (kemerahan, bengkak dan gatal pada kulit) (Murthy and Krishnamurthy, 2007), sedangkan penggunaan antibiotik topikal seperti mupirocin diketahui sudah tidak efektif terhadap luka infeksi MRSA (Rakshit and Shenoy, 2017), sehingga dibutuhkan adanya obat alternatif topikal untuk menangani luka infeksi, khususnya akibat MRSA. Pengobatan alternatif pada luka yang banyak dikembangkan saat ini adalah obat herbal alami mengingat bahwa Indonesia memiliki 25.000-30.000 jenis tanaman dan sekitar 6.000 diantaranya memiliki potensi untuk dijadikan tanaman obat, salah satunya adalah Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) (Kardono *et al.*, 2003).

Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) merupakan salah satu tanaman obat Indonesia yang memiliki banyak khasiat. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) memiliki beberapa aktivitas seperti anti kanker, anti alergi, anti malaria, anti filarial, anti bakteri, anti fungal, insektisida, anti oksidan, anti diabetik, gastro-protektan serta aktivitas penyembuhan luka. Kandungan Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) terdiri dari

tanin, fenol, saponin serta flavonoid yang berperan dalam proses penyembuhan luka melalui aktivitas antimikroba serta anti inflamasi yang dapat mempercepat epitelisasi dan penyambungan luka (Rekha, et al., 2014; Shetty dan Vijayalaxmi, 2012; Palumpun, dkk., 2017; Wardani, 2009).

Berdasarkan latar belakang yang disebutkan, penelitian ini berpotensi untuk mengetahui efek dari salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) yang sebagai penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA sehingga diharapkan dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang untuk membantu mempercepat proses penyembuhan luka insisi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa rumusan masalah yang didapat antara lain yaitu :

- 1) Apakah terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
- 2) Apakah terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain *wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-

180 gram (Kumar, *et al.*, 2013). Tikus diperoleh dari Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya dengan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang.

- 2) Luka insisi dibuat dengan menginsisi pada daerah punggung pada *midline* sepanjang 4 cm dengan kedalaman hingga subkutan (Kumar, *et al.*, 2013).
- 3) Luka diinfeksi menggunakan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* ( $10^5$  CFU/ml) sebanyak 30 $\mu$ l dengan meneteskan bakteri pada luka (Santana, *et al.*, 2015).
- 4) Daun Sirih Hijau yang digunakan adalah daun muda dengan karakteristik warna hijau yang lebih terang (Nanayakkara, *et al.*, 2014).
- 5) Pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) dengan bahan dasar vaselin album yang diberikan dengan konsentrasi berbeda yaitu 2.5%, 5% dan 7.5% sebanyak dua kali sehari selama 7 hari pasca perlakuan.
- 6) Pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan metode IHK (Susanto, dkk., 2012).
- 7) Pengamatan jumlah sel radang menggunakan pewarnaan *Hematosin Eosin* (Nilugal, *et al.*, 2015).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa tujuan dari penelitian ini antara lain yaitu :

- 1) Mengetahui apakah terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
- 2) Mengetahui apakah terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi serta dasar bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle Linn.*) terhadap luka insisi yang diinfeksi MRSA hewan tikus putih (*Rattus norvegicus*).

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Luka

Luka adalah kondisi dimana terjadi kerusakan pada jaringan tubuh. Kerusakan jaringan tubuh tersebut dapat terjadi pada jaringan kulit, membran mukosa, tulang atau organ tubuh lain. Kontinuitas serta fungsi normal dari jaringan akan mengalami perubahan ketika terjadi luka (Enoch *and* John, 2008).

Luka dapat diklasifikasikan berdasar lama proses penyembuhannya yaitu luka akut dan luka kronis (Orsted, *et al.*, 2010). Luka akut merupakan luka yang proses penyembuhannya teratur dan tepat waktu, sehingga integritas anatomi dan fungsional dari jaringan kembali normal seperti semula dalam waktu yang cepat. Luka akut dapat disebabkan oleh pemotongan atau bedah sayatan. Luka kronis merupakan luka yang proses penyembuhannya berlangsung lama dan dari proses perbaikan lukanya tidak menghasilkan integritas anatomi serta fungsi jaringan yang baik seperti semula dan termasuk kedalam keadaan patologis. Luka kronis dapat disebabkan karena adanya infeksi lokal, hipoksia, trauma serta gangguan sistemik lain seperti diabetes melitus atau malnutrisi (Menke, *et al.*, 2007). Menurut Sutawijaya (2009) luka juga dapat diklasifikasikan berdasar dari kondisi luka sendiri, yaitu luka tertutup dan luka terbuka. Luka tertutup merupakan luka yang tidak diikuti dengan rusaknya jaringan kulit sehingga darah yang keluar dari sistem peredaran darah masih tetap berada di dalam tubuh. Jenis luka ini disebabkan oleh kontak dari benda tumpul. Contoh dari luka jenis ini adalah luka memar dan hematoma. Luka terbuka merupakan luka yang diikuti dengan rusaknya jaringan kulit atau dibawah kulit. Penyebab dari luka terbuka adalah kontak dari



benda tajam, tembakan atau benturan keras dari benda tumpul. Contoh dari luka terbuka antara lain luka sayat (*Vulnus scisum*), luka robek (*Vulnus traumaticus*), luka lecet (*Eksoriasi*), luka gigitan (*Vulnus marsum*), luka bacok (*Vulnus caesum*), luka tembak (*Vulnus sclopetimus*), luka bakar dan luka hancur (*Vulnus lacerum*) (Sutawijaya, 2009).

## 2.2 Fase Kesembuhan Luka

### 2.2.1 Fase Homeostasis

Hemostasis adalah proses fisiologis yang dilakukan oleh tubuh untuk menghentikan perdarahan pada lesi vascular (Colman, *et al.*, 2001). Fase homeostasis melibatkan peranan dari platelet (trombosit) dan fibrin. Respon awal dari luka oleh pembuluh darah adalah terjadinya vasokonstriksi. Vasokonstriksi akan memperlambat aliran darah melalui defek sehingga dapat memperkecil kehilangan darah. Platelet atau trombosit akan teraktivasi dan melekat pada kolagen sehingga membentuk gumpalan atau plug pada pembuluh darah yang rusak dibawah pengaruh dari *adenosine diphosphate* (ADP). Permukaan trombosit yang terdapat di sekitar akan melekat pada permukaan trombosit lainnya sehingga terbentuk agregasi dari trombosit. Agregasi trombosit ini akan semakin banyak akibat trombosit yang melekat akan lebih banyak melepaskan ADP sehingga terbentuk sumbat trombosit. Proses agregasi trombosit tersebut mengeluarkan faktor yang berinteraksi dan menstimulasi produksi dari trombin yaitu *Platelet Factor 3* (PF3). PF3 akan mengaktifkan promtrombin yang kemudian akan mengaktifkan trombin. Trombin selanjutnya akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin serta mengaktifkan faktor XIII yang mengubah fibrin. Fase hemostasis

berlangsung 5-10 menit setelah luka terjadi apabila tidak memiliki gangguan dalam pembekuan darah (Orsted, *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Fase Inflamasi

Proses penyembuhan terjadi sejak awal pada saat terjadi luka, fase inflamasi terjadi pada hari 0-5. Fase ini dimulai dengan terjadinya vasodilatasi kapiler akibat stimulasi dari saraf sensoris (*Local Sensory Nerve Endding*), *Local Reflex Action* serta adanya substansi vasodilator yang dihasilkan oleh sel mast di permukaan endotel (histamin, bradikinin, serotonin dan sitokin). Peningkatan permeabilitas vena yang disebabkan oleh histamin serta pembentukan kinin dan prostaglandin oleh sel mast menyebabkan daerah luka dialiri oleh cairan plasma yang keluar dari pembuluh darah dan terbentuklah edema jaringan (Orsted, *et al.*, 2011).

Mediator inflamasi seperti prostaglandin, interleukin-1 (IL1-1), tumor necrosis factor (TNF), C5a, TGF- $\beta$  serta produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) menarik leukosit berpindah menuju jaringan yang luka melalui proses aktif diapedesis. Selectin memediasi penempelan leukosit pada sel endotel yang melapisi kapiler. Integrin pada permukaan leukosit dengan *intercellular adhesion moleculer* (ICAM) pada sel endotel menyebabkan perlekatan leukosit tersebut semakin erat. Leukosit kemudian berpindah secara aktif dari sel endotel menuju jaringan luka. Migrasi leukosit terutama neutrofil ke luka juga disebabkan oleh stimulasi dari agen kemotaktik seperti produk bakteri, *complement factor*, histamin, PGE2, leukotriene serta *platelet derived growth factor* (PDGF) (Lawremce, 2002). Peningkatan leukosit polimorfonuklear (PMN)

terutama neutrofil terjadi pada jam ke 24-48 pasca terjadinya luka. Neutrofil melakukan fagositosis organisme-organisme patologis dan jaringan yang mati. Neutrofil juga mengeluarkan protease yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler yang tersisa. Bila tidak terjadi infeksi, neutrofil akan difagositosis oleh makrofag atau mati dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga (Kresno, 2003).

Makrofag muncul pada 48-96 jam setelah terjadi luka melalui mediasi *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) dan mencapai puncak pada hari ke-3. Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap ada di dalam luka hingga proses penyembuhan berjalan sempurna. Makrofag seperti halnya neutrofil, melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis serta mensekresi proteinase yang berfungsi dalam degradasi matriks ekstraseluler (ECM). Makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan dibantu oleh *Natural Killer* (NK) yang teraktivasi dari hasil pelepasan IL-12 oleh makrofag yang juga menghasilkan  $CD8^+$  (Leong and Phillips, 2012). Limfosit T akan muncul secara signifikan pada hari ke-5 dan mencapai puncak pada hari ke-7. Limfosit akan menghasilkan sitokin seperti IL-2 serta fibroblast activating factor dan interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  akan menstimulasi makrofag dalam sintesis sitokin seperti IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Leong and Phillips, 2012).

Neutrofil dan makrofag dalam eliminasi bakteri tidak hanya melalui proses fagositosis, keduanya memproduksi *reactive oxygen species* (ROS). ROS memiliki sifat radikal bebas yang berperan penting dalam mencegah terjadinya infeksi bakteri. Tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan berpengaruh

buruk bagi jaringan dikarenakan dapat terjadi induksi kerusakan sel tubuh lainnya serta aktivasi dan dipertahankannya kaskade asam arakidonat. Kaskade asam arakidonat yang dipertahankan dapat memperpanjang proses inflamasi dengan memicu ulang terbentuknya mediator inflamasi (Leong and Phillips, 2012).

### 2.2.3 Fase Proliferatif

Fase ini terjadi pada hari ke-3 hingga hari ke-14. Fase ini terjadi penurunan jumlah dari sel inflamasi, tanda inflamasi serta adanya sel fibroblast yang berproliferasi, angiogenesis, epitelisasi dan kontraksi luka. Matriks fibrin yang didominasi platelet dan makrofag akan digantikan oleh jaringan granulasi yang menandakan terjadinya fase proliferasi. Jaringan granulasi tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskuler (Gurtner, 2007). Makrofag dan sel endotel yang sebelumnya mengisi matriks fibrin memproduksi *growth factor* seperti PDGF dan TGF- $\beta$ . *Growth factor* mengaktivasi fibroblast untuk bermigrasi ke daerah luka, berproliferasi dan membentuk matriks ekstraseluler. Fibroblas saat melakukan migrasi akan memecah matriks fibrin yang menghalangi migrasi dan menggantikannya dengan *glycosaminoglycan* (GAG) melalui produksi matriks *mettaloproteinase* (MMP). Fungsi utama dari fibroblas adalah sintesis kolagen yang merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler. Kolagen tipe III dan fibronectin diproduksi oleh fibroblast pada minggu pertama dan kemudian kolagen tipe III akan digantikan oleh kolagen tipe I pada fase maturasi (Schultz, 2007).

Faktor proangiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblas growth factor* (FGF), *angiopoietin-1* serta *thrombospondin* yang dihasilkan oleh makrofag kemudian menstimulasi sel endotel membentuk neovaskular melalui proses angiogenesis (Gurtner, 2007). Sel endotel yang terpapar berbagai substansi pasca terjadinya luka menjadi aktif dan mendegradasi membran basal dari vena menyebabkan terjadinya migrasi sel ke daerah luka melalui celah tersebut. Migrasi sel endotel tersebut diatur oleh *fibroblas growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) serta *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF-  $\beta$ ). Sel endotel kemudian akan melakukan pembelahan sehingga terbentuk lumen dan deposisi dari membran basal kemudian akan membentuk maturasi kapiler (Gurtner, 2007).

Epitelisasi yang merupakan proses pembentukan kembali lapisan kulit yang rusak juga terjadi pada fase proliferasi. Epitelisasi dimulai dari proliferasi keratinosit pada tepi luka setelah terjadi kontak dengan matriks ekstraseluler. Keratinosit kemudian migrasi dari membran basal menuju permukaan yang baru terbentuk (Schultz, 2007). Kontraksi luka merupakan gerakan centripetal dari tepi luka menuju arah tengah luka. Kontraksi ini didominasi oleh myofibroblast. Sel tersebut berasal dari fibroblast normal yang mengandung mikrofilamen pada sitoplasmanya (Leong and Phillips, 2012). Proses kontraksi luka ini bertujuan untuk menarik tepi luka untuk mengurangi kecacatan pada jaringan epitel

#### **2.2.4 Fase Maturasi**

Fase ini dimulai pada hari ke-21 hingga 1 tahun setelah perlukaan. Fibroblas sudah mulai meninggalkan jaringan granulasi, warna kemerahan dari

jaringan mulai berkurang karena pembuluh darah mulai regresi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat jaringan parut. Proses ini didasari dengan pergantian kolagen tipe III menjadi kolagen tipe I (Lawrence, 2002).

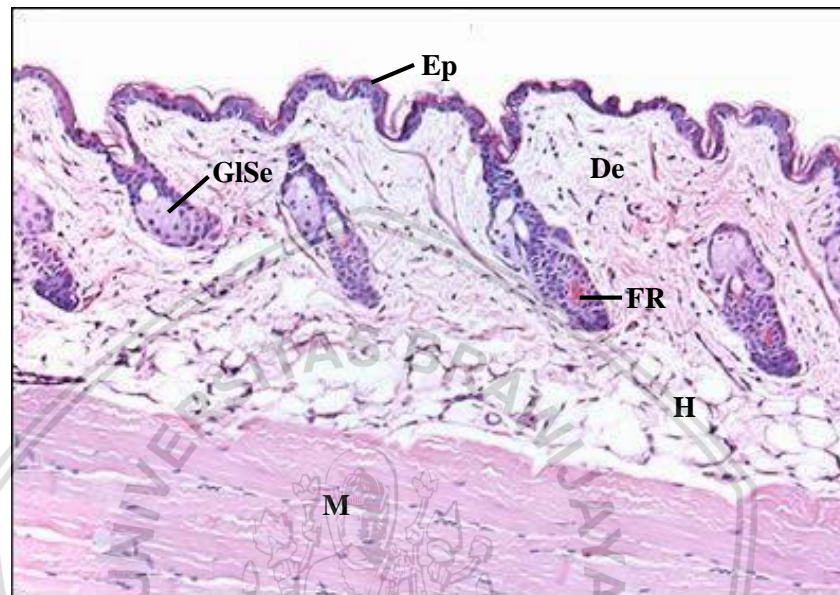
## **2.3 Jaringan Kulit**

### **2.3.1 Fungsi Kulit**

Kulit merupakan suatu jaringan pembungkus seluruh permukaan luar tubuh yang membentuk 15% berat badan total (Gibson, 2002). Kulit memiliki fungsi utama yaitu proteksi, sensasi, regulasi suhu, penyimpanan, ekskresi serta sintesis dari Vitamin D. Kulit merupakan komponen imun non spesifik yang membantu untuk melindungi tubuh dari patogen. Mekanisme imun non spesifik dari kulit memobilisasi imunitas tubuh dengan cepat termasuk keratinosit, neutrofil, sel mast, eosinofil dan makrofag. Reseptor merupakan komponen yang penting bagi imun non spesifik dalam mengenali mikroorganisme dan menginisiasi respon imun tubuh. Sel imun non spesifik dari kulit akan mengekspresikan berbagai macam dari *pattern recognition receptors* (PRRs) seperti *Toll-like receptors* (TLRs) dan *mannose* yang diaktifkan oleh komponen mikroba patogen. PRR tersebut spesifik untuk *pathogeneassociated molecular patterns* (PAMPs) yang relatif tidak berubah dalam kelas tertentu dari suatu mikroorganisme. Pengenalan PAMPs oleh PRRs menginisiasi dengan cepat fagositosis, produksi senyawa antimikroba dan mediator inflamasi sehingga mikroba dapat inaktif atau mati (Pivarcsi, 2005).

### 2.3.2 Struktur Lapisan Kulit

Struktur kulit tersusun atas 3 lapis yaitu lapisan epidermis, dermis, hipodermis (subkutan) **Gambar 2.1**.



**Gambar 2.1** Struktur lapisan kulit tikus. Ep= Epidermis; De= Dermis; GSe= Glandula Sebacea; FR= Foliker rambut; H= Hipodermis; M= Muskulus (Treuting, *et al.*, 2017).

#### 1. Epidermis

Epidermis adalah lapisan terluar kulit yang terdiri dari epitel berlapis kompleks, bertanduk (kornifikasi), mengandung sel melanosit, lagerhans dan sel merkel. Fungsi utamanya adalah sebagai proteksi barier, organisasi sel, pembelahan dan mobilisasi sel, pigmentasi (melanosit) dan pengenalan alergen (sel lagerhans) (Perdanakusuma, 2007). Epidermis memiliki melanosit yang akan memberikan warna pada kulit. Fungsi pada lapisan epidermis adalah melindungi dari masuknya bakteri, toksin, untuk keseimbangan cairan yaitu menghindari pengeluaran cairan secara berlebihan (Suriadi, 2004).

Epidermis terdiri atas beberapa lapisan sebagai berikut:

- A. *Stratum Basale (Stratum Germinativum)*, merupakan lapisan terbawah dari epidermis yang terletak pada perbatasan lapisan dermis dan epidermis. Lapisan ini berfungsi memisahkan kedua lapisan tersebut. Sel-sel melanosit yang membentuk pigmen melanin juga terdapat pada lapisan ini.
- B. *Stratum Spinosum*, terdiri atas sel poligonal dengan inti ditengah yang berbentuk oval dan sitoplasma dengan tonjolan yang terisi dengan berkas filamen. Setiap sel berisi filamen-filamen yang terdiri atas serabut protein.
- C. *Stratum Granulosum*, tersusun oleh epitel skuamus stratified dan sel-sel keratinosit yang berbentuk poligonal, berbutir kasar dan berinti mengkerut.
- D. *Stratum lusidum*, tersusun atas lapisan transparan dari sel mati yang berfungsi sebagai barrier.
- E. *Stratum Corneum*, mengandung sel tanduk pipih tanpa inti dengan sitoplasma terisi oleh skleroprotein filamentosa “*Birefringent*” keratin, yaitu jenis protein yang tidak larut dalam air dan sangat resisten terhadap bahan-bahan kimia. Hal tersebut berkaitan dengan fungsi kulit sebagai proteksi tubuh dari pengaruh luar.

## 2. Dermis atau Korium

Dermis atau Korium adalah lapisan tebal jaringan ikat tempat melekatnya epidermis. Dermis terletak dibawah epidermis dan dibatasi oleh lamina basalis. (Perdanakusuma, 2007). Fungsi utamanya sebagai penyokong epidermis. Lapisan dermis strukturnya lebih kompleks dan terdapat dua lapisan bagian stratum papilaris dan bagian dalam stratum retikularis.



Stratum papilaris tersusun lebih longgar dan ditandai dengan adanya papila dermis. Papila dermis lebih banyak dan lebih dalam pada daerah yang memiliki tekana paling besar, seperti telapak kaki. Papila mengandung pembuluh-pembuluh kapiler yang memberikan nutrisi pada epitel. Badan Meissner yang merupakan badan akhir saraf sensoris juga terdapat di beberapa papila lainnya (Kalangi, 2013).

Stratum retikularis merupakan lapisan yang lebih tebal dan dalam. Lapisan ini mengandung serat kolagen yang berfungsi sebagai pengait kulit dengan jaringan subkutan. Bagian lebih dalam dari lapisan ini terdapat rongga-rongga yang berisikan kelenjar sebacea serta folikel rambut (Kalangi, 2013).

### 3. Hipodermis (Subkutan)

Lapisan hipodermis atau subkutan merupakan lapisan yang berada pada dasar dari dermis. Lapisan ini terdiri dari jaringan adiposa dan jaringan ikat yang berfungsi sebagai peredam kejut dan insulator panas. Fungsi lain dari lapisan ini adalah sebagai tempat penyimpanan kalori. Ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah serta saluran getah bening juga terdapat pada lapisan ini (Kalangi, 2013).

## 2.4 Luka Infeksi

Infeksi merupakan munculnya mikroorganisme pada luka yang ditandai dengan gejala klinis dan mengganggu proses kesembuhan luka (Patel, 2010). Pertahanan host yang menurun dan faktor lingkungan yang mendukung dapat menyebabkan terjadinya infeksi dari mikroba yang kemudian dapat memperlama kesembuhan dari luka. Menurut Pastar *et al.* (2013) infeksi yang terjadi pada luka seringkali menunjukkan gejala edema, peningkatan eksudat, gangguan

kesembuhan luka serta diskolorasi jaringan granulasi. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi adalah seperti: besar dan kedalaman luka, jenis luka, lokasi luka, adanya penyakit vaskular, malnutrisi, diabetes melitus, adanya benda asing, radioterapi serta keadaan immunosupresi. Infeksi pada luka dapat disebabkan oleh bakteri *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* dan *Proteus sp.* (Patel, 2010). Menurut Pastar *et al.* (2013) bakteri yang paling sering diisolasi pada luka adalah *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* diketahui ditemukan dalam jaringan lebih dari 50% pada luka kronis. Bakteri yang menginfeksi memberikan efek seperti fungsi leukosit akan terganggu, peningkatan mediator inflamasi yang dapat menyebabkan fase inflamasi lebih lama dan kerusakan jaringan (Patel, 2010).

## **2.5 Bakteri Methicillin resistant *Staphylococcus aureus***

*Methicillin resistant Staphylococcus aureus* merupakan strain dari *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap *isoxazolyl penicillin* seperti *methicillin*, *oxacillin* serta *flucloxacillin*. Strain dari *Staphylococcus aureus* ini juga mengalami resisten silang terhadap seluruh antibiotika golongan beta laktam (Nahtwani *et al.*, 2008). *MRSA* ditemukan pada awal 1960-an yang kemudian dengan cepat menyebar dan menjadi salah satu penyebab utama infeksi nosokomial di seluruh rumah sakit di dunia. *MRSA* kemudian dibagi menjadi dua galur yaitu *HAMRSA* dan *CAMRSA*. *HAMRSA* merupakan *hospital associated MRSA* yang berkaitan dengan infeksi nosokomial. *CAMRSA* merupakan

community associated *MRSA* yang mana tidak berkaitan dengan infeksi nosokomial (Nahtwani *et al.*, 2008).

Resistensi *MRSA* terhadap antimikroba golongan betalaktam disebabkan bakteri ini memiliki protein mutan penicillin-binding protein 2a (PBP2a atau PBP 2'). PBP merupakan suatu kelompok enzim pada membran sel *S. aureus* yang mengkatalisis reaksi transpeptidasi guna pembentukan anyaman (cross-linkage) rantai peptidoglikan. Afinitas PBP2a terhadap antimikroba golongan beta laktam sangat rendah sehingga *MRSA* akan tetap hidup meskipun terpapar antimikroba tersebut dalam konsentrasi tinggi (Kenneth, *et al.*, 2004).

Infeksi *MRSA* dapat terjadi akibat kontak langsung dengan kulit yang terinfeksi ataupun transmisi via aerosol. Benda-benda yang terinfeksi bakteri *MRSA* juga dapat menjadi penularan secara tidak langsung (Kenneth, *et al.*, 2004). *MRSA* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan dalam infeksi. Faktor virulensi tersebut memiliki beberapa fungsi dalam patogenesis dan beberapa faktor virulensi dapat menunjukkan fungsi yang sama. Faktor-faktor virulensi dari bakteri ini adalah:

- a. *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) merupakan protein pada permukaan *MRSA*, yang memediasi adesi ke jaringan host. MSCRAMMs akan berikatan dengan molekul seperti kolagen, fibronectin dan fibrinogen dan MSCRAMMs yang lain dapat melakukan adhesi ke komponen jaringan yang sama (Gordon, 2008).

b. Exotoksin

Salah satu ciri penting dari bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kemampuannya untuk mensekresi toksin yang berperan aktif dalam menghindari sistem imun host. *Staphylococcus aureus* akan merusak sel dan jaringan host serta mengganggu sistem imun tubuh untuk kemudian melepaskan nutrisi dan memfasilitasi bakteri untuk diseminasi (Foster, 2005). Faktor yang disekresi tersebut dapat dibagi menjadi empat kategori, yaitu superantigen, toksin sitolitik, berbagai exoenzim serta aneka protein (Lin and Peterson, 2010).

1. Superantigen merupakan kelompok dari protein immunestimulatory yang dapat menginduksi berbagai macam gangguan pada tubuh hospes. Superantigen yang dihasilkan adalah *Staphylococcal enterotoxins* dan *Toxic shock syndrome toxin-1*.

2. Toksin sitolitik merupakan toksin yang dapat menyebabkan pemecahan dari kandungan suatu sel serta lisis. Toksin sitolitik yang dihasilkan yaitu  $\alpha$ -hemolysin yang dapat menginduksi lisisnya sel seperti platelet dan monosit,  $\beta$ -hemolysin yang dapat mehidrolisis sphingomyelin dari membran plasma monosit, eritrosit, neutrofil dan limfosit,  $\gamma$ -hemolysin yang dapat menginduksi lisisnya eritrosit dan leukosit, leukosidin dan *Panton-Valentine leukocidin* (PVL) yang dapat menginduksi lisisnya leukosit.

## 2.6 *Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ )*

*Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )* merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri Gram negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- $\alpha$  atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- $\beta$  atau limfotoksin. Sumber utama TNF- $\alpha$  ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- $\gamma$  yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF- $\alpha$  (Bratawidjaya dan Rengganis, 2010).

TNF- $\alpha$  mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai kemotaktik sel neutrofil dan makrofag (Soeroso, 2007). TNF- $\alpha$  juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Bratawidjaya dan Rengganis, 2010).

## 2.7 *Sel Radang pada Penyembuhan Luka*

Sel radang berperan aktif dalam proses kesembuhan luka terutama pada fase inflamasi. Inflamasi merupakan respon imun non spesifik yang melibatkan pemecahan jaringan dan pembersihan debris seluler, ekstra seluler serta patogen

(Nagaraja, *et al.*, 2014). Infiltrasi dari sel radang terjadi ketika sel radang seperti neutrofil, eosinofil, limfosit, sel mast serta makrofag menginfiltrasi di pembuluh darah dan daerah luka. Infiltrasi radang dimulai ketika sel mast melepaskan histamin yang menyebabkan terjadinya vasodilatasi serta peningkatan permeabilitas pembuluh darah (Bratawidjaya dan Rengganis, 2010).

Respon leukosit awal didominasi oleh neutrofil untuk 2-5 hari pertama, dengan makrofag mengambil alih dari sekitar hari ketiga. Neutrofil memiliki tiga fungsi utama. Pertama, neutrofil akan menghasilkan radikal bebas melalui jalur *myeloperoxidase* untuk membunuh bakteri. Neutrofil juga memecah jaringan luka melalui sekresi enzim proteolitik. Terakhir, neutrofil akan memfagosit bakteri yang mati dan debris matriks. Apoptosis neutrofil akan terjadi ketika fungsi dari neutrofil selesai (Li, *et al.*, 2007).

Ketika monosit bermigrasi ke daerah luka dan dewasa menjadi makrofag, makrofag akan menjadi sel pengatur yang paling penting dalam reaksi inflamasi (Li, *et al.*, 2007). Makrofag yang sangat fagositik menghilangkan sel host yang non fungsional, neutrofil yang mengandung bakteri, debris matriks, debris asing dan bakteri yang tersisa (Zhao, *et al.*, 2016). Makrofag juga aktif mensekresikan *growth factors*, kemokin dan sitokin seperti TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , *basic fibroblast growth factor* (bFGF), PDGF dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untuk memperkuat ataupun mengakhiri inflamasi serta menstimulasi endotel dan fibroblas untuk memulai fase penyembuhan berikutnya. Sel radang ini berperan sangat penting dalam membersihkan infeksi dan debris, namun juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan jika berkepanjangan. Infiltrasi sel radang yang

berkepanjangan akibat infeksi ataupun lainnya dapat menyebabkan jaringan parut meningkat atau terbentuk luka kronis (Zhao, *et al.*, 2016).

## 2.8 Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

### 2.8.1 Taksonomi dan Morfologi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Tanaman sirih hijau memiliki klasifikasi ilmiah atau taksonomi sebagai berikut : (Pradhan *et al.*, 2013)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnolipsida
Ordo	: Piperales
Family	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper betle</i> L.



**Gambar 2.2** Tanaman Sirih (*Piper betle* Linn.) (Pradhan *et al.*, 2013)

Sirih adalah tanaman herba perianial yang berdaun tunggal dengan letak daun yang alnetet serta variasi bentuk dari bundar telur hingga oval, ujung yang runcing, pangkal daun menyerupai bentuk jantung hingga agak bundar simetris

**Gambar 2.3** (Pradhan *et al.*, 2013). Syukur dan Hermani (2002) menyebutkan

bahwa tanaman sirih merupakan tanaman menjalar dan merambat, yang sering kali ditemui pada batang pohon dengan batang tanaman yang lunak, berbentuk bulat, beruas-ruas, beralur-alur dan berwarna hijau abu-abu. Daun yang memiliki letak berseling dengan bentuk yang bervariasi serta warna yang bervariasi dari kuning dan hijau.

### 2.8.2 Kandungan Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)

Shetty and Vijayalaxmi (2012) daun sirih hijau mengandung saponin, flavonoid, tanin serta minyak atsiri. Minyak atsiri yang mengandung fenol dan kavikol memiliki efek antibakteri dengan daya pembunuh bakteri lima kali lipat dari fenol biasa. Tanin, saponin dan flavonoid membantu proses penyembuhan luka melalui efek anti mikroba dan antioksidan yang dapat merangsang pertumbuhan sel-sel baru pada luka (Saroja, *et al.*, 2012).

#### a. Minyak Atsiri

Daun sirih memiliki aroma yang khas dikarenakan kandungan minyak atsirinya yang mencapai 1-4.2%. Minyak atsiri merupakan minyak yang mudah menguap dan mengandung aroma yang khas dikarenakan kandungan kavikol pada daun sirih yang mendominasi. Minyak atsiri terdiri dari fenol, hidroksi kavikol, fenilpropan dan tannin. Fenol alam memiliki daya antiseptik hingga 5 kali lebih kuat dibandingkan dengan fenol biasa. Fenol alam yang terkandung memiliki sifat bakterisid dan fungisid tetapi tidak sporasid. Fenol sebagai agen anti bakteri bersifat toksik terhadap protoplasma, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik yang memiliki



molekul besar dapat menginaktifkan enzim esensial pada sel bakteri walaupun dalam konsentrasi rendah. Fenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein dan menginaktifkan enzim bakteri (Rekha, *et al.*, 2013)

b. Tanin

Kandungan tanin memiliki kemampuan sebagai antioksidan, antibakteri serta astringensia. Efek tanin yang utama yaitu sebagai astringensia banyak dimanfaatkan sebagai pengencang kulit dalam kosmetika atau estetika (Palumpun, dkk., 2017). Efek konsentrasi rendah dari tanin yaitu menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan pada konsentrasi tinggi memberikan efek anti bakteri dengan mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma bakteri melalui ikatan yang stabil dengan protein bakteri. Tanin juga dapat mempercepat penyembuhan luka dengan beberapa mekanisme seluler yaitu membersihkan radikal bebas dan oksigen reaktif, meningkatkan penyambungan luka, pembuluh darah kapiler dan fibroblas (Rekha, *et al.*, 2013)

c. Saponin

Saponin menurut Wardani (2009) berperan dalam regenerasi jaringan pada proses penyembuhan luka dengan memacu pembentukan kolagen. Saponin memiliki kemampuan untuk memicu *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sehingga mempercepat proses angiogenesis dan reepitelisasi (Kimura, *et al.*, 2006).

#### d. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang bersifat polar sehingga mudah larut dalam pelarut polar seperti air, etanol, metanol, butanol dan aseton. Flavonoid berfungsi sebagai anti oksidan, anti mikroba dan juga anti inflamasi. Flavonoid akan mengurangi onset nekrosis sel dengan menurunkan lipid peroksidasi. Lipid peroksidasi yang dihambat oleh flavonoid dapat meningkatkan viabilitas serat kolagen, sirkulasi darah, mencegah kerusakan sel serta meningkatkan sintesis DNA. Senyawa flavonoid bekerja sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat jalur *cyclooxygenase* dan *5-lipoxygenase* pada siklus asam arakidonat menyebabkan penurunan pelepasan mediator radang (Rekha, *et al.*, 2013)

### 2.9 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

(Wolfensohn dan Lloyd, 2003)

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>



**Gambar 2.3** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Wolfensohn dan Lloyd, 2003).

Tikus putih jenis *Wistar* merupakan salah satu hewan laboratorium. Hewan laboratorium merupakan hewan yang sengaja untuk dikembang biakkan sebagai hewan model dalam mempelajari serta mengembangkan berbagai macam ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik **Gambar 2.4** (Wolfensohn dan Lloyd, 2003), salah satunya adalah hewan model insisi dalam penelitian kesembuhan luka pada kulit dan efisiensi dari beberapa terapi pada luka dengan jumlah total 38.2% penelitian yang menggunakan tikus sebagai hewan model luka insisi dan 38.2% menggunakan tikus sebagai hewan model luka eksisi dan beberapa lainnya menggunakan kombinasi antara keduanya (Martin, 2004). Tikus termasuk hewan mamalia sehingga dampak perlakuan yang dilakukan tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya. Keuntungan lain dari tikus putih sebagai hewan coba antara lain yaitu penanganan yang mudah, kemampuan reproduksi yang tinggi dan masa kebuntingan yang singkat. Beberapa strain yang digunakan dalam penelitian antara lain *Wistar*, *Sprague Dawley*, *Long Evans* dan *Holdzman* namun strain yang paling sering digunakan adalah *Wistar* dan *Sprague*.

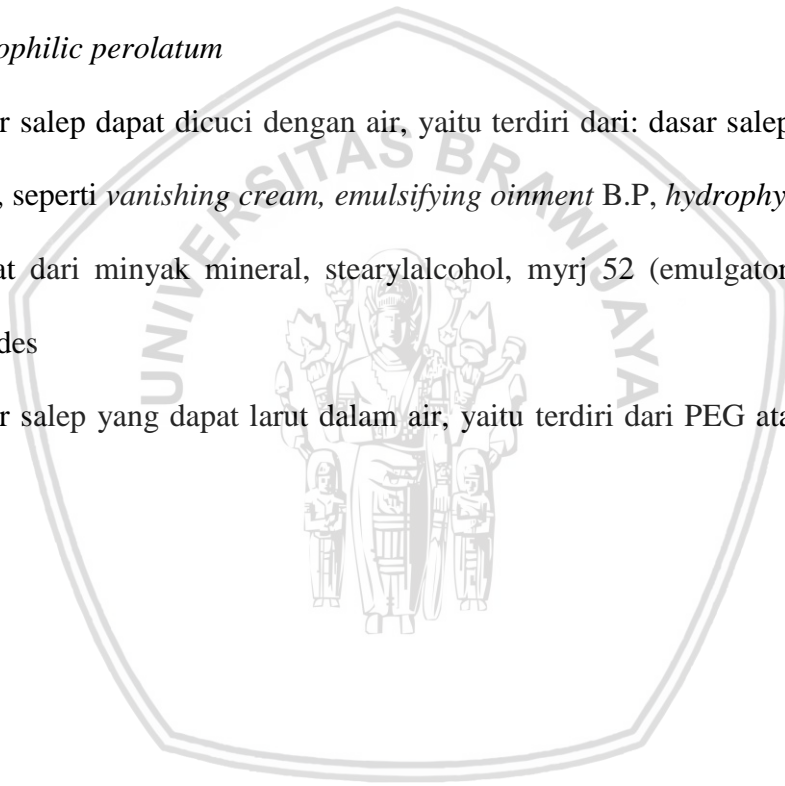
## 2.10 Salep

Salep merupakan sediaan obat dalam bentuk homogen kental, semi-padat, tebal berminyak dengan viskositas tinggi yang diaplikasikan pada bagian eksternal kulit atau selaput lendir. Kegunaan dari salep antara lain sebagai pelembaban atau perlindungan, terapi atau profilaksis yang sesuai dengan tingkat oklusi yang diinginkan. Salep diaplikasikan pada kulit dan selaput lendir yang terdapat pada mata, vagina, anus serta hidung. Salep memiliki sifat yang lembab sehingga baik digunakan pada kulit yang cenderung kering. Salep juga memiliki tingkat resiko sensitisasi yang rendah (Arief, 2007).

Salep tersusun dari bahan obat yang terlarut ataupun terdispersi di dalam basis salep yang berfungsi sebagai pembawa zat aktif. Basis salep yang digunakan dalam formulasi obat tersebut harus bersifat inert yaitu tidak menghambat atau mengurangi efek terapi dari obat yang terkandung (Arief, 2007). Pemilihan bahan dasar salep sangat penting untuk efektivitas fungsi yang diinginkan. Salep yang ditujukan sebagai proktektan harus memiliki bahan dasar salep dengan sifat melindungi kulit dari kelembapan, udara, sinar matahari serta faktor eksternal lain. Salep antiseptik yang bertujuan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri harus berbahan dasar salep yang memiliki kemampuan meresap ke dalam kulit dan melepaskan bahan aktif mengingat bahwa infeksi bakteri dapat terjadi pada lapisan dalam kulit (Agoes, 2008).

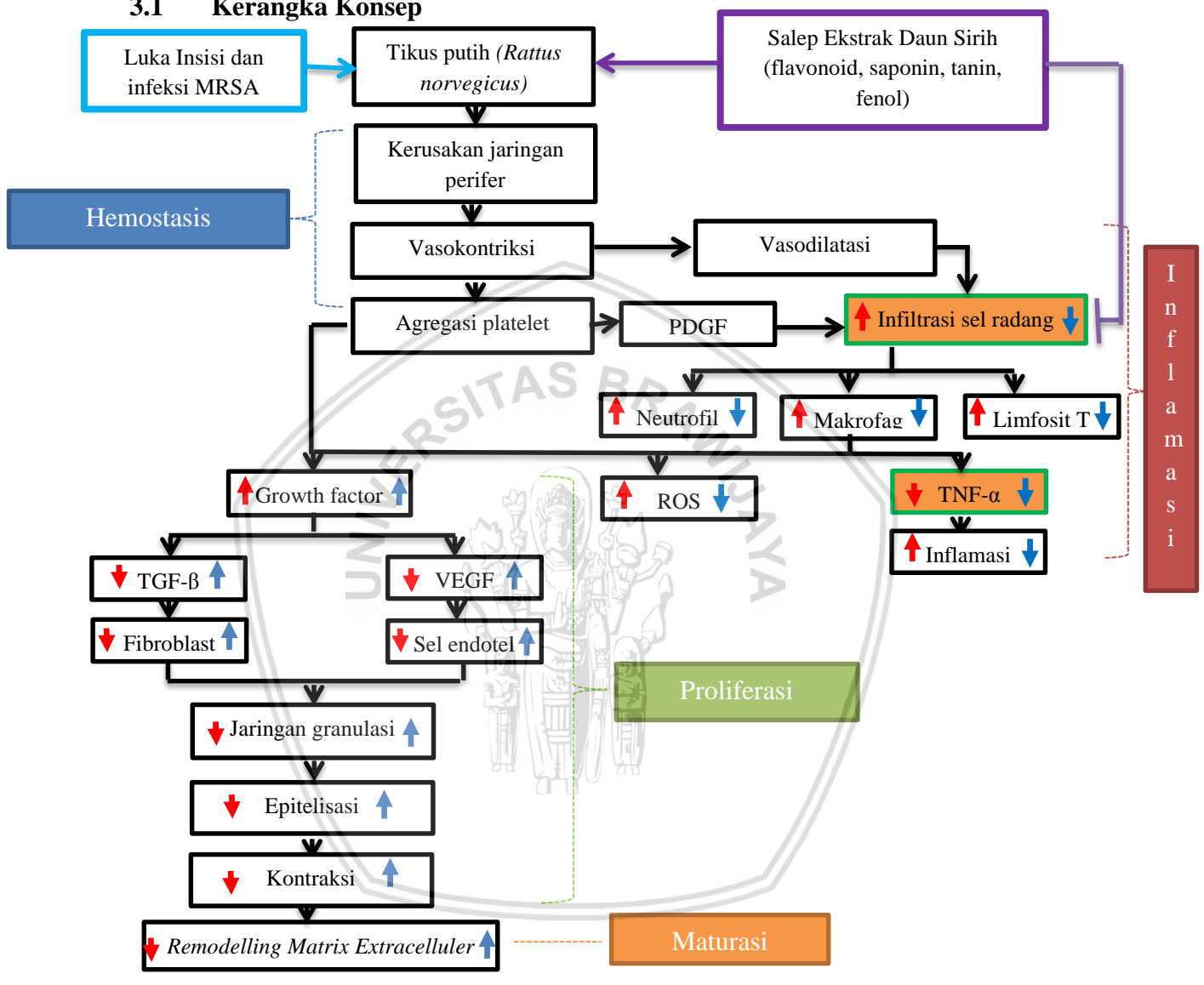
Berdasarkan komposisi dasar salep dapat digolongkan sebagai berikut: (Anief, 2013)

1. Dasar salep hidrokarbon, yaitu terdiri dari: vaselin putih, vaselin kuning, campuran vaselin dengan malam putih, malam kuning, parafin cair, parafin padat, jelene, minyak tumbuh-tumbuhan
2. Dasar salep serap, yaitu terdiri dari: *adeps lanae*, *unguentum simplex*, *hydrophilic perolatum*
3. Dasar salep dapat dicuci dengan air, yaitu terdiri dari: dasar salep emulsi tipe M/A, seperti *vanishing cream*, *emulsifying oinment B.P*, *hydrophylic ointment*, dibuat dari minyak mineral, stearylalcohol, myrj 52 (emulgator tipe M/A), aquades
4. Dasar salep yang dapat larut dalam air, yaitu terdiri dari PEG atau campuran PEG



**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konsep**



- Keterangan gambar
- :Proses luka insisi dan infeksi MRSA
  - ▼ :Jalur di dalam tubuh tikus
  - :Terapi SEDSH topikal
  - :Variabel yang diamati
  - ↕ :Efek luka insisi dan infeksi MRSA
  - ↕ :Efek terapi SEDSH topikal
  - ⊥ :Menghambat

Luka adalah rusaknya kesatuan atau komponen jaringan yang rusak atau hilang. Ketika terjadi kerusakan jaringan perifer tubuh akan memberikan respon berupa vasokonstriksi pembuluh darah. Vasokonstriksi tersebut akan memperlambat aliran darah sehingga memperkecil darah yang keluar. Kemudian akan terjadi agregasi platelet atau trombosit dibawah pengaruh dari *adenosine diphosphate* (ADP). Agregasi platelet kemudian akan membentuk sumbat trombosit dan menstimulasi produksi trombin yang kemudian merubah fibrin menjadi fibrinogen sehingga terjadi *clotting*. Platelet juga akan memproduksi beberapa growth factor seperti PDGF yang akan meningkatkan kemotaksis dari sel radang sehingga terjadi infiltrasi sel radang, selain PDGF platelet akan memproduksi growth factor seperti TGF- $\beta$  dan VEGF yang berpengaruh dalam fase proliferasi.

Sel mast kemudian akan merespon jaringan yang rusak dengan mengeluarkan histamin, selain sel mast, asam arakidonat akan terurai menjadi molekul molekul seperti prostaglandin, leukotrin dan tromboksan dalam merespon kerusakan jaringan. Histamin akan menyebabkan pembuluh darah menjadi vasodilatasi dan prostaglandin, leukotrin dan tromboksan menyebabkan peningkatan permeabilitas dari pembuluh darah. Vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah tersebut menyebabkan migrasi dari cairan plasma serta sel radang atau leukosit. Sel radang atau leukosit berperan dalam fagositosis patogen serta debris jaringan. Neutrofil akan muncul pada jam 24-48 pasca luka yang kemudian digantikan oleh makrofag pada 48-96 jam pasca luka dan limfosit T akan muncul pada hari ke 5 hingga 7 pasca luka. Sel radang kemudian akan

melepaskan sitokin pro-inflamasi, salah satunya TNF-  $\alpha$  sehingga inflamasi terjadi.

Bakteri MRSA yang menginfeksi luka akan menyebabkan sel radang yang meningkat guna melakukan fagositosis. Sel radang tersebut khususnya makrofag juga akan terus menghasilkan TNF-  $\alpha$  sebagai sitokin proinflamasi yang kemudian menyebabkan proses inflamasi yang lebih lama dan terjadi kerusakan jaringan perifer yang semakin parah. Proses inflamasi yang tidak terlewati segera menyebabkan terhambatnya fase penyembuhan selanjutnya yaitu fase proliferasi dan *remodelling* sehingga kesembuhan luka akan tertunda dan semakin lama.

Pemberian terapi salep ekstrak daun sirih hijau dapat mempercepat penyembuhan luka karena bersifat sebagai antibakteri, antiinflamasi dan menstimulasi beberapa *growth factor* yang dapat merangsang pertumbuhan sel-sel baru pada luka. Fenol dalam minyak atsiri dan tanin yang terkandung dalam daun sirih hijau yang dapat merusak dan menembus dinding bakteri, toksik terhadap protoplasma, mendenaturasi protein sel bakteri serta menginaktifkan enzim bakteri sehingga bakteri akan mati. Daun sirih hijau juga mengandung senyawa flavanoid yang berperan sebagai anti-inflamasi dengan cara menghambat jalur *cyclooxygenase* dan *5-lipoxygenase* pada siklus asam arakhidonat menyebabkan penurunan pelepasan mediator radang serta meminimalisir migrasi dari sel radang. Penurunan migrasi sel radang akan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan sebaliknya akan meningkatkan produksi *growth factor* seperti TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  akan menstimulasi pembentukan fibroblas dan kandungan saponin dari daun sirih hijau akan meningkatkan VEGF sehingga



pembentukan sel endotel yang baru juga meningkat. Fibroblas dan VEGF membentuk jaringan parut kemudian terjadilah epitelisasi pada luka kemudian kontraksi luka akan meningkat akibat myofibroblas. Kontraksi ini bertujuan untuk mengurangi kecacatan dari jaringan epitel. Sel fibroblast akan menghasilkan kolagen III yang merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler untuk kemudian akan digantikan oleh kolagen tipe I.

Pemberian salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) diharapkan mampu berperan sebagai antibakteri dan mempercepat fase inflamasi sehingga mempercepat proses penyembuhan luka infeksi.

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Terapi salep daun sirih hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Terapi salep daun sirih hijau (*Piper betle Linn.*) mampu menurunkan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan April 2018 yang dilakukan di beberapa laboratorium antara lain:

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan suspensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*  $10^5$  CFU/ml di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih hijau dan salep di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Uji Imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  yang dilakukan di Laboratorium Faal<sup>2</sup> Fakultas<sup>1</sup> Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
5. Pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, sarung tangan (glove), scalpel, pinset anatomis, pinset chirurgis, kain kasa, gunting tajam-tajam, gunting tajam-tumpul, *object glass*, *cover glass* rak kaca objek, autoclave, timbangan,

blender, penyaring karet, gelas ukur, wadah kaca tertutup, inkubator, kapas, papan fiksasi, pot organ, mikroskop cahaya (Olympus BX51), *water bath*, *software* Optilab viewer, *Immunoratio* dan aplikasi *Image Raster 3*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* dengan berat 150-180 gram, pakan standar dan minum tikus, NaCl fisiologis, alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, vaselin album, media *NA slant*, media NB, minyak emersi, pewarnaan HE, formalin 10%, jaringan kulit tikus, aquades, parafin, ketamin HCL-xylazine, xylol, PBS pH 7,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%, *Strep Avian Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamini benzidine* (DAB) antibodi TNF- $\alpha$ , parafin cair dan daun sirih hijau muda.

#### 4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Pembuatan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi 2.5%, 5% dan 7.5%.
3. Perlakuan luka insisi dengan panjang 4 cm pada daerah punggung dan pemberian bakteri MRSA.
4. Terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi 2.5%, 5% dan 7.5%.
5. Pengambilan dan pembuatan preparat histopatologi kulit.
6. Ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode Imunohistokimia.
7. Pengamatan preparat histopatologi kulit jumlah sel radang dengan pewarnaan *Haematoxylin eosin* (HE).

8. Analisis data.

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing 4 ulangan berdasarkan rumus menurut Kusriningrum (2008):

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

Keterangan :

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan **Tabel 4.4**, yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok P1 (terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi 2.5%), kelompok P2 (terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi 5%), dan kelompok P3 (terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi 7.5%).

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kelompok K(-)	Tikus dengan perlakuan luka insisi dan tidak dikontaminasi dengan MRSA $10^5$ CFU/ml dan diterapi povidon iodine dan antibiotik topikal.
Kelompok K(+)	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi dan dikontaminasi dengan MRSA $10^5$ CFU/ml dan diterapi salep plasebo.
Kelompok P1	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi dan dikontaminasi dengan MRSA $10^5$ CFU/ml serta terapi salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) dengan konsentrasi 2.5%.
Kelompok P2	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi dan dikontaminasi dengan MRSA $10^5$ CFU/ml serta terapi salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) dengan konsentrasi 5%.
Kelompok P3	Tikus yang diberi perlakuan luka insisi dan dikontaminasi dengan MRSA $10^5$ CFU/ml serta terapi salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) dengan konsentrasi 7.5%.

#### 4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : dosis terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dan bakteri *S. aureus*  $10^5$  CFU/ml
- Variabel terikat : ekspresi TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang.

Variabel kontrol : homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur pakan dan kandang serta perlakuan luka model infeksi *S. aureus*.

## **4.6 Prosedur Kerja**

### **4.6.1 Persiapan Hewan Coba**

Pada percobaan ini digunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan berat badan berkisar antara 150-180 gram dan umur 8-12 minggu. Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan terdapat 4 ekor tikus. Masing –masing kelompok ditempatkan dalam kandang berbahan plastik yang disekat menjadi 4 bagian dengan alas dari kawat yang menggantung dari dasar kandang yang berisi serbuk kayu serta penutup dari kawat berdasarkan penelitian dari Nilugal, *et al.*, (2014) dengan modifikasi.

Sebelum mendapatkan perlakuan, hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan terhadap lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar dan minum pada semua tikus (Nilugal, *et al.*, 2014). Pemberian pakan dan minum dilakukan sebanyak dua kali dalam sehari. Komposisi pakan yang diberikan berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) 2005, yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin dan air 12%. Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

### **4.6.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau**

Pembuatan ekstrak daun sirih hijau dimulai dengan proses preparasi sampel. Daun sirih (*Piper betle*) dicuci dan selanjutnya dikeringkan menggunakan

oven dengan suhu 55°C – 60°C hingga benar-benar kering. Selanjutnya, daun dipotong berukuran kecil, lalu dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga menghasilkan simplisia. Tahap ekstraksi dimulai dengan maserasi simplisia sebanyak 1 kg menggunakan etanol 70% selama 3 hari disertai pengadukan. Filtrat yang dihasilkan dari maserasi disaring dengan kertas saring sehingga didapatkan filtrat murni. Filtrat murni dievaporasi dengan suhu rendah 50°C menggunakan rotary vacuum evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental (Pakpahan dkk, 2015).

#### **4.6.3 Pembuatan Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau**

Salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dibuat dengan memformulasikan ekstrak kental daun sirih hijau dengan masing-masing konsentrasi yakni 2.5%, 5% dan 7.5%. Ekstrak kental daun sirih hijau tersebut diformulasikan dengan bahan dasar salep vaselin album yang dibuat masing-masing sebanyak 100 gram. Pencampuran dilakukan menggunakan alat mortar dan disimpan ke dalam tube serta diberi label (Fitriyana, 2012)

#### **4.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Suspensi bakteri MRSA dibuat dengan cara meremajakan kembali kultur murni MRSA pada media *NA Slant* selama 24 jam, selanjutnya dilakukan inokulasi 1 ose bakteri dari media *NA Slant* ke dalam 10 ml NB steril dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil kultur cair dibandingkan kekeruhannya dengan standard Mc. Farland No 1 (kekeruhan bakteri  $\pm 3 \times 10^8$  CFU/ml) (Wahyu, dkk., 2013). Selanjutnya, dilakukan pengenceran biakan



MRSA menggunakan media NB steril hingga didapatkan konsentrasi  $10^5$  CFU/ml (Santana, *et al.*, 2015).

#### 4.6.4 Pembuatan Luka Infeksi pada Tikus

Setiap hewan coba tikus diberi label pada bagian ekor menggunakan spidol tahan air sesuai dengan kelompok perlakuan masing-masing. Tikus dilakukan anestesi menggunakan kombinasi ketamin (dosis 40 mg/kgBB, konsentrasi 100 mg/mL) dan xylazine (dosis 5 mg/kgBB, konsentrasi 20 mg/mL) secara intramuskular (Plumb, 2008). Pencukuran rambut dilakukan pada bagian dorsal area perlukaan hingga bersih kemudian diberi alkohol 70%. Selanjutnya dilakukan insisi *longitudinal midline* sepanjang 4 cm sampai kedalaman subkutan ((Kumar, *et al.*, 2013)). Kemudian ditetaskan biakkan bakteri yang telah diencerkan sebanyak 30  $\mu$ L kedalam luka insisi, yang merupakan modifikasi dari (Santana *et al.*, 2011).

#### 4.6.5 Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau

Tiap konsentrasi salep dibuat sebanyak 100 g dengan teknik pemberian dua kali sehari setiap 12 jam dengan cara dioleskan salep ekstrak sirih hijau sebanyak  $\pm 1$  mg pada area luka infeksi selama 7 hari secara aseptis

#### 4.6.6 Pengambilan Jaringan Kulit

Hewan coba dieuthanasi dengan cara dislokasi leher, kemudian dilakukan pembedahan diatas papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada daerah punggung, tikus diletakkan dengan posisi rebah ventral. Kulit disekitar insisi kemudian diambil dengan ketebalan  $\pm 4$  mm sampai dengan lapisan subkutan dan

panjang pengguntingan disesuaikan dengan jarak 1 cm dari setiap garis incisi. Kulit yang diperoleh dicuci dengan NaCl fisiologis. Kulit yang sudah dibersihkan kemudian dibagi menjadi dua untuk pembuatan preparat histologi dan Imunohistokimia (Nilugal, et al., 2014)

#### **4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit**

Kulit direndam pada larutan formalin 10% selama 24 jam. Tahapan pembuatan preparat histopatologi kulit terdiri dari fiksasi, dehidrasi, clearing, impregnasi, dan *embedding* (Ashari, 2013).

##### **A. Fiksasi**

Jaringan dimasukkan dalam larutan formalin 10%. Lamanya fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam agar larutan fiksasi hilang. Fiksasi bertujuan sebagai pengawetan jaringan dan menghambat proses pembusukan, serta untuk mempertahankan sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran (Ashari, 2013).

##### **B. Dehidrasi**

Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol konsentrasi bertingkat (alkohol 70, 80, 90, 95%, dan alkohol absolut) dengan menggunakan alat *dehydrator autotechnicon* selama 2 jam. Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari dalam jaringan. Tujuan dari dehidrasi adalah agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan molekul parafin. Dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari presentase rendah ke presentase tinggi. Hal ini dilakukan

untuk menjaga agar tidak terjadi perubahan tiba-tiba pada sel dan jaringan (Ashari, 2013).

### C. *Clearing*

Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan *alkohol-xylol* selama 1 jam, kemudian larutan *xylol* murni selama 4 jam. *Clearing* adalah proses penjernihan atau mentransparankan jaringan. *Clearing* berfungsi untuk menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan oleh molekul parafin (Ashari, 2013).

### D. Impregnasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam parafin cair. Impregnasi dapat juga disebut infiltrasi parafin yaitu proses pengeluaran *xylol* dari dalam jaringan yang akan digantikan oleh parafin cair (Ashari, 2013).

### E. *Embedding*

Potongan jaringan dalam parafin padat dengan titik lebur 56-58 °C, ditunggu hingga parafin menjadi padat. Jaringan dalam parafin dipotong 4 mikron dan ditempelkan pada *object glass* dan dipanaskan dalam inkubator dengan suhu 60 °C hingga parafin mencair. *Embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke media parafin. Tujuannya adalah untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan sampel. Jaringan yang sudah kering kemudian dilakukan pewarnaan Hematoksilen-Eosin (HE) untuk melihat adanya sel radang (Ashari, 2013).

Perhitungan sel radang dilakukan dengan menghitung jumlah sel neutrofil, limfosit dan makrofag pada sediaan histopatologi menggunakan mikroskop

dengan perbesaran 400x. Perhitungan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang (Zayyan, dkk., 2016).

#### 4.6.8 Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman *slide* preparat pada *xylol 1*, *xylol 2*, dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selanjutnya ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat TNF- $\alpha$*  (pengenceran 1:50) selama semalam pada suhu 40°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel *rabbit anti rat igG* berlabel biotin selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali (Susanto, dkk., 2012).

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromagen *Diamano Benzidine* (DAB) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan.

Preparat di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan cover glass (Susanto, dkk., 2012).

Pengukuran presentase area ekspresi TNF- $\alpha$  dengan mengunggah foto dari preparat imunohistokimia yang diamati melalui mikroskop dalam perbesaran 400x dengan lima lapang pandang untuk setiap kelompok pada *software Immunoratio* (Tuominen, *et al.*, 2010). Hasil pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  akan tampak warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel (Tuominen, *et al.*, 2010)

#### **4.6.9 Analisis Data**

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- $\alpha$  dan jumlah sel radang. Analisis data dilakukan secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *SPSS for Window 22*. Selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% ( $P < 0,05$ ) untuk mengetahui perbedaan nyata antara kelompok perlakuan, apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui hasil yang berbeda nyata.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

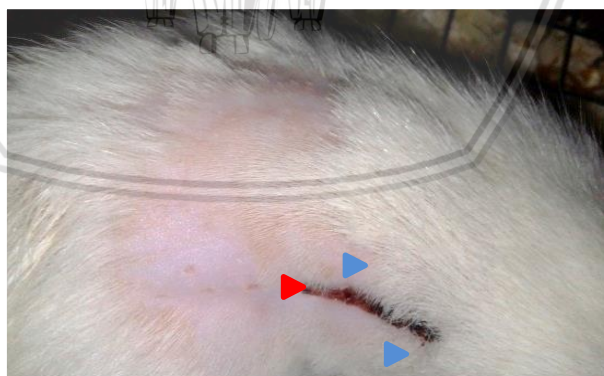
Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) strain *wistar* jantan diberi perlakuan luka insisi pada daerah punggung tepatnya bagian midline sepanjang 4 cm dan diinfeksi dengan MRSA  $10^5$  CFU/mL sebanyak 30 $\mu$ L, kemudian dilakukan pemberian terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi bertingkat yaitu 2.5%, 5% dan 7.5% sesuai kelompok perlakuan pada area luka infeksi 2 kali sehari selama 7 hari.

Kelompok kontrol negatif terdiri dari tikus dengan perlakuan insisi tanpa infeksi bakteri MRSA dan diterapi dengan antiseptik povidone iodine serta antibiotik topikal. Gambaran makroskopis jaringan kulit kelompok kontrol negatif pada hari ke-8 pasca perlakuan luka insisi menunjukkan luka yang sudah mengering dengan penutupan luka yang mulai terjadi meskipun belum sempurna dan daerah sekitar luka mulai ditumbuhi rambut (**Gambar 5.1**). Gambaran makroskopis dari kelompok kontrol negatif menunjukkan keadaan luka yang sudah tidak rubor, tidak mengalami edema atau pembengkakan dan luka yang menutup dengan adanya jaringan granulasi. Menurunnya rubor pada luka serta tidak adanya edema menandakan fase inflamasi telah terlewati, yang mana inflamasi sendiri dapat ditandai dengan tumor, calor, rubor, dolor dan functio laesa (Stankov, 2012). Kondisi luka dari kelompok kontrol negatif sesuai dengan pendapat dari Orsted *et al.*, (2011) yang menyatakan bahwa pada proses kesembuhan luka secara normal, fase inflamasi akan dimulai pada hari ke-0 dan berakhir pada hari ke-5 setelah terjadinya luka yang kemudian akan memasuki fase kesembuhan berikutnya, yaitu fase proliferasi yang ditunjukkan dengan luka yang mulai menutup dan terbentuknya jaringan granulasi. Kelompok kontrol

positif terdiri dari tikus dengan perlakuan insisi yang diinfeksi dengan bakteri MRSA  $10^5$  CFU/mL sebanyak  $30\mu\text{L}$  dan diterapi dengan salep plasebo. Gambaran makroskopis jaringan kulit kelompok kontrol positif menunjukkan luka masih belum menutup, masih terlihat rubor serta masih mengalami edema pada area sekitar luka dan dengan tidak adanya pertumbuhan rambut pada area sekitar luka (**Gambar 5.2**). Rubor atau warna kemerahan pada area luka menunjukkan luka masih dalam fase inflamasi, yang mana menurut Teller *and* Therese (2009) pada fase inflamasi aliran darah akan meningkat menuju area luka sehingga menyebabkan rubor atau warna kemerahan. Edema atau pembengkakan yang terjadi pada area sekitar luka juga menunjukkan bahwa luka masih dalam tahap fase inflamasi. Vasodilatasi dengan diikuti meningkatnya permeabilitas vaskuler menyebabkan perpindahan dari cairan intravaskuler, protein dan komponen seluler ke ruang ekstrasvaskuler, sehingga menyebabkan terjadinya edema (Teller *and* Therese, 2009). Infeksi dari bakteri MRSA menyebabkan fase inflamasi, yang secara normal berakhir pada hari ke-5 pasca terjadinya luka tidak segera terlewati dikarenakan sel-sel fagosit seperti neutrofil dan makrofag terus bermigrasi ke daerah luka guna mengeliminasi bakteri MRSA.

Kelompok perlakuan satu (P1) terdiri dari kelompok tikus dengan perlakuan insisi yang diinfeksi dengan bakteri MRSA  $10^5$  CFU/mL sebanyak  $30\mu\text{L}$  dan diterapi dengan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 2.5%. Gambaran makroskopis dari kelompok P1 menunjukkan luka yang sudah mulai mengering namun belum menutup, rubor yang memudar dan adanya sisa debris menunjukkan bahwa luka masih dalam fase inflamasi meskipun tidak separah dari kelompok kontrol positif (**Gambar 5.3**). Kelompok



perlakuan dua (P2) terdiri dari kelompok tikus dengan perlakuan insisi yang diinfeksi dengan bakteri MRSA  $10^5$  CFU/mL sebanyak 30 $\mu$ L dan diterapi dengan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 5%. Gambaran makroskopis dari kelompok P2 menunjukkan luka yang mengering, mulai terjadi penutupan luka, serta hilangnya debris yang menunjukkan bahwa proses kesembuhan dari luka telah memasuki fase proliferasi dengan sudah tidak ditemukannya tanda dari inflamasi (**Gambar 5.4**). Kelompok perlakuan satu (P3) terdiri dari kelompok tikus dengan perlakuan insisi yang diinfeksi dengan bakteri MRSA  $10^5$  CFU/mL sebanyak 30 $\mu$ L dan diterapi dengan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 7.5%. Gambaran makroskopis dari kelompok P3 menunjukkan luka yang sudah menutup meskipun belum sempurna dengan area sekitar luka yang mulai ditumbuhi rambut yang menandakan bahwa perkembangan kesembuhan luka sudah pada fase proliferasi (**Gambar 5.5**).




**Gambar 5.1** Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka insisi kelompok kontrol negatif (K-) (▶ area luka yang telah mulai menutup dengan adanya jaringan granulasi) (▶ pertumbuhan rambut di area sekitar luka).






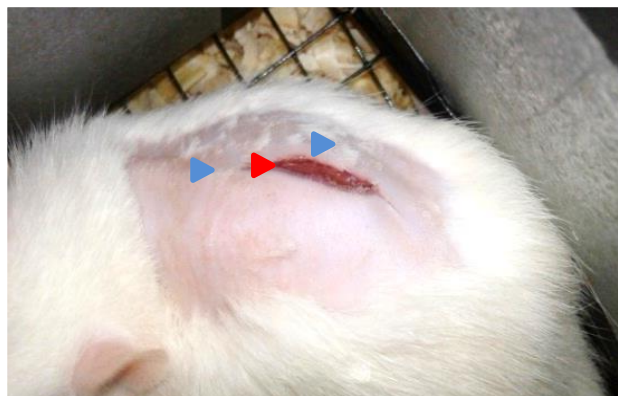
Gambar 5.2 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok kontrol positif (K+) (  area sekitar luka yang masih mengalami edema) (  area luka yang masih terlihat rubor dan belum menutup).



Gambar 5.3 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1) (  area luka yang sudah mengering dan dengan adanya sisa debris).



Gambar 5.4 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2) (  area luka yang sudah mulai mengering dan menutup).

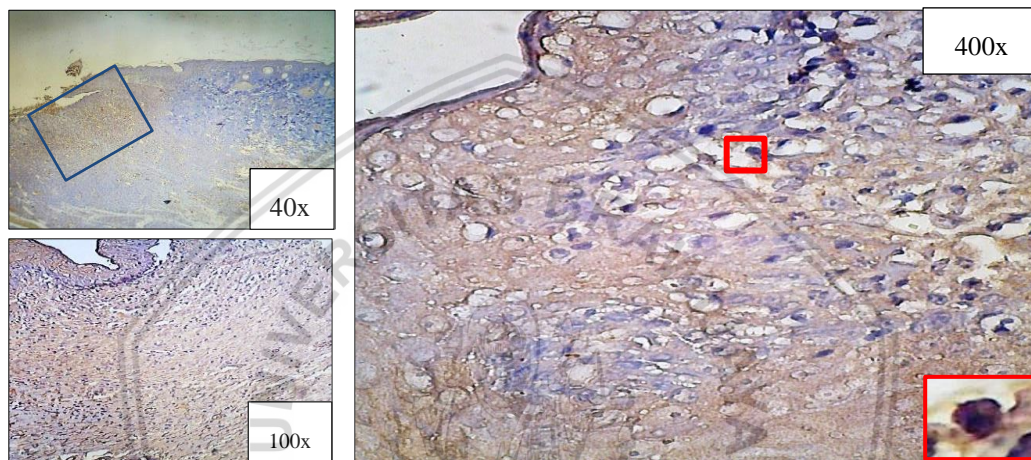


Gambar 5.5 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka infeksi jaringan kulit tikus pada hari ke-9 pasca perlakuan luka infeksi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3) ( ▶ area luka yang sudah mengering dan mulai menutup) ( ▶ pertumbuhan rambut di area sekitar luka).

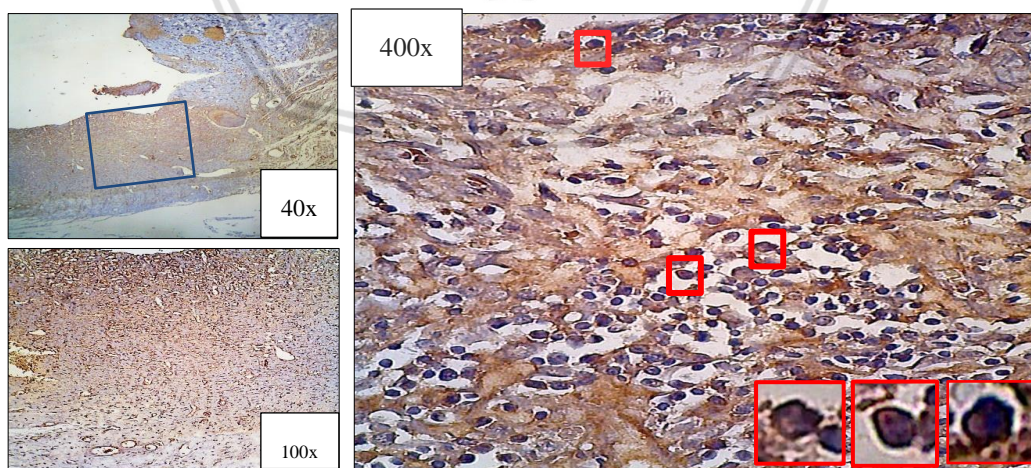
### 5.1 Efek Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- $\alpha$ ) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi yang Diinfeksi *Metichillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin pro inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag dan neutrofil ketika terjadi kerusakan jaringan akibat luka pada fase inflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek dari terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pasca luka insisi yang diinfeksi MRSA. Ekspresi TNF- $\alpha$  diamati dengan metode imunohistokimia yang merupakan suatu proses pewarnaan substansi atau bahan aktif pada jaringan dengan adanya pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif spesifik dari bahan aktif lainnya (antibodi) (Falangola *et al.*, 2005). Ekspresi TNF- $\alpha$  pada preparat histopatologi ditemukan pada pembuluh darah dan jaringan ikat yang ditunjukkan dengan warna coklat. Warna coklat tersebut merupakan hasil dari interaksi TNF- $\alpha$  pada jaringan kulit dengan antibodi yang ditambahkan, yaitu *anti rat TNF- $\alpha$*  sebagai antibodi primer dan *rabbit anti rat TNF- $\alpha$*  sebagai antibodi sekunder, yang kemudian menyebabkan terbentuknya ikatan kompleks

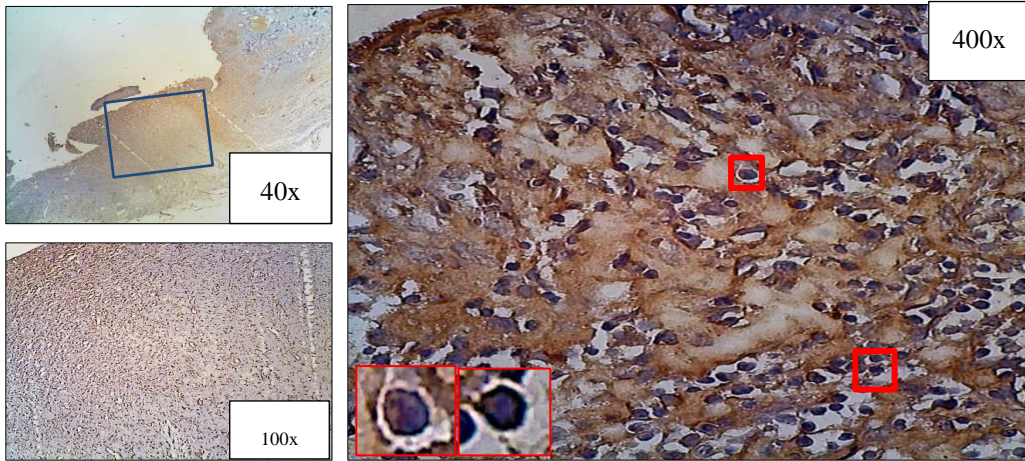
antigen-antibodi yang dikenali SA-HRP dan terwarnai dengan substrat kromagen DAB sehingga tervisualisasi warna kecoklatan (Falangola *et al.*, 2005). Hasil penelitian mengenai efek salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pasca luka insisi yang diinfeksi MRSA dapat dilihat pada **Gambar 5.6 -Gambar 5.10**.



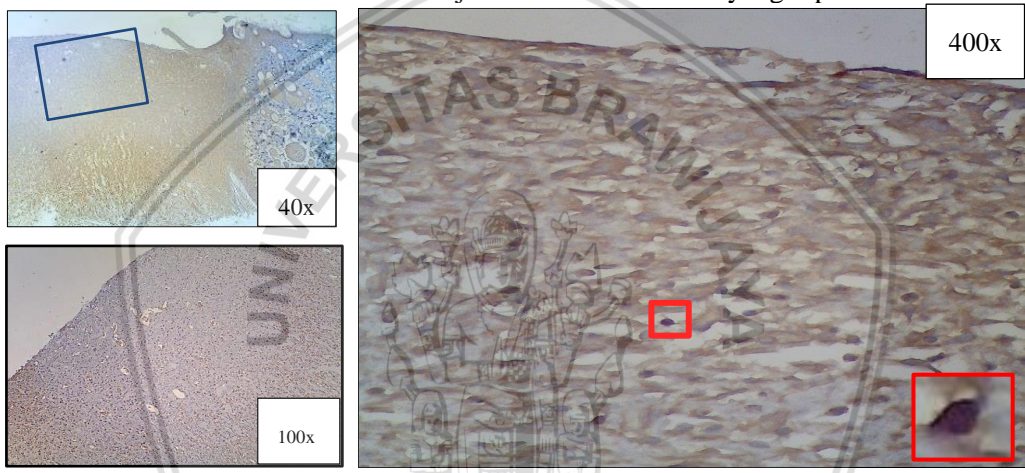
**Gambar 5.6.** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang (kotak merah ) dari kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi kelompok kontrol negatif (K-). Kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar.



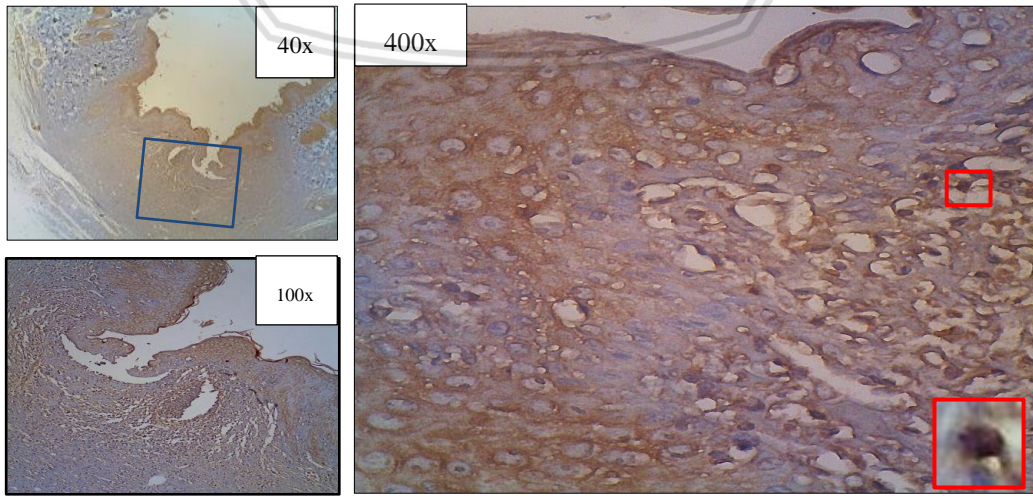
**Gambar 5.7.** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang (kotak merah ) dari kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi kelompok kontrol positif (K+). Kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar.



**Gambar 5.8.** Ekspresi Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang (kotak merah ) dari kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1). Kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar.



**Gambar 5.9.** Ekspresi Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang (kotak merah ) dari kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2). Kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar.



**Gambar 5.9.** Ekspresi Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pada sitoplasma sel radang (kotak merah ) dari kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3). Kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar.

Gambaran histopatologi dari kelima kelompok menunjukkan adanya perbedaan ekspresi TNF- $\alpha$  yang terekspresi dengan warna cokelat. Kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan adanya ekspresi TNF- $\alpha$  yang paling sedikit dibandingkan dari semua kelompok yang lebih banyak terwarnai kecoklatan. Hal tersebut disebabkan karena adanya infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pada kelompok positif maupun perlakuan sehingga terjadi reaksi imun yang meningkatkan respon inflamasi. Banyaknya TNF- $\alpha$  yang terekspresi menunjukkan proses inflamasi yang masih berlangsung sedangkan menurunnya ekspresi TNF- $\alpha$  menandakan proses inflamasi yang segera berakhir dan berlanjut ke fase proliferasi.

Perhitungan ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan dengan menghitung persentase area ekspresi menggunakan program *Imunoratio*. Data yang didapat kemudian dianalisis secara statistika menggunakan *software IBM SPSS Statistic 22®*. Dilakukan uji homogenitas dan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen dan normal. Hasil dari kedua uji tersebut (**Lampiran 10.1 dan Lampiran 10.2**) menunjukkan bahwa data yang didapat bersifat homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan untuk uji *one way ANOVA*. Hasil dari uji *one way ANOVA* (**Lampiran 10.4**) menunjukkan nilai Sig. <0.05 yang berarti  $H_0$  ditolak sehingga dapat dikatakan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) memiliki efek terhadap ekspresi TNF- $\alpha$ . Untuk mengetahui kelompok dengan perbedaan rata-rata yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey (**Lampiran 10.5**). Uji BNJ atau Tukey yang dilakukan menunjukkan hasil sebagai berikut **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Kulit Luka Infeksi MRSA dan Hasil Uji BNJ ( $\alpha=0.05$ )

No.	Perlakuan	Ekspresi TNF- $\alpha$ + SD
1.	Kontrol Negatif	26,9000 $\pm$ 4,02 <sup>a</sup>
2.	Kontrol Positif	59,9500 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>
3.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 2.5% (P1)	56,0000 $\pm$ 2,79 <sup>b</sup>
4.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 5% (P2)	34,0500 $\pm$ 4,79 <sup>a</sup>
5.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 7.5% (P3)	31,2000 $\pm$ 2,17 <sup>a</sup>

Keterangan : Perbedaan notasi a,b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok kontrol positif (K+) sebesar 59,95%  $\pm$  2,62 (Tabel 5.1) yang menunjukkan nilai persentase rata rata tertinggi dari seluruh kelompok. Berdasarkan hasil uji BNJ, kelompok kontrol positif (K+) memiliki perbedaan nyata terhadap kelompok kontrol negatif (K-). Kelompok kontrol positif (K+) merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi dan infeksi MRSA dan terapi salep plasebo. Bakteri MRSA yang menginfeksi memiliki faktor virulensi seperti MSCRAMMS yang membantu adesi ke jaringan host; exoenzim seperti hyaluronidase, staphylokinase yang membantu bakteri menyebar dalam jaringan; kapsul polisakarida yang menghindarkan bakteri dari fagositosis; toksik sitolitik seperti hemolysisn serta leukocidin yang dapat merusak membran sel (Gordon, 2008; Lin and Peterson, 2010). Kerusakan jaringan serta infeksi MRSA menyebabkan terjadinya fase inflamasi yang lebih lama dengan makrofag terus menghasilkan TNF- $\alpha$  guna mengeliminasi bakteri MRSA yang menginfeksi selain itu sel yang rusak juga akan mengeluarkan sitokin pro inflamasi yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Von Bernuth *et*

*al.* (2006) bahwa adanya infeksi bakteri pada luka menyebabkan fase inflamasi yang lebih lama dengan migrasi sel radang seperti neutrofil dan makrofag yang terus berlangsung dan menghasilkan sitokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  merupakan sitokin utama pada respon inflamasi yang berfungsi dalam menngeliminasi mikroba dengan mengerahkan neutrofil dan monosit ke area infeksi. Produksi sitokin pro-inflamsi TNF- $\alpha$  juga dapat dihasilkan oleh sinyal imun non spesifik dari kulit yang diaktivasi oleh komponen dari bakteri MRSA yaitu IL-1R dan TLR-2 untuk kemudian menginduksi jalur sinyal stimulasi NF- $\kappa$ B dan MAPK yang akan menginisiasi produksi sitokin proinflamasi salah satunya yaitu TNF- $\alpha$  (Von Bernuth, *et al.*, 2006). Sedangkan rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok kontrol negatif (K-) sebesar  $26,90\% \pm 4,02$  (**Tabel 5.1**) menunjukkan nilai persentase rata rata terendah dari seluruh kelompok. Hasil dari uji BNJ yang dilakukan menunjukkan kelompok kontrol negatif (K-) memiliki perbedaan nyata terhadap kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan luka insisi tanpa infeksi MRSA yang diterapi dengan povidone iodine dan antibiotik topikal. Rendahnya ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok ini dibandingkan dengan kelompok lain disebabkan karena luka tidak mengalami infeksi sehingga fase inflamasi akan terlewati dengan segera dan memasuki fase proliferasi yang ditunjukkan dengan menurunnya sitokin pro inflamasi TNF- $\alpha$ . Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Strbo *et al.* (2014) bahwa fase inflamasi pada penyembuhan luka secara normal berlangsung selama 2 hingga 5 hari, tidak adanya infeksi sekunder dari luar akan mempercepat proses penyembuhan. TNF- $\alpha$  pada awal fase proliferasi juga

berkontribusi dalam aktivisasi dari fibroblas, sel endotel vaskuler serta keratinosit dan sintesis dari protein ekstraseluler matriks dan matriks metalloproteinase yang berpengaruh dalam proses kesembuhan luka sedangkan pada kondisi normal, TNF- $\alpha$  berkontribusi dalam menginduksi terjadinya apoptosis dari suatu sel, sehingga TNF- $\alpha$  tetap dapat ditemukan namun dengan jumlah yang sedikit (Ritsu *et al.*, 2017; Ranggamani *and* Lawrence, 2006).

Kelompok perlakuan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan konsentrasi bertingkat yaitu 2.5% (P1), 5% (P2) dan 7.5% (P3) menunjukkan rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  yang berbeda. Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 2.5% (P1) memiliki rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 56,00% $\pm$ 2,79. Berdasarkan hasil uji BNJ yang dilakukan didapati bahwa kelompok P1 tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif (K+) yang ditandai dengan tidak adanya perbedaan notasi serta berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan adanya perbedaan notasi. Konsentrasi yang rendah pada kelompok P1 yaitu 2.5% mengandung bahan aktif dari daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) seperti flavonoid, tanin dan fenol lebih sedikit sehingga kurang optimal dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  guna mempercepat proses penyembuhan luka infeksi.

Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 5% (P2) memiliki rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 34,05% $\pm$ 4,79 (**Tabel 5.1**). Rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  dari kelompok P2 menunjukkan penurunan dibandingkan dengan kelompok P1. Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 7.5% (P3) memiliki rata rata ekspresi TNF- $\alpha$



sebesar  $31,20\% \pm 2,17$  (**Tabel 5.1**) yang juga mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok P1. Berdasarkan hasil uji BNJ yang dilakukan didapati bahwa kelompok P2 dan P3 tidak berbeda nyata terhadap kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan tidak adanya perbedaan notasi sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) 5% dan 7.5% mampu menurunkan ekspresi dari TNF- $\alpha$  dengan efektif. Penurunan rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  yang paling tinggi ditunjukkan pada kelompok P3 dengan hampir mendekati rata rata ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok kontrol negatif (K-), membuktikan bahwa dengan ditingkatkannya konsentrasi dari daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) akan lebih efektif dalam menurunkan ekspresi sitokin pro inflamasi yaitu TNF- $\alpha$ . Ekspresi TNF- $\alpha$  mengalami penurunan akibat aktivitas anti inflamasi serta anti bakteri dari senyawa aktif yang terkandung di dalam daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.), yaitu flavonoid, tanin dan fenol. Flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi yang bekerja dengan menghambat fase penting dalam biosintesis inflamasi yaitu siklus siklooksigenase dan 5-lipooksigenase sehingga mengurangi pelepasan mediator inflamasi, selain itu flavonoid mampu merangsang sel sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* guna mempercepat kesembuhan luka. Menurut Serafini *et al.* (2010) flavonoid dapat menurunkan ekspresi dari beberapa sitokin pro-inflamasi salah satunya TNF- $\alpha$  melalui mekanisme molekuler pada aktivasi sitokin pro-inflamasi dengan menghambat faktor transkripsi NF-kB sehingga sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  tidak teraktivasi dan jumlahnya mengalami penurunan. Aktivitas anti bakteri dari senyawa aktif daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) yaitu tanin dan fenol mampu

mengelminasi bakteri MRSA dengan segera melalui mekanisme merusak dinding bakteri MRSA, mendenaturasi protein dari sel bakteri MRSA serta menginaktifkan enzim bakteri MRSA (Rekha, et al., 2014; Shetty dan Vijayalaxmi, 2012). Bakteri MRSA yang segera dieliminasi melalui aktivitas anti bakteri dari daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dapat meminimalisir migrasi sel radang seperti makrofag dan neutrofil sehingga dengan menurunnya makrofag dan neutrofil yang bermigrasi ke area luka infeksi, produksi sitokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$  juga mengalami penurunan. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  menunjukkan berakhirnya fase inflamasi dalam proses penyembuhan luka untuk kemudian berlanjut ke fase proliferasi.

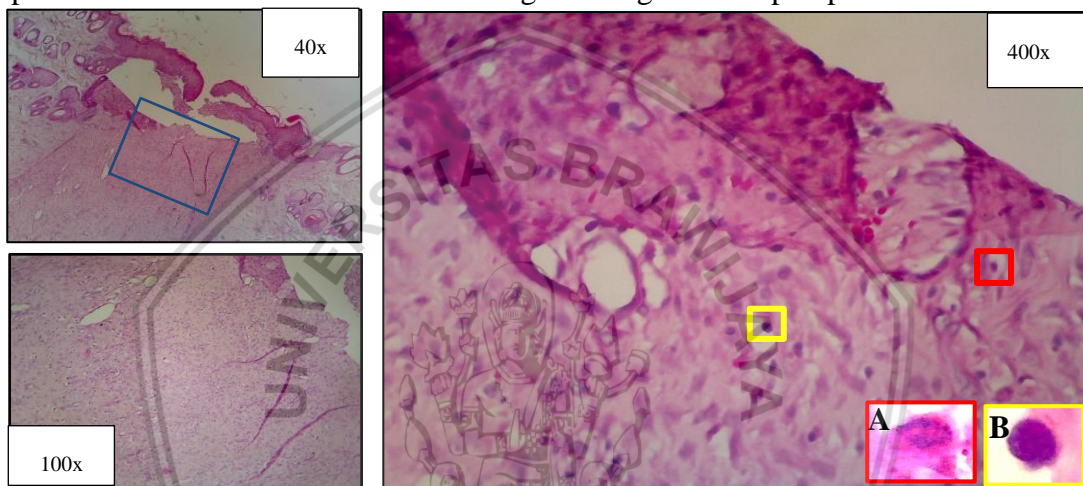
### **5.2 Efek Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap Jumlah Sel Radang pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi *Metichillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**


Sel Radang merupakan sel yang berperan penting dalam fase inflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) pasca luka insisi yang diinfeksi MRSA dengan menghitung jumlah sel radang mononuclear (MN) dan polimorfonuklear (PMN). Pengamatan dilakukan dengan pada gambaran histopatologi jaringan masing masing sampel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Perhitungan jumlah sel radang dilakukan menggunakan software *Image Raster*® dan ditunjukkan pada **Gambar 5.11** hingga **Gambar 5.15**. Gambaran histopatologi yang diamati menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE). *Hematoxyline* akan mewarnai nukleus yang bersifat asam menjadi biru gelap hingga keunguan, sedangkan Eosin akan mewarnai protein nonspesifik

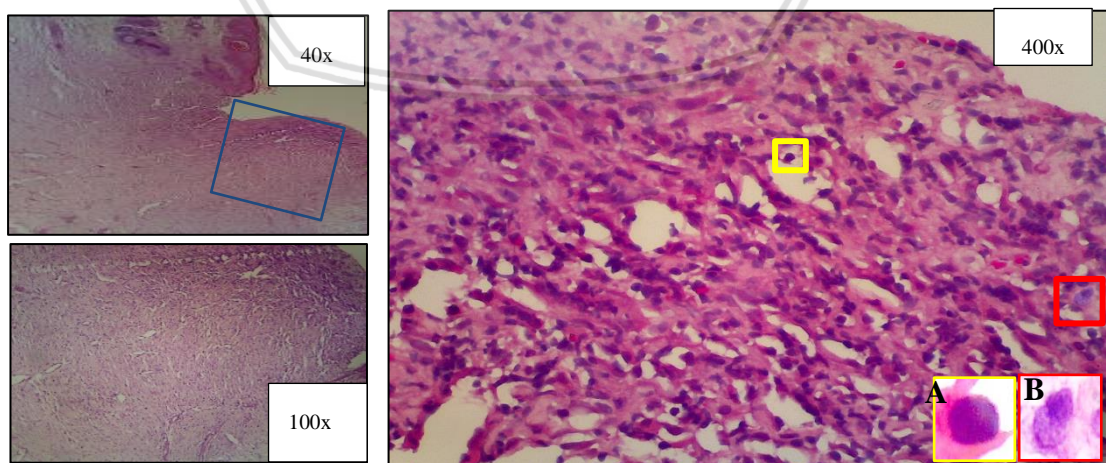
menjadi merah muda. Pewarnaan HE yang biasa dilakukan pada beberapa jaringan akan menghasilkan nukleus yang terwarnai biru dengan sitoplasma dan matriks ekstraseluler yang terwarnai merah muda (Fischer, 2008).


Gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif (K-) (**Gambar 5.11**) yang merupakan kelompok dengan perlakuan luka insisi dan diterapi dengan povidone iodine serta antibiotik topikal menunjukkan infiltrasi sel radang yang sedikit bila dibandingkan dengan gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.12**). Adanya proses re-epitelisasi yang telah terjadi pada lapisan epidermis serta adanya susunan sel fibroblas yang memadat pada lapisan dermis menunjukkan bahwa perkembangan kesembuhan luka telah memasuki fase proliferasi. Gambaran histopatologi kelompok kontrol positif (K+) (**Gambar 5.12**) yang merupakan kelompok dengan perlakuan luka insisi yang diinfeksi MRSA dan diterapi dengan salep plasebo menunjukkan perkembangan kesembuhan luka yang masih dalam fase inflamasi dengan adanya infiltrasi dari sel radang yang berfungsi dalam fagositosis dari bakteri MRSA maupun debris jaringan. Gambaran histopatologi kelompok perlakuan terapi salep ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 2.5% (P1) (**Gambar 5.13**) menunjukkan mulai terjadinya penurunan dari infiltrasi sel radang bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) meskipun perbaikan dari lapisan epidermis belum terlihat dan perbaikan dari lapisan dermis menunjukkan susunan sel fibroblas yang masih renggang. Gambaran histopatologi kelompok perlakuan terapi salep ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 5% (P2) (**Gambar 5.14**) menunjukkan mulai terjadinya perbaikan dari lapisan epidermis atau re-epitelisasi sedangkan pada lapisan dermis mulai

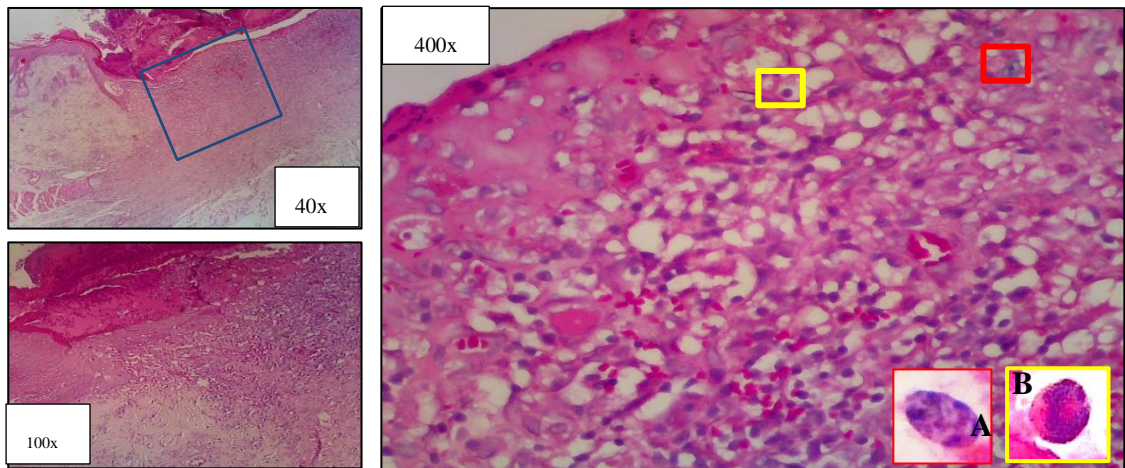
terbentuk jaringan granulasi yang tersusun dari sel fibroblas yang mulai memadat. Gambaran histopatologi kelompok perlakuan terapi salep ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 7.5% (P3) (**Gambar 5.14**) menunjukkan perbaikan lapisan epidermis yang hampir sempurna dengan menempelnya lapisan epidermis pada membran basalis, sedangkan pada lapisan dermis menunjukkan susunan sel fibroblas yang padat dan mulai beraturan bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2.



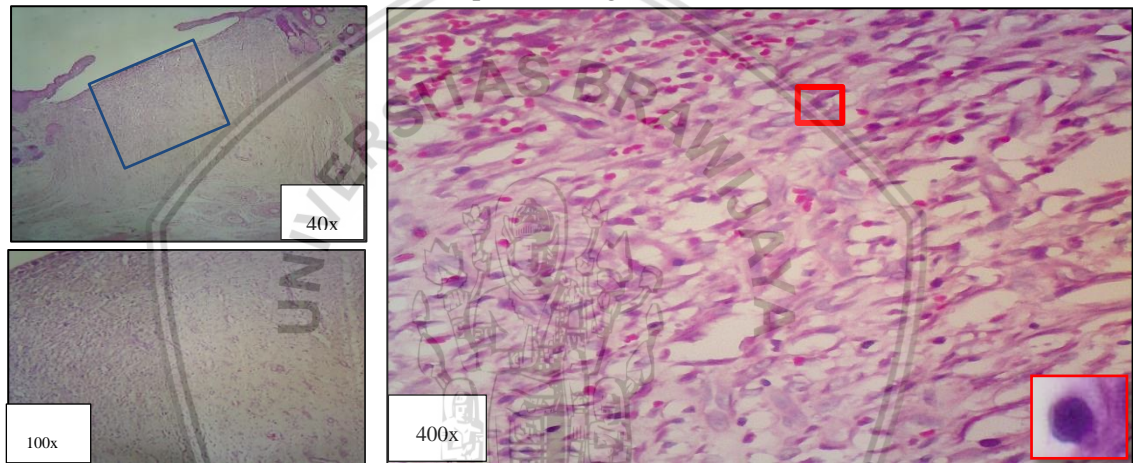
**Gambar 5.11.** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok kontrol negatif (K-) dengan kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa neutrofil (A) dan limfosit (B).



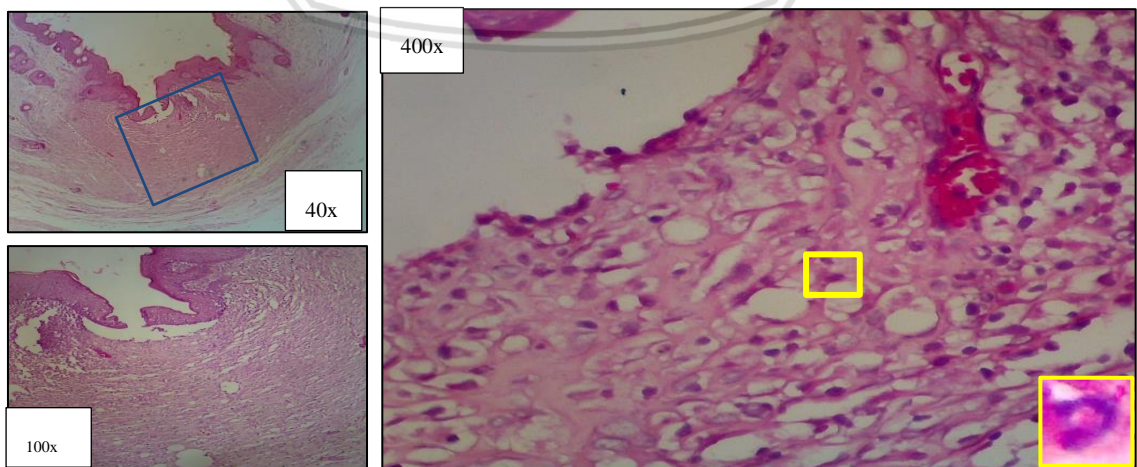
**Gambar 5.12.** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok kontrol positif (K+) dengan kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa limfosit (A) makrofag (B).



**Gambar 5.13.** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 2.5% (P1) dengan kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa makrofag (A) dan neutrofil (B).



**Gambar 5.14.** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 5% (P2) dengan kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa limfosit.



**Gambar 5.15.** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau 7.5% (P3) dengan kotak biru  menunjukkan area luka insisi yang diperbesar. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa neutrofil.

Data yang didapat kemudian dianalisis secara statistika menggunakan software IBM SPSS Statistic 22®. Dilakukan uji homogenitas dan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen dan normal. Hasil dari kedua ujia tersebut (**Lampiran 11.1 dan Lampiran 11.2**) menunjukkan bahwa data yang didapat bersifat homogen dan normal selanjutnya dilakukan uji *one way* ANOVA. Hasil dari uji *one way* ANOVA (**Lampiran 11.4**) menunjukkan nilai Sig. <0.05 yang berarti H<sub>0</sub> ditolak sehingga dapat dikatan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) memiliki efek terhadap ekspresi TNF- $\alpha$ . Untuk mengetahui kelompok dengan perbedaan rata-rata yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey (**Lampiran 11.5**). Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey yang dilakukan menunjukkan hasil sebagai berikut **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Rata-rata Jumlah Sel Radang pada Kulit Luka Infeksi MRSA dan Hasil Uji BNJ ( $\alpha=0.05$ )

No.	Perlakuan	Jumlah Sel Radang + SD
1.	Kontrol Negatif	18,25±1,05 <sup>a</sup>
2.	Kontrol Positif	39,50±2,89 <sup>b</sup>
3.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 2.5% (P1)	36,45±2,55 <sup>b</sup>
4.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 5% (P2)	21,00±1,29 <sup>a</sup>
5.	Salep ekstrak daun sirih hijau ( <i>Piper betle</i> Linn.) 7.5% (P3)	20,15±1,85 <sup>a</sup>

Keterangan : Perbedaan notasi a,b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan rata-rata jumlah sel radang terendah yaitu 18,25±1,05 (**Tabel 5.2**) dan memiliki perbedaan yang nyata terhadap kelompok kontrol positif (K+). Rendahnya jumlah sel radang pada

kelompok kontrol negatif (K-) disebabkan karena tidak terjadi infeksi MRSA pada luka, sehingga reaksi imunologis yang terjadi tidak terlalu tinggi. Adanya infiltrasi sel radang pada kelompok kontrol negatif (K-) ini disebabkan karena kerusakan jaringan kulit akibat luka insisi. Kerusakan jaringan akan menyebabkan dihasilkannya faktor kemotaktik sebagai respon inflamasi, selain sel mast yang menghasilkan histamin dan rilisnya prostaglandin serta leukotrin yang merupakan substansi dari asam arakidonat, proses koagulasi pada fase hemostasis oleh platelet juga menginisiasi dihasilkannya faktor kemotaktik seperti kalikrein, fibrinopeptid serta produk dari degradasi fibrin (Jie *et al.*, 2007). Faktor kemotaktik menyebabkan sel radang seperti neutrofil, makrofag dan limfosit migrasi ke daerah luka. Kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan rata-rata jumlah sel radang tertinggi yaitu  $39,50 \pm 2,89$  (Tabel 5.2). Tingginya rata-rata jumlah sel radang pada kelompok kontrol positif (K+) terjadi akibat adanya infeksi MRSA yang memperpanjang fase inflamasi dari proses penyembuhan luka. Bakteri MRSA akan berinteraksi dan dikenali oleh sel imun non spesifik dari kulit sehingga menyebabkan terjadinya respon berupa infiltrasi sel radang guna mengeliminasi bakteri MRSA melalui fagositosis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Pivarcsi (2005) bahwa komponen mikroba patogen akan mengaktifkan *pattern recognition receptors* (PRRs) seperti *Toll-like receptors* (TLRs) yang merupakan sel imun non spesifik dari kulit untuk mengenali *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) dari mikroba sehingga terjadi inisiasi fagositosis, produksi senyawa anti bakteri dan mediator inflamasi untuk mikroba dapat segera dieliminasi. Jika bakteri tidak segera tereliminasi, sel radang akan mengalami proliferasi dan inflamasi akut akan berlanjut menjadi inflamasi kronis.

Semua kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 menunjukkan penurunan rata-rata jumlah sel radang seiring dengan peningkatan dari konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.). Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 2.5% (P1) menunjukkan rata-rata jumlah sel radang sebesar  $36,45 \pm 2,55$  yang mengalami penurunan terhadap kontrol positif (K+). Berdasarkan hasil uji BNJ penurunan rata-rata jumlah sel radang dari kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (K+) yang ditandai dengan persamaan dari notasi dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan perbedaan notasi, sehingga dapat dinyatakan bahwa dengan konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) sebesar 2.5% mampu menurunkan jumlah sel radang namun belum optimal. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi dari ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) yang rendah mengandung senyawa aktif seperti flavanoid, tanin serta fenol yang juga rendah sehingga aktivitas antiinflamasi dan antibakteri yang dihasilkan belum mampu menurunkan jumlah sel radang secara optimal.

Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 5% (P2) memiliki rata rata jumlah sel radang sebesar  $21,00 \pm 1,29$  (**Tabel 5.2**). Rata rata jumlah sel radang dari kelompok P2 menunjukkan penurunan dari kelompok P1. Kelompok terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) konsentrasi 7.5% (P3) memiliki rata rata jumlah sel radang sebesar  $20,15 \pm 1,85$  (**Tabel 5.2**). Berdasarkan hasil uji BNJ yang dilakukan didapati bahwa kelompok P2 dan P3 tidak berbeda nyata terhadap kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan tidak adanya perbedaan notasi sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) 5%



dan 7.5% mampu menurunkan jumlah sel radang dengan efektif. Penurunan rata-rata jumlah sel radang yang paling tinggi ditunjukkan pada kelompok P3 dengan hampir mendekati rata-rata jumlah sel radang kontrol negatif (K-), membuktikan bahwa dengan ditingkatkannya konsentrasi dari daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) akan lebih efektif dalam menurunkan jumlah sel radang. Jumlah sel radang mengalami penurunan akibat efek anti bakteri dan anti inflamasi dari senyawa aktif yang terkandung di dalam daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.). Aktivitas anti bakteri dari senyawa aktif daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) yaitu tanin dan fenol mampu mengeliminasi bakteri MRSA dengan segera melalui mekanisme merusak dinding bakteri MRSA kemudian mendenaturasi protein dari sel bakteri MRSA serta menginaktifkan enzim bakteri MRSA (Rekha, et al., 2014; Shetty dan Vijayalaxmi, 2012). Protein sel bakteri akan terdenaturasi akibat fenol yang bersifat toksik menyebabkan struktur tiga dimensi protein dari bakteri terganggu dan terbuka sehingga rantai polipeptida tidak dapat mempertahankan bentuknya dan dinding sel akan mengalami kerusakan (Cowan, 1999). Bakteri MRSA yang segera dieliminasi melalui aktivitas anti bakteri dari daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dapat meminimalisir migrasi sel radang yang berfungsi sebagai sel fagosit, sehingga jumlahnya akan menurun, selain itu aktivitas anti inflamasi dari flavanoid yang terkandung dalam daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) akan mempercepat fase inflamasi dengan menghambat siklus siklooksigenase dan lipooksigenase menyebabkan mediator inflamasi yang dihasilkan seperti prostaglandin dan tromboksan (siklooksigenase) serta leukotrin (lipooksigenase) juga terhambat sehingga dengan meredanya inflamasi jumlah sel radang yang bermigrasi akan mengalami penurunan. Hal tersebut sesuai dengan pendapat

Teller *and* White (2009) yang menyatakan bahwa setelah peradangan akut mereda, permeabilitas vaskuler lokal akan segera pulih menyebabkan sel radang akan berhenti masuk ke dalam ruang ekstrasvaskuler sehingga terjadi penurunan dari jumlah sel radang. Penurunan jumlah sel radang menunjukkan berakhirnya fase inflamasi dalam proses penyembuhan luka untuk kemudian berlanjut ke fase proliferasi.



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Konsentrasi terapi pemberian salep sebesar 7,5% merupakan konsentrasi terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ .
2. Terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) mampu menurunkan jumlah sel radang pada proses penyembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Konsentrasi terapi pemberian salep sebesar 7,5% merupakan konsentrasi terbaik dalam menurunkan jumlah sel radang.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan sediaan obat lainnya sebagai perbandingan untuk menentukan efektifitas dari terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) terhadap luka insisi yang diinfeksi MRSA.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, G. 2008. *Pengembangan Sediaan Farmasi*. Bandung: ITB-Press.
- Anief, M. 2013. *Ilmu Meracik Obat: Teori dan Praktik*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Arief, M. 2007. *Farmasetika*. Yogyakarta: UGM Press.
- Bratawidjaya dan Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar* (Edisi ke 9). Jakarta: FKUI. p. 226.
- Chen, J. M. Kasper, T. Heck, K. Nakagawa, P. M. Humpert, L. Bai, G. Wu, Y. Zhang, T. Luther, M. Andrassy, S. Sciekofer, A. Hamann, M. Morcos, B. Chen, D. M. Sterm, P. P. Nawroth, and A. Bierhaus. 2005. Tissue Factor as a Link Between Wounding and Tissue Repair. *Diabetes* 52 : 2143-2154.
- Colman, R., W. Clowes, A.W, and J. N. George. 2001. *Overview of Hemostasis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins
- Cowan, M. M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. *J. Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.
- Dai, Tianhong, Gitika B. Kharkwal, Masamitsu Tanaka, Ying-Ying Huang, Vida J. Bil de Arce & Michael R. Hamblin. 2011. *Animal models of external traumatic wound infections*, *Virulence*, 2:4, 296-315
- Enoch, S. and L. D. John. 2008. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 26(2):31-37.
- Falangola, M.F., S.P. Lee, R.A. Nixon, K. Duff, and J.K. Helpert. 2005. Histological Co-Localization of Iron in Abeta Plaques of PS/APP Transgenic Mice. *Neurochemical Research*. 30(2):201-205.
- Fischer, A. H. 2008. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Scetions. *CSH Protocols*. 3(5): 1-2.
- Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Micro* 3[12], 948-958.
- Gibson, J. 2002. *Fisiologi dan Anatomi Modern untuk Perawat*. Jakarta: EGC. 479.
- Gordon, R. J., F. D. Lowy. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. *Clin Infect Dis*. 46(5): S350-9.
- Gurtner, G. C. 2007. *Wound Healing Normal and Abnormal*. Grabb and Smith's Plastic Surgery 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kalangi, S. J. R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik (JBM)* 5(3): s12-20.
- Kardono, L. B. S., Artanti, N. Dewiyanti, I.D. Basuki and T. Padmawinata. 2003. *Selected Indonesian Medical Plant Monograph and Description*. Jakarta : PT. Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Kenneth and Herbert. 2004. Synergy of Daptomycin with Oxacillin and Other  $\beta$ -Lactams against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 2871-2875.
- Kimura, Y., M. Sumiyoshi, K. Kawahira and M. Sakanaka. Effects of Ginseng Saponins Isolated from Red Ginseng Roots on Burn Wound Healing in Mice. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 148: 860-870.



- Kresno, S.B. 2003. *Imunologi, Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta : Balai Penerbit FK UI. 4-32.
- Kuma, N., P. Misra, A. Dube, S. Bhattacharya, D. Madhu and S. Ranade. 2010. Piper betle linn a maligned Pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. *Current Science*. 99(7): 922-932.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : UGM Press
- Lakhanpal. 2007. Diabetes: Patient Self Management a Discussion Paper. <http://www.effectivepractice.org.Tanggal> [5 November 2017]
- Lawrence WT, 2002. *Wound Healing Biology and Its Application to Wound Management*. Dalam: O'Leary P, penyunting. *The Physiologic Basis of Surgery*. Edisi ke-3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; h. 107-32.
- Leong, M. and L. G. Phillips, 2012. *Wound Healing*. Dalam: *Sabiston Textbook of Surgery*. Edisi ke-19. Amsterdam: Elsevier Saunders; h. 984-92
- Li, J., J. Chen and R. Kirsner. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2(5):9-18.
- Lin, Y. C. and M. L. Peterson. 2010. New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 3[6], 753-767.
- Martin, W. A. 2004. Rat Models of Skin Wound Healing: A Review. *Wound Repair and Regeneration*. 6(12): 591-599.
- Menke, N. B., K. R. Ward, T. M. Witten, D. G. Bonchev, R. F. Diegelmann. 2007. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 25: 19-25.
- Mercandetti M, and A. Cohen. 2002. Wound healing, Healing and Repair. *E-Medicine*.
- Middleton, J. R. 2005. Surveillance of Staphylococcus aureus in Veterinary Teaching Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* 43(6): 2916-2919.
- Moeljanto, R.D. dan Mulyono. 2003. *Khasiat dan Manfaat Daun Sirih, Obat Mujarab dari Masa ke Masa*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Mulyata, S. T. 2002. Analisis Imunohistokimia TGF B-1, Indikasi Hambatan Kesembuhan Luka Operasi Episiotomi pada Tikus Sprague Dawley. *1st Indonesian Simposium on Obstetric Anaesthesia*. Bandung.
- Murthy, M. B. and B. Krishnamurthy. 2009. Severe irritant contact dermatitis induced by povidone iodine solution. *Indian J Pharmacol*. 41(4): 199-200.
- Nagaraja, S., A. Wallqvist, J. Reifman, A. Y. Mitrophanov. 2014. Computational approach to characterize causative factors and molecular indicators of chronic wound inflammation. *J. Immunol*. 192, 1824-1834
- Nanayakkara, B. S., C. L. Abayasekara, G. J. Panagoda, H. M. K. Kanatiwela and M. R. Dammantha. 2014. Anti-candidal activity of Piper betle (L.), Vitex negundo (L.) and Jasminum grandiflorum (L.). *Academic Journals* 8(23): 2307-2314.
- Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, Lewis D; British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on Community-onset MRSA Infections. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant Staphylococcus aureus

- (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):976-94.
- Nelson, L. L. 2011. Small Site Infections in Small Animal Surgery. *Vet Clin Small Anim.* 41: 1041-1056.
- Nilugal, K., K. Perumal, R. E. Ugander, A. I. Chittor. 2014. Evaluation of Wound Healing Activity of Piper Betle Leaves and Stem Extract In Experimental Wistar Rats. *Am J. PharmTecg Res* 4(3).
- Orsted, H. L., D. K. Keast, J. Kuhnke, P. Armstrong. 2010. *Best Practice Recommendations for the Prevention and Management of Open Surgical Wounds.* Wound Care Canada. 8(1): 189-97
- Orsted, H. L., D. Keast, L. Forest-Lalande and M. F. Megie. 2011. Basic Principles of Wound Healing. *Sains de plaies Canada.* 9(2): 4-12.
- Pakpahan, R. Asriani, S. Khotimah dan M. Turnip. 2015. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirih (Piper betle L.) dan Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Sebagai Alternatif Pengawet Tahu. *Jurnal Protobiont.* Universitas Tanjungpura. Pontianak
- Palumpun, E. F., A. A. G. P. Wiraguna, W. Pangkahila. 2017. Pemberian ekstrak daun sirih (Piper betle) secara topikal meningkatkan ketebalan epidermis, jumlah fibroblas dan jumlah kolagen dalam proses penyembuhan luka pada tikus jantan galur Wistar (Rattus norvegicus). *Jurnal e-Biomedik (eBm)* 5(1).
- Pastar, I., A. G. Nusbaum, J. Gil, S. B. Patel, J. Valdes, O. Stojadinovic, L. R. Plano, M. Tomic-Canic and S. C. Davis. 2013. Interactions of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE* 8(2): e56846.
- Patel, S. 2010. Wound Infection. *Wound Essentials*, 5: 40-47.
- Perdanakusuma D. S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka.* Surabaya: Airlangga University School of Medicine.
- Pivarsci, A., I. Nagy and L. Kemeny. 2005. Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens. 2005. *Current Immunology Reviews* 1(1): 29-42.
- Pradhan, D., K. A. Suri, D. K. Pradhan and P. Biswasroy. 2013. Golden Heart of the Nature: Piper betle L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* Vol. 1, No. 6, pp. 147-167.
- Rakshit, T. and S. Shenoy. 2017. How Resistant Is Staphylococcus aureus to The Topical Antibiotic Mupirocin. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 8: 102-103.
- Rangamani, P. And L. Sirovich. 2007. Survival and Apoptotic Pathways Initiated by TNF- $\alpha$ : Modeling and Predictions. *Biotechnology and Bioengineering.* 97(5).
- Rekha V.P.B., M. Kollipara, B.R.S. Gupta, Y. Bharath and K.K. Pulicherla. 2014. A review on Piper betle L.: Nature's promising medicinal reservoir. *American Journal of Ethnomedicine* 1(5):276-289.
- Ritsu, M. 2017. Critical role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology and Dermatology Surgery.* 21(1): 14-19.

- Treuting, P., S. Dintzis, K. S. Montine. 2017. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat and Human Atlas*. USA: Academic Press
- Sabirin, I., A. Maskoen, B. Hernowo. 2013. *Peran Ekstrak Etanol Topikal Mengkudu (Morinda citrifolia L.) pada Penyembuhan Luka ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar*. Bandung : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Ahmad Yani Cimahi.
- Santana, G. S., E. Castro and F. Agular- Alves. 2015. Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Methicillin susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) cause dermonecrosis and bacteremia in rats. 2015. *International Research Journal of Microbiology* 6(1): 6-11.
- Saroja, M., R. Santhi and S. Annapoorani. 2012. Wound Healing Activity of Flavonoid Fraction of Cynodon dactylon in Swiss Albino Mice. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(2): 230-231.
- Schultz. *The Physiology of Wound Bed Preparation*. In: Granicks MS, Gamelli RL. *Surgical Wound Healing and Management*. Switzerland: Informa Healthcare; h. 1-16.
- Serafini, M., I. Peluso and A. Raguzzini. 2010. Sessionn 1: Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 273-278.
- Shetty and Vijayalaxmi. 2012. Phytochemical investigation of extract/solvent fractions of Piper ningrum linn. Seeds and Piper betle linn. Leaves. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(2): 344-349.
- Simor, A. E., L. S. T. L. Stuart, L. Louie, C. Watt, M. Ofner Agostini, D. Gravel, M. Mulvey, M. Loeb, A. McGeer, E. Bryce, A. Matlow and the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*. p. 3880-3886.
- Smith, J. Y. and T. P. Carr. 2005. *Prosedur Perawatan di Rumah*. Buku Kedokteran Jakarta
- Soeroso, A. 2007. Sitokin. *Oftalmologi Indonesia*. 5:171-80.
- Stacey, M. Stephen, R. Ernest. 2010. Extranasal MRSA colonization at admission to an acute care hospital. *J Infect Control Hosp Epidemiol*. 31: 42-6.
- Stankov, S. 2012. Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-Inflammatory Strategies. *The Open Inflammation Journal*. 5: 1-9.
- Stephens, P., I. B. Wall, M. J. Wilson, K. E. Hill, K. G. Harding, C. E. Davies, C. M. Hill and D. W. Thomas. 2003. Anaerobic cocci populating the deep tissue of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. *British Journal of Dermatology*. 148(3): 456-466.
- Sujono, E. 2010. *Uji Antibakteri Senyawa N-Fenil-N'-(Klorobenzoil) Tiourea Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus*. [Skripsi]. Unika Widya Mandala. Surabaya.
- Susanto, H., M. R. Indra dan S. Karyono. Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (Camellia sinensis) terhadap Ekspresi ERK1/2 PPAR $\gamma$  pada Jalur MAPK (Mitogen Activated Proteinase) Jaringan Lemak Viseral Tikus Wistar dengan Diet Tinggi Lemak. *J. Exp. Life Sci* 2(2): 89-97.

- Sutawijaya, B. G. 2009. *Gawat Darurat Panduan Kesehatan Wajib di Rumah Anda*. Aulia Publishing. Yogyakarta.
- Syukur dan Hermani. 2002. *Budidaya Tanaman Obat Komersil*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Teller, P and Therese K. W. 2009. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. *Surg Clin N Am*. 599-610
- Tuominen, V. J., S. Ruotoistenmaki, A. Viitanen, M. Jumppanen and J. Isola. 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res*; 12(4): R56.
- Von Bermuth, H. 2006. A fast procedure for the detection of defects in Toll-Like Receptors signalling. *J Immunol* 118. 2498-2500
- Wahyu, B. W., dkk., 2013. Efek antimikroba Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap bakteri *Shigella dysnteriae* kode Isolat 2312-F secara in vitro. [Skripsi] Universitas Brawijaya.
- Wardani L. P. 2009. *Efek penyembuhan luka bakar gel ekstrak etanol daun sirih (Piper betle) pada kulit punggung kelinci [skripsi]*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wasiatmadja dan Syarif. 2007. *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*. Jakarta: UI press, 3-8.
- Wolfensohn, S. and M. Lloyd. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare 3<sup>rd</sup> ed*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Zayyan, A. B., M. Y. I. Nahzi dan I. Kustiyah. 2016. Pengaruh Kulit Manggis (*Garcina Mangostana L.*) Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Inflamasi Pulpa. *Dentino (Jur. Ked. Gigi)* 1(2): 140-145.
- Zhao, R., H. Liang, E. Clarke, C. Jackson and M. Xue. 2016. Inflammation in Chronic Wounds. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2085