

repository.ub.ac.id

**UJI EFEKTIVITAS SALEP KITOSAN CANGKANG RAJUNGAN
(*Portunuspelagicus*) DIBANDINGKAN DENGAN SALEP
KOMERSIAL TERHADAP EKSPRESI EPIDERMAL
GROWTH FACTOR (EGF) DAN KETEBALAN
EPIDERMIS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODELLUKA BAKAR**

SKRIPSI

Sebagaimana syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Kedokteran Hewan

Oleh:

**WINDA HERMIN AYULIAN
145130101111055**



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



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Uji Efektivitas Salep Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
Dibandingkan dengan Salep Komersial terhadap Ekspresi *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan Ketebalan Epidermis Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar**

Oleh:

**WINDA HERMIN AYULIAN
145130101111055**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengujian pada tanggal 07 Agustus 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App., SC
NIP. 19580711199203 2 002

drh. Dahliatul Qosimah, Mkes.
NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Winda Hermin Ayulian

NIM : 145130101111055

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi Berjudul :

Uji Efektivitas Salep Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
Dibandingkan dengan Salep Komersial terhadap Ekspresi *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan Ketebalan Epidermis Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar.

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 termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tuliskan terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian Pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 07 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Winda Hermin Ayulian)

NIM. 145130101111055

Uji Efektivitas Salep Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
 Dibandingkan dengan Salep Komersial terhadap Ekspresi *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan Ketebalan Epidermis Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar

ABSTRAK

Luka bakar merupakan salah satu trauma yang sering terjadi dalam kehidupan sehari-hari. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak cangkang rajungan yang mengandung kitosan dapat digunakan sebagai bahan pengobatan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui uji efektivitas salep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dibandingkan dengan salep komersial (*neomycin sulfate* dan ekstrak *placenta*) terhadap ketebalan epidermis serta ekspresi EGF (*Epidermal Growth Factor*) pada kulit tikus model luka bakar. Tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan berumur 2-3 bulan dan diberikan perlakuan luka bakar derajat II dalam padakulit tikus. Tikus dibagi dalam 2 kelompok terasalep kitosan dan salep komersial yang masing-masing terdiri dari 12 ekor tikus, terbagi dalam 3 sub kelompok dengan pemberian terapi pada hari ke 1, ke 3, dan ke-7. Ketebalan epidermis diamati secara histopatologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) dan ekspresi EGF diukur dengan menggunakan metode imunohistokimia. Analisa data dilakukan dengan uji *Independent T-test* ($\alpha=0,05$). Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian salep kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) tidak berbeda nyata dengan salep komersial terhadap peningkatan ekspresi EGF dan ketebalan epidermis mulai hari ke-3. Kesimpulan dari penelitian ini salep kitosan 5% dapat digunakan sebagai alternatif terapi luka bakar.

Kata kunci : Epidermis, *Growth Factor*, Kitosan, Luka Bakar, Salep Komersial.

Effectiveness Test of Chitosan Ointment from Crabs (*Portunuspelagicus*) Shell Compared with Commercial Ointment in Expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and Epidermal Thickness in Rat (*Rattusnorvegicus*) Burns Model

ABSTRACT

Burn is one of the most common trauma found in daily life. Several studies have shown that chitosan contained in crab shell is available to be used as wound treatment material. This study aims to determine the effectiveness of chitosan ointment extracted from crabs (*Portunuspelagicus*) then compared to commercial ointment (neomycin sulfate and placenta extract) in increasing epidermal thickness and EGF (Epidermal Growth Factor) expression on rat skin in burn model. The rat used in this study were white male rat (*Rattusnorvegicus*) Wistar strain aged 2-3 months given second stadium burns on their skin. Rats population was divided into 2 groups, each group consists of 12 rats. A group was treated with chitosan ointment and one other was treated with commercial ointment. The groups were divided into 3 subgroups with therapy on day 1, 3, and 7th. The thickness of the epidermis was observed histopathologically by Hematoxylen Eosin (HE) staining and EGF expression was measured using immunohistochemical methods. Data analysis was performed in Independent T-test ($\alpha = 0,05$). The results of this study showed that chitosan ointment extracted from crabs (*Portunuspelagicus*) shell had no significant difference with commercial ointment in increasing EGF expression and epidermal thickness from day 3. It can be concluded that 5% chitosan ointment can be used as alternative burns therapy.

Keywords: Chitosan, Commercial Ointment, Burn, Epidermis, Growth Factor.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Salep KITOSAN Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Dibandingkan dengan Salep terhadap Ekspresi *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan Ketebalan Epidermis Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar”.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantudalam menyelesaikan skripsi, yaitu :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.,SC., selaku dosen pembimbing pertama, atas kesabaran, ilmu, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan untuk penulis, sehingga dapat menyusun skripsi ini sebaik mungkin.
2. drh. Dahliatul Qosimah, Mkes., selaku dosen pembimbing kedua, atas dorongan semangat, bimbingan, nasihat, arahnya, serta tambahan ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Desi Wulansari, M.Vet., sebagai penguji pertama, yang telah memberikan masukan, kritik, dan saran demi kesempurnaandalampenulisanskripsi ini.
4. drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si., selaku dosen penguji kedua, yang telah memberikan saran

dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

5. Orang tua Heri Sutopo, Hari Suparmi, dan kedua adik tercinta yang selalu memberikandoa, dukungan, semangat, dan motivasi yang tiada henti untuk penulis, sehingga semua menjadi lancar dalam pengerjaan laporan skripsi.
6. Sahabat Nadila Dwi Ashlina, Garnis Retno Susanti, Novembrianti Handayan dan Annisa Widowati, serta kurekansatutim dan sahabat yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
7. Teman-teman “Chelonia 2014 C”, serta mahasiswa FKH UB yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
8. Serta semua pihak yang telah membantupenyusunan laporan skripsi, sehingga kegiatan ini dapat terselesaikan dengan lancar.

Penulis berharap skripsi ini dapat diterima,

sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menerima masukan berupa kritik dan saran agar skripsi ini menjadi lebih baik.

Malang, 08 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1.PENDAHULUAN	
1.1 LatarBelakang.....	1
1.2 RumusanMasalah.....	3
1.3 BatasanMasalah.....	4
1.4 TujuanPenelitian.....	5
1.5 ManfaatPenelitian.....	6
BAB 2.TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Luka Bakar	7
2.1.1 Pengertian Luka Bakar	7
2.1.2 Etiologi Luka Bakar.....	7
2.1.3 Patofisiologi Luka Bakar	9
2.1.4 Klasifikasi Luka Bakar	9
2.1.5 Proses Penyembuhan Luka.....	12

2.1.6 Ekspresi <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) pada Proses Kesembuhan Luka	19
2.2 Kulit	20
2.2.1 AnatomidanHistologiKulit	22
2.2.2 FisiologiKulit.....	24
2.3Rajungan (<i>Portunuspelagicus</i>)	24
2.3.1 KlasifikasiRajungan.....	24
2.3.2MorfologiRajungan	25
2.3.3KandunganCangkangRajungan	26
2.3.4Kitosan.....	27
2.4 SalepKomersial.....	29
2.4.1 NeomisinSulfat	29
2.4.2 EkstrakPlasenta.....	30
2.5TikusPutih (<i>Rattusnorvegicus</i>)	31
2.5.1Klasifikasi.....	31
2.5.2 AnatomiTikusPutih.....	32
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 KerangkaKonsep	33
3.2 HipotesisPenelitian	36
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 TempatdanWaktuPenelitian.....	37
4.2 AlatdanBahan	37
4.3 TahapanPenelitian	38
4.3.1 RancanganPenelitian	38
4.3.2 PenetapanSampelPenelitian.....	39
4.3.3 VariabelPenelitian	40
4.4 ProsedurKerja	40
4.4.1 PersiapanHewanCoba.....	40
4.4.2 ProsedurEkstrakKitosanCangkangRajungan.....	41
4.4.3 PembuatanSalepKitosanCangkangRajungan.....	43
4.4.4 Pembuatan Luka BakarpadaTikus.....	43



4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan	44
4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit	44
4.4.7 Pengukuran Ketebalan Epidemis Kulit	46
4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi EGF	46
4.4.9 Analisa Data	48
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Hasil Uji FTIR pada Kitosan Cangkang Rajungan	49
5.2 Tikus Pasca Diinduksi Luka Bakar Derajat II Dalam	50
5.3 Efek Pemberian Kitosan Cangkang Rajungan pada Tikus Model Luka Bakar terhadap Ketebalan epidermis	54
5.4 Efek Pemberian Kitosan Cangkang Rajungan pada Tikus Model Luka Bakar terhadap Ekspresi EGF	62
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	69
6.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	78



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Tabel Sumber-Sumber Kitosan	28
5.1 Data Ketebalan Epidermis Kelompok Perlakuan Salep Kitosan dan Kelompok Salep Komersial hari ke-1, ke-3, ke-7	60
5.2 Data Ekspresi EGF	64



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Derajat Luka Bakar	10
2.2 PotonganMelintangKulitTikusPerbesaran 400x	21
2.3 HistologiKulitTikusdenganPewarnaan HE padaPerbesaran 20X	22
2.4 MorfologiRajungan	26
2.5 TikusPutih (<i>Rattusnorvegicus</i>).....	32
5.1 GambarMakroskopis Proses Kesembuhan Luka BakarDerajat II Dalampadahari ke-1, ke-3, ke-7	51
5.2 GambarHistopatologi Luka Bakar B1	55
5.3 GambarHistopatologi Luka BakarB3	55
5.4 GambarHistopatologi Luka Bakar B7	56
5.5 GamabrHistopatologi Luka Bakar K1	56
5.6 GamabrHistopatologi Luka Bakar K3	57
5.7 GambarHistopatologi Luka Bakar K7	57
5.8 Diagram Perbandingan Rata-rata Ketebalan Epidermis KelompokSalepkomersialdanKitosan 5%	60
5.9 Gambar IHK Ekspresi EGF hari ke-1, ke-3, ke-7.....	63
5.10 Diagram Perbandingan Rata-rata EkspresiEGF KelompokSalepKomersialdanKitosan 5%	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Layak Etik	79
2. Kerangka Operasional	80
3. Langkah Kerja Penelitian	81
4. Perhitungan Konsentrasi Salep Kitosan	87
5. Uji Kitosan Cangkang Rajungan	88
6. Data IHK Ekspresi EGF dan Ketebalan Epidermis	89
7. Hasil Uji Statistika Pengaruh Kitosan Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) Terhadap Ekspresi EGF pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Bakar	91
8. Hasil Uji Statistika Pengaruh Kitosan Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) terhadap Ketebalan Epidermis Kulit Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Luka Bakar	95
9. Dokumentasi Penelitian	99

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
®	<i>Registered Trade Mark</i>
%	Persentase
BB	BeratBadan
g	Gram
Kg	Kilogram
Mg	Miligram
mL	Mililiter
Ca ²⁺	<i>Calcium</i>
CaCO ₃	<i>Calcium Carbonate</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
LD ₅₀	<i>Lethal Dose 50</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCO ₃	<i>Magnesium Carbonate</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMN	Polimorfonuklear
RAL	RancanganAcakLengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF- α	<i>Trnasforming Growth Factor Alpha</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar merupakan salah satu trauma yang sering terjadi dalam kehidupan sehari-hari, bahkan sering kali merupakan kecelakaan massal (*mass disaster*). Menurut *World Fire Statistics Centre* pada tahun 2003 hingga 2005, tercatat negara yang memiliki prevalensi terendah terjadinya luka bakar adalah Singapura sebesar 0.12% dan yang tertinggi adalah Hongaria sebesar 1.98%, menurut Riset Kesehatan Dasar Depkes RI 2007 prevalensi luka bakar di Indonesia tertinggi terdapat di provinsi Nangroe Aceh Darussalam dan Kepulauan Riau sebesar 3.8% (Awan, 2014). Kasus luka bakar pernah terjadi di India pada 14 ekor hewan ternak berupa sapi dan kerbau (Morwal, 2016). Di Indonesia sendiri tingkat kejadian luka bakar pada hewan belum ada pendataan secara keseluruhan, akan tetapi kejadian luka bakar pada hewan di Indonesia tergolong rendah.

Luka bakar yang terjadi dapat disebabkan adanya kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik dan radiasi sehingga mengalami kerusakan jaringan kulit (Moenadjat, 2003). Kulit pada luka bakar akan mengalami kerusakan pada epidermis, dermis maupun jaringan subkutan tergantung faktor penyebab dan lamanya kontak kulit dengan sumber panas. Meningkatkan efisiensi dan efektifitas dari perbaikan jaringan yang

terluka perludikembangkanberbagaiupayauntukmempercepatdanmenyembuhkan proses penyembuhan luka (Huttenclocher dan Horwitz, 2007).

Proses penyembuhan luka sendiri dapat diartikan sebagai, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi. Ketika adanya luka dalam tubuh, akan memicusitokin dan *growth factor* untuk muncul. *Growth factor* sendiri terdapat di berbagai bagian, salah satunya adalah *Epidermal Growth Factor* (EGF). EGF berpartisipasi dalam penyembuhan luka di kulit melalui stimulasi, proliferasi, dan migrasi keratinosit, sel endotel, dan fibroblast dan memfasilitasi regenerasi kulit. EGF adalah salah satu molekul pemberi sinyal kunci dalam merangsang motilitas sel epitel, dan menjadikan faktor yang diperlukan untuk reepitelisasi (Acosta *et al.*, 2006; Bodnar, 2013).

Beberapa obat topikal digunakan untuk proses penyembuhan luka bakar, diantaranya Bioplacenton®, *Silver sulfadiazine*, Bacitracin dan Mafenide acetate. Obat topikal yang terkenal yaitu Bioplacenton® dengan kandungan ekstrak placenta bekerja untuk membentuk jaringan baru dan neomisin sulfat mencegah infeksi pada area luka (Kalberned, 2013). Dibalik keefektifan obat-obat tersebut terdapat efek samping yang menyertai, seperti pada penggunaan bioplacenton® yang merupakan golongan obat keras dapat menyebabkan reaksi hipersensitifitas pada kulit (Kalberned, 2013). Adanya efek samping dari obat sintesis, banyak peneliti yang menggunakan terapi alternatif dengan menggunakan bahan alami yang adapada tumbuhan maupun hewan. Penggunaan bahan alami yang tepat untuk

proses kesembuhan luka, salah satunya berasal dari cangkang hewan yang mengandung kitosan yaitu rajungan.

Kitosan memiliki sifat bakterostatik, fungistatik, haemostatik, mempengaruhi aktivitas makrofag, serta menstimulasi proliferasi sel dan susunan jaringan. Kitosan secara bertahap mengalami polimerisasi untuk melepaskan N-asetil-b-D-glukosamin, yang memicu proliferasi fibroblast, membantu deposisi kolagen, serta meningkatkan sintesis asam hialuronik alami di lokasi luka. Kitosan sebagai antiinflamasi yaitu mengurangi produksi COX-2 sehingga akan menekan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi secara berlebihan seperti IL-4 dan akan menghambat PGE₂ yang bekerja sebagai mediator inflamasi, selanjutnya kitosan sebagai anti mikroba akan berikat dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran terutama menyebabkan kebocoran bagian intrasel mikroba. Kitosan dapat meningkatkan kolagen dan mempercepat regenerasi sel (reepitelisasi) dan sekresi sitokin selama proses penyembuhan luka (Anggraeni, 2012; Hanifah, 2015; Paul dan Sharma, 2004; Ratnawati, 2014).

Berdasarkan uraian di atas, tujuan penelitian ini difokuskan pada uji efektivitas salep kitosan dari ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dibandingkan dengan salep komersial terhadap peningkatan ekspresi EGF (*Epidermal Growth Factor*) dan ketebalan epidermis pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang akan diselesaikan adalah:

1. Apakah terdapat perbedaan nyata terapi salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) padatikus (*Rattus norvegicus*) model lukabakardengansalep komersial terhadap peningkatan ekspresi EGF hari ke-1, ke-3, dan ke-7?
2. Apakah terdapat perbedaan nyata terapi salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) padatikus (*Rattus norvegicus*) model lukabakardengansalep komersial terhadap peningkatan ketebalan epidermis kulit?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa galur Wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan < 150 gram. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan layaketik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No: 942-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Cangkang rajungan yang digunakan adalah cangkang *Portunus pelagicus* dari pengolahan rajungan di daerah Sampang, Madura.
3. Induksi lukabakardilakukan melalui kontak langsung dengan agenternal yang telah dimasukkan dalam air bersuhu 100°C durasi 15

menit diletakkan pada kulit selama 15

detik sehingga dihasilkan lukabakar derajat II tipe dalam (Akhoodinasab, 2014).

4. Pembuatan salep kitosan ekstrak cangkang rajungan dilakukan dengan mencampur kitosan ekstrak cangkang rajungan dengan konsentrasi 5% (Putri, 2012), ke dalam dasar salep yang dibuat sediaan total sebanyak 14 gram.
5. Pemberian terapi salep kitosan cangkang rajungan pada hewan model langsung diberikan setelah dilakukan lukabakar dan dilanjutkan pada hari ke-1, hari ke-3 dan hari ke-7 tiap kelompok terapi.
6. Salep komersial mengandung *Neomycin Sulfate* dan Ekstrak *Placenta* dengan nama dagang salep *Bioplacenton®* pada hewan model kelompok kontrol positif.
7. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi EGF dengan imunohistokimia dan ketebalan epidermis dengan preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan *Hewatoxylin Eosin* (HE) perbesaran 100x dan 400x, dilihat dengan lima lapang pandang.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan yaitu :

1. Mengetahui perbedaan antar perbandingan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan salep komersial pada tikus (*Rattus norvegicus*) model lukabakar terhadap peningkatan ekspresi EGF.

2. Mengetahui perbedaan antar perbandingan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan salep komersial pada tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar terhadap peningkatan ketebalan epidermis kulit.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi tentang perbandingan salep kitosan cangkang rajungan dengan salep komersial untuk mengobat luka bakar pada hewan model tikus putih terhadap peningkatan ekspresi EGF dan ketebalan epidermis, serta kitosan dapat digunakan sebagai alternatif lain untuk mengobat luka bakar.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka Bakar

2.1.1 Pengertian Luka Bakar

Luka bakar termasuk kecelakaan yang sering terjadi dalam kehidupan sehari-hari khususnya di rumah tangga dan yang sering ditemukan adalah luka bakar derajat II. Luka bakar adalah bentuk kerusakan jaringan yang disebabkan kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik, dan radiasi. Luka bakar terjadi pada kulit, selaput lendir, saluran pernafasan, dan saluran cerna. Gejalanya berupa sakit, bengkak, merah, melepuh karena permeabilitas pembuluh darah yang meningkat (Rahayuningsih, 2013).

Kerusakan jaringan yang disebabkan api dan koloid (misalnya bubuk panas) lebih berat dibandingkan air panas. Ledakan dapat menimbulkan luka bakar dan menyebabkan kerusakan organ. Bahan kimia terutama asam menyebabkan kerusakan yang hebat akibat reaksi jaringan sehingga terjadi diskonfigurasi jaringan yang menyebabkan gangguan proses penyembuhan. Lama kontak jaringan dengan sumber panas menentukan luas dan kedalaman kerusakan jaringan. Semakin lama waktu kontak, semakin luas dan dalam kerusakan jaringan yang terjadi (Moenadjat, 2003).

2.1.2 Etiologi Luka Bakar

Luka bakar merupakan penyebab kematian ketiga akibat kecelakaan pada manusia di semua kelompok umur, maka dari itu kecelakaan akibat

luka bakar juga sangat memungkinkan untuk terjadi pada hewan terutama hewan peliharaan. Adapun mekanisme injurinya meliputi:

I. Luka Bakar *Thermal*

Luka bakar *thermal* (panas) disebabkan karena terpapar atau kontak dengan api, cairan panas atau objek panas lainnya (Rudall dan Green, 2010).

II. Luka Bakar *Chemical*

Luka bakar *chemical* (kimia) disebabkan oleh kontak jaringan kulit dengan asam atau basa kuat. Konsentrasi zat kimia, lamanya kontak dan banyaknya jaringan yang terpapar menentukan luasnya injuri karena zat kimia ini. Luka bakar kimia dapat terjadi misalnya karena kontak dengan zat-zat pembersih yang sering digunakan untuk keperluan rumah tangga dan berbagai zat kimia yang digunakan dalam bidang industri, pertanian dan militer. Lebih dari 25.000 produk zat kimia diketahui dapat menyebabkan luka bakar (Yapa dan Enoch, 2009).

III. Luka Bakar *Electric*

Luka bakar *electric* (listrik) disebabkan oleh panas yang digerakkan dari energi listrik yang dihantarkan melalui tubuh. Berat ringannya luka dipengaruhi oleh lamanya kontak, tingginya voltase dan cara gelombang elektrik itu sampai mengenai tubuh (Risma, 2016).

IV. Luka Bakar *Radiation*

Luka bakar *radiation* (radiasi) disebabkan oleh paparan dengan sumber radioaktif. Tipe injuri ini seringkali berhubungan dengan penggunaan radiasi ion pada industri atau dari sumber radiasi untuk keperluan terapeutik pada dunia kedokteran. Terbakar oleh sinar matahari akibat paparan yang terlalu lama juga merupakan salah satu tipe luka bakar radiasi (Rahayuningsih, 2013).

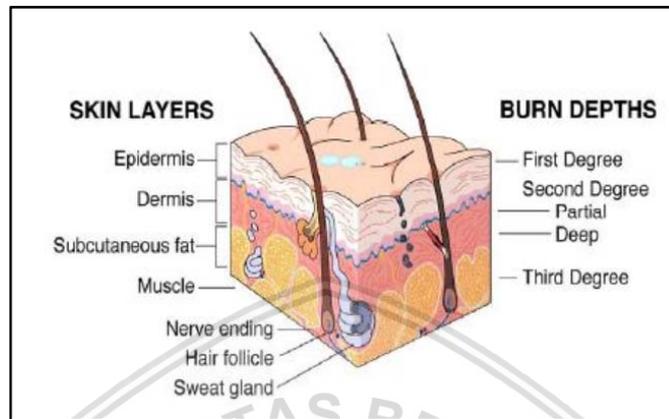
2.1.3 Patofisiologi Luka Bakar

Panas yang mengenai tubuh tidak hanya mengakibatkan kerusakan lokal tetapi memiliki efek sistemik. Perubahan ini khusus terjadi pada luka bakar dan umumnya tidak ditemui pada luka yang disebabkan oleh cedera lainnya. Karena efek panas terdapat perubahan sistemik peningkatan permeabilitas kapiler. Hal ini menyebabkan plasma bocor keluar dari kapiler ke ruang interstisial. Peningkatan permeabilitas kapiler dan kebocoran plasma maksimal muncul dalam 8 jam pertama dan berlanjut sampai 48 jam. Setelah 48 jam permeabilitas kapiler kembali normal atau membentuk thrombus yang menjadikan tidak adanya aliran sirkulasi darah. Hilangnya plasma merupakan penyebab syok hipovolemik pada penderita luka bakar. Jumlah kehilangan cairan tergantung pada luasnya luka bakar (Moenadjat, 2003; Tiwari, 2012).

2.1.4 Klasifikasi Luka Bakar

Tingkat keparahan luka bakar berkenaan dengan lamanya waktu paparan, temperatur sumber panas dan ketebalan kulit. Berdasarkan

kedalaman jaringan yang mengalami cedera, luka bakar dapat dibagi menjadi beberapa derajat yang dapat dilihat pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1. Derajat luka bakar (Kagan *et al.*, 2009)

I. Luka Bakar Derajat I

Derajat I, menunjukkan kerusakan epitel di epidermis. Karakteristik luka yang berwarna merah, lunak, dan terasa sakit merupakan ciri utama pada derajat ini. Lepuhan tidak terjadi dan epidermis masih menempel pada dermis. Penyembuhan terjadi dalam beberapa hari tanpa jaringan parut. Epidermal yang masih menempel menyebabkan respon metabolis dan risiko infeksi minimal. Penyebab paling banyak dari luka bakar derajat I adalah *flash burn* dan *sunburn* (Yasti *et al.*, 2015).

II. Luka Bakar Derajat II

Derajat II, kedalaman *superficial partial* dan *deep partial* merupakan dua tipe luka bakar derajat II. Karakteristik yang tampak pada derajat ini, beberapa komponen pelengkap kulit masih ada, sehingga perbaikan epitel tidak membutuhkan *skin grafting*. Luka bakar kedalaman *superficial partial* melibatkan kerusakan epidermis

dan dermis bagian *superficial* (papilar), sering terlihat kulit luka menipis dan terdapat lepuhan berisi air. Luka bakar menunjukkan warna merah muda, lembab dan lunak saat disentuh. Penyembuhan terjadi sekitar 2-3 minggu, biasanya tanpa jaringan parut, yang berasal dari pertumbuhan calon epitel dari kelenjar sebacea dan kelenjar keringat di lapisan dermis (Gauglitz dan Jeschke, 2012).

Luka bakar kedalaman *deep partial* meluas hingga dermis bagian retikular. Kulit biasanya menunjukkan warna campuran merah dan putih dan *capillary refill* lambat. Lepuhan kulit tebal dan terdapat retakan. Epidermis terlepas dari bagian dermis, tetapi masih dapat merasakan tekanan dan rangsangan yang dilakukan pada area luka. Reepitelisasi biasanya terjadi pada hari ke 7-10 setelah terjadi luka. Resiko jaringan parut hipertonic sangat kecil. Pada kondisi ini, jaringan akan mengalami epitelisasi spontan yang berasal dari kelenjar-kelenjar epithelial yang terdapat di lapisan terdalam dermis dan penyembuhan terjadi dalam waktu 3-6 minggu (jika tidak terjadi infeksi). Kapasitas untuk melakukan reepitelisasi pada derajat ini rendah, pembentukan jaringan parut hipertropik sangat mungkin terjadi. Pada luka bakar kedalaman *deep partial* membutuhkan pengobatan menggunakan antimikroba topikal untuk mencegah infeksi selama proses penyembuhan (Edlich, 2017).

III. Luka Bakar Derajat III

Derajat III, menunjukkan kerusakan di seluruh bagian epidermis dan dermis. Jaringan kapiler di lapisan dermis seutuhnya

mengalami kerusakan. Luka bakar menunjukkan warna putih atau tampak kasar beserta gumpalan pembuluh darah dan *anesthetic*. Jika ukuran luka bakar melebihi 1 cm, *skin grafting* selalu dibutuhkan untuk menutupi area yang rusak. Luka bakar derajat III dapat disebabkan oleh api, bahan kimia, tercelup cairan yang sangat panas dan listrik bervoltase tinggi (Rudall dan Green, 2010).

IV. Luka Bakar Derajat IV

Derajat IV, menyebabkan kerusakan seluruh bagian kulit dan jaringan subkutan termasuk lapisan dibawah *fascia*, otot, tulang dan struktur lainnya. Luka ini membutuhkan *extensive debridement* dan *complex reconstruction* pada setiap jaringan, biasanya menyebabkan kecacatan. Luka bakar derajat IV disebabkan paparan terus menerus pada penyembuhan luka bakar derajat III (Risma, 2016).

2.1.5 Proses Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka bakar mempunyai persamaan dalam fase penyembuhan luka pada umumnya, perbedaannya adalah pada durasi setiap tahap (Tiwari, 2012). Pada umumnya, penyembuhan luka dibagi dalam 3 fase yang saling tumpang tindih. Fase awal atau fase inflamasi dimulai segera setelah terjadinya suatu trauma atau cedera, dengan tujuan untuk menyingkirkan jaringan mati dan mencegah infeksi. Fase kedua fase proliferasi, dimana akan terjadi keseimbangan antara pembentukan parut dan regenerasi jaringan. Fase yang paling akhir merupakan fase yang terpanjang dan hingga saat ini merupakan fase yang paling sedikit

dipahami, yakni fase maturasi atau *remodeling* yang bertujuan memaksimalkan kekuatan dan integritas struktur dari luka (Gurtner, 2007).

I. Fase hemostasis

Hemostasis adalah kemampuan tubuh untuk menghentikan perdarahan pada saat terjadinya trauma dan mencegah terjadinya perdarahan spontan yang berkelanjutan. Trauma akibat luka bakar dapat menyebabkan pembuluh darah pada lapisan kulit rusak hingga menimbulkan perdarahan (Sjamsuhidayat *et al.*, 2010). Pembuluh darah yang rusak akan melakukan mekanisme vasokonstriksi untuk menghentikan perdarahan melalui reflek neurogenik dan sekresi lokal endotelin. Akibat adanya kerusakan endotel pembuluh darah menyebabkan terpaparnya matriks ekstrasel subendotel yang bersifat trombogenik mendorong terjadinya proses adhesi, aktivasi dan agregasi trombosit untuk membentuk plak trombosit (Yulita, 2018).

Plak trombosit akan diperkuat oleh benang-benang fibrin yang diperoleh dari pemecahan fibrinogen oleh thrombin yang diaktivasi oleh tromboplastin akibat adanya kerusakan pada pembuluh darah (Yulita, 2018). Plak trombosit yang terbentuk dari fase hemostasis akan melepaskan kemotraktan berupa sitokin proinflamasi dan *growth factor* seperti *Transforming Growth Factor* (TGF- β), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) dan *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang akan menarik sel radang, sel endotel dan fibroblast yang ada di sekitar daerah luka (Rowan *et al.*, 2015).

II. Fase inflamasi (*lag phase*)

Fase inflamasi dimulai segera setelah terjadinya trauma dan umumnya sampai hari ke-5 pasca trauma. Tujuan utama fase ini pada umumnya adalah hemostasis, hilangnya jaringan yang mati dan pencegahan kolonisasi maupun infeksi oleh agen mikrobial patogen. Perbedaan antara luka bakar dan luka biasa pada fase ini yaitu pada luka bakar terjadi vasodilatasi lokal dengan ekstravasasi cairan dalam ruang ketiga. Dalam luka bakar yang luas, adanya peningkatan permeabilitas kapiler menyebabkan ekstravasasi plasma yang cukup banyak dan membutuhkan penggantian cairan (Tiwari, 2012; Putri, 2012).

Pada luka bakar, proses koagulasi akibat panas menyebabkan dilepaskannya faktor kemotaktik seperti kalkireins dan peptida fibrin, sedangkan sel mast melepaskan faktor nekrosis tumor, histamin, protease, leukotriens dan sitokin sehingga migrasi sel-sel inflamasi. Neutrophil dan konosit merupakan sel pertama yang bermigrasi di lokasi peradangan (Gurtner, 2007).

Berbagai mediator inflamasi yakni *prostaglandin*, *interleukin-1* (IL – 1), *tumor necrosis factor* (TNF), C5a, TGF- β dan produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) akan menarik sel neutrophil sehingga menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka. Migrasi netrofil ke luka juga dimungkinkan karena peningkatan permeabilitas kapiler akibat terlepasnya serotonin dan histamin oleh sel mast dan jaringan ikat. Netrofil pada umumnya akan ditemukan

pada 2 hari pertama dan berperan penting untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah infeksi. (Gurtner, 2007; Risma, 2016).

Makrofag juga akan mengikuti netrofil menuju luka setelah 48–72 jam dan menjadi sel dominan setelah hari ketiga pasca trauma. Debris dan bakteri akan difagositosis oleh makrofag. Makrofag juga berperan utama memproduksi berbagai *growth factor* yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstraseluler oleh fibroblast dan pembentukan neovaskularisasi. Keberadaan makrofag oleh karenanya sangat penting dalam fase inflamasi ini (Gurtner, 2007; Yapa dan Enoch, 2009).

Pada luka bakar sel-sel inflamasi diatas membantu dalam fagositosis, pembersihan jaringan yang mati dan racun yang dikeluarkan oleh jaringan yang terbakar. Selain melalui proses fagositosis, netrofil dan makrofag juga berperan dalam eliminasi bakteri dengan cara memproduksi dan melepaskan beberapa proteinase dan *reactive oxygen species* (ROS). ROS melalui sifat radikal bebasnya penting dalam mencegah infeksi bakterial, namun tingginya kadar ROS secara berkepanjangan juga akan menginduksi kerusakan sel tubuh lainnya. ROS juga mengaktifasi dan mempertahankan kaskade asam arakidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator inflamasi lagi seperti prostaglandin dan leukotrien, sehingga proses inflamasi akan menjadi berkepanjangan (Lima *et al.*, 2009).

Pada akhir fase inflamasi, mulai terbentuk jaringan granulasi yang berwarna kemerahan, lunak dan granuler. Jaringan granulasi adalah suatu jaringan kaya vaskuler, berumur pendek, kaya fibroblast, kapiler dan sel radang tetapi tidak mengandung ujung saraf (Anderson, 2006). Jaringan granulasi menyediakan lingkungan yang secara metabolik mendukung proses penyembuhan luka.

III. Fase Proliferasi (fibroplasia, regenerasi)

Fase proliferasi berlangsung umumnya mulai hari ke-4. Pada luka bakar superfisial, migrasi keratonosit yang berada pada tepi luka sesungguhnya telah mulai bekerja beberapa jam pasca trauma, menginduksi terjadinya reepitelisasi yang biasanya menutup luka dalam 5 – 7 hari. Setelah reepitelisasi, membran basalis terbentuk antara epidermis dan dermis. Pembentukan kembali dermis dibantu oleh proses angiogenesis dan fibrogenesis. Pada fase ini matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara gradual digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari kumpulan fibroblast, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskuler (Gurtner, 2007, Tiwari, 2012).

Fibroblast memiliki peran yang sangat penting dalam fase ini. Fibroblast memproduksi matriks ekstraseluler dalam fase ini. Fibroblast memproduksi matriks ekstraseluler yang akan mengisi kavitas luka dan menyediakan landasan untuk migrasi kreatinosit. Matriks ekstraseluler merupakan komponen yang paling tampak pada skar di kulit. Makrofag memproduksi *growth factor* seperti PDGF dan

TGF- β yang menginduksi fibroblast untuk berproliferasi, migrasi dan membentuk matriks ekstraseluler (Gurtner, 2007). Fibroblast mencerna matriks fibrin dan menggantikannya dengan *glycosaminoglycan* (GAG) dengan bantuan *matrix metalloproteinase* (MMP). Matriks ekstraseluler akan digantikan oleh kolagen tipe III yang juga diproduksi oleh fibroblast dengan berjalannya waktu. Kolagen ini tersusun atas 33% glisin, 25% hidroksiprolin, dan selebihnya berupa air, glukosa dan galaktosa. Selanjutnya kolagen tipe III akan digantikan oleh kolagen tipe I pada fase maturasi (Marzoeki, 1993; Schultz, 2007). Faktor proangiogenik yang diproduksi makrofag seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF)-2, *angiopoietin-1* dan *thrombospondin* akan menstimulasi sel endotel membentuk neovaskular melalui proses angiogenesis (Tiwari, 2012; Gurtner, 2007; Yasti, *et al.*, 2012).

IV. Fase maturasi (*remodeling*)

Fase maturasi ini di luka pada umumnya berlangsung mulai hari ke-21 hingga sekitar 1 tahun, namun pada luka bakar derajat 2 yang dalam dan mengenai seluruh ketebalan kulit yang dibiarkan sembuh sendiri fase ini bisa memanjang menjadi bertahun-tahun (Tiwari, 2012). Fase ini segera dimulai segera setelah kavitas luka terisi oleh jaringan granulasi, proses reepitelisasi usai dan setelah kolagen menggantikan matriks temporer (Gurtner, 2007). Pada fase ini terjadi maturasi luka dan graft (Lima, *et al.*, 2009).

Kontraksi dari luka dan *remodeling* kolagen terjadi pada fase ini. Kontraksi luka terjadi akibat aktivitas *myofibroblas*, yakni fibroblast yang mengandung komponen mikrofilamen aktin intraseluler. Kolagen tipe III pada fase ini secara gradual digantikan oleh kolagen tipe I dengan bantuan *matrix metalloproteinase* (MMP) yang disekresi oleh fibroblast, makrofag dan sel endotel. Sekitar 80% kolagen pada kulit adalah kolagen tipe I yang memungkinkan terjadinya *tensile strength* pada kulit (Gurtner, 2007, Green dan Rudall, 2010).

Kolagen awalnya tersusun secara beraturan, sehingga membutuhkan *lysyl hydroxylase* untuk mengubah lisin menjadi hidroksilin yang dianggap bertanggung jawab terhadap terjadinya *cross-linking* antar kolagen. *Cross-linking* inilah yang menyebabkan terjadinya *tensile strength* sehingga luka tidak mudah terkoyak lagi. *Tensile strength* akan bertambah secara cepat dalam 6 minggu pertama, kemudian akan bertambah perlahan selama 1-2 tahun. Umumnya *tensile strength* pada kulit dan *fascia* tidak akan pernah mencapai 100%, namun hanya sekitar 80% dari normal (Marzoeki, 1993; Schultz, 2007).

Pada luka bakar derajat 2 dalam dan yang mengenai seluruh ketebalan kulit bila dibiarkan sembuh sendiri dapat terbentuk hipertrofik jaringan parut dan kontraktur. Hiperpigmentasi terjadi pada luka bakar superfisial karena respon berlebihan melanosit dari trauma

panas dan hipopigmentasi terjadi pada luka bakar yang dalam karena kerusakan melanosit pada kulit (Gaulitz dan Jeschke, 2012).

2.1.6 Ekspresi *Epidermal Growth Factor* (EGF) pada Proses Kesembuhan Luka

Epidermal growth factor (EGF) menginduksi proliferasi jaringan epidermis dan epitel pada mamalia. EGF diproduksi oleh berbagai sumber, termasuk trombosit memainkan peran penting dalam proses ini dengan merangsang sintesis dan fibronectin, angiogenesis, fibroplasia dan aktivitas kolagenase. Ini juga memiliki efek mitogenik pada sel epitel, sel endotel, dan fibroblast. Setelah pembentukan plasma hemostatis dalam fase inflamasi, EGF mengatur proses ini dengan memulai penyembuhan luka (Putri, 2017)

EGF merupakan bagian dari kompleks *growth factor* dan dengan reseptornya bersama-sama membantu untuk memodulasi pertumbuhan sel. EGF dilepaskan oleh sel, dan kemudian merangsang pertumbuhan sendiri dan sel disekitarnya, dan merangsang kemampuan membelah. Reseptor pada permukaan sel berikatan dengan EGF dan menyampaikan sinyal. EGF merangsang proliferasi dan keratinisasi dari berbagai jaringan epidermal *in vivo* dan *in vitro* (Putri, 2017).

Secara khusus, EGF berinteraksi dengan reseptornya di seluruh epidermis terutama di lapisan basal menaikkan pertumbuhan epitel melalui aktivasi beberapa jalur. Pengikatan EGF ke reseptornya menghasilkan dimerisasi dan autofosforilasi. Proses ini mengaktifkan mitogen aktif dari jalur protein kinase, akhirnya mempengaruhi fosforilasi

dari banyak faktor transkripsi dan pengeluaran kalsium oleh aktivasi protein kinase C. EGF juga menaikkan regenerasi epidermis dan epitelisasi oleh sejumlah tindakan. Tindakan tersebut termasuk meningkatkan proliferasi sel epitel dan migrasi ke luka, merangsang produksi protein seperti fibronektin dan meningkatkan jumlah fibroblast pada luka (Acosta *et al.*, 2006).

Epidermal Growth Factor (EGF) bekerja sama dengan *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) merangsang epitel tepi luka yang terdiri atas sel basal terlepas dari dasarnya dan berpindah mengisi permukaan luka, kemudian di isi sel baru yang terbentuk dari proses mitosis. Proses ini berhenti setelah epitel saling menyentuh dan menutup permukaan luka. Pada permukaan luka sudah tertutup fase proliferasi akan berhenti dan mulailah proses pematangan dalam fase remodeling (Hartz, 2004).

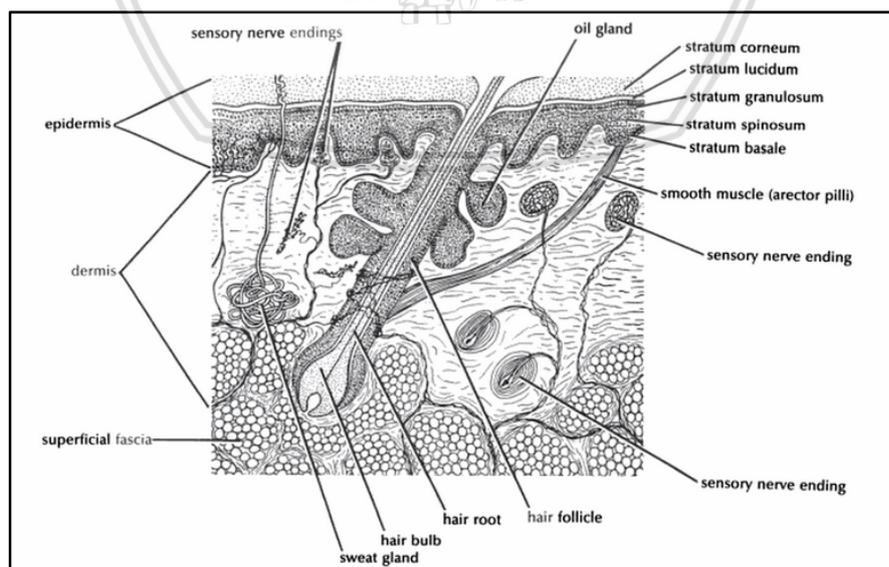
2.2 Kulit

Kulit adalah lapisan atau jaringan yang menutupi seluruh tubuh dan melindungi tubuh dari berbagai trauma dan merupakan penahan terhadap bakteri, virus dan jamur. Kehilangan dan penyimpanan panas diatur oleh vasodilatasi atau sekresi kelenjar-kelenjar keringat dan tanpa adanya kulit, maka cairan tubuh yang penting akan menguap dan elektrolit tubuh akan hilang dalam beberapa waktu (Mahmudah, 2013).

Kulit berfungsi untuk memantau lingkungan dan berbagai mekanoreseptor dengan lokasi khusus di kulit terhadap interaksi tubuh dengan

objek fisik dan mekanik seperti paparan sinar matahari yang dapat menyebabkan reaksi terbakar (*sunburn*), pigmentasi, penuaan dini dan pertumbuhan tumor (Syalindri, 2017). Kulit juga merupakan organ pelindung tulang dan berfungsi sebagai proteksi terhadap berbagai macam gangguan, baik itu gangguan fisik maupun kimia. Kulit sangat rentan terhadap trauma dan terjadinya luka karena kulit merupakan organ terluar (Kawulusan, 2015). Kulit terdiri atas lapisan epidermis yang berasal dari ektoderm serta lapisan yang merupakan lapisan jaringan ikat yang berasal dari mesoderm (Mescher, 2010).

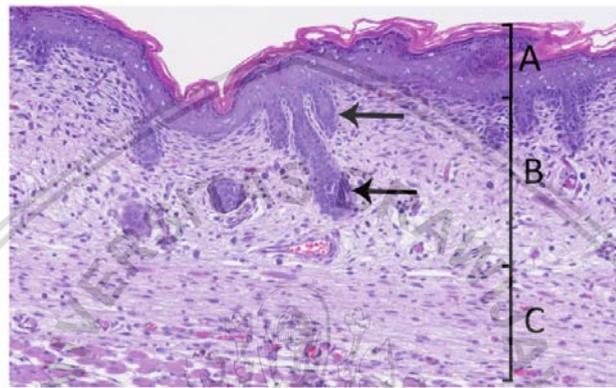
Pembagian kulit secara garis besar tersusun atas tiga lapisan utama yaitu lapisan epidermis atau kutikel, lapisan dermis (korium, kutis vera, *true skin*), dan lapisan subkutis (*hypodermis*). Tidak ada garis tegas yang memisahkan dermis dan subkutis, subkutis di tandai dengan adanya jaringan ikat longgar dan adanya sel dan jaringan lemak (Mahmudah, 2013). Lapisan utama pada kulit dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2.Bagian potongan melintang pada kulit tikus, perbesaran 400x (Wingerd, 1988)

2.2.1 Anatomi dan Histologi Kulit

Kulit terdiri dari tiga lapisan yang masing-masing terdiri dari berbagai jenis sel dan memiliki fungsi yang bermacam-macam. Ketiga lapisan tersebut adalah epidermis, dermis, dan subkutis (Wasiatmadja dan Syarif, 2007). Seperti Pada **Gambar 2.3**, histologi kulit tikus yang normal dengan lapisan yang masih lengkap seperti epidermis, dermis dan subkutan.



Gambar 2.3. Histologi Kulit Tikus dengan Perwarnaan HE pada Perbesaran 20X (Parker, 2016)

Epidermis merupakan suatu lapisan kulit yang terdiri atas banyaknya lapisan sel epitel. Lapisan epidermis di bagian dalam terdiri atas sel-sel hidup yang cepat membelah diri dan berbentuk kubus, sementara sel-sel di lapisan luar mati dan menggepeng. Epidermis tidak menerima pasokan darah langsung. Sel-sel epidermis hanya mendapat makanan melalui difusi nutrisi dari jaringan pembuluh darah di dermis. Epidermis terdiri atas lima lapisan penghasil keratin yaitu stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum germinativum (Meschester, 2012; Sherwood, 2001).

Stratum basalis (germinativum) adalah lapisan tunggal sel-sel yang melekat pada jaringan ikat dari lapisan kulit dibawahnya dermis. Pembelahan yang cepat berlangsung pada lapisan ini, dan sel yang baru didorong masuk

ke lapisan berikutnya. Stratum spinosum adalah lapisan sel spina atau tanduk, disebut demikian karena sel-sel tersebut disatukan oleh tonjolan yang berupa spina. Spina adalah bagian penghubung intrasesuler yang disebut desmosome. Stratum granulosum terdiri dari tiga atau lima lapisan atau barisan sel dengan granula-granula keratohialin yang merupakan *precursor* pembentukan keratin. Stratum lusidum adalah lapisan jernih dan tembus cahaya dari sel-sel gepeng tidak bernukleus yang mati atau hampir mati dengan ketebalan empat sampai tujuh lapisan sel. Stratum korneum adalah lapisan epidermis teratas, terdiri dari 25 sampai 30 lapisan sisik tidak hidup yang sangat terkeratinisasi dan semakin gepeng saat mendekati permukaan kulit (Sloane, 2004).

Dermis adalah lapisan yang terdiri dari kolagen, jaringan fibrosa dan elastin. Lapisan superfisial menonjol ke dalam epidermis berupa sejumlah papilla kecil. Lapisan yang lebih dalam terletak pada jaringan subkutan. Lapisan ini mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe dan syaraf (Gibson, 2002).

Lapisan subkutis kulit terletak di bawah demis. Lapisan ini terdiri dari lemak dan jaringan ikat dan berfungsi sebagai peredam kejutan dan insulator panas. Lapisan subkutis adalah tempat penyimpanan kalori. Di lapisan ini terdapat ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah dan saluran getah bening (Wasiatmaja dan Syarif, 2007).

2.2.2 Fisiologi Kulit

Secara umum, beberapa fungsi dari kulit pada tubuh menurut Slonane (2004) antara lain; kulit berperan dalam termoregulasi, mengatur kadar suhu dalam tubuh. Panas tubuh dihasilkan dari aktivitas metabolik dan pergerakan otot. Panas seperti ini harus dikeluarkan, atau suhu tubuh akan naik di atas batas normal. Pada lingkungan bersuhu dingin, panas harus dipertahankan, atau suhu tubuh akan turun di bawah batas normal suhu tubuh. Selain itu, kulit sebagai indra peraba. Rasa sentuhan yang disebabkan oleh rangsangan pada ujung saraf dalam kulit, berbeda-beda menurut ujung saraf yang dirangsang. Perasaan panas, dingin, sakit, semua ini perasaan perabaan, beberapa sensitif (peka terhadap dingin, beberapa terhadap panas dan lain lagi terhadap sakit) (Pearce, 2005). Kulit merupakan barrier fisik antara jaringan di bawahnya dan lingkungan luar. Kulit memberikan perlindungan dari abrasi, dehidrasi, radiasi ultraviolet, dan invasi mikroorganisme (Gunstream, 2000). Selain sebagai proteksi tubuh, kulit juga sebagai jalur ekskresi tubuh, dengan produksi keringat oleh kelenjar keringat menghilangkan sisa-sisa metabolisme dalam jumlah kecil seperti garam, air, dan senyawa organik (Mawarsari, 2015).

2.3 Rajungan (*Portunus pelagicus*)

2.3.1 Klasifikasi Rajungan

Rajungan (*Portunus pelagicus*) merupakan salah satu komoditas perikanan yang memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi. Pada umumnya rajungan berbeda dengan kepiting (*Scyllasp.*). Tanda khusus yang dapat membedakan jenis kepiting dan rajungan adalah dengan melihat bentuk dan ukuran karapasnya. Rajungan dicirikan dengan karapas yang relatif lebih

panjang dan memiliki duri cangkang yang lebih panjang dibandingkan dengan kepiting bakau (Hafiluddin, 2003).

Klasifikasi rajungan menurut Martin dan Davis (1978) adalah sebagai berikut :

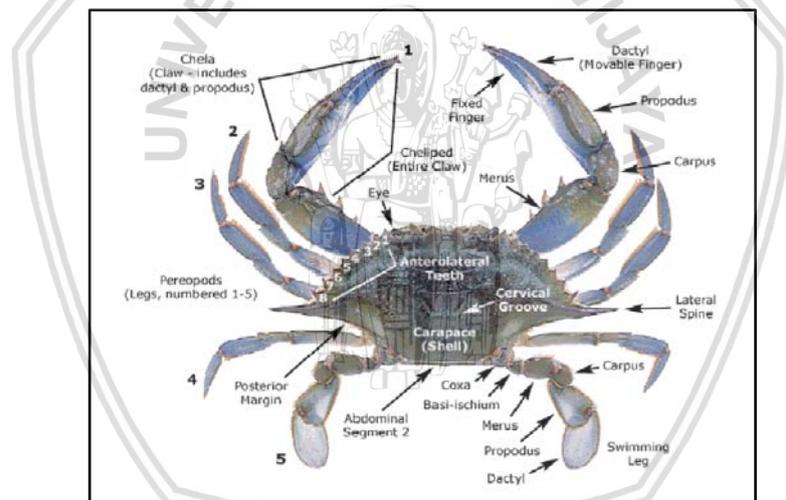
Filum : Arthropoda
 Kelas : Crustacea
 Subkelas : Malacostraca
 Ordo : Decapoda
 Subordo : Pleocyemata
 Infraordo : Brachyuran
 Famili : Portunidae
 Genus : Portunus
 Spesies : *Portunus pelagicus*

2.3.2 Morfologi Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Ukuran dan warna rajungan jantan berbeda dengan betina. Hewan jantan berukuran lebih besar dan berwarna biru serta terdapat bercak-bercak berwarna putih, sedangkan pada betina berwarna hijau kecoklatan dengan bercak-bercak putih yang kotor (Oemarjati dan Wardana, 1990).

Hewan ini mempunyai karapas yang menonjol dibandingkan abdomennya. Lebar karapas pada hewan dewasa dapat mencapai 18,5 cm. abdomennya berbentuk segitiga (meruncing pada jantan dan melebar pada betina), tereduksi dan melipat ke sisi ventral karapas. Pada kedua sisi muka bagian antero lateral karapas terdapat 9 buah duri. Duri pertama di anterior berukuran lebih besar daripada ketujuh duri di belakangnya, sedangkan duri

ke-9 yang terletak di sisi karapas merupakan duri terbesar. Kaki jalan berjumlah 5 pasang. Pasangan kaki pertama berubah menjadi capit (*cheliped*) yang digunakan untuk memegang serta memasukkan makanan di dalam mulutnya, sedangkan pasangan kaki jalan kelima berfungsi sebagai pendayung atau alat renang, sehingga sering disebut sebagai kepiting renang. Kaki renang tereduksi dan tersembunyi di balik abdomen. Kaki renang hewan betina juga berfungsi sebagai alat pemegang dan inkubasi telur (Yanuar, 2008). Bentuk umum rajungan dapat dilihat pada **Gambar 2.4.**



Gambar 2.4. Morfologi Rajungan (*Portunus Pelagicus*) (Galil, 2004)

2.3.3 Kandungan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Cangkang merupakan bagian terkeras dari semua komponen rajungan dan selama ini baru dimanfaatkan sebagai pakan ternak atau pupuk organik mengingat kandungan mineral, terutama kalsium cukup tinggi. Cangkang rajungan mengandung kitin, protein, CaCO_3 serta sedikit MgCO_3 dan pigmen *astaxanthin* (Hafiluddin, 2003). Komposisi kimia cangkang rajungan beserta daging yang masih melekat pada cangkang

diantaranya; air 8.1%, protein 15.58%, lemak 0.19%, abu 53.38% dan karbohidrat sebesar 22.75% (Fawzya *et al.*, 2004). Golongan krustasea seperti rajungan pada umumnya mengandung 25% bahan padat, yang sebagian besar terdiri dari kitin, sekitar 20-25% daging yang dapat di makan dan sekitar 50-60% berupa hasil buangan (Angka dan Suhartono, 2000).

2.3.4 Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida yang disusun dari glukosamin dan N-asetilglukosamin yang diperoleh dari turunan kitin melalui reaksi deasetilasi, yang diekstraksi dari serbuk cangkang *crustaceae* seperti udang dan kepiting yang merupakan komponen terbesar dari kitosan. Secara struktur kimia, kitosan adalah kitin yang telah mengalami deasetilasi (kehilangan gugus asetil). Kitosan adalah biopolimer alami kedua yang berlimpah yang ditemukan di alam setelah selulosa (Moe *et al.*, 2008).

Perbedaan kitin dan kitosan hanya terdapat pada perbandingan gugus amina primer dan amida pada atom C-1 unit polimer. Jika gugus amina primer lebih banyak (>50%) dari pada gugus amida maka polimer disebut kitosan (Sedjati, 2006). Kitosan tidak larut dalam larutan alkali dengan pH di atas 6.5. Kitosan mudah larut dalam asam organik seperti asam format, asam asetat dan asam sitrat (Rahayu dan Purnavita, 2007).

Kitosan memiliki empat fungsi yaitu dalam proses penyembuhan luka sebagai hemostasis dengan cara mempercepat proses pembekuan darah dengan menstimulasi faktor pembekuan darah seperti protombin dan fibrinogen, sehingga mengurangi darah yang keluar, sebagai antiinflamasi

yaitu dengan mengurangi produksi COX-2 sehingga akan menekan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi secara berlebihan seperti IL-4 dan akan menghambat PGE-2 yang bekerja sebagai mediator inflamasi, dengan penurunan produksi enzim COX-2 dan PGE-2 maka akan mempercepat proses inflamasi, selanjutnya sebagai antimikroba akan berikatan dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran dan terutama menyebabkan kebocoran bagian intraseluler mikroba dan yang terakhir kitosan dapat berperan dalam mempercepat fase proliferasi luka dengan cara mengaktivasi migrasi sel PMN, makrofag, dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka, sehingga mempercepat pembentukan jaringan baru pada luka (Hanifah, 2015; Karakecilli, *et al*, 2008; Ratnawati, 2014).

Faktor keamanan kitosan dengan nilai LD₅₀ 16 g/hari/kg berat badan tikus pada pemberian dosis oral. Menurut penelitian Costa *et al*. kitosan tidak menunjukkan toksisitas akut yang signifikan. Selain itu, tidak adanya iritasi lokal setelah aplikasi topikal pada tikus, marmut, dan kelinci (Rao and Sharma, 1997).

Tabel 2.1 Sumber-Sumber Kitosan (Sembiring, 2011)

Jenis	Kadar Kitosan
Jamur / Cendawan	5 – 20%
Cumi-cumi	3 – 20%
Kepiting	69%
Udang	70%
Rajungan	73%

Kadar kitosan dalam setiap jenis hewan memiliki hasil yang berbeda-beda. Semakin tinggi kadar kitosan pada jenis hewan, akan semakin baik

untuk digunakan dalam berbagai bidang, seperti menggunakan pada bahan makanan, medis, pertanian serta yang lainnya.

2.4 Salep Komersial

Salep komersial adalah jenis salep yang sudah ada dipasaran dan diperjual belikan dengan sudah adanya merek dagang pada obat tersebut. Berbagai obat komersial digunakan untuk mengobati berbagai penyakit diantaranya untuk mengobati luka bakar. Obat untuk mengobati luka bakar berbagai macam jenis sudah terjual dipasaran, diantaranya Bioplacenton, Bacitracin, dan *Silver sulfadiazine*. Salep komersial yang sering digunakan adalah jenis Bioplacenton dengan kandungan neomisin sulfat dan ekstrak plasenta yang berguna untuk mempercepat kesembuhan luka.

2.4.1 Neomisin Sulfat

Neomisin sulfat merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang digunakan secara topikal pada kulit dan membran mukosa untuk dekontaminasi bakteri. Neomisin sulfat adalah garam sulfat dari neomisin merupakan zat antibakteri yang dihasilkan oleh pertumbuhan *Sreptomycetes fradiae* Waksman (Familia *Sreptomycetaceae*). Kelarutan mudah larut dalam air, sangat sukar larut dalam etanol, tidak larut dalam aseton, kloroform, dan eter, dengan pH antara 5,0 sampai 7,5 (Harahap, 2017).

Neomisin berspektrum luas peka terhadap gram negatif dan gram positif, bersifat bakteriosidal. Neomisin akan berikatan dengan subunit 30s ribosom dan menghambat sintesis protein. Terikatnya neomisin pada ribosom dapat mempercepat transportasi neomisin ke dalam sel sehingga

menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma yang selanjutnya menyebabkan kematian sel (Plum, 2008).

2.4.2 Ekstrak Plasenta

Plasenta adalah organ tubuh yang berkembang pada saat manusia atau hewan mengandung anaknya. Plasenta kaya akan darah dan protein (albumin), hormon (estrogen), serta senyawa lain (DNA dan RNA). Penggunaan plasenta pada kesembuhan luka maupun kosmetik berplasenta berasal dari hewan (Chakraborty, 2009).

Peneliti menggunakan ekstrak plasenta sebagai penyembuhan luka dan bagian ekstrak berair (*aqueous extract*) dari plasenta yang memiliki khasiat dalam hal penyembuhan. Ekstrak berair dari plasenta adalah sumber yang kaya dari berbagai peptida bioaktif dengan potensi regenerasi jaringan. Selain itu, ekstrak plasenta juga mempertahankan asam amino, nukleotida, polideoksiribonukleus, dan karbohidrat yang bertanggung jawab untuk penyembuhan luka (Gupta, 2016).

Mekanisme dari ekstrak plasenta ada beberapa tahapan. NADPH memainkan peran penting dalam jalur metabolisme di plasenta dalam penyembuhan luka. Nitrit Oksida (NO) memiliki efek pada tingkat molekuler, seluler, dan fisiologis dalam penyembuhan luka. NO memediasi inflamasi untuk mekanisme perbaikan dan pengembangan matrik luka. Mediasi Nitrit oksidasi sinyal seluler meningkatkan ketersediaan oksigen jaringan melalui angiogenesis. (Chakraborty, 2009; Gupta, 2006).

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

2.5.1 Klasifikasi

Hewan laboratorium atau hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik seperti pada **Gambar 2.5**. Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya. Selain itu, penggunaan tikus sebagai hewan percobaan juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama produksi 1 tahun (Mawarsari, 2015).

Menurut Krinke (2000) klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Rattus
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.5. Morfologi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) (Paramita, 2016).

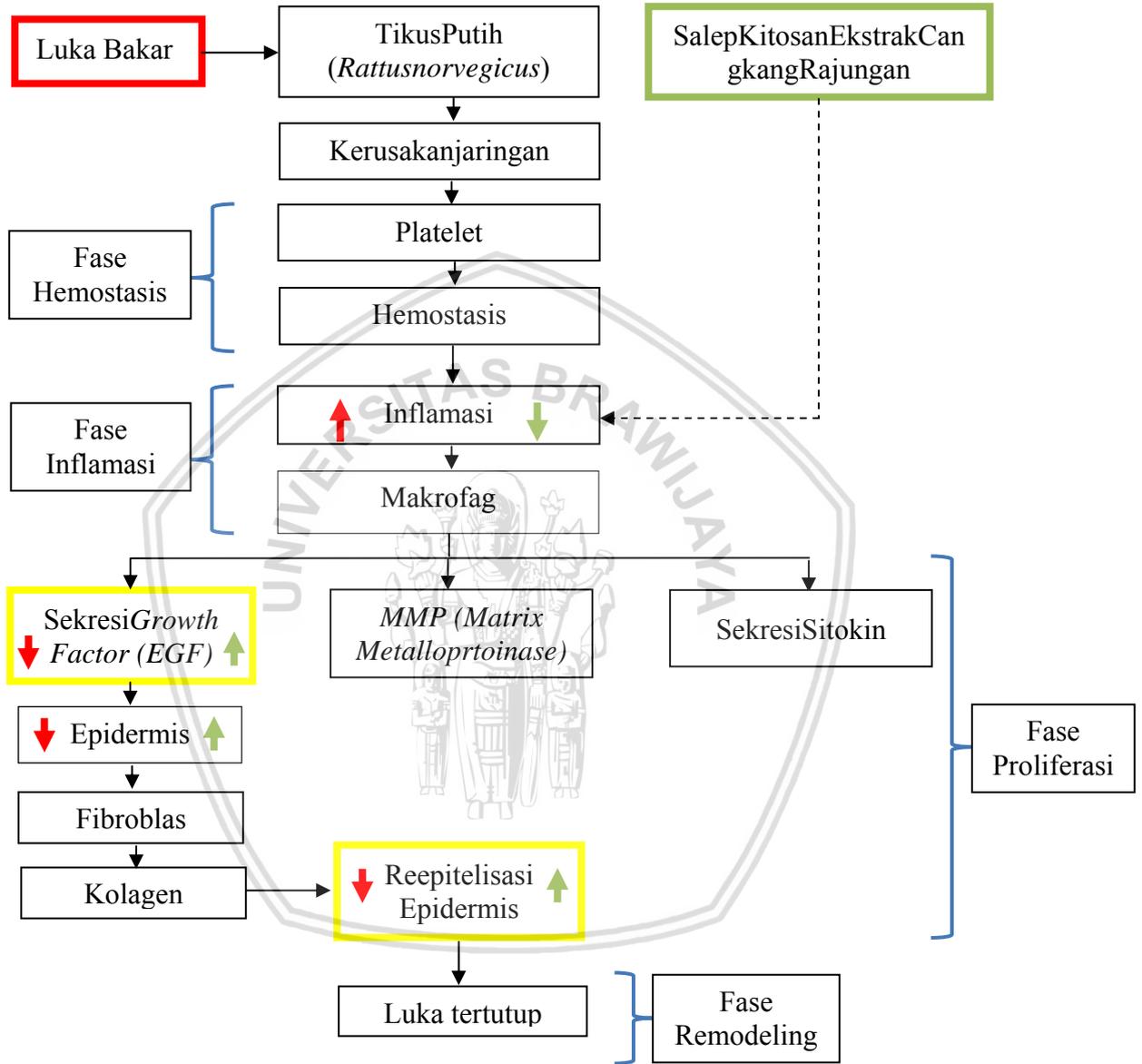
2.5.2 Anatomi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Warna umum *R. norvegicus* yaitu coklat atau abu-abu kehitaman dengan rambut tersebar di seluruh tubuh, selain itu ada juga yang berwarna abu-abu pucat atau kecokelat abu-abuan, abu-abu putih, putih hitam atau dua warna, namun laboratorium yang umum digunakan merupakan warna putih galur wistar dari *Rattus norvegicus* (Matilda, 2009).

Tikus memiliki sepasang gigi seri berbentuk pahat yang tidak berhenti tumbuh pada setiap rahangnya, sehingga untuk mempertahankan ukurannya terpaksa mengerat apa saja. Ukuran tubuh tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang lebih besar dari mencit membuat tikus putih lebih disukai untuk berbagai penelitian. Karakter fisik lainnya yaitu memiliki mata yang kecil, telinga tidak berambut dan ekor bersisik yang lebih pendek dari pada panjang tubuh dan kepalanya (Maust, 2002).

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :



: Efek terapi salep kitosan ekstrak



: Efek induksi luka bakar



: Induksi Salep Kitosan



: variabel yang diteliti



: Induksi luka bakar



: Pemberian terapi



: Menstimulus



Dilakukan perlukaan luka bakar derajat II dalam padatikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan ciri-ciri meluashinggabagian retikular, kulit biasanya menunjukkan warnacampuran merah dan putih. Rangkaian proses penyembuhan luka dimulaisesaat setelah proses luka terjadi. Perlakuan luka bakar akan menyebabkan kerusakan pada jaringan kulit. Selanjutnya akan di mulai fase hemostasis yang berfungsi untuk menghentikan pendarahan. Selanjutnya luka akan memasuki fase inflamasi, yang berfungsi untuk menyingkirkan jaringan mati, dan melawan infeksi bakteri. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin proinflamasi yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaktik akan menyebabkan sel radang seperti sel polimorfonuklear, makrofag dan limfosit bergerak menuju luka.

Tahap ketiga adalah fase proliferasi meliputi mitosis dari sel-sel epidermis, sel-sel endotel dan sel-sel fibroblast. Fibroblast, sel radang, dan pembuluh darah baru memenuhi jaringan luka dan membentuk jaringan granulasi. Makrofag akan menghasilkan *growth factor*, MMP (*matrix metalloproteinase*), sitokin dan radikal bebas. *Growth factor* yang dihasilkan diantaranya VEGF, TGF- β , FGF-2, KGF dan EGF. EGF (*Epidermal Growth Factor*) yang secara khusus berinteraksi dengan reseptornya di seluruh epidermis terutama di lapisan basal menaikkan pertumbuhan epitel. EGF juga menaikkan regenerasi epidermis dan epitelis dengan meningkatkan proliferasi sel epitel dan migrasi sel luka, merangsang protein seperti fibronektin dan meningkatkan jumlah fibroblast

padaluka. Pada fase ini reepitelisasi dimulai di manasel- selepitel bermigrasi dan berproliferasi ke jaringan luka. Tahap terakhir dari penyembuhan luka adalah fase remodeling atau fase maturasi. Pada tahap ini warna kemerahan dari jaringan mulai berkurang karena pembuluh darah mulai regres dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat bentuknya jaringan ikat untuk kemudian terjadi penutupan luka.

Pemberian terapi salep kitosan akan mempersingkat fase inflamasi karena kitosan memiliki sifat antibakteri dan mempercepat pertumbuhan jaringan baru.

Kitosan mempunyai gugus fungsi NH_2 yang mampu berikat dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif sehingga dapat mengganggu pertumbuhan bakteri.

Kitosan juga merupakan imunomodulator yang dapat meningkatkan pelepasan sitokin proinflamasi pada awal terjadinya infeksi sehingga inflamasi dapat berlangsung secara singkat, dan fase proliferasi dimulai lebih awal. Ketika terjadi fase inflamasi maka makrofag akan merespond dengan menghasilkan sitokin inflamasi dan *growth factor* berupa EGF yang akan mempercepat regenerasi

epidermis. Selain itu kitosan mampu menstimulasi sel fibroblas, membantu deposisi kolagen, serta meningkatkan sintesis asam *hyaluronic* di lokasi luka sehingga membentuk jaringan granulasi dan berperan pada pembentukan jaringan ikat. Kitosan juga dapat membantu dalam sekresi enzim kolagenase yang dapat memecah kolagen muda yang terbentuk pada fase proliferasi menjadi kolagen

yang lebih matang sehingga kekuatan dan struktur jaringan dapat menjadi lebih kuat.

Proses

reepitelisasi terjadi pada fase proliferasi ketika fase proliferasi dimulai lebih awal maka reepitelisasi terjadi lebih cepat dan akan berpengaruh terhadap ketebalan epidermis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu :

1. Tidak terdapat perbedaan terapisalepkitosancangkangrajukan (*Portunuspelagicus*) dengan salep komersial padatikus (*Rattusnorvegicus*) modellikabakar terhadap peningkatan ekspresi EGF.
2. Tidak terdapat perbedaan terapisalepkitosancangkangrajukan (*Portunuspelagicus*) dengan salep komersial padatikus (*Rattusnorvegicus*) modellikabakar terhadap peningkatan ketebalan epidermis.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai April 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu:

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.
2. Pembuatan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) di Laboratorium Sintesis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
3. Pembuatan preparat imunohistokimia dan pengamatan untuk ekspresi EGF dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB Malang.
4. Pembuatan preparat histopatologi kulit dan pengamatan untuk ketebalan epidermis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, yaitu kandang tikus, spuit 1 mL, glove, masker, spidol, alat cukur, *stereofom*, kasa steril, timbangan, *water bath*, wadah air mendidih, *stopwatch*, pinset anatomis, alat penumbuk, mortar dan ayakan, pot organ, silet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit rajungan, alkohol 70%, air mendidih suhu 98°C, normal saline 0.9%, obat anastesi (*ketamine-xylazine*), *Vaseline album*, salep komersial, antibodi EGF, dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar umur 2-3 bulan dengan berat

< 150 g. serta alat dan bahan untuk pembuatan preparat imunohistokimia dan histopatologi.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Prosedur ekstraksi kitosan dari cangkang rajungan (*Protunus pelagicus*).
3. Pembuatan salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Protunus pelagicus*).
4. Perlakuan luka bakar derajat II dalam pada hewan coba dengan menggunakan air mendidih 100°C, kasa steril dan plat besi.
5. Terapi salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
6. Perhitungan ekspresi EGF pada preparat imunohistokimia kulit hewan coba.
7. Pengukuran ketebalan epidermis kulit pada preparat histopatologi kulit hewan coba.
8. Analisa data.

4.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *post control design only*. Tiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan tikus. Kelompok perlakuan pada penelitian yaitu diantaranya:

- 1) Kelompok 1 adalah tikus yang dibuat luka bakar dengan pemberian salep komersial diamati pada hari ke-1, hari ke-3, dan hari ke-7.
- 2) Kelompok 2 adalah tikus yang dibuat luka bakar dengan pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan konsentrasi salep 5% yang diperiksa pada hari ke-1, hari ke-3, dan hari ke-7.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat < 150 g, berumur 2-3 bulan. Masing-masing tikus dipelihara dalam kandang yang sama di ruangan yang sama, serta diberi makanan dalam jumlah dan jenis yang sama. Besar sampel (n) untuk data berpasangan diperoleh dari rumus Federer (Tanggo, 2013) sebagai berikut :

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

Di mana r adalah replikasi dan t adalah jumlah pengamatan atau intervensi, sehingga :

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 6 macam kelompok perlakuan diperlakukan dengan ulangan minimal 4 kali

dengan setiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan adalah 24 tikus.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas : Salep ekstrak kitosan kulit rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan Salep komersial
- b. Variabel terikat : Ketebalan epidermis dan ekspresi EGF.
- c. Variabel kontrol : Homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan dan kandang serta perlakuan luka bakar.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat < 150 g berumur 2-3 bulan. Tikus diadaptasi selama 7 hari sebelum digunakan untuk penelitian dan dikandangkan secara individu. Untuk pemeliharaan pada hewan coba tersebut pakan diberikan berbentuk pellet sebanyak 10% berat badan setiap pagi dan sore dengan pemberian minum secara *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dengan masing-masing sub kelompok hari ke-1, ke-3, dan ke-7 terdapat 4 ekor di dalam kandang secara individu. Kandang tikus berbahan plastik, dibagi menjadi 4 bagian menggunakan sekat dan dilengkapi tutup kandang berupa kawat ram.

Bagian alas kandang diberi sekam kayu agar kandang tidak lembab (Muliani, 2011). Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.

4.4.2 Prosedur Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan

Bahan baku berupa cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) didapatkan dari *home industry* di daerah Sampang, Madura. Cangkang rajungan yang digunakan dibersihkan dari daging rajungan, kotoran dan bagian-bagian tubuh rajungan yang masih melekat menggunakan air kran dan dibilas menggunakan aquades. Kemudian cangkang tersebut dikeringkan di bawah cahaya matahari langsung sampai kering. Setelah cangkang kering dihaluskan dengan cara ditumbuk dan diayak menggunakan ayakan ketebalan 50 mesh. Selanjutnya dilakukan ekstraksi kitosan yang terdiri dari tahapan deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi.

a. Deproteinasi

Serbuk cangkang rajungan yang telah diayak sebanyak 400 g direaksikan dengan 3000 mL NaOH 1 M dan dihomogenkan menggunakan magnetik *stirrer* pada suhu 80°C selama 1 jam. Kemudian padatan disaring dan residu tersebut dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 80°C hingga kering ± 3 jam (Hastuti dan Tulus, 2015).

b. Demineralisasi

Serbuk hasil deproteinisasi sebanyak 200 g ditambah dengan 2000 mL HCL 1 M dan dihomogenkan dengan magnetik *stirrer* selama 60 menit pada suhu kamar. Kemudian endapan disaring dan reidu di cuci dengan akuades pH netral. Kemudian residu tersebut dikeringkan kembali dengan menggunakan oven bersuhu 80°C selama 3 jam. Hasil endapan ini disebut dengan kitin (Hastuti dan Tulus, 2015).

c. Deasetilasi

Kitin yang telah dihasilkan dari proses demineralisasi berupa serbuk sebanyak 40 g ditambah dengan 250 NaOH 50%, kemudian direfluks di dalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C. Hasil refluks kemudian didinginkan, di saring, lalu di cuci dengan *aquades* sampai PH netral. Kemudian endapan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu selama 3 jam dan endapan yang telah dikeringkan diletakkan dalam desikator selama 24 jam. Endapan inilah yang dinamakan kitosan (Hastuti dan Tulus, 2015).

d. Identifikasi Kitosan dengan Metode FTIR

Identifikasi kitosan secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan uji FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Uji ini merupakan suatu teknik *spektrofotometri* inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus fungsi suatu senyawa. Setelah proses deasetilasi kitosan disimpan dalam desikator selama 24 jam sebelum dibuat pellet KBr (Kalium bromide). Pembuatan

pellet KBr dengan mencampurkan sampel 1 mg dan KBr 10-100 mg. Campuran serbuk digerus hingga homogen dan ditekan dengan pompa hidrolis. Kemudian pellet tersebut di *scanning* pada daerah frekuensi antara 400 cm^{-1} sampai 4.000 cm^{-1} . Spektrum hasil pengukuran yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum kitosan standar (Rachmawati dkk., 2012).

4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Pembuatan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) menggunakan dasar salep hidrokarbon bahan *vaselin album*. *Vaselin album* memiliki kemampuan menghidrasi sehingga dapat meningkatkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit (Naibaho dkk.,2013). Pembuatan dilakukan menggunakan *mortar* dengan mencampurkan vaselin album dan kitosan dengan konsentrasi 5% sebanyak 14g. Kemudian salep kitosan disimpan dalam *tube* dilengkapi dengan label.

4.4.4 Pembuatan Luka Bakar pada Tikus

Langkah-langkah yang dilakukan untuk pembuatan luka bakar hewan coba adalah menentukan daerah yang akan dibuat luka bakar yaitu bagian punggung. Membersihkan rambut dan mencukur area tersebut sampai jarak 3 cm dari area yang akan dibuat luka bakar. Memasang perlak atau alas dibawah tubuh tikus yang akan dibuat luka bakar. Mencuci tangan dan memakai sarung tangan steril. Melakukan desinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar

dengan alkohol 70% dan tunggu hingga kering. Melakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar menggunakan *ketamine-xylazine* dan tunggu 10-15 menit untuk membuat luka bakar. Melipat kasa steril sesuai dengan luas luka bakar dan bentuk sesuai cetakan. Memasang kasa di atas lempeng logam berukuran 2x2.5 cm². Mencelupkan lempeng logam yang berlapis kasa dengan air panas (suhu 100°C) selama 15 menit. Menempelkan lempeng logam yang berukuran pada hewan coba selama 15 detik. Mengangkat kasa lalu mengompres dengan normal salin selama 1 menit untuk mencegah korbustio. Memberikan perawatan pada area luka yang terbentuk sesuai prosedur rawat luka (Akhoondinasab *et al.*, 2014).

4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Salep dibuat sejumlah 14 g pada konsentrasi yaitu 5%. Salep diberikan sebanyak 0.25 g pada area luka secara aseptis dengan frekuensi pemberian 2 kali sehari selama 1, 3 dan 7 hari (Djamaluddin, 2009). Perhitungan dosis bisa dilihat pada **Lampiran 3**.

4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit

Sebelum membuat preparat histologi jaringan kulit dilakukan euthanasia terlebih dahulu pada hewan coba dengan caradislodasio servikalis (AVMA, 2013). Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan kulit. Kulit digunting dengan ketebalan ± 4 mm sampai dengan subkutan dan panjang 2.5 cm. Bagian kulit luka diisolasi dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0.9%. Kulit yang diperoleh kemudian dipotong

menjadi dua bagian. Lalu bagian yang ingin digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dimasukkan ke dalam pot dan difiksasi dengan larutan *Buffer Natural Formaline* (BNF) dan dibiarkan pada suhu kamar selama 48 jam (Febram dkk., 2010). Sedangkan bagian kulit yang akan digunakan untuk pembuatan preparat imunohistokimia untuk perhitungan ekspresi EGF dimasukkan ke pot lain.

Sediaan kulit yang telah difiksasi menggunakan BNF 10% dilakukan *tissue trimming* jaringan dan dimasukkan ke dalam *cassette tissue* dari plastik. Kemudian dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I dan II masing-masing selama 2 jam. Setelah ini dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing selama 2 jam. Dilanjutkan dengan proses pencetakan atau parafinasi menggunakan parafin I dan parafin II. Sediaan dimasukkan ke dalam cetakan yang berisi parafin setengah volume dan potongan melintang sediaan melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku maka parafin ditambahkan lagi dalam pencetakan hingga penuh dan dibiarkan mengeras. Setelah blok parafin mengeras dilakukan pemotongan setebal 5 mikrometer menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat yang bersuhu 46°C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan

tersebut kemudian diangkat dan diletakkan diatas gelas objek dan dikeringkan semalam dalam inkubator bersuhu 60°C untuk dilakukan pewarnaan *Hematoksilen-Eosin* (HE) (Febram dkk., 2010).

4.4.7 Pengukuran Ketebalan Epidermis Kulit

Pengukuran ketebalan epidermis kulit tikus didapatkan melalui pengamatan pada sediaan histopatologi epidermis kulit tikus dengan pengecatan HE di lapisan epidermis. Interpretasi hasil pengamatan yaitu mengamati ketebalan lapisan epidermis kulit tikus menggunakan mikroskop OLYMPUS E seri XC® 10 yang dilengkapi *software* OlyVia® (*Viewer for Imaging Application*) perbesaran 400x. Ketebalan reepitalisasi dinilai dengan cara mengukur ketebalan epidermis yang baru tumbuh pada tepi luka menggunakan *microruller* dengan *software Image Raster* kemudian dibandingkan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Data diolah secara komputerisasi, kemudian disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi (Rahayu, 2001).

4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi EGF

Imunohistokimia (IHK) merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menentukan keberadaan protein target dalam jaringan atau sel dengan memanfaatkan prinsip antara protein target (antigen) dan antibodi. Teknik ini diawali dengan pembuatan preparat histologi agar dapat diamati di bawah mikroskop. Preparat jaringan yang telah di dapat selanjutnya memasuki prosedur IHK. Prosedur IHK

menggunakan antibodi yang dilabeli enzim sehingga ikatan protein dan antibodi dapat divisualisasikan. Enzim selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya (Fatchiyah dkk., 2009).

Tahapan pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide pada xylol I, xylol II, dan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7.4 selama 1x15 menit. Selanjutnya ditetesi dengan H₂O₂ selama 20 menit. Setelah itu di cuci kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 5% FBS selama 1 jam. Kemudian, slide preparat di cuci kembali selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi *primer mouse anti rat EGF* selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali menggunakan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Berikutnya, diinkubasi dengan antibodi sekunder SA-HRP selama 1 jam dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. *Diamano Benzidine* (DAB) ditetaskan selama 10 menit. Kembali dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayor Hematoxylen* selama 10 menit. Slide di cuci dengan air

mengalir. Slide dibilas dengan aquades dan dikeringkan, lalu slide dimounting dengan *etellan* dan ditutup dengan *cover glass*.

Pengamatan ekspresi EGF dilakukan dengan mikroskop perbesaran perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Pengamatan dilakukan pada bagian dermis. Setelah itu hasil pengamatan di foto. Hasil foto dari mikroskop diproses menggunakan *software imunorattio* untuk mengamati peningkatan ekspresi EGF yang ditandai dengan peningkatan presentasi luas daerah yang terwarnai (Janquiera and Carneiro, 2007).

4.4.9 Analisa Data

Dalam penelitian ini parameter yang digunakan adalah ketebalan epidermis kulit dan ekspresi EGF, dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *SPSS for windows* dengan analisis statistik ragam *Independent T-test* ($\alpha=0,05$) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata antara kelompok satu dengan kelompok yang lainnya (Firdaus dkk., 2013).

BAB 5.HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Uji FTIR pada Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Spektroskopi Inframerah (*Fourier Transform Infra Red/FTIR*) merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1,000 μm atau pada bilangan gelombang 13.000 – 10 cm^{-1} . Radiasi elektromagnetik dikemukakan pertama kali oleh *James Clark Maxwell*, yang menyatakan bahwa cahaya secara fisis merupakan gelombang elektromagnetik, artinya mempunyai listrik dan vektor magnetik yang keduanya saling tegak lurus dengan arah rambatan (Giwangkara S., 2007).

Kitosan cangkang rajungan uji FTIR (**Lampiran 5**) dibandingkan dengan standar kitosan. Kitosan dari ekstrak cangkang rajungan didapatkan hasil 873,68; 1034,63; 1156,66; 1261,70; 1422,61; 1555,66; 1658,66; 2148,77; 2518,75; 2923,67; 3438,58 cm^{-1} . Spektrum inframerah kitosan standar memiliki panjang gelombang kisaran 897,41; 1026,63; 1077,93; 1154,64; 1259,54; 1422,73; 1587,94; 1587,94; 1660,55; 2361,41; 2922,85; 2922,85; 3377,95 cm^{-1} (Dompeipen, 2017).

Kitosan komersial menurut Sarbon *et al.* (2014) terdapat pita serapan dari N-H amida pada bilangan gelombang 3369,11 – 3413,07. Pita serapan C-O alkohol pada rentang 1128,21 – 1129,02. Pita N-H amina didapatkan pada 1622,76 – 1623,92 cm^{-1} . Berdasarkan penelitian ekstrak cangkang rajungan memiliki kadar kitosan sesuai dengan uji FTIR pada puncak N-H amida yang

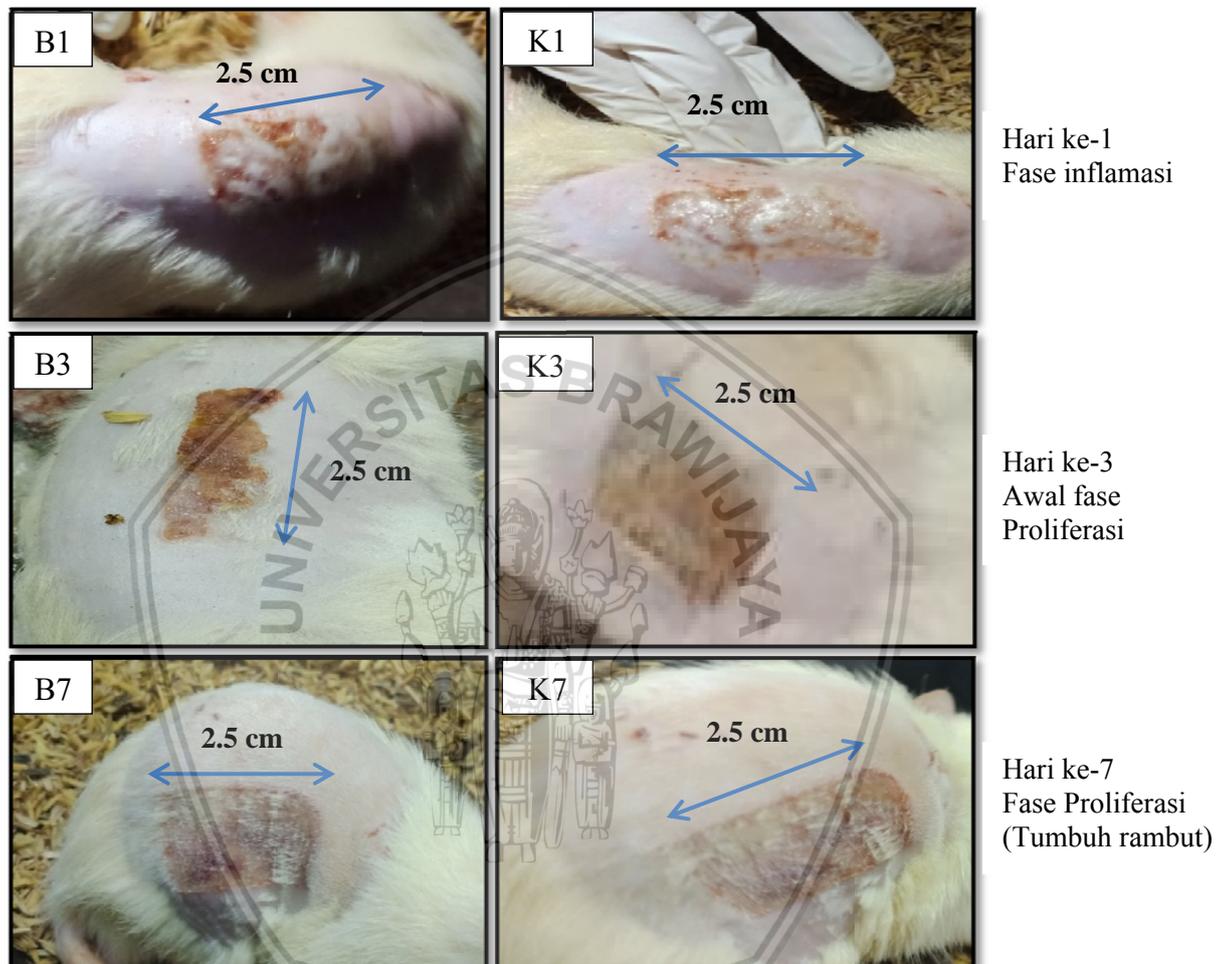
tidak tajam dan memiliki hasil yang hampir sama dengan spektroskopi inframerah kitosan standar.

5.2 Tikus Pasca Diinduksi Luka Bakar Derajat II Dalam

Hewan coba yang digunakan berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat < 150 gram, berumur 2-3 bulan. Tikus diberikan perlakuan berupa model luka bakar derajat II dalam, dibuat luka sepanjang 2,5 cm dengan lebar 2 cm. Terapinya berupa salep kitosan dari ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan konsentrasi 5% diberikan secara *topical* sebanyak 0.25 gram selama 7 hari pemberian salep pada area luka bakar dan diberikan juga salep komersial pada tikus yang dijadikan kontrol positif. Proses kesembuhan dari luka bakar yang dibuat diamati pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7 seperti pada **Gambar 5.1**.

Gambaran makroskopis jaringan kulit tikus yang tampak pada **Gambar 5.1 (B2, B3, B7)** merupakan tikus yang dijadikan kontrol positif dengan diberi perlakuan luka bakar derajat II dalam dan diberikan salep komersial. **Gambar 5.1 (K1, K3, K7)** menunjukkan tikus yang diberikan perlakuan luka bakar derajat II dalam dan diberikan terapi salep kitosan konsentrasi 5%. Pengamatan proses kesembuhan luka pada hari pertama (**ke-1**) pada tikus **K1** (tikus perlakuan terapi kitosan 5% hari ke-1) dan pada **B1** (tikus kontrol positif hari ke-1) menunjukkan bahwa luka berada pada fase inflamasi yang ditandai adanya berwarna merah keputihan pada bagian kulit. Sesuai dengan kriteria luka bakar derajat II dalam yaitu bula sering ditemukan dengan dasar luka eritema yang basah.

Permukaan luka berbecak merah dan sebagian putih karena variasi vaskularisasi
(Anggowarsito, 2014).



Gambar 5.1. Gambar makroskopis proses kesembuhan luka bakar derajat II dalam pada hari ke-1, ke-3, ke-7.

Keterangan : **B1.** Terapi Salep komersial hari ke-1.

K1. Kontrol kitosan hari ke-1.

B3. Terapi Salep komersial hari ke-3.

K3. Konrol kitosan hari ke-3.

B7. Terapi Salep komersial hari ke-7.

K7. Kontrol kitosan hari ke-7.

Pengamatan proses kesembuhan luka bakar hari ketiga (**ke-3**) pada tikus

K3 (tikus perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-3) dan tikus **B3** (tikus kontrol

positif hari ke-3) terlihat warna kemerahan mulai berkurang menjadi kecoklatan dan area luka sedikit mengering, hal ini menunjukkan mulai berakhirnya fase inflamasi. **Gambar 5.1(B3)** dan **(K3)** menunjukkan adanya warna kecoklatan pada kulit dan tampak telah mengering, pada tikus yang diberikan perlakuan salep kitosan dan tikus kontrol diberikan salep komersial tidak jauh beda kondisi makroskopisnya.

Fase kesembuhan selanjutnya masuk pada fase proliferasi yang biasanya dimulai pada hari ke-4 sampai hari ke-7 (Tiwari, 2012). Pada terapi salep kitosan mempunyai tujuan untuk mempercepat fase proliferasi dan mempersingkat fase inflamasi, sehingga pengamatan kesembuhan luka bakar dilakukan pada hari ke-3. Pada fase proliferasi luka bakar, migrasi keratonosit yang berada pada tepi luka sesungguhnya telah mulai bekerja beberapa jam pasca trauma, menginduksi terjadinya reepitelisasi yang biasanya menutup luka dalam 5-7 hari. Setelah reepitelisasi, membran basalis terbentuk antara epidermis dan dermis. Pembentukan kembali dermis dibantu oleh proses angiogenesis dan fibrogenesis (Gurtner, 2007; Yasti, *et al.*, 2012).

Pengamatan proses kesembuhan luka bakar hari ketujuh (**ke-7**) pada tikus **K7** (tikus perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-7) dan tikus **B7** (tikus kontrol positif hari ke-7) seperti tampak pada **Gambar 5.1 (B7)** dan **(K7)** terlihat jaringan mulai mengeras dan terjadi regenerasi sel pada kedua tikus perlakuan, luka sepenuhnya tertutup oleh jaringan yang mengeras.

Luas luka juga dapat berpengaruh dalam kesembuhan luka. Semakin luas luka, maka akan semakin lama proses kesembuhan dari luka tersebut. Model luka

bakar, dibuat perlakuan luka bakar dengan panjang 2.5 cm dan lebar 2 cm. Pada **Gambar 5.1**, fase inflamasi hari ke-1 merupakan awal terjadinya luka. Luka masih basah dan belum mengering, keropeng (*scab*) belum muncul, dengan panjang masih 2.5 cm. Memasuki awal fase proliferasi hari ke-3, tampak adanya keropeng (*scab*) pada kontrol positif dan terapi kitosan 5%. Adanya keropeng (*scab*) pada luka, menyebabkan tertariknya kulit sehingga luas luka menjadi berkerut. Fase proliferasi hari ke-7, luas luka masih tetap sama pada awal fase proliferasi, tetapi luka sudah mengering keropeng (*scab*) terlihat jelas dan rambut pada tikus sudah mulai tampak. Hal ini menunjukkan bahwa kedua salep tersebut memiliki kemampuan percepatan proses kesembuhan yang hampir sama.

Perubahan warna luka bakar derajat II dalam terjadi seiring dengan mulai mengeringnya luka. Kecepatan terbentuknya keropeng dari masing-masing kelompok perlakuan menandakan kecepatan dari penyembuhan luka. Waktu pelepasan keropeng (*scab*) menandakan bahwa sudah terjadi pertumbuhan sel-sel baru pada kulit sehingga membantu mempercepat lepasnya keropeng dan merapatkan tepi luka. Keropeng (*scab*) terlepas karena jaringan dibawahnya sudah kering dan tepi-tepi luka mulai tertarik ke tengah (Aponno *et al.*, 2014).

Reaksi alergi terkadang terjadi pada hewan yang tidak tahan akan kandungan protein. Ciri-ciri adanya alergi di kulit secara makroskopis dapat dilihat dengan adanya eritema yaitu adanya warna kemerahan pada kulit. Selain itu, dapat dilihat dengan adanya edema yaitu pembengkakan pada kulit dan tikus biasanya akan sering menggaruk pada area kulit (Abdulkadir, 2011). Pada

penelitian ini, tikus yang diberikan salep kitosan dan salep komersial tidak tampak adanya tanda-tanda reaksi alergi yang muncul secara makroskopis.

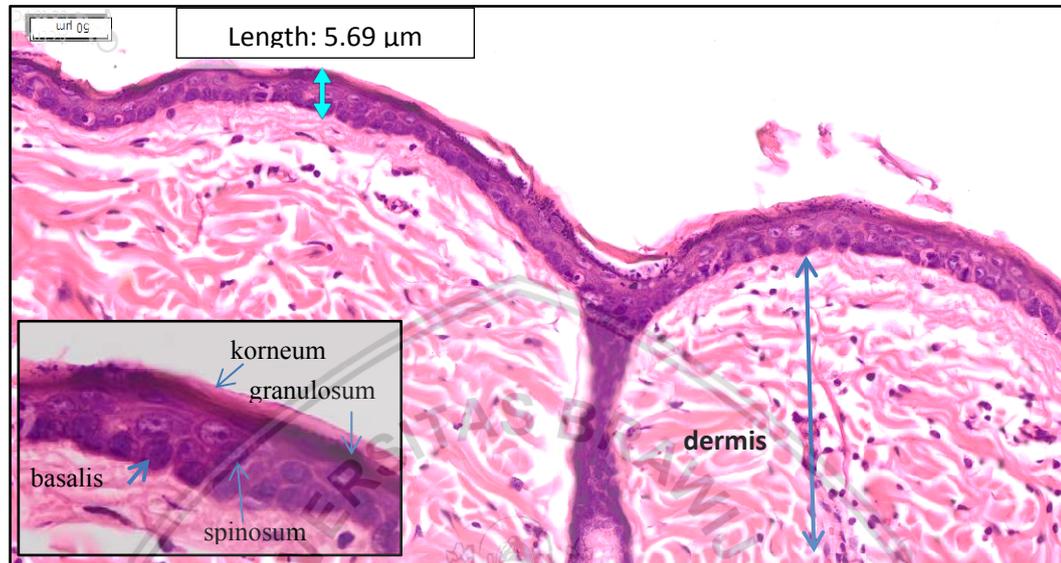
5.3 Efek Pemberian Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar terhadap Ketebalan Epidermis

Pembagian kulit secara garis besar tersusun atas tiga lapisan utama yaitu lapisan epidermis, lapisan dermis, dan lapisan subkutis (*hypodermis*). Tidak ada garis tegas yang memisahkan dermis dan subkutis, subkutis di tandai dengan adanya jaringan ikat longgar dan adanya sel dan jaringan lemak (Mahmudah, 2013). Epidermis terdiri atas lima lapisan penghasil keratin yaitu stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum germinativum (Meschester, 2012).

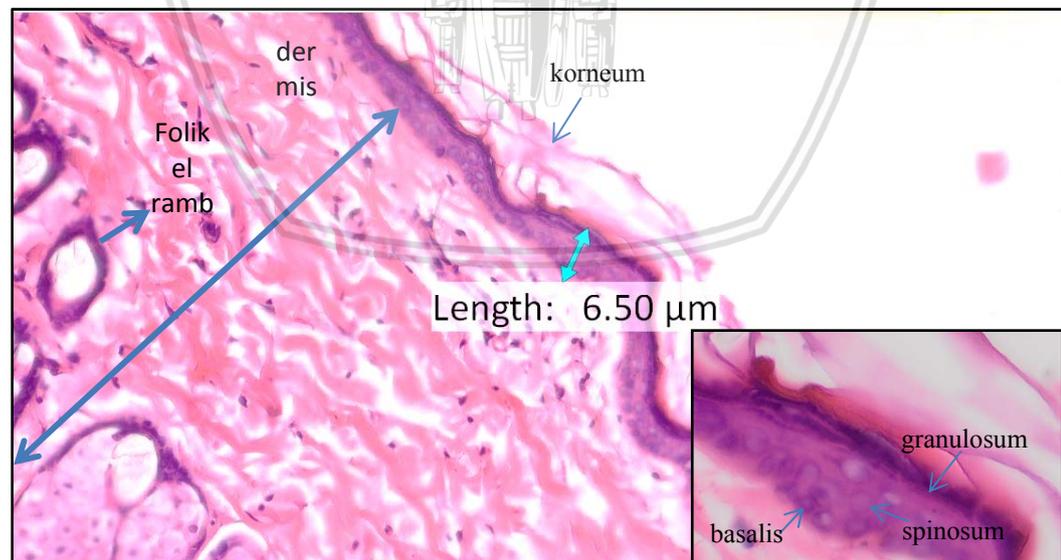
Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian kitosan pada luka, dapat mempercepat kesembuhan luka dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa pemberian kitosan dengan dosis efektif sebesar 5%. Sehingga pada penelitian ini diharapkan pemberian salep ekstrak kitosan memiliki kualitas yang hampir sama dan mampu meningkatkan rata-rata ketebalan epidermis sebanding dengan salep komersial yang digunakan sebagai kontrol dan telah beredar dipasaran.

Penelitian ini, parameter yang diamati dalam proses kesembuhan luka adalah ketebalan epidermis. Pengamatan parameter ketebalan epidermis dilakukan untuk mengetahui proses reepitelisasi. Proses reepitelisasi akan menghasilkan kembali lapisan epidermis yang utuh untuk menutup luka sehingga dapat terlindungi dari lingkungan luar. Gambaran histopatologi luka diamati

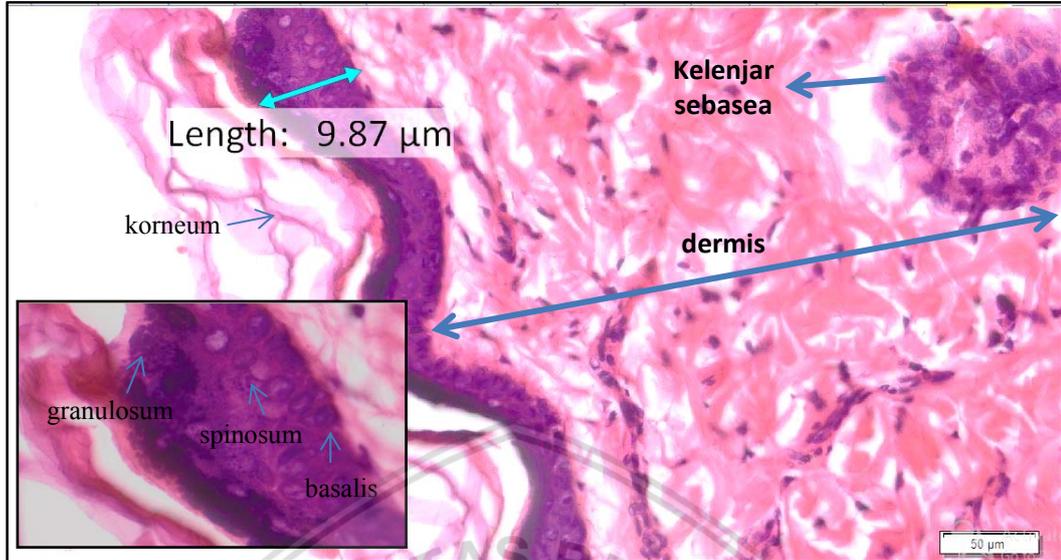
menggunakan mikroskop dengan perbesaran total 100X dan 400X dilihat pada **Gambar 5.2** sampai **Gambar 5.7**.



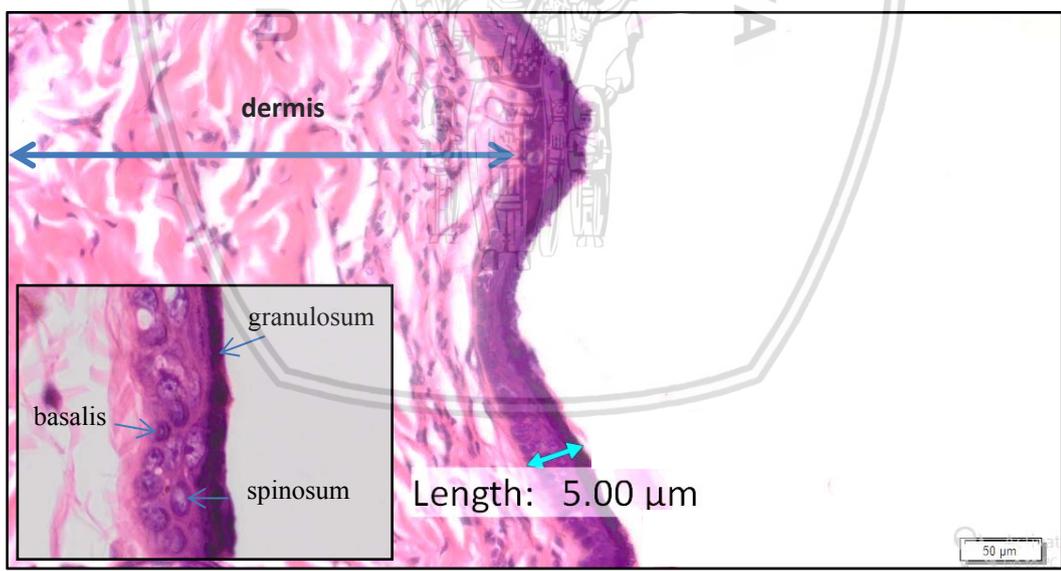
Gambar 5.2. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok kontrol positif hari ke-1 (**B1**) dengan menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan sebesar 5.69 μm dan pada perbesaran 400x tampak stratum korneum, granulosum, spinosum dan basalis.



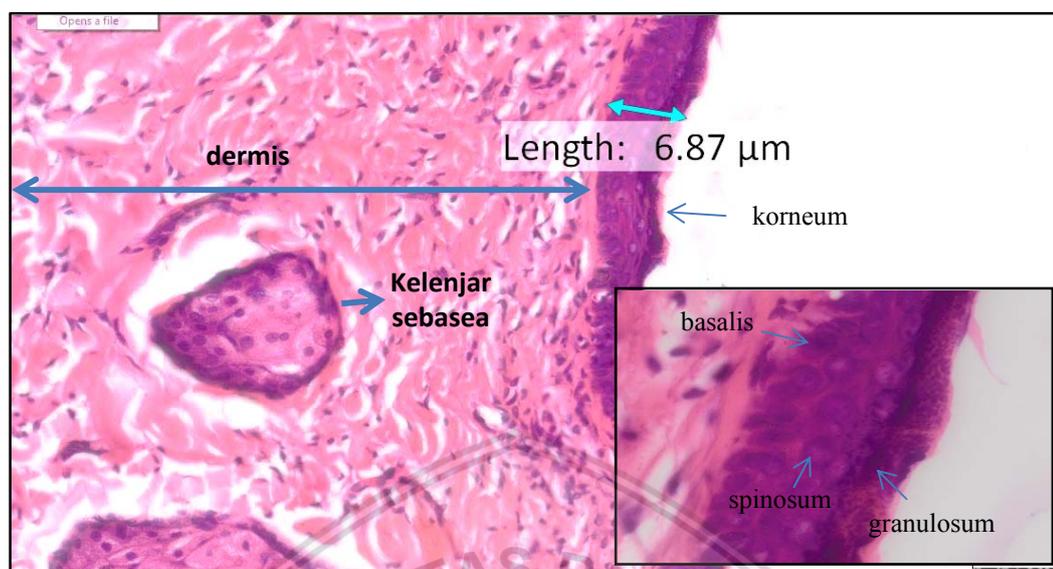
Gambar 5.3. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok kontrol positif hari ke-3 (**B3**) dengan menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan sebesar 6.50 μm dan perbesaran 400x tampak stratum korneum, granulosum, spinosum dan basal.



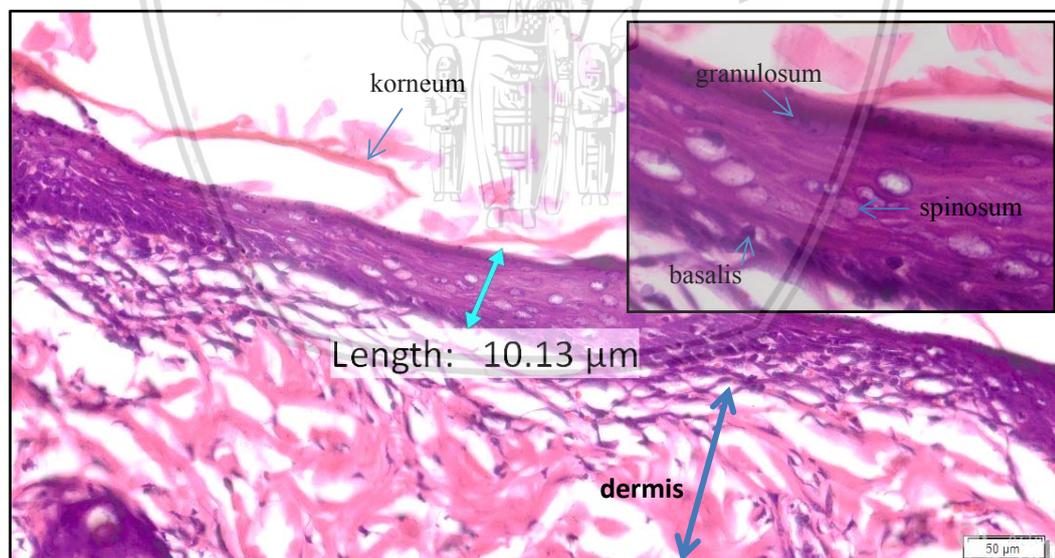
Gambar 5.4. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok kontrol positif hari ke-7 (B7) dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan sebesar 9.87 μm dan pada perbesaran 400x tampak stratum korneum, granulosum, spinosum, dan basal.



Gambar 5.5. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-1 (K1) dengan menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan 5.00 μm pada perbesaran 400x tampak stratum granulosum, spinosum, dan basal.



Gambar 5.6. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-3 (**K3**) dengan menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan sebesar 6.87 μm dan pada perbesaran 400x tampak stratum korneum, granulosum, spinosum dan basal.



Gambar 5.7. Gambaran histopatologi luka bakar kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-7 (**K7**) dengan menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x dengan menggunakan *microruler* didapatkan hasil ketebalan sebesar 10.13 μm dan pada perbesaran 400x tampak stratum korneum, granulosum, spinosum, dan basal.

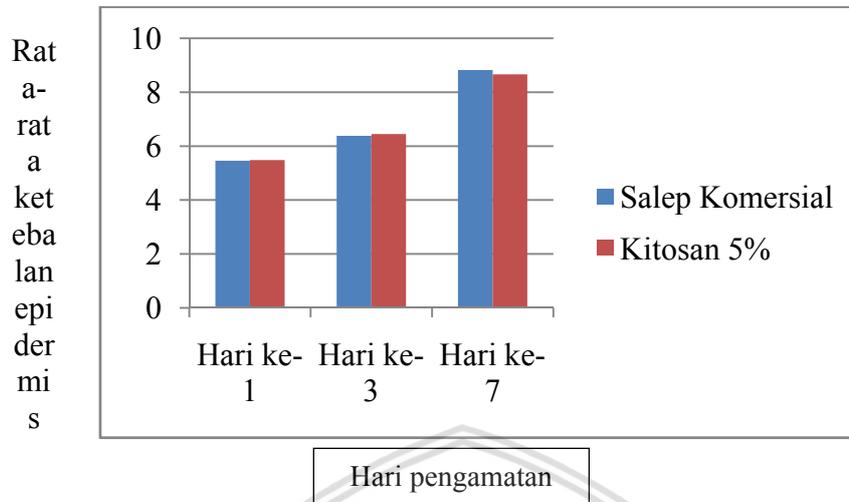
Berdasarkan gambaran ketebalan epidermis yang diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x pada lapisan epidermis, tampak pada kelompok kontrol positif terapi salep komersial hari ke-1 (**B1**), **Gambar 5.2** menunjukkan bahwa stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum dan stratum korneum sudah terbentuk, akan tetapi ketebalannya masih belum sesuai pada normalnya akibat luka bakar masih pada tahap inflamasi. Kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-1 (**K1**), **Gambar 5.3** menunjukkan bahwa stratum korneum tidak tampak pada lapisan epidermis. Sedangkan stratum basalis, stratum spinosum, dan stratum granulosum sudah terbentuk, akan tetapi ketebalan pada lapisan epidermis masih belum normal. Kelompok kontrol positif **B3**, **Gambar 5.4 dan 5.5**, kelompok kontrol positif dan salep kitosan 5% (**B3**) dan (**K3**) menunjukkan bahwa lapisan epidermis sudah terbentuk seluruhnya, pada stratum spinosum mulai mengalami peningkatan penebalan dikarenakan mulai masuk fase proliferasi. Kelompok kontrol positif **B7**, **Gambar 5.6** menunjukkan bahwa stratum pada epidermis sudah terbentuk keseluruhan yaitu stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum korneum. Ketebalan pada lapisan epidermis tampak semakin menebal. Kelompok perlakuan salep kitosan **K7**, **Gambar 5.7** menunjukkan bahwa stratum pada lapisan epidermis sudah terbentuk secara keseluruhan yaitu stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum korneum, pada stratum basalis pembentukannya sudah terlihat kompak dan beraturan selain itu stratum spinosum juga mulai menebal, dan akan terus bertambah hingga berakhirnya fase proliferasi.

Proses reepitelisasi dimulai ketika sel-sel epidermal yang berproliferasi menuju area luka. Keratinosit pada stratum basalis akan aktif membelah, bermigrasi, dan berproliferasi menuju stratum spinosum. Pada stratum spinosum, sel keratinosit akan bermigrasi dan berproliferasi menuju stratum korneum. Keratinosit yang berada di stratum korneum akan berdiferensiasi menjadi keratin (Paster *et al.*, 2014).

Data rata-rata ketebalan epidermis yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistika menggunakan uji *Independent T-test* ($\alpha=0,05$) sehingga diperoleh hasil bahwa rata-rata ketebalan epidermis mengalami kenaikan dari hari ke-1, hari ke-3, dan hari ke-7 pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5%, dengan perbedaan rata-rata pada masing masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (**Tabel 5.1** dan **Gambar 5.8**).

Tabel 5.1. Data Ketebalan Epidermis Kelompok Perlakuan Salep Kitosan dan Kelompok Kontrol Positif Hari ke-1, ke-3, dan ke-7.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ketebalan Epidermis (Mean \pm SD)	Peningkatan Ketebalan Epidermis (%)
B1 (Kontrol positif Salep komersial hari ke-1)	5.46 \pm 0.81	-
B3 (Kontrol positif Salep komersial hari ke-3)	6.38 \pm 0.56	14%
B7 (Kontrol positif Salep komersial hari ke-7)	8.82 \pm 1.18	27%
K1 (Terapi salep kitosan 5% hari ke-1)	5.48 \pm 0.46	-
K3 (Terapi salep kitosan 5% hari ke-3)	6.45 \pm 0.48	15%
K7 (Terapi salep kitosan 5% hari ke-7)	8.66 \pm 0.83	25%



Gambar 5.8 Diagram Perbandingan rata-rata ketebalan epidermis pada kelompok terapi salep kitosan dengan salep komersial pada hari ke-1, ke-3, dan ke-7.

Berdasarkan **Tabel 5.1** dan **Gambar 5.8** dapat dilihat bahwa kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% hari ke-1 (**K1**) memiliki ketebalan epidermis yang masih tipis dibandingkan dengan rata-rata ketebalan epidermis kelompok terapi salep kitosan lainnya yaitu dengan rata-rata 5.48, sedangkan pada kelompok kontrol Salep komersial hari ke-1 (**B1**) sebesar 5.46, masih terhitung tipis dibandingkan rata-rata ketebalan epidermis kelompok kontrol yang lainnya dikarenakan masih berada pada fase inflamasi.

Pada hari ke-3 kelompok perlakuan terapi salep kitosan 5% (**K3**) jumlah rata-rata ketebalan epidermis sebesar 6.45 dan pada kelompok kontrol positif Salep komersial (**B3**) sebesar 6.38, juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Rata-rata ketebalan epidermis mengalami peningkatan dibandingkan dengan hari ke-1, karena memasuki awal fase proliferasi untuk kesembuhan luka.

Pada hari ke-7, tidak adanya perbedaan nyata juga ditunjukkan oleh kelompok perlakuan salep kitosan 5% (**K7**) dengan kelompok kontrol (**B7**)

dengan rata-rata jumlah ketebalan epidermis 8.66 dan 8.82. Berdasarkan data di atas menunjukkan rata-rata ketebalan epidermis terus mengalami peningkatan hingga perlakuan hari ke-7.

Pada K3 jumlah rata-rata ketebalan epidermis mulai mengalami peningkatan sebesar 15%, karena reepitelisasi akan bekerja mulai dari hari ke-3 setelah terjadinya luka yakni pada fase proliferasi. Pada K7 rata-rata jumlah ketebalan epidermis juga mengalami peningkatan sebesar 25%. Reepitelisasi akan naik terus hingga mencapai tahap akhir fase proliferasi.

Ketebalan epidermis normal pada tikus jantan dan betina berbeda. Pada betina memiliki ketebalan rata-rata $9.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$, sedangkan pada jantan memiliki ketebalan epidermis rata-rata $13.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$. Lapisan epidermis akan meningkat terus hingga mencapai akhir fase proliferasi di hari ke-21 (Azzi *et al.*, 2005).

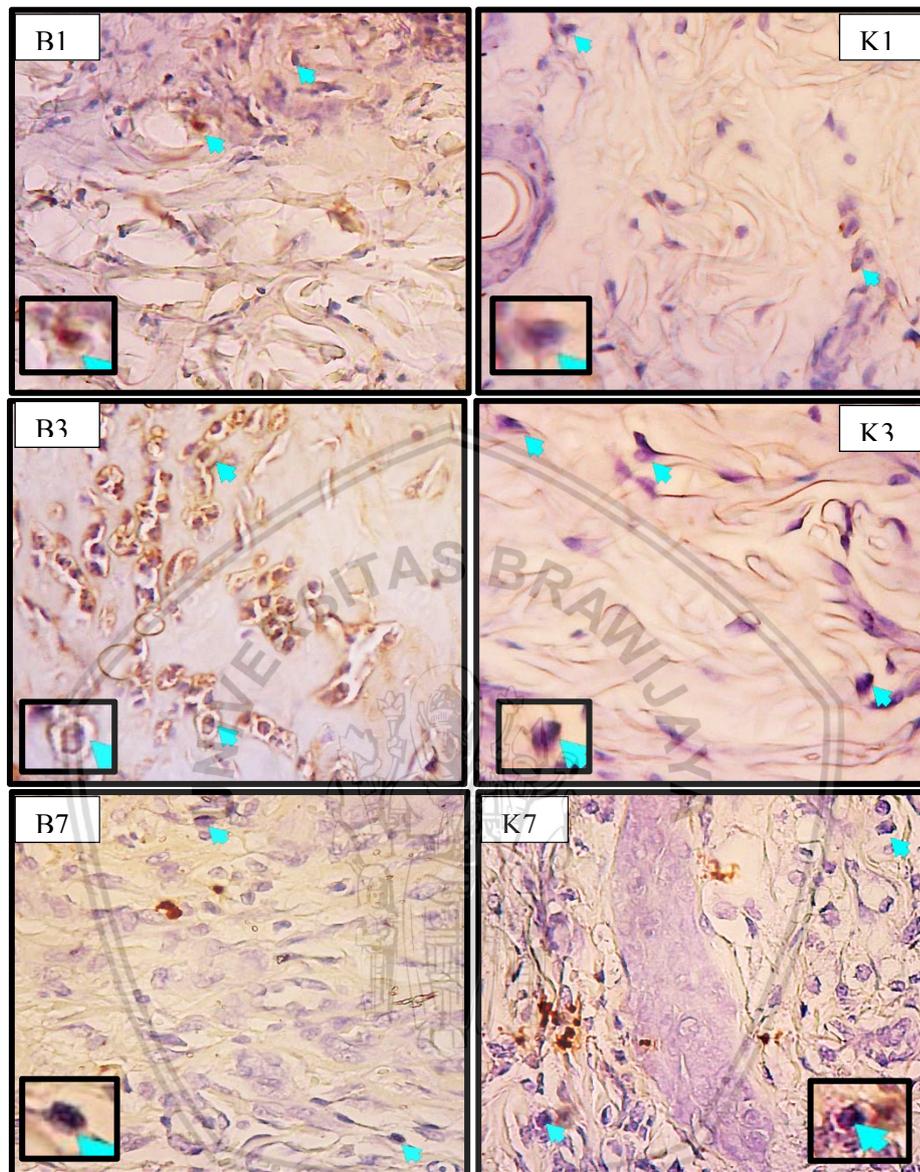
Menurut Singer and Claraks (dikutip dalam Handayani, 2006) pada fase proliferasi mulai terjadi proses reepitelisasi dimana sel-sel epitel mulai bermigrasi dan berproliferasi ke jaringan luka. Lapisan hemidesmosom antara epidermis dengan membran dasar menipis dan memungkinkan sel epitel yang telah aktif untuk bermigrasi ke jaringan luka dengan mengeluarkan seperti TGF- β yang dapat meningkatkan sintesis kolagen. Proses reepitelisasi akan menghasilkan kembali lapisan epidermis yang utuh untuk menutup luka sehingga dapat terlindungi dari lingkungan. Proses reepitelisasi terdiri dari fase migrasi, proliferasi, dan diferensiasi kreatinosit. Migrasi dan proliferasi kreatinosit dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu FGF, KGF, TGF- β , TGF- α , IGF, HGF, dan EGF (Rahayu *et al.*, 2003).

5.4 Efek Pemberian Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar terhadap Ekspresi EGF

Ekspresi EGF pada jaringan kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar derajat II dalam diamati menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x sebanyak lima lapang pandang dan dihitung menggunakan *immunoratio* serta dianalisa menggunakan uji *Independent T-test* untuk memperoleh ada tidaknya perbedaan yang nyata pada ekspresi EGF pada masing-masing ulangan setiap kelompok.

Pada penelitian ini ekspresi EGF dilihat berdasarkan ekspresi EGF yang berwarna kecoklatan pada setiap kelompok perlakuan. Warna coklat yang muncul disebabkan oleh ikatan antara antigen pada jaringan dan antibodi sekunder yang diikuti dengan penambahan enzim SA-HRP (*Strepta Avidin Horse Radish Peroxidase*) dan substrat berupa kromagen DAB sehingga menghasilkan warna kecoklatan pada target yang spesifik. Hasil pengukuran *immunoratio* dilakukan dengan metode histopatologi menggunakan pewarnaan IHK, hasil dapat dilihat pada **Gambar 5.9**.

Jumlah rata-rata ekspresi EGF pada tiap perlakuan mengalami peningkatan pada tiap fase kesembuhan mulai dari fase inflamasi menuju fase proliferasi, dilihat pada waktu pengamatan hari ke-1, hari ke-3, dan hari ke-7 selama 7 hari pemberian terapi dengan adanya perbedaan pada setiap harinya. Hal tersebut terlihat dengan jumlah rata-rata ekspresi kelompok perlakuan salep kitosan K1, K3, dan K7 dengan kelompok kontrol positif Salep komersial B1, B3, dan B7 (**Tabel 5.2 dan Gambar 5.10**).

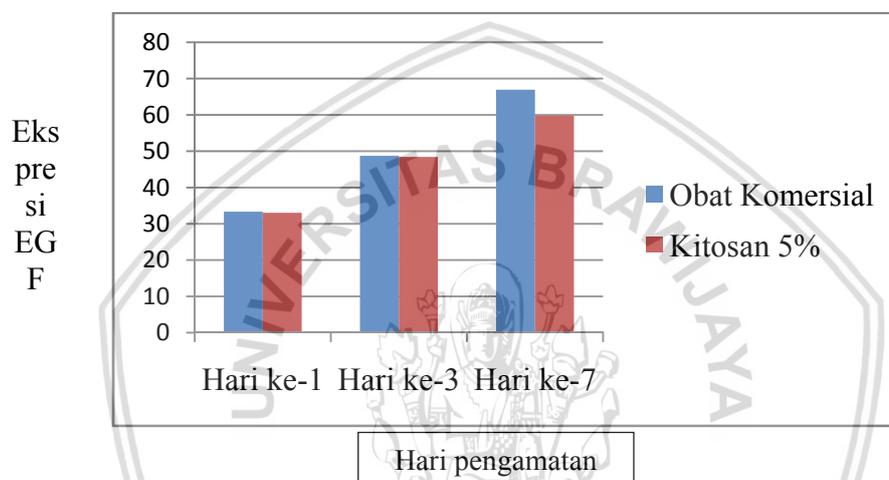


Gambar 5.9 IHK ekspresi EGF kulit tikus hari ke-1, ke-3, dan ke-7 pada lapisan dermis (400x)

Keterangan : **A.** Kontrol positif Salep komersial hari ke-1, **B.** Terapi kitosan hari ke-1, **C.** Kontrol positif Salep komersial hari ke-3, **D.** Terapi kitosan hari ke-3, **E.** Kontrol positif Salep komersial hari ke-7, **F.** Terapi kitosan hari ke-7; (Ekspresi EGF ditunjuk dengan panah biru pada sel makrofag).

Tabel 5.2 Data Ekspresi EGF

Kelompok Perlakuan	Hari ke-1 (%) (<i>mean</i> ± <i>SD</i>)	Hari ke-3 (%) (<i>mean</i> ± <i>SD</i>)	Hari ke-7 (%) (<i>mean</i> ± <i>SD</i>)
Kontrol positif (Obat Komersial)	33.34±7.62	48.73±4.09	66.95±3.92
Kitosan 5%	33.04±7.24	48.41±3.00	59.83±5.80



Gambar 5.10 Diagram Perbandingan Ekspresi EGF (*Epidermal Growth Factor*) pada kelompok kontrol positif salep komersial dan perlakuan terapi salep kitosan 5%.

Berdasarkan **Tabel 5.2** dan **Gambar 5.10** dapat dilihat bahwa K1 dan B1 memiliki rata-rata jumlah ekspresi EGF yang rendah dibandingkan dengan rata-rata jumlah EGF lainnya pada kelompok terapi kitosan 5% dan kelompok kontrol positif terapi salep komersial. Didapatkan hasil B1 sebesar 33.34±7.62 dan K1 sebesar 33.04±7.24. Jumlah ekspresi EGF masih rendah karena proses kesembuhan luka masih dalam fase inflamasi. Tujuan utama fase inflamasi adalah menghilangkan jaringan yang mati dan pencegahan kolonisasi maupun infeksi oleh agen mikrobial patogen. Makrofag penting untuk membuang material asing

dan merangsang pergerakan sel. Makrofag pada fase inflamasi lebih banyak menghasilkan sitokin seperti IL-1 dan TNF- α (Leong, 2012; Tiwari, 2012).

Pada hari ke-3 kelompok terapi kitosan 5% (K3) dan kelompok kontrol positif (B3) rata-rata ekspresi EGF mengalami peningkatan dengan hasil 48.41 ± 3.00 dan 48.73 ± 4.09 . Keduanya menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antara K3 dan B3. Dibandingkan dengan K1 dan B1, pada K3 dan B3 mengalami peningkatan yang nyata dikarenakan proses penyembuhan telah memasuki awal fase proliferasi. Ekspresi EGF mengalami peningkatan pada hari ke-3, karena EGF bekerja dimulai pada fase inflamasi. EGF merupakan bagian dari kompleks *growth factor* dan dengan reseptornya bersama-sama membantu untuk memodulasi pertumbuhan sel. Secara khusus, EGF berinteraksi dengan reseptornya di seluruh lapisan epidermis terutama di lapisan basal, meningkatkan pertumbuhan epitel ketika memasuki fase proliferasi (Acosta *et al.*, 2006).

Pada hari ke-7 kelompok perlakuan kitosan 5% (K7) dan kelompok kontrol positif (B7) terus mengalami peningkatan dari hari ke-1, hari ke-3, hingga hari ke-7. Pada K7 rata-ratanya sebesar 59.83 ± 5.80 dan B7 rata-ratanya sebesar 66.95 ± 3.92 , menunjukkan hasil ekspresi EGF yang tidak berbeda nyata pada keduanya. Pada hari ke-7 setelah luka, proses penyembuhan masih berada pada fase proliferasi. Fase proliferasi terjadi pada hari ke-3 hingga hari ke-14 setelah terjadinya luka (Tiwari, 2012). Berdasarkan data yang diperoleh, bahwa pemberian salep kitosan 5% dapat meningkatkan jumlah ekspresi EGF hasilnya tidak berbeda nyata dengan kontrol positif pemberian salep komersial.

EGF terletak pada inti sel, dengan mekanisme ligan EGF berikatan dengan reseptor EGF dan mengaktifkan Janus Kinase (JAK) intrasitoplasma, yang kemudian dapat berinteraksi dengan sinyal transduser dan aktivator transkripsi (STAT) yang menyebabkan dimerisasi. Dimer STAT aktif yang terakumulasi dalam inti sel dan mengaktifkan transkripsi gen target mereka. Protein kinase C dan pelepasan kalsium diaktifkan oleh *diacylglycerol* (DG) dan inositol trifostat mengirim sinyal untuk memulai ekspresi gen (Hardwicke, 2008).

Pada proses proliferasi terjadinya epitelisasi dan pembentukan jaringan granulasi, akan dimediasi oleh trombosit dan makrofag melalui produksi *growth factor* seperti EGF, TGF- α , dan PDGF. EGF bermanfaat untuk penyembuhan luka karena efeknya pada proliferasi keratinosit, fibroblast, dan sel endotel vascular, sehingga memfasilitasi pembentukan jaringan granulasi dan epitelisasi. Pembentukan kolagen yang berlebihan disebabkan oleh bantuan TGF- β 1, salah satu alasan pembentukan bekas luka. Pembentukan kolagen yang berlebihan ini dikurangi secara tidak langsung dengan menggunakan EGF, karena EGF berfungsi untuk menurunkan produksi TGF- β 1. Selain itu, EGF dapat merangsang fibroblast untuk mensintesis peningkatan jumlah VEGF dan HGF yang berguna pada proses angiogenesis (Kuroyanagi, 2017).

Epidermal Growth Factor (EGF) akan bekerja sama dengan *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) merangsang epitel tepi luka yang terdiri atas sel basal terlepas dari dasarnya dan berpindah mengisi permukaan luka, kemudian diisi sel baru yang terbentuk dari proses mitosis. Proses ini berhenti setelah epitel saling menyentuh dan menutup permukaan luka. Pada saat permukaan luka sudah

tertutup, fase proliferasi akan berhenti dan mulailah proses pematangan dalam fase remodeling (Hatz, 2004).

Jumlah kitosan pada setiap jenis hewan berbeda-beda kadar yang didapatkan. Pada kepiting didapatkan kitosan sebesar 69%, pada udang sebesar 70%, dan pada rajungan sebesar 73%. Pada penelitian ini didapatkan kitosan dari rajungan sebesar 53,38%. Perbedaan hasil kitosan yang di dapatkan tergantung proses dari proses deasetilasi, deproteinasi, dan demineralisasi. Selain itu kitosan yang berasal dari air tawar maupun air asin serta lokasi dari jenis krustasea yang diambil juga dapat mempengaruhi hasil akhir kitosan yang didapatkan.

Menurut penelitian sebelumnya, adanya dosis letal (LD_{50}) sebesar 16 g/hari/kg berat badan tikus pada pemberian dosis oral. Selain itu, tidak adanya iritasi lokal pemberian kitosan setelah diaplikasikan secara topikal pada tikus, marmut, dan kelinci sebagai hewan penelitian yang telah diuji (Rao and Sharma, 1997). Pada penelitian ini, pemberian secara topikal diberikan sebanyak 0.25 g pada setiap tikus. Tidak adanya efek samping yang ditimbulkan serta masih dalam batas normal.

Obat komersial pada penelitian ini memiliki kandungan ekstrak placenta dan neomisin sulfat. Ekstrak plasenta bekerja memicu pembentukan jaringan baru pada area luka sedangkan neomisin sulfat berfungsi sebagai antibakteri, mencegah infeksi pada area luka (Kalberned, 2013). Neomisin merupakan golongan aminoglikosida berspektrum luas peka terhadap gram negatif dan gram positif, bersifat bakteriosidal. Neomisin akan berikatan dengan subunit 30s ribosom dan menghambat sintesis protein. Terikatnya neomisin pada ribosom dapat

mempercepat transport neomisin ke dalam sel sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma yang selanjutnya menyebabkan kematian sel (Plum, 2008).

Kitosan memiliki sifat antibakteri dengan karakteristik mempunyai gugus fungsional amina ($-NH_2$) yang bermuatan positif sangat kuat yang dapat menarik molekul asam amino bermuatan negatif pembentuk protein mikroba. Gugus fungsional amina juga memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat menarik mineral Mg^{2+} yang terdapat pada ribosom dan mineral Ca^{2+} yang terdapat pada dinding sel mikroba membentuk ikatan kovalen koordinasi. Hal tersebut menjadikan kitosan dapat mengakibatkan timbulnya kebocoran konstituen intraseluler sehingga mikroba tersebut akan mati (Sarwono, 2010). Selain itu, kitosan mempercepat fase proliferasi luka dengan cara mengaktivasi migrasi sel PMN, makrofag, dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka, sehingga mempercepat pembentukan jaringan baru pada luka (Karakecilli *et al.*, 2008). Kontrol positif terapi salep komersial dengan kelompok perlakuan terapi kitosan 5%, keduanya memiliki fungsi yang sama yaitu sebagai bakteriosidal dan mempercepat pembentukan jaringan baru, sehingga keduanya memiliki hasil yang tidak berbeda nyata. Kitosan dapat digunakan sebagai alternatif lain untuk penyembuhan luka.

BAB 6.KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Perbandingan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) konsentrasi 5% tidak berbeda nyata dengan kontrol positif salep komersial sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar terhadap ekspresi EGF dilihat dari meningkatnya ekspresi EGF mulai hari ke-3.
2. Perbandingan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) konsentrasi 5% tidak berbeda nyata dengan kontrol positif salep komersial sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar yang dapat meningkatkan ketebalan epidermis mulai hari ke-3.

6.2 Saran

Penelitian penggunaan kitosan sebagai obat luka bakar dapat diaplikasikan untuk jenis luka bakar yang lain dan parameter yang belum diteliti, selain itu perlu diadakan uji lanjutan untuk mengetahui apakah kitosan dapat memberikan reaksi alergi, yang diamati secara makroskopis dan mikroskopis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulkadir, W. dan F.R. Polontalo. 2011. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Health and Sport* 3 (2): 285-362.
- Acosta, J.B., W. Savigne, and C. Valdez. 2006. Epidermal Growth Factor Intralesional Infiltrations can Prevent Amputation in Patients with Advanced Diabetes Foot Wound. *In Wound Journal* 3: 232-239.
- Akhoodinasab, M.R and M.Saberi. 2014. Comparison of Healing Effect of Aloe Vera Extract and Silver Sulfadiazine in Burn Injury in Experimental Rat Model. *Original article* 3 (1): 29-24.
- Anderson, I. 2006. Debridement Methods in Wound Care. *Nursing Standard Journal* 20 (24) : 65-72.
- Anggowarsito, J.L. 2014. Luka Bakar Sudut Pandang Dermatologi. *Jurnal Widya Medika Surabaya* 2 (2): 1-6.
- Anggraeni, Y. 2012. *Preparasi dan Karakterisasi Film Sambung Silang Kitosan-Tripolifosfat yang Mengandung Asiatikosidase sebagai Pembalut bioaktif untuk Luka*. Depok: Universitas Indonesia.
- Angka, S.L. dan M.T. Suhartono. 2000. *Bioteknologi Hasil Laut*. Pusat Pengkajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan. Institut Pertanian Bogor.
- Apono, J.V., V.Y.Y. Paulina, dan S.S. Hamidah. 2014. Uji Efektivitas Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn) Terhadap Penyembuhan Luka yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus Aureus* pada Kelinci (*Ortolagus cuniculus*). *Jurnal Ilmiah Farmasi* 3 (3) ISSN: 2302-2493.
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. AVMA.org.
- Awan, S.A., N. Astuti, A. Bukhari, M. Mahendradatta, dan A.B. Tawah. 2014. Manfaat Suplementasi Ekstrak Ikan Gabus terhadap Kadar Albumin, MDA pada Luka Bakar Derajat II. *Jurnal ST Kesehatan* 4 (4): 385-393.
- Azzi, L. and M. El-Alfy. 2005. Gender Differences in Mouse Skin Morphology and Specific Effects of Sex Steroids and Dehydroepiandrosterone. *Journal of Investigative Dermatology* 124 (1): 22-27.



- Bodnar, R.J. 2013. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Journal Advances in Wound Care (New Rochelle)* 2(1): 24-29.
- Djamaluddin, A.M. 2009. *Pemanfaatan Kitosandaari Limbah Krustasea untuk Penyembuhan Luka pada Mencit (Mus musculus albinus)*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Domb, A.J. and N. Kumar. 2011. *Biodegradable Polymers in Clinical Development*. John Wiley and Sons. 158.
- Dompeipen, E.J. 2017. *Isolasi dan Identifikasi Kitin dan Kitosandaari Kulit Udang Windu (Peneus monodon) dengan Spektroskopi Inframerah*. <http://ejournal.kemenperin.go.id/bpbiam> [17 Juli 2018]
- Dutta, P.K., J. Dutta, and V.S. Tripathy. 2000. Chitin and Chitosan: Chemistry and Applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 63: 20-31.
- Chakroborty, P.D. and D. Bhattacharyya. 2009. Analysis of Free and Bound NADPH in Aqueous Extract of Human Placenta Used As Wound Healer. *Journal Chromatogr. B.* 877: 2435.
- Edlich, R.F. 2017. *Thermal Burns: Overview, Pathophysiology, Quantifying, Burns Severity*. <http://emergencymedicine.medscape.com/article/1278244-overview#a1> [30 Maret 2018]
- Elmotasem. 2007. Chitosan-Alginate Blend Films for the Transdermal Delivery of Meloxicam. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 3 (1): 12-29.
- Fatchiyah, A.E.L., S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. Brawijaya Press. Malang.
- Fawzya, Y.N., N. Indriati, dan T.D. Suryaningrum. 2004. Pengaruh Penambahan Kitin pada Medium Produksi terhadap Kitin Deasetilase dari *Bacillus* K29-14. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 10(3): 11-18.
- Febram, B.P., I. Wientarsih, dan B. Pontco. 2010. Aktifitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiacavarsapientum*) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Majalah Obat Tradisional* 15(3): 121-137.
- Firdaus, M.F.P., Madyawati, N.S. Widjaja, M. Lamid, K. Rachmawati, dan S.H. Warsito. 2013. Efektifitas Penambahan Kombinasi Tujuh Enzim Terhadap Estimasi Pertumbu

hanBeratBadanSapiPotongPeranakanSimental. *Journal Agroveteriner*2(1): 3.

Galil, B. 2004. *Portunuspelagicus*. <http://www.ciesm.org/atlas/portunuspelagicus.htm>. [3 April 2018].

Gaulitz, G.G., danM.G. Jeschke. 2012. *Pathophysiology of Burn Injury*. Handbook of Burns Volume 1 Acute Burn Care.Spring Wien New York. P. 131-132, 148.

Gibson, J. 2002. *FisiologidanAnatomi Modern untukPerawat* (Sugiarto, Bertha, penerjemah). EGC PenerbitBukuKedokteran, Jakarta. 479.

Giwangkara, S.E.G. 2007. *Spektrofotometri Infra Merah*. http://www.chemistry.org/artikel_kimia/kimia_analisis/spektrofotometri_intra_merah/ [17 Juli 2018].

Green, A. and N. Rudall. 2010. Burn Management. *Pharmaceutical Journal* 2: 249.

Gunstream, S.2000. *Anatomy and Physiology*. McGraw Hill, Boston.

Gupta, V., A. Sinha, K.D. Jithendra, S.S. Chauhan, and S. Singh. 2016. Placenta Extract the Magical wound Healer, Next Milestone in the Healing of Periodontal Surgery. *Journal of Dental and Medical Sciences* 15(11): 73-79.

Gurtner, G.C. 2007. *Wound Healing: Normal and Abnormal*. In Thorne, C.H., R.W. Beasley, S.J. Aston, S.P. Bartlett, G.C. Gurtner, and S.L. Spear, Grabb and Smith's Plastic Surgery. Lippincott Williams and Redox Signaling 15(6): 1583-1606.

Hafiluddin.2003. *Studi Proses IsolasiKitindariCangkangRajungan (Portunuspelagicus) denganMenggunakanMesinEkstrasi Semi Otomatis*. FakultasPerikananandanIlmuKelautan.InstitutPertanian Bogor.

Handayani, I. 2006. *AktivitasSediaan Gel dariEkstrakLidahBuaya (Aloe barbadensis Miller) untuk Proses Persembuhan Luka padaMencit (Musmusculus)*. FakultasKedokteranHewan. InstitutPertanian Bogor.

Hanifah, N. danD. Endang.2015. EfekAntiinflamasiKitosandariCangkangUdangPantaiTrisikpadaTikus Model Pheumatoid Arthritis.YogyakartaFakultasFarmasi.Universitas Ahmad Dahlan. *Journal Pharmacia* 5 (2) 2015: 177-184.

Harahap, N.I. 2017. *UjiAktivitasAntibakteri Gel EkstrakEtanolDaunSambungRambat (MikaniamicranthaKunth) terhadap*

Angiogenesis Luka Eksisi Terinfeksi pada Marmut. [Tesis]. Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara.

- Hardwicke, J., D. Schmaljohann, D. Boyce, and D. Thomas. 2008. *Epidermal Growth Factor Therapy and Wound Healing – Past, Present, and Future Perspectives*. Elsevier Inc, Swansea. 172-77.
- Hartz, R.A., R. Niedner, and W. Vanscheidt. 2004. *Physiology of Wound Healing*. Springer-Verlag, Berlin. 1-16.
- Hastuti, B., dan N. Tulus. 2015. *Sintesis Kitosan dari Cangkang Kerang Bulu (Anadara inflata) Sebagai Absorben Ion Cu^{2+}* . ISBN: 978-602-73159-0-7.
- Janquiera and Carneiro. 2007. *Histologi Dasar: Teks dan Atlas; alihbahasa*. ed. 10. EGC, Jakarta.
- Kagan, R.J., M.D. Peck, D.H. Ahrenholz, W.L. Hickerson, J.H. Holmes, and R.A. Korentager. 2009. *American Burn Association White Paper Surgical Management of the Burn Wound and Use of Skin Substitutes*. <http://www.ameriburn.org/WhitePaperFinal.pdf> [Di akses pada 20 April 2018]
- Kalberned. 2013. *Bioplacenton*. Kalbe Medical Portal. <http://www.kalberned.com/Products/Drugs/Branded/tabid/245/ID/5699/Bioplacenton.aspx> [3 April 2018].
- Karakecilli, A.G., S. Cristiana, G. Menemse, and M. Givanni. 2008. *Enhancement of Fibroblastic Proliferation on Chitosan Surfaces By Immobilized Epidermal Growth Factor*. Elsevier. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 989-996.
- Kasim, F. 2011. *Informasi Spesialite Obat (ISO) Indonesia*. PT ISFI, Jakarta. (6).
- Kawulusan, F.R., S.J.R. Kalangi, dan M.M. Kaseke. 2015. *Gambaran Reaksi Radang Luka Antemortem yang Diperiksa 1 Jam Postmortem pada Hewan Coba*. *Jurnal e-Biomedik* 2(1): 393-397.
- Krinke, G.J. 2000. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat*. Academic Press, London.
- Kuroyanagi, M. and Y. Kuroyanagi. 2017. *Tissue-engineered Products Capable of Enhancing Wound Healing*. *Journal AIMS Materials Science* 4(3): 561-581.
- Leong, M. and L.G. Philips. 2012. *Wound Healing*. Sabiston Textbook of Surgery. Elsevier Saunders, Amsterdam. (9): 984-92.
- Lima, C.C., A.P.C. Pereira, J.R.F. Silva, L.S. Oliveira, M.C.C. Resck, C.O. Grechi, M.T.C.P. Bernardes, F.M.P. Olimpio, A. Santos, E.K. Incerpi, and J.A.D. Garcia. 2009. *Ascorbic Acid for The Healing of Skin Wounds in Rats*. *Braz J Bio* 169 (4): 1195-1201.

- Mahmudah. 2013. *Uji Aktivitas Film Kitosan yang Mengandung Asiatikosidase sebagai Penutup Luka Bakar pada Tikus Putih Betina (Rattus norvegicus) Galur Sprague Dawley secara In Vivo*. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Marzoeki, D. 1993. *Ilmu Bedah Luka dan Perawatannya (Luka Asepsis/Antiseptis, Desinfektandan Luka Bakar)*. Airlangga University Press, Surabaya. 3-9.
- Martin, J.W. and G.E. David. 1978. *Classification of Portunuspelagicus*. [http://www.ermstaxonomichierarchy\(familyportunidae\).htm](http://www.ermstaxonomichierarchy(familyportunidae).htm). [3 April 2018].
- Matilda, P. 2009. *Pengaruh Pemberian Infusa Buah Pare (Momordica charantia L.) terhadap Kesembuhan Luka Insisi Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Maust, M. 2002. *Introduced Species Summary Project Norway Rat (Rattus norvegicus)*. http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoffburg/invasion_bio/in_v_spp_summ/rattus_norvegicus.html. [2 April 2018].
- Mawarsari, T. 2015. *Uji Aktivitas Penyembuhan Luka Bakar Ekstrak Etanol Umbi talas Jepang (Colocasia esculenta (L.) Schott var. antiquorum) pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan Galur Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Mescher, A.L. 2010. Skin. In Mescher, A.L., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas (13th ed)*. McGraw-Hill Education. USA. 774-828.
- Meschester, A.L. 2012. *Histologi Dasar*. Junquiera: Teks & Atlas ed 12. H. Hartanto, ed. Jakarta: EGC.
- Moe, T., T. Khaing, T. Han, and H. Mon. 2008. *Effects of Chitosan Films on Wound Healing and Evaluation of Their Properties*. 1-4
- Moenadjat, Y. 2003. *Luka Bakar: Masalah dan tatalaksana*. Balai penerbit FK UI, Jakarta.
- Morwal, S., S. Rustolgi, and M. Sharma. 2016. Parallelism in Data Mining Technique: Challenges and Opportunities. *Journal of Control Theory and Applications* 9 (20): 9-13.
- Muliani, H. 2011. *Pertumbuhan Mencit (Mus musculus L.) setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (Jatropha curcus L.)*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Diponegoro. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 19 (1).

- Naibaho, O.H., V.Y.Y. Paulina, dan W. Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Omicum sanctum L.*) pada Kulit Pnggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococys aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi Unstrat* 2(02).
- Oemarjati, B.S. dan W. Wardana. 1990. *Taksonomi Avertebrata*. Pengantar Praktikum Laboratorium. UI Press, Jakarta.
- Paramita, A. 2016. *Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Binahong (Anrederacordifolia (Ten) Steeins) Terhadap Kepadatan Kolagen Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Mengalami Luka Bakar*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Parker, M.C.O., E.C. Ashby, M.W.N. Nicholls, C.H. Downing, and J.C. Brooker. 2016. *Povidone-Iodine Colorectal Carcinoma*. *Annals of the Royal Collage of Surgeons of England*. 67: 1-2.
- Paster, I., S. Olivera, C.Y. Natalie, R. Horacio, G.N. Aron, S. Andrew, B.P. Shailee, K. Laiqua, R.I. Rivkah, and T.C. Marjana. 2014. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care Journal* 3(7): 445-464.
- Paul, W. and C.P. Sharma. 2004. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trend Biometer Journal. Artif. Organs* 18 (1): 18-23.
- Pearce, E.C. 2005. *Anatomidan Fisiologis untuk Paramedis*. Penerbit PT Gramedia, Jakarta.
- Plumb, D.C. 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 6th ed. Wisconsin: Pharma Vet Inc.
- Putri, F.R. dan T. Sri. 2012. Efektivitas Salep Kitosan terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimia pada *Rattus norvegicus*. *Artikel Penelitian: Mutiara Media* 12 (1): 24-30.
- Putri, D.E. dan Sriwidodo. 2017. Peranan Epidermal Growth Factor pada Penyembuhan Luka Pasien Ulkus Diabetes. *Review Artikel: Farmaka* 14 (4).
- Rachmawati, W. dan D.H, Husniati. 2012. *Produksi Kitosan dari Bahan Baku Cangkang Udang Menggunakan Metode Kimia dan Enzimatis dengan Enzim Kitin Deasetilase*. Universitas Lampung.
- Rahayu, F., W. Ade, dan W. Rahayu. 2001. *Pengaruh Pemberian Topikal Gel Lidah Buaya (Aloe chinensis Bakter) terhadap Reepitelisasi Epidermis pada Luka Sayatan Kulit Mencit (Mus musculus L.)*. Fakultas Kedokteran. Universitas Riau.

- Rahayuningsih, T. 2013. *Penatalaksanaan Luka Bakar (Combustio)*. Profesi, 8: 1-13.
- Rao, S.B. and C.P. Sharma. 1997. Use of Chitosan as a Biomaterial: Studies on its Safety and Hemostatic Potential. *Journal Biomed. Ater. Res.* 34 (1): 21-28.
- Risma, Y.R.D.W. 2016. *Studi Penggunaan Terapi Cairan pada Pasien Luka Bakar*. Universitas Airlangga.
- Ratnawati, A., I.R. Djoni, dan S. Andri. 2014. *Sintesis dan Karakterisasi Kolagen dan Teripang-Kitosan sebagai Aplikasi Pembalut Luka*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga.
- Rowan, M.P. 2015. *The Burn Wound Microenvironment*. WHS. 5(3): 106-18.
- Sarbon, N.M., S. Sandanamsamy, S.F.S. Kamaruzaman, and F. Ahmad. 2015. Chitosan Extracted from Mud Crab (*Scylla olivacea*) Shells: Physicochemical and Antioxidant Properties. *J Food Sci Technol Article* 52 (7): 4266-4275.
- Sarwono, R. 2010. *Pemanfaatan Kitin atau Kitosan sebagai Bahan Antimikroba*. *Jurnal Pusat Penelitian Kimia* 2 (1): 1-7.
- Schultz, G. S. 2007. *The Physiology of Wound Bed Preparation*. In Granick, M. S. and Ganelli, R. L., *Surgical Wound Healing and Management*. Informa Helathcare, USA Inc. New York. 1-5.
- Sembiring, W.B. 2011. *Penggunaan Kitosan sebagai Pembentuk Gel dan Edible Coating serta Pengaruh Penyimpanan Suhu Ruang terhadap Mutu dan Daya Awet Empek-Empek*. Fakultas Ekologi Manusia. Institut Pertanian Bogor.
- Sherwood. 2001. Preparation and Properties of Nanoparticles of Calcium Phosphates with Various Ca/P Ratios. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 115(4): 243-255.
- Sloane, E. 2004. *Anatomid dan Fisiologi untuk Pemula*. Penerbit Buku Kedokteran: EGC, Jakarta.
- Sjamsuhidayat, K., P. Warko, O.H. Theddu, dan R. Rudiman. 2010. *Buku Ajar Ilmu Bedah Edisi ke-3*. Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Syalindra, F. 2017. *Perbedaan Penyembuhan Luka Sayat Secara Makroskopis antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkim Tali Pusat Manusia dengan Povidone Iodine pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran: Universitas Lampung.

- Tanggo, V.T.
2013. *Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Kulit Delima Pada Penyembuhan Luka Split Thicknes Kulit Tikus*. Departemen SMF Ilmu Bedah Plastik Rekrotruksidan Estetik. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Tiwari, V.K. 2012. Burn Wound: How it Differs from Other Wounds. *Indian Journal of Plasctic Surgery* 45: 364-373.
- Wasiatmadjadan Syarif. 2007. *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*. UI Press, Jakarta. 3-8.
- Wingerd, B.D. 1988. *Rat Dissection Manual*. JHU Press, USA. 14.
- Yulita, L.D. 2018. *Perbedaan Kecepatan Penyembuhan Luka Bakar Derajat II antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Wharton's Jelly Tali Pusat Manusia dengan Gel Bioplacenta pada Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus) Galur Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung.
- Yanuar, V. 2008. *Pemanfaatan Cangkang Rajungan (Portunus pelagicus) sebagai Sumber Kalsium dan Fosfor dalam Pembuatan Produk Crackers*. Institut Pertanian Bogor.
- Yapa, K.S. dan Enoch S. 2009. *Management of Bruns in the Community*. Wounds UK. 5 (2).
- Yasti, A.C., E. Sene, M. Saydam, G. Ozok, A. Couruh, and K. Yorganci. 2015. *Guideline and Treatment Algorithm for Burn Injuries*. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, March 2015, 21 (2).