

**Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol
(*Archidendron pauciflorum*) sebagai Terapi Luka
Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Dilihat
Dari Jumlah Sel Radang dan Ekspresi
Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

AMATULLAH FAUZIYYAH YASMIN

145130101111006



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol (*Archidendron pauciflorum*) sebagai Terapi Luka Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*)
Dilihat dari Jumlah Sel Radang dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α)**

Oleh:

**AMATULLAH FAUZIYYAH YASMIN
145130101111006**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 02 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Dian Vidiastuti, M.Si
NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Amatullah Fauziyyah Yasmin

NIM : 145130101111006

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol (*Archidendron pauciflorum*) sebagai Terapi Luka Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Dilihat dari Jumlah Sel Radang dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α)

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 tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

Amatullah Fauziyyah Yasmin
NIM.145130101111006

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK KULIT BUAH JENKOL
(*Archidendron pauciflorum*) SEBAGAI TERAPI LUKA INSISI PADA
TIKUS (*Rattus norvegicus*) DILIHAT DARI JUMLAH SEL RADANG
DAN EKSPRESITUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)**

ABSTRAK

Luka insisi adalah luka yang dibuat menggunakan benda tajam dengan memperhatikan bentuk, ukuran dan arah luka. Luka bisa ditangani dengan berbagai macam obat herbal yang mengandung agen antiinflamasi, contohnya adalah jengkol. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) terhadap jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α . Ekstrak kulit buah jengkol dibuat pada sediaan salep dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus *Rattus norvegicus* jantan dengan berat 150-200 gram dan berumur 8-12 minggu. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok KN (Kontrol Negatif) adalah kelompok yang tidak diinsisi dan tidak diterapi. Kelompok KP (Kontrol Positif) adalah kelompok yang diinsisi tetapi tidak diterapi. Kelompok P1 adalah kelompok yang diinsisi dan diberi terapi salep kulit jengkol 5%. Kelompok P2 adalah kelompok yang diinsisi dan diberi terapi salep kulit jengkol 10%. Kelompok P3 adalah kelompok yang diinsisi dan diberi terapi salep kulit jengkol 15%. Parameter yang digunakan adalah jumlah sel radang dengan histopatologi pewarnaan HE dan ekspresi TNF- α dengan histopatologi pewarnaan imunohistokimia. Analisis data yang dilakukan adalah dengan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Hasil penelitian menunjukkan pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% mampu menurunkan jumlah sel radang ($12,5 \pm 0,62$ sel) dan menurunkan ekspresi TNF- α ($24,4 \pm 6,91$ %). Kesimpulan penelitian ini adalah salep ekstrak kulit buah jengkol mampu menjadi terapi luka insisi pada tikus, dengan konsentrasi 10%.

Kata kunci: Kulit, Luka Insisi, Kulit Buah Jengkol, Sel Radang, TNF- α

EFFECTS OF DJENGKOL (*Archidendron pauciflorum*) FRUIT PEEL ANOINTMENT AS A THERAPEUTIC SKIN INCISION WOUND HEALING IN RAT (*Rattus norvegicus*) ON INFLAMMATORY TOTAL CELL AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) EXPRESSION

ABSTRACT

Incision wound is a wound created by sharp object and planned in shape, direction and size. Wound could be healed with several herbal medicines which contain anti-inflammatory agents, such as djengkol. The aim of this study is to determine the effects of djengkol (*Archidendron pauciflorum*) fruit peel anointment to decrease inflammatory total cells and to decrease expression of TNF- α . Djengkol ointment was made in three types of djengkol extracts with concentrations of 5%, 10% and 15%. The animal models in this research were twelve 150-200 g, 8-12 week-old male rats (*Rattus norvegicus*). This experimental used completely randomized experimental. The rats were divided into five treatment groups, each group contained of four rats. KN was negative group which didn't have incision and didn't get any treatment. KP was the positive group which had an incision wound but didn't get any treatment. P1 was a group which had an incision and has gotten treatment with 5% djengkol ointment. P2 was a group which had an incision and has gotten treatment with 10% djengkol ointment. P3 was a group which had an incision and has gotten treatment with 15% djengkol ointment. The parameters in this research were inflammatory total cells observed by histopathology with HE staining, and expression of TNF- α was measured by immunohistochemistry staining. The data was analyzed by *One Way* ANOVA test and *Tukey* range test with 95% of confidence level ($\alpha=0,05$). The result of this study showed that djengkol fruit peel anointment 10% concentration can reduce the number of inflammatory cells ($12,5 \pm 0,62$ cells) and reduce the TNF- α expressions ($24,4 \pm 6,91$ %). The conclusion of this study showed that djengkol fruit peel anointment could give effects as therapy for incision wounds with 10% concentration.

Keyword: Skin, Wound healing, Djengkol Fruit Peel, Inflammatory cell, TNF- α

KATA PENGANTAR

Ucapan alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol (*Archidendron pauciflorum*) sebagai Terapi Luka Insisi pada Tikus *Rattus norvegicus* Dilihat dari Jumlah Sel Radang dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α)”.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini dan secara khusus penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP selaku pembimbing I atas segala bimbingan, kesabaran, nasehat, motivasi, perhatian serta waktunya selama pelaksanaan dan penyusunan skripsi.
2. drh. Dian Vidiastuti, M.Si selaku pembimbing II atas bimbingan, saran, masukan serta waktunya selama pelaksanaan dan penyusunan skripsi.
3. drh. Aldila Noviatry, M. Biomed dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji yang telah banyak memberi masukan yang membangun serta waktunya dalam skripsi ini.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah memberikan dukungan dalam penyusunan skripsi.
5. Kedua orang tua penulis: Bapak Drs. Toto Hariwachjono, Med dan Ibu Dewi Fitriastuti Kusuma, S.Pt., kedua adik penulis: Fadhlurrahman Yusuf

Fardan dan Ahmad Syakir Lathifuddin serta seluruh keluarga besar atas jasa, cinta, kesabaran, do'a serta ketulusannya dalam mendukung segala cita-cita penulis.

6. Kelompok penelitian *Jeng Kool*: Nana, Firsta dan Gita yang telah bekerja sama dengan baik selama pelaksanaan dan penyusunan skripsi
7. Kakak sepupu penulis Mas R. A. Hafiidh serta orang terdekat penulis: Adisti, Mas Zakka, Tanty, Anganti, Selga, dan Ila yang selalu memberi semangat, dukungan dan doa kepada penulis
8. Teman-teman dari kelas 2014 C, Asisten Laboratorium Histologi Veteriner FKH UB, TEC *Seniors*, Rumah Tazkiyaa serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebut satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dan bantuan telah diberikan kepada penulis. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya, dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca, Aamiin

Malang, Agustus 2018

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Luka Insisi.....	7
2.1.1 Struktur Kulit.....	7
2.1.2 Pengertian Luka.....	10
2.1.3 Mekanisme Kesembuhan Luka.....	11
2.1.3.1 Fase Hemostatis.....	12
2.1.3.2 Fase Inflamasi.....	14
2.1.3.3 Fase Proliferasi.....	17
2.1.3.4 Fase <i>Remodelling</i>	19
2.1.4 Respon Imunitas pada Luka.....	20
2.1.5 Faktor Kesembuhan Luka.....	24
2.2 Salep.....	25
2.3 Jengkol (<i>Archidendron pauciflorum</i>).....	26
2.3.1 Definisi Jengkol.....	26
2.3.2 Klasifikasi Jengkol.....	27
2.3.3 Morfologi Jengkol.....	27



2.3.4 Kandungan Kulit Buah Jengkol.....	28
2.4 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	30
2.5 Sel Radang.....	33
2.6 TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>).....	35
BAB III KERANGKA KONSEP.....	37
3.1 Kerangka Konsep.....	37
3.2 Hipotesis Penelitian.....	41
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....	42
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	42
4.2 Alat dan Bahan.....	42
4.3 Sampel Penelitian.....	43
4.4 Rancangan Penelitian.....	44
4.5 Variabel Penelitian.....	45
4.6 Tahapan Penelitian.....	45
4.7 Prosedur Kerja.....	46
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	46
4.7.2 Pembuatan Ekstraksi Kulit Buah Jengkol.....	46
4.7.3 Pembuatan Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol.....	47
4.7.4 Pembuatan Luka Insisi pada Hewan Coba.....	48
4.7.5 Pemberian Terapi Salep Kulit Buah Jengkol.....	49
4.7.6 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit....	49
4.7.7 Perhitungan Jumlah Sel Radang.....	51
4.7.8 Metode Pewarnaan Imunohistokimia (IHK) dan Pengamatan Ekspresi TNF- α	52
4.8 Analisis Data.....	53
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	55
5.1 Tikus Pasca Perlakuan.....	55
5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol terhadap Jumlah Sel Radang pada Luka Insisi Tikus Putih (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>).....	60
5.3 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol terhadap Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α) pada Luka Insisi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	69
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	78
DAFTAR PUSTAKA.....	79
LAMPIRAN.....	87



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Hasil skrining fitokimia kulit jengkol.....	29
2.2	Data biologis tikus putih.....	32
5.1	Rata-rata jumlah sel radang.....	65
5.2	Rata-rata ekspresi TNF- α	73



DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Jaringan kulit tikus putih secara histologis.....	8
2.2	Fase kesembuhan luka.....	20
2.3	Skema respon imun luka.....	21
2.4	Reaksi imunitas kesembuhan luka.....	23
2.5	Pergeseran fenotip makrofag.....	24
2.6	Jengkol.....	28
2.7	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	31
2.8	Jenis-jenis sel PMN.....	34
2.9	Infiltrasi sel radang.....	34
3.1	Kerangka konsep.....	37
5.1	Gambaran makroskopis luka insisi tikus hari ke-3.....	56
5.2	Gambaran makroskopis luka insisi tikus hari ke-7.....	58
5.3	Gambaran makroskopis luka insisi tikus hari ke-10.....	59
5.4	Preparat HE luka insisi tikus KN.....	60
5.5	Preparat HE luka insisi tikus KP.....	61
5.6	Preparat HE luka insisi tikus P1.....	61
5.7	Preparat HE luka insisi tikus P2.....	62
5.8	Preparat HE luka insisi tikus P3.....	62
5.9	Grafik rata-rata dan standar deviasi sel radang.....	64
5.10	Preparat IHK luka insisi tikus KN.....	69
5.11	Preparat IHK luka insisi tikus KP.....	70



5.12	Preparat IHK luka insisi tikus P1.....	70
5.13	Preparat IHK luka insisi tikus P2.....	71
5.14	Preparat IHK luka insisi tikus P3.....	71
5.15	Grafik rata-rata dan standar deviasi TNF- α	73



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rencana Penelitian.....	88
2. Perhitungan Komposisi Salep.....	89
3. Perhitungan Dosis Anastesi.....	90
4. Data Jumlah Sel Radang.....	91
5. Data Statistika Radang.....	95
6. Data Ekspresi TNF- α	98
7. Data Statistika TNF- α	99
8. Keterangan Laik Etik.....	102
9. Determinasi Tanaman Jengkol.....	103
10. Surat Keterangan Ekstrak.....	104
11. Dokumentasi Penelitian.....	105

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

5HT	: 5 Hidroksitriptin
AA	: Asam Arakhidonat
AMP	: Adeno Monophospate
ANOVA	: Analysis of Variance
AVMA	: American Veterinary Medicine Association
bFGF	: Basic Fibroblast Growth Factor
BB	: Berat Badan
cm	: Centimeter
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: Bovine Serum Albumin
C	: Komplemen
COX	: Siklooksigenase
CRP	: C Reaktif Protein
DAB	: Diamino Benzidine
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ECM	: Extra Cellular Matrix
EGF	: Epidermal Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
g	: gram
HE	: Hematoksilin Eosin
IFN	: Interferon
IFN- γ	: Interferon Gamma
IGF-I	: Insulin Like Growth Factor-I
Ig-G	: Immunoglobulin-G
IHK	: Imunohistokimia
IL	: Interleukin
IL-1	: Interleukin-1
IL-1 β	: Interleukin-1 Beta

IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-12	: <i>Interleukin-12</i>
IL-17	: <i>Interleukin-17</i>
IL-22	: <i>Interleukin-22</i>
IM	: <i>Intramuscular</i>
KN	: <i>Kelompok Negatif</i>
KP	: <i>Kelompok Positif</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
P1	: <i>Perlakuan 1</i>
P2	: <i>Perlakuan 2</i>
P3	: <i>Perlakuan 3</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PGA	: <i>Pulvis Gummi Arabicum</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>
MN	: <i>Mononuklear</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidasae</i>
TGF- α	: <i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factors Alpha</i>
TNF- β	: <i>Tumor Necrosis Factor Beta</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
$^{\circ}\text{C}$: <i>Derajat Celsius</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka merupakan gangguan medis yang ditandai dengan adanya kerusakan fisik pada bagian tubuh, disebabkan oleh mikroba, trauma mekanik, kimia atau suhu yang mengenai jaringan dan mengganggu keseimbangan fungsi dan anatomi kulit normal (Rupina dkk., 2016). Bagian tubuh yang rusak bisa berupa robeknya jaringan ikat, jaringan otot serta jaringan epitalia (kulit), kemudian diikuti dengan rusaknya jaringan syaraf dan pembuluh darah di sekitarnya dan berujung dengan adanya pendarahan. Luka yang tidak ditangani menyebabkan gangguan sistem hemostatis tubuh, timbulnya infeksi sekunder, kematian sel dan jaringan yang mampu merusak organ bersangkutan (Abdurrahmat, 2014). Selain dampak secara fisik, luka juga dapat menyebabkan dampak secara psikologis, antara lain rasa tidak nyaman, stres, rasa takut dan depresi (Upton *and* Solowiej, 2010).

Ada berbagai macam luka berdasarkan penyebabnya, salah satunya adalah luka insisi atau *vulnus incivum*. Luka insisi adalah luka iris akibat benda tajam yang mencapai kedalaman tertentu. Kedalaman insisi akan menentukan tingkat keparahan, karena semakin dalam luka insisi maka semakin banyak juga pembuluh darah dan syaraf yang mengalami kerusakan (Pavletic, 2010).

Terapi yang umum diberikan pada luka insisi adalah pemberian obat-obatan antiseptik. Kerusakan kulit sebagai *barrier* pertama tubuh akan menyebabkan bakteri mudah masuk dan mengkontaminasi jaringan yang mengalami luka, sehingga pemberian antiseptik akan mampu mengurangi jumlah mikroba yang

mampu mengkontaminasi luka dan mempercepat proses kesembuhan. Menurut Widiyanto dkk. (2015), tidak semua jenis antiseptik mampu diaplikasikan pada luka. Obat antiseptik tersebut harus aman, tidak toksik dan tidak menunda penyembuhan luka. Salah satu antiseptik yang umum diberikan adalah povidone iodine. Povidone iodine merupakan antiseptik eksternal dengan spektrum mikrobiosidial, memiliki kemampuan oksidasi kuat dari iodine bebas terhadap asam amino, nukleotida dan lemak bebas tidak jenuh. Hal ini yang menyebabkan povidone iodine mampu merusak protein dan DNA mikroba. Namun povidone iodine juga memiliki efek samping, yaitu dapat menyebabkan dermatitis pada kulit dan menyebabkan efek toksikogenik pada fibroblast (Andini, 2012).

Saat ini penelitian mengenai penggunaan obat dari bahan herbal semakin pesat, salah satunya adalah penelitian mengenai jengkol atau *Achidendron pauciflorum* (Fabaceae, sinonim: *Pithecellobium jiringa*, *Archidendron jiringa*). Beberapa bagian dari tumbuhan ini, seperti biji, kulit biji, kulit batang, kulit buah dan daun jengkol mengandung berbagai senyawa kimia yang memiliki banyak manfaat (Madhihah dkk., 2017). Kulit buah jengkol banyak mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, glikosida dan triterpenoid (Patimah dkk., 2015) dan senyawa-senyawa tersebut telah diketahui berperan dalam penyembuhan luka melalui mekanisme antimikroba, peningkatan neovaskularisasi, peningkatan kepadatan kolagen, sebagai astringensia dan antioksidan (Malini dkk., 2017). Berdasarkan uraian tersebut, kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) sangat berpotensi untuk menyembuhkan luka insisi pada tikus, sehingga dilakukan

penelitian untuk menguji potensi ekstrak kulit buah jengkol tersebut untuk menyembuhkan luka insisi.

Saat tubuh mengalami luka, maka terjadi proses peradangan yang merupakan tahap awal dalam perbaikan jaringan yang rusak. Selama proses peradangan diperlukan peran dari sel radang dalam jaringan atau dalam sirkulasi darah, mediator kimiawi yang dihasilkan dari sel radang, endothel atau mediator kimia yang terlarut dalam plasma (contohnya komplemen, faktor pembekuan darah, dsb.) (Arimbi dkk., 2013). Sel radang terdiri dari sel radang mononuklear (monosit dan limfosit) dan sel radang polimorfonuklear (basofil, eosinofil dan neutrofil). Sel ini pada kondisi normal berada pada pembuluh darah, tetapi pada saat terjadi luka sel sel tersebut akan beremigrasi ke dalam jaringan dermis, terutama neutrofil (Wijaya dkk., 2015). *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan salah satu jenis sitokin pro inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag. Sitokin ini memicu munculnya berbagai respon inflamasi, seperti kemotaksis leukosit, merangsang makrofag untuk menghasilkan kemokin serta menginduksi terjadinya respon demam (Irawati, 2014).

Oleh sebab itu, sel radang dan sitokin TNF- α dipilih sebagai parameter inflamasi dalam proses kesembuhan luka insisi dari hewan coba. Pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol yang mengandung bahan aktif flavonoid sebagai antiinflamasi diharapkan mampu menekan jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α , sehingga luka akan segera bergerak menuju tahap proliferasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

- 1) Apakah pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) berpengaruh terhadap jumlah sel radang pada proses kesembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)?
- 2) Apakah pemberian salep kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) berpengaruh terhadap ekspresi TNF- α pada proses kesembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram (Madihah dkk., 2017 dengan modifikasi). Etik penelitian telah diajukan ke KEP (Komisi Etik Penelitian) Universitas Brawijaya
- 2) Pembuatan luka insisi dilakukan pada bagian dorsal tikus putih berjarak 0,5 cm dari kanan os vertebrae sepanjang 3 cm dengan kedalaman insisi yang mencapai lapisan subkutan (Malini dkk., 2017 dengan modifikasi)
- 3) Kulit buah jengkol yang dipakai berasal dari buah jengkol matang dengan ciri-ciri buah yang berbentuk bulat pipih dan kulit yang sudah berwarna hitam kecoklatan (Madihah dkk., 2017 dengan modifikasi). Kulit buah matang

langsung dipisahkan dengan buahnya, berciri-ciri coklat kehitaman, tidak terlalu kering serta tidak membusuk. Kulit buah jengkol tersebut didapat dari perkebunan di Kabupaten Bogor, Jawa Barat

- 4) Pemberian ekstrak kulit buah jengkol pada sediaan salep dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15% diberikan 2 kali sehari selama 10 hari berturut-turut yang merupakan modifikasi dari penelitian Malini, dkk. (2017)
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah sel radang dengan preparat histopatologi pewarnaan HE (Mulyono dkk., 2014) dan ekspresi TNF- α dengan preparat histopatologi pewarnaan IHK (Aruan, 2014)

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka tujuan penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) terhadap jumlah sel radang pada proses kesembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) terhadap ekspresi TNF- α pada proses kesembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan dan membuktikan adanya pengaruh pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) terhadap jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α sehingga bisa digunakan sebagai terapi kesembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

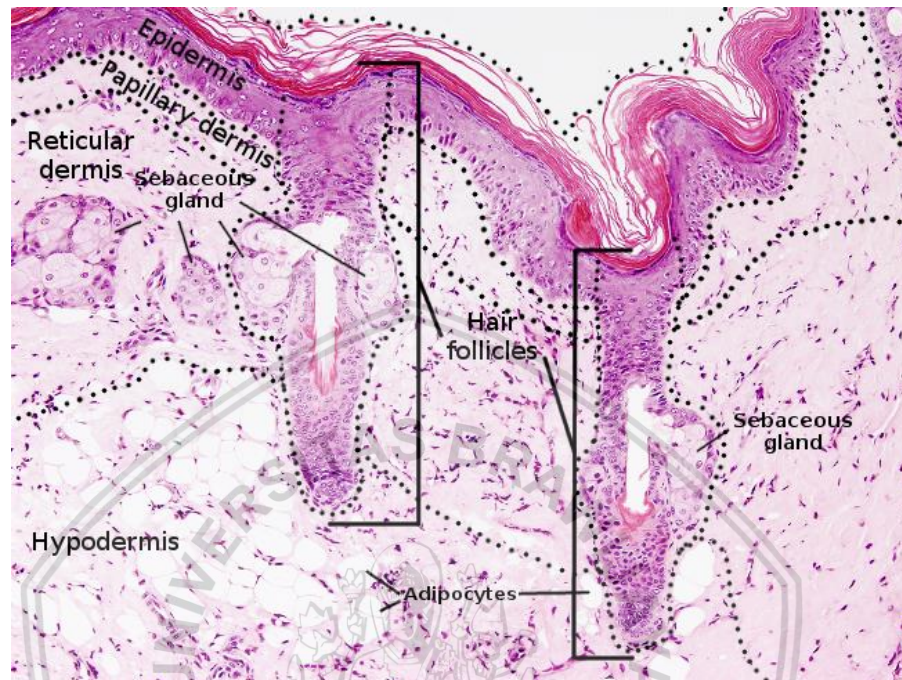
2.1 Luka Insisi

2.1.1 Struktur Kulit

Kulit merupakan organ pelindung yang berperan dalam pencegahan mikroorganisme dan agen perusak lain agar tidak masuk ke jaringan yang lebih dalam. Kulit merupakan pertahanan pertama yang berupa barrier mekanik. Secara biologis, kulit terdiri dari 3 lapisan utama, yaitu epidermis (lapisan luar yang paling tipis), dermis (lapisan tengah) dan subkutan (lapisan paling dalam). Epidermis merupakan lapisan yang tebalnya relatif, terdiri dari stratum korneum dan mengandung desmosom, sel melanosit dan lain-lain. Dermis merupakan jaringan metabolik aktif yang mengandung kolagen, elastin, sel syaraf, pembuluh darah dan jaringan limfatik. Sedangkan subkutan merupakan lapisan yang ada di bawah dermis, terdiri dari jaringan ikat dan lemak (Garna, 2016).

Kulit beserta turunannya meliputi rambut, kuku, kelenjar *sebaceae*, kelenjar keringat, dan kelenjar *mammae* disebut dengan istilah intergumen. Menurut Kalangi (2013), kulit dibagi menjadi 2 lapisan umum, yaitu lapisan epidermis dan dermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, terdiri dari *stratum korneum*, *stratum lusidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* dan *stratum basalis*. Dermis merupakan jaringan ikat yang agak padat, berasal dari mesoderm. Lapisan dermis terdiri dari *stratum*

papilaris dan *stratum retikularis*. Secara histologis, lapisan tersebut digambarkan pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Jaringan kulit tikus *Rattus norvegicus* secara histologis (Pachecho, 2018)

- a. *Stratum korneum* (lapisan tanduk), merupakan lapisan paling atas, memiliki banyak lapisan sel-sel mati, pipih, tidak berinti dan sitoplasma yang telah terganti oleh keratin. Sel-sel yang ada di lapisan ini merupakan sisik zat tanduk yang terdehidrasi dan selalu mengelupas.
- b. *Stratum lusidum* (lapisan bening), merupakan lapisan yang dibentuk oleh 2-3 lapisan epitel skuamus, tembus cahaya dan sedikit eosinofilik. Tidak ada inti maupun organel pada sel-sel di lapisan ini.
- c. *Stratum granulosum* (lapisan berbutir), merupakan lapisan yang terdiri dari 2-4 lapis sel epitel skuamus yang banyak mengandung granula basofilik.

- d. *Stratum spinosum* (lapisan taju), merupakan lapisan yang terdiri dari lapis sel besar besar berbentuk poligonal dengan inti lonjong. Lapisan ini memiliki desmosom yang melekatkan sel-sel satu sama lain. Semakin ke atas, selnya semakin pipih. Terdapat sel melanosit yang berfungsi dalam pemberian warna kulit.
- e. *Stratum basal* (lapisan basal atau benih), merupakan lapisan epidermis yang paling dalam. Terdiri atas satu lapis sel yang tersusun berderet, saling melekat pada lapisan dermis di bawahnya. Lapisan ini memasok sel-sel di atasnya untuk regenerasi.
- f. *Stratum papilaris*, merupakan lapisan yang ditandai dengan adanya papilla dermis, yang semakin ke dalam jumlahnya semakin banyak. Sebagian besar papilla mengandung pembuluh kapiler untuk memberi nutrisi bagi epitel yang ada di atasnya. Di bawah lapisan ini, terdapat serat-serat kolagen yang tersusun rapat.
- g. *Stratum retikularis*, merupakan lapisan yang tebal dan dalam. Memiliki berkas-berkas kolagen kasar dan beberapa serat elastin yang membentuk jaringan padat ireguler. Terdapat jaringan yang lebih terbuka, rongga-rongga jaringan lemak, kelenjar keringat, kelenjar *sebacea*, dan folikel rambut (Kalangi, 2013).

Kulit memiliki banyak fungsi, fungsi utamanya adalah fungsi perlindungan. Fungsi ini terjadi melalui berbagai mekanisme biologis, contohnya adalah pembentukan lapisan tanduk secara terus menerus (keratinisasi dan pelepasan sel-sel mati), respirasi, pengaturan suhu tubuh,

produksi sebum, produksi keringat, pembentukan pigmen melanin untuk melindungi kulit dari bahaya sinar UV, sebagai peraba dan perasa, serta pertahanan terhadap tekanan dan infeksi dari luar (Tranggono dan Latifah, 2007).

2.1.2 Pengertian Luka

Secara umum, luka diartikan sebagai suatu keadaan yang ditandai adanya kerusakan jaringan tubuh, meliputi jaringan ikat, otot atau epitel yang diikuti dengan rusaknya jaringan syaraf dan pecahnya pembuluh darah (Abdurrahmat, 2014). Ada 2 jenis luka berdasarkan keutuhan kulit, yaitu luka terbuka dan luka tertutup (Encyclopaedia Britannica, 2014). Saat terjadi luka terbuka, cedera kulit menyebabkan jaringan di bawah kulit mengalami paparan dengan agen penyakit sehingga dapat menyebabkan infeksi.

Salah satu jenis luka terbuka adalah luka insisi. Menurut Pavletic (2010), luka insisi merupakan salah satu jenis luka yang terjadi akibat mekanisme *shearing*, yaitu dihasilkan akibat goresan benda-benda tajam seperti pisau, kaca, silet dan lain-lain. Energi dari benda-benda tersebut didispersi sepanjang area yang terkena luka sehingga menyebabkan kerusakan jaringan. Luka insisi umumnya dilakukan pada prosedur yang steril dalam proses pembedahan menggunakan bantuan *blade* (Memon *et al.*, 2016). Sehingga hasil dari luka insisi akan terlihat rapi dan dapat ditentukan panjang serta kedalamannya.

Berdasarkan derajat kontaminasinya, Taylor (1997) membagi luka menjadi beberapa tingkat seperti berikut:

- a. Luka bersih, adalah luka yang muncul akibat insisi pembedahan yang steril, sehingga tidak ada infeksi pada sistem pernafasan, pencernaan, genital dan urinasi.
- b. Luka bersih terkontaminasi, adalah luka yang muncul akibat insisi pembedahan pada bagian saluran respirasi, pencernaan, genital dan urinasi dalam kondisi terkontrol.
- c. Luka terkontaminasi, adalah luka terbuka yang segar seperti pada kasus kecelakaan, insisi akut, inflamasi *non purulent* atau operasi dengan kerusakan besar dan kontaminasi pada saluran pencernaan, genital atau urinaria.
- d. Luka kotor, adalah luka yang mendapat infeksi oleh mikroorganisme. Didapat dari kecelakaan di tempat yang tidak aseptis sehingga memperburuk keadaan luka.

Sedangkan menurut waktu penyembuhan, Semer (2013) membagi luka menjadi 2 jenis, yaitu:

- a. Luka akut, pada saat luka terjadi kurang dari beberapa hari.
- b. Luka kronis, pada saat luka terjadi selama beberapa minggu, bulan ataupun tahun.

2.1.3 Mekanisme Kesembuhan Luka

Proses kesembuhan luka melibatkan proses biokimiawi yang kompleks karena merupakan penggabungan antara pengangkatan dari jaringan nekrotik (pembongkaran) dan penggantian jaringan. Kesembuhan luka diawali dengan

proses: radang akut, regenerasi sel parenkim, migrasi dan proliferasi sel parenkim/ jaringan ikat, deposisi matriks ekstraseluler (ECM), *remodeling* jaringan untuk mengembalikan fungsi jaringan, diikuti fibroplasia untuk mengembalikan kekuatan luka (pembentukan jaringan parut). Saat awal terjadi luka, platelet sebagai komponen hemostatis akan mengeluarkan beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan esensial yang menginisiasi kesembuhan luka. Makrofag juga memegang peran penting pada kesembuhan luka bersama komponen lain seperti sel endotel dan fibroblast. Tujuan dari serangkaian proses ini adalah untuk mengembalikan struktur dan fungsi jaringan yang rusak pada saat terjadi luka (Arimbi dkk., 2013).

Berdasarkan proses yang terjadi, kesembuhan luka dibagi menjadi 3 fase umum. Fase-fase tersebut adalah fase hemostatis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase *remodeling* (Morison, 2004).

2.1.3.1 Fase Hemostatis

Kerusakan pembuluh darah menyebabkan proses hemostatis yang akan membutuhkan peranan dari platelet dan fibrin. Pembuluh darah yang normal memiliki produk endotel seperti prostacyclin untuk menghambat pembekuan darah. Proses pembekuan dimulai dari rangsangan kolagen terhadap platelet, sehingga platelet akan menempel dengan platelet lainnya menyebabkan penutupan kapiler untuk menghentikan pendarahan (Lawrence, 2002). Fase hemostatis diawali dengan vasokonstriksi lokal pada arteri dan kapiler yang dimediasi oleh ephinephrin, norepinephrine dan prostaglandin

yang dikeluarkan oleh sel yang mengalami cedera. Setelah 10-15 menit, pembuluh darah akan mengalami vasodilatasi yang dimediasi oleh serotonin, histamin, kinin, prostaglandin, leukotriene dan produk endotel. (Eslami *et al.*, 2009).

Fase hemostatis terdiri dari 2 proses utama, yaitu pembentukan *fibrin clot* dan proses koagulasi. Pada saat munculnya platelet, terjadi perubahan thrombin menjadi fibrinogen dan kemudian menjadi fibrin selama agregasi platelet sehingga terbentuk *fibrin clot* untuk menahan pendarahan. Sedangkan pada saat koagulasi, terjadi *coagulation pathways* secara instrinsik dan ekstrinsik. Kerusakan jaringan akan menyebabkan pelepasan lipoprotein yang dikenal sebagai *tissue factor*. Platelet juga akan meningkatkan pembentukan jaringan baru dengan menghasilkan *growth factor* seperti *Transforming Growth Factor Alpha* (TGF- α), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) dan *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) (Li *et al.*, 2007).

Platelet-derived Growth Factor berfungsi menginduksi migrasi dan proliferasi fibroblast, sel otot polos dan monosit, tetapi mempunyai perangkat proinflamasi juga. *Platelet-derived Growth Factor* berikatan dengan 2 jenis reseptor, dengan spesifisitas ligan yang berbeda (α dan β) yang mempunyai aktivitas protein kinase intrinsik. Sedangkan TGF- β mempunyai efek pleiotropik yang bisa menyebabkan efek yang bertentangan. Dalam konsentrasi rendah, TGF- β mampu menginduksi sintesis dan sekresi PDGF sehingga secara langsung bersifat mitogenik. Namun, pada konsentrasi tinggi, TGF- β merupakan inhibitor pertumbuhan karena memblokir reseptor

PDGF. *Transforming Growth Factor Beta* merangsang kemotaksis fibroblast serta memproduksi kolagen dan fibronektin oleh sel (Kumar *et al.*, 2007).

2.1.3.2 Fase Inflamasi

Reaksi inflamasi adalah respon fisiologis normal tubuh dalam mengatasi luka. Reaksi inflamasi yang berlebihan bisa menyebabkan terhambatnya kesembuhan luka. Inflamasi ditandai dengan adanya ciri-ciri khusus seperti *rubor* (kemerahan), *tumor* (pembengkakan), *calor* (hangat/panas), *dolor* (nyeri) dan *functio laesa* (kehilangan fungsi). Tujuan dari reaksi inflamasi adalah membunuh mikroorganisme yang mengkontaminasi luka. (Suryadi dkk., 2007). Respon *rubor* dan *calor* diakibatkan oleh dilatasi pembuluh darah dan hiperemia. Respon *tumor* disebabkan oleh akumulasi transudat, terutama plasma atau fibrin. *Dolor* disebabkan oleh adanya tekanan pada ujung syaraf pada proses pembengkakan, dan biasanya berujung pada respon *functio laesa* (Arimbi dkk., 2013).

Tahap paling awal dari inflamasi adalah vasodilatasi arteriol dan aliran darah yang bertambah, sehingga meningkatkan tekanan hidrostatik intravaskuler dan pergerakan cairan dari kapiler. Selanjutnya terjadi permeabilitas vaskuler yang memungkinkan pergerakan cairan kaya protein. Ketika cairan kaya protein hilang dari ruang perivaskuler, maka akan menyebabkan turunnya tekanan intravaskuler dan meningkatnya tekanan osmotik cairan interstitial (Chandrasoma *and* Taylor, 2004).

Adanya agen kemotaktik seperti produk bakteri, *complement factor*, histamine, PGE2, leukotriene dan PDGF menstimulasi leukosit untuk berpindah dari sel endotel, terutama neutrofil (Sjamsuhidajat, 2005). Menurut Kumar *et al.* (2007), proses ekstravasasi leukosit dari lumen pembuluh darah ke ruang ekstravaskuler dibagi menjadi 3 tahap: marginasi dan *rolling*; adhesi dan transmigrasi; kemotaksis dan aktivasi.

a. Marginasi dan *Rolling*

Leukosit terlempar dari sumbu sentral pembuluh darah dan berinteraksi dengan sel endotel yang melapisinya. Peningkatan permeabilitas vaskular menyebabkan cairan keluar dari pembuluh darah dan aliran darah melambat. Proses akumulasi leukosit inilah yang disebut dengan marginasi. Selanjutnya, leukosit akan berguling-guling pada permukaan endotel untuk melekat sementara. Peristiwa ini disebut *rolling*.

b. Adhesi dan Transmigrasi

Leukosit melekat kuat pada permukaan endotel (adhesi) sebelum merayap di antara sel endotel dan melewati membrane basalis untuk masuk ke ruang ekstravaskuler. Setelah adhesi kuat, leukosit akan bertransmigrasi terutama dengan merembes di antara sel pada *intercellular junction*.

c. Kemotaksis dan Aktivasi

Leukosit akan berjalan menuju tempat jejas mengikuti gradien kimiawi pada suatu proses yang disebut dengan kemotaksis. Agen yang menyebabkan kemotaksis leukosit antara lain adalah bakteri, komponen C5a, produk metabolisme asam arakhidonat (AA) jalur lipooksigenase, dan sitokin.

Leukosit bergerak dengan cara memperpanjang *pseudopodia* yang berujung pada ECM dan menarik sel ke arah tersebut.

Leukosit terdiri dari berbagai komponen: sel mononuklear (MN) yang terdiri atas monosit dan limfosit, serta sel polimorfonuklear (PMN) yang terdiri atas eosinofil, basofil dan neutrofil (Arimbi dkk., 2013). PMN yang mengalami kontak dengan material asing akan melepaskan enzim lisosom yang mampu menghancurkan material tersebut dan mencerna jaringan yang sudah nekrosis (Peterson, 2003). Leukosit MN juga mampu memproduksi *reactive oxygen species* (ROS) sebagai pertahanan terhadap mikroorganisme dan dibutuhkan dalam fagositosis debris sel (Werner *and* Grose, 2003). Namun, ROS juga berdampak negatif yaitu menghambat migrasi sel dan merusak jaringan (Reddy *et al.*, 2012).

Makrofag adalah monosit yang telah berada pada jaringan. Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan PDGF yang akan menarik fibroblast ke lokasi luka. Makrofag juga bersifat fagositik yang mampu membuang sel tubuh yang tidak berfungsi kembali, seperti PMN, matriks yang rusak, debris asing dan bakteri yang berada di lokasi luka (Diegelmann *and* Evans, 2004). Menurut Kumar *et al.* (2007), pada makrofag yang teraktivasi oleh toksin, cedera fisik dan mediator kimia akan menghasilkan sitokin pro inflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 yang berperan penting pada proses inflamasi luka.

2.1.3.3 Fase Proliferatif

Fase ini diawali dengan proses destruktif, yaitu pembersihan jaringan yang mati dan yang sedang mengalami devitalisasi oleh PMN neutrofil. Kemudian dilanjutkan dengan proses proliferasi, yaitu ketika makrofag, *capillary buds* dan fibroblast bermigrasi pada jaringan yang mengalami kerusakan. Beberapa sitokin yang dihasilkan oleh makrofag akan menstimulasi tahap angiogenesis dan fibroplasia (Arimbi dkk., 2013). Secara umum, fase ini terdiri dari 4 tahap: angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru), fibroplasia (pembentukan matriks ekstraseluler), epitalisasi (pembentukan epitel) dan *wound contraction* (penguatan daerah luka) (Pavletic, 2010).

Angiogenesis distimulasi dan diatur oleh berbagai macam sitokin, terutama TNF- α . TNF- α yang dihasilkan makrofag akan merangsang proses inflamasi dari awal hingga akhir (Suryadi dkk., 2016). Proses angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru dibutuhkan karena jaringan yang luka mengalami tingkat metabolisme yang tinggi, sehingga diperlukan suplai nutrisi dan oksigen yang lebih banyak (Peterson, 2003).

Fibroblast yang bermigrasi di daerah luka akan mengalami proliferasi hingga jumlahnya dominan dibandingkan sel radang (Suryadi dkk., 2016). Ketika melakukan migrasi, fibroblast mengeluarkan *matrix metalloproteinase* (MMP) untuk memecah matriks yang menghalangi migrasi. Fungsi utama dari fibroblast adalah sintesis kolagen sebagai komponen utama ECM. Kolagen tipe III dan fibronectin dihasilkan

fibroblast, kemudian kolagen tipe III akan digantikan dengan kolagen tipe I. Kolagen tersebut akan bertambah banyak dan menggantikan fibrin sebagai penyusun matriks utama luka (Schultz, 2007).

Pada fase ini, terjadi epitelisasi atau pembentukan lapisan yang rusak. Keratinosit yang ada pada tepi luka akan berproliferasi setelah kontak dengan ECM, kemudian bermigrasi dari membran basal ke permukaan. Keratinosit akan menjadi pipih dan panjang, serta membentuk sitoplasma yang panjang. Keratinosit akan berikatan dengan kolagen tipe I dan bermigrasi menggunakan reseptor spesifik integrin. Kolagenase yang dikeluarkan keratinosit akan membantu pergerakan matriks awal, serta mensintesis dan mensekresi MMP ketika bermigrasi (Schultz, 2007).

Menurut Kumar *et al.* (2007), terdapat beberapa faktor pertumbuhan serupa yang mengatur proliferasi fibroblast dan mengatur perangsangan sintesis ECM. Contohnya adalah proses sintesis kolagen yang diinduksi sejumlah molekul, meliputi *growth factor* (PDGF, bFGF dan TGF- β) serta sitokin (interleukin-1 [IL-1] dan *tumor necrosis factor alpha* [TNF- α]) yang disekresikan oleh leukosit dan fibroblast.

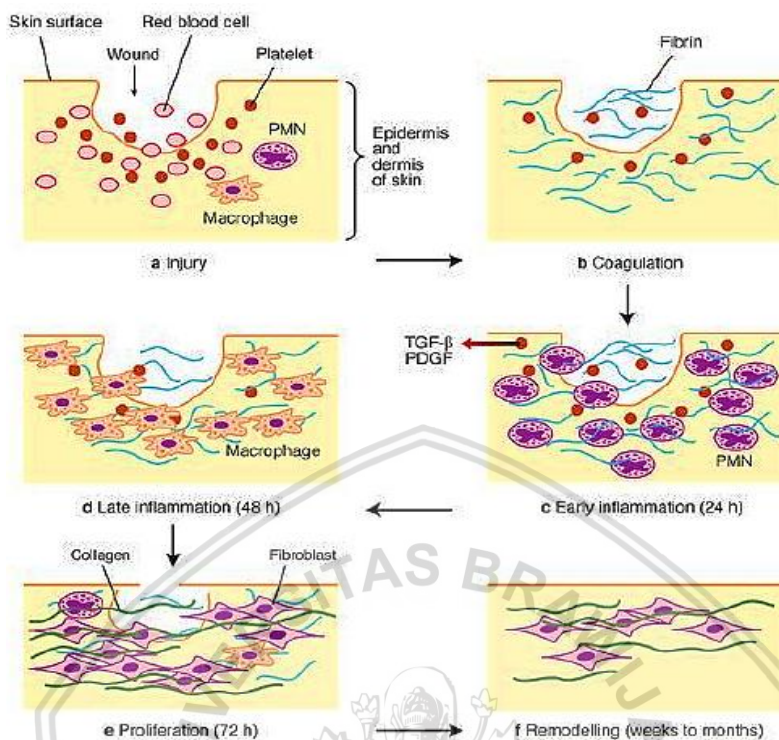
Wound contraction atau kontraksi luka merupakan proses terakhir pada fase proliferasi. Fase ini ditandai dengan penebalan jaringan di bagian luka, dimulai dari tepi luka hingga pusat luka dengan arah sentripedal. Kontraksi luka awalnya terjadi tanpa bantuan myofibroblast, kemudian fibroblast akan berdiferensiasi menjadi myofibroblast dengan bantuan *growth factor*. Myofibroblast mirip dengan sel otot polos, memiliki aktin dan mampu

berkontraksi. Proses ini menandai dimulainya maturasi atau *remodeling* (Pavletic, 2010).

2.1.3.4 Fase *Remodelling*

Merupakan fase terakhir dan memiliki durasi yang paling panjang pada proses kesembuhan luka (Abdurrahmat, 2014). Fase ini menyebabkan perubahan dalam komposisi ECM. Meskipun telah dilakukan sintesis dan deposisi ECM, ECM jaringan ini akan terus diubah dan dilakukan *remodeling*. Hasil akhir dari proses ini adalah keseimbangan antara sintesis dan degradasi ECM. Degradasi ECM dilakukan oleh kelompok MMP, yang meliputi MMP-1 (*interstitial collagenase*), MMP-2 (*gelatinase*) dan MMP-3 (*stomelysin*). MMP-1 berfungsi untuk memecah fibril tipe I, II dan III. MMP-2 berfungsi untuk memecah kolagen amorf dan fibronektin. MMP-3 berfungsi untuk mengatabolisasi berbagai unsur pokok ECM, termasuk proteoglikan laminin, fibronektin dan kolagen amorf. MMP dikeluarkan oleh berbagai macam sel seperti fibroblast, makrofag, neutrofil, sel sinovial dan beberapa sel epitel (Kumar *et al.*, 2007).

Ketika fase ini, metabolisme luka telah mengalami penurunan, maka vaskularisasi akan menurun dan bekas kemerahan pada luka akan menghilang dengan sendirinya (Peterson, 2003). Ilustrasi tahapan-tahapan kesembuhan luka beserta komponen yang terlibat terlampir pada **Gambar 2.2** di bawah ini.



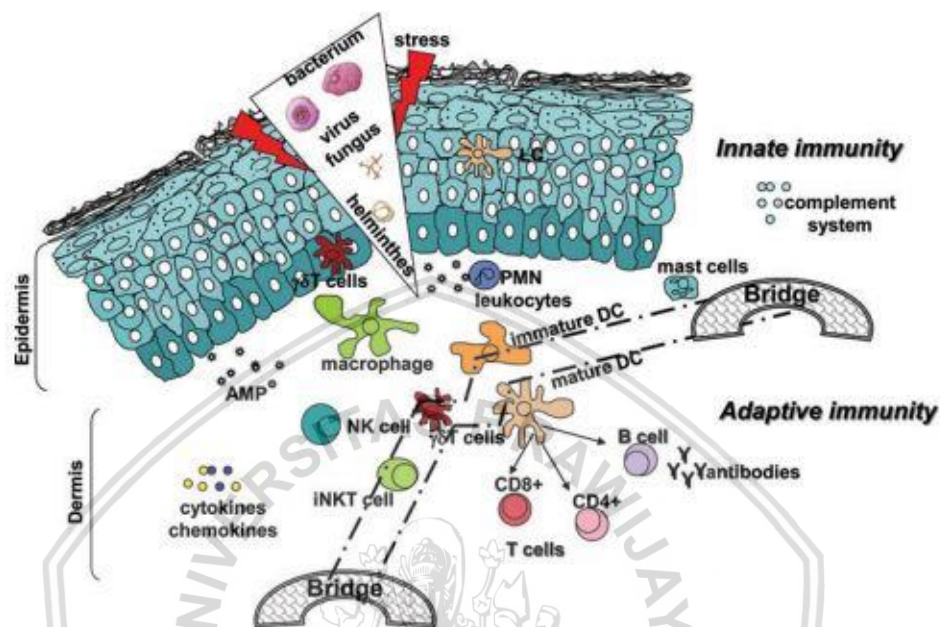
Gambar 2.2 Fase kesembuhan luka (Beanes *and* Cockbill, 2003)

2.1.4 Respon Imunitas pada Luka

Imunitas merupakan serangkaian pertahanan awal tubuh dari infeksi. Saat terjadi luka insisi, kulit yang berfungsi sebagai barrier pertama tubuh dengan lingkungan luar mengalami kerusakan sehingga menyebabkan tubuh rentan mengalami infeksi. Hal ini menyebabkan tubuh akan segera mengeluarkan respon imunitas setelah mengalami luka. Sel-sel utama yang berperan pada respon imun luka adalah makrofag, sel T, sel B dan sel NK (*natural killer*)

. Sel tersebut bisa berinteraksi langsung atau melalui interleukin (IL). Selain itu bisa juga diikutsertakan dengan komponen humoral seperti komplemen (C), C Reaktif Protein (CRP) dan interferon (IFN) (Winaktu,

2011). Skema terjadinya respon imun pada epidermis dan dermis saat terjadinya luka ditunjukkan pada **Gambar 2.3** di bawah ini.



Gambar 2.3 Skema representasi respon imun pada luka (Strbo *et al.*, 2013)

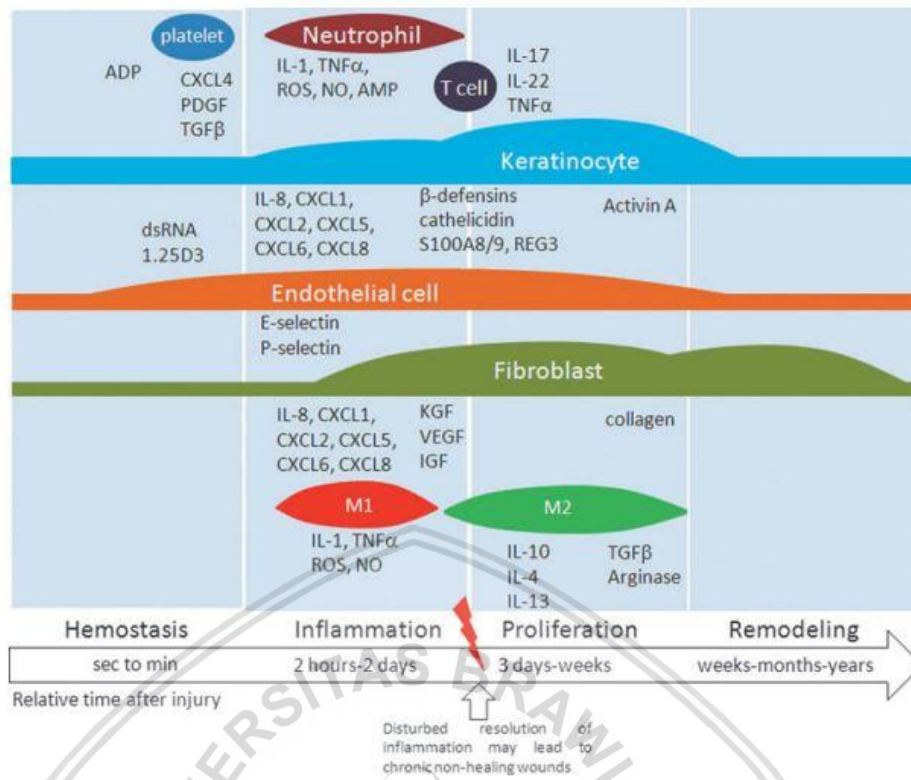
Ada 2 sistem imunitas yang bekerja, yaitu sistem imun non spesifik (*innate immunity*) dan sistem imun spesifik (*adaptive immunity*). Sistem imun non spesifik merupakan kekebalan bawaan yang menjadi pertahanan pertama dalam setiap infeksi. Reaksi ini meliputi pengenalan serta fagositosis mikroorganisme oleh sel imun seperti makrofag, neutrofil, IFN, IL, AMP, sel mast, eosinofil yang merupakan barrier fisik yang ada di lapisan epidermis (MacLeod and Mansbridge, 2014) . Sistem imun spesifik meliputi sistem humoral oleh sel limfosit B dan sistem seluler oleh sel limfosit T. Sistem imun spesifik bekerja jika sistem imun non spesifik tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Sel limfosit B yang teraktivasi akan memproduksi antibodi yang menyerang toksin, bakteri opsonin dan agen patogen. Sedangkan sel limfosit T

akan memproduksi sitokin yang mendukung sel B serta mendiferensiasi sel tersebut menjadi sel plasma untuk memproduksi antibodi (Strbo *et al.*, 2013)

Menurut Robbins *et al.* (2010), penyembuhan luka insisi meliputi:

- a. 0 jam → Luka terisi bekuan darah
- b. 3-24 jam → Neutrofil dari tepian luka akan menginfiltrasi bekuan darah
- c. Hari ke-3 → Neutrofil mulai digantikan dengan makrofag. Sudah ada jaringan granulasi
- d. Hari ke-5 → Ruang luka terisi oleh jaringan granulasi, neovaskularisasi pada tingkat maksimal, terdapat sel kolagen dan proliferasi epitel pada tingkat maksimal
- e. Minggu ke-2 → Terdapat proliferasi fibroblast dan akumulasi kolagen. Inflamasi sebagian besar sudah menghilang.
- f. Bulan ke-2 → Parut didominasi dengan jaringan ikat, peradangan hilang total, ditutup oleh epitel utuh

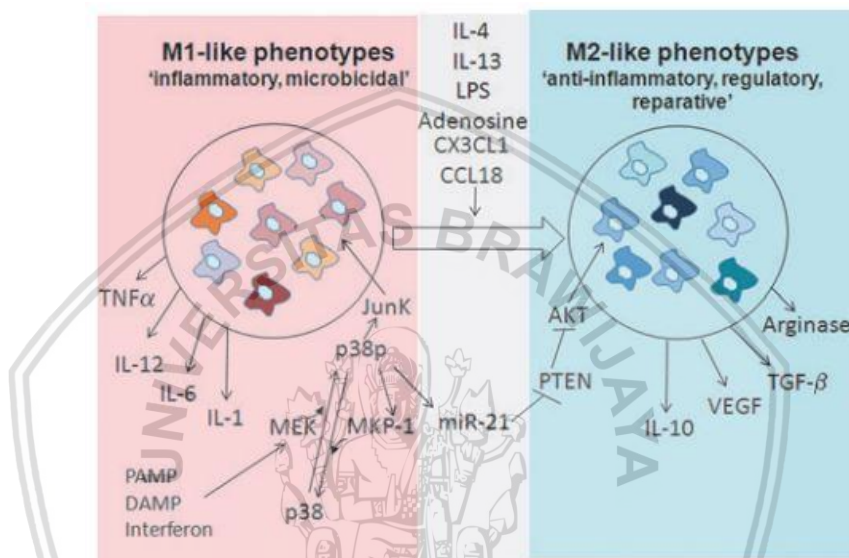
Berdasarkan uraian di atas, keberadaan sel-sel imun akan muncul dominan sesaat setelah terjadinya luka (proses inflamasi) dan mulai menurun pada hari ke-5, bersamaan dengan terjadinya proliferasi oleh sel fibroblast dan kolagen. Reaksi imunitas pada luka juga dijelaskan pada **Gambar 2.4** di bawah ini.



Gambar 2.4 Reaksi imunitas pada proses kesembuhan luka (MacLeod and Mansbridge, 2014)

Pada mulanya, agregasi platelet akan menyebabkan lepasnya ADP, PDGF, TGF-β yang akan mengaktifkan fibroblast, keratinosit dan agen imunitas untuk memicu inflamasi. Keratinosit akan mengeluarkan sitokin proinflamasi dan AMP. Respon imun tersebut bertujuan untuk dekontaminasi luka yang dengan cara merangsang neutrofil dan makrofag pada daerah luka. Neutrofil dan makrofag berfungsi sebagai *microbe killing-cell* dengan bantuan ROS, NO, dan AMP. Sementara itu di bagian endotel akan mengekspresikan E-selectin dan P-selectin, yang mengatur *rolling* dan ekstravasasi dari leukosit. Sel limfosit T pada fase inflamasi berfungsi untuk memproduksi IL-17, IL-22 da TNF-α. Sel limfosit T yang ada juga memproduksi *growth factor* yang menstimulasi proliferasi keratin. Aktivasi dari makrofag, neutrofil dan keratinosit

berfungsi untuk mensterilkan bagian luka dan mengatur terjadinya proses inflamasi. Proses proliferasi dari keratinosit dan fibroblast akan menstimulasi penutupan luka (MacLeod *and* Mansbridge, 2014). Proses kesembuhan luka juga melibatkan peran makrofag yang mampu mengalami pergeseran fenotip seperti **Gambar 2.5** di bawah ini.



Gambar 2.5 Pergeseran fenotip makrofag pada fase kesembuhan luka (MacLeod *and* Mansbridge, 2014)

Makrofag yang aktif dalam fase inflamasi (disebut M1) akan mengalami pergeseran fenotip menjadi M2 yang bersifat antiinflamasi dan reparatif. Makrofag yang mensekresikan TNF- α , IL-12, IL-6 dan IL-1 pada tipe M1 akan beralih mensekresikan IL-10, VEGF, TGF- β dan arginase pada tipe M2.

2.1.5 Faktor Kesembuhan Luka

Menurut Boyle (2008), kesembuhan luka dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut antara lain adalah status nutrisi, istirahat, stress,

infeksi, kondisi medis dan pengobatan. Faktor yang mempengaruhi proses penyembuhan luka salah satunya status nutrisi, terutama asupan protein, vitamin A dan vitamin C. Protein akan mensuplai asam amino yang dibutuhkan untuk perbaikan jaringan dan degenerasi. Diet yang baik juga mampu mempertahankan ketahanan tubuh terhadap infeksi.

Infeksi yang ada pada luka juga menjadi penghambat utama dalam proses kesembuhan. Pembersihan area luka akan meningkatkan tingkat kesembuhan pasien dan mencegah terjadinya infeksi (Darmawati dan Sastra, 2013).

2.2 Salep

Salep merupakan sediaan yang sering digunakan pada penyakit kulit. Salep merupakan sediaan semisolid yang ditujukan untuk pemakaian topikal pada kulit atau membran mukosa. Salep merupakan sediaan berminyak, basisnya tidak mengandung air sehingga tidak mudah dihilangkan dari kulit (Anggraeni, 2008). Bahan aktif untuk terapi luka yang diberikan pada sediaan salep memiliki kemampuan yang lebih maksimal dibandingkan sediaan lain. Hal itu dikarenakan sediaan salep mampu bertahan lama di atas permukaan kulit dan berpenetrasi secara optimal ke dalam kulit (Yanhendri dan Yenny, 2012).

Menurut Thong *et al.* (2007), absorpsi salep yang dioleskan ke dalam kulit akan melewati berbagai fase, yaitu *lag phase*, *rising phase* dan *falling phase*.

- a. *Lag phase*, merupakan fase disaat salep dioleskan dan belum melewati stratum korneum. Pada fase ini, obat belum masuk ke dalam tubuh sehingga tidak ditemukannya bahan aktif dalam pembuluh darah.

- b. *Rising phase*, merupakan saat sebagian sediaan salep menembus stratum korneum, kapiler dermis dan kemudian memasuki aliran pembuluh darah.
- c. *Falling phase*, merupakan fase pelepasan bahan aktif obat dari permukaan kulit, sehingga mampu dibawa ke kapiler dermis.

Salep terdiri dari bahan obat yang terlarut ataupun terdispersi di dalam basis atau basis salep sebagai pembawa zat aktif. Basis salep yang digunakan dalam sebuah formulasi obat harus bersifat inert, yaitu tidak merusak dan mengurangi efek terapi dari obat yang dikandungnya (Naibaho dkk., 2013). Pada penelitian ini, digunakan basis salep berupa vaselin *album* dan PGA (*Pulvis Gummi Arabicum*). Vaselin *album* merupakan salah satu jenis sediaan hidrokarbon yang didapat dari minyak bumi, memiliki titik cair 10°C - 50°C, dan dapat mengikat sekitar 30% air (Yanhedri dan Yenny, 2012).

2.3 Jengkol (*Archidendron pauciflorum*)

2.3.1 Definisi Jengkol

Tumbuhan jengkol merupakan tumbuhan asli Asia Tenggara, merupakan salah satu tumbuhan yang mudah dikenali karena memiliki aroma yang khas. Buah jengkol di Indonesia dimanfaatkan sebagai salah satu bahan makanan yang memiliki nilai ekonomis, sehingga cukup banyak petani yang memilih untuk membudidayakan jengkol. Jengkol atau dikenal juga dengan sebutan tumbuhan jering, merupakan tumbuhan yang masuk dalam famili Fabaceae (suku biji-bijian). Tumbuhan ini memiliki nama latin *Archidendron pauciflorum*, dengan nama sinonim antara lain *Archidendron jiringa*,

Pithecellobium jiringa, dan *Pithecellobium lobatum*. (Hutauruk, 2010). Jengkol juga memiliki beberapa senyawa seperti tannin, saponin, flavonoid, polifenol dan lain-lain yang dapat menjadi terapi luka melalui mekanisme antimikroba, neovaskularisasi, kepadatan kolagen dan astringensia. (Mukherjee, 2015)

2.3.2 Klasifikasi Jengkol

Menurut Pandey (2003), klasifikasi tumbuhan jengkol atau *Archindendron pauciflorum* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Magnoliophyta
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Subfamili	: Mimosoideae
Genus	: <i>Archindendron</i>
Spesies	: <i>Archindendron pauciflorum</i>

2.3.3 Morfologi Jengkol

Tumbuhan jengkol merupakan tumbuhan berbiji yang berakar tunggang. Ciri-ciri yang nampak dari tumbuhan jengkol adalah buahnya berwarna coklat kotor, batang tegak, bulat, berkayu dan memiliki banyak percabangan. Daun jengkol berbentuk lonjong, panjang berkisar 10-20 cm, lebar berkisar 5-15 cm, tepi rata, ujung runcing, pangkal membulat, pertulangan menyirip, berwarna hijau tua dan anak daun yang berhadapan satu sama lain. Bunga jengkol

merupakan bunga majemuk, berbentuk tandan, berwarna ungu, kelopak berbentuk mangkok, benang sari serta putik berwarna kuning, mahkota berwarna putih kekuningan dan dapat tumbuh di ujung batang ataupun ketiak daun. Buah jengkol berbentuk bulat pipih dan berwarna coklat kehitaman dengan kulit kehitaman yang relatif tebal. Biji jengkol berbentuk bulat pipih, berkeping dua dan berwarna putih kekuningan (Hutapea, 1994). Gambaran buah jengkol (meliputi kulit dan biji jengkol) bisa dilihat pada **Gambar 2.6**.



Gambar 2.6 Jengkol (*Archidendron pauciflorum*). Bagian (a) merupakan kulit jengkol, dan bagian (b) adalah buah jengkol (Elysa, 2011)

2.3.4 Kandungan Kulit Buah Jengkol

Indonesia merupakan daerah tropis yang menyimpan banyak kekayaan hayati, salah satunya adalah tumbuhan. Sebagian besar tumbuhan yang ada dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal, salah satunya adalah tumbuhan jengkol.

Banyak kandungan kimia yang terkandung pada tumbuhan jengkol, terutama pada bagian kulit buahnya. Kulit buah jengkol merupakan limbah pasar yang tidak menghasilkan nilai ekonomis. Padahal menurut Patimah dkk.

(2015), kulit buah jengkol mengandung banyak senyawa aktif antara lain alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, glikosida dan steroid/ terpenoid. Senyawa-senyawa tersebut diketahui dapat berperan baik dalam proses penyembuhan luka, antara lain melalui mekanisme antimikroba, meningkatkan neovaskularisasi, meningkatkan kepadatan kolagen, sebagai astringensia dan antioksidan (Malini dkk., 2017).

Menurut Afiah dan Medawati (2017), kulit buah jengkol memiliki kandungan aktif yang membantu dalam proses kesembuhan luka. Kandungan tersebut antara lain adalah sebagai berikut:

- a. Saponin, merupakan senyawa yang dapat digunakan untuk penyembuhan luka dan menghentikan pendarahan.
- b. Flavonoid, memberikan aktivitas antiinflamasi dalam proses kesembuhan luka.
- c. Tannin, memberikan manfaat sebagai astringen

Kulit buah jengkol juga mampu digunakan sebagai obat luka bakar dan obat antiseptik (Darwin, 2011). Hasil skrining fitokimia dari serbuk simplisia dan ekstrak etanol kulit buah jengkol dapat dilihat pada **Tabel 2.1** di bawah ini.

Tabel 2.1 Hasil skrining fitokimia kulit buah jengkol

Parameter	Hasil	
	Simplisia	Ekstrak
Alkaloida	+	+
Flavonoida	+	+
Tannin	+	+
Saponin	+	+
Glikosida	+	+
Steroid/ Terpenoid	+	+

(Nurussakinah, 2010)

Efek antiinflamasi kulit buah jengkol pada terapi luka berasal dari kandungan senyawa aktif flavonoid. Menurut Nijveltd *et al.* (2001), mekanisme aktivitas antiinflamasi dari senyawa flavonoid dapat melalui beberapa jalur, yaitu dengan penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil dan penghambatan pelepasan histamin. Aktivitas antiinflamasi dari flavonoid dengan penghambatan aktivitas siklooksigenase dan lipooksigenase akan menyebabkan penghambatan sintesis leukotriene dan prostaglandin (Riansyah dkk., 2015). Prostaglandin yang dihambat akan menyebabkan turunnya respon edema, respon nyeri, respon demam dan turunnya interaksi sitokin yang menyebabkan demam, seperti TNF- α . Selain itu, ketika jalur lipooksigenase dihambat, maka yang terjadi adalah penurunan agregasi sel leukosit terutama sel neutrofil dan menurunkan efek inflamasi pada luka (Kumar *et al.*, 2007).

2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang umum digunakan sebagai hewan coba pada berbagai percobaan ilmiah. Tikus putih *Rattus norvegicus* mulai sering digunakan sekitar tahun 1970, bersamaan dengan berkembangnya ilmu biomedis di dunia (Suckow *et al.*, 2006). *Rattus norvegicus* dipilih sebagai hewan coba dikarenakan memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, masa hidupnya yang pendek, tingkat reproduksi yang tinggi, variasi sifat-sifat tinggi dan mudah dalam perawatan dan penanganan (Moriwaki *et al.*, 1994).

Keuntungan lain pada penggunaan tikus putih sebagai hewan coba adalah ukurannya yang lebih besar dibandingkan mencit, sehingga lebih mudah diamati dan ditangani. Ukuran tikus putih lebih kecil dibandingkan dengan tikus liar yang ada di alam bebas. Tikus putih memiliki berat sekitar 35-40 gram, dan ketika dewasa beratnya bisa mencapai 200-250 gram (Kusumawati, 2004). Tikus putih yang digunakan sebagai hewan percobaan pada umumnya adalah yang berjenis kelamin jantan karena memiliki segi hormonal yang lebih stabil dan pemeliharaan yang lebih mudah (Sirois, 2005).

Pada penelitian ini, digunakan tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar. Tikus wistar adalah salah satu jenis tikus paling populer yang digunakan pada penelitian laboratorium. Ciri khas yang dimiliki oleh tikus wistar adalah ukuran kepalanya yang lebar, telinga panjang dan ekor yang lebih pendek dari panjang tubuhnya. Tikus wistar memiliki karakter yang lebih agresif dibandingkan dengan tikus jenis lainnya (Sirois, 2005). Tikus putih galur wistar berbulu putih, warna mata merah dan kecil, moncong tumpul, dan telinga kecil (Krinke, 2000). Gambaran fisik pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bisa dilihat pada **Gambar 2.7** di bawah ini. Sedangkan data biologis tikus putih (*Rattus norvegicus*) bisa dilihat pada **Tabel 2.2**.



Gambar 2.7 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010)

Menurut Adiyati (2011), taksonomi dari tikus putih *Rattus norvegicus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

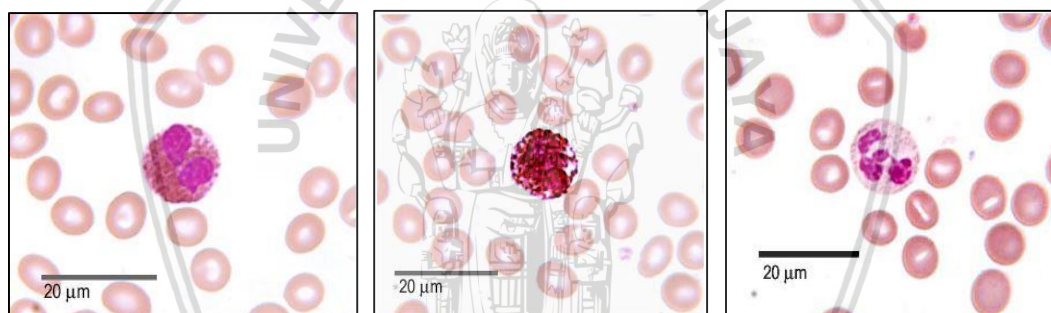
Tabel 2.2 Data biologis tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Siklus Biologis Tikus Putih	Keterangan
Lama Hidup	2-3 tahun sampai dengan 4 tahun
Umur Dewasa	40-60 hari
Umur Kawin	8-10 minggu (jantan dan betina)
Siklus Estrus	4-5 hari
Lama Bunting	20-22 hari
Berat Badan	Jantan : 267-500 g Betina : 225-325 g
Temperatur Tubuh	36-39°C (rata-rata 37,5°C)
Pernapasan	65-115 /menit
Denyut Jantung	250 bit/menit
Tekanan Darah	Sistol : 90-180 Diastol : 60-145
Konsumsi Makan	Dewasa : 15-30 g/hari
Konsumsi Minum	Dewasa : 20-45 ml/hari
Aktivitas	Nokturnal (malam)

(Krinke, 2000)

2.5 Sel Radang

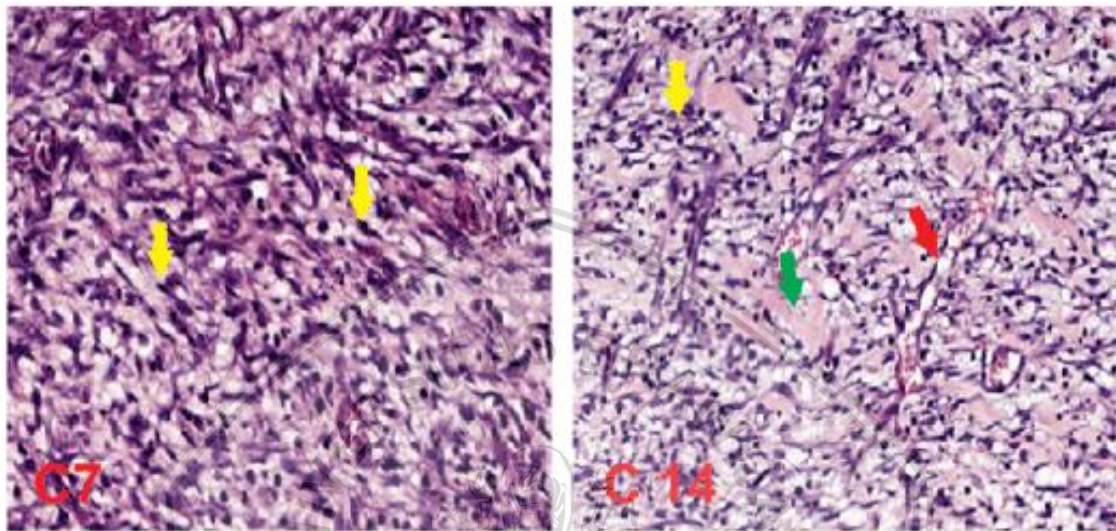
Pada fase inflamasi berperan berbagai komponen inflamasi, terutama adalah sel radang. Sel radang yang terdiri dari berbagai jenis terutama yang berasal dari leukosit. Menurut Junqueira (2005) leukosit dibagi menjadi 2 kelompok utama, yaitu agranulosit (mononuklear/ MN) dan granulosit (polimorfonuklear/ PMN). Pada saat diakumulasikan, leukosit terdiri dari 30% sel MN dan 70% sel PMN. Sel MN terdiri dari 25% sel limfosit dan 5% sel monosit. Sel PMN terdiri dari 68% sel neutrofil, 1% sel eosinofil dan 1% sel basofil. Gambaran jenis-jenis leukosit PMN bisa dilihat pada **Gambar 2.8**.



Gambar 2.8 Gambaran sel PMN. Eosinofil (kiri), basofil (tengah) dan neutrofil yang terdapat pada pembuluh darah (kanan) (The Histology Guide, 2015)

Ketika terjadi peradangan, PMN terutama neutrofil akan menginvasi daerah yang mengalami kerusakan. Neutrofil tersebut akan melaksanakan fungsinya untuk membersihkan jaringan dari agen toksis dan infeksi. Beberapa jam setelah terjadinya radang akut, akan terjadi peningkatan jumlah neutrofil dalam darah hingga mencapai 3-4 kali lipat dari nilai normal. Keadaan neutrofilia ini disebabkan oleh produk peradangan yang masuk aliran darah, kemudian ditransport ke sumsum tulang, bekerja pada kapiler sumsum dan pada neutrofil yang tersimpan untuk menggerakkan neutrofil-neutrofil segera ke dalam sirkulasi darah. Hal ini

menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah neutrofil yang tersedia pada area yang meradang (Guyton *and* Hall, 2007). Gambaran infiltrasi PMN pada proses inflamasi akut dermis tikus bisa dilihat pada **Gambar 2.9**.



Gambar 2.9 Infiltrasi sel radang pada jaringan kulit yang luka pada hari ke-7 (kiri) dan ke-14 (kanan). Panah kuning menunjukkan sel radang, panah merah menunjukkan pembuluh darah dan panah hijau menunjukkan serabut kolagen (Campelo *et al.*, 2018)

Monosit adalah sel radang kronis yang berupa sel radang mononuklear. Sel mononuklear berjumlah sekitar 3-8% dari keseluruhan leukosit. Bentuk inti dapat berbentuk oval, seperti tapal kuda atau seperti terlipat. Sitoplasma monosit tampak berwarna biru keabu-abuan. Ketika berada di jaringan, monosit berubah menjadi makrofag yang diklasifikasikan sebagai sel fagositik (Subowo, 2009). Makrofag juga berperan penting dalam proses proliferasi setelah mengalami proses pergeseran fenotip (MacLeod *and* Mansbridge, 2014). Makrofag mampu merangsang terjadinya angiogenesis, mensekresikan FGF untuk proses fibroplasia dan merangsang fibroblast untuk menghasilkan kolagen dan elastin (Bornado dkk., 2015).

2.6 TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

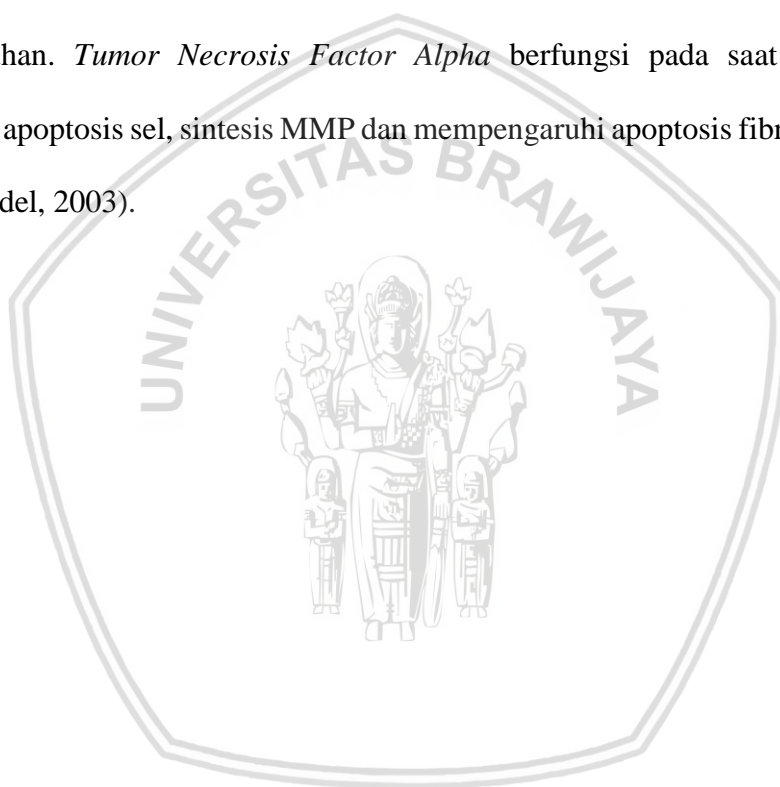
Menurut Kumar *et al* (2007), sitokin adalah produk polipeptida dari banyak jenis sel yang melakukan fungsi sel lainnya. *Tumor Necrosis Factor Alpha* adalah sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. *Tumor Necrosis Factor* (TNF) disebut TNF- α untuk membedakannya dengan TNF- β atau limfotoksin. *Tumor Necrosis Factor Alpha* dapat dihasilkan oleh makrofag, sel T yang diaktifkan oleh antigen, sel NK dan *mast cell*. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresi TNF- α . *Interferon Gamma* (IFN- γ) yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF- α (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Tumor Necrosis Factor Alpha memiliki berbagai fungsi dalam proses inflamasi kesembuhan luka, yaitu meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam pengaturan aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang *growth factor* lain dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dan hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta sel neutrofil dan makrofag (Supit dkk., 2015).

Bersama IL-1, TNF- α menginduksi respon inflamasi akut sistemik, terutama pada kondisi infeksi atau cedera. Respon tersebut antara lain adalah munculnya demam, sintesis hepatic berbagai protein, pembuangan secara metabolik (*kaheksia*), pelepasan neutrofil ke dalam sirkulasi dan pelepasan hormon adenokortikotropik (menginduksi sintesis dan pelepasan kortikosteroid). *Tumor Necrosis Factor Alpha* juga menyebabkan terjadinya efek hipotensif pada syok

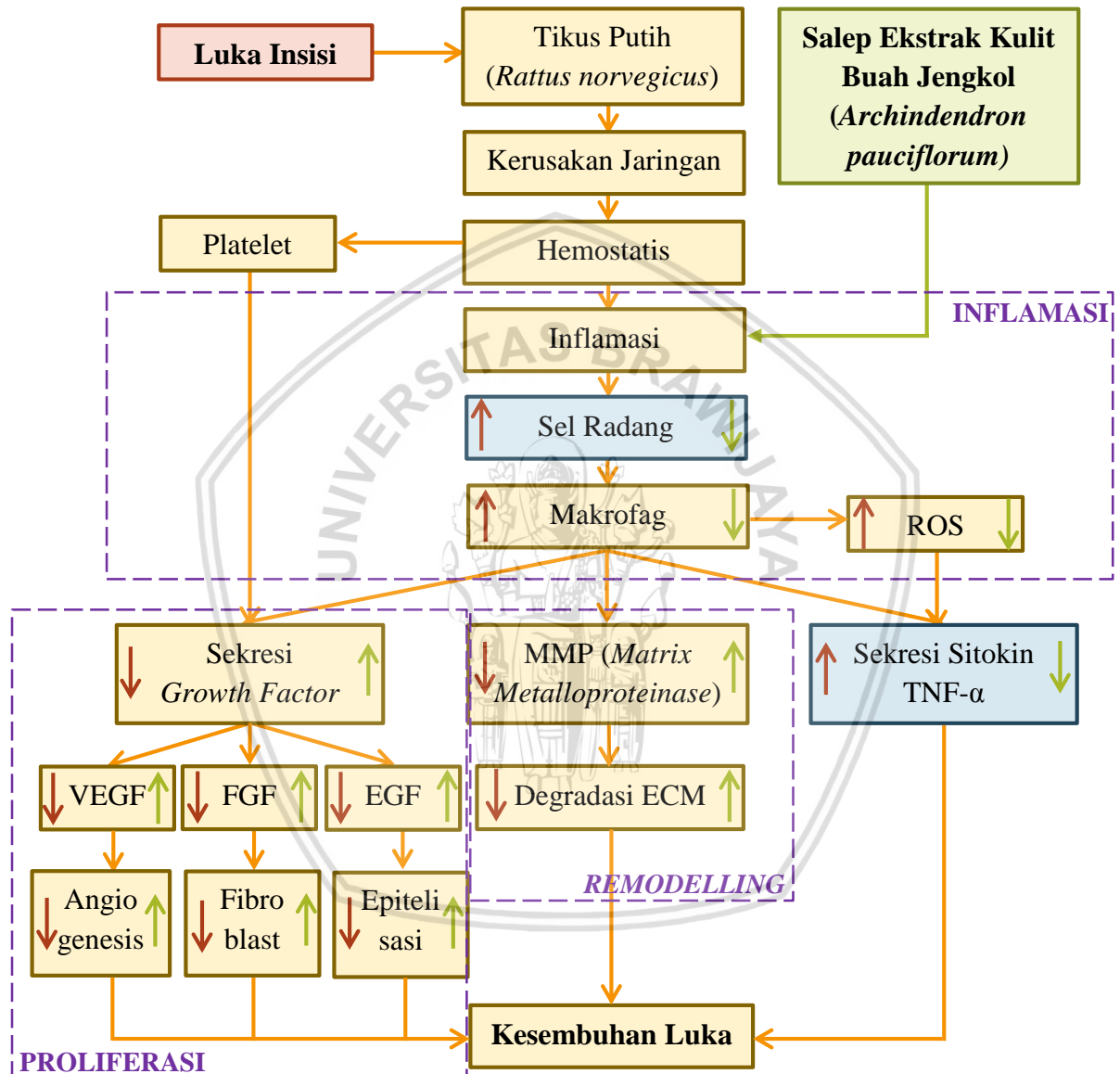
septik, termasuk berkurangnya kontraktilitas miokard dan relaksasi otot polos pembuluh darah (Kumar *et al.*, 2007).

Tumor Necrosis Factor Alpha dibutuhkan pada proses kesembuhan luka karena berperan penting sebagai mediator pro-inflamasi. Semakin tinggi kadar TNF- α pada luka, menandakan proses inflamasi yang sedang berlangsung. Semakin rendah kadar TNF- α pada luka, menandakan keadaan luka yang mulai mencapai kesembuhan. *Tumor Necrosis Factor Alpha* berfungsi pada saat migrasi sel leukosit, apoptosis sel, sintesis MMP dan mempengaruhi apoptosis fibroblast (Chen and Goddel, 2003).



BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- ↕ : efek luka insisi
- ↕ : efek terapi salep kulit jengkol
- : stimulasi
- : efek penghambat
- : variabel terikat
- : tahapan-tahapan
- : pemberian luka
- : pemberian terapi

Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan diberi insisi di bagian punggung kanan sepanjang 3 cm dengan *blade*. Luka tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan baik jaringan kulit hingga jaringan vaskular. Ketika jaringan vaskular mengalami kerusakan, platelet akan teragegrasi dan menyebabkan terjadinya proses hemostatis. Platelet tersebut akan mengeluarkan substansi vasokonstriksi, sehingga terjadi vasokonstriksi sesaat disusul dengan vasodilatasi yang menyebabkan aliran darah semakin cepat, daerah luka berwarna kemerahan dan terasa panas. Vasodilatasi dan permeabilitas mikrovaskular akan menyebabkan peningkatan tekanan hidrostatis, dan memudahkan leukosit terlempar ke tepi dan menempel pada endotelial dan bersiap untuk migrasi pada lokasi luka. Vaskular yang mengalami kerusakan tersebut akan segera ditutup oleh endotel sebagai respon hemostatis, yang komponennya juga akan menyebabkan pelepasan dan pengaktifan sitokin PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) dan TGF- β (*Transformed Growth Factor Beta*). Sitokin-sitokin tersebut berfungsi dalam kemotaksis neutrofil, makrofag, sel mast, sel endotel dan fibroblast. Tahap inilah yang disebut dengan tahap inflamasi.

Dua sel yang paling aktif pada saat inflamasi adalah neutrofil dan makrofag. Makrofag adalah monosit yang sudah ada pada jaringan, berfungsi sebagai pembunuh patogen, memperbaiki jaringan yang rusak serta turut memproduksi TGF- β . Makrofag juga memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang menunjang proses perlawanan tubuh terhadap bakteri, memacu pengeluaran COX-2 dan memacu sintesis sitokin inflamasi seperti TNF- α dan IL-1.

Makrofag juga mampu memproduksi TNF- α tanpa harus memproduksi ROS terlebih dahulu. Bersama IL-1, TNF- α merupakan sitokin utama yang memediasi proses inflamasi. Kerja yang TNF- α adalah sitokin pro inflamasi yang berfungsi dalam pengerahan dan pengaktifan neutrofil dan monosit ke tempat yang mengalami kerusakan, merangsang makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis, menginduksi respon fase akut sistemik yang menyertai infeksi pada luka seperti demam, anoreksia, letargi dan neutrofilia. Adapun fungsi lain dari TNF- α adalah membantu migrasi sel PMN, apoptosis sel, sintesa MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dan apoptosis fibroblast.

Ketika terjadi cedera sel, terjadi pembentukan metabolit asam arakhidonat (AA). Asam arakhidonat dilepaskan oleh fosfolipid sel melalui fosfolipase sel yang telah diaktifkan oleh rangsang mekanik, kimiawi, fisik, atau melalui mediator peradangan seperti C5a. Asam arakhidonat memiliki 2 jalur, yaitu jalur siklooksigenase dan jalur lipooksigenase, yang mengakibatkan banyak mediator kimia dilepaskan secara lokal, seperti histamin, 5 hidroksitriptin (5HT), faktor kemotaktin bradikinin, prostaglandin dan leukotrien. Lipooksigenase adalah enzim utama pada neutrofil yang akan menghasilkan suatu senyawa, yaitu leukotrien yang memiliki kemotaktik kuat atas eosinofil dan neutrofil yang kemudian akan berinteraksi dengan asam arakhidonat menghasilkan suatu senyawa kemotaktik yang dapat merangsang migrasi leukosit termasuk sel-sel PMN ke area radang. Sedangkan pada jalur siklooksigenase (COX) akan menghasilkan produk-produk yang mencakup prostaglandin, yang menyebabkan vasodilatasi, pembentukan edema, patogenesis nyeri dan respon demam pada proses inflamasi.

Selain berperan pada proses inflamasi, makrofag juga masih tetap bekerja pada proses proliferasi. Makrofag mampu mensekresikan *growth factor* yang merangsang proliferasi fibroblast untuk membentuk matriks ekstraseluler, serta memproduksi *angiogenic factors* untuk mendukung proses terbentuknya pembuluh darah baru dalam proses proliferasi. Contoh *growth factor* tersebut adalah VEGF yang menstimulasi proses angiogenesis, FGF yang menstimulasi fibroblast dan EGF yang menstimulasi epitelisasi. TNF- α yang ada, akan menstimulasi sintesis kolagen serta aktivasi MMP untuk mendegradasi matriks ekstraseluler. Matriks ekstraseluler tersebut kemudian akan diganti dengan kolagen tipe III, dan selanjutnya akan menjadi kolagen tipe I pada fase maturasi, yang merupakan fase terakhir dari proses kesembuhan luka.

Salep kulit jengkol diberikan sebagai terapi pada luka insisi hewan coba. Kandungan yang ada pada kulit buah jengkol antara lain adalah flavonoid sebagai antiinflamasi, saponin untuk menghentikan pendarahan, tanin sebagai astringen dan memiliki kandungan antiseptik yang baik untuk luka. Kandungan flavonoid yang bersifat antiinflamasi mampu mengurangi rasa sakit apabila terjadi pendarahan atau pembengkakan pada luka. Selain antiinflamasi, flavonoid juga mampu merangsang pertumbuhan sel baru dengan meningkatkan ekspresi *Insulin Like Growth Factor I* (IGF-I) yang menjadi mediator proliferasi fibroblast dan sintesis kolagen.

Flavonoid yang terkandung pada salep kulit jengkol juga dapat menghambat reaksi metabolisme AA sehingga menghambat 2 enzim sekaligus, yaitu enzim lipooksigenase dan enzim siklooksigenase. Hal ini menyebabkan terhambatnya mediator inflamasi, salah satunya TNF- α sebagai sitokin pro inflamasi serta

berkurangnya agregasi sel radang di daerah luka. Terhambatnya kedua enzim tersebut diharapkan menurunkan reaksi inflamasi dan fase penyembuhan luka akan bergerak menuju tahap proliferasi

3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rangkaian konseptual penelitian yang tercantum maka hipotesis penelitian adalah sebagai berikut :

1. Pemberian terapi salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) dapat memberikan efek terapi terhadap penurunan jumlah sel radang pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi insisi pada daerah dorsolateral
2. Pemberian terapi salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) dapat memberikan efek terapi terhadap penurunan ekspresi TNF- α pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi insisi pada daerah dorsolateral

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, terhitung dari Februari 2018 hingga April 2018. Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu:

- a) Pembuatan ekstrak kulit buah jengkol dilakukan di Laboratorium Fitokimia, UPT Materia Medica Batu
- b) Pembuatan salep ekstrak kulit jengkol dilakukan di Laboratorium Farmakologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
- c) Pemeliharaan hewan coba beserta pemberian perlakuan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- d) Pembuatan preparat histopatologi kulit dan pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Malang
- e) Pewarnan IHK, pengamatan sel PMN dan pengamatan ekspresi TNF- α dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain kandang tikus hewan coba, seperangkat *dissecting set*, oven, gelas ukur, blender, mikroskop Olympus[®] BX51, pot organ, kasa steril, plester, *software* Optilab[®] viewer, *software* Image Raster[®], *software* Immunoratio[®], wadah kaca tertutup dan toples.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan BB 150 – 250 gr yang berusia 8-12 minggu, pakan tikus, air minum tikus, kulit jengkol, formula pembuatan salep, NaCl fisiologis dengan konsentrasi 0,9%, ketamin, xylazine, alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%), minyak emersi, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), formalin dengan konsentrasi 10%, aquades, larutan PBS pH 7,4, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino Benzidine* (DAB), paraffin, eter dengan konsentrasi 70%, dan larutan xylol.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang memiliki BB berkisar 150 – 250 gr dengan usia 8 – 12 minggu. Sebelum dilakukan percobaan, menurut Lamanepa (2005) tikus harus diadaptasi selama 7 hari untuk menyesuaikan keadaan tubuh tikus dengan kondisi di sekitar. Jumlah hewan coba yang digunakan sebagai sampel dihitung dengan rumus berikut:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

(Kusriningrum, 2008)

Berdasarkan rumus di atas, maka dalam pelaksanaan penelitian ini dibutuhkan hewan coba sejumlah 20 ekor yang dibagi dalam 5 perlakuan berbeda. Masing-

masing perlakuan membutuhkan 4 kali ulangan, sehingga setiap perlakuan membutuhkan 4 ekor hewan coba.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental, post test control only design* dengan menggunakan metode statistika Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel hewan coba yang berjumlah 20 ekor, dibagi dalam 5 perlakuan yang berbeda dan masing-masing menggunakan pengulangan sebanyak 4 kali.

Kelompok hewan coba pada penelitian ini adalah:

1. Kelompok KP (Kontrol Positif) adalah kelompok tikus diinsisi dan tanpa terapi
2. Kelompok KN (Kontrol Negatif) adalah kelompok tikus tidak diinsisi dan tanpa terapi
3. Kelompok P1 (Perlakuan 1) adalah kelompok tikus diinsisi dan diberi terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 5%
4. Kelompok P2 (Perlakuan 2) adalah kelompok tikus diinsisi dan diberi terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 10%
5. Kelompok P3 (Perlakuan 3) adalah kelompok tikus diinsisi dan diberi terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 15%

(Malini dkk., 2017 dengan modifikasi)

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas :
 - 1) Terapi salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*)
 - 2) Luka insisi
- b. Variabel terikat :
 - 1) Jumlah sel radang
 - 2) Ekspresi TNF- α
- c. Variabel kontrol :
 - 1) Homogenitas tikus (meliputi galur, jenis kelamin, BB, usia, suhu pemeliharaan, jenis pakan dan kandang)
 - 2) Penggantian kasa steril pada lokasi luka
 - 3) Intesitas pemberian terapi

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian pada penelitian ini antara lain adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan hewan coba
- b. Persiapan dan pengambilan kulit buah jengkol
- c. Pembuatan ekstraksi kulit buah jengkol
- d. Pembuatan salep ekstrak kulit buah jengkol
- e. Pemberian luka insisi pada hewan coba
- f. Terapi salep ekstrak kulit buah jengkol
- g. Pengambilan dan pembuatan preparat kulit

- h. Perhitungan jumlah sel radang
- i. Pengamatan ekspresi TNF- α

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* dengan BB berkisar 150 – 200 g dan usia 8 – 12 minggu. Tikus tersebut dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok berisi 4 ekor tikus. Hewan coba dirawat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Hewan coba tersebut dipelihara dalam kandang balok plastik yang disekat dengan kawat. Kandang tikus ditempatkan pada tempat yang bebas dari polutan dan suara ribut (Tahani, 2013).

4.7.2 Pembuatan Ekstraksi Kulit Buah Jengkol

Pembuatan ekstraksi dilakukan di laboratorium Materia Medica, Batu. Kulit jengkol tersebut langsung dipisahkan dari dagingnya dan dikeringkan pada suhu 40 °C selama 48 jam agar tidak merusak flavonoid (Hernani, 2009). Setelah kulit jengkol mengering, maka selanjutnya dilakukan penggilingan agar butirannya menjadi lebih halus. Ekstraksi kulit buah jengkol dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Perbandingan etanol dan serbuk jengkol tersebut adalah 2:1. Maserat yang dihasilkan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 – 50 °C sampai diperoleh

ekstrak etanol dalam bentuk pasta (Syafnir dkk., 2014). Pada penelitian ini didapatkan sediaan ekstrak etanol dalam bentuk cair.

4.7.3 Pembuatan Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol

Pembuatan salep ekstrak kulit jengkol dilakukan di Laboratorium Farmakologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. Ekstrak kulit jengkol diproses dalam bentuk sediaan salep agar bahan aktif pada ekstrak bertahan lama di atas permukaan kulit dan berpenetrasi secara optimal ke dalam kulit (Yanhendri dan Yenny, 2012). Ekstrak kulit buah jengkol yang telah didapat sebelumnya dihomogenisasi menggunakan mortar dengan basis salep vaselin album (Malini dkk., 2017). Vaselin album dipilih karena memiliki dasar hidrokarbon yang mempunyai waktu kontak dan absorpsi tinggi dibanding basis salep yang lain (Naibaho dkk., 2013). Salep ekstrak kulit jengkol tersebut dibuat pada konsentrasi 5%, 10% dan 15% (Malini dkk., 2014).

Salep ekstrak kulit jengkol dibuat dengan cara menghomogenkan ekstrak kulit buah jengkol dengan basis salep. Basis salep yang digunakan adalah kombinasi antara PGA (*Pulvis Gummi Arabicum*) dan vaselin *album* dengan perbandingan 1:4. Sehingga untuk mendapatkan 3 salep ekstrak kulit jengkol dengan konsentrasi yang berbeda-beda, dibutuhkan komposisi sebagai berikut:

- a. Salep ekstrak kulit jengkol 5% → 1 g ekstrak kulit buah jengkol + 19 g basis salep (3,8 g PGA + 15,2 g vaselin *album*)

- b. Salep ekstrak kulit jengkol 10% → 2g ekstrak kulit buah jengkol + 18 g basis salep (3,6 g PGA + 14,4 g vaselin *album*)
- c. Salep ekstrak kulit jengkol 15% → 15 g ekstrak kulit buah jengkol + 85 g basis salep (3,4 g PGA + 13,6 g vaselin *album*)

Semua bahan meliputi ekstrak kulit jengkol dan basis salep tersebut kemudian diletakkan pada mortar dan dihomogenkan menggunakan alu. Setelah itu, salep diletakkan pada wadah tertutup dan diberi label. Salep tersebut dipergunakan untuk perlakuan kelompok tikus P1, P2 dan P3.

4.7.4 Pembuatan Luka Insisi pada Hewan Coba

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari. Tikus tersebut telah dikelompokkan menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus tersebut dipisahkan dengan sekat kawat dengan tikus yang lain. Lokasi sekitar insisi dibersihkan dari bulu hingga bersih, kemudian dioles dengan kapas alkohol 70% untuk sterilisasi dan dilakukan injeksi anastesi (ketamine dosis 40 mg/kgBB dan xylazine dosis 5 mg/kgBB) secara IM sebelum dilakukan insisi (Danu, 2012). Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah praktikan memberi perlakuan insisi pada hewan coba. Insisi diberikan pada hari ke-1, dibuat sepanjang 3 cm dan kedalaman hingga mencapai subkutan pada daerah dorsal.

Luka tikus diberi terapi rutin setiap harinya sebanyak 2 kali. Pemberian pakan dan air minum dilakukan secara *ad libitum*, dan tikus diusahakan ada posisi yang nyaman serta leluasa untuk bergerak. Kandang juga harus

dibersihkan secara rutin, mendapatkan cahaya, kelembaban, suhu yang cukup dan jauh dari kebisingan.

4.7.5 Pemberian Terapi Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol

Masing-masing hewan coba diberi terapi 2 kali sehari. Salep ekstrak kulit jengkol diberikan secara topikal, yaitu dengan cara mengoleskan tipis pada lokasi luka. Konsentrasi salep yang diberikan adalah salep ekstrak kulit jengkol 5% pada kelompok P1, salep ekstrak kulit jengkol 10% pada kelompok P2 dan salep ekstrak kulit jengkol 15% pada kelompok P3. KN tidak diinsisi dan tidak diterapi. KP tidak diberi terapi apapun. Lama terapi yang diberikan adalah 10 hari, yaitu pada hari ke-1 hingga hari ke-10 (Ramdani dkk, 2014). Langkah ini juga terangkum dalam kerangka operasional pada **Lampiran 1**.

4.7.6 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Euthanasia dan pengambilan jaringan kulit hewan coba dilakukan 10 hari setelah insisi atau hari ke-11, dan merupakan modifikasi dari penelitian Malini dkk. (2017). Euthanasia tikus dilakukan dengan metode *dislokasio os occipital*, karena menurut Suckow *et al.* (2006) American Veterinary Medical Association (AVMA) merekomendasikan metode tersebut pada tikus yang memiliki berat badan ≤ 200 g. Setelah itu dilakukan eksisi pada bagian luka yang paling luar yang melibatkan sedikit jaringan kulit normal, sekitar 0,5 cm dari tepi luka. Menurut Ramdani (2014), eksisi tersebut segera dimasukkan pada larutan formalin 10% sebelum dilakukan pembuatan preparat histologi.

Pembuatan preparat histopatologi kulit diawali dengan fiksasi jaringan, di mana eksisi biopsi kulit direndam pada formalin 10% selama kurang lebih 18-24 jam. Setelah itu, jaringan segera dimasukkan pada akuades selama 1 jam agar bersih dari larutan fiksasi. Tahap selanjutnya adalah tahap dehidrasi, di mana eksisi biopsi dimasukkan pada larutan alkohol bertingkat 70% (30 bagian akuades + 70 alkohol absolut), 80% (20 bagian akuades + 80 alkohol absolut), 90% (10 bagian akuades + 90 alkohol absolut) dan 100%. Tahapan ini berfungsi agar memudahkan paraffin cair masuk dan mengisi ruang yang ada pada sel. Jaringan yang sudah lebih jernih tersebut dimasukkan dalam alkohol-xylol selama 1 jam, dan xylol murni selama 2 x 2 jam. Potongan jaringan tersebut bisa dimasukkan pada paraffin cair selama 2 x 2 jam.

Potongan jaringan yang telah dimasukkan pada paraffin cair ditunggu hingga memadat. Jaringan dalam paraffin tersebut dipotong dengan ketebalan 4 mikron dengan menggunakan mikrotom. Potongan jaringan tersebut bisa diletakkan pada *object glass* yang telah dilapisi *polylysine* sebagai perekat. Jaringan yang telah ada pada *object glass* tersebut dipanaskan pada inkubator bersuhu 56°C – 58 °C agar paraffin di dalamnya dapat mencair kembali.

Menurut Talley *et al.* (2011), potongan sediaan histopatologi tersebut diwarnai dengan pewarna HE (*Hematoxyline Eosin*) agar inti sel bisa nampak berwarna biru (*basofilik*) dan sitoplasma dan jaringan penyambungannya berwarna merah muda (*eosinofilik*). Pewarnaan dilakukan dengan cara deparaffinasi dengan xylol, dilanjutkan rehidrasi dengan alkohol turun bertingkat 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian

jaringan tersebut dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan akuades selama 5 menit. Jaringan kemudian diwarnai dengan pewarna HE selama 10 menit, dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan akuades selama 5 menit. Jaringan yang terwarnai tersebut kemudian diberi perlakuan dehidrasi kembali dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit. Lalu, dilanjutkan dengan tahap *clearing* dengan larutan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Tahap terakhir dari pembuatan preparat histologi adalah dilakukan *mounting* dengan larutan Entelan serta ditutup *coverglass*. Seluruh rangkaian pembuatan preparat histopatologi ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

4.7.7 Perhitungan Jumlah Sel Radang

Perhitungan jumlah sel radang bisa dilakukan pada preparat histopatologi yang dibuat sebelumnya, dengan pengamatan dilakukan pada lapisan dermis di sekitar luka. Preparat kulit diwarnai dengan pewarnaan HE, dan menghitung sel radang yang ada. Sel radang PMN ditandai dengan sel yang terdapat segmen atau lobus inti yang jumlahnya berkisar 2-4 buah. Inti sel PMN akan terisi penuh oleh butir-butir kromatin padat sehingga sangat mengikat zat warna basa menjadi biru atau ungu. Sel radang MN ditandai bentuk inti yang dapat berbentuk oval, seperti tapal kuda atau seperti terlipat. Sitoplasma monosit tampak berwarna biru keabu-abuan. Pengamatan histopatologi dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus® BX51) dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang.

4.7.8 Metode Pewarnaan Imunohistokimia (IHK) dan Pengamatan Ekspresi TNF- α

Metode pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mengamati ekspresi TNF- α pada jaringan histopatologi yang diamati. Ekspresi TNF- α ditandai dengan adanya spot berwarna kecoklatan, yang menandakan adanya interaksi antara TNF- α dengan antibodi yang ditambahkan (antibodi primer anti TNF- α dan *anti rat labeled biotin*). Pemberian antibodi sekunder *rabbit anti rat* yang diikuti SA-HRP (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase*) dan substrat berupa kromagen DAB (*Diaminobenzidine*) akan menghasilkan warna kecoklatan pada jaringan (Duerr, 2006).

Metode pewarnaan dimulai dengan cara merendam *slide* preparat pada xylol I, xylol II dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%). *Slide* ini kemudian dicuci dengan PBS ber-pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan ditetesi H₂O₂ selama 20 menit dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, jaringan bisa dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali kembali, untuk selanjutnya diinkubasi dengan antibody primer. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi primer *anti rat* TNF- α (pengenceran 1:50) selama semalam dengan suhu berkisar 40°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Setelah itu, preparat diinkubasi dengan antibody sekunder berlabel *rabbit anti rat* IgG berlabel biotin selama 1 jam dengan suhu ruang.

Preparat kemudian dicuci lagi dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Preparat yang telah menjalani tahap di atas, kemudian diberi tetesan SA-HRP selama 40 menit, dan dicuci lagi dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya, ditetesi dengan kromagen DAB selama 10 menit, dan diikuti pencucian dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Pewarnaan menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Preparat kemudian dicuci air mengalir dan dibilas akuades, kemudian dikeringkan. Kemudian preparat masuk pada tahap *mounting* menggunakan larutan entellan dan ditutup *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x dengan 5 bidang pandang pengamatan. Ekspresi TNF- α akan nampak warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel (Astanto, 2010).

Pengukuran presentase ekspresi TNF- α dilakukan dengan mengamati 5 bidang pandang (kiri atas, kanan atas, tengah, kiri bawah dan kanan bawah) dan. Perhitungan secara kuantitatif terhadap TNF- α dilakukan dengan bantuan *software Immunoratio*[®] (Sabirosi dkk., 2012).

4.8 Analisa Data

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α . Analisa kedua parameter tersebut dilakukan dengan metode kuantitatif. Data kuantitatif yang didapat dari seluruh perlakuan diolah secara statistik menggunakan aplikasi khusus statistika SPSS for Windows 25[®]. Uji yang digunakan adalah uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$), uji homogenitas

($p > 0,05$) dan uji *One Way* ANOVA. Apabila terdapat perbedaan nyata pada *One Way* ANOVA ($p < 0,05$), uji tersebut dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey/ Beda Nyata Jujur* (BNJ) $\alpha = 0,05$ (Kusriningrum, 2008).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Tikus Pasca Perlakuan

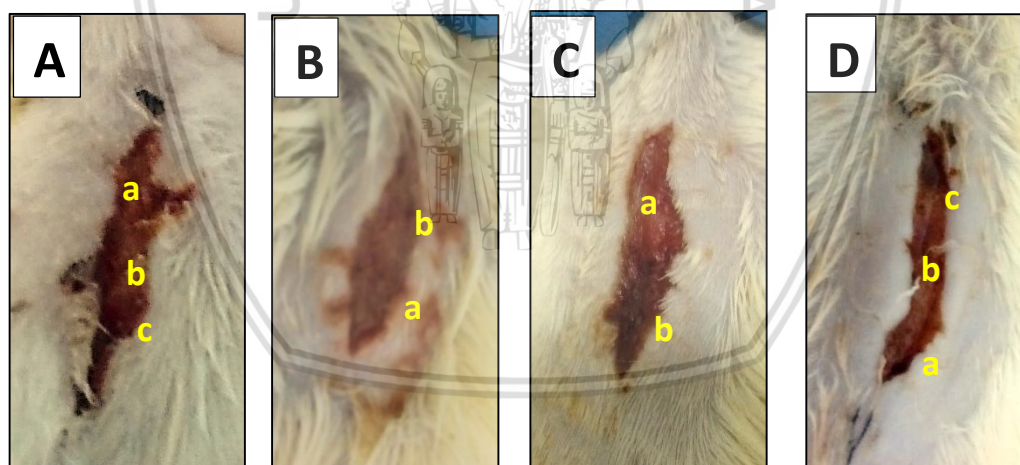
Tikus kelompok perlakuan diberi terapi sebanyak 2 kali sehari selama 10 hari, yaitu pada pukul 9 pagi dan 3 sore. Kelompok P1 diberi salep ekstrak kulit jengkol 5%, kelompok P2 diberi salep ekstrak kulit jengkol 10% dan kelompok P3 diberi salep ekstrak kulit jengkol 15%. Kelompok KP berlaku sebagai kontrol positif sehingga tidak diberi terapi apapun. Salep diaplikasikan dengan cara dioleskan pada bagian yang diinsisi.

Pada hari ketiga, kelompok KP, P1, P2 dan P3 sama-sama mengalami inflamasi meskipun ada pada tingkat keparahan yang berbeda. Gejala inflamasi primer antara lain adalah rubor (kemerahan) dan tumor (pembengkakan) (Robbins *et al.*, 2010). KP mengalami inflamasi dengan adanya debris di bagian tengah luka. P1 mengalami pembengkakan luka meskipun bagian terinsisi tidak terlalu kemerahan. P2 mengalami kemerahan tetapi tidak membengkak. Luka pada P3 masih memerah dan membengkak, tetapi relatif bersih dan lembab dibanding luka kelompok lain. Inflamasi akut memiliki tanda tanda klasik seperti panas (kalor), merah (rubor), edema (tumor), nyeri (dolor) dan berkurangnya fungsi (fungsi laesa) dan terjadi pada hari ke-1 hingga ke-5 (Arimbi dkk., 2013). Jaringan akan kemerahan dan terasa panas akibat adanya aktivitas metabolisme yang tinggi dan vaskularisasi di daerah jejas (Robbins *et al.*, 2010).

Kelompok KP memiliki tingkat inflamasi paling tinggi diakibatkan tidak adanya agen yang menghambat proses inflamasi. Saat terjadi cedera sel, maka

fosfolipid sel akan mengeluarkan fosfolipase yang menggerakkan cakram asam arakhidonat. Jalur lipooksigenase yang berjalan akan merangsang kemotaksis neutrofil pada jaringan jejas, sehingga menyebabkan reaksi inflamasi (Kumar *et al.*, 2007). P1, P2 dan P3 diberi terapi salep ekstrak kulit buah jengkol yang memberikan efek antiinflamasi dari flavonoid (Afiyah dan Medawati, 2017) sehingga jalur lipooksigenase terhambat dan berujung pada penurunan tingkat inflamasi. P1 dan P3 terlihat mengalami pembengkakan di tepian luka yang diakibatkan penumpukan eksudat hasil inflamasi yang ada pada rongga serosa (Robbins *et al.*, 2010). Hal tersebut terjadi karena merupakan salah satu tanda klasik terjadinya inflamasi (Arimbi dkk., 2013). Keterangan lengkap bisa dilihat pada

Gambar 5.1.

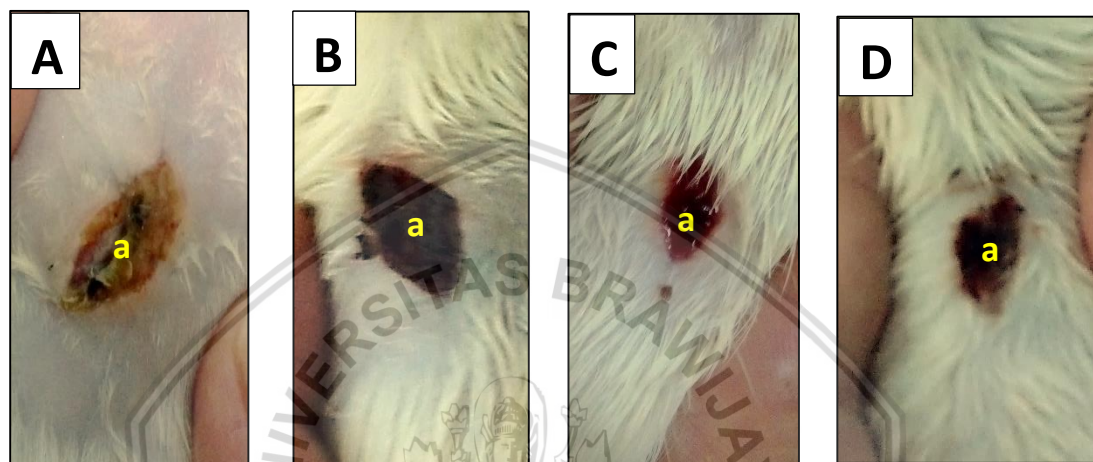


Gambar 5.1 Gambaran makroskopis perkembangan luka tikus pasca insisi hari ke-3, fase inflamasi. (A) KP dengan adanya tanda kemerahan (a), debris yang menempel pada luka (b) dan luka yang menutup (c). (B) P1 mengalami bengkak (a), dan luka yang belum menutup (b). (C) P2 mengalami kemerahan (a) dan tepi luka belum bertaut (b). (D) P3 memiliki luka yang membengkak (a) kondisi luka yang memerah dan lembab (b), serta tepi luka yang belum menutup (c).

Pada hari ke-7, luka pada semua kelompok mulai mengecil meski belum tertutup sempurna. Menurut Robbins *et al.* (2010) pada hari ke-7 terjadi proliferasi sehingga jaringan mulai menutup dan terisi jaringan baru. Luka pada KP mengeluarkan nanah dan mengering memenuhi lapisan atas luka. P1 memiliki keropeng tebal berwarna kehitaman yang menutupi luka. Keropeng tersebut merupakan akumulasi dari debris, nanah dan sisa-sisa sediaan salep ekstrak jengkol yang tidak terserap tubuh. Hal ini menyebabkan menghambat proses penutupan luka oleh epidermis. Kelompok P2 dan P3 mengalami hal yang sama meski dalam ukuran yang berbeda. Pada tikus dilakukan *debridement* luka agar jaringan-jaringan mati beserta sisa salep tidak menghambat tumbuhnya sel-sel baru dari sel-sel yang ada pada keadaan yang bagus (Pavletic, 2010).

Luka pada hari ke-7 masuk pada fase proliferasi karena jaringan telah membentuk jaringan granulasi, neovaskularisasi ada pada tingkatan maksimal, munculnya serabut kolagen dan proliferasi epitelial maksimal (Robbins *et al.*, 2010). Proses inflamasi mulai berkurang diakibatkan jaringan didominasi oleh jaringan ikat baru, menggantikan sel-sel imun. Menurut MacLeod *and* Mansbridge (2014) pada fase proliferasi, makrofag M1 fase inflamasi akan mengalami pergeseran fenotip menjadi M2 yang bersifat antiinflamasi dan reparatif, sehingga mampu menghasilkan sitokin IL-10, VEGF, TGF- β yang menunjang terbentuknya jaringan baru dan proses penutupan luka. Kelompok KP yang tidak diberi terapi masih menghasilkan nanah diakibatkan adanya akumulasi dari sel-sel neutrofil yang mati setelah menyerang bakteri, dan difagositosis oleh makrofag (Underwood, 2000). Luka pada P1, P2 dan P3 terlihat lebih baik dibandingkan KP. Hal tersebut

bisa terjadi akibat pengaruh tannin yang ada pada salep jengkol dan memberikan efek astringen untuk penguatan luka (Afiyah dan Medawati, 2007). Kondisi terbaik ada pada P2, yang memiliki luas luka terkecil dan kondisi luka yang bersih tanpa debris. Keterangan lengkap bisa dilihat pada **Gambar 5.2**.

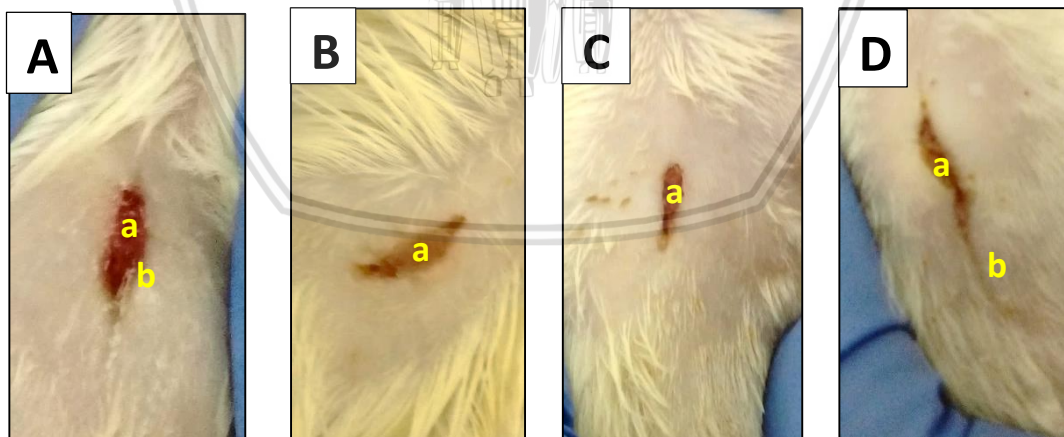


Gambar 5.2 Gambaran makroskopis perkembangan luka tikus pasca insisi hari ke-7, fase proliferasi. (A) Luka pada KP tertutup nanah yang mengering dan berwarna kuning kotor (a). (B) P1 memiliki keropeng bekas salep yang mengering sehingga menghambat penutupan luka (a). (C) P2 memiliki bekas salep yang lebih kecil dari kelompok lain (a). (D) P3 memiliki bekas salep yang melebar (a).

Pada hari ke-10, luka pada semua kelompok tikus semakin mengering. Tanda-tanda inflamasi sudah mulai menurun dan epitel lebih cepat tumbuh. Namun beberapa tikus tidak mengalami penutupan luka sempurna akibat adanya debris dan sisa salep yang tidak dibersihkan pada hari sebelumnya. Luka pada KP memiliki debris yang menempel sehingga luka masih belum tertutup sempurna. Luka pada P1 sudah mulai mengecil, tetapi masih memiliki lapisan debris yang tipis di tengah luka. P2 merupakan kelompok tikus yang mengalami perkembangan luka paling bagus. Luka pada P3 cukup baik, tetapi memiliki panjang luka yang lebih panjang

dari kelompok lain. Berdasarkan pengamatan, luka tersebut sudah ada pada fase proliferasi (Arimbi dkk., 2013).

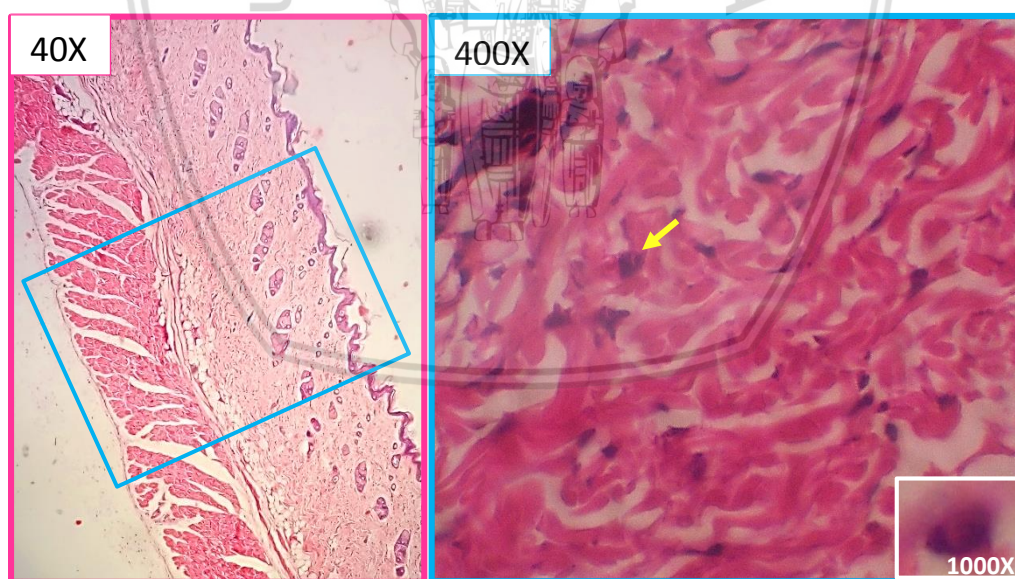
Kondisi pada hari ke-10 menggambarkan bahwa tingkat kesembuhan luka antar perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan. KP sebagai kelompok tanpa terapi masih memiliki debris sehingga penutupan luka terhambat. Debris tersebut muncul akibat luka yang kurang bersih. P1, P2 dan P3 memiliki luka yang bersih, diakibatkan efek salep kulit jengkol yang mampu memberikan efek antiseptik (Darwin, 2011). P2 memiliki kondisi luka yang paling sempit, hal ini sesuai dengan penelitian Malini dkk. (2017) yang menyatakan bahwa salep jengkol 10% merupakan konsentrasi optimal ditinjau dari perkembangan penutupan luka. Semua luka menyempit diakibatkan keratinosit berproliferasi setelah kontak dengan ECM, kemudian akan bermigrasi dari membran basal hingga permukaan untuk menunjang penutupan luka (Schultz, 2007). Keterangan lengkap bisa dilihat pada **Gambar 5.3**.



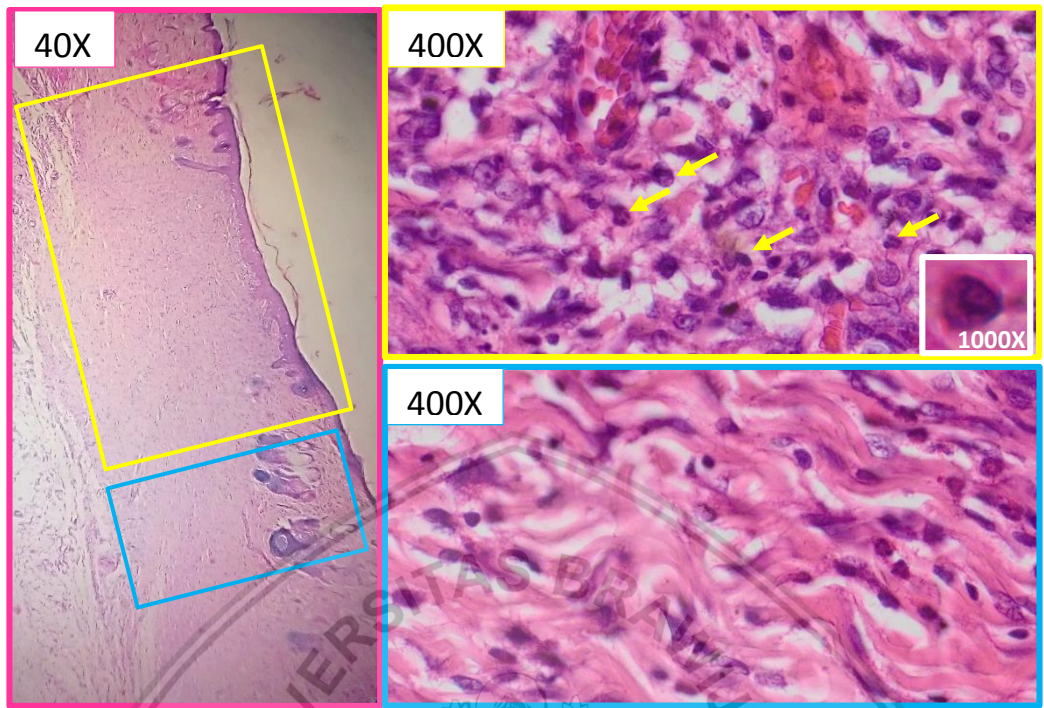
Gambar 5.3 Gambaran makroskopis perkembangan luka tikus pasca insisi hari ke-10, fase proliferasi. (A) Luka pada KP nampak lebih lebar dibanding kelompok lain (a) dengan tepi yang mengering (b). (B) P1 mulai menutup dengan timbunan debris tipis di lapisan teratas luka (a). (C) P2 memiliki luka yang paling sempit di antara kelompok lain (a). (D) Luka pada P3 mulai menyempit tetapi lebih panjang dibanding kelompok lain (a), terdapat bekas epitel yang baru menyatu (b).

5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol terhadap Jumlah Sel Radang pada Luka Insisi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

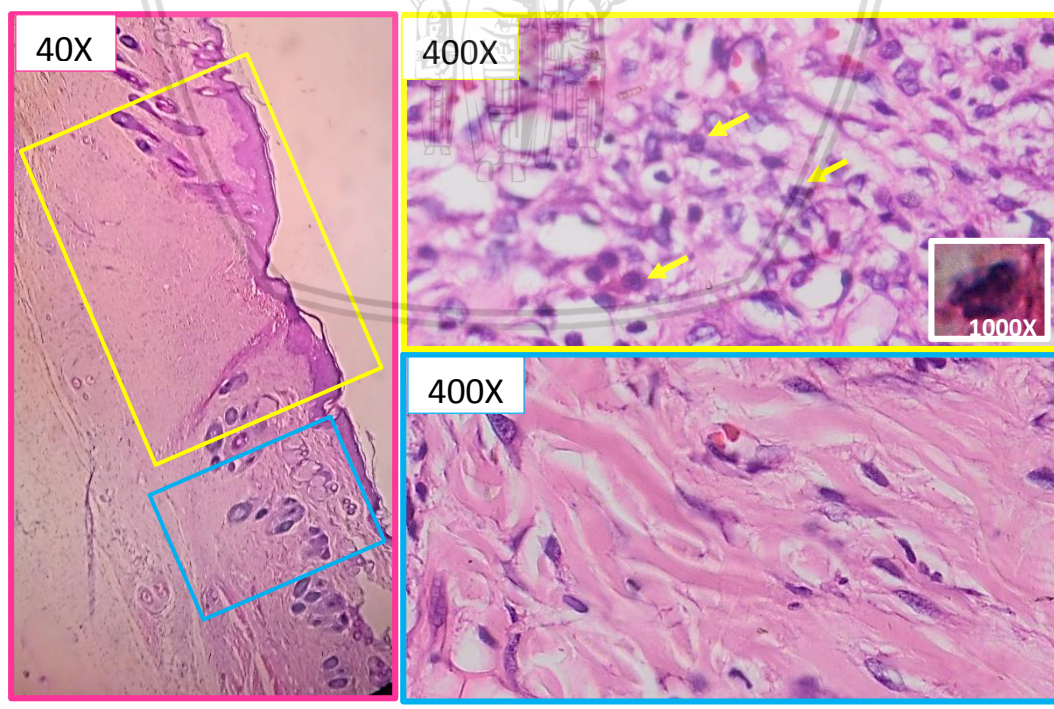
Ketika kulit mengalami peradangan akibat luka, maka akan terjadi peristiwa neutrofilia karena adanya sel radang terutama neutrofil yang menginvasi daerah yang rusak. Sel radang berfungsi untuk membersihkan jaringan dari agen toksis dan infeksi (Guyton and Hall, 2007). Menurut Dorland (1998), sel PMN merupakan leukosit granular yang memiliki nukleus dengan 3-5 lobus yang dihubungkan dengan benang kromatin, berwarna ungu dan merah muda. Sel MN memiliki inti oval, seperti tapal kuda atau terlipat. Warna sitoplasmanya biru keabu-abuan. Hasil pengamatan preparat HE menggunakan mikroskop bisa dilihat pada **Gambar 5.4**, **Gambar 5.5**, **Gambar 5.6**, **Gambar 5.7** dan **Gambar 5.8** di bawah ini.



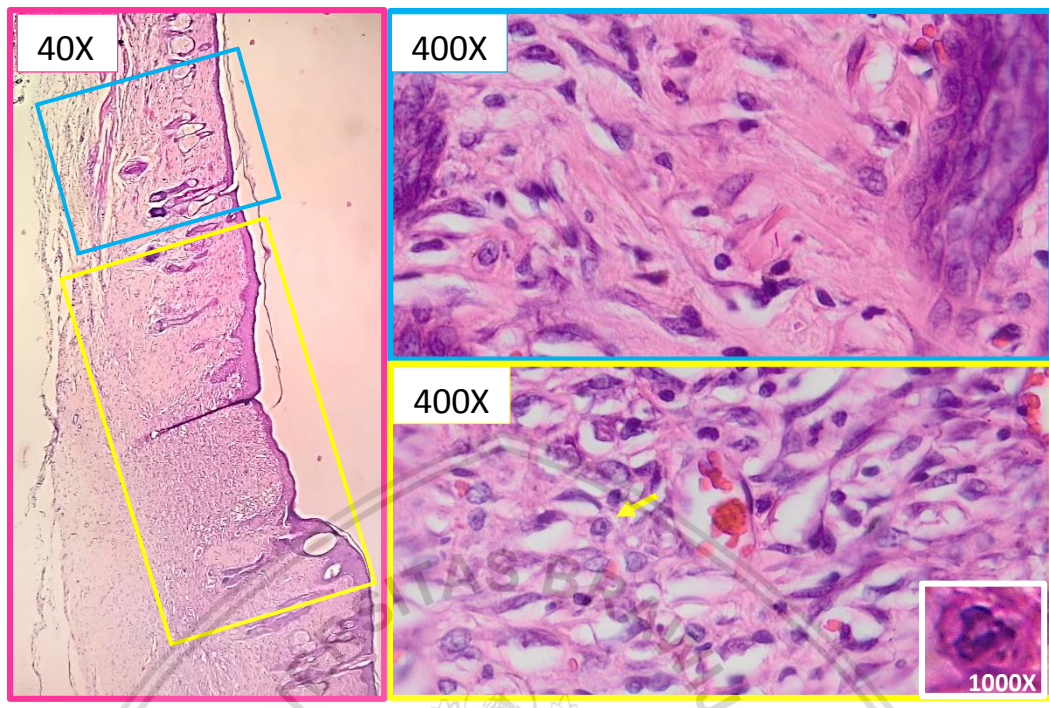
Gambar 5.4 Preparat histopatologi kulit kelompok KN pewarnaan HE dengan perbesaran 40X (kiri) dan 400X (kanan). → : sel radang dan *insert* : bentuk sel PMN neutrofil (1000X). Jaringan tidak mengalami kerusakan sehingga tidak ada bekas insisi. Jumlah sel radang sangat sedikit.



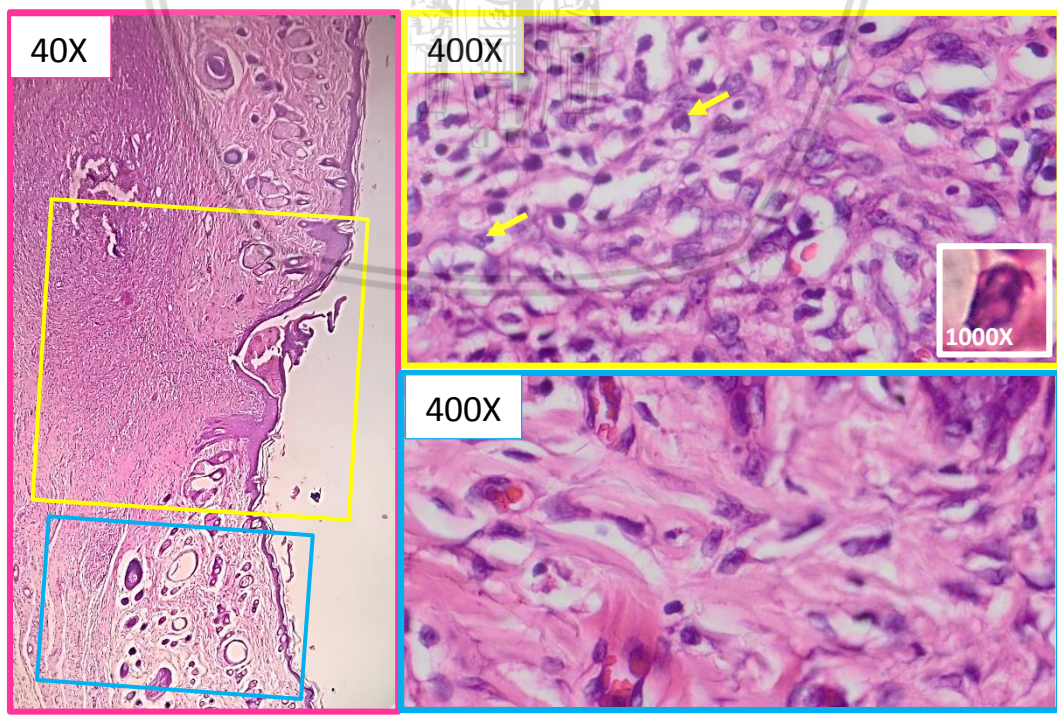
Gambar 5.5 Preparat histopatologi kulit kelompok KP pewarnaan HE dengan perbesaran 40X (kiri) dan 400X (kanan). □ : bagian normal, □ : daerah insisi, insert : bentuk sel PMN neutrofil (1000X), → : keberadaan sel radang pada bagian insisi.



Gambar 5.6 Preparat histopatologi kulit kelompok P1 pewarnaan HE dengan perbesaran 40X (kiri) dan 400X (kanan). □ : bagian normal, □ : daerah insisi, insert : bentuk sel PMN neutrofil (1000X), → : keberadaan sel radang pada bagian insisi.



Gambar 5.7 Preparat histopatologi kulit kelompok P2 pewarnaan HE dengan perbesaran 40X (kiri) dan 400X (kanan). : bagian normal, : daerah insisi, *insert* : bentuk sel PMN neutrofil (1000X), → : keberadaan sel PMN pada bagian insisi.



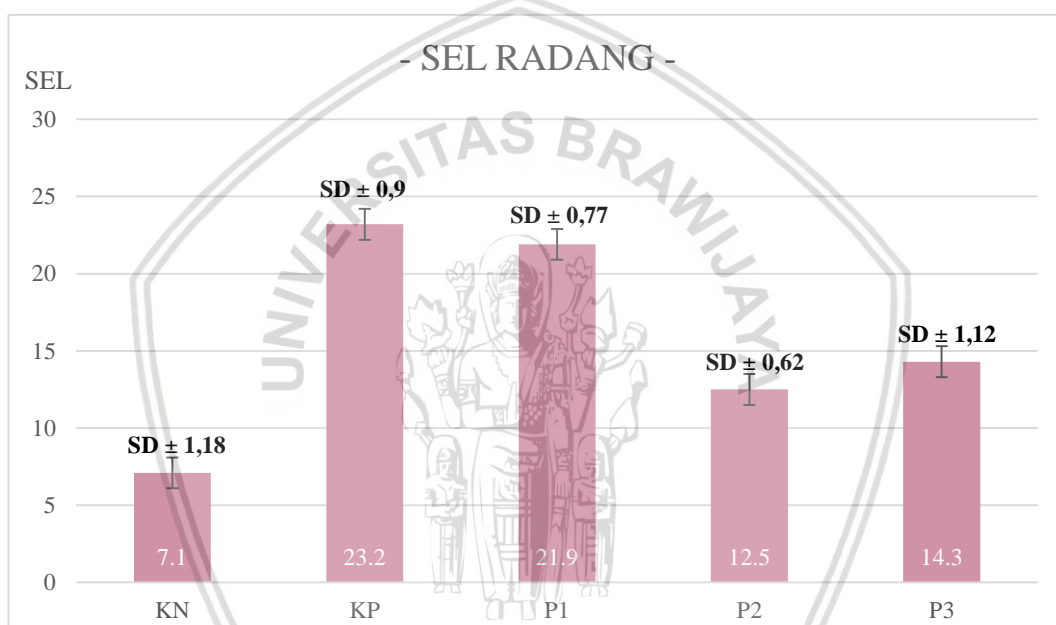
Gambar 5.8 Preparat histopatologi kulit kelompok P3 pewarnaan HE dengan perbesaran 40X (kiri) dan 400X (kanan). : bagian normal, : daerah insisi, *insert* : bentuk sel PMN neutrofil (1000X), → : keberadaan sel PMN pada bagian insisi.

Jaringan di atas dipreparasi pada hari ke-10 pasca insisi, yaitu ketika luka insisi sudah memasuki fase proliferasi (Arimbi dkk., 2013). Bekas insisi pada jaringan kulit ditandai dengan rusaknya bagian epitel, tidak adanya bentukan glandula dan ECM berupa serat kolagen yang masih belum tersusun rapi. Warna area luka insisi juga terlihat lebih gelap karena didominasi oleh sel-sel radang, lebih banyak daripada jaringan yang masih sehat.

Berdasarkan gambar di atas, terlihat bahwa jaringan kulit KN (**Gambar 5.4**) memiliki jumlah sel radang paling sedikit dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan karena KN merupakan kontrol negatif, tidak diberikan perlakuan insisi dan juga terapi. KN menunjukkan kondisi kulit tikus yang sehat dan tidak memiliki bekas insisi seperti kelompok yang lain sehingga dapat dijadikan pembanding dengan kelompok terapi. Terlihat bahwa sel radang (terutama neutrofil) masih terlihat pada jaringan yang sehat meski jumlahnya sangat sedikit. Neutrofil hanya ada dalam sirkulasi selama 7-10 jam, sebelum akhirnya bermigrasi ke jaringan dan hidup selama beberapa hari dalam jaringan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Kelompok KP (**Gambar 5.5**) merupakan kelompok yang diinsisi tetapi tidak diberi terapi. Pada gambaran histologis, nampak bagian epitel masih belum menutup sempurna dan terbentuk cekungan yang diisi oleh jaringan ikat. Setelah dilakukan pengamatan dengan perbesaran 400X, terlihat sel fibroblast yang mulai mensekresikan kolagen serta adanya sisa-sisa sel radang dari fase inflamasi. KP tidak diberi terapi antiinflamasi sehingga jumlah sel radang yang ada terlihat lebih banyak dibandingkan kelompok yang lain.

Kelompok P1 (**Gambar 5.6**), P2 (**Gambar 5.7**) dan P3 (**Gambar 5.8**) merupakan kelompok perlakuan yang diberi insisi dan terapi ekstrak kulit buah jengkol, masing-masing 5%, 10% dan 15%. Berdasarkan pengamatan gambar di atas, terlihat bahwa jumlah sel radang yang ada pada ketiga kelompok tersebut lebih banyak dari kelompok KN, tetapi masih lebih sedikit dibandingkan kelompok KP. Hasil rata-rata jumlah sel radang dilihat pada **Gambar 5.9**.



Gambar 5.9 Grafik rata-rata dan standar deviasi jumlah sel radang

Uji *One Way* ANOVA (**Lampiran 4.4**) menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$). Analisa lanjut dilakukan dengan uji *Tukey* (**Lampiran 4.5**). Rata-rata jumlah sel radang pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah sel radang dan uji *Tukey* $\alpha=0,05$ pada masing-masing kelompok

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Jumlah Sel Radang \pm SD (sel)
KN (Kontrol Negatif)	7,1 \pm 1,18 ^a
KP (Kontrol Positif)	23,25 \pm 0,90 ^c
P1 (Salep Jengkol 5%)	21,9 \pm 0,77 ^c
P2 (Salep Jengkol 10%)	12,5 \pm 0,62 ^b
P3 (Salep Jengkol 15%)	14,35 \pm 1,12 ^b

Keterangan: perbedaan notasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Kelompok yang berbeda nyata dengan kelompok KP adalah kelompok P2 dan P3, sedangkan kelompok yang berbeda nyata dengan KN adalah kelompok P1. Berdasarkan rata-rata, kelompok P2 (12,5 \pm 0,62 sel) merupakan kelompok yang memiliki jumlah sel radang paling sedikit dibandingkan P1 dan P3. Kelompok P2 (12,5 \pm 0,62 sel) dan P3 (14,35 \pm 1,12 sel) memiliki notasi yang sama sehingga secara statistika keduanya tidak memiliki perbedaan nyata. Kelompok P1 (21,9 \pm 0,77 sel) memiliki notasi yang sama dengan kelompok KP sehingga dianggap tidak memberi efek terapi penurunan jumlah sel radang pada luka insisi.

Kelompok KP (23,25 \pm 0,90 sel) merupakan kelompok yang memiliki jumlah sel radang paling tinggi. Hal ini disebabkan karena fase inflamasi KP tidak dihambat dengan terapi apapun, sehingga kaskade jalur lipooksigenase berjalan lancar dan menyebabkan peningkatan agregasi sel radang pada bagian yang mengalami kerusakan. Inflamasi menyebabkan terjadinya vasodilatasi arteriol, peningkatan tekanan hidrostatik intravaskular, peningkatan permeabilitas vaskuler yang memungkinkan pergerakan cairan kaya protein (Chandrasoma *and* Taylor, 2004). Munculnya agen kemotaktik akan menstimulasi leukosit untuk berpindah dari sel endotel, terutama neutrofil (Sjamsuhidajat, 2005). Leukosit akan berjalan

menuju tempat jejas dengan mengikuti gradien kimiawi seperti bakteri, komponen C5a, produk metabolisme asam arakhidonat (AA) jalur lipooksigenase dan sitokin (Kumar *et al.*, 2007).

Kelompok P1 ($21,9 \pm 0,77$ sel), P2 ($12,5 \pm 0,62$ sel) dan P3 ($14,35 \pm 1,12$ sel) menunjukkan adanya penurunan jumlah sel radang dibandingkan dengan kelompok KP. Dilihat dari grafik yang ada pada **Gambar 5.9**, terlihat bahwa P2 merupakan kelompok yang memiliki jumlah sel radang paling rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa P2 merupakan kelompok perlakuan dengan tingkat kesembuhan paling tinggi. Menurut Kumar *et al.* (2010), neutrofil akan menghasilkan neutrofil protease elastase dan proteinase-3 yang mempunyai kemampuan memecah elastin dan matriks ekstraseluler. Gangguan tersebut menyebabkan perbaikan epitel terganggu dan menghambat proses penyembuhan luka.

Berdasarkan statistika dengan uji *Tukey* $\alpha=0,05$ yang ada pada **Tabel 5.1**, didapatkan kesimpulan bahwa P2 (10%) dan P3 (15%) memiliki beda nyata dengan kelompok KP. Pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol konsentrasi 10% dan 15% memiliki efek menurunkan jumlah sel radang pada kondisi luka insisi secara signifikan. Penurunan tersebut diakibatkan aktivitas senyawa flavonoid yang ada pada salep ekstrak kulit buah jengkol. Kulit buah jengkol memiliki kandungan flavonoid tinggi yang memberikan efek antiinflamasi (Afiyah dan Medawati, 2017). Flavonoid menghambat aktivitas enzim lipooksigenase pada siklus asam arakhidonat (AA). Penurunan aktivitas enzim lipooksigenase akan menghambat sintesis leukotriene (Riansyah dkk., 2015) dan berujung pada penurunan agregasi sel leukosit dan menurunkan efek inflamasi pada luka (Kumar *et al.*, 2007).

Kelompok P1 (5%) tidak menunjukkan efek yang signifikan terhadap kesembuhan luka insisi. Hal tersebut bisa terjadi dikarenakan konsentrasi yang diberikan terlalu rendah sehingga senyawa bioaktif yang ada tidak memadai untuk memberikan efek terapi. Menurut Mukherjee (2015), ekstrak tumbuhan dengan konsentrasi terlalu rendah akan mengandung sedikit senyawa bioaktif, sehingga tidak bisa memberikan efek terapi secara optimal. Sebaliknya, pada konsentrasi ekstrak yang terlalu tinggi, maka akan zat lain dalam ekstrak akan bersifat toksik dan menurunkan efek terapi yang diharapkan.

Hasil perhitungan sel secara spesifik (**Lampiran 4.1**) menunjukkan bahwa sebagian besar sel radang terdiri atas neutrofil dan makrofag. Eosinofil ada dalam jumlah yang sedikit tetapi masih lebih banyak dibandingkan jumlah basofil. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa sel imun yang mendominasi pada saat terjadi peradangan adalah neutrofil. (Robbins *et al.*, 2010). Terdapat sel eosinofil yang berfungsi sebagai barrier fisik bersama sel imun yang lain, tetapi dalam jumlah yang sangat sedikit. Makrofag adalah salah satu jenis sel radang yang meningkat pada fase inflamasi, tetapi sel tersebut juga masih mendominasi area luka di hari ke-10. Hal tersebut dikarenakan pada fase proliferasi, makrofag fenotip M1 akan bertransformasi menjadi fenotip M2 yang memicu *growth factors* pada saat proliferasi (MacLeod *and* Mansbridge, 2014).

Neutrofil merupakan sel imun yang berfungsi untuk mengenali dan memfagositosis mikroorganisme, sekaligus merupakan barrier fisik yang ada pada lapisan epidermis (MacLeod *and* Mansbridge, 2014). Sel radang memiliki fungsi penting dalam pertahanan tubuh secara selular dan humoral. Sel radang mampu

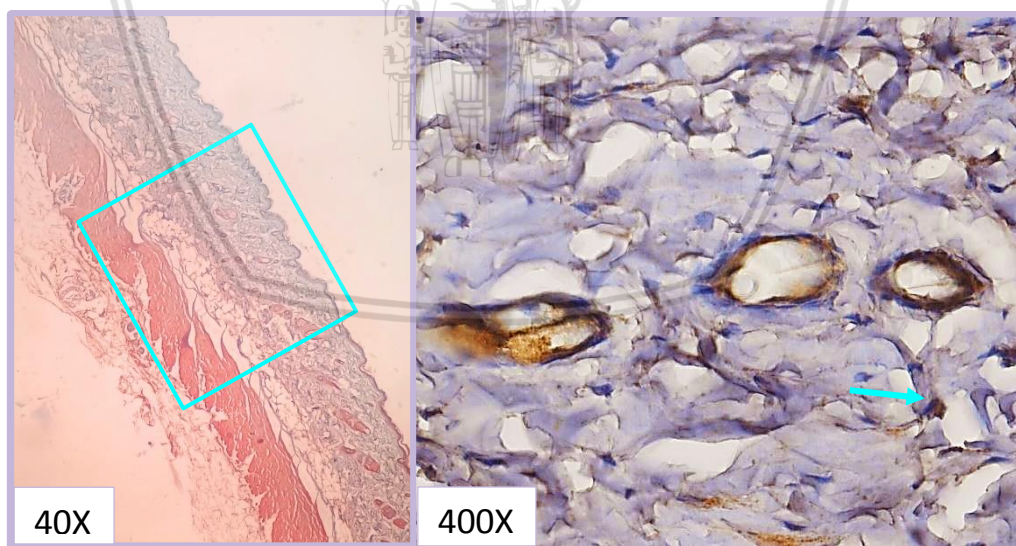
bergerak secara amuboid seperti makrofag melalui proses diapedesis, dapat meninggalkan pembuluh darah, menerobos sel-sel endotel dan menembus jaringan ikat. Sel radang PMN (terutama neutrofil) memiliki kemampuan untuk bergerak aktif sehingga dapat berkumpul dalam waktu singkat di jaringan yang mengalami kerusakan. Proses tersebut dinamakan dengan kemotaksis, yaitu sel imun akan bergerak mengikuti rangsangan spesifik. Sehingga pada saat terjadi luka, sel radang akan berkumpul dan menyebabkan inflamasi (Sadikin, 2002).

Berdasarkan gambaran histopatologi perbesaran 400X di atas, terlihat bahwa jumlah sel radang yang terdeteksi lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah sel fibroblast dan makrofag yang ada. Hal tersebut terjadi karena preparasi jaringan kulit dilakukan pada hari ke-10, pada saat luka sudah masuk pada fase proliferasi. Pada keadaan proliferasi, sel yang mendominasi adalah sel-sel perbaikan seperti fibroblast, kolagen, dan proliferasi epitel. Sel radang akan menginfiltrasi jaringan luka pada 3-24 jam pasca terjadinya jejas. Pada hari ke-3, neutrofil mulai digantikan dengan makrofag dan muncul jaringan granulasi untuk persiapan fase proliferasi. Pada hari ke-5, ruang luka sudah terisi dengan jaringan granulasi, sel kolagen dan proliferasi epitel maksimal. Pada hari ke-14, fase inflamasi sebagian besar sudah menghilang dan luka dipenuhi oleh proliferasi fibroblast beserta akumulasi ECM kolagen (Robbins *et al.*, 2010).

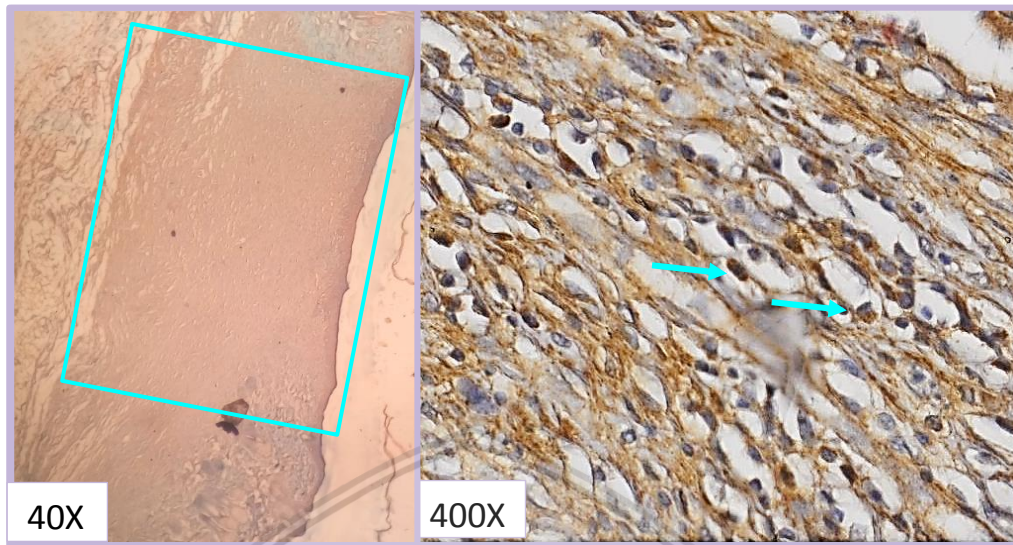
5.3 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kulit Buah Jengkol terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada Luka Insisi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Ekspresi TNF- α diidentifikasi dengan cara melakukan pengamatan pada preparat histologi pewarnaan imunohistokimia. Semakin tajam dan luas warna tersebut, maka semakin banyak ekspresi TNF- α yang ada pada area tersebut. Pada kondisi normal TNF- α akan terekspresi pada lapisan basal epidermis, duktus eksokrin, glandula sebacea dan sel dendritik dermis (Kristensen *et al.*, 2008).

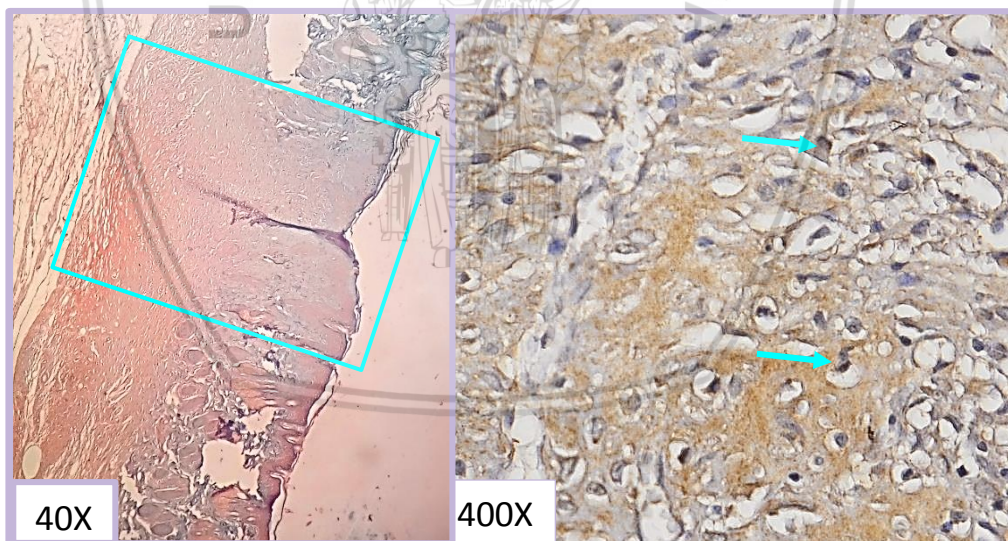
Hasil penelitian pengaruh pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol terhadap ekspresi TNF- α luka insisi kulit tikus *Rattus norvegicus* pada setiap kelompok bisa dilihat pada **Gambar 5.10**, **Gambar 5.11**, **Gambar 5.12**, **Gambar 5.13** dan **Gambar 5.14**.



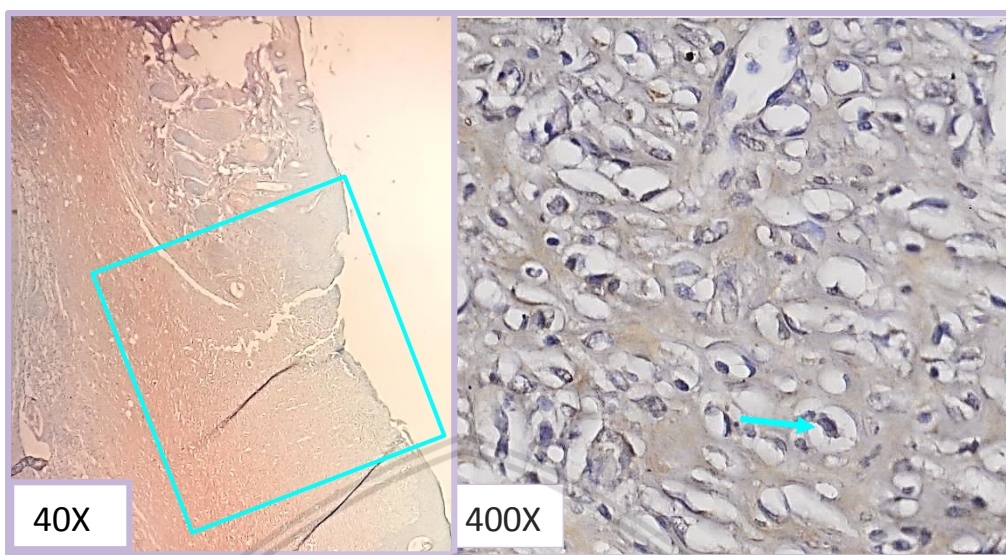
Gambar 5.10 Ekspresi TNF- α terlihat pada sel makrofag dalam jaringan kulit tikus kelompok KN terapi negatif (tanpa insisi dan tanpa terapi) menggunakan metode IHK dengan perbesaran 40X dan 400X. → : ekspresi TNF- α .



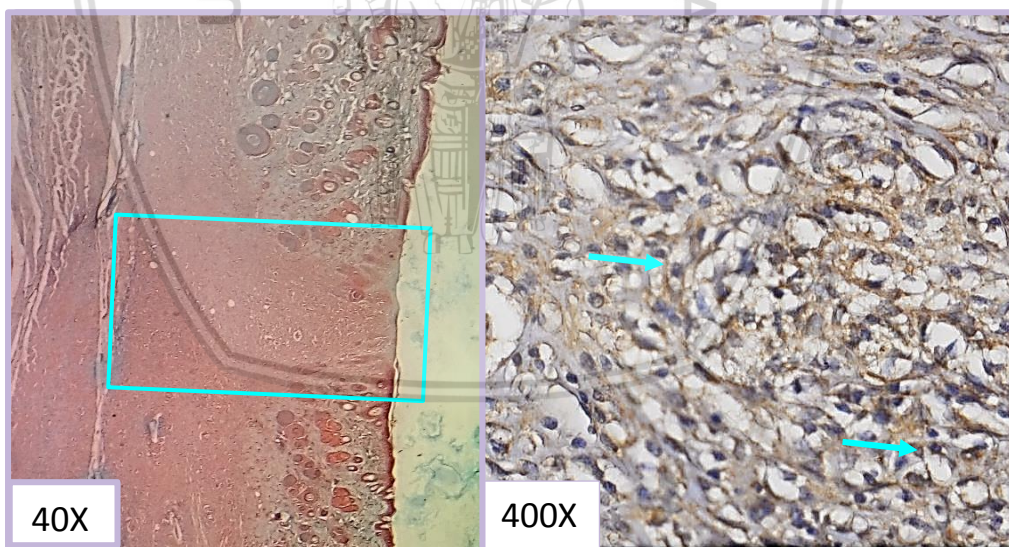
Gambar 5.11 Ekspresi TNF- α terlihat pada sel makrofag dalam jaringan kulit tikus kelompok KP terapi positif (insisi dan tanpa terapi) menggunakan metode IHK dengan perbesaran 40X dan 400X. □ : area insisi, → : ekspresi TNF- α .



Gambar 5.12 Ekspresi TNF- α terlihat pada sel makrofag dalam jaringan kulit tikus kelompok P1 (terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 5%) menggunakan metode IHK dengan perbesaran 40X dan 400X. □ : area insisi, → : ekspresi TNF- α .



Gambar 5.13 Ekspresi TNF- α terlihat pada sel makrofag dalam jaringan kulit tikus kelompok P2 (terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 15%) menggunakan metode IHK dengan perbesaran 40X dan 400X. \square : area insisi, \rightarrow : ekspresi TNF- α .

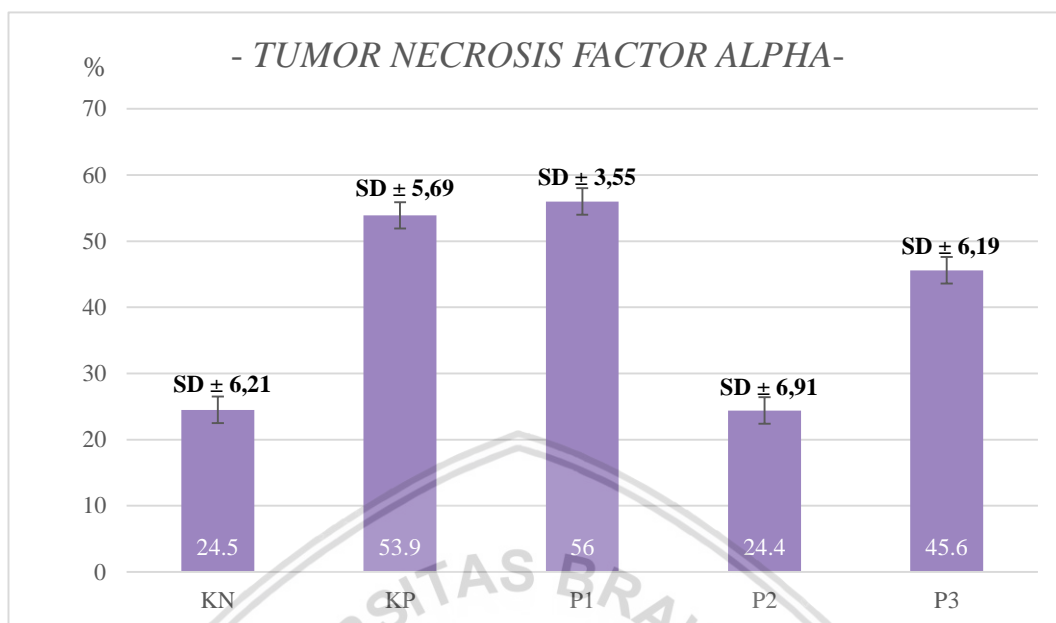


Gambar 5.14 Ekspresi TNF- α terlihat pada sel makrofag dalam jaringan kulit tikus kelompok P3 (terapi salep ekstrak kulit buah jengkol 15%) menggunakan metode IHK dengan perbesaran 40X dan 400X. \square : area insisi, \rightarrow : ekspresi TNF- α .

Kelompok KN (**Gambar 5.10**) sebagai kontrol negatif menggambarkan ekspresi TNF- α pada kondisi jaringan kulit yang normal. TNF- α merupakan komponen imunitas yang normal ada pada jaringan sehat. Menurut Budini dkk. (2014), TNF- α akan tetap terekspresi pada jaringan kulit dalam jumlah yang sedikit, dan hanya akan meningkat jika kulit tersebut mengalami luka atau suatu penyakit. Hal tersebut terbukti pada hasil penelitian ini, yaitu KN masih memiliki warna kecoklatan tanda adanya TNF- α , meski dengan ketajaman yang rendah dan terlokalisasi pada sel basal epidermis, duktus eksokrin, glandula sebacea dan sel dendritik dermis (Kristensen *et al.*, 2008).

Pada KP (**Gambar 5.11**), nampak warna coklat mendominasi seluruh bagian dermis dan bertolak belakang dengan keadaan kelompok KN. Kelompok ini merupakan kelompok kontrol positif, yaitu hewan coba akan mendapatkan luka insisi tetapi tidak diberikan terapi apapun. Hal ini menyebabkan agen inflamasi, salah satunya sitokin pro inflamasi TNF- α terekspresi tinggi, lebih tinggi dibandingkan kelompok yang mendapatkan terapi.

Perbedaan mencolok terjadi antara P2 (**Gambar 5.13**) dengan P1 (**Gambar 5.12**) dan P3 (**Gambar 5.14**). P2 memiliki dominasi warna biru pada bagian dermis dan epidermis, sedangkan P1 dan P3 memiliki dominasi warna coklat. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok P2 merupakan kelompok perlakuan yang memiliki ekspresi TNF- α paling rendah, bahkan mendekati dengan keadaan KN. P1 dan P3 memiliki ekspresi TNF- α yang masih cukup banyak meskipun tidak sebanyak ekspresi yang muncul pada KP. Hasil rata-rata ekspresi TNF- α dilihat pada **Gambar 5.15**.



Gambar 5.15 Grafik rata-rata dan standar deviasi ekspresi TNF- α

Uji *One Way* ANOVA (**Lampiran 7.4**) menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$). Analisa lanjut dilakukan dengan uji *Tukey* (**Lampiran 7.5**). Rata-rata kelompok, standar deviasi dan hasil uji lanjutan pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata area ekspresi TNF- α dan uji *Tukey* $\alpha = 0,05$ pada masing-masing kelompok

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Presentase Area Ekspresi TNF- $\alpha \pm$ SD (%)
KN (Kontrol Negatif)	24,5 \pm 6,21 ^a
KP (Kontrol Positif)	56,0 \pm 5,69 ^b
P1 (Salep Jengkol 5%)	53,9 \pm 3,55 ^b
P2 (Salep Jengkol 10%)	24,4 \pm 6,91 ^a
P3 (Salep Jengkol 15%)	43,9 \pm 6,19 ^b

Keterangan: perbedaan notasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Kelompok yang berbeda nyata dengan kelompok KP adalah kelompok P2, sedangkan tidak ada kelompok yang berbeda nyata dengan KN. Berdasarkan rata-

rata, kelompok P2 ($24,4 \pm 6,91$ %) merupakan kelompok yang memiliki jumlah sel radang paling sedikit dibandingkan P1 dan P3.

Kelompok P2 ($24,4 \pm 6,91$ %) merupakan kelompok perlakuan yang memiliki ekspresi TNF- α terendah. Irawati (2014) menyebutkan bahwa TNF- α adalah sitokin utama yang mengendalikan respon inflamasi, sehingga dapat menjadi indikator seberapa tinggi aktivitas inflamasi di jaringan tersebut. Berdasarkan uji *Tukey*, kondisi jaringan P2 mendekati keadaan jaringan sehat (tidak ada beda nyata). Jaringan sehat masih mengekspresikan TNF- α karena merupakan komponen normal pada sistem imunitas tetapi dalam jumlah sedikit (Budini dkk., 2014).

Kelompok KP ($56,0 \pm 5,69$ %) memiliki ekspresi TNF- α paling tinggi dibandingkan dengan yang lain karena adanya inflamasi jaringan pasca insisi dan tidak diberi terapi apapun untuk meredakan inflamasi. Rusaknya jaringan pada saat terjadi luka menyebabkan teraktivasinya makrofag, terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi, salah satunya TNF- α (Abbas *et al.*, 2010).

Kelompok P3 ($43,9 \pm 6,19$ %) dan P1 ($53,9 \pm 3,55$ %) memiliki nilai TNF- α yang lebih tinggi dari P2 tetapi lebih rendah dari KP. Berdasarkan uji *Tukey*, kedua kelompok ini tidak memiliki beda nyata dengan kelompok KN ataupun kelompok KP. Sehingga disimpulkan bahwa dari ketiga kelompok perlakuan, hanya kelompok P2 yang memiliki efek terapi sebagai antiinflamasi terhadap luka insisi pada hewan coba.

Tumor Necrosis Factor Alpha merupakan sitokin pro-inflamasi yang jumlahnya meningkat pada saat terjadi peradangan, seperti pada saat terjadi luka insisi (Kumar

et al., 2007). *Tumor Necrosis Factor Alpha* diekspresikan pada saat terjadi luka karena memiliki banyak fungsi pada saat terjadi inflamasi, seperti peningkatan peran pro trombotik, perangsangan adhesi sel leukosit, induksi sel endothel, pengaturan aktivitas makrofag dan lain-lain (Supit dkk., 2015). Menurut Navarro (2008), tingginya jumlah ekspresi TNF- α menandakan bahwa jaringan luka masih dalam tahap inflamasi, sedangkan rendahnya ekspresi TNF- α menandakan bahwa jaringan sudah melewati fase inflamasi dan masuk pada fase proliferasi.

Ekstrak kulit buah jengkol memiliki banyak zat aktif, antara lain alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, glikosida dan steroid/ terpenoid (Patimah dkk., 2015). Kandungan flavonoid di kulit buah jengkol relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan flavonoid yang ada di tumbuh-tumbuhan pada umumnya, sehingga dengan ekstraksi yang ada pada konsentrasi rendah, kulit jengkol sudah bisa memberikan efek antiinflamasi (Malini dkk., 2017). Menurut Nijveltd *et al.* (2001), efek antiinflamasi didapat karena flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat 2 enzim yang ada pada siklus asam arakhidonat (AA), yaitu enzim lipooksigenase dan enzim siklooksigenase (COX), menghambat degranulasi neutrofil, menghambat akumulasi leukosit dan menghambat pelepasan histamin. Ketika flavonoid menghambat enzim lipooksigenase, maka akan terjadi penurunan sintesis leukotriene dan prostaglandin (Riansyah dkk., 2015). Terhambatnya prostaglandin menurut Kumar *et al.*, (2007) akan menyebabkan turunnya respon edema, nyeri, demam dan menurunnya interaksi penyebab demam seperti TNF- α . Oleh sebab itu, rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok terapi akan lebih rendah dibandingkan KP yang tidak mendapat terapi apapun.

Zat aktif lain yang ada pada kulit jengkol adalah tannin (Afiyah dan Medawati, 2007). Tannin memiliki senyawa yang bersifat astringen dan toksisitasnya mampu merusak membran sel bakteri. Astringen mampu menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau suatu substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tannin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tannin. Tannin diduga dapat mengerutkan dinding sel atau membrane sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Akibat terganggunya permeabilitas, sel mikroba tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau mati (Ajizah, 2004).

Alkaloid merupakan zat aktif lain yang terdapat pada kulit jengkol dan bersinergi dalam kesembuhan luka. Alkaloid berfungsi sebagai antibakteri, dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 2001).

Pada penelitian ini, didapat kesimpulan bahwa P2 (10%) merupakan satu-satunya konsentrasi yang memberikan efek terapi nyata sebagai penyembuh luka terhadap kelompok KP. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan penelitian penutupan luka diabetes oleh Malini dkk. (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak kulit jengkol 10% memiliki efek penutupan luka yang lebih optimal dibandingkan ekstrak 5% dan 15%. Hal tersebut bisa terjadi karena menurut Mukherjee (2015), beberapa ekstrak tumbuhan yang dijadikan bahan obat dengan konsentrasi terlalu rendah akan mengandung sedikit senyawa bioaktif, sehingga tidak bisa memberikan efek terapi optimal. Sebaliknya, jika konsentrasi ekstrak terlalu tinggi,

maka akan ada zat-zat lain yang akan bersifat toksik dan dapat menurunkan efek terapi yang diharapkan. Pada kondisi ini, P1 (5%) memiliki senyawa bioaktif rendah yang menyebabkan tidak adanya pengaruh antiinflamasi, sedangkan P3 (15%) memiliki konsentrasi terlalu tinggi yang menyebabkan toksisitas pada jaringan sehingga kelompok P3 dan P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok KP.

Hal ini bisa terjadi akibat beberapa faktor, seperti tingkat keasaman salep kulit jengkol. Kulit jengkol mengandung senyawa kimia alkaloid, steroid/triterpenoid, saponin, flavonoid, dan tannin serta zat asam yang disebut dengan asam jengkolat (Astuti, 2013). Adanya asam jengkolat menyebabkan salep kulit jengkol 15% bersifat lebih asam sehingga mempengaruhi aktivitas sitokin pro-inflamasi. Kadar pH yang terlalu asam menyebabkan kerusakan sel, jaringan atau organ sehingga kulit mengalami iritasi. Iritasi tersebut memicu aktivasi respon imun dan memicu aktifnya sel radang, dan meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α (Odom *et al.*, 2000). Selain itu menurut Rahayu (2016), ekstrak tumbuhan dengan konsentrasi pekat dapat menyebabkan pembentukan keropeng yang keras dan cukup tebal serta menempel pada permukaan luka sehingga menghambat distribusi zat aktif pada daerah luka dan dapat menghambat kesembuhan luka.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa efek terapi salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) pada luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

1. Pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) dapat memberi efek penurunan jumlah sel radang pada kesembuhan luka insisi tikus dengan konsentrasi salep 10% dan 15%.
2. Pemberian salep ekstrak kulit buah jengkol (*Archidendron pauciflorum*) dapat memberi efek penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kesembuhan luka insisi tikus dengan konsentrasi salep 10%.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penyimpanan sediaan salep ekstrak kulit buah jengkol di dalam lemari pendingin agar tidak rusak. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada jenis sediaan ideal untuk ekstrak kulit buah jengkol sehingga tidak menjadi hambatan saat fase penutupan luka seperti sediaan salep.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Litchman and S. Pillai. 2010. *Cellular and Molecular Immunology 6th*. W. B. Saunders, Company. Philadelphia
- Abdurrahmat, A. S. 2014. Luka, Peradangan dan Pemulihan. *Jurnal Entropi*. 9 (1) : 729-738
- Adiyati, P. N. 2011. *Ragam Jenis Ektoparasit pada Hewan Coba Tikus Putih (Rattus norvegicus) galur Sprague dawley* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor
- Afiyah, L. A dan A. Medawati. 2017. *Efektifitas Gel Ekstrak Kulit Buah Jengkol pada Proses Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi Marmut Jantan*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. *Bioscientiae*. 1 (1) : 31-38
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta
- Albuquerque-Junior, R. L. C., A. L. S. Baretto, J. A. Pires, F. P. Reis, S. O. Lima, M. A. G. Ribeiro and J. C. Cardoso. 2009. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. *International Journal of Morphology*. 27 (4) : 1105-1110
- Andini, A. R. 2012. *Pengaruh Pemberian Povidone Iodine 1% sebagai Oral Hygiene terhadap Jumlah Bakteri Orofaring pada Penderita dengan Ventilator Mekanik*. Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Anggraeni, C. A. 2008. *Pengaruh Bentuk Sediaan Krim, Gel, dan Salep terhadap Penetrasi Aminofilin sebagai Antiselulit Secara In Vitro Menggunakan Sel Difusi Franz* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Depok
- Ardinata, D. 2008. Eosinofil dan Patogenesis Asma. *Majalah Kedokteran Nusantara*. 41 (4) : 268-273
- Arimbi, A. Azmijah, R. Darsono, H. Plumeriastuti, T. V. Widiyanto dan D. Legowo. 2013. *Buku Ajar Patologi Umum Veteriner Edisi 2*. Airlangga University Press. Surabaya



- Aruan, S. Y. 2014. *Hubungan Ekspresi Tumor Necrosis Alpha (TNF- α) dengan Derajat Destruksi Tulang Akibat Kolesteatoma pada Penderita Otitis Media Supuratif Kronis Tipe Bahaya* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Medan
- Astanto, T. 2010. *Pengaruh Pemberian Echinacea terhadap Perbedaan Ekspresi Granzyme dan Perkembangan Massa Tumor pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H yang Mengalami Stress* [Tesis]. Universitas Diponegoro. Semarang
- Astuti, P. 2013. Uji Efektivitas Kulit Buah Jengkol (*Pithecolobium lobatum*) terhadap Kematian Siput Murbei (*Pomacea canaliculata*). *Ziraa 'ah*. 37 (2) : 40-45
- Baratawidjaya, K. G. dan Rengganis I. 2010. *Imunologi Dasar Edisi 9*. Fakultas Kedokteran UI. Jakarta
- Beanes, D. and S. Cockbill. 2003. The Healing Process. *Hospital Pharmacist*. 9 : 255-260
- Bonardo, B., H. Christina, C. Fransisca, K. Kristin, Caroline dan J. Sudiono. 2015. Peran Monosit (Makrofag) pada Proses Angiogenesis dan Fibrosis. *Seminar Nasional Cendekiawan*. 254-259
- Boyle, M. 2008. *Pemulihan Luka*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Budini, S. S., M. Cholis dan A. Rofiq. 2014. Kadar TNF- α Lesi Kulit dengan Derajat Keparahan Psoriasis Vulgaris. *Jurnal Kedokteran Hewan* : 3-7
- Campelo, M. B. D., J. A. F Santos, A. L. M. M. Filho, D. C. L Ferreira, L. B. Sant'Anna, R. A. Oliveira, L. F. Maia and E. A. L. Arisawa. 2018. Effects of the Application of the Amniotic Membrane in the Healing Process of Skin Wounds in Rats. *Acta Cir Bras*. 33 (2) : 144-155
- Chandrasoma, P and C. R. Taylor. 2005. *Ringkasan Patologi Anatomi Edisi 2*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Chea, G. and D. V. Goeddel. 2002. TNF-R1 Signaling: a Beautiful Pathway. *Science*. 296 (5573) : 1634-1635
- Danu, M. 2012. The Effect of Aloe Vera on Healing Process of Incision Wound. *Jurnal Plastik Rekonstruksi*. Jakarta
- Darmawati dan I. Sastra. 2013. Hubungan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka dengan Lama Penyembuhan Luka Perineum Ibu Nifas. *Idea Nursing Journal*. 2 (3) : 41-51

- Darwin. 2011. *Perbedaan Percepatan Penyembuhan Luka Bakar dari Ekstrak Kulit Jengkol (Pithecellobium lobatum Benth.) dalam Bentuk Sediaan Salep dan Gel Secara Praktinis pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar* [Skripsi]. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Diegelman, R. F. and M. C. Evans. 2004. Wound Healing: an Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Frontiers in Bioscience*. 9 : 283-389
- Dorland. 1998. *Kamus Saku Kedokteran Dorland Edisi 25*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Duerr, J. S. *Immunochemistry*. Departement of Biologica; Sciences Ohio University. USA
- Elysa. 2011. *Efek Ekstrak Etanol Biji Jengkol (Pithecellobium lobatum Benth.) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Aloksan* [Skripsi]. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Encyclopaedia Britannica. 2014. *Wound*. <<http://www.britannica.com/science/wound>> [Diakses tanggal 14 Januari 2018]
- Eslami, A., C. L. Gallant-Behm, D. A. Hart, C. Wiebe, D. Honardoust and H. Gardner. Expression of Integrin $\alpha\beta 6$ and TGF- β in Scarless vs Scar-forming Wound Healing. *Journal of Histochem Cytochem*. 57 : 543-573
- Garna, H. 2001. Patofisiologi Infeksi Bakteri pada Kulit. *Sari Pediatri*. 2 (4) : 205-209
- Guyton, A. C. and J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Hernani, N. 2009. *Aspek Pengeringan dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder pada Tanaman Obat*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Bogor
- Hutapea, J. R. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Edisi III*. Depkes RI. Jakarta
- Hutauruk, J. E. 2010. *Isolasi Senyawa Flavonoida dari Kulit Buah Tanaman Jengkol (Pithecellobium lobatum Benth.)* [Skripsi]. FMIPA USU.
- Irawati, L. 2014. Hubungan Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF-a) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3 (2) : 98-101

- Junqueira, L. C. 2005. *Basic Histology Text and Atlas*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Kalangi, S. J. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik*. 5 (3) : S12-S20
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat*. Academic Press. San Diego
- Kristensen, M., C. Q. Chu, Eedy, M. Feldmann, F. M. Brennan and S. M. Breathnach. 2008. Localization of Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Its Receptors in Normal and Psoriatic Skin: Epidermal Cells Express the 55-kD But Not the 75-kD TNF Receptors. *Clinical Explanation Immunology*. 94 : 354-362
- Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto, R. Mitchell and Robbins. 2010. *Basic Pathology 8th Edition*. Elsevier Saunders Inc. China
- Kumar, V., R. S. Cotran, dan S. L. Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi Edisi 7*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Kusriningrum, R. S. 2007. *Perancangan Pecobaan: Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi Cetakan Pertama*. Airlangga University Press. Surabaya
- Lawrence, W. T. 2002. *Wound Healing Biology and Its Application to Wound Management*. Lippincott Williams & Wilkins
- Li, J., J. Chen and R. Kirsner. 2007. Pathophysiology of Acute Wound Healing. *Clinics in Dermatology*. 25 : 8-9
- Macleod, A. S. and J. N. Mansbridge. 2014. The Innate Immune System In Acute and Chronic Wounds. *Advanced in Wound Care*. 5 (2) : 65-78
- Madihah, N. Ratningsih, D. M. Malini, A. H. Faiza dan J. Iskandar. 2017. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Kulit Buah Jengkol (Achindendron Pauciflorum) Terhadap Tikus Wistar Betina. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv Indonesia*. 3 (1) : 33-38
- Malini, D. M., Madihah dan F. Kamilawati. 2017. Uji Potensi Sediaan Salep Ekstrak Etanol Kulit Buah Jengkol Untuk Mempercepat Penutupan Luka Pada Kulit Mencit Model Diabet. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv Indonesia*. 3 (2) : 205-210
- Memon, M. A. A. Shah, A. Z. Khan, A. Sifeddein, Y. Xianjun, L. Qinhua, H. Y. Alhaag, A. K. Khan, M. Nazar, I. A. Shah and S. Tao. 2016. Careful Surgery, Management and Treatment of Feline (Cat) Breast Cancer. *Journal of Animal Research and Nutrition*. 1 (2) : 11
- Morison, J. M. 2004. *Manajemen Luka*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta

- Moriwaki, K. T., Shiroisi and H. Yonekawa. 1994. *Genetic in Wild Mice*. Biomedical Research Japan Scientific Societies Press. Tokyo
- Mukherjee, P. K. 2015. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. Elsevier. Amsterdam
- Mulyono, A., Ristiyanto, D. H. Farida dan H. N. Soesanti. 2014. Gambaran Histopatologi Ginjal Rattus norvegicus Infektif *Leptospira*. *Vektora*. 6 (2) : 68-72
- Naibaho, O. H., P. V. Y. Yamlean, W. Wiyono. 2013. Pengaruh Basis Salep terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*. 2 (2) : 27-33
- Navarro G. J. F. 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *Journal of American Society Nephrology*. 19 : 433-442
- Nijveldt, R. J., E. V. Nood, D. Hoorn, and P. G. Norren. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *American Journal of Clinical and Nutrition*. 74
- Nurussakinah. 2010. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Tanaman Jengkol (Pithecellobium jiringa (Jack.) Prain) terhadap Bakteri Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus dan Escherichia coli* [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan
- Odom, R. B., W. D. James and T. G. Berger. 2000. *Andrew's Disease of the Skin: Clinical Dermatology Ed 9*. Saunders Company. USA
- Pacheco, M. M. 2018. *Atlas of Plant and Animal Histology*. Department of Functional Biology and Health Sciences. Faculty of Biology University of Vigo. Spain
- Pandey, B. P. 2003. *A Textbook of Botany Angiosperms*. S. Chand & Company Ltd. New Dehli
- Patimah, S., Abun dan R. H. Supratman. 2015. *Pengaruh Penambahan Ekstrak Kulit Jengkol (Pithecellobium jiringa (Jack) Prain) dalam Ransum terhadap Jumlah Koloni Bakteri Escherichia coli dan Lactobacillus sp. Pada Usus Halus Ayam Broiler*. Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. Bandung
- Pavletic, M. M. 2010. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery 3rd Edition*. Willey-Blackwell Saunders

- Peterson, P. E. 2003. Continuous Improvement of Oral Health in the 21st Century. *The World Oral Health Report*. World Health Organization. Switzerland
- Rahayu, N. 2016. *Uji Aktivitas Gel Isolat Katekin Gambir (Uncaria Gambir Roxb.) terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih (Rattus Norveicus) Jantan Galur Sparague Dawley*. [Skripsi]. UIN Syarif Hidayatullah. Surabaya
- Ramdani, N. F., C. Mambo dan J. Wuisan. 2014. Uji Efek Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) terhadap Penyembuhan Luka Insisi pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Jurnal e-Biomedik UNSRAT*. 37 (8)
- Reddy, G. A. K., B. Priyanka and S. Saranya. 2012. Wound Healing Potential of Indian Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacy Review & Research*. 2 : 75-78
- Riansyah, Y., L. Mulqie dan R. Choesrina. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas (L.) Lamk*) terhadap Tikus Wistar Jantan. *Prosiding Penelitian Spesia Unisba*. Bandung
- Riyadi, H. 2014. *Perbedaan Pengaruh Dexamethason dan Ketorolac terhadap Kadar Neutrofil pada Pasien Pasca Insisi* [Tesis]. Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Robbins, S. L., R. S. Cotran and V. Kumar. 2010. *Intisari Patologi*. Binarupa Aksara Publisher. Tangerang
- Robinson, T. 2001. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Institut Teknik Bandung. Bandung
- Rupina, W., H. F. Trianto dan I. Fitrianingrum. Efek Salep Ekstrak Etanol 70% Daun Karamunting terhadap Re-epitalisasi Luka Insisi Kulit Tikus Wistar. *E-Jurnal Kedokteran Indonesia*. 4 (1) : 26-30
- Sabirosi, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III*. FKG Unair. 81-87
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Darah*. Widia Medika. Jakarta
- Schultz, G. S. 2007. *Surgical Wound Healing and Management*. Informa Healthcare. Switzerland
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier. USA
- Sjamsuhidajat, R. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah Edisi 2*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta

- Strbo, N., N. Yin, O. Stojadinovic. 2013. Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Advanced in Wound Care*. 3 (7) : 492-501
- Subowo. 2009. *Histologi Umum*. CV Sagung Seto. Jakarta
- Suckow, M.A., S. H. Weisbroth and C. L. Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. London
- Supit, I. A., D. H. C. Pagemanan dan S. R. Marunduh. 2015. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF-a) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik*. 3 (2) : 640-643
- Suryadi, I. A., A. A. G. N. Asmarajaya dan S. Maliawan. 2016. *Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka*. Bagian/ SMF Ilmu Penyakit Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Bali
- Syafnir, L., Y. Krishnamurti dan M. Ilma. 2014. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Kulit Jengkol (*Archidendron pauciflorum* (Benth.) I. C. Nielsen). *Prosiding Sains, Teknologi dan Kesehatan*. Universitas Islam Bandung. Bandung
- Tahani, N. A. 2013. Laporan Teknik Instrumentasi Laboratorium Biosistem (Hewan Coba). *Laporan Instrumentasi Laboratorium*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Talley, D., J. D. Bancroft and A. Stevens. 2011. *Theory and Practice of Histological Techniques: Fixation and Fixatives 3rd Edition*. Churchill Livingstone. Edinburgh
- Taylor, C. 1997. *Fundamental of Nursing the Art and Science of Nursing Care 4th Edition*. JP Lippincof. Philadelphia
- The Histology Guide. 2015. *White Blood Cell*. http://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_wbc.php [Diakses tanggal 21 Januari 2018]
- Thong, H., Y. Zhai and H. I. Maibach. 2007. Percutaneous Penetration Enhancers: an Overview. *Skin Pharmacol Physiol*. 20 : 272-282
- Tranggono, R. I. dan F. Latifah. 2007. *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Penerbit Pustaka Utama. Jakarta
- Underwood, J. C. E. 2000. *Patologi Umum dan Sistemik Vol 2 2nd Edition*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Upton D. and K. Solowiej. 2010. Pain and Stress as Contributors to Delayed Wound Healing. *Wound Practice and Research*. 18 (3) : 114-122

- Werner, S. and R. Grose. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *American Physiological Society Press*. 83 (3)
- Widianto, B. Rahardjo, R. P. Soetji dan R. Susilawati. Pengaruh Chlorhexidine 0,2% dan Povidone Iodine 10% pada Luka Terbuka terhadap Sel Radang, Proliferasi Sel, dan Sel Apoptosis. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 6 (2) : 89-98
- Wijaya, Y. A., S. J. R. Kalangi dan M. M. Kaseke. 2015. Gambaran Reaksi Radang Luka Postmortem pada Hewan Coba. *Jurnal e-Biomedik*. 3 (1) : 539-543
- Winaktu, G. J. 2011. Peran Zinc pada Respons Imun. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 7 (44) : 24-34
- Yanhendri dan S. W. Yenny. 2012. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. *Cermin Dunia Kedokteran*. 194 39 (6) : 423-430

