

**PENGARUH EKSTRAK ETHANOL KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*) TERHADAP JUMLAH MAKROFAG PADA PENYEMBUHAN
ULKUS TRAUMATIK TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI PANAS**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi**



Oleh:

Dyan Novita Wardhani

NIM : 145070401111029

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Lembar Judul.....	i
Lembar Persetujuan.....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
<i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.3.1 Tujuan umum.....	3
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Delima (<i>Punica granatum L.</i>)	6
2.1.1 Morfologi.....	6
2.1.2 Taksonomi.....	7
2.1.3 Kandungan Kulit Buah Delima	8
2.1.3.1 Tanin	8
2.1.3.2 Flavonoid	9
2.1.4 Manfaat	9
2.1.5 Peran Kulit Buah Delima dalam Penyembuhan Luka	10
2.2 Ulkus Traumatik	11
2.2.1 Definisi.....	11
2.2.2 Insidensi	11
2.2.1 Klasifikasi	11
2.3 Penyembuhan Luka	13
2.3.1 Definisi.....	13
2.3.2 Fase Penyembuhan Luka	14
2.4 Makrofag.....	16
2.4.1 Fungsi.....	17
2.4.2 Peran dalam Penyembuhan Luka	18
2.5 Tikus Putih Galur Wistar	18
2.6 Sediaan Gel.....	19
2.7 Ekstraksi.....	20
2.8 Ethanol	21
2.9 <i>Triamcinolone Acetonide</i> 0,1%	22



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep.....	24
3.2 Keterangan Kerangka Konsep.....	25
3.3 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan dan Desain Penelitian	27
4.2 Sampel Penelitian	28
4.2.1 Jumlah Sampel Penelitian	29
4.2.2 Kriteria Sampel Penelitian.....	29
4.3 Variabel Penelitian	30
4.3.1 Variabel Bebas.....	30
4.3.2 Variabel Terikat	30
4.3.3 Variabel Kontrol.....	30
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	31
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian	31
4.5.1 Perawatan dan Pembuatan Makanan Hewan Coba.....	31
4.5.2 Bahan dan Alat untuk Membuat Ulserasi.....	31
4.5.3 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima ..31	
4.5.4 Bahan dan Alat Pembuatan Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima.....	32
4.5.5 Bahan dan Alat Perlakuan.....	32
4.5.6 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat	32
4.6 Definisi Operasional	32
4.6.1 Ekstrak Kulit Buah Delima	32
4.6.2 Ulkus Traumatik	33
4.6.3 Jumlah Makrofag.....	33
4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data	34
4.7.1 <i>Ethical Clearance</i>	34
4.7.2 Alur Penelitian.....	34
4.7.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L.</i>).....	34
4.7.4 Pembuatan Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L.</i>)	35
4.7.5 Pembuatan Ulkus Traumatik	37
4.7.6 Pengaplikasian Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L.</i>)	37
4.7.7 Pembedahan Hewan Coba.....	37
4.7.8 Sanitasi Hewan Coba	38
4.7.9 Pembuatan Preparat.....	38
4.7.10 Penghitungan Jumlah Makrofag.....	39
4.7.11 Kerangka Operasional Penelitian	40
4.8 Analisa Data	41
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	
5.1 Hasil Penelitian.....	42
5.2 Analisa Data	45
5.2.1 Uji Normalitas Data	45
5.2.2 Uji Homogenitas Ragam	46
5.2.3 Uji <i>One Way Anova</i>	46
5.2.4 Uji <i>Post hoc Tukey</i>	47

BAB VI PEMBAHASAN50

BAB VII PENUTUP

 7.1 Kesimpulan.....55

 7.2 Saran.....55

DAFTAR PUSTAKA.....57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Punica granatum L.*..... 6

Gambar 2.2 Thermal Burn pada Palatum Durum 12

Gambar 2.3 Ulkus Traumatik pada Sisi Lateral Posterior Lidah
karena Gigi Impaksi Molar Tiga..... 12

Gambar 2.4 UlkusTraumatik karena Aspirin 13

Gambar 2.5 Sel Makrofag dengan Potongan Melintang. Pengecatan
Hematoxylin Eosin. Pengambilan Gambar dengan
Pembesaran 400x..... 17

Gambar 2.6 Tikus Jantan *Rattus norvegicus* galur Wistar..... 19

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 24

Gambar 4.1 Kerangka Desain Penelitian 27

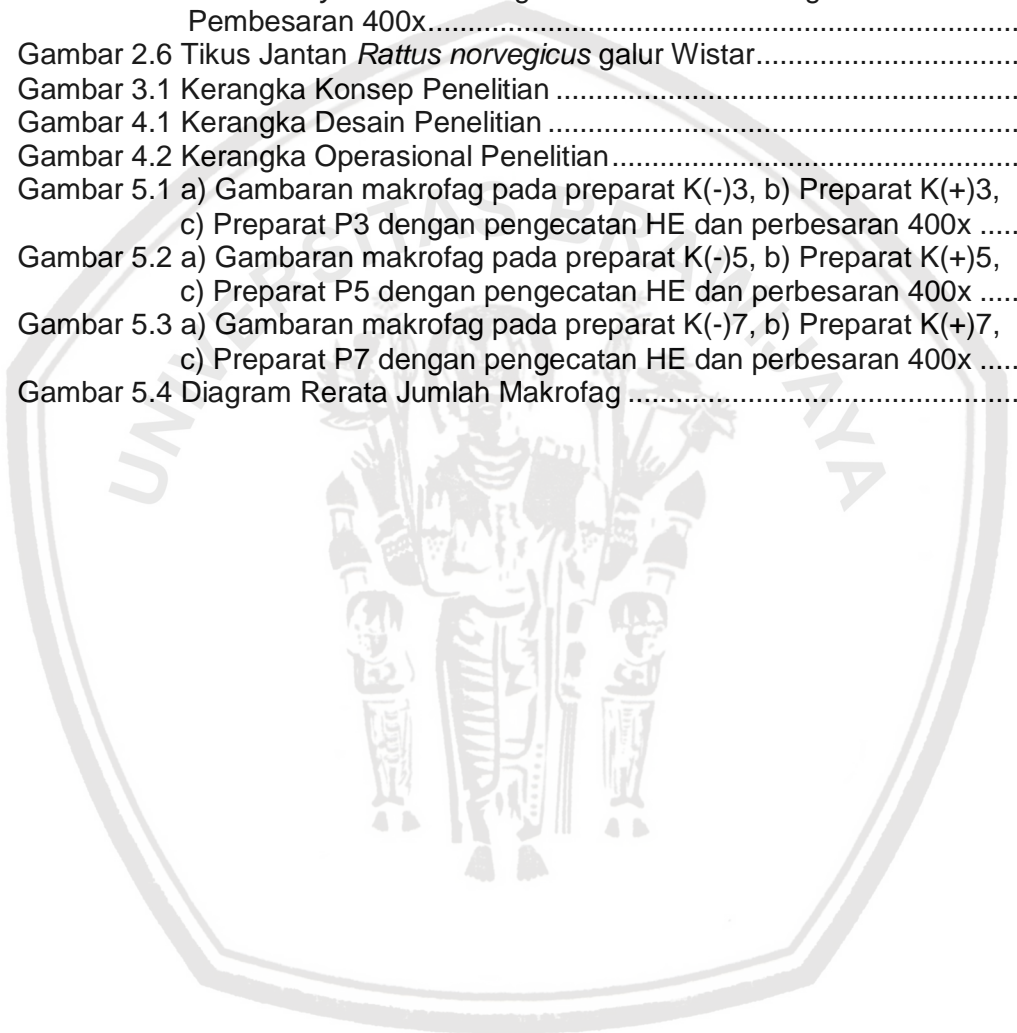
Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian..... 40

Gambar 5.1 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)3, b) Preparat K(+3,
c) Preparat P3 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x 43

Gambar 5.2 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)5, b) Preparat K(+5,
c) Preparat P5 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x 43

Gambar 5.3 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)7, b) Preparat K(+7,
c) Preparat P7 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x 44

Gambar 5.4 Diagram Rerata Jumlah Makrofag 44



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Tanin pada Kulit Buah Delima 8
 Tabel 2.2 Kandungan Flavonoid pada Kulit Buah Delima 9
 Tabel 2.3 Sifat Fitokimia Beberapa Pelarut..... 22
 Tabel 4.1 Formula Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima 36
 Tabel 5.1 Rerata Jumlah Makrofag Tikus Wistar Pemeriksaan Mikroskop
 Pembesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang 42
 Tabel 5.2 Uji Normalitas Makrofag 45
 Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam Makrofag 46
 Tabel 5.4 Uji *One Way Anova* 47
 Tabel 5.5 Uji *Post Hoc Tukey* 48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan.....	64
Lampiran 2 Hasil Uji Statistik.....	65
Lampiran 3 Foto Bahan dan Alat Penelitian.....	71
Lampiran 4 <i>Ethical Clearance</i>	73
Lampiran 5 Determinasi Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L.</i>).....	75
Lampiran 6 Surat Keterangan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L.</i>).....	76



DAFTAR SINGKATAN

APC	: Agen Presenting Cell
COX	: Cyclooxygenase
EGF	: Epidermal Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
HE	: Haematoxylin-eosin
HPA	: Histopatologis
IFN- γ	: Interferon- γ
IGF-1	: Insuline-like-Growth Factor
IL-1	: Interleukin-1
IL-6	: Interleukin-6
LOX	: Lipooxygenase
MIF	: Migration Inhibitory Factor
NO	: Nitric Oxide
NF- κ B	: Nuclear Factor-kappaB
OIYVIA	: Olympus Viewer for Imaging Applications
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PF-4	: Platelet Factor-4
PGE2	: Prostaglandin E2
PMN	: Polimononuclear
ROS	: Reactive Oxygen Spesies
TGF- α	: Tumor Necrosis Factor α
TGF- β	: Transforming Growth Factor- β
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

ABSTRAK

Wardhani, Dyan Novita. 2018. **Pengaruh Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) Terhadap Jumlah Makrofag Pada Penyembuhan Ulkus Traumatik Tikus Wistar yang Diinduksi Panas.** Skripsi, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM (2) drg. Prasetyo Adi, MS.

Ulkus traumatik merupakan lesi yang disebabkan karena traumatik, suhu, elektrik, dan kimia. *Triamcinolone acetonide* 0,1% merupakan salah satu obat ulkus golongan kortikosteroid yang dapat menyebabkan *Oral candidiasis*. Ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) mengandung tanin dan flavonoid yang berfungsi mempercepat aktivasi makrofag sehingga dapat mempercepat penyembuhan ulkus traumatik. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental menggunakan *Post Test Only Randomized Control Group Design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas. Sampel menggunakan teknik *Simple Random Sampling* kemudian dibagi menjadi 9 kelompok yaitu kelompok tanpa perlakuan (K(-)), kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1% (K(+)) dan kelompok yang diaplikasikan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) (P) dalam 3 *times series*. Variabel yang diteliti adalah jumlah makrofag pada jaringan ulkus traumatik mukosa labial tikus dari sediaan HPA dengan pengecatan HE. Analisis data menggunakan *one way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap jumlah makrofag pada setiap kelompok. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.

Kata Kunci : Ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*), makrofag, penyembuhan ulkus traumatik

ABSTRACT

Wardhani, Dyan Novita. 2018. **The Effect of Ethanol Extract Pomegranate Fruit Peel (*Punica granatum L.*) to The Number of Macrophages in Traumatic Ulcer Healing of Wistar Rat with Thermal Induction.** Essay, Dentistry Faculty of Brawijaya University. Supervisor: (1) drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM (2) drg. Prasetyo Adi, MS.

Traumatic ulcer is a lesion caused by traumatic, temperature, electrical, and chemical. Triamcinolone acetonide 0,1% is one of the group of corticosteroid for ulcer treatment that can cause *Oral candidiasis*. The Ethanol extract pomegranate fruit peel (*Punica granatum L.*) contains tannin and flavonoid which acts as improving activation for accelarate the traumatic ulcer healing. The type of this study is experimental research and using Post Test Only Randomized Control Group Design in order to understanding the effect of ethanol extract pomegranate fruit peel (*Punica granatum L.*) to the number of macrophages in traumatic ulcer healing of wistar rat with thermal induction. The sampling technique is using Simple Random Sampling technique and the samples devided into 9 groups that are non treatment groups (K(-)), applied Triamcinolone acetonide 0,1% groups (K(+)), and applied ethanol extract pomegranate fruit peel (*Punica granatum L.*) groups (P) in 3 times series. Variable studied was the number macrophages in traumatic ulcer tissue in labial mucosa of rat from HPA preparation and HE coloration. Analyzing *one way ANOVA* showed that there were significant differences ($p < 0,05$) to the number of macrophages in each group. Conclusion of this study was that ethanol extract pomegranate fruit peel (*Punica granatum L.*) takes effect to the number of macrophages in traumatic ulcer healing of wistar rat with thermal induction.

Keywords : Ethanol Extract Pomegranate Fruit Peel (*Punica granatum L.*), macrophages, traumatic ulcer healing

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ulkus traumatik adalah lesi ulseratif yang disebabkan oleh trauma mekanik, suhu, elektrik, maupun kimia, lokasi ulkus biasanya terdapat pada mukosa bibir, mukosa pipi, palatum dan tepi perifer dari lidah. Prevalensi ulkus traumatikus pada mukosa rongga mulut cukup tinggi yaitu sekitar 83,6% (DeLong, 2008). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cebecci di Turki, prevalensi ulkus traumatik sebesar 30,47% (Cebecci, 2009). Ulkus memiliki ukuran yang bervariasi tergantung dari trauma yang mengenai mukosa, dengan gambaran klinis dasar lesi berwarna kekuningan dan tepi ulkus merah. Ulkus dapat sembuh dalam beberapa hari sampai 2 minggu setelah penyebabnya dihilangkan dan diberikan pengobatan yang bertujuan untuk mempercepat proses penyembuhan (Neville, 2002; Birnbaum et al., 2009).

Penyembuhan luka adalah proses transisi yang merupakan salah satu proses paling kompleks dalam fisiologi manusia yang melibatkan serangkaian reaksi dan interaksi kompleks antara sel dan mediator (Prasetyono, 2009). Pada umumnya, penyembuhan luka dibagi dalam 3 fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling. Fase inflamasi dimulai segera setelah terjadinya trauma dan tujuan utama fase ini yaitu hemostasis, hilangnya jaringan yang mati dan pencegahan kolonisasi maupun infeksi oleh agen mikrobial patogen (Gurtner, 2007).

Salah satu sel radang dalam fase inflamasi yang mempunyai peranan penting dalam proses penyembuhan luka adalah makrofag. Makrofag memiliki peran fagositosis, yang bertujuan untuk mengeliminasi partikel ekstraseluler, sel yang rusak atau mati, dan bakteri patogen (Haas, 2007; Liu, 2006). Selain itu, makrofag juga mempunyai peranan untuk menghasilkan produk *growth factors*, beberapa contohnya yaitu *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang digunakan untuk merangsang pembentukan kolagen dan elastin oleh fibroblas dan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru (Christina dkk, 2015).

Obat yang paling sering digunakan untuk penyembuhan ulkus traumatik adalah golongan kortikosteroid dengan sediaan topikal yaitu *Triamcinolone acetone* 0,1% (Halim dkk., 2013; Deshmukh, 2014). Namun penggunaan obat tersebut dapat menyebabkan *candidiasis oral* (Scully, 2003). Indonesia merupakan negara yang memiliki berbagai jenis flora yang dapat dijadikan alternatif tanaman obat, salah-satunya adalah tanaman Delima.

Kulit buah delima (*Punica granatum L.*) diketahui mempunyai kadar polifenol yang lebih tinggi dibanding jus buahnya, seperti Ellagic acid, Gallic Acid, Antosianin, Ellagic tannin (Fawole, 2012). Kulit buah delima mengandung senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, asam fenolat, yang terdiri dari gallotanin, ellegatanin, punicalagin, punicalin, asam galat, asam ellagic, katekin, kuercetin, flavonol, flavon, dan antocianidin (Madrigal *et al.*, 2009).

Tanin berupa ellagitanin dan Flavonoid berupa flavol dan flavonol memiliki kemampuan imunomodulator yang dapat mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan *Growth Factors* yang digunakan untuk

merangsang pembentukan kolagen dan elastin oleh fibroblas dan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru sehingga akan mempercepat fase proliferasi dan penyembuhan luka (Christina dkk, 2015; Widyastomo, 2013; Hertiani dkk, 2018). Kandungan Flavonoid pada kulit buah delima juga dapat berpotensi merangsang sel-sel fagosit yaitu makrofag untuk melakukan respon fagositosis (Hayyu N dkk, 2013; Kusmardi dkk, 2007).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin mengetahui pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah “Apakah ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada proses penyembuhan ulkus traumatik tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membandingkan jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang diinduksi panas pada kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1 %,

kelompok yang diaplikasikan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) pada hari ke-3.

2. Membandingkan jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang diinduksi panas pada kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1 %, kelompok yang diaplikasikan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) pada hari ke-5.
3. Membandingkan jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang diinduksi panas pada kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1 %, kelompok yang diaplikasikan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) pada hari ke-7.
4. Menganalisa perbedaan jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang diinduksi panas pada kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1 %, kelompok yang diaplikasikan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini dapat menambah pengetahuan tentang pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang diinduksi panas.

1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) sebagai obat alternatif pada penyembuhan ulkus traumatik.
- b. Menambah ilmu pengetahuan dan wawasan tentang pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik serta digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Delima (*Punica granatum L.*)

Tanaman delima (*Punica granatum L.*) merupakan tanaman semak atau perdu meranggas. Tanaman ini ditanam secara luas di Iran, India, Turkey, Egypt, Tunisia, Spain dan Morocco. Tanaman ini sangat cocok untuk ditanam di tanah yang gembur dan tidak terendam oleh air, serta air tanahnya tidak dalam. tumbuhan delima (*Punica granatum L.*) dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 30 kaki (Zarfeshany, 2014).

2.1.1 Morfologi



Gambar 2.1 Punica granatum L.

Pohon delima berupa perdu dengan tinggi 2-5 meter. Batang berkayu, percabangan banyak, berduri pada ketiak daun, coklat ketika masih muda, dan hijau kotor setelah tua, ranting bersegi. Daun tunggal, letaknya berkelompok, helaian daun bentuknya lonjong sampai lanset, pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan mengkilap, panjang 1-9 cm, lebar 0,5-2,5 cm, warnanya hijau. Bunga tunggal bertangkai pendek, biasanya terdapat satu sampai lima bunga berwarna merah, putih atau ungu dan berbunga sepanjang tahun.

Buah delima berbentuk bulat dengan diameter 5-12 cm. Bijinya banyak, kecil-kecil, bentuknya bulat panjang yang bersegi-segi agak pipih, keras, tersusun tidak beraturan, berwarna merah, merah jambu, atau putih. Dikenal tiga macam buah delima, yaitu delima putih, delima merah, dan delima ungu. (Faralia, 2012). Delima putih merupakan salah satu jenis buah delima yang digunakan sebagai obat resmi pada kurang lebih 23 negara dan banyak ditanam pada pekarangan rumah atau di daerah permukiman. Delima putih memiliki kandungan polifenol yang tinggi sehingga delima putih sering dimanfaatkan sebagai obat (Sabrina dkk, 2015).

2.1.2 Taksonomi

Menurut taksonomi, buah delima dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Rosidae

Ordo : Myrtales

Famili : Punicaceae

Genus : Punica

Spesies : *Punica granatum L.*

2.1.3 Kandungan Kulit Buah Delima

2.1.3.1 Tanin

Ellagitannin dan gallotannin merupakan senyawa yang paling umum yang terdapat di berbagai bagian tanaman delima. Pada kulit buah delima didapatkan kandungan ellagitannin sebagai contoh punicalin dan punicalagin adalah konstitusi utama pada kulit buah delima (Wang, 2010; Sabrina dkk, 2015). Kandungan dalam kulit buah delima berupa ellagitannin mempunyai fungsi sebagai immunomodulator, yaitu mengaktifkan sel makrofag yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Hertiani dkk, 2018).

Tabel 2.1 Kandungan Tanin pada Kulit Buah Delima (Wang, 2010)

Nama Kandungan	Bioaktivitas	Referensi
Ellagic acid	Anti-neoplastic, pemutih kulit	Amakura et al. 2000 : Wang et al. 2004
Gallic Acid	Anti-inflamasi, anti-mutagenic, antioksidan, antiviral	Huang et al. 2005
Methyl Gallate	Anti-inflamasi, anti-mutagenic, antioksidan, antiviral	Kasimu et al. 2009
Granatin B	Anti-inflamasi	Liu et al. 2007
3-O-methylellagic acid	Anti-inflamasi	El Toumy et al. 2003
Punicalagin	Antioksidan	Liu et al. 2007
Punicalin	Antioksidan	Liu et al. 2007

2.1.3.2 Flavonoid

Flavonoid yang terdapat pada tanaman delima berupa Flavon, Flavonol, anthocyanidins dan flavan-3-ols. Flavonol dan Flavol merupakan flavonoid utama yang dapat ditemukan pada kulit buah delima (Wang, 2010). Menurut Parlinaningrum dkk (2014) dan Haeria dkk (2017), kandungan flavonoid berupa flavon dan flavonol mempunyai fungsi sebagai respon imun yaitu mengaktifasi makrofag sehingga dapat memberikan rangsangan makrofag untuk respon fagositosis.

Tabel 2.2 Kandungan Flavonoid pada Kulit Buah Delima (Wang, 2010)

Nama Kandungan	Bioaktivitas	Referensi
Catechin	Anti-neoplastik, antioksidan	De Pascual- Teresa et al. 2000
Cyanidin	Antioksidan	Noda et al. 2002
Epicatechin	Anti-neoplastik	De Pascual- Teresa et al. 2000
Kaempferol	Antioksidan, anti-inflamasi	Van Elswijk et al. 2004
Kaempferol-3-O-glucoside	Antioksidan	Van Elswijk et al. 2004
Luteolin	Antioksidan, anti-inflamasi	Van Elswijk et al. 2004

2.1.4 Manfaat

Banyak penelitian mengenai antioksidan, antikarsinogenik, dan sifat antiinflamasi unsur delima telah dipublikasikan yang difokuskan pada pengobatan dan pencegahan kanker, penyakit jantung, diabetes, kondisi gigi, disfungsi ereksi, infeksi bakteri, resistensi antibiotik, dan kerusakan kulit karena radiasi ultraviolet. Aplikasi potensial lainnya, termasuk iskemia otak pada bayi, penyakit Alzheimer, infertilitas pria, arthritis, dan obesitas (Jurenka, 2008).

2.1.5 Peran Kulit Buah Delima dalam Penyembuhan Luka

Kulit buah delima (*Punica granatum L.*) diketahui mempunyai kadar polifenol yang lebih tinggi dibanding jus buahnya, seperti Ellagic acid, Gallic Acid, Antosianin, Ellagic tannin (Fawole, 2012). Kulit delima mengandung senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, asam fenolat, yang terdiri dari gallotanin, ellagitanin, punicalagin, punicalin, asam galat, asam ellagic, katekin, kuercetin, flavonol, flavon, dan antocianidin (Madrigal *et al.*, 2009).

Tanin berupa ellagitanin dan Flavonoid berupa flavol dan flavonol memiliki kemampuan imunomodulator untuk merangsang proliferasi limfosit sehingga menyebabkan sel T Helper 1 (Th1) teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Specific Makrofag Activating Factor*) yang dapat mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan *Growth Factors* seperti *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang digunakan untuk merangsang pembentukan kolagen dan elastin oleh fibroblas dan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru sehingga akan mempercepat fase proliferasi dan penyembuhan luka (Christina dkk, 2015; Widyastomo, 2013; Haeria dkk, 2017; Hertiani dkk, 2018). Kandungan flavonoid dalam kulit buah delima juga berfungsi merangsang sel-sel fagosit yaitu makrofag untuk melakukan respon fagositosis (Hayyu N dkk, 2013; Kusmardi dkk, 2007).

2.2 Ulkus Traumatik

2.2.1 Definisi

Ulkus Traumatik merupakan lesi ulseratif yang disebabkan oleh adanya trauma suhu, mekanik, elektrik, maupun kimia, lokasinya biasanya pada mukosa bibir, mukosa pipi, palatum dan tepi perifer dari lidah (Neville, 2002).

2.2.2 Insidensi

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Castellanos, dkk. pada tahun 2003 di Meksiko terhadap 1000 orang menunjukkan prevalensi ulkus traumatik sebesar 40,24%. Sedangkan Turki memiliki prevalensi ulkus traumatik mencapai 30,47% pada tahun 2005 (Castellanos *et al.*, 2008; Cebeci *et al.*, 2009).

Ulkus traumatikus dapat terjadi pada mukosa rongga mulut, antara lain: pada lidah, bibir, lipatan mukosa bukal (*buccal fold*), gingiva, palatum, mukosa labial dan dasar mulut. Ulkus traumatikus sering terjadi pada mukosa labial dan dasar mulut. Selain itu juga terjadi pada bibir, lidah, dan mukosa bukal karena terletak berdekatan dengan daerah kontak oklusi geligi sehingga lebih mudah mengalami gigitan pada waktu gerakan pengunyahan (Delong, 2008).

2.2.3 Klasifikasi

Ulkus traumatik berdasarkan etiologinya diklasifikasikan menjadi 4, yaitu :

1. Trauma Thermal

Trauma thermal berasal dari mengkonsumsi makanan atau minuman yang panas. Luka yang berhubungan dengan *thermal food burns* biasanya tampak pada mukosa bukal posterior atau palatum (Neville, 2002). Pada kasus yang jarang, trauma berasal dari aplikasi instrumentasi yang panas, es kering (Ghom, AG *et al.*, 2014).



Gambar 2.2 Thermal Burn pada Palatum Durum (Ongole et al., 2013)

2. Trauma Mekanis

Trauma mekanis disebabkan oleh pipi, bibir dan lidah tergigit, gigi atau malposisi atau akar yang tajam, luka sikat gigi, tepi protesa atau restorasi yang tajam, gigi palsu yang tidak pas, piranti ortodonti (Ghom, AG *et al.*, 2014). Ulkus bersifat sakit, dikelilingi oleh eritema, dasarnya ditutupi oleh *exudates fibrous* dan pada *stage* berikutnya oleh jaringan granulasi dan *regenerating epithelium* (Neville, 2002).



Gambar 2.3 Ulser Traumatik pada Sisi Lateral Posterior Lidah karena Gigi Impaksi Molar Tiga (Ariawardana, 2014)

3. Trauma Elektrik

Trauma elektrik disebabkan oleh peralatan elektrik yang digigit dengan mulut. Lokasi paling sering pada mukosa bibir dan sudut mulut (Neville *et al.*,

2015). Biasanya ulkus parah, melibatkan kerusakan jaringan yang luas sehingga membutuhkan rekonstruksi dari ahli bedah plastik (Myers S *et al.*, 2014).

4. Trauma Kimiawi

Trauma kimiawi disebabkan oleh pemakaian beberapa jenis obat, salah satunya Aspirin. Aspirin yang mengandung asam asetilsalisilik yang dapat menyebabkan rasa terbakar jika ditempatkan pada area sekitar gigi yang sakit. Pasien juga biasanya menggunakan hipoklorit (pemutih) untuk membersihkan dan mendesinfeksi gigi palsu lengkap (Myers S *et al.*, 2014). Selain itu, trauma juga dapat disebabkan hidrogen peroksida, pasta gigi (Cohen, 2012)



Gambar 2.4 Ulser Traumatik karena Aspirin (Neville, 2002)

2.3 Penyembuhan Luka

2.3.1 Definisi

Penyembuhan luka merupakan proses transisi yang merupakan salah satu proses paling kompleks dalam fisiologi manusia yang melibatkan serangkaian reaksi dan interaksi kompleks antara sel dan mediator (Prasetyono, 2009). Pada umumnya, penyembuhan luka dibagi dalam 3 fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling.

2.3.2 Fase Penyembuhan Luka

1. Fase Inflamasi

Fase inflamasi dimulai segera setelah cedera sampai hari ke-5 pasca cedera. Tujuan utama fase ini adalah hemostasis, hilangnya jaringan yang mati dan pencegahan kolonisasi maupun infeksi oleh agen mikrobial patogen (Gurtner, 2007) Pada fase inflamasi terjadi vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler sehingga terjadi erithema, oedema, dan suhu yang meningkat pada daerah yang terluka. Perubahan permeabilitas vaskular ini memungkinkan masuknya makrofag, neutrofil, mast cells dan antibodi. Pembuluh darah yang cedera mengakibatkan termobilisasinya berbagai elemen darah ke lokasi luka. Agregasi platelet akan membentuk plak pada pembuluh darah yang cedera. Selama proses ini berlangsung, platelet akan mengalami degranulasi dan melepaskan beberapa *growth factor*. Hasil akhir kaskade koagulasi jalur intrinsik dan ekstrinsik adalah konversi fibrinogen menjadi fibrin (Gurtner, 2007).

Neutrofil merupakan *responder* pertama pada distress selular dan sinyal kemotaktik oleh sitokin yang menuju ke *fibrin clot*. Selain itu, daerah di sekitar pembuluh darah akan tervasodilatasi dan peningkatan jumlah neutrofil di daerah luka oleh *Interleukin* (IL-1), *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α), *Platelet Factor* (PF-4), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan produk-produk bakteri. PMN leukosit tersebut akan melakukan fungsi yaitu mengeliminasi bakteri dan debris selular (Prasetyono, 2009).

Makrofag bermigrasi ke dalam luka dalam 48-86 jam dan mencapai puncak pada hari ke 3 setelah cedera dan menjadi jenis sel dominan. Di awal tahap penyembuhan luka, makrofag memfagositosis sisa debris, bakteri, dan sel apoptosis, termasuk neutrofil (Guo & DiPietro, 2010). Makrofag mengeluarkan

sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), *interleukin-1* (IL-1), dan *interleukin-6* (IL-6), makrofag juga melepas faktor pertumbuhan seperti VEGF, FGF, PDGF, TGF- β , dan EGF (Perdanakusuma, 2007). Limfosit muncul didalam luka setelah 72 jam dan mencapai puncak pada hari ke 7. Limfosit memiliki peran penting dalam regulasi penyembuhan luka, dengan cara memproduksi matriks ekstraseluler (Young & McNaught, 2011). Limfosit T memasuki area luka dan puncaknya selama akhir fase proliferasi atau awal fase remodeling (Guo & Dipietro, 2010).

2. Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung mulai hari ke-4 hingga hari ke-21 pasca cedera. Pada fase ini matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara gradual digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskular (Gurtner, 2007)

Regresi jaringan desmosom antar keratinosit mengakibatkan terlepasnya keratinosit untuk bermigrasi ke daerah luka. Keratinosit juga bermigrasi secara aktif karena terbentuknya filamen aktin di dalam sitoplasma keratinosit. Keratinosit bermigrasi akibat interaksinya dengan protein sekretori seperti fibronektin, vitronektin dan kolagen tipe I melalui perantara integrin spesifik di antara matriks temporer. Matriks temporer ini akan digantikan secara bertahap oleh jaringan granulasi yang kaya akan fibroblas, makrofag dan sel endotel. Sel tersebut akan membentuk matriks ekstraseluler dan pembuluh darah baru. Jaringan granulasi umumnya mulai dibentuk pada hari ke-4 setelah cedera (Lorenz, Longaker, 2006).

Makrofag menghasilkan hormon pertumbuhan yang akan menginduksi fibroblast untuk berproliferasi, migrasi dan membentuk matriks ekstraseluler. Matriks temporer ini secara bertahap akan digantikan oleh kolagen tipe III. Sel endotel akan membentuk pembuluh darah baru dengan bantuan protein sekretori VEGF, FGF dan TSP-1. (Gurtner, 2007).

3. Fase Remodelling

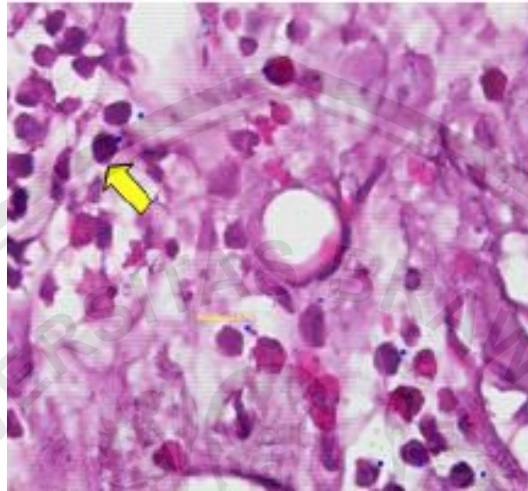
Fase terakhir merupakan fase Remodelling. Fase ini dapat berlangsung berbulan-bulan dan dinyatakan berakhir bila semua tanda radang sudah lenyap, yaitu berlangsung mulai hari ke-21 hingga sekitar 1 tahun. Proses ini diawali dengan migrasi keratinosit dari basal membran ke permukaan. Proses migrasi ini juga melepaskan kolagenase yang berfungsi men-disosiasi sel dari dermal matrix ke provisional matrix. Keratinosit juga mensintesis dan mensekresi MMP-1, MMP-2, dan MMP-9 (Gurtner, 2007).

Metaloproteinase matriks yang disekresi oleh makrofag, fibroblas dan sel endotel akan mendegradasi kolagen tipe III dan akan digantikan oleh kolagen tipe I selama berbulan-bulan oleh karena proses degradasi kolagen tipe III yang lambat. Hasil akhir yang didapatkan berupa adanya keseimbangan degradasi dan deposisi dari kolagen (Prasetyono, 2009). Kekuatan jaringan parut bekas luka akan semakin meningkat akibat berubahnya tipe kolagen dan terjadinya *crosslinking* jaringan kolagen. Pada akhir fase *remodeling*, jaringan baru hanya akan mencapai 70% kekuatan jaringan awal (Gurtner, 2007).

2.4 Makrofag

Makrofag merupakan sel yang tersebar luas di berbagai jaringan, merupakan fagosit, antigen processing dan antigen presenting cells (APC) serta merupakan sel yang menghasilkan berbagai macam mediator (Widjajanto, 2005).

Makrofag umumnya bulat dengan garis batas sedikit tak teratur, tampilan makrofag dapat bervariasi pada gambar, gambaran sel makrofag berbentuk bulat dengan sitoplasma berwarna merah terang dan inti berwarna ungu kebiruan berbentuk menyerupai ginjal atau oval (Eroschenko, 2005; Hidayati dkk, 2015).



**Gambar 2.5 Sel Makrofag dengan potongan melintang. Pengecetaan *Hematoxylin Eosin*.
Pengambilan Gambar dengan Pembesaran 400x (Budi dkk, 2017)**

2.4.1 Fungsi Makrofag

Makrofag mempunyai fungsi antara lain :

1. fungsi utama ialah melahap partikel dan mencernakannya oleh lisosom dan mengeluarkan sederetan substansi yang berperan dalam fungsi pertahanan dan perbaikan
2. dalam sistem imun tubuh, sel ini berperan serta dalam mempengaruhi aktivitas dari respon imun, mereka menelan, memproses dan menyimpan antigen dan menyampaikan informasi pada sel-sel berdekatan (limfosit dan sel plasma)
3. makrofag yang aktif juga merupakan sel sektori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting, termasuk enzim-enzim, lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan gen anti virus penting, interveron (Efendi, 2003).

2.4.2 Peran dalam Penyembuhan Luka

Makrofag bermigrasi ke dalam luka dalam 48-86 jam dan mencapai puncak pada hari ke 3 setelah cedera. Pada awal penyembuhan luka, makrofag memfagositosis sisa debris, bakteri, dan sel apoptosis, termasuk neutrofil (Guo & DiPietro, 2010). Selain itu, limfosit melepaskan limfokin (*interferon- γ*) yang berpengaruh terhadap agregasi makrofag yang merupakan sitokin aktivator makrofag yang poten. Pengukuran untuk makrofag teraktivasi dapat dilakukan antara lain kemampuan *killing* terhadap mikroba yang sudah difagositosis (Kumar *et al.*, 2007).

Makrofag yang teraktivasi menyebabkan :

- a. Ukuran selnya bertambah besar
- b. Kandungan enzim lisosom menjadi meningkat
- c. Metabolismenya lebih aktif
- d. Kemampuan fagositosis lebih besar (Eroschenko, 2005)

Selain kemampuan makrofag dalam memfagositosis mikroba, Makrofag juga menghasilkan zat bioaktif yang bersifat kemoatraktan terhadap makrofag lain, *growth factors* untuk proliferasi sel dan sintesis protein dan protease molekul matriks ekstraseluler (DiPietro and Burns, 2003).

2.5 Tikus Putih Galur Wistar

Tikus yang dipergunakan untuk penelitian ini adalah tikus putih dengan spesies *rattus norvegicus* yang sering digunakan sebagai hewan coba untuk penelitian ilmiah. Tikus putih memiliki keuntungan yaitu mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang cepat, memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia dan harganya yang relatif murah (Sihombing dan Rafliizar, 2010).

Menurut Krinke (2000), klasifikasi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah :

Kingdom : *Animalia*

Phylum : *Chordata*

Subphylum : *Vertebrata*

Class : *Mammalia*

Order : *Rodentia*

Family : *Muridae*

Genus : *Rattus*

Species : *Norvegicus*

Galur/Strain : *Wistar*



Gambar 2.6 Tikus jantan *Rattus norvegicus* galur Wistar (Estina, 2010)

2.6 Sediaan Gel

Gel merupakan suatu sistem setengah padat yang terdiri dari suatu dispersi yang tersusun baik dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan saling diresapi cairan (Herdiana, 2007). Zat-zat pembentuk gel digunakan sebagai pengikat dalam granulasi, koloid pelindung dalam suspensi, pengental untuk sediaan oral dan sebagai basis supositoria. Secara luas sediaan gel banyak digunakan pada produk obat-obatan, kosmetik dan makanan juga pada beberapa proses industri. Pada kosmetik yaitu sebagai

sediaan untuk perawatan kulit, sampo, sediaan pewangi dan pasta gigi (Herdiana, 2007).

Keuntungan sediaan gel ialah memberikan sensasi dingin, tidak menimbulkan bekas dikulit, mudah digunakan, mudah merata jika dioleskan tanpa penekanan (Anggraeni dkk, 2012). Selain itu, gel memiliki kekurangan yaitu sangat mudah di cuci dan dapat hilang ketika berkeringat (Wardiyah, 2015). Basis gel yang ideal adalah *inert*, aman, tidak bereaksi dengan bahan lain dalam formula. Beberapa polimer dapat digunakan sebagai basis gel, antara lain gom, turunan selulosa dan Carbomer (Anggraeni dkk, 2012). Carbomer memiliki beberapa kelebihan yaitu bersifat hidrofil, sehingga mudah terdispersi dalam air dan dengan konsentrasi kecil yaitu 0,5 - 2,0% mempunyai kekentalan yang cukup sebagai basis gel (Rowe, 2006).

2.7 Ekstraksi

Menurut Departemen Kesehatan RI (2006), ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan yaitu metode maserasi.

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Prosedurnya dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup. Pengadukan dilakukan dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Kelemahan dari maserasi adalah prosesnya membutuhkan waktu yang cukup lama. Ekstraksi secara maserasi dilakukan pada suhu kamar (27°C), sehingga tidak menyebabkan degradasi metabolit yang tidak tahan panas (Departemen Kesehatan RI, 2006).

Berdasarkan penelitian mengenai kadar metabolit sekunder dengan menggunakan variasi metode ekstrak pada tumbuhan sarang semut, di dapatkan kadar tanin lebih tinggi pada penggunaan metode ekstraksi maserasi dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain (Ariani dkk, 2015).

2.8 Ethanol

Ethanol adalah pelarut yang umum dan sering digunakan oleh industri, dengan titik didih 70°C yang cenderung aman digunakan. Titik didih 70°C pada ethanol dapat menarik seluruh komponen dalam bahan baku (Kealey *et al.*, 2004). Pelarut ethanol merupakan pelarut yang paling baik dalam ekstraksi tanin dibandingkan dengan methanol, n-heksana dan aseton untuk ekstraksi tanin. Ethanol dengan kemurnian 66% atau lebih tinggi menghasilkan jumlah ekstrak yang hampir sama (Marnoto dkk, 2012).

Berdasarkan penelitian oleh Rafsanjani (2015), tanin cenderung polar sehingga pada proses ekstrak tanin lebih banyak larut dalam ethanol. Pelarut ethanol dapat mengekstrak senyawa tanin secara optimal, diduga karena besarnya konstanta dielektrik dari ethanol yang dapat mengekstrak senyawa tanin. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya tentang ekstrak rumput laut coklat, yang menyatakan kadar tanin adalah senyawa yang cenderung polar sehingga ekstraksi yang dilakukan pelarut yang polar, seperti ethanol (Septiana, 2012).

Tabel 2.3 Sifat Fisikokimia beberapa pelarut (Markom, dkk., 2007)

No.	Pelarut	Polaritas Pelarut (Index Snyder)
1.	n-heksana	0,1
2.	Aseton	5,4
3.	Ethanol	5,2
4.	Methanol	5,6
5.	Air	9,0

Berdasarkan penelitian Marnoto dkk (2012), Penggunaan ethanol dan methanol sebagai pelarut pada tanaman putri malu menghasilkan ekstrak tanin yang berbeda yaitu methanol 0,0274 g/mL dan etanol 0,044 g/mL, hal ini disebabkan pelarut methanol tidak mengandung air, sedangkan ethanol lebih banyak mengandung air sebagai pengotor yang menyebabkan etanol teknis lebih polar dibandingkan methanol dan pada akhirnya dapat melarutkan lebih banyak tanin dengan mendapatkan kemurnian tanin terbanyak pada penggunaan ethanol 96%.

2.9 *Triamcinolone Acetonide* 0,1%

Triamcinolone acetonide 0,1% *dental paste* adalah golongan kortikosteroid topikal yang memiliki efek antiinflamasi, antialergi dan analgesik sehingga dapat mempercepat penyembuhan ulser dan mengurangi keparahan lesi. Obat ini diindikasikan untuk pengobatan lesi inflamasi mulut dan lesi ulseratif (Scully, 2003).

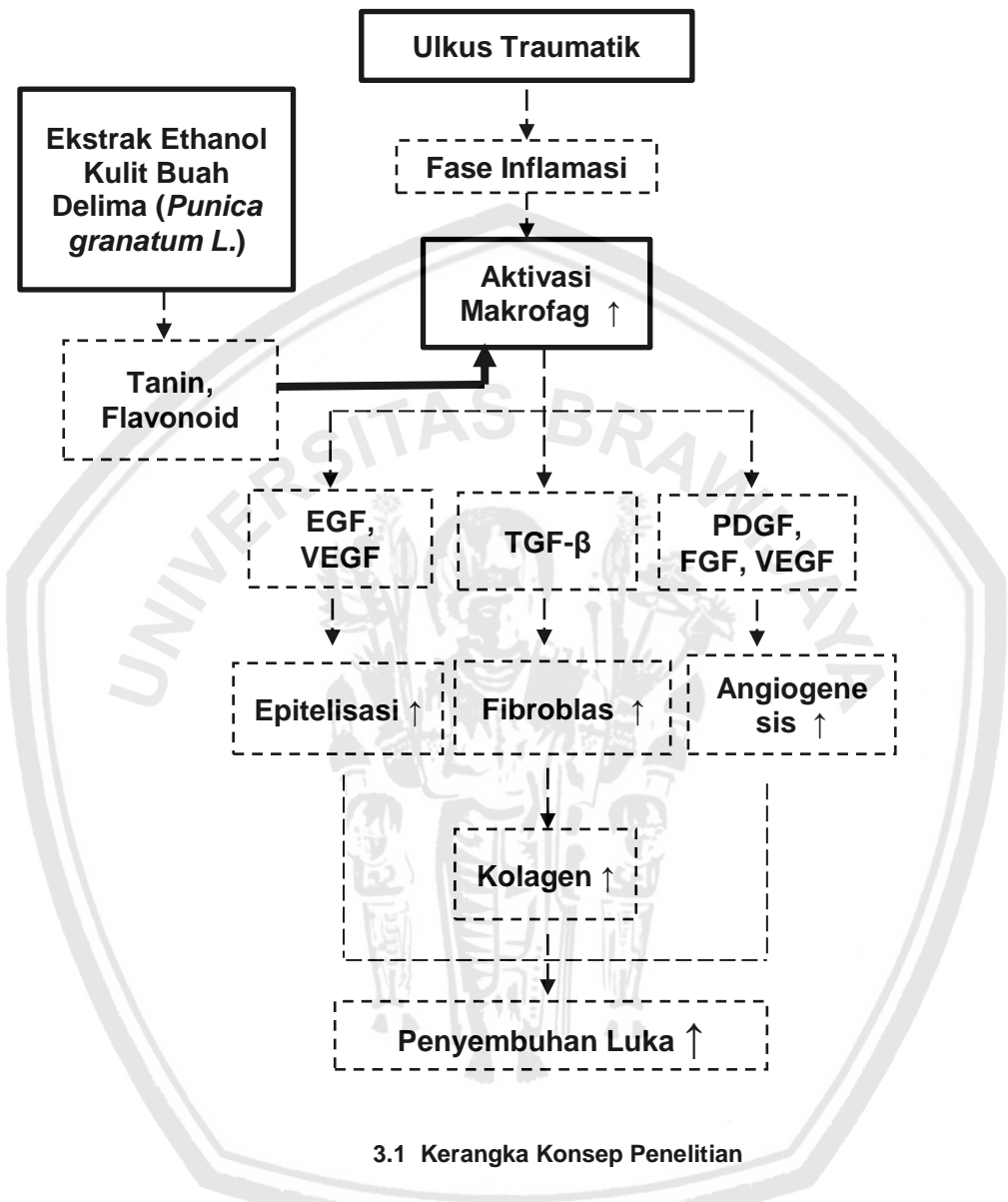
Kontraindikasi penggunaan *Triamcinolone acetonide* 0,1 % *dental paste* adalah pasien dengan riwayat hipersensitivitas terhadap kortikosteroid. Jika

pasien mengalami hipersensitivitas, maka penggunaan obat harus dihentikan. Efek samping penggunaan obat ini dapat menyebabkan kandidiasis oral (Scully, 2003).



BAB III
KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Teori



3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Ket :
↑ : Meningkatkan diakibatkan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima
□ : Variabel yang diteliti
--- : Variabel yang tidak diteliti
➔ : Efek yang diakibatkan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima

Proses penyembuhan luka dibagi dalam 3 fase yaitu fase inflamasi, proliferasi dan remodeling. Fase inflamasi dimulai saat mulai terjadinya luka sampai hari ke-empat sampai hari kelima (Broughton, 2006). Adanya proses penyembuhan luka merangsang aktivasi sel-sel radang pada fase inflamasi, salah satunya yaitu makrofag.

Makrofag berperan dalam eliminasi bakteri dengan cara memproduksi dan *reactive oxygen species* (ROS) dan *Nitric Oxide* (NO) (Moenadjat, 2006; Lima *et al.*, 2009). Makrofag juga berperan utama memproduksi berbagai *growth factor* yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstraseluler oleh fibroblas dan pembentukan neovaskularisasi (Gurtner, 2007). Beberapa *Growth factors* yang dihasilkan antara lain *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) berperan untuk merangsang fibroblas untuk memproduksi kolagen, epitelisasi serta terjadinya angiogenesis (Prasetyono, 2009).

Kulit buah delima mengandung senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, asam fenolat, yang terdiri dari gallotanin, ellegatanin, punicalagin, punicalin, asam galat, asam ellagic, katekin, kuercetin, dan antocianidin (Madrigal *et al*, 2009). Kandungan Tanin berupa ellagitanin dan Flavonoid berupa flavol dan flavonol mempunyai fungsi sebagai immunomodulator yang akan meningkatkan aktivitas makrofag, adanya peningkatan aktivitas makrofag menyebabkan makrofag memproduksi *growth factors* yang dapat membantu proses penyembuhan luka sehingga penyembuhan luka akan cepat terjadi (Haeria dkk 2017; Hertiani dkk, 2018). Kandungan flavonoid pada kulit delima juga dapat berpotensi merangsang sel-sel fagosit yaitu makrofag untuk melakukan respon fagositosis (Hayyu N *et al.*, 2013; Kusmardi *et al.*, 2007).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep diatas dapat di rumuskan hipotesis :

Ada pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.

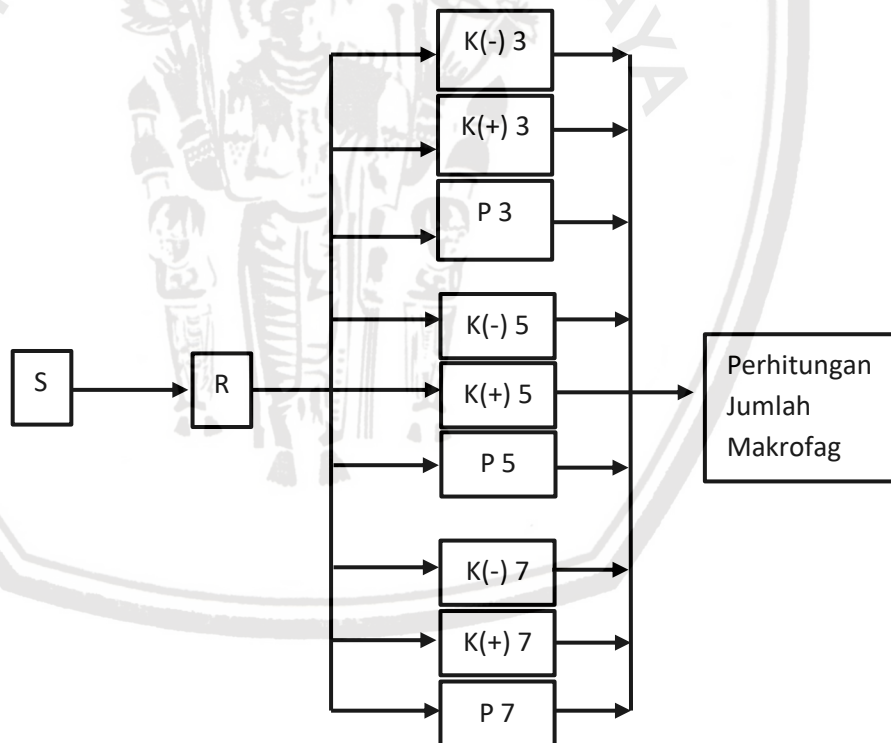


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen murni (*True Experimental*) menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Randomized Control Group Design*” di laboratorium secara in-vivo. Jenis penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.



Gambar 4.1 Kerangka Desain Penelitian

Keterangan :

S : sampel

R : random

K(-)3 : kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan sampai hari ke-3 pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan

K(+)3 : kelompok kontrol positif diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 3 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

P3 : kelompok perlakuan diberi ekstrak ethanol kulit delima (*Punica granatum L.*) berupa gel yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 3 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

K(-)5 : kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan sampai hari ke-5 pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan

K(+)5 : kelompok kontrol positif diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 5 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

P5 : kelompok perlakuan diberi ekstrak ethanol kulit delima (*Punica granatum L.*) berupa gel yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 5 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

K(-)7 : kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan sampai hari ke-7 pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan

K(+)7 : kelompok kontrol positif diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 7 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

P7 : kelompok perlakuan diberi ekstrak ethanol kulit delima (*Punica granatum L.*) berupa gel yang diaplikasikan 2 kali sehari selama 7 hari pasca diinduksi panas dan kemudian dilakukan pembedahan satu hari setelah diberi perlakuan

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang berumur 3 bulan dengan berat 180-200 gram yang dipelihara di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.1. Jumlah Sampel Penelitian

Pada penelitian ini terbagi menjadi 9 kelompok sampel. Jumlah pengulangan penelitian dihitung menggunakan rumus $(n - 1) (t - 1) \geq 15$ (Federer, 1963) adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

t= jumlah kelompok

n= jumlah pengulangan

Pada penelitian ini t=9, oleh karena itu, perhitungan menjadi :

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

$$(n-1) (9-1) \geq 15$$

$$(n - 1) 8 \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$n \geq 2,8$$

Pada penelitian ini digunakan minimal 3 tikus wistar untuk tiap kelompoknya. Penelitian ini dibagi menjadi 9 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 27 tikus wistar. Untuk mengurangi *lost of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus wistar mati, maka jumlah sampel ditambah 3 ekor menjadi 30 ekor tikus wistar yaitu 1 ekor tikus pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan.

4.2.2. Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria Inklusi sampel penelitian yang digunakan yaitu:

1. Tikus putih galur *Wistar* keturunan murni yang sehat
2. Berjenis kelamin jantan

3. Sehat dan belum pernah digunakan untuk penelitian
4. Umur 3 bulan
5. Berat badan 180-200 gram

Kriteria Eksklusi sampel penelitian yang digunakan yaitu:

1. Tikus sakit / tidak sehat selama masa adaptasi 7 hari
2. Tikus mati selama penelitian berlangsung

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*).

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah makrofag saat penyembuhan ulkus traumatik pada tikus wistar yang telah diinduksi panas.

4.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah :

- a. Genetik
- b. Jenis kelamin
- c. Usia
- d. Berat badan
- e. Makanan dan minuman yang dikonsumsi objek penelitian

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2017 - Februari 2018.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1. Perawatan dan Pembuatan Makanan Hewan Coba

Alat perawatan hewan coba meliputi 30 buah box plastik ukuran 15 x 35 x 45 cm³ dengan tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, sekam dan satu neraca Sartorius untuk menimbang berat badan hewan coba. Bahan makanan hewan adalah pellet (pakan tikus).

4.5.2. Bahan dan Alat untuk Membuat Ulserasi

Alat yang dibutuhkan semen stopper, spiritus burner, pinset bedah, dan kaca mulut. Bahan yang dibutuhkan ketamin 0.2 ml, cotton pellet, masker, dan sarung tangan, tikus wistar umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram.

4.5.3 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Alat yang dibutuhkan pisau, kertas saring, tabung Erlenmeyer, alat evaporator. Bahan yang dibutuhkan kulit buah delima (*Punica granatum L.*), etanol 96%, dan aquadest.

4.5.4. Bahan dan Alat Pembuatan Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Alat yang dibutuhkan mortar, pengaduk, alat penimbangan digital dan tube. Bahan yang dibutuhkan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*), propilenglikol, carbopol, metil paraben, gliserin, Trietanolamin (TEA), masker, sarung tangan dan *aquadest*.

4.5.5. Bahan dan Alat Perlakuan

Alat yang dibutuhkan cotton bud, masker, dan sarung tangan. Bahan yang dibutuhkan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berupa sediaan gel, *Triamcinolone acetonide* 0.1%, Tikus wistar umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* alat kedokteran gigi sehingga terdapat ulkus pada mukosanya.

4.5.6. Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Alat yang dibutuhkan scalpel, microtom, kaca obyek dan penutup, blok paraffin, waterbath, tempat pewarna dan cucian, kertas saring, timer, dan kuas kecil. Bahan yang dibutuhkan formalin 10 %, aceton, xylol, gelatin, alcohol 96%, Pewarna *Haematoxylin* dan *Eosin*, dan *Lithium carbonat*.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1. Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima

Ekstrak ethanol kulit buah delima didapatkan dari keseluruhan kulit (Bagian *Pericarp*) buah delima tanpa ada kriteria khusus mengenai berat dan ukuran yang digunakan dengan pembuatan ekstrak menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dibuat menjadi gel dengan menggunakan basis gel carbopol hingga terbentuk gel ekstrak kulit buah delima

dengan konsentrasi 8,9%. Pada penelitian ini menggunakan kulit buah delima jenis lokal yang diperoleh dari kota Kediri, Jawa Timur dan diidentifikasi di Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur UPT Medica Batu.

4.6.2. Ulkus Traumatik

Ulkus traumatik dalam penelitian ini adalah ulkus yang dibuat dengan cara menempelkan *cement stopper* dengan penampang ± 1.5 mm yang telah dipanaskan hingga membara selama 10 detik pada mukosa labial bawah tikus selama 3 detik tanpa tekanan kemudian ditunggu selama 24 jam sehingga didapatkan ulkus dengan diameter ± 1.5 mm berbentuk ovoid, berwarna putih kekuningan dan dikelilingi eritema, yang nantinya akan diaplikasikan gel ekstrak kulit buah delima secara topikal.

4.6.3. Jumlah Makrofag

Penghitungan jumlah makrofag adalah penghitungan jumlah makrofag pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulser pada hari ke-3, ke-5, ke-7 pasca ulserasi dengan pewarnaan *haematoxylin-eosin (HE)* dan diamati dengan mikroskop digital dan aplikasi *software Olyvia-Olympus dot slide* dengan pembesaran 400 kali per 5 lapangan pandang dan kemudian dibuat foto preparat. Makrofag dalam pewarnaan HE adalah gambaran sel makrofag berbentuk bulat dengan sitoplasma berwarna merah terang dan inti berwarna ungu kebiruan berbentuk menyerupai ginjal (Hidayati dkk, 2015).

4.7. Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Ethical Clearance

Penelitian ini diawali dengan pengurusan *ethical clearance* di di Komisi Etik Penelitian *Bioscience* Universitas Brawijaya.

4.7.2 Alur Penelitian

Sebelum ulserasi pada mukosa labial, sejumlah tikus wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangkan pada box plastik berukuran 15 x 35 x 45 cm³ yang ditutup dengan kawat kassa dengan dasar sekam yang diganti setiap 3 hari sekali dan diberi pakan standar selama 7 hari. Setelah 7 hari masa adaptasi, mukosa labial tikus wistar dianastesi dengan ketamin 0.2 ml secara intramuskular (Widyastomo, 2013), kemudian jika tikus wistar tidak memberi respon saat diberi rangsangan rasa sakit menggunakan pinset bedah maka tikus wistar bisa diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* sehingga terbentuk ulkus, lalu diberikan analgesik novalgin sebanyak 0,3 ml diberikan secara intramuskular kemudian dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi label kelompok kontrol negatif (K(-)), kelompok kontrol positif (K(+)), kelompok perlakuan (P). Satu kandang terdiri dari 1 ekor tikus dengan perlakuan sama. Kemudian dilakukan pembedahan pada hewan coba pada sehari setelah diberi perlakuan *time series* yaitu pada hari ke 3, 5, dan 7. Kemudian membuat preparat untuk menghitung jumlah makrofag, analisis data dan membuat kesimpulan.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Kulit buah delima yang masih segar dikirim ke Dinas Kesehatan UPT Medica Batu untuk dilakukan identifikasi dan pembuatan ekstrak. Kulit buah

delima yang masih segar dicuci dengan air hingga bersih kemudian dikeringkan hingga benar-benar kering dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan, digiling hingga halus dengan menggunakan alat giling khusus sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang sebanyak 500 gram serbuk kulit buah delima. Proses pembuatan ekstrak dengan teknik maserasi yaitu dengan cara serbuk kulit buah delima dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 4000 mL. Tabung erlenmayer ditutup rapat dan diaduk dengan homogenizer selama 30 menit dan disimpan pada suhu kamar dan didiamkan selama 5 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan untuk meratakan konsentrasinya. Setelah 5 hari campuran itu disaring dengan kertas filter, proses ini diulang 2 kali hingga diperoleh hasil berupa ampas dan filtrat, hasil filtrat dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporation* selama 4 jam guna memisahkan pelarut ethanol dengan ekstrak ethanol kulit buah delima. Filtrat dievaporasi dengan pengurangan tekanan pada suhu yang diatur sesuai dengan titik didih etanol hingga semua pelarut terpisah. Didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak ethanol kulit buah delima dengan konsentrasi 100% dari pelarut etanol 96% yang telah dipisahkan dengan berat sebesar 58 gram.

4.7.4 Pembuatan Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.)

Menimbang terlebih dahulu semua bahan yang akan digunakan ke dalam pembuatan gel ekstrak kulit buah delima sesuai takaran. Setelah semua bahan ditimbang sesuai takaran kemudian karbopol dikembangkan dengan aquadest dalam mortir hingga mengembang. Metil paraben dilarutkan dalam gliserin aduk hingga larut dalam beaker gelas. Pada mortir yang berbeda ekstrak kulit buah delima digerus hingga teksturnya menjadi lembut lalu tambahkan sebagian

propilenglikol lalu gerus hingga homogen. Setelah karbopol mengembang gerus terlebih dahulu dengan di tambahkan TEA sedikit-sedikit hingga membentuk basis gel. Campuran gliserin dan metil paraben ditambahkan dalam basis gel sambil di gerus hingga homogen. Sisa propilenglikol ditambahkan dalam campuran basis, gerus hingga homogen. Campurkan gerusan ekstrak ke dalam basis gel dan gerus sampai homogen. Ditambahkan *aquadest* yang sudah dipanaskan $\pm 70^{\circ}\text{C}$ sedikit sedikit sampai 40 ml. Kemudian setelah gel ekstrak kulit buah delima selesai dibuat gel dimasukkan ke dalam tube tertutup yang terlindung dari kontaminasi luar dan ditimbang untuk mengetahui berat gelnya. Didapatkan hasil akhir penimbangan gel ekstrak kulit buah delima sebanyak 44.67 gram dengan konsentrasi 8,9%. (Maulina, 2015). Gel tersebut lalu disimpan pada suhu kamar 24 jam dan kemudian dilakukan uji fisik gel meliputi homogenitas, pH dan daya sebar dan mengetahui apakah ada perubahan warna, bentuk, dan bau selama penyimpanan. Untuk memenuhi syarat sediaan gel yang baik dan dapat diterima masyarakat dapat dilihat dari sifat fisik dan stabilitasnya.

Tabel 4.1 Formula Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (Maulina, 2015)

Komponen	Takaran (gram)
Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima	4 g
Carbopol	2 g
Gliserin	4 g
Propilenglikol	2 g
Metil Paraben	0,06 g
Trietanolamin (TEA)	2 g
Air Ad	40 g

4.7.5 Pembuatan Ulkus Traumatik

Pembuatan ulkus traumatik yang diinduksi panas didahului dengan anestesi menggunakan ketamin 0,2 ml secara intramuskular, kemudian diinduksi dengan ujung *cement stopper* kedokteran gigi dengan penampang ± 1.5 mm yang sebelumnya telah dipanaskan dengan bunsen selama 10 detik dan ditempelkan pada mukosa labial bawah tanpa tekanan selama 3 detik kemudian ditunggu selama 24 jam sehingga terbentuk ulkus dengan diameter ± 1.5 mm berbentuk ovoid, berwarna putih kekuningan dan dikelilingi eritema, yang nantinya akan diaplikasikan gel ekstrak kulit buah delima secara topikal. Setelah dilakukan pembuatan ulkus traumatik kemudian tikus wistar diberi analgesik novalgin 0.3 ml secara intramuskular untuk mengurangi rasa sakit pada tikus wistar pasca di ulserasi.

4.7.6. Pengaplikasian Gel Ekstrak Ethanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Setelah satu hari ulserasi, pada kelompok perlakuan dilakukan aplikasi gel ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L.*) dua kali sehari. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dilakukan aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% selama dua kali sehari dan kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan. Pengaplikasian gel ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) dilakukan secara topikal menggunakan *cotton bud*. Dilakukan aplikasi yang sama pada kelompok kontrol (+) dan (-) pada hari ketiga, kelima sampai hari ketujuh.

4.7.7. Pembedahan Hewan Coba

Pada sehari setelah hari ke 3, 5, dan 7 hewan coba dikorbankan menggunakan teknik dislokasi leher. Setelah itu, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan sekitar ulser pada hewan coba. Jaringan tersebut kemudian

dimasukkan ke dalam botol organ yang sudah berisi larutan BNF (*Buffered Neutral Formalin*) 10% dengan pH 6.5-7.5 (Muntiha, 2001).

4.7.8. Sanitasi Hewan Coba

Semua sisa organ hewan coba yang sudah dibedah dan tidak terpakai dilakukan sanitasi. Semua sisa organ tikus yang sudah dibedah dan tidak terpakai kemudian dikubur dengan mengubur di halaman belakang laboratorium biokimia dengan membuat lubang dengan kedalaman 100 cm dan dibalut kain atau bahan yang mudah terurai. Sampah dari prosedur pembedahan yang tidak terpakai dibuang dalam satu kantong plastik, sampah medis dipisahkan tersendiri, dan diserahkan ke Rumah Sakit Saiful Anwar untuk proses pembuangan. Area kerja sisa pembedahan dibersihkan dengan sabun dan jika perlu disemprot dengan alkohol.

4.7.9. Pembuatan Preparat

a. Fiksasi

Pada tahap fiksasi, dilakukan perendaman jaringan ulser pada larutan formalin 10% selama 18-24 jam, kemudian jaringan dicuci dengan aquadest selama 15 menit.

b. *Embedding*

Jaringan ulkus dimasukkan pada beberapa cairan yaitu *acetone* selama 1 jam x 4, *Xylo* selama ½ jam x 4, *paraffin* cair selama 1 jam x 3 dan penanaman jaringan kulit pada *paraffin* blok.

c. *Slicing*

Blok yang sudah tertanam jaringan ulkus diletakkan pada balok es selama kurang lebih 15 menit kemudian blok ditempelkan pada *cakram microtom rotary* kemudian sayat jaringan ulkus secara vertikal dengan ukuran 4 mikron.

Sayatan jaringan ulkus yang dibentuk pita diambil dengan menggunakan kuas kecil, kemudian letakkan pada *water bath* yang mengandung gelatin dengan suhu 36°C. Setelah sayatan jaringan ulkus merentang, sayatan diambil dengan menggunakan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam.

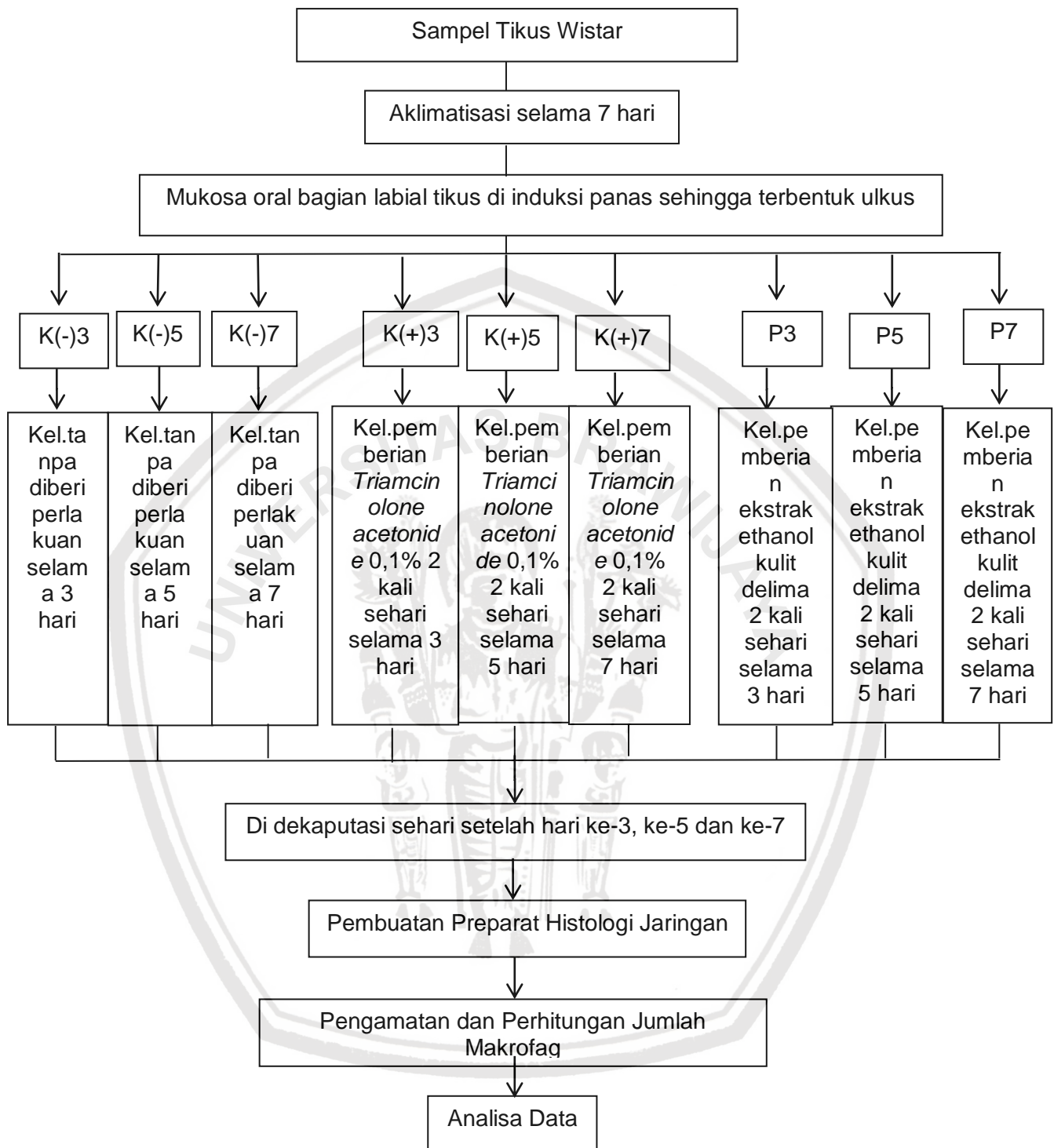
d. *Staining*

Object glass dimasukkan dalam *Xylo* selama 15 menit x 3, alkohol 96% selama 15 menit x 3, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu *object glass* dimasukkan pada pewarna *Haematoxylin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. *Object glass* dimasukkan pada *Litium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya *object glass* dimasukkan pada pewarnaan *Eosin* selama 15 menit, alkohol 96% selama 15 menit x 3 dan *Xylo* selama 15 menit x 3. Dan yang terakhir, preparat ditutup dengan menggunakan *deck glass Entellan*.

4.7.10. Penghitungan Jumlah Makrofag

Sel Makrofag pada sediaan preparat jaringan dihitung menggunakan mikroskop digital dan menggunakan aplikasi *software Olyvia-Olympus dot slide* dengan pembesaran 400 kali per 5 lapangan pandang. Tiap potongan jaringan jumlah makrofag dihitung secara sistematis mulai dari pojok kiri bawah kemudian digeser kekanan dan ditarik keatas demikian seterusnya sehingga semua lapangan pandang terbaca. Kemudian dihitung makrofag dari masing-masing kelompok potongan jaringan tersebut lalu dibandingkan percepatan penyembuhan dalam hitungan hari dari jumlah makrofag antara kelompok kontrol (-), (+), dan kelompok perlakuan.

4.7.11. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

4.8. Analisa Data

Pada penelitian dilakukan uji normalitas untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak dan uji homogenitas untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Uji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampelnya ≤ 50 kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogenitas ragam terpenuhi ($p > 0,05$), maka digunakan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya (Dahlan, 2008).

Uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah makrofag antara kelompok tanpa perlakuan, kelompok aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1%, dan kelompok aplikasi ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L*) pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas. Apabila data berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *one way Anova* atau *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* (Dahlan, 2008).

BAB V

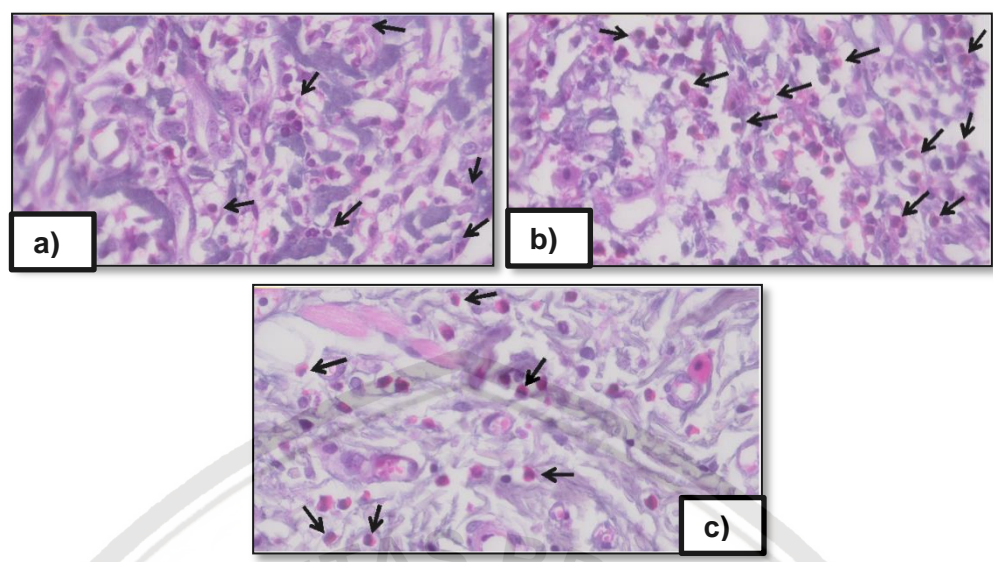
HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

Sampel penelitian didapatkan dengan mengambil jaringan mukosa tikus wistar yang didekaputasi pada satu hari setelah hari ketiga, kelima, ketujuh pasca ulserasi kemudian dilakukan pembuatan preparat dengan pengecatan *Haematoxylin-Eosin*. Berdasarkan gambar hasil pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* yang diamati menggunakan *software* Olyvia dengan perbesaran 400 kali, gambaran sel makrofag berbentuk bulat dengan sitoplasma berwarna merah terang dan inti berwarna ungu kebiruan berbentuk menyerupai ginjal (Hidayati dkk, 2015).

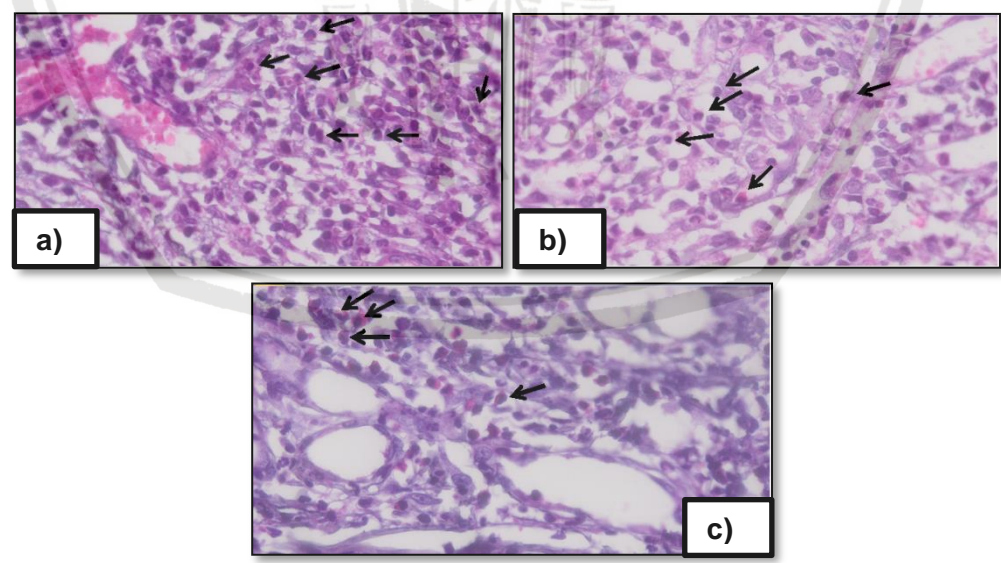
Tabel 5.1 Rerata Jumlah Makrofag Tikus Wistar Pemeriksaan Mikroskop Pembesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang

Kelompok	Hari	Rerata Makrofag	Standar Deviasi
Kontrol Negatif 1	3	26,000	2,0000
Kontrol Positif 1	3	36,000	4,0000
Perlakuan 1	3	27,333	3,2146
Kontrol Negatif 2	5	25,667	4,6188
Kontrol Positif 2	5	22,333	3,7859
Perlakuan 2	5	17,333	1,5275
Kontrol Negatif 3	7	16,333	4,7258
Kontrol Positif 3	7	12,000	2,0000
Perlakuan 3	7	8,000	1,0000



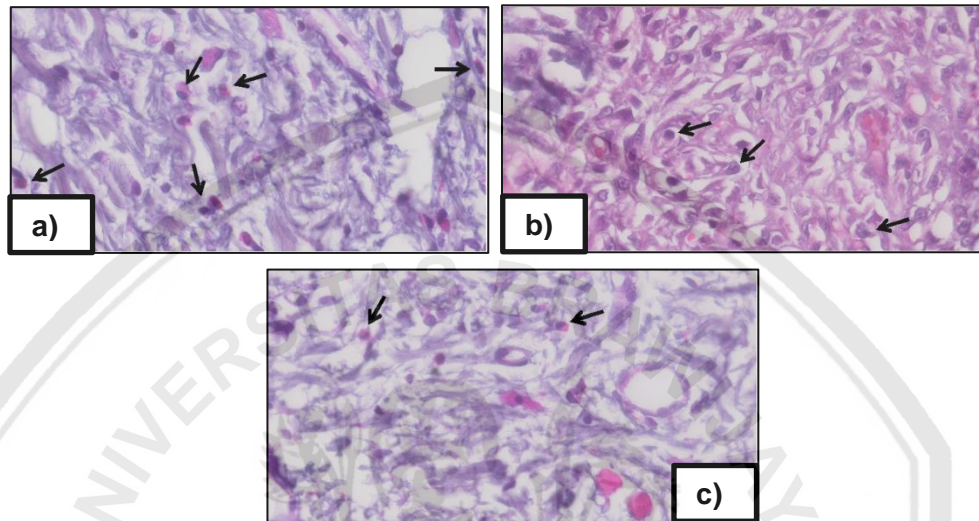
Gambar 5.1 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)3, b) Preparat K(+3, c) Preparat P3 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x

Gambaran mikroskopis (Gambar 5.1) didapatkan bahwa jaringan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus pada hari ke 3 menunjukkan bahwa jumlah makrofag paling banyak pada kelompok K(+) dan jumlah makrofag paling sedikit pada kelompok K(-).



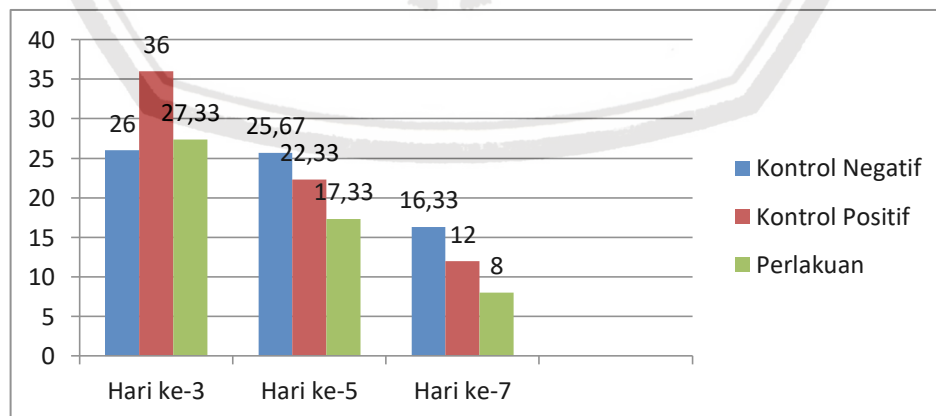
Gambar 5.2 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)5, b) Preparat K(+5, c) Gambaran Preparat P5 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x

Gambaran mikroskopis (Gambar 5.2) didapatkan bahwa jaringan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus pada hari ke 5 menunjukkan bahwa jumlah makrofag paling banyak pada kelompok K(-) dan jumlah makrofag paling sedikit pada kelompok P.



Gambar 5.3 a) Gambaran makrofag pada preparat K(-)7, b) Preparat K(+7), c) Gambaran Preparat P7 dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x

Gambaran mikroskopis (Gambar 5.3) didapatkan bahwa jaringan ulkus traumatik pada mukosa labial tikus pada hari ke 7 menunjukkan bahwa jumlah makrofag paling banyak pada kelompok K(-) dan jumlah makrofag paling sedikit pada kelompok P.



Gambar 5.4 Diagram Rerata Jumlah Makrofag

Diagram tersebut menunjukkan bahwa :

- a. Hari ke 3 jumlah makrofag yang paling banyak pada kelompok K(+) dan jumlah makrofag yang paling sedikit pada kelompok K(-).
- b. Hari ke 5 jumlah makrofag yang paling banyak pada kelompok K(-) dan jumlah makrofag yang paling sedikit pada kelompok P.
- c. Hari ke 7 jumlah makrofag yang paling banyak pada kelompok K(-) dan jumlah makrofag yang paling sedikit pada kelompok P.

5.2 Analisa Data

Data hasil penelitian berupa jumlah makrofag dianalisis menggunakan metode *one way Anova*. Sebelum dilakukan pengujian dengan *one way Anova*, dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas ragam. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene's Test*.

5.2.1 Uji Normalitas Data

Pengujian normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan $p > 0,05$. Didapatkan hasil pengujian normalitas sebagai berikut.

Tabel 5.2 Uji Normalitas Makrofag

	<i>Shapiro-Wilk</i>	
	Df	Sig.
Makrofag	27	0,719

Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,719. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan $p = 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga, dari pengujian ini dapat diketahui bahwa uji normalitas telah terpenuhi dan data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas Ragam

Pengujian homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan *Levene's Test*. Uji homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan $p > 0,05$. Dari hasil analisis data didapatkan pengujian homogenitas ragam sebagai berikut.

Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam Makrofag

<i>Lavene Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>Sig.</i>
1,800	8	18	0,143

Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan koefisien *Levene statistis* sebesar 1,800 dengan nilai signifikansi sebesar 0,143. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan $p = 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga, dari pengujian ini dapat diketahui bahwa uji homogenitas ragam telah terpenuhi.

5.2.3 Uji *One Way Anova*

Hipotesis pada uji *one way ANOVA* ditentukan melalui suatu rumusan yaitu H_0 diterima bila nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 dan H_1 diterima bila nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05. H_0 dari penelitian ini adalah ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) tidak berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas, sedangkan H_1 adalah ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.

Setelah kedua pengujian yang melandasi uji *one way Anova* telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui perubahan jumlah makrofag. Berikut hasil penghitungan uji *one way Anova*.

Tabel 5.4 Uji *One Way Anova*

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
Between Groups	1795,333	8	224,417	21,112	0,000
Within Groups	191,333	18	10,630		
Total	1986,667	26			

Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan signifikansi sebesar 0,000. Nilai signifikansi yang didapatkan dari proses penghitungan lebih kecil daripada $p=0,05$. Sehingga dari pengujian ini dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jumlah makrofag antar kelompok. Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan nilai $p=0,00$ lebih kecil daripada $p=0,05$, maka H_1 diterima sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas.

5.2.4 Uji *Post Hoc Tukey*

Analisa mengenai perbedaan jumlah makrofag dari kesembilan kelompok dapat diketahui dengan menggunakan Uji *Post Hoc Tukey*. Metode *Post-Hoc* yang digunakan adalah uji HSD. Pada Uji *Post Hoc Tukey*, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$ serta pada interval kepercayaan 95%.

Berdasarkan uji *Post Hoc* didapatkan hasil sebagai berikut

Tabel 5.5 Uji *Post Hoc Tukey*

	K(-)3	K(-)5	K(-)7	K(+3)	K(+5)	K(+7)	P3	P5	P7
K(-)3		1.000	0.039*	0.030*	0.892	0.001*	1.000	0.081	0.000*
K(-)5	1.000		0.050*	0.024*	0.933	0.002*	0.999	0.102	0.000*
K(-)7	0.039*	0.050*		0.000*	0.415	0.779	0.014*	1.000	0.102
K(+3)	0.030*	0.024*	0.000*		0.002*	0.000*	0.081	0.000*	0.000*
K(+5)	0.892	0.933	0.415	0.002*		0.024*	0.632	0.635	0.001*
K(+7)	0.001*	0.002*	0.779	0.000*	0.024*		0.000*	0.560	0.841
P3	1.000	0.999	0.014*	0.081	0.635	0.000*		0.030*	0.000*
P5	0.081	0.102	1.000	0.000*	0.635	0.560	0.030*		0.050*
P7	0.000*	0.000*	0.102	0.000*	0.001*	0.841	0.000*	0.050*	

Berdasarkan tabel hasil uji *Post Hoc Tukey* di atas dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jika $p < 0,05$ dan terdapat perbedaan yang tidak signifikan jika $p \geq 0,05$. Tabel diatas membandingkan tiap-tiap kelompok perlakuan.

Terdapat perbedaan yang signifikan antara K(-)3 dibandingkan dengan kelompok K(-)7, K(+3), K(+7), dan P7. Terdapat perbedaan yang signifikan antara K(-)5 dibandingkan dengan kelompok K(-)7, K(+3), K(+7), dan P7. Terdapat perbedaan yang signifikan antara pada K(-)7 dibandingkan dengan kelompok K(-)3, K(-)5, K(+3), dan P3. Terdapat perbedaan yang signifikan antara K(+3) dibandingkan dengan kelompok K(-)3, K(-)5, K(-)7, K(+5), K(+7), P5 dan P7. Terdapat perbedaan yang signifikan antara K(+5) dibandingkan dengan kelompok K(+3), K(+7) dan P7. Terdapat perbedaan yang signifikan antara K(+7) dibandingkan dengan kelompok K(-)3, K(-)5, K(+3), K(+5), dan P3. Terdapat perbedaan yang signifikan antara P3 dibandingkan dengan kelompok K(-)7, K(+7), P5, dan P7. Terdapat perbedaan yang signifikan antara P5 dibandingkan

dengan kelompok K(+)₃, P₃, dan P₇. Terdapat perbedaan yang signifikan antara P₇ dengan kelompok K(-)₃, K(-)₅, K(+)₃, K(+)₅, P₃ dan P₅.

Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara K(-)₃ dibandingkan dengan kelompok K(-)₅, K(+)₅, P₃ dan P₅. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara K(-)₅ dibandingkan dengan kelompok K(-)₃, K(+)₅, P₃ dan P₅. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara pada K(-)₇ dibandingkan dengan kelompok K(+)₅, K(+)₇, P₅, dan P₇. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara K(+)₃ dibandingkan dengan kelompok P₃. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara K(+)₅ dibandingkan dengan kelompok K(-)₃, K(-)₅, K(-)₇, P₃ dan P₅. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara K(+)₇ dibandingkan dengan kelompok K(-)₇, P₅, dan P₇. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara P₃ dibandingkan dengan kelompok K(-)₃, K(-)₅, K(+)₃, dan K(+)₅. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara P₅ dibandingkan dengan kelompok K(-)₃, K(-)₅, K(-)₇, K(+)₅, dan K(+)₇. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara P₇ dengan kelompok K(-)₇ dan K(+)₇.

BAB VI

PEMBAHASAN

Pengamatan pada penelitian ini dilakukan di hari ke-3, ke-5 dan ke-7 setelah semua hewan coba dilakukan ulserasi. Lesi yang timbul dari trauma pada mukosa labial bawah tikus wistar terbentuk satu hari setelah induksi panas dilakukan yaitu tampak lesi berwarna kekuningan dengan tepi kemerahan berbentuk bulat atau oval dengan tepi kemerahan. Hal ini sesuai dengan Anjani (2012), yang menjelaskan bahwa ulkus traumatik mempunyai gambaran klinis berupa lesi berwarna kekuningan hingga kelabu, seringkali cekung dan biasanya berbentuk oval dengan tepi eritematosus.

Pembuatan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) dengan cara dingin yaitu maserasi karena metode yang digunakan sederhana tetapi efektifitasnya tinggi untuk menarik zat-zat aktif (Tanin, Flavonoid) yang terkandung dalam kulit buah delima, hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Ariani, dkk (2015) bahwa penggunaan teknik maserasi dapat menarik zat-zat aktif (Tanin, flavonoid) dengan optimal. Ekstraksi menggunakan ethanol 96% karena larutan ethanol mampu mengikat zat fitokimia yang terkandung dalam kulit buah delima (*Punica granatum L.*) seperti tanin dan flavonoid (Marnoto dkk, 2012; Syafitri dkk, 2014). Setelah dilakukan proses maserasi nantinya akan didapatkan kandungan ekstrak ethanol kulit buah delima dengan konsentrasi 100%.

Pembuatan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) diformulasikan dalam bentuk gel dengan menggunakan *gelling agent* berupa *Carbopol*, karena *Carbopol* memiliki stabilitas dan kompatibilitas yang tinggi dan toksisitas yang rendah (Sudjono, 2012). Selain itu, gel memiliki keuntungan yaitu

memberikan sensasi dingin, tidak menimbulkan bekas dikulit, mudah digunakan, mudah merata jika dioleskan tanpa penekanan (Anggraeni dkk, 2012).

Berdasarkan uji ANOVA one way didapatkan perbedaan yang signifikan jumlah makrofag pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok yang diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1%, dan kelompok yang diaplikasikan ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L.*). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya mengenai ekstrak kulit delima yang dilakukan oleh Putri (2013) terhadap jumlah makrofag, fibroblas dan kolagen pada penyembuhan luka bakar tikus putih dengan hasil yang didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok dan penyembuhan luka yang terjadi lebih cepat dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan.

Penelitian ini didapatkan K(+)₃ memiliki rerata jumlah makrofag tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lain, hal ini disebabkan karena *Triamcinolone acetonide* 0,1% mempunyai peran yaitu menghambat MIF (*Migration Inhibitory Factor*) sehingga makrofag mudah keluar dari jaringan yang dipengaruhinya (Arimbi, 2010), hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Gegana (2017), bahwa penggunaan kortikosteroid topikal dapat berpengaruh pada jumlah makrofag. Kelompok K(+)₅ dan K(+)₇ mengalami penurunan jumlah makrofag dibandingkan dengan K(+)₃. Hal ini dikarenakan sel makrofag telah mulai memasuki fase proliferasi yaitu pada hari ke-5 dengan menghasilkan *growth factors* yang menginduksi fibroblast untuk berproliferasi, migrasi dan membentuk matriks ekstraseluler. Kemudian pada hari ke-7 jumlah makrofag mulai menurun seiring dengan adanya fibroblas, angiogenesis yang mendominasi di daerah luka (Gurtner, 2007). Kelompok K(+)₃ tidak ada perbedaan secara bermakna dengan P₃, begitu pula kelompok K(+)₅ dengan

P5, dan kelompok K(+)⁷ dengan kelompok P7 yang tidak ada perbedaan yang bermakna. Hal ini menandakan bahwa efek dari ekstrak ethanol kulit buah delima hampir sama dengan kelompok yang di aplikasikan dengan *Triamcinolone acetonide* 0,1%.

Kelompok P3 memiliki jumlah makrofag yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K(-)³, hal ini berkaitan dengan zat-zat biologis aktif yang terdapat pada kulit buah delima (*Punica granatum L.*) yang mempunyai pengaruh pada sel makrofag. Tanin berupa ellagitanin dan Flavonoid berupa flavol dan flavonol memiliki kemampuan imunomodulator untuk merangsang proliferasi limfosit sehingga menyebabkan sel T Helper 1 (Th1) teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Spesific Makrofag Activating Factor*) yang dapat mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan *Growth Factors* seperti *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang digunakan untuk merangsang pembentukan kolagen dan elastin oleh fibroblas dan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru sehingga akan mempercepat fase proliferasi dan penyembuhan luka (Christina dkk, 2015; Widyastomo, 2013; Haeria dkk, 2017; Hertiani dkk, 2018). Kandungan flavonoid dalam kulit buah delima juga berfungsi merangsang sel-sel fagosit yaitu makrofag untuk melakukan respon fagositosis (Hayyu N dkk, 2013; Kusmardi dkk, 2007).

Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Putri (2013), bahwa dalam penelitiannya yang menggunakan ekstrak kulit buah delima pada luka bakar tikus putih yaitu terjadi peningkatan jumlah makrofag pada kelompok yang diaplikasikan ekstrak kulit buah delima dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan, dengan adanya peningkatan jumlah makrofag dapat menginduksi fibroblas kedalam daerah luka pada saat fase inflamasi sehingga

dapat memicu penyembuhan luka dengan cepat. Kandungan Tanin dalam kulit buah delima memiliki fungsi yaitu mensintesis TGF- β yang merangsang terbentuknya angiogenesis dan biosintesis kolagen serta menstimulasi migrasi fibroblas.(Gurtner, 2007; Nurdiana dkk, 2016).

Kelompok K(-) pada hari ke-3 dibandingkan dengan hari ke-5 terjadi penurunan jumlah makrofag namun tidak signifikan, hal ini dikarenakan proses penyembuhan luka yang terjadi bersifat *self healing* dan tidak adanya perlakuan yang diberikan sehingga penurunan jumlah makrofag yang terjadi tidak sebanyak kelompok K(+) maupun kelompok yang diberi perlakuan berupa ekstrak ethanol kulit buah delima.

Kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah makrofag yaitu pada hari ke-5, dan hari ke-7 dibandingkan hari ke-3 hal ini dapat terjadi karena makrofag telah memasuki fase proliferasi sejak hari ke-5 sehingga pada daerah luka keberadaan makrofag semakin menurun seiring dengan digantikannya fibroblas dan angiogenesis, selain itu adanya peningkatan aktivitas makrofag oleh kandungan tanin berupa ellagitanin dan flavonoid berupa flavol dan flavonol pada kulit buah delima yang berfungsi sebagai imunomodulator pada fase inflamasi sehingga makrofag akan terjadi apoptosis dan terjadi penurunan jumlah makrofag pada hari-5 dan hari-7 dibandingkan dengan hari ke-3.

Namun, masih terdapat keterbatasan pada penelitian ini yaitu tidak adanya variasi konsentrasi sehingga tidak dapat mengetahui konsentrasi yang optimal dalam penyembuhan ulkus traumatik menggunakan ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*). Keterbatasan kedua yaitu adanya pengaruh keadaan rongga mulut tikus saat dilakukannya pengaplikasian ekstrak ethanol kulit buah delima, yaitu pengaruh saliva terhadap penempelan gel ekstrak ethanol kulit buah delima yang akan berpengaruh terhadap jumlah makrofag dan proses penyembuhan luka. Keterbatasan ketiga yaitu diperlukannya uji efek

samping apabila melakukan penelitian dengan pengaplikasian secara *orabase* pada manusia. Keterbatasan keempat yaitu tidak dilakukannya pengamatan secara makroskopis pada ulkus traumatik hewan coba untuk mengetahui perbedaan percepatan penyembuhan luka secara makroskopis, dan keterbatasan kelima adalah tidak dilakukannya perhitungan jumlah makrofag pada hari ke 1 sampai ke 2 untuk mengetahui apakah terdapat peningkatan jumlah makrofag.



BAB VII

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan :

7.1. Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar.
2. Rerata jumlah makrofag pada hari ketiga, tertinggi pada kelompok tikus wistar yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% dan terendah pada kelompok tikus wistar yang tidak diberi perlakuan.
3. Rerata jumlah makrofag pada hari kelima, tertinggi pada kelompok tikus wistar yang tidak diberi perlakuan dan terendah pada kelompok tikus wistar yang diberi ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*).
4. Rerata jumlah makrofag pada hari ketujuh, tertinggi pada kelompok tikus wistar yang tidak diberi perlakuan dan terendah pada kelompok tikus wistar yang diberi ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*).
5. Rerata keseluruhan dari jumlah makrofag didapatkan tertinggi pada kelompok tikus wistar yang diberi *Triamcinolone acetonide* 0,1% pada hari ke 3 dan terendah pada kelompok tikus wistar yang diberi ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) pada hari ke 7.

7.2 Saran

Berdasarkan kekurangan yang ada pada penelitian ini, maka perlu diadakan penelitian yang lebih lanjut sebagai berikut:

1. Penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus

traumatik tikus wistar yang diinduksi panas dengan konsentrasi yang bervariasi.

2. Penelitian lebih lanjut mengenai efek samping dalam pemberian ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) sebagai terapi penyembuhan ulkus traumatik.
3. Penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak ethanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah makrofag pada penyembuhan ulkus traumatik tikus wistar yang diinduksi panas pada hari ke-1 dan hari ke-2.



DAFTAR PUSTAKA

- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. 2000. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A* 896, 87-93.
- Anggraeni Y, Hendradi E, Purwanti T. 2012. Karakteristik Sediaan dan Pelepasan Natrium Diklofenak dalam Sistem Niosom dengan Basis Gel Carbomer 940. *Pharma Scientica*. Vol. 1 No.1.
- Anjani, Lintang. 2012. *Pigmentasi Rasial, Smoker's Melanosis dan Ulkus Traumatikus*, Laporan Kasus Ilmu Penyakit Mulut.
- Ariani SR, Agustina W, Karina YD. 2015. Optimasi Rendemen, Kadar Mineral dan Metabolit Sekunder pada Ekstrak Akua Sarang Semut (*Myrmecodia pendans* Merr. & Perry) Dari Wamena Papua dengan Variasi Metode Ekstraksi. SN-KPK VII. Universitas Sebelas Maret.
- Arimbi MR. 2010. Penggunaan Kortikosteroid Pada Tuberkulosa. *Lecture Faculty of Medicine*. Universitas Wijaya Kusuma, Surabaya.
- Ariawardana A. 2014. Traumatic Oral Mucosal Lesions: A Mini. Review and Clinical Update. *Oral Dental Health Management*, 13 (2):254-259.
- Birnbaum, W. dan Dunne, S. M., 2009. *Diagnosis Kelainan dalam Mulut: Petunjuk bagi Klinisi*. Alih bahasa Lilian Juwono. Jakarta: EGC. Hal. 245-247.
- Broughton G, JE Janis, et al. 2006. The Basic Science of Wound Healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl): 12S-34S.
- Budi HS, Soesilowati P, Imanina Z. 2017. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi Pada Makrofag dan Neovaskular dengan Pemberian Getah Batang Pisang Ambon. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. Vol 3:121-127.
- Castellanos JL, Guzman LD, Guanajuato. 2008. *Lesions of the oral mucosa: an epidemiological study of 23785 Mexican patients*.105:79-85.
- Cebecci ARI, GulsahiA, Kamburoglu K, Orhan BK, Oztas B. 2009. Prevalence and Distribution of Oral Mucosa Lesions in Adult Turkish Population. *Medical Oral Patology Oral Bucal*. Edinburg: Churchill Livingstone, Elsevier,p.192-195.
- Christina BBH, Fransisca C, Caroline KK, Sudiono J. 2015. Peran Monosit (Makrofag) pada Proses Angiogenesis dan Fibrosis. Smeinar nasional Cendikiawan. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti.

- Cohen DMD, Donald M, Indraneel B Silverman JR. 2012. Red and White Lesions of the Oral Mucosa. Saunders Company. United State of America.
- Dahlan S. 2008. Statistik Untuk Kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Salemba Medika.
- Delong L. 2008. General and oral pathology for the dental higienist. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. p.295-7
- De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5331-5337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2006. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. DepKes RI, Jakarta.
- Deshmukh RA, Bagewadi AS. 2014. Comparison of effectiveness of curcumin with triamcinolone acetone in the gel form in treatment of minor recurrent aphthous stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Pharma Investig*; 4(3): 138-41.
- DiPietro, L.A., Burns, A.L. 2003. Wound Healing: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Medicine*. Totowa, N.J. Humana Press. Electronic book.
- Efendi, Zukesti. 2003. Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh. Dalam *USU Digital Library*. Sumatra Utara : Bagian Histologi FK USU.
- El-Toumy SAA, Rauwald HW. 2003. Two new ellagic rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. *Planta Medica* 69, 682-684.
- Eroschenko, V.P. 2005. *diFiore's Atlas of Histology*. (Edisi Kesepuluh). Philadelphia.
- Estina. 2010. *Jenis dan Ciri Tikus Laboratorium Disertai Gambar* [Internet]. [Place unknown]: Available from: dokter.ternak.com.
- Faisah R. 2012. Pemberian Probiotik Terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida E.Coli. Universitas Jember.
- Faralia. 2012. 1001 khasiat istimewa buah-buahan dan sayuran. Yogyakarta: Aulia publishing. hal 32-36.
- Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. 2012. Antibacterial, antioxidant and tyrosine-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *Complementary and alternative med J*. (12): 200.
- Federer WT. 1963. *Experimental Design*. Nueva York. MacMillan.544 p.

- Gegana, Muhlisa Tsania. 2017. Pengaruh Gel Campuran Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) Dan Lendir Bekicot (*Achatina Fulica*) Terhadap Jumlah Makrofag Pada Penyembuhan Ulkus Traumatik Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). Skripsi. Tidak Diterbitkan. Universitas Brawijaya.
- Ghom AG, Anil S. 2014. Textbook of Oral Medicine. 3rd ed. New delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Guo S, Dipietro LA. 2010. Factors Affecing Wound Healing. Journal of Dental Res, 89 (3): 219-229.
- Gurtner GC, 2007. *Wound healing, normal and abnormal*. In Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Bartlett SP, Gurtner GC, Spear SL (eds). *Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th edition*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 15-22.
- Halim DS, Izzaty N, Taib H, Pohchi A, Hassan A, Alam MK. 2013. Novel material in the treatment of minor oral recurrent aphthous stomatitis. Int Med J; 20(3): 392-4.
- Haas A. 2007. The phagosome: compartment with a license to kill. Traffic; 8:311-30.
- Haeria, Dhuha N.S, Hasbi. M.I. 2017. Uji Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum. L*) dengan Parameter Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan. Jurnal Farmasi Galenika. Vol. 4 No.1.
- Hayyu N, Endah A, Djamhari M. Uji sitotoksitas ekstrak kulit *Garcinia mangostana* Linn terhadap sel fibroblas gingiva manusia. Oral Medicine Dental Journal; 4(1):10-16, 2013.
- Herdiana, Y.2007. Formulasi Gel Undesilenil Fenilalanin dalam aktivitas sebagai pencerah kulit. Karya Ilmiah. Fakultas Farmasi Unipad Jatinangor.
- Hertiani T, Yuswanto A, Pratiwi S, Mashar H. 2018. Effect of *Massoia aromatica Becc.* Bark on the Phagocytic Activity of Wistar Rat Macrophages. Scientia Pharmaceutica. 86,19.
- Hidayati F, Agusmawati P, Firdausy MD. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) Terhadap Jumlah Sel Makrofag Ulkus Traumatikus Mukosa Mulut Akibat Bahan Kimiawi. Odonto Dental Journal, Vol 2(1):52-57.
- Huang TH, Peng H, Kota GBP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. 2005. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 160-169.

- Jurenka J. 2008. Therapeutic application of pomegranate (*Punica granatum L*): A review. *Alternative Med Review*,(13): 128-44.
- Kealey, K.S., M. Rodney, J.F.Leo, F.John, Margaret, and Giovani. 2004. Cocoa extract prepared from cocoa solids having high cocoa polyphenol content. United States Patent. Hlm 1-7.
- Kasimu R, Abulizi P, Zhang XY. 2009. Studies on the chemical constituents from Xinjiang *Punica granatum*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 32, 363-365.
- Krinke, G. J.2000. *The Laboratory Rat*. San Diego C: Academic Press. Hal : 150-152.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 2007. *Buku Ajar Patologi*. 7nd ed, Vol. 1. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.189-1.
- Kusmardi. 2007. Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia Alata L.*) Terhadap Aktivitas Dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. *Makara, Kesehatan*, 11(2), 50–53.
- Lorentz, H. P., Longaker, M. T. 2006. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. In: Mathes, S. J. and Hentz, V. R., (Eds). *Plastic surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 209-234.
- Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol* 2006; 64: 1-9.
- Liu YZ, Li HX. 2007. Tannins and polyphenols in pericarps of *Punica granatum L*. *Chinese Traditional and herbal Drugs*. 38:502-504.
- Lima CC, Pereira APC, Silva JRF, Oliveira LS, Resck MCC, Grechi CO, Bernardes MTCP, Olimpio FMP, Santos AMM, Incerpi EK, Garcia JAD. 2009. *Ascorbic Acid for The Healing of Skin Wounds in Rats*. *Braz J Bio*, 1 69(4), pp.1195-1201.
- Madrigal, S., Carballo, G., Rodriguez, C.G., Krueger, M., Dreher, J., Dreed. 2009. Pomegranate (*Punicagranatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of Functional Foods*.
- Maulina L, Sugihartini N. 2015. Formulasi Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan Variasi Gelling Agent Sebagai Sediaan Luka Bakar. *Pharmaciana*. Vol. 5 No. 1;43-52.
- Markom, M., Hasan, M., Daud, W.R.W., Singh, H., and Jaim, J.M. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri Linn*: Effects of solvents and extraction methods, *Separation dan Purification technology*, 52, pp.487- 496.

- Marnoto T, Haryono G, Gustina D, Putra FA. 2012. Ekstraksi Tannin Sebagai Bahan Pewarna Alami dari Tanaman Putri Malu Menggunakan Pelarut Organik. Vo. 14 No. 1, Hal. 39-45.
- Moenadjat Y. 2006. *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) dan Multisystem Organ Dysfunction Syndrome (MODS) dalam Luka Bakar*. Dalam Noer (Ed.) *Penanganan Luka Bakar*. Airlangga University Press, Surabaya, pp 27-41.
- Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). Balai penelitian Veteriner. Bogor. 156-163.
- Myers SL, Curran AE. 2014. *General and Oral Pathology For Dental Hygiene Practice*. Philadelphia: F. A. Davis Company.
- Neville. 2002. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 2nd ed., Saunders Company, United State of America.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. 2015. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 4th ed., Philadelphia: Sanders. Pp.285-329.
- Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 166-171.
- Nurdiana, Ulya I, Putra. 2016. Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Daun Melati (*Jasminum sambac L. Ait*) terhadap Jumlah Fibroblas Kulit Dalam Penyembuhan Luka Bakar Derajat II A pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Tikus Galur Wistar. *Jurnal Ilmu Keperawatan Universitas Brawijaya* Vol. 4 No 1.
- Ongole R, Praveen BN. 2013. *Textbook of Oral Medicine, Oral Diagnosis and Oral Radiology*. 2nd Ed. Elsevier.
- Parlinaningrum D, Widyarti S, Rifa'i M. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata Linn*. Terhadap Peningkatan Jumlah B220 pada *Mus musulus*. *Jurnal Biotropika*. Vol.2 No.5
- Perdanakusuma D. S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka*. Surabaya: Airlangga University School of Medicine.
- Prasetyono TOH. 2009. General concept of wound healing, revisited. *Med J Indones*. 18: 208-16.
- Putri, Almahitta Cintami. 2013. Pengaruh Ekstrak Aqueous Kulit Delima (*Punica granatum*) Peroral terhadap Makrofag, Fibroblas, dan Kolagen pada Penyembuhan Luka Bakar Tikus Putih. Skripsi. Universitas Airlangga.

- Rafsanjani MK, Putri WDR. 2015. Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Bali Menggunakan Metode *Ultrasonic Bath* (Kajian Perbedaan Pelarut dan lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 3 No 4 p. 1473-1480.
- Rowe, C.R., Sheskey, P.J., Owen, S.C. 2006. *Pharmaceutical Exipients*, 5rd Edition, London : Pharmaceutical Press, Electronic version.
- Sabrina G.A, Sukanto, Probosari N. 2015. Daya Antibakteri Fraksi *n-butanol* Kulit Buah Delima Putih (*Granati fructus cortex*) Terhadap *Streptococcus Mutans*. *Ejurnal Pustaka Kesehatan*. Vol.3 No.3.
- Septiana dkk. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum Duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut Dan Metode Ekstraksi. *Teknologi Pangan*. Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto
- Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. 2003. The Diagnosis and Management of Recurrent Aphthous Stomatitis: A Consensus Approach. *J Am Dent Assoc*, p.134-200.
- Sihombing M, Rafliizar. 2010. Status Gizi dan Fungsi Hati Mencit (Galur CBS-Swiss) dan Tikus Putih (Galur Wistar) di Laboratorium Hewan Percobaan Puslitbang Biomedis dan Farmasi. *Media Litbang Kesehatan*. Vol. XX No. 1
- Sudjono TA, Honniasih M, Pratimasari YR. 2012. Pengaruh Konsentrasi *Gelling Agent Carbomer 934 dan HPMC* pada Formulasi Gel Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap Kecepatan Penyembuhan Luka Bakar pada Punggung kelinci
- Syafitri NE, Bintang M, Falah S. 2014. Kandungan Fitokimia, Total Fenol, Total Flavonoid Ekstrak Buah Heredong (*Melastoma Affine D. Don*). *Curr Biochem*. Vol. 1(3):105-115.
- Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H. 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 65.
- Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, Ma C, Du LJ. 2004. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *Journal of Natural Products* 67, 2096-2098.
- Wang R, Ding Yi, Liu Ruining, Xiang L, Du L. 2010. *Pomegranate: Constituents, Bioactivities, and Pharmacokinetics*. *Journal Fruit, vegetables and cereal science and biotechnolog* 4, 77-87.
- Wardiyah Sry. 2015. Perbandingan Sifat Fisik Sediaan Krim, Gel, dan Salep yang Mengandung Etil P-Metoksisinamat dari Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga Linn.*). Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Widjajanto E. 2005. Peranan Makrofag pada Proliferasi, Diferensiasi dan Apoptosis pada Proses Hematoposis (Penelitian pada Limpa Janin Tikus

dan Aspirat Sumsum Tulang Manusia).Jurnal Kedokteran Brawijaya. Vol. 21 No 1:29-36.

Widyastomo, Wulan KA, Permatasari I. 2013. Pengaruh Jus Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola Linn.*) terhadap Peningkatan Jumlah Fibroblas pada Soket Tikus Strain Wistar Pasca Ekstraksi Gigi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Vol. 1 No 2: 62-70

Young A. and McNaught C. E.2011.The physiology of wound healing. Surgery .Oxford. 29:475-479.

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. 2014. Potent health effect of pomegranate. Adv Biomed Res. (3): 100.

