

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN AIR Ag (PERAK) TERHADAP
EKSPRESI IL-10 DAN KEPADATAN KOLAGEN
DALAM PENYEMBUHAN LUKA INSISI
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh:
PATRICIA ERWINI EASTER PUSUNG
155130107111032



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN AIR Ag (PERAK) TERHADAP
EKSPRESI IL-10 DAN KEPADATAN KOLAGEN
DALAM PENYEMBUHAN LUKA INSISI
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
PATRICIA ERWINI EASTER PUSUNG
155130107111032



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 dan Kepadatan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Oleh:
PATRICIA ERWINI EASTER PUSUNG
NIM. 155130107111032

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 4 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19560210 198403 2 001

drh. Yudit Oktanella, M.Si.
NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Patricia Erwini Easter Pusung

NIM : 155130107111032

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 Dan Kepadatan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka Insisi Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 4 Juli 2019

Yang menyatakan,

Patricia Erwini Easter Pusung
NIM. 155130107111032

**Pengaruh Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 dan
Kepadatan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka Insisi
pada Tikus (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRAK

Luka insisi merupakan luka yang disebabkan oleh irisan benda bertepi tajam seperti pisau bedah. Proses penyembuhan luka dilakukan oleh tahap hemostasis, inflamasi, proliferasi dan reepitelisasi. Pemberian terapi air Ag (Perak) dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan efek antibakteri dan antiinflamasi sehingga dapat mempercepat fase inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Air Ag (Perak) terhadap ekspresi IL-10 dan kepadatan kolagen dalam penyembuhan luka insisi pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan model tikus *strain* Wistar jantan dengan umur 8 – 10 minggu dan berat badan 179 – 205 g. Penelitian dibagi dalam 4 kelompok perlakuan dengan pemberian terapi sebanyak 2 kali sehari selama 7 hari. Kelompok kontrol negatif, kelompok P1 diberi terapi *Povidone iodine* 10% 0,5 mL, kelompok P2 diberi terapi Air Ag (Perak) 0,5 mL, dan kelompok P3 diberi terapi *Povidone iodine* 10% dan Air Ag (Perak) sebanyak 0,5 mL. Ekspresi IL-10 dilihat menggunakan metode *flowcytometry* yang di analisis statistika *One-Way ANOVA*, dan uji BNJ tingkat kepercayaan 95%. Kepadatan kolagen dilihat dengan pewarnaan *Masson's Trichrome*. Hasil penelitian menunjukkan, pemberian terapi Air Ag (Perak) tunggal mempengaruhi peningkatan kadar IL-10 sangat nyata ($p < 0,05$) dan terapi kombinasi *Povidone iodine* 10% + Air Ag (Perak) dapat meningkatkan pertumbuhan kolagen paling baik. Kesimpulan penelitian, terapi Air Ag (Perak) dan kombinasi dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Kata kunci: Luka insisi, inflamasi, Air Ag (Perak), Interleukin-10, dan kepadatan kolagen

**The Effect of Ag (Silver) Water Toward The Expression of IL-10 and
Collagen Density in Incision Wound Healing
on Rats (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Incision wound are caused by sharp-edged objects such as a scalpel. The wound healing process is carried out by the stages of hemostasis, inflammation, proliferation and reepithelization. The provision of Ag (Silver) water therapy can accelerate the wound healing process with antibacterial and anti-inflammatory effects so that it can accelerate the inflammatory phase. This study aims to determine the effect of giving Ag (Silver) water to the expression of IL-10 and collagen density in incisional wound healing in animal models of rats (*Rattus norvegicus*). This research is experimental using a completely randomized design (CRD). Animal model of male mouse strain Wistar with age 8-10 weeks and body weight 179 - 205 g. The study was divided into 4 treatment groups by giving therapy twice a day for 7 days. Negative control group, group P1 was given therapy of *Povidone iodine* 10% 0.5 mL, group P2 was given therapy of Ag (Silver) water 0.5 mL, and group P3 was treated with *Povidone iodine* 10% and Ag (Silver) water as much as 0.5 mL. IL-10 expression was seen using the *flowcytometry* method in One-Way ANOVA statistical analysis, and BNJ test 95% confidence level. Collagen density was seen by staining *Masson's Trichrome*. The results showed that a single Ag (Silver) water therapy influenced the increase in IL-10 levels very significantly ($p < 0.05$) and combination therapy *Povidone iodine* 10% + Ag (Silver) water can increase the best collagen growth. Conclusion of research, therapy of Air Ag (Silver) and combination can accelerate the process of wound healing.

Keywords: Incision wounds, inflammation, Ag (Silver), Interleukin-10, and collagen density

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah Bapa pencipta atas berkat, kasih, penyertaan serta pimpinan-Nya dalam setiap bagian kehidupan sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi dengan judul **“Pengaruh Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 dan Kepadatan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*)”** sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Dalam penyusunan Tugas Akhir ini tidak lepas akan adanya bantuan serta dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis berterima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS dan drh. Yudit Oktanella, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I dan II yang telah memberikan bimbingan serta arahnya dalam penyusunan skripsi penulis.
2. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan Dhita Evi Aryani, S. Farm, Apt., M.Farm.Klin. selaku Dosen Penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan skripsi penulis.
3. drh. Widi Nugroho, Ph.D dan drh. Rahadi Swastomo, M. Biomed. selaku Dosen Pengganti Penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan skripsi penulis.
4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.

5. drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama proses perkuliahan penulis.
6. Keluarga penulis, Papa Jantje Pusung dan Mama Veybe G. Kereh, serta Adik Yohan Ch.E.P. dan Bright Warren J.K. yang tak henti memberikan doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan.
7. Rekan seperjuangan penelitian “Silver Squad” Diah, Talitha, Winona dan Dwika untuk waktu dan kerjasama yang diberikan untuk penulis.
8. Teman-teman “Chillin” Kiki, Vava, Melita, Winona, Talitha dan Fakhira untuk persahabatan, dukungan dan doa kepada penulis.
9. Teman-teman belajar Baki, Afwan, Ellen, Ninik atas semangat dan bantuan selama penyusunan tugas akhir.
10. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di FKH UB.
11. Seluruh kolega FKH UB, teman-teman “Classy Class 2015”, angkatan 2015 “DNA”, keluarga besar IMPROVE KEPETA, keluarga besar PMK Veteriner dan “Guest House Sulut” atas masukan, motivasi dan inspirasi.

Masih banyak kekurangan dalam penulisan tugas akhir skripsi ini, oleh karena itu penulis sangat menerima kritik atau saran yang membangun. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat.

Malang, Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Air Ag (Perak).....	7
2.2 <i>Povidone iodine</i>	8
2.3 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
2.4 Luka.....	10
2.4.1 Definisi Luka	10
2.4.2 Jenis-Jenis Luka.....	11
2.4.3 Fase Penyembuhan Luka	13
2.5 Interleukin-10.....	19
2.6 Kolagen	21
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	23
3.1 Kerangka Teori.....	23
3.2 Kerangka Konsep	24
3.3 Hipotesis Penelitian.....	27
BAB IV. METODEOLOGI PENELITIAN.....	28
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.2 Sampel Penelitian	28

4.3 Rancangan Penelitian	29
4.4 Variabel Penelitian	30
4.5 Alat dan Bahan	31
4.5.1 Alat	31
4.5.2 Bahan	31
4.6 Prosedur Penelitian.....	31
4.6.1 Persiapan Hewan Model	31
4.6.2 Pembuatan Air Ag (Perak)	32
4.6.3 Pembuatan Hewan Model Luka Insisi.....	32
4.6.4 Pemberian Terapi Air Ag (Perak).....	33
4.6.5 Pembedahan Hewan Coba	33
4.6.6 Ekspresi Interleukin 10 dengan Analisa Flowcytometry.....	34
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit	34
4.6.8 Pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i>	35
4.6.9 Pengukuran Kepadatan Kolagen	36
4.6.10 Analisa Data	36
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
5.1 Terapi Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 pada Proses Kesembuhan Luka Insisi Tikus	40
5.2 Terapi Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Kepadatan Kolagen pada Proses Kesembuhan Luka Insisi Tikus.....	44
BAB VI. PENUTUP	53
6.1 Kesimpulan.....	53
6.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	59

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Kelompok Perlakuan.....	29
4.2	ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>).....	30
4.3	Parameter Skor Penilaian Histopatologi Kepadatan Kolagen.	36
5.1	ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Ekspresi IL-10.....	41
5.2	Hasil Uji Tukey Rata-rata Ekspresi IL-10.....	42
5.3	Kriteria Penilaian Skoring Kepadatan Kolagen.....	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Wistar.....	10
5.1	Pembuatan Luka Insisi pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)....	37
5.2	Gambar Makroskopis Kulit Tikus Pasca Insisi dan Perlakuan Hari Ke-3.....	38
5.3	Gambar Makroskopis Kulit Tikus Pasca Insisi Dan Perlakuan Hari Ke-7.....	39
5.4	Histopatologi Kolagen Jaringan Kulit Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) dengan pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i> (Perbesaran 400x).....	46
5.5	Grafik Rata-rata Skor Kepadatan Kolagen.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	60
2. Kerangka Operasional Penelitian.....	61
3. Pembuatan Insisi Pada Hewan Coba.....	62
4. Metode <i>Flowcytometry</i>	63
5. Dokumentasi Prosedur <i>Flowcytometry</i>	64
6. Hasil <i>Flowcytometry</i> IL-10.....	65
7. Kadar IL-10.....	67
8. Data Uji Statistika Ekspresi IL-10.....	68
9. Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Kulit dengan Pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i>	70
10. Data Rata-rata Kepadatan Kolagen 5 Lapang Pandang.....	71
11. Perhitungan Dosis Anetesi.....	74
12. Rata-rata Gambaran Penyembuhan Luka pada Hari ke-3 dan ke-7 Pasca Pemberian Terapi.....	75



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
°C	Derajat Celcius
%	Persen
Ag	Argentum
BB	Berat Badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
µl	Mikroliter
ANOVA	<i>Analisis of Variant</i>
BB	Berat Badan
Cc	<i>Cubic centimeter</i>
Cm	Centimeter
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
Gr	Gram
IFN γ	<i>Interferon Gamma</i>
IL	Interleukin
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
Kg	Kilogram
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Mililiter
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
m-RNA	Messenger RNA
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE/Cy 7	<i>Phycoerythrin Cyanine Dye</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
PMN	Polymorphonuclear
Ppm	Parts per million
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>Radian per Minute</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka menurut Brown (2004) didefinisikan sebagai rusaknya struktur normal anatomi suatu jaringan. Luka juga diartikan sebagai kerusakan fisik karena terbukanya kulit yang menyebabkan rusaknya keutuhan sel epitel. Kulit merupakan organ yang berperan sangat penting dalam kehidupan yang berfungsi mengatur keseimbangan air serta elektrolit, termoregulasi, dan sebagai barier terhadap lingkungan luar termasuk mikroorganisme. Saat barier ini rusak karena berbagai penyebab seperti ulkus, luka bakar, trauma, atau neoplasma maka kulit tidak dapat melaksanakan fungsinya dengan optimal, oleh karena itu sangat penting untuk mengembalikan integritasnya sesegera mungkin (Cohen *et al.*, 1999).

Tingginya angka kejadian luka di Indonesia setiap tahun yang semakin meningkat dimana berdasarkan hasil penelitian Riskesdas (2013), prevalensi kasus penanganan luka tahun 2013 terjadi peningkatan dibandingkan dengan tahun 2007 dari 25,9% menjadi 47,7% baik luka akut maupun luka kronis. Saat luka terinfeksi pada masa yang cukup lama, maka waktu penyembuhannya tidak sesuai lagi dengan kondisi normal. Hal ini jika tidak mendapatkan penanganan yang benar, maka dapat menimbulkan kerusakan yang lebih luas pada jaringan di sekitarnya (Webster, 2012).

Penyembuhan luka merupakan proses alami oleh tubuh yang kompleks dan dinamis untuk perbaikan struktur sel dan jaringan. Ketika terjadi perlukaan pada jaringan kulit, proses kesembuhan dan regenerasi sel terjadi secara otomatis

sebagai respon fisiologis tubuh yang normal. Penyembuhan luka melibatkan berbagai proses utama, yaitu : 1) hemostasis, 2) inflamasi, 3) proliferasi, 4) maturasi atau *remodelling*. Fase-fase ini terjadi saling tumpang tindih (*overlapping*), dan berlangsung sejak terjadinya luka, sampai tercapainya resolusi luka (Wiksmann *et al.*, 2007).

Infeksi oleh bakteri merupakan salah satu penyebab utama terjadinya radang yang akan mengganggu penyembuhan luka. Luka akut yang mengalami hambatan dalam proses penyembuhannya dapat berkembang menjadi luka kronis. Melihat permasalahan tersebut, luka perlu mendapat penanganan yang baik agar segera cepat mengalami proses penyembuhan normal (Webster, 2012). Tujuan dari penanganan luka yaitu untuk menyembuhkan luka lebih cepat serta meminimalkan rasa sakit, menghindari infeksi dan meminimalkan ketidaknyamanan pada pasien (Sastrawan *et al.*, 2016).

Perawatan luka insisi banyak menggunakan antiseptik salah satunya *povidone iodine 10%*. *Povidone iodine* merupakan senyawa yang digunakan secara luas sebagai antiseptik kulit karena sifat antibakteri yang efektif membunuh mikroba (Frederick, 2003). Namun kekurangannya dapat menimbulkan rasa perih pada penggunaannya, menimbulkan iritasi pada luka dan lebih toksik bila masuk ke pembuluh darah. Efek lain dalam penggunaan yang berlebihan juga dapat menghambat pertumbuhan fibroblast yang juga akan menekan produksi kolagen sebagai salah satu matriks ekstraseluler penyusun jaringan ikat dan menghambat granulasi luka dimana hal ini secara langsung akan menghambat proses

penyembuhan luka, sehingga pengobatan luka perlu menggunakan alternatif lain yang lebih aman dapat mengurangi efek tersebut (Nurdiantini *et al.*, 2017).

Sejak tahun 1968 Ag (perak) telah digunakan dalam salep dan krim obat topikal untuk mencegah infeksi pada luka (Fox, 1968). Peran perak sebagai antibakteri membuat perak banyak digunakan seperti pada pembalut (*dressing*) luka yang tersedia secara komersial (Dunn and Jones, 2004). Dalam penelitian Landsdown (2004) menyebutkan bahwa perak secara signifikan dapat meningkatkan jumlah fibroblast dalam kultur sel sehingga dapat meningkatkan produksi kolagen sebagai penyusun jaringan ikat, mengurangi infiltrasi neutrofil dan makrofag dalam model luka insisi *in vivo* yang menunjukkan adanya penurunan respon inflamasi. Adanya penurunan respon inflamasi dapat dilihat dengan turunnya ekspresi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α serta meningkatnya ekspresi sitokin-sitokin anti-inflamasi seperti IL-2, IL-4, IL-10 dan TGF- β . Efek anti-inflamasi dan neovaskularisasi perak juga secara langsung dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Boroumand *et al.*, 2018).

Umumnya sediaan obat luka disiapkan dalam bentuk cair atau setengah padat. Sediaan cair berupa larutan air Ag (Perak) dipilih karena bentuk sediaan ini lebih mudah digunakan dan penyebarannya di kulit lebih cepat. Selain itu larutan ini memiliki sifat yang menyejukkan, melembabkan, mudah berpenetrasi pada kulit karena tingginya kandungan air, tidak mengiritasi dan tidak menimbulkan rasa perih sehingga memberikan efek lebih nyaman pada pasien (Wyatt *et al.*, 2011).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji efek terapi air Ag (Perak) dalam penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap ekspresi IL-10 sebagai salah satu agen anti-inflamasi, kepadatan kolagen sebagai salah satu penyusun jaringan ikat dan dibandingkan dengan respon yang ditimbulkan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah pemberian Air Ag (Perak) secara topikal dapat mempengaruhi ekspresi IL-10 pada luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)?
2. Apakah pemberian pemberian Air Ag (Perak) secara topikal mempengaruhi kepadatan kolagen pasca luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dibatasi pada hal-hal berikut ini:

1. Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan umur 8 – 10 minggu dan berat badan 179 – 205 g, yang telah mendapatkan sertifikasi laik etik No:1020-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.
2. Luka insisi dibuat dengan menginsisi pada daerah dorsal yang telah dicukur sepanjang 2 cm dengan kedalaman $\pm 0,5$ cm mencapai subkutan (bagian *M. Puninculus carnosus*) dengan menggunakan *scalpel* nomor 4 dan *blade* nomor 24.

3. Air Ag (Perak) dengan kadar 20 ppm yang digunakan berasal dari produk yang dibuat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Pemberian terapi Air Ag (Perak) dilakukan secara topikal, frekuensi pemberian dua kali sehari dengan kadar Ag 20 ppm yang dibuat dalam bentuk sediaan cair dan diberikan pada tikus selama 7 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-10 yang dianalisa dengan menggunakan *flowcytometry*.
6. Variabel kedua yang diamati adalah kepadatan kolagen menggunakan pewarnaan *Masson's Trichrome* yang dianalisa secara deskriptif.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian Air Ag (Perak) secara topikal dapat berpengaruh pada ekspresi IL-10 berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian bakteri Air Ag (Perak) secara topikal terhadap penyembuhan luka insisi ditinjau dari kepadatan kolagen pada tikus (*Rattus norvegicus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian Air Ag (Perak) terhadap penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang ditinjau dari ekspresi IL-10 sebagai salah satu agen anti-inflamasi dan kepadatan kolagen sebagai salah satu penyusun jaringan ikat untuk mempercepat proses regenerasi dan penyembuhan luka.

Pemanfaatan pemberian terapi topikal Air Ag (Perak) dapat digunakan sebagai terapi pada penyembuhan luka yang bersifat mempercepat regenerasi sel sehingga efek samping dari penggunaan obat kimia dapat di kurangi.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Ag (Perak)

Perak telah digunakan sebagai agen antiseptik yang termasuk antibiotik spektrum luas (Hoffmann, 1984). Sejak tahun 1968 perak telah digunakan dalam salep dan krim untuk penggunaan obat topikal sebagai bahan pencegah infeksi (Fox, 1968). Menurut Fong dan Wood (2006) perak bertindak sebagai agen antibakteri dengan cara memblokir respirasi sel. Perak juga dapat mengganggu fungsi membran sel bakteri. Dalam penelitian Boroumand *et al* (2018) juga menuliskan bahwa dengan efek antiinflamasi dan neovaskularisasi-nya, perak secara langsung juga dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Banyak peneliti telah menguji sifat antibakteri perak. Nanopartikel perak adalah yang paling umum digunakan dalam penyembuhan luka sebelumnya, dimana dalam bentuk ini perak telah digunakan dalam pembalut (*dressing*) luka yang tersedia secara komersial seperti Acticoat, PolyMem Silver, dan lain-lain (Dunn and Jones, 2004). Jenis *dressing* seperti ini dapat membatasi pelepasan nanopartikel ke area luka yang tidak diinginkan, sehingga kemungkinan toksisitas akan semakin berkurang (Boroumand *et al.*, 2018).

Menurut Lara *et al* (2010), salah satu mekanisme antibakteri perak (Ag^+) karena interaksinya dalam struktur protein dari dinding sel dan membran plasma bakteri yang menyebabkan disfungsi protein inilah yang mengancam kehidupan organisme atau bakteri. Di sisi lain, ion Ag^+ akan mengikat bagian membran bakteri bermuatan negatif yang selanjutnya menciptakan lubang di bagian membran, menyebabkan isi sitoplasma keluar sel dan akhirnya menyebabkan

kematian sel (Knetsch and Koole, 2011). Selain itu, keberadaan ion Ag^+ di dalam sel bakteri dapat mengganggu fungsi rantai transpor elektron bakteri. Ion Ag^+ juga berikatan dengan DNA dan RNA dari bakteri dan menghambat pembelahan sel (Pelgrift and Friedman, 2013).

Dalam penelitian lain juga menyebutkan bahwa perak secara signifikan akan meningkatkan jumlah fibroblast dalam kultur sel, dan mengurangi infiltrasi neutrofil dan makrofag dalam model luka insisi *in vivo*, yang menunjukkan penurunan respon inflamasi. Perak juga meningkatkan penyembuhan luka lebih cepat dengan peningkatan ketebalan epidermis. Hanya sebagian kecil perak yang diberikan ke tempat luka terlibat dalam tindakan sebagai antibakteri. Sebagian besar sisanya tetap dalam perban atau mengikat protein di luka atau debris (Landsdown, 2004).

Sangat sedikit bagian perak yang terserap secara sistemik bahkan jika diserap secara sistemik, perak akan diekskresikan terutama melalui empedu di feses, beberapa juga diekskresikan dalam bentuk urin. Perak tidak diserap ke dalam sistem saraf pusat atau perifer sehingga dalam penggunaannya yang dalam kadar tepat tidak akan menyebabkan efek toksik bagi tubuh (Pelgrift and Friedman, 2013).

2.2 Povidone Iodine

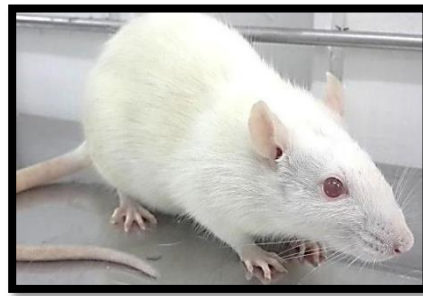
Salah satu antiseptik yang sering dipakai dalam perawatan luka yaitu menggunakan *Povidone Iodine* 10%. *Povidone iodine* merupakan senyawa zat anti bakteri lokal yang efektif membunuh bakteri serta digunakan secara luas sebagai salah satu antiseptik untuk kulit. Secara umum, *povidone iodine*

mempunyai sifat antiseptik (membunuh kuman) baik bakteri gram positif maupun gram negative (Rondhianto *et al.*, 2015). Sifat antibakteri dari Povidone iodine dengan spektrum luas sangat efektif membunuh beberapa infeksi bakteri pada kulit seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Streptococcus sp.* (Putri *et al.*, 2015). Kandungan iodium yang digabungkan dengan polivinil pirolidon menghasilkan suatu kompleks iodoform yang dapat menghambat pertumbuhan kolonisasi. *Povidone iodine* mampu merusak protein dan DNA mikroba (Rondhianto *et al.*, 2015).

Antiseptik seperti *povidone iodine* umumnya bersifat iritan dan alergen serta meninggalkan residu (Willey, 2013). Studi menunjukkan bahwa antiseptik seperti *povidone iodine* bersifat toxic terhadap sel (Tsunoda *et al.*, 2000). *Iodine* dengan konsentrasi lebih dari 3% bahkan dapat memberikan rasa panas pada kulit. *Povidone iodine* dapat bersifat iritatif dan toksik bila masuk ke pembuluh darah, selain itu zat-zat yang terkandung dalam bahan antiseptik akan dianggap benda asing oleh tubuh karena komponen dan susunannya berbeda dengan sel-sel tubuh (Nurafifah, 2016).

2.3 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Jenis tikus yang paling sering digunakan sebagai hewan coba penelitian di laboratorium adalah tikus *Rattus norvegicus*. Penggunaan tikus sebagai hewan coba didasarkan karena tikus memiliki gen, struktur dan fungsi organ-organ yang homolog dengan manusia, serta karakter anatomi dan fisiologi yang telah diketahui (Fauziah, 2010).



Gambar 2.1 Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Fauziyah, 2016).

Menurut Suckow (2006) klasifikasi tikus (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

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

Berdasarkan data biologis, tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki kebutuhan air sebesar 8-11 ml/100 g BB, dengan kebutuhan makan sebesar 10 g/100 g BB. Suhu tubuh normal berkisar antara 35,9-37,5°C, dengan rata-rata kelembaban kandang yang diperlukan sekitar 40-60% (Fauziah, 2010).

2.4 Luka

2.4.1 Definisi Luka

Luka merupakan kerusakan atau hilangnya struktur serta fungsi anatomis dari kulit normal yang dapat disebabkan oleh trauma benda tajam dan tumpul, perubahan suhu, zat kimia maupun gigitan hewan (Pusponegoro, 2005). Menurut

De Jong (2004) luka dapat diakibatkan oleh proses patologis yang dapat berasal dari bagian internal maupun eksternal. Sedangkan menurut Kozier (1995) luka adalah rusaknya kontinuitas kulit atau oragn tubuh lainnya yang dapat menimbulkan beberapa efek seperti hilangnya fungsi organ, respon stress simpatis, perdarahan serta pembekuan darah, kontaminasi dan kematian sel.

Berdasarkan lama waktu kesembuhannya, luka dibagi menjadi 2 yaitu luka akut dan luka kronis. Apabila luka memiliki lama waktu kesembuhan antara 2-3 minggu maka luka dikatakan akut. Sedangkan luka kronis jika tidak adanya tanda luka itu sembuh pada waktu lebih dari 4-6 minggu (Agustina, 2009).

Dalam hal ini, luka insisi termasuk golongan luka akut jika sembuh dalam waktu yang ditentukan, tetapi dalam beberapa kasus luka insisi dapat menjadi kronis jika menunjukkan keterlambatan penyembuhan yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti infeksi (Agustina, 2009).

2.4.2 Jenis-Jenis Luka

Bentuk dari luka berbeda tergantung penyebabnya, ada yang terbuka dan tertutup. Salah satu contoh luka terbuka adalah insisi atau luka sayat dimana terdapat robekan linier pada kulit dan jaringan di bawahnya (Pusponegoro, 2005).

Luka dapat diklasifikasi kedalam tiga cara; sesuai dengan mekanisme cedera, tingkat kontaminasi luka, kedalaman dan luasnya luka.

1. Berdasarkan Mekanisme Cedera

- a. Luka insisi atau luka sayat dibuat dengan potongan bersih menggunakan instrumen tajam.

- b. Luka kontusi dibuat dengan dorongan tumpul dan ditandai dengan cedera berat bagian yang lunak, hemoragi, dan pembengkakan.
- c. Luka laserasi adalah luka dengan tepi bergerigi dan tidak teratur seperti goresan kaca.
- d. Luka tusuk disebabkan oleh benda kecil pada kulit, sebagai contoh luka oleh peluru atau tusukan pisau (Baroroh, 2011).

2. Berdasarkan Tingkat Kontaminasi

- a. *Clean Wounds* (Luka bersih), yaitu luka bedah tidak terinfeksi yang mana tidak terjadi proses peradangan (inflamasi) dan infeksi pada sistem pernafasan, pencernaan, genital dan urinari tidak terjadi. Luka bersih biasanya menghasilkan luka yang tertutup; jika diperlukan dimasukkan drainase tertutup. Kemungkinan terjadinya infeksi luka sekitar 1% - 5%.
- b. *Clean-contaminated Wounds* (Luka bersih terkontaminasi), merupakan luka pembedahan dimana saluran respirasi, pencernaan, genital atau perkemihan dalam kondisi terkontrol, kontaminasi tidak selalu terjadi, kemungkinan timbulnya infeksi luka adalah 3% - 11%.
- c. *Contaminated Wounds* (Luka terkontaminasi), termasuk luka terbuka, fresh, luka akibat kecelakaan dan operasi dengan kerusakan besar dengan teknik aseptik atau kontaminasi dari saluran cerna; pada kategori ini juga termasuk insisi akut, inflamasi nonpurulen. Kemungkinan infeksi luka 10% - 17%.

- d. *Dirty or Infected Wounds* (Luka kotor atau infeksi), yaitu terdapatnya mikroorganisme pada luka (Baroroh, 2011).
3. Berdasarkan Kedalaman dan Luasnya Luka
- a. Stadium I : Luka Superfisial “*Non-Blanching Erythema*” : yaitu luka yang terjadi pada lapisan epidermis kulit.
- b. Stadium II : Luka “*Partial Thickness*” : yaitu hilangnya lapisan kulit pada lapisan epidermis dan bagian atas dari dermis. Merupakan luka *superficial* dan adanya tanda klinis seperti abrasi, blister atau lubang yang dangkal.
- c. Stadium III : Luka “*Full Thickness*” : yaitu hilangnya kulit keseluruhan meliputi kerusakan atau nekrosis jaringan subkutan yang dapat meluas sampai bawah tetapi tidak melewati jaringan yang mendasarinya. Lukanya sampai pada lapisan epidermis, dermis dan fasia tetapi tidak mengenai otot. Luka timbul secara klinis sebagai suatu lubang yang dalam dengan atau tanpa merusak jaringan sekitarnya (Baroroh, 2011).
- d. Stadium IV : Luka “*Full Thickness*” yang telah mencapai lapisan otot, tendon dan tulang dengan adanya destruksi/kerusakan yang luas (Baroroh, 2011).

2.4.3 Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka normal terjadi pada tiap individu dengan luka, dimana ini berarti tubuh memiliki kemampuan sendiri untuk memulihkan. Sitokin bersama faktor-faktor pertumbuhan didalamnya akan aktif berperan dalam

pelaksanaan proses penyembuhan. Tubuh akan bekerja untuk mengembalikan komponen jaringan yang rusak agar membentuk struktur dan fungsionalnya kembali (Maryuyani, 2015). Proses inflamasi sangat berperan dalam penyembuhan luka dimana reaksinya berguna untuk proteksi pada jaringan yang mengalami kerusakan agar tidak terjadi infeksi. Proses reaksi vaskuler ini terjadi jika adanya rangsangan yang menyebabkan kerusakan sel (Prabakti, 2005).

Umumnya proses kesembuhan luka melalui 4 fase yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (*remodelling*).

1. Fase Hemostasis

Fase ini merupakan mekanisme alami tubuh untuk menghentikan kehilangan darah yang berlebihan. Pada fase ini akan berperan pletelet yang berfungsi sebagai hemostasis. Terbukanya pembuluh darah akan memulai proses ini yang diawali oleh tereksposnya kolagen pada area luka. Vasokonstriksi akan terjadi sebagai respon refleksi dari sel endotel sekitar area luka untuk berkontraksi dan mengurangi keluarnya darah. Teraksposnya kolagen berfungsi untuk mengikat dan mengaktifkan trombosit untuk pembentukan sumbat trombosit (Okky, 2012).

Pembentukan sumbat trombosit akan berlangsung setelah vasokonstriksi pembuluh darah. Dalam tahap ini berperan faktor-faktor kimia yaitu *von willebrand factor* yang berfungsi membantu adhesi trombosit untuk berikatan dengan kolagen, *adenosine diphosphate* yaitu platelet aktivator yang berfungsi menarik lebih banyak platelet ke area luka bersama serotonin dan protrombin untuk meningkatkan

vasokonstriksi dan agregasi platelet. Pembentukan sumbat sementara adalah hasil akhir proses ini, dimana dalam proses ini sel-sel yang tidak mengalami luka akan mensekresikan *nitric oxide* dan prostaglandin yang akan mencegah adhesi trombosit ke area dimana tidak terjadi perlukaan. IL-1 dan TNF- α menginduksi aktivasi endotel dengan meningkatkan pengeluaran molekul adhesi, meningkatkan sekresi sitokin dan faktor pertumbuhan tambahan (Silverthorn, 2014).

Koagulasi untuk membentuk bekuan darah stabil selanjutnya akan berlangsung. Koagulasi merupakan proses penggumpalan darah membentuk trombus dan berfungsi untuk memperkuat sumbat trombosit dengan membuat bekuan fibrin. Langkah koagulasi dibagi menjadi dua jalur yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Jalur intrinsik dimulai ketika kolagen terekspos. Jalur ini menggunakan protein yang telah tersedia di dalam plasma, dimana kolagen akan mengaktifkan enzim pertama atau faktor XII untuk memulai kaskade. Jalur ekstrinsik dimulai ketika jaringan rusak mengeluarkan tromboplastin jaringan atau faktor III. Faktor ini akan mengaktifkan faktor VII untuk memulai jalur ekstrinsik. Kedua jalur ini akan bersatu pada jalur umum untuk menghasilkan trombin, yaitu enzim yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin dan bekuan darah (Silverthorn, 2014).

2. Fase Inflamasi

Fase inflamasi hanya berlangsung selama 5-10 menit dan setelah itu akan terjadi vasodilatasi. Hasil dari fase ini area luka akan dibersihkan dari

benda asing, sel-sel mati dan bakteri untuk mempersiapkan proses penyembuhan. Sel PMN terutama netrofil adalah sel pertama yang menuju ke daerah luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncak pada 24–48 jam. Netrofil akan melakukan fagositosis dan mencerna organisme patologis dan sisa jaringan. Bila tidak terjadi infeksi sel-sel PMN berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga (Macleod and Mansbridge, 2014). Selanjutnya makrofag akan muncul untuk melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas zat biologis aktif yang akan mempermudah makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa-sisa jaringan. Fungsi penting makrofag terdapat pada faktor pertumbuhan dan sitokin yang dilepaskannya seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 dan IL-6 yang mengawali dan mempercepat pembentukan jaringan granulasi (Mast, 2000).

PDGF akan oleh platelet pada pembekuan darah akan memicu proses kemotaksis dari netrofil, makrofag, otot polos dan fibroblas, dan juga memulai proses mitosis dari sel fibroblas dan otot polos. $\text{TGF-}\beta$ akan memperkuat kemotaksis dari fibroblas dan otot polos, dan memodulasi pembentukan kolagen (Mast, 2000). Fase inflamasi tidak boleh berlangsung lama, makrofag bersama sel T juga akan mengekspresikan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan $\text{TGF-}\beta$ yang akan menekan sitokin-sitokin inflamasi serta aktivitas makrofag sehingga fase ini akan cepat selesai. Tercapainya fase inflamasi dapat di tandai dengan adanya eritema,

hangat pada kulit, edema dan rasa sakit yang berlangsung sampai hari ke-3 atau hari ke-4 (Oky, 2012).

3. Fase Proliferasi

Fase ini merupakan lanjutan dari fase inflamasi. Dalam fase proliferasi terjadi perbaikan dan penyembuhan luka yang ditandai dengan proliferasi sel yaitu proses reepitelialisasi, neovaskularisasi, dan pembentukan jaringan granulasi. TGF- β yang dilepaskan oleh trombosit dan makrofag memegang peranan penting sebagai pengatur fungsi fibroblast. TGF- β memiliki beberapa peran penting dalam pembentukan matrik ekstraselular, yaitu meningkatkan pergerakan sel epidermis, pembentukan kolagen dan mengurangi produksi dari enzim protease yang merusak matriks. Fibroblast bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang akan digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Selama proses ini berlangsung, terjadi proses granulasi dimana sejumlah sel dan pembuluh darah baru tertanam di dalam jaringan baru. Selanjutnya dalam fase ini juga terjadi proses epitelisasi, dimana fibroblas mengeluarkan KGF yang berperan dalam stimulasi mitosis sel epidermal (Rajan dan Murray, 2008).

Reepitelialisasi terjadi dalam beberapa jam setelah terjadi luka, dan Sitokin yang berperan adalah EGF dan TGF- α yang dihasilkan oleh platelet, makrofag, dan keratinosit. Angiogenesis atau neovaskularisasi, juga akan berlangsung dan dipengaruhi oleh VEGF, FGF dan TGF- β . Proses

ini vital dalam kelangsungan proses selanjutnya yaitu pembentuk jaringan granulasi pada hari ke 4-7 (Oky, 2012).

4. Fase Maturasi (*Remodelling*)

Fase ini dimulai pada minggu ke-3 setelah terjadi luka dan berakhir sampai kurang lebih 12 bulan. Dalam fase ini terjadi penyempurnaan terbentuknya jaringan baru menjadi jaringan penyembuhan yang lebih kuat dan bermutu. Sintesa kolagen yang telah dimulai pada fase proliferasi akan dilanjutkan pada fase maturasi. Pada fase ini myofibroblas akan melakukan kontraksi luka yang menunjukkan adanya pepadatan jaringan ikat. Proses ini dipicu oleh TGF- β 1 dan PDGF (Rajan and Murray, 2008).

Penyembuhan akan tercapai secara optimal jika terjadi keseimbangan antara kolagen yang di produksi dengan kolagen. Degradasi kolagen pada luka juga dipengaruhi oleh beberapa enzim proteolitik yang disebut MMP yang dihasilkan oleh sel makrofag, epidermis, endothel dan fibroblas. Keseimbangan antara MMP akan menentukan perkembangan penyembuhan luka (Rajan and Murray, 2008). Kelebihan kolagen pada fase ini akan menyebabkan terjadinya penebalan jaringan parut atau *hypertrophic scar*. Sedangkan produksi kolagen yang terlalu sedikit juga dapat mengakibatkan turunnya kekuatan jaringan parut sehingga luka akan selalu terbuka (Oky, 2012).

2.5 Interleukin 10 (IL-10)

Terjadinya proses penyembuhan luka tidak terlepas dari peran sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yaitu : FGF, VEGF, EGF, TGF- β , IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ dan lainnya. Sitokin merupakan protein sistem imun yang mengatur reaksi antarsel dan memacu reaktivitas imun. Sitokin diproduksi sebagai respons terhadap rangsang mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi. Makrofag merupakan salah satu penghasil sitokin seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6 yang diketahui sebagai sitokin pro-inflamasi. Ketiga sitokin pro-inflamasi tersebut berperan dalam induksi ekspresi faktor adhesi pada koagulasi, selain itu akan mengaktifkan makrofag dan neutrofil serta meningkatkan fagositosis pada proses inflamasi lokal (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Lama dan intensitas inflamasi lokal akut perlu dikontrol agar tidak terjadi kerusakan jaringan. Untuk mencegah hal diatas, sitokin-sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β dan IL-10 akan di ekspresikan untuk membatasi respon inflamasi dan memacu akumulasi dan proliferasi fibroblast serta matriks ekstraseluler yang diperlukan untuk perbaikan jaringan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Interleukin-10 (IL-10) adalah salah satu sitokin anti-inflamasi yang diproduksi oleh sel T helper dan makrofag. IL-10 bekerja pada sistem imun dan memiliki fungsi sebagai anti-inflamasi. IL-10 adalah salah satu sitokin anti inflamasi, berfungsi menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain seperti TNF- α , IL-1 dan IL-12 serta menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T.

Dampak akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non spesifik maupun spesifik yang diperantarai oleh sel T (Bardram *et al*, 1995).

IL-10 akhir-akhir ini diidentifikasi sebagai sitokin yang diproduksi oleh sel T yaitu sel T helper 2 yang menghambat sintesis sitokin imunostimulatori yang diproduksi oleh sel T helper 1. *Human IL-10* diproduksi oleh sel B dan sel T, sel mast yang teraktivasi serta makrofag. IL-10 adalah salah satu sitokin yang diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi dan selanjutnya menghambat fungsi makrofag. Ini merupakan contoh mekanisme umpan balik negatif.

Tidak jelas apakah stimulus lain dapat merangsang produksi IL-10 atau efektor sitokin lain seperti TNF, IL-12 serta stimulus yang sama akan menekan produksi dari sitokin-sitokin tadi dengan cara yang berbeda (Bardram *et al*, 1995).

IL-10 mempunyai efek penghambatan yang besar terhadap monosit termasuk *downregulation* ekspresi antigen MHC kelas II, IL-1, IL-6, IL-8, dan produksi TNF- α . IL-10 menunjukkan efek sinergisme dengan IL-2 dan IL-4 untuk meningkatkan proliferasi thimosit, IL-10 juga menunjukkan aksi dalam hubungannya dengan IL-3 dan IL-4 untuk memperpanjang daya tahan hidup sel mast (Bultmann *et al*, 1998).

IL-10 merupakan sitokin yang diproduksi oleh karena aktivasi makrofag dan sel-sel T helper. Fungsi utama IL-10 adalah menghambat aktifitas makrofag dan memainkan peran penting dalam homeostasis yang diperantarai oleh sel-sel imun serta dalam tahap inflamasi sebagai sitokin antiinflamasi (Bultmann *et al*, 1998).

2.6 Kolagen

Kolagen merupakan protein matriks ekstraseluler yang berperan dalam formasi skar pada fase penyembuhan jaringan ikat (Novriansyah, 2008). Kolagen memegang peranan yang sangat penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain hemostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis (Friess, 1998). Kolagen diketahui menyusun lebih dari 50% jaringan kulit.

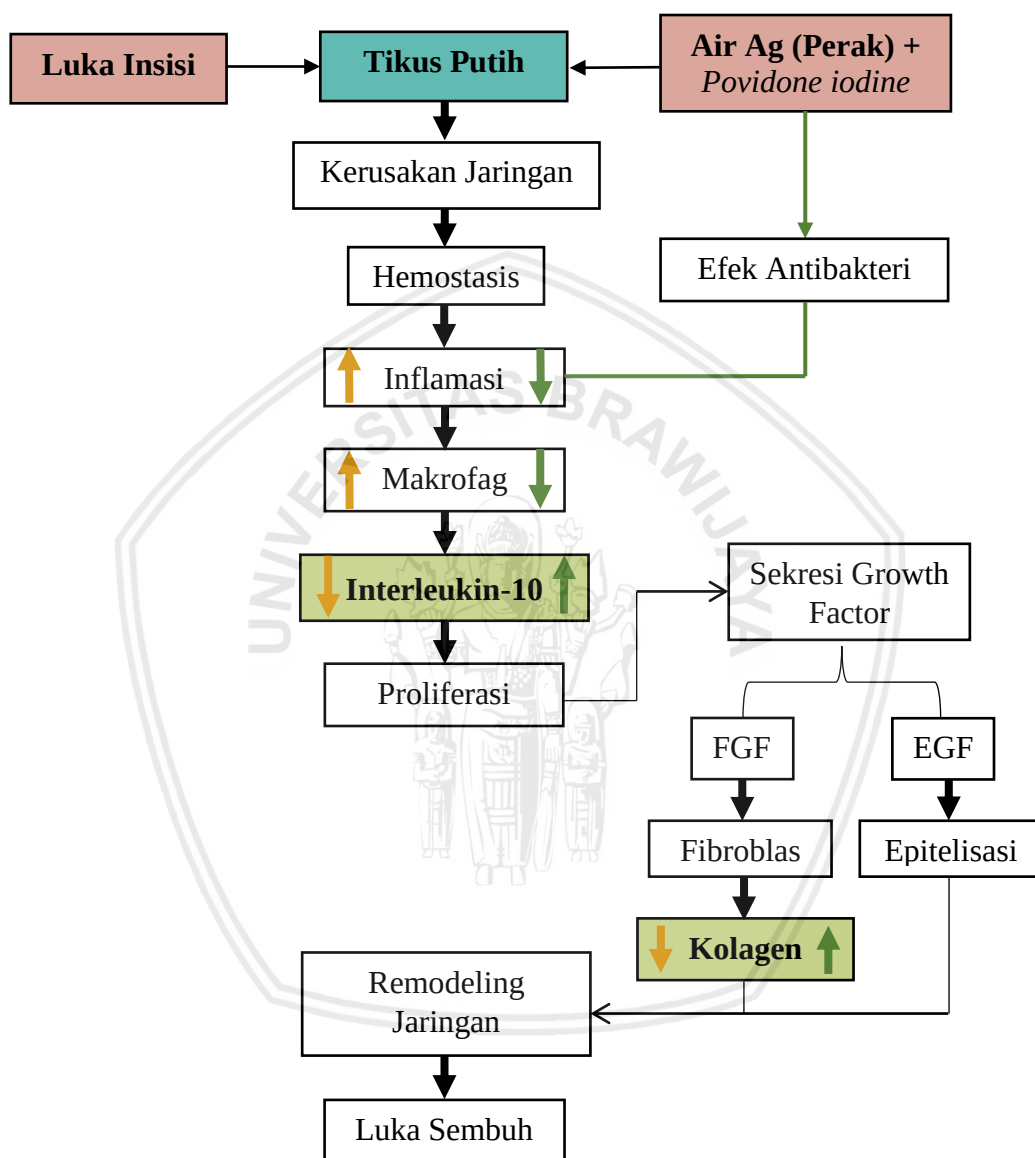
Kolagen disintesa terutama oleh sel *fibroblast* dan diatur oleh koordinasi dari aksi sejumlah kolagen m-RNA dan konsentrasi IL-1 sehingga akan merangsang produksi kolagen oleh *fibroblast*. Fibroblas akan berikatan dengan serabut dari matrik fibrin dan mulai memproduksi kolagen, sampai saat ini telah diketahui ada 23 jenis kolagen, yang dominan ditemukan pada kulit adalah kolagen tipe 1. Pembentukan kolagen dimulai dari pembentukan prokolagen dengan karakter khas triple helix, setelah di sekresikan ke dalam ruang ekstraselular, kemudian akan mengalami hidroksilasi dan kemudian mengalami pembelahan pada gugus terminal peptida prokolagen N dan C oleh enzim lysyl oxydase yang memungkinkan terjadinya crosslink yang lebih stabil. Kolagen normal pada kulit tersusun teratur dan memiliki kekuatan regangan yang setara dengan baja, namun pada jaringan parut, ukurannya lebih kecil dan tidak beraturan, sehingga lebih lemah dan mudah sekali rusak dibandingkan jaringan sekitarnya. Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan

sitokin yang diproduksi oleh leukosit dan limfosit pada saat sintesis kolagen. Pada proses *remodelling* jaringan, faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF β , IL-1, TNF- α akan menstimulasi sintesis kolagen serta jaringan ikat lain yang selanjutnya sitokin dan faktor pertumbuhan memodulasi sintesis dan aktivasi metaloproteinase, suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen ECM. Hasil dari sintesis dan degradasi ECM merupakan *remodelling* kerangka jaringan ikat, dan struktur ini merupakan gambaran pokok penyembuhan luka pada inflamasi kronis. Sedangkan proses degradasi kolagen dan protein ECM lain dilaksanakan oleh metaloproteinase. Metaloproteinase terdiri atas interstitial kolagenase dan gelatinase, diproduksi oleh beberapa macam sel seperti *fibroblast*, makrofag, neutrofil, sel sinovial dan beberapa sel epitel (Cotran *et al.*, 1999).

Sintesis kolagen pada fase proliferasi dapat optimal jika masa inflamasi tidak mengalami perpanjangan (Gauglitz *et al.*, 2011). Sebuah penelitian oleh Novriansyah (2008) juga menyatakan bahwa tingginya densitas kolagen pada fase proliferasi merupakan tanda proses penyembuhan luka terjadi lebih cepat dan menurunkan potensi terbentuknya skar yang buruk.

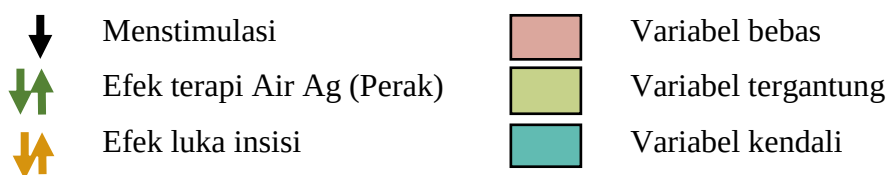
BAB III KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori

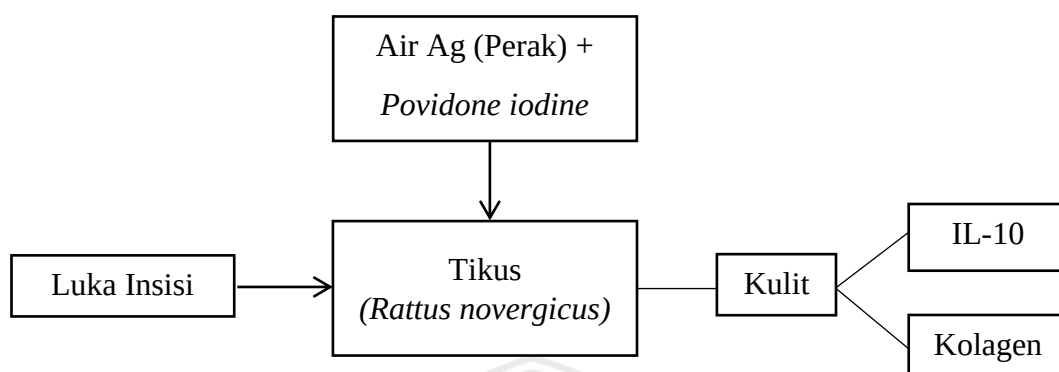


Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:



3.2 Kerangka Konsep



Luka insisi yang menyebabkan terjadinya kerusakan perifer akan mengaktivasi platelet dan menyebabkan terjadinya proses hemostasis. Mekanisme hemostasis merupakan proses alami dari tubuh yang bertujuan mencegah keluarnya darah yang berlebih. Pada proses ini akan terjadi vasokonstriksi pembuluh darah terlebih dahulu. Terjadinya luka dan terbukanya pembuluh darah akan memulai keluarnya kolagen dari lapisan sub endotel yang berperan penting untuk mengikat dan mengaktifkan trombosit. Kolagen yang keluar ini akan membantu proses pembentukan sumbat trombosit dan proses koagulasi sampai terbentuknya fibrin yang saling terikat atau bekuan darah. Fase inflamasi selanjutnya berlangsung, leukosit serta makrofag akan mengambil fungsi fagositosis yang akan mengeleminasi bakteri patogen yang masuk. Inflamasi distimulasi oleh faktor kimia seperti sitokin yang akan mempromosikan migrasi sel imun dari pembuluh darah ke jaringan yang mengalami inflamasi. Pada fase ini juga terjadi vasodilatasi pembuluh darah yang akan meningkatkan aliran darah sehingga diharapkan lebih banyak lagi sel imun akan bermigrasi ke jaringan tersebut dan membantu fagositosis.

Keadaan jumlah sel-sel radang yang meningkat akan menyebabkan fase inflamasi tidak akan berlangsung secara cepat sehingga fase penyembuhan tidak dapat berlanjut ke tahap proliferasi. Selama proses inflamasi berlangsung, diproduksi sinyal untuk menghentikan reaksi inflamasi. Mekanisme ini meliputi perubahan produksi mediator proinflamasi menjadi mediator antiinflamasi seperti Interleukin 10 (IL-10), *transforming growth factor- β* (TGF- β) dan perubahan kolinergik yang menghambat produksi mediator inflamasi pada makrofag.

IL-10 bekerja pada sistem imun dan memiliki fungsi sebagai anti-inflamasi. IL-10 adalah salah satu sitokin anti inflamasi, berfungsi menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain seperti TNF α , IL-1 dan IL-6, dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Dampak akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non spesifik maupun spesifik yang diperantarai oleh sel T (Bardram *et al*, 1995). Sistem tersebut dibutuhkan untuk mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan yang dapat memicu kerusakan jaringan (Chung dkk, 2011).

Untuk mempercepat fase diatas, air Ag (Perak) dengan efek antibakteri dapat mempercepat proses inflamasi sehingga dapat berlanjut pada tahap proliferasi. Ion Ag⁺ akan mengikat bagian membran bermuatan negatif yang menciptakan lubang di membran, menyebabkan isi sitoplasma keluar sel dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Knetsch and Koole, 2011). Selain itu, keberadaan ion Ag⁺ di dalam sel dapat mengganggu fungsi rantai transpor elektron bakteri. Ion Ag⁺ juga berikatan dengan DNA dan RNA dari bakteri dan menghambat replikasi sel (Pelgrift and Friedman, 2013). Sehingga dengan

bantuan air perak sebagai antibakteri dapat mempercepat terjadinya proses inflamasi sehingga fase selanjutnya dapat berjalan. Pemberian air perak juga memiliki sifat anti-inflamasi. Perak dapat mengurangi peradangan luka dengan menekan tingkat penanda inflamasi pada hewan. Perak terlibat dalam mengubah atau menekan kejadian inflamasi dengan menyeimbangkan tingkat mediator inflamasi yang dikeluarkan selama infeksi (Abebayehu *et al.*, 2013).

Fase ketiga adalah proliferasi, selain platelet makrofag juga turut membantu dalam proses inisiasi *growth factor*. *Growth factor* ini akan mensekresikan VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) yang berperan dalam proses angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru. Sekresi FGF (*Fibroblast Growth Factor*) juga berperan dalam fibroplasia, dimana dalam proses ini terjadi migrasi fibrin ke daerah luka serta produksi kolagen dan matriks ekstraseluler baru oleh fibroblas yang berperan utama dalam pembentukan jaringan granulasi atau jaringan ikat. Sintesis kolagen pada fase proliferasi dapat optimal jika masa inflamasi tidak mengalami perpanjangan (Gauglitz *et al* 2011). Jika luka tidak segera masuk ke fase proliferasi maka produksi *growth factor* tidak akan tinggi sehingga luka tidak akan cepat sembuh. EGF (*Epidermal Growth Factor*) juga merupakan faktor umum yang merangsang proliferasi sel terutama fibroblas dan sel epitel pada reepitelisasi.

Fase selanjutnya yaitu fase maturasi atau *remodelling* yang akan terjadi proses penyembuhan luka pada jaringan dermal. Sintesa kolagen yang telah dimulai pada fase proliferasi akan dilanjutkan pada fase maturasi. Fase ini merupakan hasil tumpang tindih dari fase proliferasi. Proses ini bertujuan untuk

memulihkan struktur normal jaringan yaitu perubahan matriks ekstraseluler menjadi matur yang dibantu oleh matriks metaloproteinase (MMP). Penyembuhan akan tercapai secara optimal jika terjadi keseimbangan antara kolagen, elastin dan fibroblas yang di produksi (Cotran *et al*, 1999).

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian Air Ag (Perak) secara topikal dapat meningkatkan ekspresi IL-10 pada luka insisi hewan model tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian Air Ag (Perak) secara topikal dapat meningkatkan kepadatan kolagen pada luka insisi hewan model tikus (*Rattus norvegicus*).

BAB IV METODELOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan bulan November 2018 :

- a. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- b. Pembuatan Air Ag (Perak) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang.
- c. Pengukuran ekspresi IL-10 dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.
- d. Pembuatan histopatologi kulit dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* untuk kepadatan kolagen serta pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang memiliki berat badan 179-205 g dengan usia 8-12 minggu. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium.

Berdasarkan perhitungan dengan rumus Frederer (1977), maka dalam penelitian ini dibutuhkan hewan coba sejumlah 20 ekor yang dibagi dalam 4 perlakuan berbeda. Masing-masing perlakuan membutuhkan 5 kali ulangan, sehingga setiap perlakuan membutuhkan 5 ekor hewan coba.

Jumlah hewan coba yang digunakan sebagai sampel didapatkan menggunakan rumus Federer (1977) dibawah ini:

$$\begin{array}{ll} t(n-1) & \geq 15 \\ 4(n-1) & \geq 15 \\ 4n-4 & \geq 15 \\ 4n & \geq 19 \\ n & \geq 5 \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{Keterangan} \\ t : \text{jumlah kelompok perlakuan} \\ n : \text{jumlah ulangan yang diperlukan} \end{array}$$

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain post test only control group menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan 1 (P.1), kelompok perlakuan 2 (P.2) dan kelompok perlakuan 3 (P.3). Setiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus. Kelompok perlakuan penelitian ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok Tikus	Perlakuan
(Kontrol negatif)	Kelompok tikus yang diberi ransum standar dan minum secara <i>ad libitum</i> , tanpa diberi perlakuan insisi.
P.1	Kelompok tikus yang diberi ransum standar dan minum secara <i>ad libitum</i> , dengan perlakuan insisi dan diberi povidone iodine 0,5 mL hingga hari ke delapan.
P.2	Kelompok tikus yang diberi ransum standar dan minum secara <i>ad libitum</i> , dengan perlakuan insisi kemudian diberi povidone 0,5 mL dan air Ag (Perak) 0,5 mL hingga hari ke delapan.
P.3	Kelompok tikus yang diberi ransum standar dan minum secara <i>ad libitum</i> , dengan perlakuan insisi kemudian diberi air Ag (Perak) 0,5 mL hingga hari ke delapan.

Tabel 4.2 Tabel ANOVA (*Analysis of Variance*)

S.V	df ^x	SS	MS ^{xx}	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%
Treatment	4	SST	MST	$\frac{MST}{MSE}$	3,06	4,89
Error	15	SSE	MSE			
Total	19					

Keterangan:

x). d.f *varietas (treatment)* = $t - 1 = 5 - 1 = 4$

d.f total = $nt - 1 = 20 - 1 = 19$

d.f *error* = $df \text{ total} - df \text{ varietas} = 19 - 4 = 15$

xx). MS *varietas* = $\frac{ss \text{ Varietas}}{df \text{ Varietas}}$

MS *error* = $\frac{ss \text{ error}}{df \text{ error}}$

xxx). F *Calculated* = $\frac{MS \text{ Varietas}}{MS \text{ error}}$

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati pada penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas: Terapi Air Ag (Perak), luka insisi
- b. Variabel terikat : Ekspresi IL-10 dan kepadatan kolagen
- c. Variabel kontrol :
 1. Homogenisitas tikus (berat badan, umur, dan jenis kelamin tikus), pakan, dan kondisi kandang.
 2. Intensitas pemberian terapi

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus, botol minum tikus, underpad, *box* pakan, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan (*glove*), *masker*, spuit 1 cc, tabung *valcon*, timbangan digital, gelas ukur 10 mL, mortar, *object glass*, *cover glass*, mikrotom, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), flowcytometry BD FACSCalibur™, kamera digital, *centrifuge* (*Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*), *appendorf micropipette* ukuran 10–100 µl, pisau, gunting, pot organ, *disposable syringe*, dan lemari pendingin.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 8 – 12 minggu, *povidone iodine* 10% Betadine®, Air Ag (Perak), antibody IL-10 BIOSS®, formalin 10%, media *Phosphate Buffer Saline* (PBS), etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, *Xylol*, *Para Formal Dehyde* (PFA) 4%, parafin blok, formalin 34 dengan konsentrasi 10%, aquades, aquabides, paraffin, *Trichrome Stain Kit (Modified Masson's)* ScyTek®, Ketamin 40 mg/Kg BB dan Xilazine 5 mg/Kg BB.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Model

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan tikus antara 179 - 205 gram yang diperoleh dari Laboratorium

Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Aklimatisasi hewan coba selama satu minggu dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba meliputi fisiologi normal tikus, aktivitas, berat badan, feses dan urinasi hewan. Pemberian pakan selama masa aklimatisasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 40 gram/ekor/hari dalam bentuk pelet (10% dari berat badan) dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

4.6.2 Pembuatan Air Ag (Perak)

Air Ag (Perak) yang digunakan pada penelitian ini merupakan produk jadi dalam bentuk sediaan cair yang dibuat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Perak yang digunakan sebagai agen antimikrobal merupakan ion perak yang bermuatan positif (Ag^+) (Leaper, 2012). Air Ag (Perak) yang digunakan dalam penelitian sebagai terapi untuk perlakuan mengandung 20 ppm kadar perak. Pada pemberian terapi luka insisi, Air Ag (Perak) yang digunakan sebanyak 0,5 mL.

4.6.3 Pembuatan Hewan Model Luka Insisi

Pada penelitian ini digunakan 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan tikus antara 179-205 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum dibuat luka insisi, hewan terlebih dahulu diberi anestesi berupa pemberian Ketamin 40 mg/Kg BB dan Xilazine 5 mg/Kg BB pada *M. semimembranosus*. Daerah yang akan diinsisi dicukur terlebih dahulu menggunakan silet dan diukur menggunakan penggaris sepanjang 2 cm untuk

memastikan panjang insisi sama. Daerah yang akan diinsisi dibersihkan terlebih dahulu dengan larutan alkohol dan baru dilakukan insisi dan selanjutnya dilakukan insisi pada bagian dorsal dengan menggunakan blade dari arah cranial menuju caudal dengan panjang insisi 2 cm.

4.6.4 Pemberian Terapi Air Ag (Perak)

Masing-masing hewan coba diberi terapi sebanyak dua kali sehari. Air Ag (Perak) diberikan secara topikal, yaitu dengan cara meneteskan air ke lokasi luka. Air Ag (Perak) sebanyak 0,5 mL. Kelompok hewan coba K (-) tidak diinsisi dan tidak diberi terapi apapun. Kelompok hewan P.1 diberi *Povidone Iodine 10%* sebanyak 0,5 mL. Untuk kelompok P.2 diberikan terapi Air Ag (Perak) kadar 20 ppm sebanyak 0,5 mL. Sedangkan, kelompok P.3 diberi kombinasi terapi *Povidone Iodine 10%* sebanyak 0,5 mL dan Air Ag (Perak) kadar 20 ppm sebanyak 0,5 mL dengan perbandingan 1:1. Setelah diteteskan terapi lokasi luka segera ditutup dengan kasa steril agar tidak terkontaminasi. Lama terapi yang diberikan adalah 7 hari.

4.6.5 Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan dimulai dengan pemberian anastesi terlebih dahulu sebelum hewan didislokasi dengan pemberian ketamin 1cc/kgBB. Tikus yang telah dianastesi kemudian dilakukan *dislokasio os cervicalis*. *Cervical dislocation* (pemutaran leher) merupakan metode euthanasia untuk burung, hewan dengan BB 125g – 1 kg.

Hewan yang akan dimatikan harus dalam keadaan telah anastesi dan tidak boleh dilakukan dalam keadaan sadar. Metode ini tidak diperbolehkan untuk

hewan kelinci atau rodensia dengan BB > 1kg, anjing, kucing, dan ternak potong. Teknik ini sangat efektif, cepat, murah dan efek terhadap diagnostic sangat rendah (Setiatin, 2004). Organ yang diambil disimpan dalam formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologi.

4.6.6 Ekspresi Interleukin 10 dengan Analisa Flowcytometry

Sel-sel hasil isolasi sel dari organ kulit yang telah ditambahkan antibodi *Mouse* anti-IL10, dikonjugasi dengan label PE Cy 7. Sampel tersebut didapatkan dengan menambah 1 mL PBS dan ditempatkan pada kuvet *flow cytometry*. Selanjutnya dilakukan pemfilteran menggunakan wire filter dan dilakukan sentrifugasi 1500 rpm dengan suhu 20°C selama 5 menit. Hasil supernatant dibuang dan endapannya direndam cytofix dan cytoferm 100 µL selama 20 menit untuk memudahkan antibodi masuk ke sel lalu ditambah 50 µL *antibody intraselluler staining* (IL-10) (Hefni, 2013).

Flow cytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibody, kemudian hasil yang diperoleh diolah dengan program BD cellquest Pro™ (Pinca dkk, 2017).

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Pembuatan preparat kulit diawali dengan fiksasi jaringan, dimana eksisi biopsi kulit direndam dalam formalin 10% selama kurang lebih 18-24 jam. Setelah itu, jaringan segera dimasukkan pada aquades selama satu jam agar bersih dari larutan fiksasi.

Tahap selanjutnya adalah dehidrasi, dimana eksisi biopsi dimasukkan pada larutan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 100%. Tahapan ini bertujuan agar

memudahkan paraffin cair masuk dan mengisi ruang yang ada pada sel. Jaringan yang sudah lebih jernih tersebut dimasukkan dalam alkohol-xylol selama satu jam, dan xylol murni selama 2 x 2 jam. Potongan jaringan tersebut bisa dimasukkan pada paraffin cair selama 2 x 2 jam.

Potongan jaringan yang telah dimasukkan pada paraffin cair ditunggu hingga memadat. Jaringan dalam paraffin tersebut dipotong dengan ketebalan 5 mikron dengan menggunakan mikrotom. Potongan jaringan diletakkan pada object glass yang telah dilapisi gelatin sebagai perekat untuk pewarnaan *Masson's Trichrome*.

4.6.8 Pewarnaan Masson's Trichrome

Pewarnaan *Masson's Trichrome* adalah pewarnaan yang khusus untuk serat elastin dan retikulen, serat retikulen merupakan serat kolagen yang kaya akan selubung glikoprotein. Pewarnaan *Masson's Trichrome* akan memberikan warna ungu hingga hitam pada inti sel, warna biru hingga hijau pada kolagen dan warna merah pada otot, sitoplasma dan keratin (Triyono, 2005).

Pewarnaan ini dimulai dengan proses deparaffinisasi dan rehidrasi. Pertama ditetaskan larutan Neutral Red 0,5% selama lima menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama lima menit lalu dibilas menggunakan aquades. Ditetaskan larutan Acis Fucshin selama lima menit yang kemudian dicuci dengan aquades selama lima menit. Selanjutnya, ditetaskan larutan Methyl blue selama dua hingga lima menit dan kemudian dibilas dengan aquades selama lima menit. Ditetaskan larutan Acetid acid 1% selama dua menit setelahnya dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol 95% dan 100%. Dibersihkan menggunakan

xylene sebanyak dua kali yang selanjutnya dilakukan mounting dengan balsam kanada dan ditutup dengan cover glass.

4.6.9 Pengukuran Kepadatan Kolagen

Pengamatan dan pengukuran kepadatan kolagen dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus seri EX51 dengan perbesaran 400 kali pada lima lapang pandang. Pengamatan kolagen dilakukan di area bekas insisi yang kemudian diinterpretasikan secara semikuantitatif menggunakan skoring berdasarkan parameter histopatologi menurut Novriansyah (2008) pada **Tabel 4.3** yang juga telah disepakati oleh ahli patologi.

Tabel 4.3 Parameter Skor Penilaian Histopatologi Kepadatan Kolagen

SKOR	Keterangan
(+0)	Tidak ditemukan adanya serabut kolagen
(+1)	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rendah
(+2)	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sedang
(+3)	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rapat
(+4)	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sangat rapat

4.6.10 Analisa Data

Analisa data yang digunakan yaitu analisa secara deskriptif untuk parameter kepadatan kolagen. Data penelitian berupa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi IL-10 dengan menggunakan metode *flowcytometry*. Selanjutnya dilakukan analisis statistika dengan metode One-Way ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) untuk melihat pengaruh pemberian Air Ag (Perak) terhadap luka insisi yang paling optimal.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan luka terbuka dengan tipe luka insisi dibuat menggunakan blade yang sebelumnya diukur sepanjang 2 cm (**Gambar 5.1**). Daerah yang akan diinsisi dibersihkan terlebih dahulu dengan larutan alkohol dan baru dilakukan insisi hingga kedalaman mencapai subcutan. Setelah dilakukan insisi maka tikus siap diberikan perlakuan menurut kelompok masing-masing. Setiap hari setelah pemberian terapi, luka dibalut menggunakan hypafix untuk menjaga agar luka tetap bersih.



Gambar 5.1 Pembuatan Luka Insisi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) sepanjang 2 cm dengan kedalaman mencapai subukutan

Tikus yang sudah diinsisi sepanjang 2 cm diberikan terapi *Povidone Iodine* 10% sebanyak 0,5 mL untuk kelompok P1, terapi Air Ag (Perak) sebanyak 0,5 mL untuk kelompok P2, dan terapi kombinasi Air Ag (Perak) dan *Povidone Iodine* 10% sebanyak 0,5 mL untuk kelompok P3. Pemberian terapi diberikan sebanyak dua kali selama 7 hari pada area insisi.



Gambar 5.2 Gambar Makroskopis Kulit Tikus Pasca Insisi dan Perlakuan Hari Ke-3

Keterangan (A) Kelompok Kontrol Negatif (K-), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P.1) terapi *Povidone iodine* 10%, (C) Kelompok Perlakuan 2 (P.2) terapi Air Ag (Perak), (D) Kelompok Perlakuan 3 (P.3) terapi *Povidone iodine* 10% dan Air Ag (Perak).

Pengamatan gambaran makroskopis kulit tikus pada hari ke -3 untuk kelompok tikus kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan apapun menunjukkan kulit dalam keadaan normal seperti dapat terlihat pada **Gambar 5.2**

A. Adapun kriteria penyembuhan luka insisi dengan fase inflamasi menurut Sjamsuhidayat dan De Jong (2005) yaitu 1) kemerahan pada luka dan sekitarnya, 2) edema jaringan sekitarnya, 3) cairan pada luka. Sedangkan kriteria pada fase proliferasi yaitu 1) granulasi pada jaringan luka, 2) tepi luka insisi menyatu dengan tepi luka lain dan 3) bentuk struktur kulit.

Kelompok tikus P.1 yang diberikan luka insisi dengan terapi *Povidone Iodine* 10% pada **Gambar 5.2 B** menunjukkan luka yang belum tertutup atau masih dalam fase inflamasi, bagian kulit terlihat mengalami rubor atau kemerahan, sedikit pembengkakan di pinggiran luka, dan belum terlihat adanya rambut yang tumbuh di daerah kulit yang dicukur. Kelompok tikus P.2 yang diberikan perlakuan luka insisi dengan terapi Air Ag (Perak) pada **Gambar 5.2 C** terlihat luka belum mulai menutup, tampak adanya krusta dipinggiran luka, adanya sedikit pembengkakan. Untuk kelompok tikus luka insisi P.3 pada

Gambar 5.2 D yang diberikan terapi kombinasi Air Ag (Perak) dan dan *Povidone Iodine* 10% terlihat luka belum menutup, terdapat banyak krusta yang menutupi luka insisi, sedikit pembengkakan di daerah luka dan pada daerah yang dicukur sudah mulai ditumbuhi rambut halus.



Gambar 5.3 Gambar Makroskopis Kulit Tikus Pasca Insisi Dan Perlakuan Hari Ke-7
Keterangan (A) Kelompok Kontrol Negative (K-), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P.1) terapi *Povidone iodine* 10%, (C) Kelompok Perlakuan 2 (P.2) terapi Air Ag (Perak), (D) Kelompok Perlakuan 3 (P.3) terapi *Povidone iodine* 10% dan Air Ag (Perak)

Gambaran makroskopis kulit tikus pasca luka insisi dan terapi pada hari ke -7 untuk kelompok tikus P.1 pada **Gambar 5.3 B** terlihat sudah mulai terjadi penutupan luka, kulit tidak mengalami rubor seperti pada pengamatan hari ke-3, tidak ada pembengkakan, dan pada daerah kulit yang dicukur masih belum tumbuh rambut. Kelompok tikus P.2 pada **Gambar 5.3 C** menunjukkan luka yang sudah cukup banyak menutup, garis insisi mengecil, tidak ada pembengkakan dan pada daerah yang dicukur sudah ditumbuhi banyak rambut yang menandakan penyembuhan sudah dalam proses proliferasi. Kelompok tikus P.3 pada **Gambar 5.3 D** juga memperlihatkan luka sudah menutup namun belum sempurna, garis insisi mengecil dan pada daerah yang dicukur sudah ditumbuhi rambut tebal.

Berdasarkan pengamatan gambaran makroskopis dari empat kelompok perlakuan yang diberi terapi pasca insisi dapat dilihat bahwa pada kelompok tikus P.2 dengan pemberian terapi Air Ag (Perak) dan kelompok tikus P.3 dengan pemberian terapi kombinasi Air Ag (Perak) dan *Povidone Iodine 10%* menunjukkan proses penyembuhan luka yang paling cepat dibandingkan kelompok tikus P.1 yang diterapi dengan pemberian *Povidone Iodine 10%*.

5.1 Terapi Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Ekspresi IL-10 pada Proses Kesembuhan Luka Insisi Tikus

Terjadinya proses penyembuhan luka tidak terlepas dari peran faktor pertumbuhan dan sitokin. Sitokin merupakan protein yang berfungsi sebagai mediator inflamasi dan pengatur imunitas. Salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses ini yaitu Interleukin-10 (IL-10).

IL-10 merupakan salah satu sitokin anti-inflamasi yang berfungsi menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain yaitu sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, TNF α dan IL-12. Kadar sitokin IL-10 sebagai respon terhadap inflamasi selain berfungsi sebagai sitokin anti-inflamasi. IL-10 disekresikan oleh sel T dan makrofag untuk merangsang respon kekebalan tubuh selama infeksi. Proses diatas sangat penting dalam mempercepat fase inflamasi agar segera berlanjut ke fase proliferasi dan proses penyembuhan luka berlangsung sampai terbentuknya jaringan baru.

Pada penelitian ini, kadar IL-10 ditentukan dengan menggunakan metode *flowcytometry* pada software *BD Cellquest Pro™* yang kemudian di uji statistika dengan menggunakan One Way ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%

menggunakan *software statistical package for the social science* (SPSS) for Windows 22.

Tabel 5.1 ANOVA (*Analysis of Variance*) Ekspresi IL-10

S.V.	df	SS	MS	F _{hitung}	F5%	F1%
Treatment	4	183.893	61,298	3,401	3,06	4,89
Error	15	288.369	18,023			
Total	19	472.263				

Data uji pada **Tabel 5.1** menunjukkan F hit (3,401) > F tabel 5% (3,06) yang berarti ada pengaruh yang berbeda nyata. Dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata ($p < 0,05$) antara pemberian terapi terhadap peningkatan ekspresi IL-10. Hasil uji statistika ekspresi IL-10 secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Analisa dilanjutkan dengan Uji Tukey atau BNJ (Beda Nyata Jujur) guna membandingkan rata-rata setiap kelompok perlakuan dari perbedaan notasi yang ada. Hasil uji tukey dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.

Terapi luka insisi dengan pemberian Air Ag (Perak) mampu mempengaruhi ekspresi IL-10 secara signifikan ($p < 0,05$). Nilai rata-rata ekspresi IL-10 antar kelompok perlakuan terlihat berbeda namun tidak signifikan. Hasil uji tukey terhadap ekspresi IL-10 pada hari ke-7 pada kelompok kontrol K(-) atau kelompok tikus sehat memiliki rata-rata 6.1940 ± 1.91189 yang digunakan sebagai standar atau pembanding untuk menentukan adanya penurunan maupun peningkatan yang terjadi pada kelompok perlakuan lainnya. Kelompok tikus P.1 dengan pemberian terapi *Povidone Iodine* 10% memiliki rata-rata 9.0580 ± 3.49153 dengan nilai presentasi peningkatan terhadap K(-) 0.46%. Hasil rata-rata

kelompok P.2 dengan pemberian terapi Air Ag (Perak) memiliki nilai 14.4420 ± 3.95755 dan menunjukkan nilai persentasi peningkatan 1.33%. Pada kelompok P.3 yaitu kelompok terapi kombinasi *Povidone Iodine* 10% dan Air Ag (Perak) menunjukkan nilai rata-rata 8.3900 ± 6.37056 serta nilai persentasi peningkatan 0.35%.

Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey Rata-rata Ekspresi IL-10

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi IL-10 (Rata-rata $\pm$ SD)	Peningkatan terhadap K(-)
Kontrol (-)	6.1940 ± 1.91189^a	-
P.1 (<i>Povidone Iodine</i> 10%)	9.0580 ± 3.49153^{ab}	0.46%
P.2 (Air Ag Perak)	14.4420 ± 3.95755^b	1.33%
P.3 (<i>Povidone Iodine</i> 10% + Air Ag Perak)	8.3900 ± 6.37056^{ab}	0.35%

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

Ekspresi IL-10 pada kelompok perlakuan P.2 dengan terapi pemberian Air Ag (Perak) memiliki nilai rata-rata paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain dan memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok K(-). Hal ini menunjukkan bahwa Air Ag (Perak) dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dengan cara menekan dan menghambat sekresi mediator sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan TNF α sehingga mempercepat proses inflamasi dan dapat menunjukkan bahwa luka sudah memasuki tahap proliferasi karena nilai ekspresinya yang tinggi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Landsdown (2004) yang menyebutkan bahwa perak memiliki efek antiinflamasi dengan menekan tingkat penanda inflamasi (IL-1 dan TNF α). Peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi IL-10 akan menyebabkan fase inflamasi berlangsung lebih cepat dan akan mempercepat proses penyembuhan luka. Ag (Perak) juga bersifat sebagai antibakteri yang dapat mengikat bagian

membran bakteri yang bermuatan negatif dan menciptakan lubang membran sehingga menyebabkan isi sitoplasma keluar dari sel dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Knetsch and Koole, 2011). Proses tersebut dapat membantu mempercepat tugas sel-sel imun dan mediator-mediator inflamasi dalam fase inflamasi sehingga dapat segera berlanjut pada fase selanjutnya.

Nilai rata-rata ekspresi IL-10 pada kelompok tikus P.1 menunjukkan adanya peningkatan terhadap kelompok K(-) serta memiliki nilai rata-rata yang lebih tinggi dari kelompok P.3, namun nilai rata-rata antara keduanya tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Peningkatan ekspresi IL-10 pada tikus P.1 disebabkan oleh sifat antibakteri *Povidone Iodine* 10% yang dapat mengurangi infiltrasi neutrofil dan makrofag yang juga akan mengurangi ekspresi sitokin pro-inflamasi. Peningkatan ini menunjukkan proses penyembuhan yang sudah berlanjut pada tahap proliferasi yang ditandai oleh turunnya kadar sitokin pro-inflamasi serta naiknya kadar sitokin anti-inflamasi IL-10. Hasil ekspresi IL-10 pada kelompok tikus P.3 juga menunjukkan adanya peningkatan terhadap kelompok K(-), namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan jika dibandingkan antar kelompok perlakuan lainnya. Nilai ekspresi IL-10 yang menurun dibandingkan kelompok lain pada kelompok P.3 ini berbeda dengan analisa hasil pada kepadatan kolagen kulit serta gambaran makroskopis yang mana kelompok ini menunjukkan nilai yang paling baik diantara semua perlakuan. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh adanya kesalahan pada prosedur *flowcytometry* terutama saat proses penggerusan organ kulit. Pada prosedur ini, organ kulit termasuk sulit untuk digerus dikarenakan sifatnya yang lentur dan licin

serta tidak mudah hancur. Hal ini dapat menyebabkan saat penggerusan organ kulit sel-sel yang diharapkan keluar tidak dapat keluar dengan baik karena bedanya tekanan yang diberikan saat penggerusan dan jumlah sel yang mengendap saat sentrifugasi lebih sedikit.

Hasil uraian ekspresi IL-10 berdasarkan analisa statistika one-way ANOVA diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian terapi dengan Air Ag (Perak) pada kelompok P.2 dengan pemberian terapi Air Ag (Perak) memiliki nilai ekspresi IL-10 yang paling tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok K(-) dimana menunjukkan bahwa pemberian Air Ag (Perak) dengan efek antibakteri dan antiinflamasi membantu menekan tingkat penanda inflamasi seperti sel-sel radang dan sitokin pro-inflamasi yang ditandai dengan naiknya kadar sitokin anti-inflamasi sehingga proses inflamasi berakhir dan masuk pada fase proliferasi guna mempercepat penyembuhan.

5.2 Terapi Pemberian Air Ag (Perak) Terhadap Kepadatan Kolagen pada

Proses Kesembuhan Luka Insisi Tikus

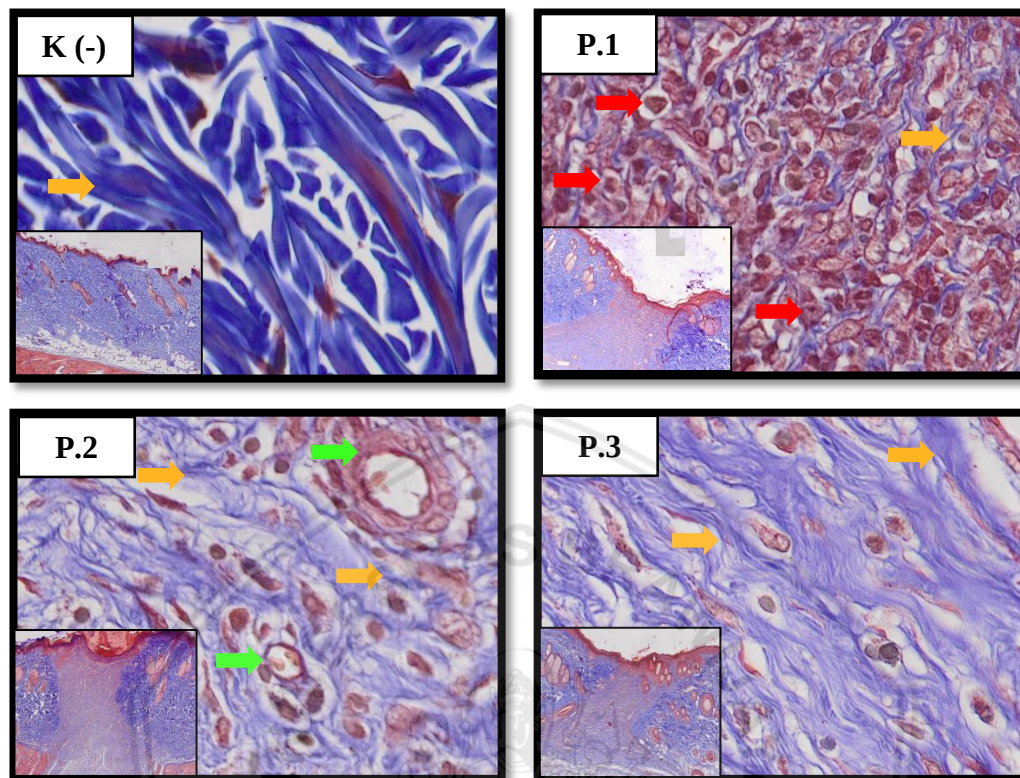
Parameter yang diukur untuk melihat keberhasilan terapi Air Ag (Perak) pada tikus yang diberi luka insisi juga dilihat melalui pengamatan histopatologi kepadatan kolagen yang dibuat menggunakan pewarnaan khusus *Masson's Trichrome*. Pewarnaan *Masson's trichrome* disebut juga teknik pewarnaan jaringan ikat karena digunakan untuk menunjukkan elemen pendukung jaringan ikat terutama kolagen. Pewarnaan ini menghasilkan tiga warna; inti dan struktur *basophilic* lainnya berwarna ungu; kolagen berwarna hijau atau biru; dan

sitoplasma, otot, eritrosit, dan keratin diwarnai dengan warna merah (Young *et al*, 2006).

Penentuan skor kepadatan kolagen dilakukan berdasarkan sebaran kolagen, ketebalan dan kerapatan serabut-serabut kolagen. Hal tersebut dilakukan karena serabut kolagen dalam jaringan ikat bersifat tidak beraturan sehingga pengukuran diameter serabut sulit untuk dilakukan. Penilaian pembentukan kolagen ini dilakukan dalam lima lapang pandang di setiap preparat luka insisi yang diberi terapi air Ag dan *Povidone Iodine* 10% dengan perbesaran 400x. Penilaian kepadatan kolagen dikonversikan oleh Novriansyah (2008) menjadi skoring angka +0 sampai +4. Penetapan skoring diatas berdasarkan kriteria penilaian yang dapat dilihat pada **Tabel 5.3**.

Tabel 5.3 Kriteria Penilaian Skoring Kepadatan Kolagen

SKOR	Kriteria
+0 =	Tidak ditemukan adanya serabut kolagen pada daerah luka
+1 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rendah (kurang dari 10 % per lapangan pandang)
+2 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sedang (10 s/d 50 % per lapangan pandang)
+3 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rapat/padat (50 s/d 90 % per lapangan pandang)
+4 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sangat rapat/padat (90 s/d 100 % per lapangan pandang)



Gambar 5.4 Histopatologi Kolagen Jaringan Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* (Perbesaran 400x).

Keterangan: **K (-)** Kolagen pada kelompok tikus sehat tanpa insisi; **P.1** Kolagen pada kelompok tikus yang diterapi *Povidone Iodine* 10% 0,5 mL; **P.2** Kolagen kelompok tikus yang diterapi Air Ag (Perak) 0,5 mL; **P.3** Kolagen pada kelompok tikus yang diterapi kombinasi *Povidone Iodine* 10% dan Air Ag (Perak) 0,5 mL. Kolagen terwarnai biru keunguan dan tampak adanya pertumbuhan kolagen pada setiap kelompok perlakuan.

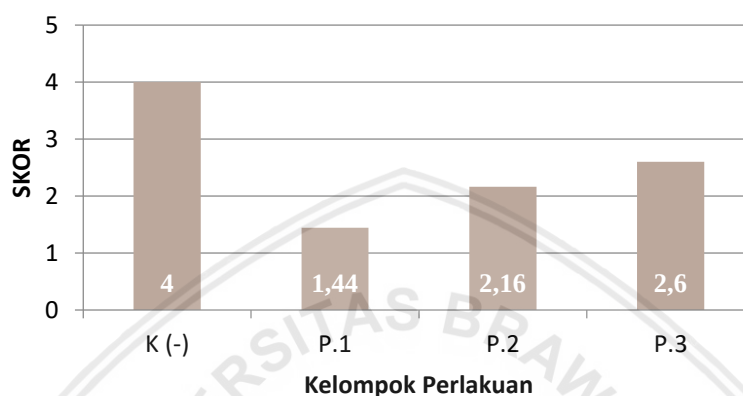
Kepadatan kolagen pada **K (-)** yaitu sangat padat dan tebal dengan Skor +4, sedangkan pada **P.1** memiliki tingkat kepadatan kolagen paling rendah dengan Skor +1, serta terlihat masih banyak sel radang. Tingkat kepadatan kolagen pada **P.2** memiliki tingkat kepadatan kolagen yang sedang dengan Skor +2 dan terlihat banyak terbentuknya pembuluh darah baru (angiogenesis). Kepadatan kolagen pada **P.3** memiliki hasil yang paling baik yaitu sedang sampai padat dengan Skor +2 sampai +3.

- ➡ = Kolagen
- ➡ = Sel Radang
- ➡ = Angiogenesis

Kontrol negatif merupakan kelompok tikus sehat yang tidak mendapatkan insisi dan terapi apapun. Berdasarkan **Gambar 5.4** hasil pewarnaan kolagen tampak berwarna biru. Kolagen pada tikus kontrol negatif **Gambar 5.4 K (-)** dapat terlihat terwarnai biru secara jelas dengan jarak dan ketebalan serabut kolagen yang padat. Kelompok kontrol ini digunakan sebagai pembanding peningkatan kepadatan kolagen pada kelompok terapi dimana kontrol negatif menjadi indikator normal bentuk dan kepadatan kolagen. Kelompok tikus dengan pemberian terapi *Povidone Iodine 10%* pada **Gambar 5.4 P.1** memperlihatkan kolagen yang tampak tidak terwarnai biru padat. Jarak dan ketebalan serabut kolagen jarang sampai sedang serta masih banyak terlihat sel yang terwarnai dengan warna merah yaitu sel-sel radang dimana ini berarti luka belum secara sempurna memasuki fase proliferasi atau masih dalam fase inflamasi. Pewarnaan kolagen pada **Gambar 5.4 P.2** kelompok terapi pemberian Air Ag (Perak) menunjukkan bahwa serabut kolagen terwarnai sedang dan jarak kepadatan sedikit renggang. Pada gambaran histopat kelompok ini juga sudah banyak terlihat banyaknya pembentukan pembuluh darah baru atau proses angiogenesis dimana ini menunjukkan sudah masuknya proses penyembuhan pada fase proliferasi. Kelompok tikus yang diberi terapi kombinasi *Povidone Iodine 10% + Air Ag* (Perak) **Gambar 5.4 P.3** terlihat memiliki ketebalan serabut kolagen paling padat dengan jarak kepadatan rapat jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Serabut kolagen terwarnai biru dengan jarak kepadatan yang sedang sampai rapat. Gambaran histopat kelompok ini juga terlihat sudah banyak

terbentuknya pembuluh darah baru yang menandakan proses penyembuhan sudah memasuki fase proliferasi.

KEPADATAN KOLAGEN



Gambar 5.5 Grafik Rata-rata Skor Kepadatan Kolagen

Keterangan: K (-) Tikus Sehat, P.1 Tikus dengan insisi diberi terapi *Povidone Iodine* 10% 0,5 mL, P.2 Tikus dengan insisi diberi terapi Air Ag (Perak) 0,5 mL, P.3 Tikus dengan insisi diberi terapi kombinasi *Povidone Iodine* 10% dan Air Ag (Perak) 0,5 mL.

Penilaian skor kepadatan kolagen pada setiap kelompok dapat dilihat pada grafik rata-rata skor kepadatan kolagen **Gambar 5.5**. Hasil perhitungan rata-rata skor kepadatan kolagen berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa kepadatan kolagen tikus model luka insisi pada hari ke-7 kelompok kontrol negatif menunjukkan tingkat padat dengan nilai skor rata-rata 4 atau sangat tebal dan padat. Kelompok perlakuan yang menunjukkan hasil pertumbuhan kolagen dengan kepadatan yang paling baik didapatkan pada kelompok tikus P.3 yang memiliki nilai rata-rata skor 2,6 selanjutnya diikuti oleh kelompok tikus P.2 dengan nilai rata-rata 2,16 atau kepadatan sedang. Kelompok yang menunjukkan pertumbuhan kolagen dengan kepadatan yang rendah ditunjukkan pada kelompok tikus P.1 dengan nilai rata-rata skor 1,44.

Kelompok kontrol negatif pada **Gambar 5.4 K (-)** terlihat memiliki serabut kolagen tebal dan padat berwarna biru. Gambaran ini menjadi indikator kepadatan kolagen karena merupakan gambaran normalnya pada tikus yang sehat. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menuliskan bahwa preparat histopatologi kulit tikus sehat, kolagen dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* akan tampak berwarna biru atau ungu padat dan serabut kolagennya tampak lebih teratur jika dibandingkan dengan kolagen pada kulit tikus dengan perlakuan insisi (Rizka *et al.*, 2013). Tingginya rata-rata ketebalan kolagen pada kelompok tikus sehat K(-) juga disebabkan karena adanya pembuluh darah normal yang berkerja menyuplai darah menuju jaringan ikat dan nutrisinya sehingga terjadi peningkatan ketebalan kolagen (Hurle, 2010).

Hasil gambaran kepadatan kolagen kelompok tikus perlakuan satu **Gambar 5.4 P.1** dengan pemberian *Povidone Iodine* 10% menunjukkan adanya pertumbuhan kolagen namun tidak terwarnai biru padat. Jarak dan ketebalan serabut kolagen termasuk dalam skoring rendah sampai sedang. Gambaran histopatologi juga dengan jelas banyak terlihat sel radang yang terwarnai dengan warna merah dimana ini berarti luka belum memasuki fase proliferasi secara sempurna. Hal ini dapat disebabkan karena lamanya proses inflamasi berlangsung pada kelompok tikus perlakuan satu dengan pemberian terapi *Povidone Iodine* 10%. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Pratiwi *et al* (2015) yang menyatakan bahwa pada pemberian *Povidone Iodine* yang berlebihan dapat menghambat jaringan granulasi luka, sehingga menghambat proses granulasi, penyatuan tepi luka dan kembalinya struktur kulit. *Povidone Iodine* juga dapat bersifat toksik

terhadap fibroblast dan leukosit, menghambat migrasi neutrofil dan menurunkan monosit sehingga memperlambat proses penyembuhan luka (Zakariya *et al.*, 2009). Migrasi neutrofil dan proliferasi yang meningkat akan mempengaruhi peningkatan pembentukan kolagen karena fibroblast berperan penting dalam pembentukan kolagen pada area luka sehingga menghambat proses granulasi, penyatuan tepi luka dan kembalinya struktur kulit. Jika terhambat maka proses inflamasi akan berlangsung lebih lama dan pembentukan kolagen baru juga akan terhambat karena proses penyembuhan yang tidak berlanjut pada fase proliferasi.

Kolagen merupakan protein matriks ekstraseluler yang berperan dalam formasi skar pada fase penyembuhan jaringan ikat. Sintesis kolagen pada fase proliferasi dapat optimal jika masa inflamasi tidak mengalami perpanjangan (Gauglitz *et al* 2011). Penelitian oleh Novriansyah (2008) juga menyatakan bahwa tingginya densitas kolagen pada fase proliferasi merupakan tanda proses penyembuhan luka terjadi lebih cepat dan akan menurunkan potensi terbentuknya skar yang buruk. Hasil terapi kombinasi Air Ag (Perak) dan *Povidone Iodine* 10% pada kelompok perlakuan tiga **Gambar 5.4 P.3** menunjukkan pertumbuhan kolagen yang paling baik dibandingkan kelompok lainnya. Densitas kolagen pada perlakuan ini masuk pada penilaian skor sedang sampai rapat sehingga dapat dikatakan proses penyembuhan luka pada kelompok perlakuan ini berjalan lebih cepat dibandingkan perlakuan satu. Pemberian terapi Air Ag (Perak) dengan efek antibakteri dan antiinflamasi membantu cepatnya proses penyembuhan luka. Air Ag menekan tingkat penanda inflamasi seperti sel-sel radang sehingga proses ini dapat selesai dan masuk pada fase proliferasi. Hal ini juga sesuai dengan

penelitian Landsdown (2004) yang menuliskan bahwa pemberian Air Ag pada luka secara signifikan akan meningkatkan jumlah fibroblast dalam kultur sel dan mengurangi infiltrasi neutrofil dan makrofag dalam model luka insisi yang menunjukkan penurunan respon inflamasi. Dengan adanya peningkatan jumlah fibroblast sebagai pembentuk utama kolagen maka akan meningkatkan densitas kolagen seiring berjalannya proses penyembuhan. Pemberian *Povidone Iodine* 10% yang dikenal efektif membunuh bakteri sebagai antibakteri lokal juga akan membantu dalam proses penyembuhan. Perawatan luka dengan *Povidone Iodine* 10% dapat membunuh bakteri patogen gram positif maupun negatif, sehingga fase inflamasi dapat terkendali (Morison, 2004).

Gambaran histopatologi kulit kelompok tikus perlakuan dua terapi Air Ag (Perak) pada **Gambar 5.4 P.2** menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan ini terjadi pertumbuhan kolagen yang cukup baik dengan skor kepadatan rata-rata sedang. Pada gambarannya juga terlihat beberapa pembentuk pembuluh darah baru atau angiogenesis di daerah bagian luka insisi yang menandakan bahwa proses penyembuhan luka sudah masuk pada fase proliferasi yang juga terlihat pada kelompok tikus perlakuan tiga **Gambar 5.4 P.3**. Hasil ini juga jauh lebih baik dibandingkan kelompok tikus perlakuan satu dan mendekati gambaran densitas perlakuan dua dan serabut kolagen terlihat mulai cukup teratur.

Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan rata-rata skor hasil kepadatan kolagen menunjukkan bahwa terapi luka insisi tikus dengan pemberian kombinasi Air Ag (Perak) dan *Povidone Iodine* 10% sebanyak 0,5 mL yang dilakukan dua kali sehari selama 7 hari memiliki pengaruh paling baik pada pembentukan

kolagen dibandingkan dengan pemberian terapi *Povidone Iodine* 10% sebanyak 0,5 mL dan pemberian terapi Air Ag (Perak) pada terapi penyembuhan luka.



BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi Air Ag (Perak) 20 ppm dapat meningkatkan kadar IL-10 dalam penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian terapi kombinasi Air Ag (Perak) dan *Povidone Iodine* 10% paling baik untuk meningkatkan kepadatan kolagen dalam penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*).

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Perlu diperhatikan pelaksanaan teknis prosedur *flowcytometry* agar tidak mengganggu hasil, sehingga hasil yang didapatkan maksimal.
2. Perlu dilakukan penelitian lagi menggunakan metode lain untuk menguji kadar ekspresi IL-10.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengkaji potensi Air Ag (Perak) mengenai kadarnya atau ppm yang lebih tinggi untuk pengobatan terapi model luka lainnya.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan Ag (Perak) dalam bentuk sediaan obat lainnya seperti gel, krim atau pasta.

DAFTAR PUSTAKA

- Abebayehu, N., Singh, S., Dixit, S., and Dennis. 2013. Anti-Inflammatory Effects Of Silver-Polyvinyl Pyrrolidone (Ag-PVP) Nanoparticles In Mouse Macrophages Infected With Live Chlamydia Trachomatis. *International Journal of Nanomedicine*.
- Baratawidjaja, K. dan Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar Edisi Ke-8*. Karnen Garna Terbitan: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bardram L, Funch, Jensen P, and Kehlet H. 1995. *Recovery After Laparoscopic Colonic Surgery With Epidural Analgesia and Early Oral Nutrition and Mobilisation*. Lancet.
- Baroroh, D. 2011. *Konsep Luka*. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. Hal: 2.
- Beam, J. 2009. Topical Silver for Infected Wounds. *Journal of Athletic Training*, University of North Florida, Jacksonville.
- Brown D. L. 2004. *Wound*. In: Brown D.L, Borschel G.H. *Michigan Manual of Plastic Surgery*. 1st ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.p. 1-9.
- Boroumand, Z., Golmakani, N., and Boroumand, S. 2018. *Clinical Trials On Silver Nanoparticles for Wound Healing*. 1 School of Nursing and Midwifery, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
- Bultmann M, Streich R, Risse A, 1999. *Postoperative Analgesia in Children After Hernioplasty, Wound Infiltration With Different Concentrations of Bupivacaine : A Pilot Study*. German. Anaesthesist.
- Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Yager, D.R., Wornum, I.L., Graham, M., Crossland, M.C. Wound Care and Wound Healing. Dalam: Schwartz S.I, Spencer S, Fischer. *Principles of Surgery*, 7th ed. New York.: McGraw-Hill.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. 1999. *Pathology Basic of Disease*. 6th ed. Philadelphia: W B Saunders.
- De Jong W. 2004. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Edisi Kedua. Jakarta. ECG.
- Dunn K, Edwards, Jones V. 2004. *The Role of Acticoat™ With Nanocrystalline Silver in The Management of Burns*. Burns.

- Fauziah, E. 2010. *Efek Antipiretik Ekstrak Daun Pare (Momordica charantia L.) Pada Tikus Putih Jantan*. Surakarta. Universitas Sebelas Maret.
- Fauziyah, K. 2016. *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Federer, W. T., 1977. *Experimental Design Theory And Application*, 3rd ed. Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta
- Fong J, Wood F. 2006. Nanocrystalline Silver Dressings In Wound Management: A Review. *International Journal Nanomedicine*.
- Fox C. L. 1968. *Silver Sulfadiazine, A New Topical Therapy for Pseudomonas in Burns: Therapy of Pseudomonas Infection in Burns*. Arch Surg.
- Frederick, 2003. *Wound Healing Studies In Human Volunteers*, (<http://www.woundcare.org/news.html>), Diakses tanggal 2 Januari 2019.
- Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzucka T, and Jeschke MG. 2011. *Hypertrophic Scarring and Kelloid: Pathomechanisms and Current & Emerging Treatment Strategies*. Mol Med. 17 (1-2): 113-125
- Hefni, M. 2013. *Imunomodulator Activity Of Aqueous Extract Of M. Oleifera Lam On Immunity Response Of Mice (Mus musculus) Which Infected With Salmonella typhi*. Master Thesis. University of Brawijaya. Malang.
- Hoffmann S. 1984. *Silver Sulfadiazine: An Antibacterial Agent for Topical Use in Burns*. Scand J Plast Reconstr Surg.
- Hurlé, A., Quintana, D.S., Siew, Y., Bernabeu, E., Murillo, M., Climent, V. 2010. *Capillary Supply to The Sinus Node in Subjects with Long-term Atrial Fibrillation*. The Society of Thoracic Surgeons, Published by Elsevier Inc.
- Isrofah, Sagiran dan Afandi, M. 2015. Efektifitas Salep Ekstrak Daun Binahong (Anredera Cordifolia (Ten) Steenis) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Bakar Derajat 2 Termal pada Tikus Putih (Rattus Novergicus). Pekalongan. *Muhammadiyah Journal of Nursing*.
- Kemenkes Ri. 2013. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes Ri
- King, A, Balaji, S, Le, L. D, Crombleholme, T. M., Keswani, S. G. 2013. *Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10*. Wound Healing Society : Advance in Wound Care, Volume 3.

- King, A, Balaji, A, Le, L.D, Marsh, E, Crombleholme, T. M, Keswani, S. G. 2013. *Interleukin-10 Regulates Fetal Extracellular Matrix Hyaluronan Production*. J Pediatr Surg.
- Knetsch M. L., Koole L. H. 2011. *New Strategies In the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles*. Polymers.
- Kozier. 1995. *Nursing; Nursing Process; Nursing Care*. 5th ed. Addison Westley Nursing. Redwood City, California.
- Lansdown A.B.G, Williams A. 2004. *How Safe Is Silver In Wound Care?*. J Wound Care; 13(4): 131-36.
- Lara H.H, Ayala-Núñez N.V, Turrent L.C, 2010. *Padilla C.R. Bactericidal Effect Of Silver Nanoparticles Against Multidrugresistant Bacteria*. World J Microbiol Biotechnol.
- Macleod, A. S. and J. N. Mansbridge. 2014. *The Innate Immune System In Acute and Chronic Wounds*. Advanced in Wound Care. 5. Page: 65-78
- Maryunani, A. 2015. *Perawatan Luka Modern (Modern Woundcare)*. Jakarta: IN MEDIA
- Mast AB. 2000. *Normal wound healing*. In : Achauer BM, Eriksson E, eds. *Plastic Surgery, Indications, Operations and Outcomes*. Mosby : Mosby Inc, Page: 37-53
- Morison J.M., 2004. *Manajemen Luka*. Jakarta: EGC, Hal:1-4.
- Novriansyah R. 2008. *Perbedaan Kepadatan kolagen di Sekitar Luka Insisi Tikus Wistar yang dibalut Kasa Konvensional dan Penutup Oklusif Hidrokoloid selama 2 dan 14 Hari*. Tesis. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Bedah Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nurafifah, D. 2016. *Pengaruh Pemberian Povidone Iodine 10% Terhadap Kecepatan Penyembuhan Luka Perineum Pada Ibu Postpartum Di Bidan Praktik Mandiri Ani Mahmudah Kabupaten Lamongan*. Lamongan, Program Studi DIII Kebidanan STIKES Muhammadiyah Lamongan.
- Nurdiantini, I., Prastiwi, S., dan Nurmaningsari. 2017. *Perbedaan Efek Penggunaan Povidone Iodine 10% dengan Minyak Zaitun terhadap Penyembuhan Luka Robek (Lacerated Wound)*. Nursing News Volume 2, Nomor 1, 2017.
- Okky, M. 2012. *Pengaruh Cairan Kultur Filtrate Fibroblast (CCC) Terhadap Penyembuhan Luka*. Jakarta. ECG.

- Pinca, S., Djati, M. dan Rifai, M. 2017. *Analisis Mobilisasi Sel T CD4 + dan CD8 + pada Timus Ayam Pedaging Pasca Infeksi Salmonella typhimurium dan Pemberian Simplicia Polyscias obtuse*. Malang: Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang
- Pratiwi, A.D., Ratnawati, R., dan Kristianto. 2015. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kuncup Bunga Cengkeh (Syzygium aromaticum) terhadap Peningkatan Ketebalan Epitelisasi Luka Insisi pada Tikus Putih (Rattus novergicus)* Galur Wistar. *Majalah Kesehatan FKUB*. Volume 2, Nomor 3.
- Pusponegoro, A.D. 2005. *Luka*. Dalam: Sjamsuhidajat R, De Jong W, Penyunting. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Edisi ke-2. Jakarta: EGC.
- Putri, S., Djamal, A dan Ilmawati. 2015. *Perbandingan Daya Hambat Larutan Antiseptik Povidone iodine dengan Ekstrak Daun Sirih terhadap Candida albicans secara In Vitro*. Padang, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang
- Rajan, V. Dan Murray, R. 2008. *The Duplicitous Nature of Inflammation in Wound Repair*. *Wound Practice and Research*, Hal 122-129.
- Rizka, A., Vicky, Budipramana dan Fauziah. 2013. *Kepadatan Kolagen Tipe 1 Pada Luka Operasi Tikus Wistar Yang Mengalami Anemia Karena Perdarahan Akut*. Surabaya, SMF Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga.
- Rondhianto, Wantiyah dan Widyaputri. 2015. Perbedaan Penggunaan Povidone Iodine 1% Dengan Nacl 0,9% Sebagai Dekontaminasi Oral Terhadap Kolonisasi Staphylococcus Aureus Pada Pasien Post Operasi Dengan General Anesthesia Di Ruang Mawar Rsud Dr. Abdoer Rahem Situbondo. Jember. *Jurnal Keperawatan*.
- Sastrawan, N.K., Wardhita, A.A., Dada, I.K. dan Sudimartini, L.M. 2016. *Perbandingan Kecepatan Kesembuhan Luka Insisi yang Diberi Amoksisilin-Deksametason dan Amoksisilin-Asam Mefenamat pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus)*. Denpasar, Laboratorium Farmasi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
- Silverthorn, Dee. 2014. *Human Physiology: An Integrated Approach*. Jakarta: ECG Penerbit Buku Kedokteran.
- Sjamsuhidayat, R. dan De Jong, 2005. *Buku Ajar: Ilmu bedah*. Jakarta: EGC, hlm. 67.

- Suckow, M. Weisbroth, Steven, H. Franklin, Craig. 2006. *The Laboratory Rat 2nd ed.* British Library. American College of Laboratory.
- Triyono, B. 2005. *Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupivakain.* Program Magister Biomedik dan PPDS I. Universitas Diponegoro
- Tsunoda, A., Shibusawa, M., Kamiyama, G., and Takata. 2000. *Iodine Absorption After Intraoperative Bowel Irrigation With Povidone-Iodine.* Springer Link. Diseases of the Colon & Rectum Volume 43.
- Wiksmann, L.B., Solomonik, I., Spira, R., Tennenbaum, T. 2007. *Novel Insights Into Wound Healing Sequences of Events.* Toxicologic Pathol.
- Willey, Jhon. 2013. *Wound Healling and Skin Integrity.* UK: University of Hertfordshire.
- Wyatt, Jonathan. 2011. *Forensic Medicine.* New York: Oxford University Press.
- Young, B., J.S. Lowe, A.Stevens, and S.W. Heath. 2006. *Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas. 5th ed.* Churchill Living Elsivier, London.
- Zakariya, M., Sudiana, I. K., dan Wahyuni. 2009. Efektifitas Perawatan Luka Insisi Dengan Madu Dan Povidon Iodin 10%. *Jurnal Ners Vol.4 No.1.* Surabaya.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1020-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : EFEK TERAPI Ag (PERAK) TERHADAP
HISTOPATOLOGI, KULIT DAN EKSPRESI MEDIATOR
IMFLAMASI PADA TIKUS PUTIH

PENELITI : WAWID PURWATININGSIH

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

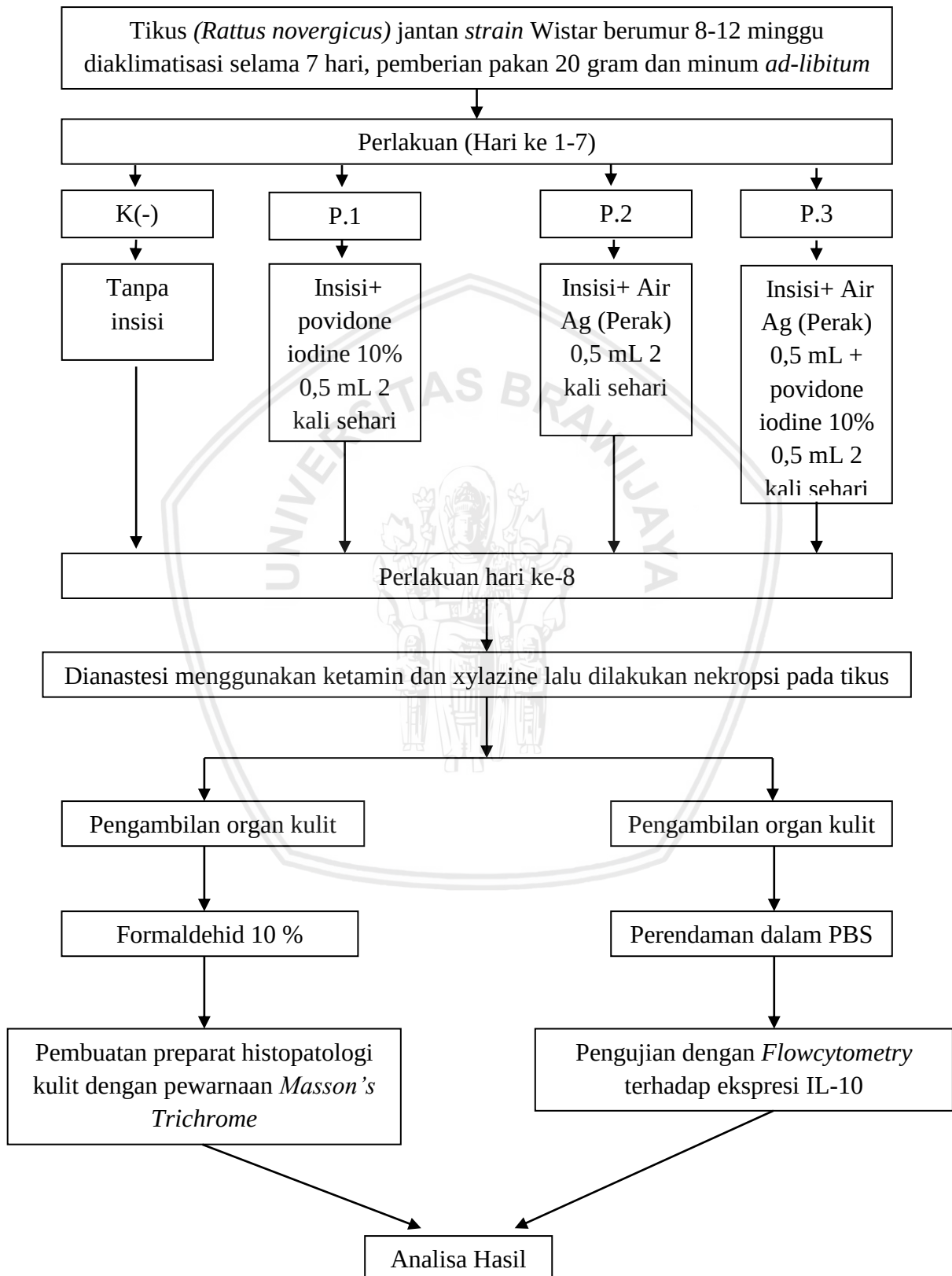
DINYATAKAN : LAIK ETIK

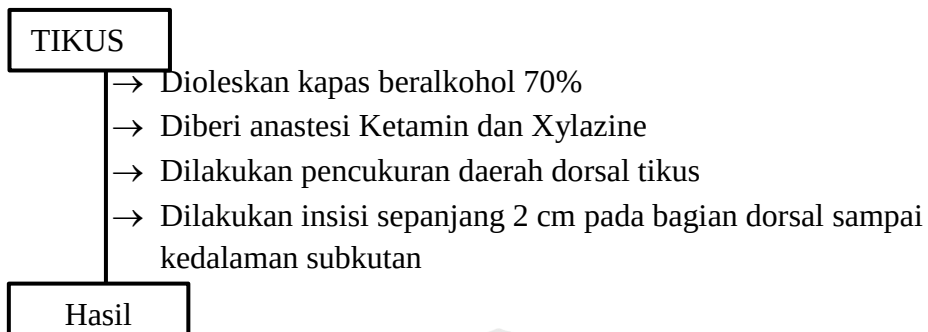
Malang, 12 September 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian



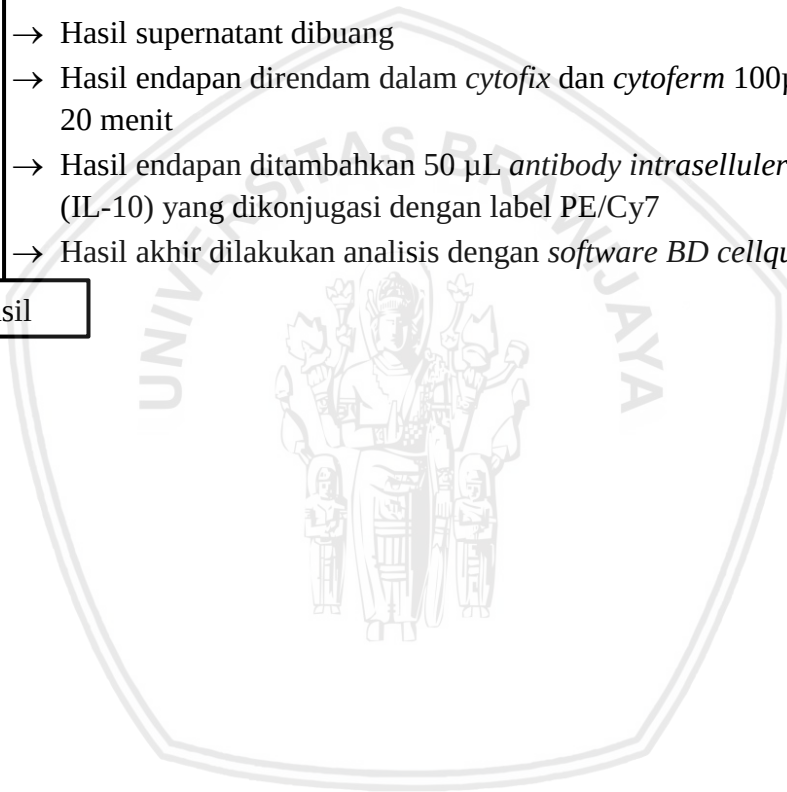
Lampiran 3. Pembuatan Insisi Pada Hewan Coba

Lampiran 4. Metode *Flowcytometry*

Sample kulit

- Sample kulit dimasukkan ke dalam PBS
- Sample kulit digerus
- Sample kulit dimasukkan lagi kedalam PBS untuk dihomogenkan
- Sample kulit difilteran dengan *wire filter*
- Sample kulit disentrifugasi 1500rpm pada suhu 20°C selama 5 menit
- Hasil supernatant dibuang
- Hasil endapan direndam dalam *cytofix* dan *cytoferm* 100µL selama 20 menit
- Hasil endapan ditambahkan 50 µL *antibody intraselluler staining* (IL-10) yang dikonjugasi dengan label PE/Cy7
- Hasil akhir dilakukan analisis dengan *software BD cellquest Pro™*

Hasil

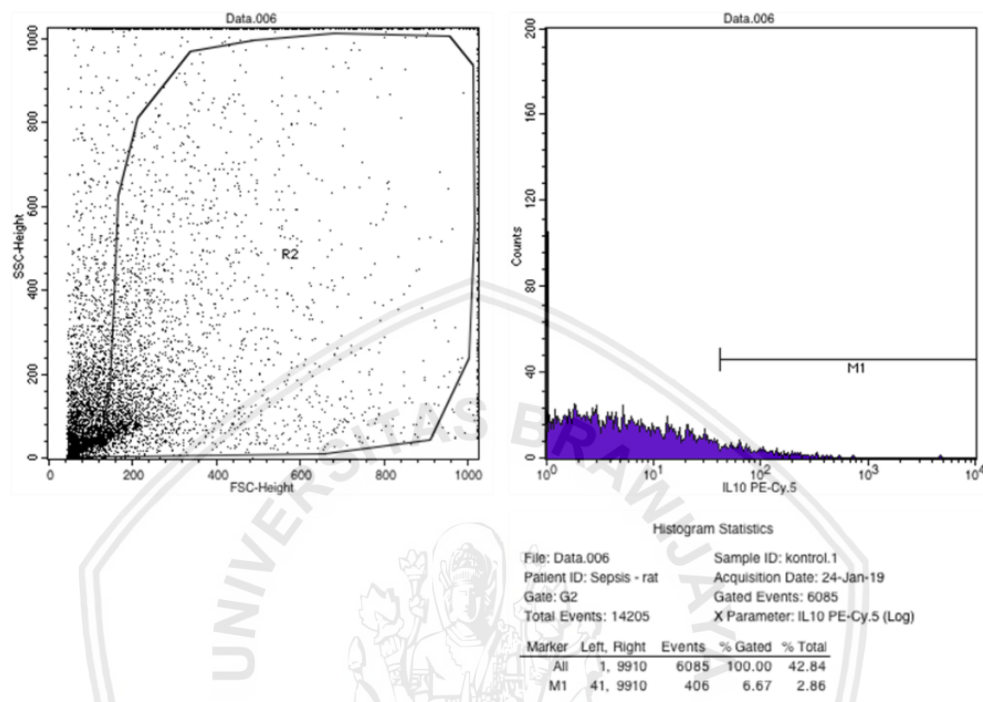


Lampiran 5. Dokumentasi Prosedur *Flowcytometry*

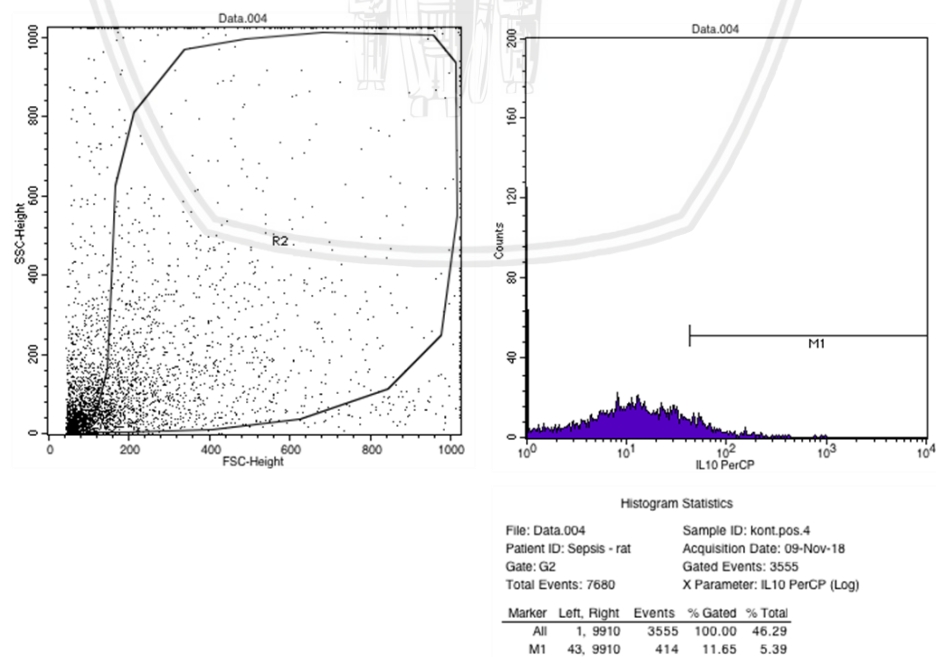
No	Gambar	Keterangan	No	Gambar	Keterangan
1		Sample kulit dimasukkan ke dalam PBS.	5.		Hasil supernatant dibuang.
2		Sample kulit digerus.	6.		Hasil endapan direndam dalam cytofix dan cytoferm 100µL selama 20 menit, lalu + antibody intraseluler staining IL-10.
3		Sample kulit dimasukkan lagi kedalam PBS untuk dihomogenkan.	7.		Hasil akhir dilakukan analisis dengan software BD cellquest Pro™.
4		Sample kulit difilter dengan wire filter lalu di sentrifugasi.			

Lampiran 6. Hasil *Flowcytometry* IL-10

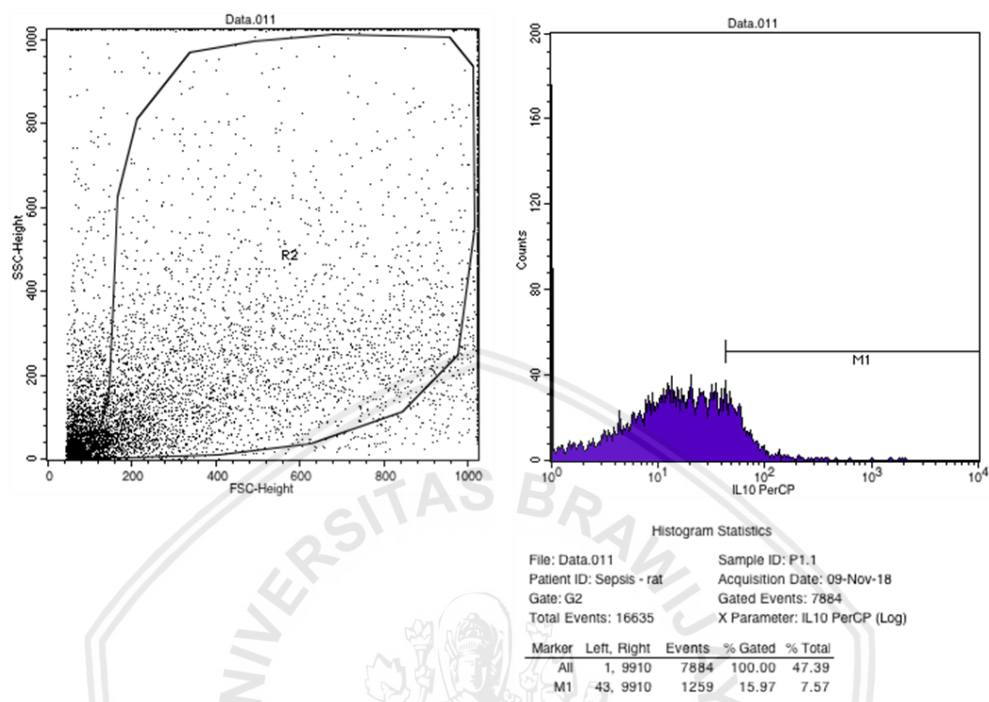
a) Kontrol Negatif



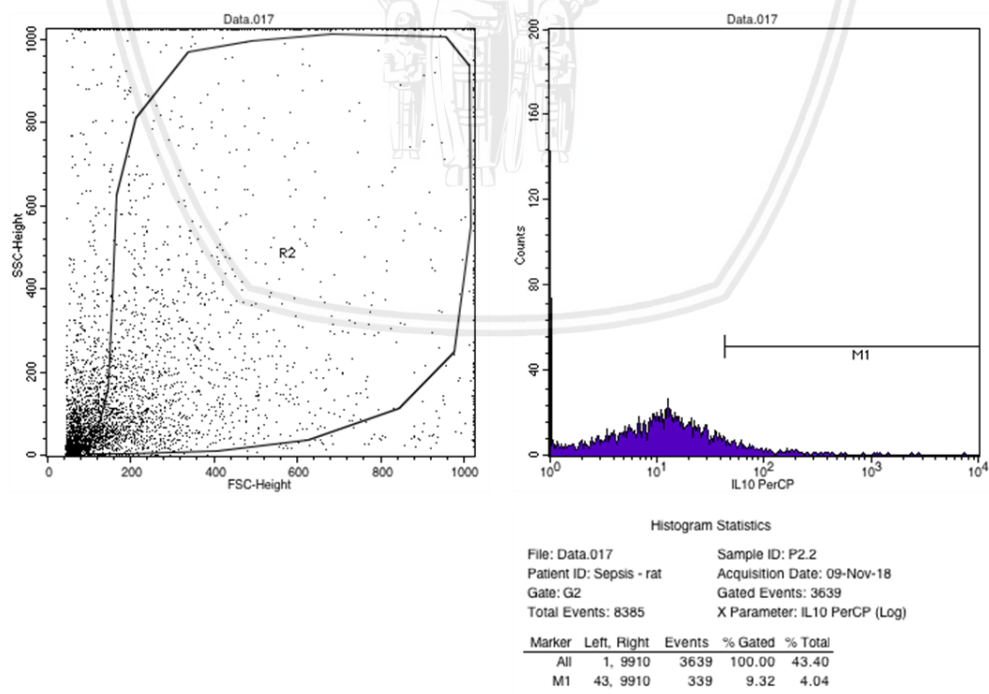
b) Perlakuan 1



c) Perlakuan 2



d) Perlakuan 3



Lampiran 7. Kadar IL-10

Perlakuan		IL-10 (%)
K(-)	1	6,67
	2	6,93
	3	3,79
	4	4,91
	5	8,70
P1	1	9,68
	2	10,79
	3	2,95
	4	11,65
	5	10,22
P2	1	15,97
	2	18,11
	3	16,27
	4	14,00
	5	7,86
P3	1	10,38
	2	9,32
	3	17,57
	4	2,21
	5	2,47

Lampiran 8. Data Uji Statistika Ekspresi IL-10

a. Uji Deskriptif

Descriptives

IL10

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	6.1940	1.91189	.85502	3.8201	8.5679	3.76	8.70
2	5	9.0580	3.49153	1.56146	4.7227	13.3933	2.95	11.65
3	5	14.4420	3.95755	1.76987	9.5281	19.3559	7.86	18.11
4	5	8.3900	6.37056	2.84900	.4799	16.3001	2.21	17.57
Total	20	9.5210	4.98557	1.11481	7.1877	11.8543	2.21	18.11

b. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL10	1	.198	5	.200*	.973	5	.891
	2	.371	5	.024	.751	5	.030
	3	.256	5	.200*	.865	5	.246
	4	.224	5	.200*	.905	5	.436

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IL10	Based on Mean	1.754	3	16	.196
	Based on Median	1.131	3	16	.366
	Based on Median and with adjusted df	1.131	3	12.500	.374
	Based on trimmed mean	1.778	3	16	.192

d. Uji ANOVA

ANOVA

IL10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	183.893	3	61.298	3.401	.044
Within Groups	288.369	16	18.023		
Total	472.263	19			

e. Uji BNJ Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL10

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.86400	2.68500	.714	-10.5458	4.8178
	3	-8.24800*	2.68500	.033	-15.9298	-.5662
	4	-2.19600	2.68500	.845	-9.8778	5.4858
2	1	2.86400	2.68500	.714	-4.8178	10.5458
	3	-5.38400	2.68500	.227	-13.0658	2.2978
	4	.66800	2.68500	.994	-7.0138	8.3498
3	1	8.24800*	2.68500	.033	.5662	15.9298
	2	5.38400	2.68500	.227	-2.2978	13.0658
	4	6.05200	2.68500	.151	-1.6298	13.7338
4	1	2.19600	2.68500	.845	-5.4858	9.8778
	2	-.66800	2.68500	.994	-8.3498	7.0138
	3	-6.05200	2.68500	.151	-13.7338	1.6298

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

IL10

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	5	6.1940	
4	5	8.3900	8.3900
2	5	9.0580	9.0580
3	5		14.4420
Sig.		.714	.151

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 9. Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Kulit dengan Pewarnaan *Masson's Trichrome*

Organ Kulit

- Organ kulit difiksasi menggunakan larutan formalin 10%
- Organ kulit di dehidrasi menggunakan etanol bertingkat (konsentrasi 70% selama 24 jam untuk dehidrasi, 80% selama 2 jam, 90%, 95 % selama 20 menit)
- Organ kulit diclearing menggunakan *xylol* I selama 20 menit dan *xylol* II selama 30 menit
- Organ kulit diinfiltrasi dan embedding menggunakan parafin pada inkubator bersuhu 38°C
- Hasil embedding dipotong longitudinal menggunakan *microtome* setebal $\pm 1-10 \mu\text{m}$
- Hasil potongan diletakkan pada *object glass* yang telah dilapisi gelatin untuk pewarnaan *Masson's Trichrome*
- *Object glass* dimasukkan dalam inkubator bersuhu 38-40°C selama 24 jam
- Preparat kulit di deparaffinisasi dan rehidrasi
- Preparat kulit ditetaskan larutan Neutral Red 0,5% selama 5 menit lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dibilas menggunakan aquades
- Preparat kulit ditetaskan larutan *Acis Fucshin* selama 5 menit kemudian dicuci menggunakan aquades selama 5 menit
- Preparat kulit ditetaskan larutan Methyl blue selama 2-5 menit kemudian dibilas dengan aquades selama 5 menit
- Preparat kulit ditetaskan larutan Acetid acid 1% selama 2 menit
- Preparat kulit dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol 95% dan 100%.
- Preparat kulit dibersihkan menggunakan xylene sebanyak dua kali
- Preparat kulit di mounting dengan balsam kanada dan ditutup dengan *cover glass*.

Hasil

Lampiran 10. Data Rata-rata Kepadatan Kolagen 5 Lapang Pandang

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang	SKOR	Rata-rata Skor
Kontrol (-)	Ulangan 1	1	+4	+4
		2	+4	
		3	+4	
		4	+4	
		5	+4	
	Ulangan 2	1	+4	
		2	+4	
		3	+4	
		4	+4	
		5	+4	
	Ulangan 3	1	+4	
		2	+4	
		3	+4	
		4	+4	
		5	+4	
	Ulangan 4	1	+4	
		2	+4	
		3	+4	
		4	+4	
		5	+4	
	Ulangan 5	1	+4	
		2	+4	
		3	+4	
		4	+4	
		5	+4	
P.1	Ulangan 1	1	+1	1,44
		2	+1	
		3	+1	
		4	+2	
		5	+1	
	Ulangan 2	1	+1	
		2	+2	
		3	+2	
		4	+1	
		5	+1	
	Ulangan 3	1	+1	
		2	+2	
		3	+1	
		4	+2	
		5	+2	

	Ulangan 4	1	+2	
		2	+2	
		3	+2	
		4	+2	
		5	+2	
	Ulangan 5	1	+1	
		2	+1	
		3	+1	
		4	+1	
		5	+1	
P.2	Ulangan 1	1	+3	2,16
		2	+2	
		3	+2	
		4	+3	
		5	+3	
	Ulangan 2	1	+2	
		2	+1	
		3	+2	
		4	+3	
		5	+3	
	Ulangan 3	1	+2	
		2	+3	
		3	+2	
		4	+2	
		5	+2	
	Ulangan 4	1	+2	
		2	+2	
		3	+2	
		4	+2	
		5	+2	
	Ulangan 5	1	+2	
		2	+2	
		3	+2	
		4	+1	
		5	+2	
	Ulangan 1	1	+3	
		2	+2	
		3	+3	
		4	+3	
		5	+3	
	Ulangan 2	1	+3	
		2	+3	
		3	+3	
		4	+3	

P.3		5	+3	2,6
	Ulangan 3	1	+3	
		2	+2	
		3	+2	
		4	+3	
		5	+2	
	Ulangan 4	1	+2	
		2	+3	
		3	+2	
		4	+2	
		5	+3	
	Ulangan 5	1	+3	
		2	+3	
		3	+2	
		4	+2	
		5	+2	

SKOR	Kriteria
+0 =	Tidak ditemukan adanya serabut kolagen pada daerah luka
+1 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rendah (kurang dari 10 % per lapangan pandang)
+2 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sedang (10 s/d 50 % per lapangan pandang)
+3 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka rapat/padat (50 s/d 90 % per lapangan pandang)
+4 =	Kepadatan serabut kolagen pada daerah luka sangat rapat/padat (90 s/d 100 % per lapangan pandang)

Lampiran 11. Perhitungan Dosis Anetesi

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata BB tikus} &= 170 \text{ gram} \\ &= 0,17 \text{ kg}\end{aligned}$$

Perhitungan dosis Ketamin

$$\begin{aligned}\text{Volume} &= \frac{\text{Dosis (mg/kg BB)} \times \text{Berat Badan (kg)}}{\text{Konsentrasi (mg/mL)}} \\ &= \frac{40 \text{ mg/kg} \times 0,17 \text{ kg}}{100 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,068 \text{ mL}\end{aligned}$$

Perhitungan dosis Xylazine

$$\begin{aligned}\text{Volume} &= \frac{\text{Dosis (mg/kg BB)} \times \text{Berat Badan (kg)}}{\text{Konsentrasi (mg/mL)}} \\ &= \frac{5 \text{ mg/kg} \times 0,17 \text{ kg}}{100 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,0425 \text{ Ml}\end{aligned}$$

Lampiran 12. Rata-rata Gambaran Penyembuhan Luka pada Hari ke-3 dan ke-7 Pasca Pemberian Terapi

Kelompok	Ulangan	Penyembuhan Luka (Hari)	
		3	7
P.1	1	●*	**+
	2	●**	**+
	3	●*	**✓
	4	●*	**✓
	5	●**	**✓
P.2	1	●●**	+
	2	●●**	+
	3	●●**	✓
	4	●●*	✓
	5	●●**+	✓
P.3	1	●●**	✓
	2	●●** +	✓
	3	●●** +	✓
	4	●●** +	✓
	5	●●**	✓

Keterangan:

- : Eritrema
- : Sedikit eritrema
- * : Edema
- ** : Sedikit Edema
- + : Luka mulai menutup
- ✓ : Luka menutup