EFEK TERAPI SALEP KITOSAN CANGKANG KERANG DARAH (Anadara granosa) TERHADAP KESEMBUHAN LUKA PADA HEWAN MODEL NOSOKOMIAL BERDASARKAN EKSPRESI TNF-α DAN KEPADATAN KOLAGEN

SKRIPSI

Oleh: DENDRA CHRISMASANDO 135130107111008



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

EFEK TERAPI SALEP KITOSAN CANGKANG KERANG DARAH (Anadara granosa) TERHADAP KESEMBUHAN LUKA PADA HEWAN MODEL NOSOKOMIAL BERDASARKAN EKSPRESI TNF-α DAN KEPADATAN KOLAGEN

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

DENDRA CHRISMASANDO 135130107111008



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

EFEK TERAPI SALEP KITOSAN CANGKANG KERANG DARAH (Anadara granosa) TERHADAP KESEMBUHAN LUKA PADA HEWAN MODEL NOSOKOMIAL BERDASARKAN EKSPRESI TNF-α DAN KEPADATAN KOLAGEN

Oleh:

DENDRA CHRISMASANDO

NIM. 135130107111008

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 5 Agustus 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si, M.Sc., Ph.D.

NIP. 19810504 2005 1 001

drh. Dyah Ayu OAP., Mbiotech NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.S

NIP. 19631216 198803 1 002

BRAWIJAY

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dendra Chrismasando

NIM : 135130107111008

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul

EFEK TERAPI SALEP KITOSAN CANGKANG KERANG DARAH (Anadara granosa) TERHADAP KESEMBUHAN LUKA PADA HEWAN MODEL NOSOKOMIAL BERDASARKAN EKSPRESI TNF-α DAN KEPADATAN KOLAGEN

Dengan ini menyatakan bahwa:

- 1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
- 2. Apabila 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, Agustus 2019 Yang Menyatakan,

<u>DENDRA CHRISMASANDO</u> NIM. 135130107111008

EFEK TERAPI SALEP KITOSAN CANGKANG KERANG DARAH (Anadara granosa) TERHADAP KESEMBUHAN LUKA PADA HEWAN MODEL NOSOKOMIAL BERDASARKAN EKSPRESI TNF-α DAN KEPADATAN KOLAGEN

ABSTRAK

Luka infeksi nosokomial merupakan luka infeksi setelah operasi. Penyebab infeksi nosokomial adalah infeksi dari virus, bakteri, jamur, atau parasit. Salah satu bakteri penyebab infeksi ini adalah Staphylococcus aureus. Kitosan cangkang kerang darah yang berfungsi sebagai haemostasis, anti inflamasi, bakteriostatik, meningkatkan proliferasi fibroblas dan produksi kolagenase serta mempercepat regenerasi jaringan luka. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh terapi kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa) pada luka insisi hewan model nosokomial terhadap peningkatan ekspresi TNF- α dan kepadatan kolagen. Hewan model yang digunakan adalah mencit (Mus musculus) BALB/c jantan, berat 25 g berumur 8 minggu. Metode penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 kelompok perlakuan, yaitu : kelompok 1 adalah) mencit yang diinsisi kemudian dijahit dengan benang silk 4/0 secara aseptis (kontrol negatif), kelompok 2 adalah mencit yang diincisi kemudian dijahit dengan benang silk 4/0 yang telah dikotaminasi dengan bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml tanpa pemberian terapi salep kitosan (kontrol positif, kelompok 3-5 adalah mencit diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml kemudian diterapi dengan salep kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa) dengan konsentrasi 2%, 4% dan 8% (kelompok terapi). Terapi salep diberikan dua kali sehari pagi dan sore. Pengukuran ekspresi *TNF-α* dilakukan menggunakan metode flowcytometri kemudian dianalisis dengan uji ANOVA dan pengamatan histopatologi kulit untuk melihat kepadatan kolagen menggunakan mikroskop. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis terapi salep kitosan dapat menurunkan ekspresi $TNF-\alpha$ secara signifikan (p<0,05) dan peningkatan kepadatan kolagen. Dosis pemberian terapi terbaik adalah salep kitosan konsentrasi 8%. Kesimpulan pada penelitian ini adalah salep kitosan cakang kerang darah (Anadara granosa) dapat digunakan sebagai terapi kesembuhan luka pada hewan model luka insisi nosokomial

Kata kunci: Luka Nosokomial, Kitosan, TNF-α, Kepadatan Kolagen

Effect of Chitosan Ointment Therapy Blood Shells (Anadara Granosa) On Welding Health in Animal Nosocomial Model Based On *TNF-α* Expression and Collagen Density

ABSTRACT

Nosocomial infection wound is an infection wound after surgery. The causes of nosocomial infection are infection of viruses, bacteria, fungi, or parasites. One of the bacteria causing this infection is Staphylococcus aureus. Chitosan from blood cockle shells have function as haemostasis, antiinflammatory, bacteriostatic, increase the proliferation of fibroblasts and the production of collagenase and accelerate wound tissue regeneration. The purpose of study to investigate the effect of chitosan therapy from the blood cockle shells (Anadara granosa) on nosocomial animal incision injuries to increased TNF-α expression and collagen density. Animal model used was mice (Mus musculus) BALB/c male, weight 25 g aged 8 weeks. Methods of the study were Completely Randomized Design with 5 treatment groups, namely: Group 1 was mice that were stitched and stitched with 4/0 silk yarn that had been contaminated with 10⁵ CFU/ml Staphylococcus aureus bacteria without chitosan ointment (positive control), group 2 was the incised mice and then sewn with 4/0 silk threads aseptically (negative control), group 3-5 was mice incised and stitched with 4/0 silk threads contaminated with 10⁵ CFU / ml Staphylococcus aureus bacteria then treated with chitosan from blood cockle shells (Anadara granosa) with concentrations of 2%, 4% and 8% (therapy group). The ointment therapy is administered twice daily a day morning and evening. $TNF-\alpha$ expression was performed using flowcytometry method then analyzed by ANOVA test and histopathology observation of skin to see the density of collagen using microscope The results indicate that the dosage of chitosan ointment can significantly reduce TNF- α expression (p <0.05) and increase collagen density. The best dose of therapy is 8% chitosan ointment. The conclusion of this study is chitosan ointment Blood shell (*Anadara granosa*) can be used as a wound healing therapy in animals with nosocomial incision wound models

Key Word: Nosocomial Wound, Chitosan, TNF-α, Collagen Density

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadirat Tuhan Yang Maha Esa sebab kasih kasih dan karunia-Nya dapat penulis dapat menyelesaikan proposal SKRIPSI yang berjudul "Efek Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah (*Anadara Granosa*) Terhadap Kesembuhan Luka Pada Hewan Model Nosokomial berdasarkan Ekspresi *TNF-α* Dan Kepadatan Kolagen" Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada:

- 1. Edwin Widodo, S.Si, M.Sc., Ph.D sebagai Pembimbing I atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
- 2. Drh. Dyah Ayu Oktavianie A. P., M.Biotech sebagai Pembimbing II atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
- 3. Drh. Indah Amalia Amri, M.Si dan Drh. Yudit Oktanella, M.Si sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
- 4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.S sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
- 5. Keluarga penulis, Bapak Indro, Ibu Dewi, nenek Suharti, dan adik penulis Devira yang telah memberikan doa, kesabaran, serta dukungan baik moral dan material kepada penulis untuk tetap semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

- 6. Tim Penelitian "*SKRIPSI FIGHTER*" yaitu Ardhi, Fara, Katrin, Niken, Rowena, dan Joe atas kerjasamanya, semangat, kesabaran selama penelitian.
- 7. Seluruh sahabat TIVA, "Dolan kene hore" yaitu Udin, Alex, Pambudi, dan Roni, angkatan 2013 "Six Sense" FKH UB serta kakak-kakak angkatan 2012, dan 2011 atas segala perhatian, dorongan, bantuan, dukungan, dan doa yang telah diberikan.
- 8. Seluruh staf dan karyawan FKH yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.
- 9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, Agustus 2019

Penulis

DAFTAR ISI

На	laman
COVER HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	\mathbf{v}
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	X
DAFTAR GAMBAR	хi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Kulit	8
2.2 Luka	12
2.3 Fase Penyembuhan Luka	13
2.3.1 Fase Hemostasis	14
2.3.2 Fase Inflamasi	14
2.3.3 Fase Proliferasi	15
2.2.4 Fase Remodeling	16
2.4 Infeksi Nosokomial	17
2.4.1 Patogenesis Infeksi Nosokomial	17
2.4.2 Etiologi infeksi Nosokomial	18
2.4.3 Staphylococcus aureus	19
2.4.4 Kriteria Infeksi Nosokomial	19
2.4.5 Dampak Infeksi Nosokomial	20
2.5 Obat Topikal	20
2.5.1 Salep	20
2.6 Kerang Darah	23
2.7 Kitosan terhadap Luka	24
2.8 Respon Imunologi pada Luka Infeksi Nosokomial	26
2.9 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α)	28
2.10 Kolagen	29
2.11 Mencit (Mus musculus)	30

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN H	IPOTESIS PENELITIAN
3.1 Kerangka Konseptual	
3.2 Hipotesis Penelitian	
BAB 4. METODE PENELITIAN	••••••
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	
4.2 Alat dan Bahan	
4.3 Tahapan Penelitian	
4.3.1 Rancangan Penelitian	
	tian
4.3.3 Variabel Penelitian	
4.4 Prosedur Kerja	
	n Cangkang Kerang Darah
	n Cangkang Kerang Darah
	teri
	Sakteri Staphylococcus aureus.
4.4.6 Pembuatan Benang Diko	
	Nosokomial pada Mencit
	ngkang Kerang Darah
	ulit
7% <u>F</u> IRA V / 14 / 1	stopatologi Kulit
4.4.11. Pengukuran Kadar Rel	
	ometry
4.5 Analisa Data	
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pengujian Kitosan dengan me	
	(/. 38
5.2 Pengamatan Makroskopis	
5.3 Efek Terapi terhadap Ekspresi	
5.4. Efek Terapi terhadap Kepadata	
BAB 6. KESIMPULAN	
6.1 Kesimpulan	
6.2 Saran	
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel Halan	nan
5.1 Hasil Uji Tukey Produksi TNF-α	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Histologi Kulit	12
2.2 Fase Proses Penyembuhan Luka	16
2.3 Kerang Darah (Anadara granosa)	24
2.4 Mencit (Mus musculus)	31
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	32
5.1A Makroskopis Kontrol Negatif	53
5.1B Makroskopis Kontrol Positif	53
5.1C Makroskopis Terapi 2%	53
5.1D Makroskopis Terapi 4%	
5.1E Makroskopis Terapi 8%	
5.2 Rata-rata Ekspresi TNF-α	54
5.3A Histopatologi Kepadatan Kolagen Kontrol Negatif	61
5.3B Histopatologi Kepadatan Kolagen Kontrol Positif	61
5.3C Histopatologi Kepadatan Kolagen Terapi 2%	62
5.3D Histopatologi Kepadatan Kolagen Terapi 4%	62
5.3E Histopatologi Kepadatan Kolagen Terapi 8%	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Rancangan Penelitian	2
2 Perhitungan Konsentrasi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah	3
3 Kerang Langkah Kerja Penelitian	4
4 Perhitungan pengenceran ketamin dan xylazine	11
5 Perhitungan pengenceran Mc. Farland	11
6 Hasil Uji FTIR Kitosan Asal Cangkang Kerang Darah	12
7 Identifikasi Staphylococcus sureus pada media NAP dan MSA	13
8 Uji Antibiogram Bakteri Staphylococcus aureus	14
9 Hasil Statistika Ekspresi TNF-α	17
10 Ekspresi TNF-α Hasil Uji <i>Flowcytometry</i>	20
11 Sertifikat Laik Etik	21

FTIR

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan Keterangan : Alfa α : Gram g $^{\circ}C$: Derajat celcius % : Persen : Mikroliter μL ml : Mililiter : Milimeter mm cm : Centimeter **ECM** : Extraceluler Matrix $TNF\,\alpha$: Transforming Necrotic Factor Aplha **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor MMP : Matrix Metalloproteinase CFU : Colony Forming Unit **RAL** : Rancangan Acak Lengkap M : Molar : Potential of Hydrogen pН **BNF** : Buffer Neural Formalin NB : Nutrient Broth MT: Masson's Trichrome **PBS** : Phosphate Buffer Saline rpm : Revolutions per minute NA slant : Nutrient Agar slant **PMN** : Polymorphonuclear **BNJ** : Beda Nyata Jujur **ANOVA** : One Way Analysis of Variance NaOH : Natrium Hidrosida HC1 : Hydrogen Chlorida NaCl : Natrium Chlorida MSA : Mannitol Salt Agar kBr : Kalium Bromida MHA : Mueller Hilton Agar NAP : Nutrient Agar Plate **TIMP** : Tisssue Inhibitor of Matrix Metaloproteinase

: Fourier Transform Infra Red



SRAWIJAYA

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyembuhan luka adalah faktor penting dari post operasi karena luka dapat mengalami infeksi nosokomial yang dapat menambah waktu proses kesembuhan luka. Infeksi nosokomial adalah infeksi lokal maupun sistemik akibat agen infeksi atau toksin yang didapat di rumah sakit, termasuk rumah sakit hewan (Milton, et al., 2015). Infeksi luka post operasi termasuk dalam infeksi nosokomial yang dapat menyebabkan meningkatnya morbiditas dan mortalitas pada pasien. Penyebab infeksi nosokomial pada luka antara lain *Staphylococcus aureus* 20%, *Pseudomonas aeruginosa* 16%, *Coagulase-negative Staphylococci* 15%, *Enterococci*, jamur, *Enterobacter*, dan *Escherichia coli* <10% (Nasution,2012). Infeksi nosokomial pada luka operasi terjadi ketika mikroorganisme dari kulit, bagian tubuh lain, lingkungan, alat kesehatan, dan tenaga medis masuk kedalam insisi yang ditandai oleh adanya discharge purulen disekitar luka, abses atau selulitis yang meluas dari luka (WHO,2002).

Staphylococcus aureus adalah salah satu penyebab utama infeksi nosokomial post operasi. Bakteri patogen yang termasuk dalam flora normal pada kulit dan dapat ditularkan melalui petugas medis ke pasien selama perawatan sehingga infeksi sulit diobati (Sujono, 2010). Implikasi bakteri multidrug resistant terhadap infeksi nosokomial menjadi perhatian utama karena dapat mengakibatkan morbiditas dan biaya perawatan yang tinggi serta durasi pengobatan yang lama sehingga sulit

Infeksi nosokomial pada umumnya menjadi hambatan yang dihadapi oleh pasien saat perawatan di rumah sakit, dan infeksi nosokomial post operasi dapat mebabkan 77% kematian pada pasien (Darmadi, 2008). Sedangkan faktor resiko di rumah sakit hewan sebanding dengan rumah sakit masunia. Studi prevalensi telah menunjukkan bahwa 4-9% pasien dapat bertahan dari infeksi nosokomial (Milton *et* al., 2015).

Penyembuhan luka meliputi empat fase, yaitu : hemostasis, inflamasi, polifrasi, dan remodeling. Keempat fase tersebut diinisiasi, dimediasi, dan diteruskan oleh mediator biokimia berupa sitokin dan *growth factor* (William, 2009). Penyembuhan luka adalah proses yang berkesinambungan antara sel inflamasi, epitel, endotel, trombosit, dan fibroblas yang berinteraksi untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Sel jaringan yang rusak akan melepaskan sitokin yang mempunyai daya kemotatik sehingga mampu menarik leukosit dalam sirkulasi kapiler (Mercandetti, 2002).

Sitokin yang diproduksi akibat adanya respon antigen dan mikroba maupun inflamasi meliputi TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, dan TGF-β. Sitokin bersama dengan *growth factor* seperti PDGF, FGF aktif berperan dalam proses penyembuhan luka. Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) adalah salah satu sitokin yang memiliki sifat proinflamasi, berperan penting dalam imunitas innate dan adaptif, poliferasi sel, maupun proses apoptosis. Peningkatan kadar TNF-α akan menyebabkan stress oksidatif pada kapiler (Arpornchayanon, 2010). TNF-α juga akan menstimulasi

Kerang darah (Anadara granosa) adalah jenis kerang yang banyak ditemui di Indonesia. Hasil produksi yang tinggi diikuti dengan limbah cangkang kerang darah yang berlimpah dan belum terlalu dimanfaatkan. Cangkang kerang darah mengandung kitin. Salah satu senyawa kitin yang banyak dikembangkan adalah kitosan (Afranita, 2014). Kitosan merupakan senyama polimer karbohidrat alami yang dapat ditemukan dalam cangkang dari krustasea, seperti : udang, kepiting, dan lobster, serta dalam eksoskeleton zooplankton laut, termasuk kerang dan ubur-ubur (Harahap, 2011). Beberapa penelitian menyatakan kitosan efektif dalam mempercepat penyembuhan luka karena memiliki sifat spesifik, yaitu : bioaktif, anti bakteri, anti jamur, dan dapat terbiodegradasi sehingga kitosan menunjukan biokompabilitas yang baik dan efek positif pada penyembuhan luka.

Kitosan secara bertahap mengalami depolimerisasi untuk melepaskan N-asetil-b-D-glukosamin, yang memicu proliferasi fibroblas, membantu deposisi kolagen, serta meningkatkan sintesis asam hyaluronik alami pada lokasi luka (Paul dan Sharma, 2004). Kitosan dapat meningkatkan kolagenisasi dan mengakselerasi regenerasi sel (reepitelisasi) dan menurunkan sekresi sitokin seperti $TNF-\alpha$ selama proses penyembuhan luka (Anggraeni, 2012). Sifat kitosan tersebut dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka dan mencegah terjadinya infeksi nosokomial pada luka post operasi.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah pemberian salep kitosan ekstrak cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) secara topikal mampu menurunkan ekspresi *TNF-α* yang berkaitan dengan penyembuhan luka hewan model nosokomial pada mencit (*Mus musculus*)?
- 1.2.2. Apakah pemberian salep kitosan ekstrak cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) secara topikal berpengaruh terhadap penyembuhan luka hewan model nosokomial ditinjau dari kepadatan kolagen pada mencit (*Mus musculus*)?

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka penelitian ini dibatasi pada :

- a. Hewan coba yang digunakan adalah *mencit (Mus musculus)* BALB/c jantan dengan berat 24 ± 3 gr berumur 8 minggu (Dai, 2011). Mencit diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinary dan Farmasi) Surabaya dan diuji sertifikasi laik etik di Universitas Islam Negri Maulana Malik Ibrahim Malang..
- b. Anastesi untuk pembuatan model luka menggunakan kombinasi Ketamine HCl (dosis 90 mg/kgBB) dan Xylazine (dosis 4.5 mg/kgBB). Untuk mempermudah injeksi, dilakukan pengenceran Xylazine 20 mg/ml sebanyak 0,1 ml dicampur dengan PBS 1x di dalam vial steril. Selanjutnya, ditambahkan Ketamine HCl 100 mg/ml sebanyak 0,1 ml dicampurkan kedalam Xylazine yang telah diencerkan sebelumnya (Clouthier dan Luther, 2015; Plumb, 2008).
- c. Pembuatan model luka insisi nosokomial dibuat berdasarkan Dai (2011) yang dimodifikasi, yakni dengan insisi *longitudinal midline* sepanjang 2.3 ± 0.2 cm sampai dengan *penniculus cranosus* dan luka dijahit dengan benang silk 4/0 yang telah dikontaminasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* (10⁵ CFU/ml). Penjahitan dilakukan dengan jarum *tapper* ½ GT 35 mm pola *simple continous suture* sebanyak 4 jahitan dengan jarak masingmasing 5 mm pada luka insisi.
- d. Cangkang kerang darah (Anadara granosa) yang diperoleh dari Pasar
 Blimbing Malang. Proses sintesis menjadi kitosan dengan tahapan

- e. Cangkang kerang darah yang digunakan berbentuk bulat, agak lonjong, mempunyai dua belahan cangkang yang simetris, cangkang berwarna putih ditutupin periostrakum yang berwarna kunung kecoklatan sampai cokelat kehitaman (Sahara, 2011).
- f. Bentuk sediaan obat yang digunakaan yaitu salep dengan penambahan vaselin album sehingga didapatkan salep dengan masing-masing konsentrasi 2%, 4%, dan 8%. Salep diberikan secara topikal pada luka dua kali selama 7 hari sebanyak 0,5 gr pada luka (Djamaluddin, 2009).
- g. Variabel pada penelitian ini yaitu pengamatan preparat histopatologi luka kepadatan kolagen dengan pewarnaan *Masson* Trichome (Febram, dkk., 2010). Dan penurunan ekspresi *TNF-α* yang diamati dengan metode *flowcytometri* (Sysmex-Europe, 2015).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1. Mengetahui efek terapi pemberian salep ekstrak kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa) dapat menurunkan ekspresi TNF-α sebagai penyembuhan luka pada hewan mencit (Mus musculus) jantan galur BALB/c model luka nosokomial.
- 2. Mengetahui efek terapi pemberian salep ekstrak kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa) meningkatkan kepadatan kolagen sebagai proses kesembuhan luka hewan mencit (Mus musculus) jantan galur BALB/c model luka nosokomial.

1.5 Manfaat Penelitian

- 1. Memperoleh dasar informasi potensi sintesis kitosan dari cangkang kerang darah dalam mempengaruhi peningkatan kepadatan kolagen dan penurunan ekspresi *TNF-α* sebagai terapi luka pada hewan mencit (*Mus musculus*) jantan galur BALBc model luka insisi nosokomial.
- 2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dalam mempengaruhi penigkatan kepadatan kolagen dan penurunan ekspresi TNF-α dan memberi nilai tambah pada limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*).

SRAWIJAYA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit adalah organ terbesar dari tubuh yang berfungsi sebagai pertahanan pertama terhadap mikroorganisme, bahan kimia, dan radiasi serta berfungsi sebagai reseptor sensorik terhadap sentuhan, tekanan, nyeri, temperatur, dan mengubah provitamin D menjadi vitamin D. Kulit juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan air, lemak, protein, dan karbohidrat (Pavletic, 2010). pH kulit adalah asam, yaitu antara 4 sampai 6,5 yang bertujuan untuk membantu lapisan kulit dalam melawan mikroorganisme (Robbins *et al.*, 2007).

Menurut Junqueira (2005) gambaran histologi kulit (**Gambar 2.1**) dan penjelasannya adalah sebagai berikut :

a. Epidermis

Epidermis adalah lapisan kulit terluar dengan karakteristik tipis, tidak dialiri pembuluh darah, dan biasanya beregenerasi setiap 4-6 minggu. Secara histologi, epidermis tersusun atas lima lapisan dari luar ke dalam, yaitu :

• Stratum corneum

Stratum corneum adalah lapisan kulit terluar yang tersusun dari beberapa lapis sel pipih, tidak berinti, dan protoplasmanya telah berubah menjadi keratin (zat tanduk). Lapisan ini sebagian besar terdiri atas sel-sel keratinosit yang mati, jenis protein tidak larut air, dan sangat resisten terhadap bahan-bahan kimia. Kerusakan pada lapisan

• Stratum lucidum

Stratum lucidum berada di bawah stratum corneum yang tersusun dari sel-sel pipih tanpa inti dengan protopolasmanya berubah menjadi protein yang disebut eleidin. Lapisan ini tipis dan transparan serta sulit untuk diindentifikasi pada gambaran histologi.

• Stratum granulosum

Stratum granulosum tersusun dari dua atau tiga lapis sel keratinosit berbentuk pipih dengan sitoplasma berbutir kasar serta intinya mengkerut.

• Stratum spinosum

Stratum spinosum tersusun dari sel kuboid dengan inti besar dan oval terletak di tengah. Di antara sel-sel stratum spinosum terdapat jembatan-jembatan antarsel yang terdiri atas protoplasma dan keratin. Lapisan ini terdapat sel-sel langerhans. Sel tersebut mengandung penonjolan panjang (dendrit) yang bercabang-cabang di antara keratinosit dan berkontak dengan sel-sel Langerhans lainnya untuk membentuk suatu jalinan kontinu. Saat sel ini terpapar oleh antigen/benda asing, sel-sel akan bermigrasi keluar epitel dan menuju kelenjar getah bening regional untuk inisiasi respon imun. Sel langerhans

memiliki badan sel yang bulat, sitoplasma pucat dan nukleus berbentuk oval.

• Stratum germinativum/ Membran basale

Stratum germinativum/ Membran basale terdiri dari satu lapis sel yang terletak berbatasan dengan dermis. Membran basale ini berisi sel punca (sel yang membelah dan memperbaharui populasi sel punca serta menghasilkan sel keratinosit), sel keratinosit (sel ini membelah 3-6 kali sebelum bergerak ke atas menuju stratum spinosum dengen bentuk kuboid dan sitoplasma merah muda serta nukleus ungu muda), melanosit (sel penghasil pigmen dengan ciri sitoplasma pucat/ jernih dan nukelus ungu gelap/ basofilik).

Lapisan ini memproduksi sel keratinosit. Ketika sel keratinosit sudah matang akan bermigrasi ke lapisan-lapisan diatasnya sampai pada *stratum corneum*. Sel keratinosit memproduksi keratin (protein tahan air yang dapat mencegah hilangnya cairan tubuh dan masuknya mikroorganisme) selama proses migrasi.

b. Dermis

Dermis terdiri atas lapisan elastis dan fibrosa padat dengan elemenelemen selular dan folikel rambut. Di dalam dermis terdapat adneksaadneksa kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebasea, otot penegak rambut, pembuluh darah, dan jaringan limfatik. Kombinasi kolagen dan serabut elastik membuat jaringan dermis menjadi kuat dan elastis. Dermis terdiri dari dua lapis, yaitu:

Lapisan superfisial

Lapisan superficial terdiri dari matrik ekstraseluler (kolagen, jaringan elastis dan substansi dasar), fibroblas (sel yang membentuk kolagen dan jaringan elastin). Substansi dasar terdiri dari air, elektrolit, protein plasma dan mukopolisakarida sehingga membuat lapisan dermis menjadi turgor. Serat kolagen berfungsi memberi kekuatan pada kulit. Elastin berfungsi untuk mempertahankan kelenturan dari kulit. Lapisan superfisial juga mengandung pembuluh darah, ujung saraf, dan jaringan limfatik.

• Lapisan retikuler

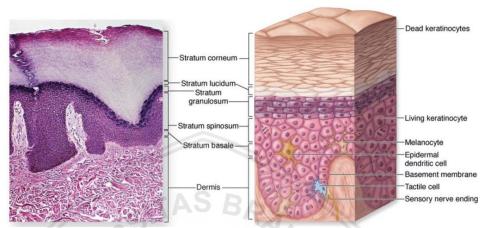
Lapisan retikuler terletak di atas jaringan lemak subkutan.

Lapisan ini mengandung kumpulan pembuluh darah yang lebih besar dibanding lapisan di atasnya. Lapisan ini mengandung serabut kolagen yang tebal, fibroblas, kelenjar keringat, folikel rambut, dan saraf.

c. Subkutan/Hipodermis

Lapisan subkutan merupakan kelanjutan dermis yang terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya. Sel-sel lemak merupakan sel bulat besar, dengan inti terdesak ke pinggir sitoplasma lemak yang bertambah. Sel-sel ini membentuk kelompok yang dipisahkan satu dengan yang lain oleh trabekula yang fibrosa. Lapisan sel lemak disebut *paniculus adipose* yang berfungsi sebagai cadangan

makanan.lapisan ini memisahkan dermis dari lapisan yang berada dibawahnya, yaitu : fascia, otot, dan tulang. Jaringan ini juga mengandung banyak pembuluh darah dan saraf.



Gambar 2.1. Histologi Kulit (Junquiera dan Carneiro, 2005).

2.2 Luka

Luka adalah kerusakan jaringan tubuh yang disebabkan oleh faktor fisik dan kimia disertai dengan gangguan struktur kontuinitas jaringan. Luka merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan adanya kerusakan struktur dan fungsi anatomis dari jaringan normal. Berdasarkan jumlah lapisan kulit dapat dikategorikan menjadi luka *superficial*, *partial thickness*, dan *full thickness*. Luka superficial ditandai dengan kerusakan jaringan dangkal sebatas lapisan epidermis. Luka *partial thickness* melibatkan lapisan epidermis dan sebagian dermis. Sedangkan luka *full thickness* kerusakan jaringan telah mencapai subkutan (Boateng *et al.*, 2007).

Sedangkan menurut Suryadi dkk. (2013), luka adalah cedera dimana kulit robek terpotong atau tertusuk, atau trauma benda tumpul yang

2.3 Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah usaha untuk memperbaiki kerusakan jaringan akibat adanya cedera agar dapat berfungsi kembali. Luka yang terjadi akan menimbulkan efek hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ dan berupa respon stres simpatis, perdarahan, kontaminasi bakteri, dan kematian sel (Kartika, 2015).

Menurut Pavletic (2010) proses penyembuhan luka dibagi menjadi empat fase (**Gambar 2.2**), yaitu : *hemostasis*, *inflamasi*, *proliferasi*, dan *remodelling*. Berikut ini adalah fase penyembuhan luka :

2.3.1 Fase Hemostasis

Luka dapat menyebabkan perdarahan, sehingga secara normal tubuh akan merespon untuk menghentikan perdarahan. Respon tersebut dilakukan dengan kontraksi otot polos dinding pembuluh darah sehingga dalam beberapa menit aliran darah akan berkurang dimediasi oleh penyempitan arteriol akibat dari agreasi platelet yang menyebabkan hipoksis jaringan dan asidosis. Hal ini

2.3.2 Fase Inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada hari ke-0-5. Fase ini diawali dengan kerusakan pembuluh darah akan menyebabkan keluarnya platelet yang berfungsi sebagai hemostatis. Platelet akan menutupi vaskuler yang terbuka Platelet akan menutupi vaskuler yang terbuka dan mengeluarkan substansi vasokonstriksi yang mengakibatkan pembuluh darah kapiler vasokonstriksi. Terjadi penempelan endotel akan menutup pembuluh darah. Periode ini berlangsung 5-10 menit dan akan terjadi vasodilatasi kapiler akibat stimulasi saraf sensoris (Local Sensory Nerve Endding), Local Reflex Action, dan adanya substansi vasodilator (histamin, bradikinin, serotinin, dan sitokin). Histamin menyebabkan peningkatan permeabilitas vena, sehingga cairan darah keluar dari pembuluh darah dan masuk ke daerah luka sehingga secara klinis terjadi edema jaringan dan keadaan lingkungan manjadi asidosis. Secara klinis fase inflamasi ditandai dengan eritema, edema, dan rasa sakit yang berlangsung dari hari ke-3 sampai ke-4 (Suryadi, 2013). Terjadinya edema, pembengkakan, dan rasa nyeri disebabkan adanya pembentukan kinin dan prostaglandin yang menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas

pembuluh darah. Peningkatan PMN (Polimorfonuklear) terutama neutrofil terjadi pada 24-48 jam pasca luka. Neutrofil melakukan fagositosis dan mencerna organisme patologis dan sisa jaringan. Julah neutrofil akan menurun jika tidak terjadi infeksi yang terjadi pada hari ketiga (Kresno, 2003).

Makrofag muncul pada 48-96 jam setelah terjadinya luka dan mencapai puncak pada hari ke-3. Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap ada di dalam luka hingga muncul proses penyembuhan berjalan sempurna. Setelah makrofag maka muncul Limfosit-T pada hari ke-5 dan mencapai puncak pada hari ke-7. Makrofag seperti halnya neutrofil, melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan (Roseberg *et al.*, 2003).

2.3.3 Fase Proliferasi

Fase poliferasi meliputi epilitelisasi, angiogenesis, dan fibroplasia. Fibroplasia ditandai dengan adanya diferensiasi sel-sel masenkim menjadi fibroblast. Fibroblast berpoliferasi dan bermigrasi menuju area luka. Sel fibroblast memiliki peranan dalam mensintesis dan melepaskan kolagen dalam jumlah tertentu. Kadar kolagen yang disekresikan akan menentukan *tensile strenght*. Selanjutnya proses angiogenesis yaitu pembentukan pembuluh darah baru yang kemudian sel endotel akan bermigrasi menuju area luka. Serangkaian proses fibroplasia dan angiogenesis ini akan membentuk jaringan granulasi pada area luka yang tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag, dan sel endotel. Apabila jaringan granulasi telah terbentuk dengan baik maka sel epidermal pada terapi tepi luka akan mengalami poliferasi yang diikuti

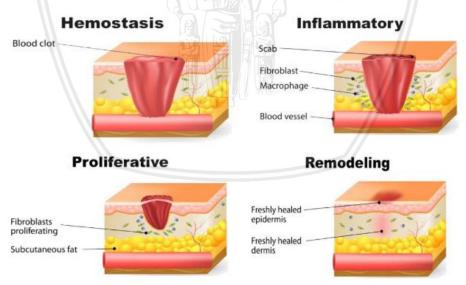
BRAWIJAYA

BRAWIJAYA

dengan akumulasi membran basalis. Dengan demikian luka ditutup oleh selsel epidermal (Hosgood, 2009).

2.3.4 Fase Remodeling

Fase remodeling atau maturasi ditandai dengan adanya pengaturan ulang serat kolagen dan pembentukan struktur baru untuk meningkatkan kekuatan regangan. Selama fase ini jaringan baru yang terbentuk akan disusun seperti jaringan asalnya. Fase maturasi berlangsung mulai hari ke-21 hingga 1 tahun. Fase ini dimulai setelah kavitasi luka terisi oleh jaringan granulasi dan proses peepitelisasi berhenti. Perubahan yang terjadi setelah penurunan kepadatan sel dan vaskularisasi, pembuangan matriks temporer yang berlebihan, dan penataan serat kolagen sepanjang garis luka untuk meningkatkan kekuatan jaringan baru. Fase penyembuhan luka ini terjadi selama bertahun-tahun (Gurtner, 2007).



Gambar 2.2. Fase Penyembuhan Luka (Pavletic, 2010).

2.4 Infeksi Nosokomial

Infeksi adalah masuk dan berkembangnya mikroorganisme dalam tubuh yang menyebkan sakit disertai dengan gejala klinis baik lokal maupun sistemik (Potter dan Perry, 2005). Infeksi nosokomial dapat diartikan sebagai infeksi yang berasal atau terjadidi rumah sakit. Infeksi yang timbul dalam kurun waktu 48 jam setelah dirawat sampai dengan 30 hari setelah selesai dirawat di rumah sakit (Nasution, 2012). Menurut WHO (2002), infeksi nosokomial juga dapat terjadi pada petugas kesehatan yang bekerja di rumah sakit.

2.4.1. Patogenesis Infeksi Nosokomial

Infeksi nosokomial disebabkan oleh virus, jamur, parasit, dan bakteri. Faktor predisposisi dari infeksi nosokomial adalah kualitas imun pasien yang rendah, pemakaian bat imunosupresif dan antimikroba, tindakan invasif seperti pemasangan kateter, endotrakealtube, dan trakeotomi, serta tranfusi darah yang non aseptis. Infeksi nosokomial dapat ditularkan melalui kontak langsung, kontak tidak langsung, melalui *droplet*, dan melalui udara (Nasution, 2012).

Menurut Nasution (2012) penularan agen infeksius dari rumah sakit dapat melalui beberapa cara seperti berikut :

- a. Penularan secara kontak, yang terbagi menjadi tiga bentuk yaitu: penularan melalui kontak langsung yang melibatkan kontak tubuh yang terinfeksi dengan tubuh yang rentan, penularan melalui kontak tidak langsung yang melibatkan tubuh yang rentan dengan alat rumah sakit yang terkontaminasi, dan penularan melalui *droplet* yang terjadi ketika individu terinfeksi batuk, bersin, berbicara, atau melalui prosedur medis seperti bronkoskopi.
- b. Penularan melalui udara yang mengandung mikroorganisme atau partikel debu yang mengandung agen infeksius. Mikroorganisme akan terbawa melalui udara sehingga terhirup oleh individu yang rentan. Sebagai contoh mikroorganisme yang dapat terbawa oleh udara adalah Legonella, Mycobacterium tuberculosisl, Rubela, dan virus varisela.
- c. Penularan melalui makanan, air, obat-obatan, dan peralatan yang terkontaminasi.
- d. Penularan melalui vektor, seperti nyamuk, lalat, tikus, dan kutu.

2.4.2. Etiologi Infeksi Nosokomial

Persentase mikroorganisme penyebabkan infeksi nosokomimial pada luka operasi yaitu *Staphylococcus aureus* 20%, *Pseudomonas aeruginosa* 16%, *Coagulase-negative Staphylococci* 15%, *Enterococci*, jamur, *Enterobacter*, dan *Escherichia coli* < 10% (Nasution, 2012).

2.4.3 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm yang tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optium pada suhu 37°C tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada pembenihan berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada kulit dan selaput mukosa (Fischetti, et al., 2000).

Staphylococcus aureus adalah penyebab terjadinya infeksi yang bersifat piogenik (sifat bakteri yang menghasilkan nanah pada luka yang mengalami infeksi). Bakteri ini dapat masuk ke dalam kulit melalui folikelfolikel rambut, kelenjar keringat, dan luka kecil. Staphylococcus aureus dikenal sebagai bakteri yang sering mengkontaminasi luka pasca operasi (bedah) sehingga menimbulkan komplikasi (DeLeo et, al., 2009).

2.4.4 Kriteria Infeksi Nosokomial

Kriteria terjadinya infeksi nosokomial pada pasien diantaranya yaitu pada waktu pasien mulai dirawat di rumah sakit tidak didapatkan tandatanda klinis infeksi, pada waktu pasien mulai dirawat di rumah sakit tidak sedang dalam masa inkubasi infeksi, tanda-tanda klinis infeksi baru timbul sekurangkurangnya 48 jam sejak mulai perawatan, infeksi tersebut bukan merupakan sisa infeksi sebelumnya. Infeksi nosokomial yang terjadi pada kulit ditandai dengan pengelupasan kulit, terjadi sepsis, dan nekrosis BRAW. epidermal (Nasution, 2012).

2.4.5 Dampak Infeksi Nosokomial

Dampak infeksi nosokomial akan menyebabkan peningkatan angka morbiditas dan angka mortalitas serta dapat meyebabkan kerugian lain seperti rasa tidak nyaman bagi pasien, perpanjangan hari rawat inap (length of stay), menambah biaya perawatan dan pengobatan sehingga dapat memberikan kesan buruk terhadap rumah sakit (Milton, et al., 2015).

2.5 Obat Topikal

Obat topikal adalah obat yang mengandung dua komponen dasar yaitu zat pembawa dan zat aktif. Zat aktif memiliki efek terapeutik sedangkan zat pembawa adalah bagian inaktif dari sediaan topikal dapat berbentuk cair atau padat yang membawa bahan aktif berkontak dengan kulit. Secara ideal zat pembawa memiliki sifat mudah dioleskan, mudah dibersihkan, tidak menimbulkan iritasi, dan menyenangkan secara kosmetik. Bahan aktif harus berada di dalam zat pembawa dan mudah di lepaskan (Yanhendri dan Yenny, 2012).

2.5.1. Salep

Menurut Yanhendri dan Yenny (2012), salep merupakan sediaan semisolid berbahan dasar lemak ditujukan untuk kulit dan mukosa. Dasar salep yang digunakan sebagai pembawa dibagi dalam 4 kelompok yaitu: dasar salep senyawa hidrokarbon, dasar salep serap, dasar salep yang bisa dicuci dengan air dan dasar salep yang larut dalam air. Setiap bahan salep menggunakan salah satu dasar salep tersebut. Dasar kelompok salep diantaranya adalah sebagai berikut:

a. Dasar salep hidrokarbon

Dasar salep ini dikenal sebagai dasar salep berlemak seperti *vaselin album (petrolatum), parafin liquidum. Vaselin album* adalah golongan lemak mineral diperoleh dari minyak bumi, titik cair sekitar 10-50°C, mengikat 30% air, tidak berbau, transparan, konsistensi lunak. Hanya sejumlah kecil komponen air dapat dicampurkan ke dalamnya. Sifat dasar salep hidrokarbon sukar dicuci, tidak mengering dan tidak berubah dalam waktu lama. Salep ini ditujukan untuk memperpanjang kontak bahan obat dengan kulit dan bertindak sebagai penutup.

b. Dasar salep serap

Dasar salep serap dibagi dalam 2 tipe, yaitu bentuk anhidrat (parafin hidrofilik dan lanolin anhidrat (*adeps lanae*) dan bentuk emulsi (lanolin dan *cold cream*) yang dapat bercampur dengan sejumlah larutan

c. Dasar salep yang dapat dicuci dengan air

Dasar salep yang menggunakan emulsi minyak dalam air misalnya salep hidrofilik. Dasar salep ini dapat dicuci dengan air karena mudah dicuci dari kulit, sehingga lebih dapat diterima untuk dasar kosmetik. Tampilannya menyerupai krim karena fase terluarnya adalah air. Keuntungan dari dasar salep ini adalah dapat diencerkan dengan air dan mudah menyerap cairan yang terjadi pada kelainan dermatologi (Yanhendri dan Yenny, 2012).

d. Dasar salep larut dalam air

Dasar salep larut dalam air disebut juga dengan dasar salep tak berlemak terdiri dari komponen cair. Dasar salep jenis ini memberikan banyak keuntungan seperti halnya dasar salep yang dapat dicuci dengan air karena tidak mengandung bahan tak larut dalam air seperti parafin, lanolin anhidrat. Contoh dasar salep ini ialah polietilen glikol (Yanhendri dan Yenny, 2012).

2.6 Kerang Darah

Menurut Romimohtarto dan Juwana, (2001) Kerang darah (*Anadara granosa*) merupkan jenis kerang yang termasuk kedalam kelas *Pelecypoda* dan dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Animalia

Filum : Mollusca

Kelas : Petecypoda

Sub Kelas : Lamelladibranchia

Ordo : Taxodonta

Family : Arcidae

Genus : Anadara

Spesies : Anadara granosa

Menurut Ghufran, (2011) spesies *Anadara granosa*, memiliki ciri – ciri lapisan cangkang umumnya bewarna putih keruh. Kerang darah hidup terbenam dibawah permukaan tanah pada kedalaman perairan 0-1 m, serta memiliki substrat pasir berlumpur. Cangkang kerang darah berbentuk bulat, agak lonjong, mempunyai dua belahan cangkang yang simetris, cangkang berwarna putih ditutupi periostrakum yang berwarna kuning kecoklatan sampai cokelat kehitaman, memiliki garis palial pada cangkang sebelah dalam lengkap dan garis palial bagian luar beralur, bagian dalam halus dengan warna putih mengkilat, warna dasar yaitu kemerahan atau merah darah, bagian daging berwarna merah dan ukuran lebar cangkang dapat mencapai 4 cm

BRAWITAYA

(Gambar 2.3). Penamaan kerang darah dikarenakan kelompok kerang ini memiliki pigmen darah merah atau haemoglobin yang disebut *bloody cockles* (Sahara, 2011).

Menurut Sabdono dkk (2014), Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) merupakan metode yang banyak digunakan dalam menentukan derajat deasetilissi kitosan, masing- masing kitosan mempunyai derajat deasetilisasi yang berbeda-beda. Derajat deasitilasi dihitung dari hasil FTIR didapat derajat deasetilisasi kerang simping bewarna merah sebesar 66,27%, kerang simping bewarna putih sebesar 71,37%, dan kerang darah sebesar 69,72%.



Gambar 2.3 Kerang darah (Anadara granosa) (Romimohtarto dan Juwana, 2001)

2.7 Kitosan terhadap Luka

Kitosan adalah polisakarida yang tersusun oleh glukosamin dan Nasetilglukosamin dari turunan kitin melalui reaksi deasetilasi, yang diekstraksi dari cangkang *crustaceae* dan merupakan komponen terbesar dari kitosan. Kitosan berupa serbuk atau serpihan berwarna putih atau krem dan tidak berbau (Rowe, dkk, 2009). Kitosan tidak dapat larut dalam air atau larutan alkali diatas pH 6,5 tetapi larut dengan cepat dalam asam organik cair seperti asam formiat, asam sitrat, dan mineral lain kecuali sulfur. Kitosan dapat didegradasi secara biologis dan tidak beracun sehingga aman bagi lingkungan (Djamaludin, 2009).

Kitosan memiliki empat fungsi yaitu dalam proses penyembuhan luka yaitu sebagai haemostasis dengan cara mempercepat proses pembekuan darah dengan menstimulasi faktor pembekuan darah seperti protrombin dan fibrinogen, sehingga mengurangi darah yang keluar, sebagai anti inflamasi yaitu dengan mengurangi produksi COX-2 sehingga akan menekan peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi secara berlebihan seperti TNF-α dan akan menghambat PGE2 yang bekerja sebagai mediator inflamasi, dengan penurunan produksi enzim COX-2 dan PGE2 makan akan mempercepat proses inflamasi, dan sebagai anti mikroba dengan cara berikatan dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran, dan terutama menyebabkan kebocoran bagian intraseluler mikroba, serta kitosan dapat menembus nukleus dari bakteri untuk menghambat sintesis mRNA dan protein dengan cara berikatan

pada DNA mikroba, dan yang terakhir kitosan dapat berperan dalam mempercepat fase proliferasi luka dengan cara mengaktivasi migrasi sel PMN, makrofag, dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka, sehingga akan mempercepat pembentukan jaringan baru pada luka (Ratnawati, 2014).

Kitosan diaplikasikan pada daerah luka akan menginduksi analgesia dengan memberikan efek dingin, nyaman, dan sejuk. Kitosan juga mempengaruhi fungsi makrofag dan sekresi sejumlah enzim (kolagenase) dan sitokin (tumor necrosis factor) selama penyembuhan luka sehingga mempercepat proses penyembuhan luka. Kitosan memiliki kemampuan untuk meningkatkan hemostasis, menurunkan fibroplasia, meningkatkan regenerasi jaringan serta memiliki aktivitas antimikroba (Anggraeni, 2012).

2.8 Respon Imunologi pada Luka Infeksi Nosokomial

Mikroorganisme patogen penyebab infeksi nosokomial dapat masuk ke dalam luka dikenali oleh struktur *pathogen associated molecular patterns* (PAMP), seperti lipopolisakarida bakteri Gram-negatif. Reseptor untuk PAMP adalah *toll-like receptor* (TLR) yang diekspresikan pada neutrofil, makrofag, epidermis dan sel endotel. Ketika TLR sel mengikat produk asing, sel diaktifkan untuk menghasilkan mediator pro-inflamasi, termasuk sitokin (TNF-α, IL-1), molekul adhesi (integrin, selectins) dan *growth factor*. Mediator pro-inflamasi akan memulai fase inflamasi pada proses penyembuhan luka. Fase inflamasi ditandai dengan migrasi leukosit ke dalam

luka, yang terjadi dalam waktu 6 jam dari terbentuknya luka (Williams dan Moores, 2009).

Produk degradasi komplemen menarik neutrofil pada luka dan menjadi opsonin untuk fagositosis. Opsonin berfungsi sebagai molekul yang mengikat bakteri dan sel asing, serta meningkatkan fagositosis. Neutrofil akan mendominasi peradangan untuk 3 hari pertama dan memuncak pada 24-48 jam pasca terbentuknya luka. fibrinopeptida leukotrien, dan peptida bakteri berfungsi sebagai kemoatraktan untuk neutrofil. Aktifasi trombosit akan melepaskan zat kemoatraktan untuk makrofag dan fibroblas, seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor beta* (TGF-β). Neutrofil membunuh bakteri dan menghilangkan debris ekstraseluler melalui fagositosis, pelepasan *reactive oxygen species* (ROS), mediasi vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, serta menghasilkan sitokin pro-inflamasi (Williams dan Moores, 2009).

Neutrofil yang mendominasi dalam awal inflamasi memiliki waktu hidup yang lebih pendek dan pada luka yang lebih lama akan digantikan oleh monosit. Konsentrasi monosit pada luka akan memuncak pada pada 48-72 jam pasca terbentuknya luka dan dapat bertahan selama berminggu-minggu. Sitokin yang dilepaskan dari neutrofil teraktivasi, produk degradasi, dan protein inflamasi dalam matrik ektraseluler akan menarik monosit ke dalam luka. *Growth Factor* dan sitokin yang berperan sebagai kemoatraktan untuk monosit antara lain PDGF, TGF-α, TGF -β, VEGF, IGF-1, NGF, MCP-1 dan MIP-1a. Setelah peradangan akut mereda, permeabilitas vaskuler lokal

dipulihkan dan sel darah akan berhenti masuk ke dalam ruang ekstravaskuler. Jika bahan asing atau bakteri tetap pada luka, monosit mengalami proliferasi dan inflamasi akut berlanjut menjadi inflamasi kronis (Werner dan Grose, 2003, Williams dan Moores, 2009).

Monosit bertransformasi menjadi makrofag dan berada dalam matriks ekstraseluler sementara. Makrofag meneruskan proses inflamasi melalui produksi dan pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1α, IL-1β, IL-6 dan TNF-α. Makrofag juga merangsang dan memodulasi proses perbaikan (fibroplasia, angiogenesis dan epitelisasi) melalui pelepasan FGF-2, TGF-α, TGF-β, EGF, IGF, PDGF, VEGF, MMP dan TIMP. Makrofag berperan penting dalam *debridement* luka melalui aktivitas fagositosis dan modifikasi matriks ekstraseluler sementara menjadi jaringan granulasi (Williams dan Moores, 2009).

2.9 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-a)

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) adalah sitokin proinflamasi utama yang memiliki berat molekul sebesar 26 kDa yang kemudian dipecah menjadi 17 kDa. TNF- α berfungsi sebagai mediator penting untuk menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut (Listyanti, 2006). TNF- α adalah sitokin yang bersifat pleitropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T (Navarro-Gonzales, 2008).

2.10 Kolagen

Kolagen adalah sebagian besar jenis protein dalam tubuh manusia dan hewan. Kolagen merupakan zat protein berbentuk serabut yang merupakan bagian utama jaringan ikat yang diperlukan pada keadaan-keadaan penyembuhan luka, pembentukan jaringan parut, serta pembentukan matris tulang. Sekitar 30 bentuk rantai alfa terdapat pada 14 tipe kolagen. Kolagen tipe I,II,dan III merupakan kolagen interstisiil atau kolagen *fibriler* yang merupakan jumlah yang paling banyak. Kolagen adalah komponen kunci pada fase dari penyembuhan luka. Fragmen-fragmen kolagen melepaskan kolagenase leukositik untuk menarik fibroblas ke daerah luka. Dalam waktu 10 jam setelah luka, telah terjadi peningkatan sintesis kolagen. Setelah 5 sampai 7 hari, sintesis kolagen mencapai puncak dan kemudian menurun

BRAWIJAYA

perlahan-lahan. Pada awalnya terdapat kolagen tipe III yang lebih dominan yang kemudian akan diganti oleh kolagen tipe I (Triyono, 2015).

2.11 Mencit (*Mus musculus*)

Berdasarkan Tahari (2013), klasifikasi mencit adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Klas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : Mus musculus

Mencit (*Mus musculus*) memiliki ciri yaitu bentuk tubuh kecil, berwarna putih keabu-abuan dengan warna abdomen yang sedikit lebih pucat. Berat badan mencit jantan dewasa mencapai 20-40 g, sedangkan pada mencit betina dewasa mencapai 18-35 gram. Umur dewasa mencit dimulai pada 35-60 hari serta dikawinkan pada umur delapan minggu. Lama hidup mencit mencapai satu sampai tiga tahun, dengan masa kebuntingan 18-21 hari dan masa aktifitas reproduksi 2-14 bulan. Mencit dapat hidup pada temperatur 30°C (Akbar, 2010, Muliani, 2011).

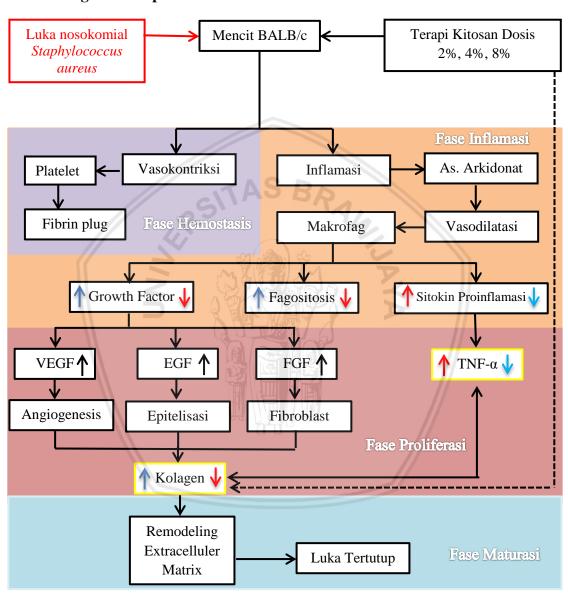
Mencit merupakan hewan yang umum digunakan sebagai hewan percobaan dalam penelitian laboratorium, yaitu mencapai 40-80%. Mencit termasuk dalamkategori hewan omnivora alami yang kuat, dan jinak. Mencit memiliki jumlah anak banyak yaitu 4-13 ekor dengan durasi beranak 5-10 kali per tahun (Muliani, 2011). Sebagai hewan coba, mencit memiliki kelebihan, antara lain siklus hidup pendek, variasi sifat yang tinggi, mudah dihandling, harga relatif murah, dan biaya ransum rendah (Tahari, 2013).



Gambar 2.4. Mencit (Mus musculus)

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

: Variabel bebas

ikat

: Efek terapi salep kitosan kerang darah

: Variabel terikat

: Efek luka insisi yang dikontaminasi bakteri

↑ ↓ : Stimulasi

Hewan coba mencit BALB/c (Mus musculus) diberi perlakuan incisi sehingga meyebabkan kerusakan jaringan kemudian diinfeksi dengan benang yang mengandung Staphylococcus aureus sebagai interpretasi luka nosokomial. Proses penyembuhan luka merupakan proses biologi dalam tubuh yang terdiri dari hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling (Morison, 2003). Serangkaian proses penyembuhan luka terjadi sesaat setelah terjadi luka. Salep cangkang kerang darah (Adanare granosa) diaplikasikan ke daerah luka bersifat sebagai hemostat yang akan menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah sehingga mempercepat penghentian perdarahan. Penghentian perdarahan diawali dengan pembentukan agregat dan degranulasi oleh platelet sehingga terbentuk formasi pembekuan darah. Fibrin plug akan terbentuk karena aktivasi platelet yang disertai adanya eritrosit dan fibrin. Kemudian fibrin plug akan mengalami pengeringan dan membentuk scrub yang berfungsi mencegah kehilangan darah, melindungi luka, serta sebagai barrier terhadap infeksi bakteri. Platelet juga berfungsi dalam pembentukan growth factor.

Proses selanjutnya adalah proses inflamasi yang berfungsi untuk menghilangkan jaringan mati serta melawan infeksi oleh bakteri patogen. Kerusakan jaringan saat luka terbentuk akan memicu aktivasi enzim fosfolipase A2 yang mengubah fosfolipid pada membran sel yang mengalami kerusakan menjadi asam arakidonat. Asam arakidonat akan dimetabolisme menjadi dua jalur yakni lipooksigenase dan siklooksigenase. Jalur lipooksigenase menghasilkan leukotrin sementara alur siklooksigenase

dihasilkan beberapa mediator radang salah satunya adalah prostaglandin. Kemampuan trombosit dalam mensintesis beberapa faktor pertumbuhan serta didukung oleh sekresi beberapa mediator radang tersebut akan menginisiasi terjadinya fase inflamasi. Fase inflamasi ditandai dengan terjadinya vasodilatasi disekitar jaringan perlukaan dan migrasi leukosit salah satunya adalah monosit. Saat bermigrasi menuju luka, monosit akan bertransformasi menjadi makrofag dan melakukan fagositosis serta melepas beberapa sitokin proinflamasi salah satunya adalah TNF-α. Makrofag juga mengekspresikan beberapa *growth factor* seperti VEGF, EGF, dan FGF yang berperan dalam proses angiogenesis, epitelisasi dan pembentukan fibroblast.

Salep cangkang kerang darah memiliki kandungan kitosan yang bersifat sebagai bakteriostatik sebagai anti inflamasi sehingga mampu mempercepat respon inflamasi. Ketika respon inflamasi selesai, maka TNF-α dan jumlah sel radang akan menurun. Selanjutnya, luka akan memasuki proses proliferasi menstimulus angiogenesis dan sintesis faktor pertumbuhan yang penting untuk pembentukan fibroblast. Sel-sel keratinosit dan fibroblast akan mengalami proliferasi sehingga mempercepat epitelisasi dan pembentukan jaringan granulasi yang berperan dalam pembentukan kolagen. Proses terakhir dalam penyembuhan luka yakni fase remodeling atau maturasi. Pada fase ini, fibroblast sudah mulai meninggalkan jaringan granulasi, warna kemerahan dari jaringan berkurang akibat pembuluh darah mengalami regresi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat terbentuknya jaringan ikat. TNF-α akan menstimulasi sintesis

kolagen dengan mengaktivasi metalloproteinase, suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen ECM. Hasil dari sintesis dan degradasi ECM merupakan remodeling kerangka jaringan ikat, dan struktur tersebut merupakan gambaran pokok penyembuhan luka.

3.1 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesa dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Terapi pemberian salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dapat menurunkan eksprei TNF-α pada hewan mencit (*Mus musculus*) jantan galur *BALB/c* model luka nosokomial.
- 2. Efek terapi pemberian salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dapat meningkatkan kepadatan kolagen pada luka hewan mencit (*Mus musculus*) jantan galur *BALB/c* model luka nosokomial.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan April 2017 dan penelitian ini dilakukan dibeberapa laboratorium yaitu :

- Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Pembuatan salep, suspensi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml dan pembacaan hasil histopatologi kulit di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
- Pembuatan sintesis kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa) di Laboratorium Kimia Sintesis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- 4. Uji *flocytometry* untuk pengamatan ekspresi TNF-α yang dilkukan di Laboratorium Biomolekuler FMIPA Universitas Brawijaya Malang.
- Pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, restrainer, spuit 1 ml, dissecting set, oven, blender, magnetic stirrer, labu alas, desikator, mikroskop, glove, masker, autoclave, jarum tapper 1/2 GT, mikrotom, serta alat untuk uji flowcytometri seperti yellow tip, blue tip,

BRAWIJAYA

mortir, sentrifuge tube, alat uji flowcytometry dan software pembaca hasil flowcytometry.

Bahan yang dipersiapkan dalam penelitian ini antara lain mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 24 g berumur 8 minggu, akuades, cangkang kerang darah, NaOH, HCl, vaselin album, benang silk 4/0, alkohol 70 %, ketamin, formalin 10%, antibodi anti TNF-α, pewarnaan *Masson Trichome*, akuades, NaCl fisiologis 0,9%, dan fenol 4%.

4.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sabagai berikut :

- 1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
- 2. Sintesis kitosan dari cangkang kerang darah (Anadara granosa).
- 3. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml.
- 4. Perlakuan insisi dan penjahitan hewan coba dengan benang terkontaminasi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml dan digunakan pola simple interrupted suture
- 5. Terapi salep kitosan cangkang kerang darah (Anadara granosa).
- 6. Pengambilan sampel kulit dan pembuatan preparat histopatologi kulit.
- 7. Penghitungan ekspresi TNF-α dengan metode *flocytometry*.
- 8. Tahap perhitungan kepadatan kolagen dengan metode pewarnaan Masson Trichrome.
- 9. Analisis data.

4.3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL) dan *post control design only*. Tiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan mencit. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain adalah:

- 1) Kelompok 1 adalah mencit yang diinsisi, dijahit dengan benang silk 4/0 secara aseptis (kontrol negatif).
- 2) Kelompok 2 adalah mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 terkontaminsi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml tanpa pemberian terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa* (kontrol positif).
- 3) Kelompok 3 adalah mencit diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 terkontaminsi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml serta dilakukan terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan konsentrasi 2%.
- 4) Kelompok 4 adalah mencit diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 terkontaminsi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml serta dilakukan terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan konsentrasi 4%.
- 5) Kelompok 5 adalah mencit yang telah dilakukan insisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 terkontaminsi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml serta dilakukan terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan konsentrasi 8%.

BRAWIJAY

4.3.2. Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 24 gr \pm 3 gr berumur 8 minggu. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga banyaknya perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus p (n-1) \geq 15 (Montgomery *and* Kowalsky, 2011) :

 $t(n-1) \ge 15$

Keterangan:

 $5 (n-1) \ge 15$

t: Jumlah perlakuan

 $5n - 5 \ge 15$

n: Jumlah ulangan yang diperlukan

 $5n \ge 20$

 $n \ge 4$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor mencit.

4.3.3. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas : dosis terapi salep kitosan cngkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml.
- b. Variabel terikat : kepadatan kolagen dan ekspresi TNF-α.
- c. Variabel kontrol: homogenitas mencit meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kandang serta perlakuan luka model nosokomial.

BRAWIJAY/

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1. Persiapan Hewan Coba

Sampel penelitian menggunakan mencit sebagai hewan percobaan. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Mus musculus* galur BALB/c jantan dengan berat 24 g berumur 8 minggu. Mencit diadaptasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian. Menurut Muliani (2011), hewan coba diberi minum secara *ad libitum* dan pakan berbentuk pelet sebanyak 10% berat badan setiap pagi dan sore. Mencit kemudian dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan masingmasing kelompok terdapat empat ekor mencit di dalam kandang. Kandang mencit berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam kayu agar kandang tidak lembab. Mencit dipelihara dalam Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.4.2. Pembuatan Kitosan Cangkang Kerang Darah

Bahan baku cangkang kerang darah (*Anadara gransa*) yang didapatkan dari Pasar Blimbing Malang. Cangkang kerang darah yang digunakan dibersihkan dari daging kerang, kotoran, bulu yang melekat menggunakan air kran dan dibilah dengan akuades, kemudian dikeringkan menggunakan oven. Setelah cangkang kerang darah dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan berukurn 100 mesh. Selanjutnya dilakukan sintesis kitosan yang terdiri dari tahapan deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi.

BRAWIJAYA

a. Deproteinasi

Sebanyak 400 gram serbuk cangkang kerang darah yang telah diayak direaksikan dengan 3000 ml NaOH 1M ambil diaduk menggunakan magnetik stirrer pada suhu 80° C selama 1 jam. Kemudian padatan disaring dan residu dicuci dengan akuades hingga pH netral. Kemudian residu tersbut dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 80° C hingga kering \pm 3 jam (Hastuti dan Tulus. 2015).

b. Demineralisasi

Sebanyak 200 gram serbuk hasil deproteinasi ditambah dengan 2000 ml HCl 1 M dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 60 menit pada suhu kamar. setelah itu endapan disaring dan residu dicuci dengan akuades hingga pH netral. Kemudian residu tersebut dikeringkan kembali dengan menggunakan oven bersuhu 80°C selama 3 jam. Hasil endapan ini disebut dengan kitin (Hastuti dan Tulus. 2015).

c. Deasetilasi

Sebanyak 40 gram serbuk hasil demineralisasi ditambah dengan 250 ml NaOH 50% (b/v), kemudian direfluks didalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C. Hasil refluks didinginkan, disaring lalu dicuci dengan akuades sampai pH netral. Setelah itu endapan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama 3 jam dan lalu endapan yang telah kering diletakan dalam desikator selama 24 jam (Hastuti dan Tulus. 2015).

BRAWIJAYA

4.4.3. Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah

Salep dibuat dengan bahan vaselin album yang termasuk dasar salep hidrokarbon. Pemilihan sediaan salep dengan bahan basis vaselin album karena sifatnya yang dapat menutup luka dengan baik serta dapat menyerap air dalam luka sehingga dapat meningkatkan hidrasi pada kulit (Naibaho, dkk., 2013). Efek hidrasi pada stratum korneum akan membuka struktur lapisan tanduk yang kompak dan juga benang-benang keratin dari stratum korneum akan mengembang sehingga kulit menjadi lebih permeabel (Khielhorn, 2006). Dengan kemampuan basis vaselin album yang dapat menghidrasi kulit maka dapat meningkatkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit.

Salep kitosan cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dibuat dengan menformulasikan kitosan dengan bahan pembawa vaselin album dengan masing-masing konsentrasi yaitu 2%, 4%, 8% yang dibuat sebanyak 20 gram. Dilakukan dengan cara mencampur kitosan dan vaselin album menggunakan mortar. Setelah itu disimpan dalam *tube* dan diberi label.

4.4.4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Kultur murni *Staphylococcus aureus* dalam NA *Slant* miring yang telah diremajakan selama 3 hari berturut-turut diinokulasikan 1 ose ke dalam 2 ml NB steril kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kultur cair *Staphylococcus aureus* dalam NB steril disetarakan dengan larutan standar Mc.Farland No I (kekeruhan bakteri ± 3 ×10⁸ CFU/ml).

Selanjutnya, biakan bakteri diencerkan dengan NB steril hingga konsentrasinya menjadi 10⁵ CFU/ml (Sujono, 2010).

4.4.5. Identifikasi Kemurnian Bakteri Staphylococcus aureus

Identifikasi kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan mengamati karakteristik pertumbuhan bakteri pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*). Identifikasi bakteri dengan media MSA (*Mannitol Salt Agar*) dapat dilakukan dengan cara yaitu koloni bakteri dari media NA (*Nutrient Agar*) slant diambil dan digoreskan pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*). Setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Jika *Staphyllococcus aureus* positif tumbuh pada media MSA, media dan koloni berwarna kuning karena terjadi fermentasi manitol menjadi asam. Produk yang dihasilkan bakteri ini adalah asam organik yang mengubah indikator pH di MSA, merubah warna merah media MSA menjadi kuning cerah dan hasil negatif tidak ada perubahan warna (Tambayong, 2009).

Media MSA mengandung konsentrasi garam NaCl yang tinggi (7,5%-10%) sehingga membuat MSA menjadi media selektif untuk *Micrococcaceae* dan *Staphylococcus*, karena tingkat NaCl yang tinggi menghambat bakteri yang lain tumbuh (Boerlin *et al.*, 2003).

4.4.6. Pembuatan Benang Terkontaminasi Bakteri Staphylococcus aureus

Benang silk 4/0 yang digunakan dikontaminasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml. Benang silk 4/0 tersebut dipotong dengan panjang 5 cm dan dimasukkan kedalam air mendidih selama 3 menit. Setelah itu benang silk 4/0 dikeringkan menggunakan kertas steril.

Kemudian benang silk 4/0 dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 8 ml dalam pengenceran suspensi *Staphylococcus aureus* yang dihomogenkan selama 10 detik dan direndam dalam suspensi selama 30 menit. Selama periode ini, sekitar 10⁵ sel terabsorpsi pada benang. Setelah direndam, benang dikeluarkan dari tabung dan dikeringkan. Jumlah organisme yang teradsorpsi pada benang dapat dipastikan dengan cara benang digoyangkan dalam tabung reaksi yang berisi 2 mL air suling steril pada *shaker twistaction* selama 45 menit pada pengaturan terendah. Setelah bakteri dielusi (proses ekstraksi suatu bahan dari bahan lain dengan mencuci menggunakan pelarut) dari benang silk 4/0, maka hasil suspensi didilusi (melarutkan bakteri dalam media cair) dan diinokulasi pada media MSA (Mcripley *and* Whitney, 1976).

4.4.7. Pembuatan Luka Model Nosokomial pada Mencit

Masing-masing mencit diberi label pada ekornya dengan menggunakan spidol tahan air sesuai kelompoknya. Kemudian mencit BALB/c jantan dianestesi menggunakan ketamin dengan dosis 0,02 mg/ekor secara intramuskular pada kaki belakang (muskulus *quadriceps*). Punggung mencit yang akan diinsisi dibersikan dengan air sabun. Kemudian dilakukan pencukuran pada daerah punggung dan dibersihkan dengan alkohol 70 %. Setelah itu dilakukan insisi *longitudinal midline* sepanjang 2.3 ± 0.2 cm sampai dengan *panniculus carnosus*. Luka dijahit dengan benang silk 4/0 terkontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* (10⁵ CFU/ml) (Dai, 2011). Penjahitan dilakukan dengan jarum *tapper* 1/2 GT

35 mm pola *simple interrupted suture* sebanyak 4 jahitan dengan jarak masing-masing jahitan 5 mm pada luka insisi.

4.4.7. Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah

Pemberian salep sebanyak 140 gr yang dilakukan dengan teknik pemberian dua kali sehari setiap 12 jam dengan cara mengoleskan salep kitosan sebanyak 2 gr di area luka jahitan selama 7 hari secara aseptis. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap penyembuhan luka secara makroskopis (Djamaluddin, 2009).

4.4.8. Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan kulit pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dilakukan pada hari ke-8 dan dilakukan eutanasi pada mencit dengan cara dislokasi leher. Daerah punggung yang akan diambil kulitnya dibersihkan dari bulu yang mulai tumbuh kembali, kulit digunting dengan ketebalan ± 3 mm sampai dengan subcutan dan sepanjang 1-1,5 cm². Kulit yang diperoleh kemudian di fiksasi dengan larutan *Buffer Neutral Formalin* atau BNF 10% dibiarkan pada suhu kamar selama ± 48 jam (Febram, dkk., 2010).

4.4.9. Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Sediaan kulit yang telah difiksasi menggunakan larutan *Buffer* Neutral Formalin atau BNF 10% lalu dilakukan trimming jaringan dan dimasukkan ke dalam cassette tissue dari plastik. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol yang bertingkat yaitu alkohol 70 %, 80 %, 90 %, alkohol absolut I, alkohol

absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan xylol II. Proses pencetakan atau parafinisasi dilakukan menggunakan parafin I dan parafin II. Sediaan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sedian diletakkan ke arah vertikal dan horizontal sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras (Febram, dkk., 2010).

Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 5 mikrometer dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentngkan di atas air hangat yang bersuhu 46°C dan langsung diangkat yang berguna untuk meregangkan potongan agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan di atas gelas objek dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C sehingga dapat dilakukan pewarnaan *Masson Trichrome* (MT) untuk melihat ketebalan jaringan ikat (Febram, dkk., 2010).

4.4.8. Pengukuran Kadar Relatif TNF-α menggunakan *Flowcytometry*

Sampel yang diuji dengan *flowcytometri* adalah kulit. Selanjutnya sampel kemudian dibilas dengan menggunakan PBS sebanyak dua kali, diletakan dalam cawan petri yang berisi 5 ml PBS, digerus menggunakan pangkal spuit dan dihomogenisasi serta disuspensi dengan PBS. Sel-sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter dengan menggunakan *wire*.

Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. *Pellet* yang dihasilkan disuspensi dengan 1 mL PBS dan di*pipeting* untuk mendapatkan homogenat. Sebanyak 200 μL homogenat dipindahkan pada tabung mikrosentrifus baru dan ditambahkan 500 μL PBS. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 20°C. Hasil supernatan dibuang dan pelletnya ditambahkan 50μl antibodi intraseluler staning (anti TNF-α) yang dikonjugasi dengan label PE. Kemudian data hasil dari *flowcytometri* dianalisis dengan menggunakan *softwer* BD *cellquest Pro*TM. Program diatur sesuai dengan pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi. *Gated* dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat dalam layar komputer (Hefni, dkk., 2013).

4.5 Analisa Data

Data hasil penghitungan kadar relatif TNF- α (*Transforming growt factor-* α) dianalisis secara kuantiatif dengan menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (Anova) kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tinggkat keprcanyaan 5% (α = 0,05). Sedangkan data hasil pengamaatan preparat hitopatologi kulit dianalisa secara kualitatif dengan metode deskriptif berdasarkan kepadatan kolagen dengan bantuan mikroskop mikroskop binokuler BX53 dengan pembesaran 400 X pada satu satu lapang pandang yang kemudian kepadatan kolagen diinterpretasikan menggunakan skor berdasarkan parameter histopatologi (Novriansyah, 2008).

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengujian Kitosan dengan metode FTIR (Fourier Transform Infra Red)

Karakterisasi kitosan dari cangkang kerang darah diuji secara kualitatif menggunakan FTIR (**Lampiran 6**) yang diperoleh dari hasil pembacaan dengan spektroskopi inframerah berdasarkan gugus fungsi dari kitosan. Prinsip kerja FTIR adalah dapat mengenali gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan pada senyawa tersebut. Pola absorbansi yang diserap oleh tiap-tiap senyawa berbeda-beda sehingga senyawa tersebut dapat dibedakan (Sjahfirdi, dkk, 2015).

Spektrum hasil pengukuran FTIR yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum kitosan standar. Spektra IR (*Infra Red*) kitosan memperlihatkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3466 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya vibrasi gugus fungsi –OH. Pita serapan bilangan gelombang 1764 cm⁻¹ dan 1798 cm⁻¹ pada kitosan menunjukkan adanya gugus carbonil (C=O). Pita serapan metil (CH₃) didaerah bilangan gelombang 1453 cm⁻¹. Kemudian serapan pada bilangan gelombang 1632 cm⁻¹ merupakan serapan gugus (NH) yang mendekati dengan kontrol serapan baku kitosan bilangan gelombang 1600,8 cm⁻¹ yang menunjukan adanya gugus amin. Menurut Pitriani (2010), standar serapan kitin pada gugus carbonil (C=O) berbentuk melebar sedangkan pada kitosan terlihat lebih tajam. Hal ini menandakan bahwa gugus asetamida pada kitin telah berubah menjadi gugus amin yang menunjukan adanya kitosan pada senyawa yang diuji.

Pada kitosan baku memiliki serapan gugus fungsi OH di daerah bilangan gelombang 3425 cm⁻¹, serapan CH terletak pada bilangan gelombang 2877

BRAWIJAY

cm⁻¹, pita serapan amin terletak pada bilangan gelombang 1600,8 cm⁻¹, sedangkan pita gugus metil (CH₃) pada bilangan gelombang 1380,9 cm⁻¹. Perbedaan pita serapan kitosan baku dan hasil sintesis disebabkan adanya ikatan atom yang bergeser dalam molekul, sehingga pita serapan bergeser kearah bilangan gelombang yang lebih tinggi. Selain itu, standar kitosan baku sudah dalam bentuk kitosan murni yang telah dihilangkan produk pengotornya, sedangkan hasil sintesis kitosan pada penelitian ini kemungkinan masih mengandung bahan pengotor dan adanya uap air yang terserap sehingga dapat mempengaruhi ikatan hidrogen antar molekul yang menyebabkan peningkatkan puncak serapan gugus fungsi OH (Hastuti dan Tulus, 2015).

Pada proses deasetilasi gugus asetamida pada kitin diubah menjadi gugus amin yang ditandai dengan berkurangnya serapan gugus C=O dari molekul pada spektrum FTIR (Pitriani, 2010). Akan tetapi pada penelitian ini gugus fungsi C=O masih ada yang menandakan hasil dari deasetilasi masih belum sempurna. Hal ini disebabkan kurang lama waktu pemanasan dan suhu pemanasan kurang tinggi sehingga pemutusan gugus asetil (-COCH₃) kurang sempurna. Berdasarkan hasil FTIR ini didapatkan gugus fungsi yang sesuai dengan struktur kitosan standar.

5.2 Pengamatan Makroskopis Efek Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) pada Hewan Model Luka Insisi Nosokomial Pasca Operasi.

Luka merupakan kerusakan atau gangguan pada struktur dan anatomi normal suatu jaringan (Velnar *et, al.*, 2009). Pada saat terjadi luka, tubuh secara normal akan menimbulkan respon terhadap cedera dengan jalan proses

BRAWIJAYA

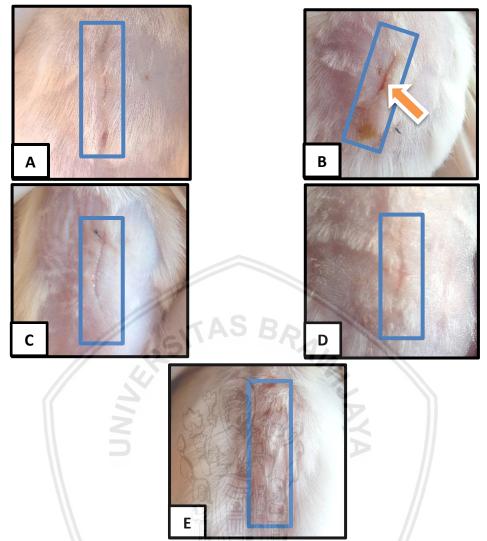
peradangan yang dikarakteristikkan dengan adanya bengkak, kemerahan, panas, nyeri dan kerusakan fungsi (David, 2007). Perawatan luka yang tidak baik dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang terjadi di rumah sakit dan timbul kurun waktu 48 jam setelah dirawat. Persentase mikroorganisme penyebabkan infeksi nosokomial pada luka operasi paling tinggi disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 20% dan biasanya telah mengalami *multidrug resistance* (Nasution, 2012).

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan untuk mengontaminasi benang di tanam pada media NAP (Nutrient Agar Plate) dan MSA (Mannitol Salt Agar). Pertumbuhan bakteri pada media NAP menunjukan koloni bakteri berwarna kuning keemasan yang diinkubasi pada suhu ruang, sedangkan pada media MSA menunjukan bahwa koloni bakteri dapat mengubah warna merah pada media menjadi warrna kuning (Lampiran 7). Dari hasil tersebut membuktikan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri Staphylococcus aureus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Jawetz et al., (2005) bahwa bakteri Staphylococcus aureus mampu memfermentasi manitol yaitu asam yang dihasilkan bakteri Staphylococcus aureus menyebabkan perubahan *phenol red* pada media dari merah menjadi kuning. Media MSA merupakan media selektif yang dapat membedakan bakteri Staphylococcus aureus dengan bakteri Staphylococcus lainnya yang ditandai hasil positif dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning (Oscarina, 2015). Berdasarkan hasil uji antibiogram menunjukan bahwa bakteri yang digunakan merupakan bakteri Staphylococcus aureus yang telah mengalami *multidrug resistance* (MDR) (**Lampiran 8**). Bakteri *multidrug resistance* (MDR) adalah bakteri yang resisten terhadap minimal satu jenis antibiotik dari tiga atau lebih golongan antibiotik yang berbeda (Kurniawati, dkk, 2015).

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan penyembuhan luka pada hewan model luka insisi nosokomial pasca operasi secara makroskopis pada hari ke-8 setelah insisi luka. Perubahan makroskopis yang diamati yaitu penutupan luka, luka kering dan pertumbuhan rambut. Kontrol negatif (kelompok mencit yang di insisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 secara aseptis) menunjukan luka insisi kering, luka menyatu dan tidak mengalami inflamasi serta mulai ditumbuhi rambut disekitar area luka (Gambar 5.1.A), sedangkan pada kontrol positif (kelompok mencit diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml) menunjukan luka insisi belum menutup sempurna, bengkak dan masih mengalami inflamasi (Gambar 5.1.B). Pada kelompok terapi 2%, 4% dan 8% (kelompok mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 yang dikontaminasi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml dengan pemberian terapi salep kitosan masing-masing pada konsentrasi 2%, 4% dan 8%) menunjukan bahwa luka insisi sudah menyatu, kering dan tidak mengalami inflamasi serta area disekitar insisi mulai ditumbuhi rambut (Gambar 5.1 C, D dan E). Tumbuhnya rambut pada daerah luka tersebut menunjukan terjadinya proses regenerasi dan kondisi kulit sudah mulai kembali normal (Listyanti, 2006).

Pemberian terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah pada kelompok terapi diberikan dengan cara mengoleskan salep kitosan dengan basis *vaselin* album sebanyak 0,5 gram pada area luka insisi dua kali sehari selama 7 hari pasca operasi. Salep merupakan sediaan semisolid berbahan dasar lemak yang ditujukan untuk kulit dan mukosa (Yanhendri dan Yeny, 2012). Setelah salep diaplikasikan pada luka, kitosan terurai langsung mengaktivasi trombin yang ada di bawah lapisan kulit sel endotel dan mengaktivasi platelet yang ada di permukaan luka untuk membentuk pembekuan darah. Kitosan terurai juga akan berinteraksi dengan sel leukosit untuk melepaskan sitokin Sifat alami dari kitosan sebagai antiinflamatory dan anti mikrobial akan mempengaruhi proses inflamasi. Kitosan akan memodulasi reaksi oksidasi yang terbentuk saat injury kemudian menghambat kerja TNF-α dan metaloproteinase yang berperan dalam kerusakan jaringan. Kitosan menginduksi sitokin untuk meningkatkan kerja makrofag, monosit dan limfosit T sehingga terjadi proses penyembuhan luka dan melindungi luka dari risiko infeksi. Kitosan berperan dalam regulasi dan pelepasan growth factors sehingga disekresikan secara perlahan dan lebih efektif berperan dalam proses poliferasi. Kolagen yang disekresikan dalam proses life span memiliki waktu yang singat. Namun dengan kitosan life span menjadi lebih lama sehingga proses pembentukan kolagen akan lebih cepat. Pembuatan terapi kitosan dalam sediaan salep karena salep memiliki beberapa kelebihan seperti stabilitas yang baik, berupa sediaan halus, mudah terdistribusi merata, mudah digunakan, mudah disimpan maupun dapat menjaga kelembapan kulit, tidak mengiritasi kuit dan menpunyai tampilan yang lebih menarik (Febram, dkk, 2010). Pemilihan sediaan salep dengan basis vaselin album karena sifatnya yang dapat menutup luka dengan baik dan memperpanjang kontak obat dengan kulit serta dapat menyerap air dalam luka sehingga dapat meningkatkan hidrasi pada kulit (Naibaho dkk, 2013). Efek hidrasi pada stratum korneum akan membuka struktur lapisan tanduk yang kompak dan juga benang-benang keratin dari stratum korneum akan mengembang sehingga kulit menjadi lebih permeabel (Khielhorn, 2006). Dengan kemampuan basis *vaselin album* ini yang dapat menghidrasi kulit sehingga dapat memaksimalkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit area.





Gambar 5.1 (A) Kontrol negatif (luka insisi menutup dan tidak terjadi inflamasi), (B) Kontrol positif (luka belum menutup dan masih mengalami inflamasi), (C) Terapi 2% (luka insisi menutup dan tidak terjadi inflamasi), (D) Terapi 4% (luka insisi menutup, kering dan tidak mengalami inflamasi), (E) Terapi 8% (luka insisi menutup, kering dan tidak mengalami inflamasi). Area luka insisi, bagian yang mengalami kebengkakan.

Keterangan :

Kontrol negatif : mencit yang diinsisi, dijahit dengan benang silk 4/0 secara aseptis.

Kontol positif : mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml tanpa pemberian terapi salep kitosan.

Terapi 2% : mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri

Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep

kitosan konsentrasi 2%.

Terapi 4% : mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri

Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep

kitosan konsentrasi 4%

Terapi 8% : mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri

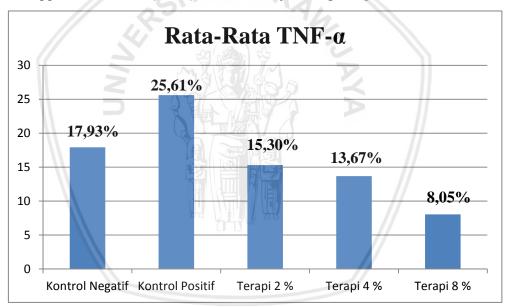
Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep

kitosan konsentrasi 8%

BRAWIJAYA

5.3 Efek Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa* pada Hewan Model Luka Nosokomial Terhadap Ekspresi TNF-α

Pengukuran ekpresi TNF- α (*Transforming necrosis factor-* α) pada penelitian ini diamati secara kuantitatif menggunakan metode *flowcytometry* yang dianalisis dengan *software* BD *cellquest Pro*TM untuk melihat efek terapi salep kitosan (**Lampiran 9**) terhadap luka insisi nosokomial pasca operasi. *Flowcytometri* merupakan teknik yang digunakan untuk menghitung dan menganalisa partikel mikroskopis yang tersuspensi dalam aliran fluida (Cytopathol, 2009). Histogram hasil pengukuran TNF- α menggunakan metode *flowcytometri* ditunjukkan pada **gambar 5.2.**



Gambar 5.2 Rata-rata Ekspresi TNF-α.

Keterangan:

Terapi 8%

Kontrol negatif
Kontol positif

i. mencit yang diinsisi, dijahit dengan benang silk 4/0 secara aseptis.

i. mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri

Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml tanpa pemberian terapi salep kitosan.

i. mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri

Staphylococcus aureus 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep kitosan konsentrasi 2%.

Terapi 4% mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri : *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep kitosan konsentrasi 4%.

: mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml serta dilakukan pemberian terapi salep kitosan konsentrasi 8%.

Data hasil pengukuran Ekspresi TNF-α jaringan kulit pada kelompok mencit perlakuan dilakukan analisa statistik menggunakan *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 dengan uji *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey* (**Lampiran 9**).

Berdasarkan statistika dilakukan uji normalitas dan homogenitas data hasil pengukuran kadar relatif TNF-α dengan menggunakan metode flowcytometri menunjukan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, setelah itu dilanjutkan dengan uji one way ANOVA (Lampiran 9). Uji one way ANOVA dapat diperoleh hasil dengan p value (sig) sebesar 0,0001 < 0,05 yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang nyata pemberian terapi salep kitosan cangkang kerang darah (Anadara granosa) terhadap kelompok perlakuan. Hal ini menunjukan bahwa terapi salep kitosan cangkang kerang darah (Anadara granosa) dapat memberikan pengaruh pada proses penyembuhan luka insisi nosokomial pasca operasi berdasarkan ekspresi TNF-α. Kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan.

Uji *Tukey* atau BNJ dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang perbedaan signifikan diantara kelompok-kelompok perlakuan lainnya. Hasil uji *Tukey* terlihat perbedaan notasi yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1** dan didapatkan hasil bahwa produksi ekspresi TNF-α pada kelompok kontrol positif berbeda signifikan (p<0,05) dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi 2%, 4%, dan 8% beda signifikan (p<0,05) dengan kontrol positif. Kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi TNF-α paling tinggi dan sedangkan kelompok terapi 8% memiliki rata-rata ekspresi TNF-α terrendah.

Tabel 5.1 Hasil Uji Tukey Produksi TNF-α

Kelompok Perlakuan	Rata-rata ekspresi TNF-α ± SD
Kontrol Negatif	$17,93 \pm 3,32^{\mathrm{b}}$
Kontrol Positif	$25,61 \pm 3,62^{c}$
Terapi 2 %	$15,30 \pm 4,22^{\mathrm{b}}$
Terapi 4 %	$13,67 \pm 1,74^{ab}$
Terapi 8%	$8,05 \pm 2,74^{\mathrm{a}}$

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c menunjukan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai p < 0.05.

Kontrol Positif Kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi TNF-α paling tinggi (**Tabel 5.1**), hal ini dikarenakan pada kontrol positif mencit di insisi dan dijahit menggunakan benang silk 4/0 dikontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* akan mengaktifkan sistem pertahanan tubuh atau respon imun. Respon imun yang terjadi akibat adanya invasi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu *Staphylococcus aureus* sebagai antigen ketika masuk akan dieliminasi oleh makrofag dan neutrofil sebagai perannya pada sistem imun innate (Abbas *and* Lichman, 2005 dalam Mufidah dkk, 2013). Luka akan memasuki fase inflamasi akut, yang berfungsi untuk menyingkirkan jaringan mati dan melawan infeksi oleh bakteri patogen. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi.

Infiltrasi berlebihan neutrofil dan makrofag pada luka akan menyebabkan sekresi sitokin proinflamasi secara berlebihan. Kemudian neutrofil akan melepaskan enzim MMP (matrix metalloproteinase) yang mampu menghancurkan growth factor seperti TGF-β. Sitokin yang berlebihan akan meningkatkan produksi MMP dan menghambat produksi TIMP (Tissue

BRAWIJAYA

Inhibitor of Matrix Metaloproteinase). Produksi MMP yang berlebihan akan mendegradasi ECM (Extracelullar Matrix) dan growth factor sehingga menghambat proses penyembuhan luka dan terjadi inflamasi kronis (Cornelissen, 2004). Produksi MMP yang berlebihan menyebabkan produksi TNF-α pada kontrol positif menjadi tinggi.

TNF-α dalam proses peradangan dapat berfungsi sebagai sitokin *pro- inflammatory* maupun *anti-inflammatory*. Efek pro inflamasi dapat ditemukan pada peningkatan proses kemoktasis dari makrofag dan neutrofil kedalam jaringan yang rusak, sedangkan efek anti inflamasi dengan cara deaktivasi mediator dan sel efektor inflamasi yang memungkinkan *host* untuk memperbaiki jaringan (Soeroso, 2007). TNF-α diproduksi oleh platelet dalam jumlah besar setelah terjadinya trauma. TNF-α juga disintesis oleh makrofag, limfosit, fibroblas, sel endotel dan keratinosit (Abbas dan Lichman, 2005). TNF-α memiliki fungsi penting dalam proliferasi dan migrasi fibroblast, meningkatkan sintesis kolagen dan fibronektin serta mengurangi degradasi atau pemecahan matriks ekstraseluler oleh MMP dengan produksi TIMP (Ester dan Troef, 2012). Sehingga peran TNF-α ini sangat penting dalam proses penyembuhan luka pada luka insisi nosokomial pasca operasi.

Pada kelompok terapi rata-rata ekspresi TNF-α mengalami penurunan jika dibandingkan dengan rata-rata ekspresi TNF-α kelompok kontrol positif yang disebabkan karena adanya pengaruh dari terapi salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) yang dapat menurunkan ekspresi TNF-α pada hewan model nosokomial. Hal ini dapat terjadi karena kitosan memiliki efek sebagai anti inflamasi dan antibakteri sehingga dapat mempercepat proses

inflamasi dengan menurunkan mediator inflamasi dan proses penyembuhan luka dapat segera memasuki fase proliferasi. Mekanisme kitosan sebagai anti inflamasi yaitu dengan mengurangi produksi COX-2 (cyclooxygenase-2) sehingga akan menekan peningkatan ekpresi sitokin pro inflamasi secara berlebihan dan akan menghambat PGE2 (prostaglandin E2) yang bekerja sebagai mediator inflamasi, dengan penurunan produksi COX-2 dan PGE2 maka mempercepat proses inflamasi (Hanifah, 2015, Karakecili, *et al.*, 2008, dan Ratnawati, 2014). Berdasarkan penelitian Dexter *et al.*, bahwa TNF-α menurun pada hari ke 3 setelah aplikasi plester kitosan pada luka (Halleluyah *et al.*, 2015).

Mekanisme antimikroba kitosan terhadap bakteri terjadi karena adanya gugus fungsional amina yang bermuatan positif pada kitosan yang dapat berikatan dengan membran sel bakteri yang cenderung bermuatan negatif. Interaksi ini dapat menyebabkan ketidakseimbangan tekanan interna sel dan dapat menyebabkan kebocoran intraseluler bakteri sehingga sel bakteri menjadi lisis dan akhirnya mati (Komariah, 2014). Menurut Suptijah (2006) dalam Dharmawan (2015), menyatakan bahwa efek antimikrobra kitosan dengan cara kitosan dapat berikatan dengan membran sel yaitu glutamat yang merupakan komponen dari membran sel. Kitosan berikatan dengan *phosphatidil colin* (PC) yang menyebabkan peningkatan permeabilitas *inner membrane* (IM) dan peningkatan permeabilitas IM memudahkan cairan untuk keluar sehingga terjadi lisis sel bakteri. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahman (2012), pada media yang berisi biakan *Staphylococcus aureus* dengan kitosan kosentrasi 0,75% memiliki zona hambat yang paling luas yakni sebesar 13 mm

BRAWIJAY

bahkan lebih luas dari zona hambat yang dihasilkan oleh produk *hand sanitizer* yang digunakan sebagai kontrol. Kitosan sebagai hemostat dapat mempercepat terjadinya koagulasi eritrosit dan agregasi platelet sehingga dapat mempercepat terbentuknya gumpalan darah atau proses pembekuan darah (Pogorielov and Sikora, 2015).

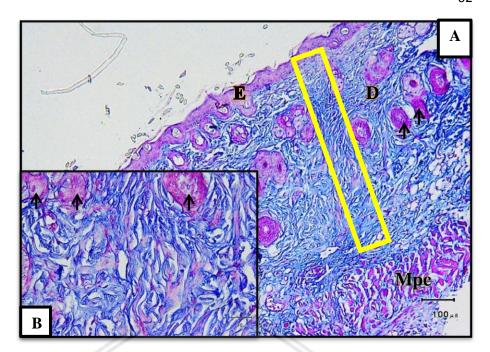
Berdasarkan uji *Tukey* atau BNJ ekspresi TNF-α (**Tabel 5.1**) pada kelompok terapi 2%, 4% dan 8% memiliki notasi yang berbeda dengan notasi kadar relatif TNF-α pada kontrol positif. Hal ini menunjukan bahwa terapi 2%, 4% dan 8% secara nyata mampu memberikan efek penpenurunan rata-rata ekspresi TNF-α pada hewan model luka insisi nosokomial pasca operasi. Jika ditinjau dari hasil rata-rata ekspresi TNF-α pada kelompok terapi 8% mampu memberikan efek penurunan rata-rata TNF-α terbaik jika dibandingkan dengan terapi 2% dan 4% yang mendekati rata-rata ekspresi TNF-α kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukan bahwa terapi 8% yang diberikan 2 kali sehari selama 7 hari berturut-turut pada hewan model luka insisi nosokomial pasca operasi merupakan dosis terbaik pada penelitian ini dan dapat berpengaruh menurunkan ekspresi TNF-α secara signifikan dari kontrol positiif.

5.4 Efek Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) pada Hewan Model Nosokomial Terhadap Kepadatan Kolagen.

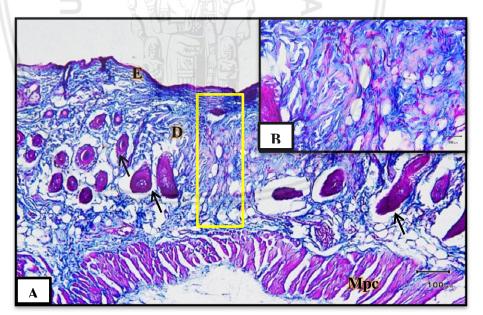
Pengamatan gambaran histopatologi pembentukan jaringan ikat kulit dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* (MT). Pengamatan dilakukan dengan membandingkan antar kelompok perlakuan dan dianalisis secara deskriptif. Penelitian ini menggunakan perbesaran 100x dan 400x dengan mengamati perbaikan gambaran jaringan ikat yang terbentuk pada area insisi. Hasil

pengamatan terhadap perbaikan gambaran histopatologi pembentukan kolagen dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif (Gambar 5.3), kelompok kontrol positif (Gambar 5.4), kelompok terapi 2% (Gambar 5.5), kelompok terapi 4% (Gambar 5.6), kelompok terapi 8% (Gambar 5.7).

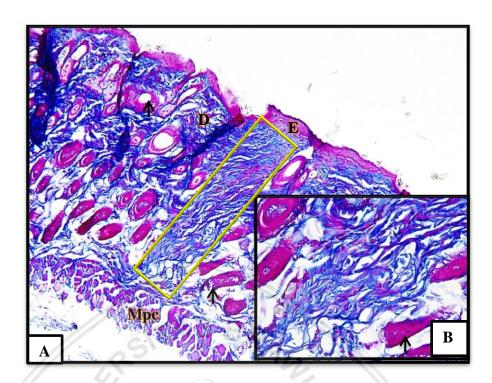
Area luka insisi pada preparat histopatologi kulit ditandai dengan kolagen yang padat tak teratur dengan serat kolagen yang terorientasi acak. Pembentukan jaringan ikat pada hari ke-7 terlihat kolagen yang matur mempunyai arah serat cenderung horizontal sedangkan pembentukan jaringan ikat pada kondisi inflamasi arah serat kolagennya cenderung ke arah vertikal (Sultana *et., al,* 2009). Area insisi juga ditandai dengan area kosong yang tidak ditumbuhi folikel rambut (Lemo *et., al,* 2010). Pada area insisi akan terlihat sebuah garis yang banyak terdapat sel radang dan lapisan epidermis pada area insisi akan terlihat lebih tebal jika dibandingkan dengan kulit yang normal (Vindsky, 2006).



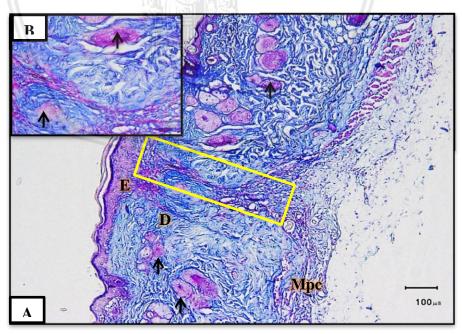
Gambar 5.3. Histopatologi kulit mencit kontrol negatif (mencit yang diinsisi secara aseptis tanpa pemberian terapi) (A) perbesaran 100x dan (B) perbesaran 400x; (1) area insisi luka menutup sempurna menunjukan area luka terisi penuh dengan kolagen pewarna biru pada sepanjang area insisi (1) folikel rambut, (E) epidermis, (D) dermis, (Mpc) M. panniculus cranosus (pewarnaan MT).



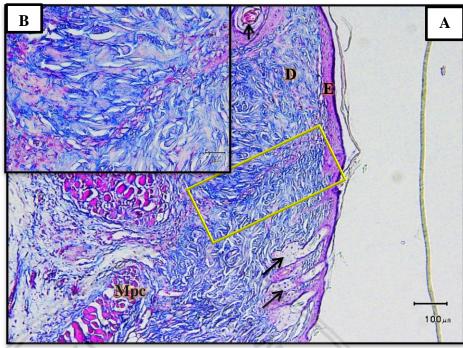
Gambar 5.4. Histopatologi kulit mencit kontrol positif (mencit di insisi dan dijahit benang dikontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml) (A) perbesaran 100x dan (B) perbesaran 400x; (☐) area luka insisi menunjukan adanya kolagen yang masih banyak terdapat rongga dibeberapa bagian insisi, (♠ folikel rambut, (E) epidermis, (D) dermis, (Mpc) *M. panniculus cranosus* (pewarnaan MT).



2% di Histopatologi kulit mencit terapi (mencit insisi, Gambar 5.5. dijahit benang dikontaminasi bakteri dan di berikan terapi 2%) (A) perbesaran 100x dan (B) perbesaran 400x; (U) area insisi luka menunjukkkan adanya jaringan ikat yang padat pada bagian atas insisi dan pada bagian bawah insis masih terdapat sedikit celah, (A) folikel rambut, (E) epidermis, (D) dermis, (Mpc) M. panniculus cranosus



Gambar 5.6. Histopatologi kulit mencit terapi 4% (mencit di insisi, dijahit benang dikontaminasi bakteri dan di berikan terapi salep 4%) (A) perbesaran 100x dan (B) perbesaran 400x; () area insisi menutup sempurna, menunjukan area luka terisi dengan jaringan ikat pada sepanjang area insisi dan telihat adanya celah kecil pada jaringan ikat, () folikel rambut, (E) epidermis, (D) dermis, (Mpc) M. panniculus cranosus (Pewarnaan MT).



Gambar 5.7. Histopatologi kulit mencit terapi 8%; (mencit di insisi, dijahit benang dikontaminasi bakteri dan di berikan terapi salep 8%) (A) perbesaran 100x dan (B) perbesaran 400x; (1) area insisi menutup sempurna, menunjukan area luka terisi penuh jaringan ikat pada sepanjang area insisi dan paling mendekati gambaran kontrol negatif, (1) folikel rambut, (E) epidermis, (D) dermis, (Mpc) M. panniculus cranosus (Pewarnaan MT).

Dermis terdiri atas jaringan ikat disusun oleh kolagen yang mehubungkan epidermis dan jaringan subkutan (hipodermis). Unsur pembentuk utama jaringan ikat adalah matriks ektraseluler (Junqueira and Carneiro, 2007). Kolagen adalah protein matriks ekstraseluler yang berperan dalam pembentukan jaringan ikat. Jaringan ikat adalah salah satu tanda bahwa penyembuhan luka sedang berjalan. Fibroblas merupakan sel pada jaringan ikat yang berpengaruh dalam proses penyembuhan luka. Setelah terjadi luka, fibroblas akan aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke dalam daerah luka, kemudian akan berkembang (proliferasi) serta mengeluarkan beberapa substansi (kolagen, elastin, *hyaluronic acid, fibronectin* dan *proteoglycans*) yang berperan dalam rekontruksi jaringan baru (Febram, dkk, 2010). Fungsi

kolagen yang lebih spesifik adalah membentuk jaringan ikat (connective tissue matrix) (Maxcorry, 2015). Menurut Junqueira and Carneiro (2007), pewarna Masson Trichrome adalah pewarna khusus untuk membedakan struktur kolagen dengan otot berdasarkan kontras warna. Kolagen ditunjukkan dengan warna biru.

Gambaran histopatologi kontrol negatif (Gambar 5.3) merupakan gambaran histopatologi pembentukan kolagen dari mencit yang diinsisi dan dijahit menggunakan benang silk 4/0 secara aseptis serta tanpa pemberian terapi salep kitosan. Terlihat luka insisi yang telah menutup sempurna yang ditandai dengan terbentuknya kolagen yang padat pada daerah insisi luka dan bagian epidermis sudah menutup serta jaringan sekitar folikel rambut juga terisi jaringan ikat.

Gambaran hitopatologi kontrol positif (Gambar 5.4) merupakan gambaran histopatologi pembentukan kolagen mencit yang diinsisi dan dijahit menggunakan benang *silk* 4/0 yang dikontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵ CFU/ml tanpa pemberian terapi salep kitosan. Pada gambaran histopatologi kontrol positif ini terlihat banyak celah pada daerah insisi yang ditandai dengan tidak terbentuknya kolagen dan terlihat epidermis yang tipis. Hal ini menunjukan bahwa luka insisi pada mencit kontrol positif belum menutup sempurna dan proses penyembuhan luka masih dalam fase inflamasi serta daerah yang ditumbuhi folikel rambut belum terbentuk jaringan ikat. Hasil pengamatan ini juga didukung dengan data pengamatan makroskopis bahwa saat dilakukan preparasi jaringan kulit mencit terlihat kulit bagian dalam tampak kemerahan.

Inflamasi adalah respon fisiologis tubuh terhadap suatu *injury* dan gangguan oleh faktor eksternalnya (Dorland, 2002). Kondisi inflamasi akan menimbulkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan menyebabkan masuknya leukosit kedalam jaringan (Mansjoer, 2003). Pada fase awal proses inflamasi, secara kimia sel yang pertama kali tertarik ke daerah inflamasi yaitu neutrofil yang bertanggungjawab dalam penarikan sel-sel inflamasi lainnnya untuk melokalisir terjadinya kerusakan dengan melepaskan sitokin seperti TNF-α, dan IL-1 (Fournier, 2012). Inflamasi yang berkepanjangan ditandai dengan peningkatan jumlah sel radang yang akan menyebabkan jumlah sitokin dan MMP semakin meningkat sehingga semakin lama menyebabkan kerusakan jaringan dan luka menjadi sembuh lebih lama. MMP juga dapat menyebabkan degradasi ECM yang merupakan unsur pembentuk jaringan ikat. Hal ini yang menyebabkan pada luka insisi kontrol positif jaringan ikat masih belum terbentuk sempurna atau masih terbentuk rongga.

Gambaran histopatologi kelompok terapi salep kitosan 2%, (Gambar 5.5) terlihat luka insisi sudah menutup terlihat epidermis yang tebal dan pembentukan kolagen pada area insisi yang lebih padat jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif akan tetapi kolagen yang terbentuk pada terapi 2% tidak sepadat pada kontrol negatif, pada bagian bawah insisi masih tedapat sedikit celah dan daerah yang ditumbuhi oleh folikel rambut belum terbentuk jaringan ikat.

Histopatologi kolagen kulit mencit kelompok terapi 4% (**Gambar 5.6**) menunjukan bahwa luka insisi sudah menutup terlihat epidermis yang tebal dan pembentukan kolagen pada area insisi dan sekitar folikel rambut yang lebih

padat jika dibandingkan dengan kolagen pada kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok terapi 2%. Sedangkan histopatologi kolagen kulit mencit pada kelompok terapi 8% luka insisi telah menutup sempuran (Gambar 5.7) yang ditandai dengan gambaran epidermis yang tebal dan kolagen yang terbentuk pada area insisi serta sekitar folikel rambut memiliki pembentukan kolagen yang lebih padat jika dibandingkan dengan pembentukan kolagen pada kontrol positif, terapi 2% dan 4%. Pada gambaran histopatologi pembentukan kolagen kelompok terapi 8% menunjukan perbaikan jaringan terbaik yang mendekati kontrol negatif.

Pemberian terapi salep kitosan cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) pada luka insisi nosokomial pasca operasi dapat meningkatkan pembentukan kolagen pada luka insisi nosokomial. Hal ini disebabkan kitosan dapat meningkatkan produksi TGF-β yang dapat memicu proliferasi dan migrasi fibroblast pada area luka sehingga dapat memproduksi kolagen dalam jumlah besar. Kolagen merupakan protein matriks ekstraseluler yang berperan dalam pembentukan jaringan ikat pada proses penyembuhan luka (Novriansyah 2008). 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. Kitosan dapat meningkatkan tegangan permukan luka dengan cara meningkatkan deposisi kolagen (Halleluyah *et al.*, 2015). Kolagen yang meningkat menambah kekuatan permukaan luka sehingga kecil kemungkinan luka terbuka.

Kitosan juga memiliki fungsi sebagai antibakteri dan antiinflamasi. Kitosan dapat memacu migrasi neutrofil, aktivasi makrofag dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka sehingga dapat mempercepat proses inflamasi dan perbaikan jaringan yang rusak. Selain itu, terapi kitosan didukung oleh sifat basis *vaselin album*. Menurut Naibaho, dkk. (2013), salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi pada kulit sehingga dapat mendukung aktivitas senyawa aktif dalam penyembuhan luka.

Dalam penelitian ini, pembentukan kolagen yang lebih padat diperoleh pada kelompok terapi salep kitosan 8%, karena pada kelompok ini menunjukan bahwa pengecilan daerah luka lebih cepat terjadi. Hal ini di akibatkan semakin banyaknya kolagen pada luka maka semakin besar daya kontraksi luka sehingga sisi luka akan tertarik dan menyebabkan area luka menjadi mengecil sampai menutup.

Berdasarkan hasil pengukuran rata-rata ekspresi TNF-α dan pengamatan histopatologi pembentukan kolagen kulit didapatkan bahwa terapi salep kitosan konsentrasi 8% pada hewan model luka insisi nosokomial pasca operasi memiliki efek terapi terbaik yang mampu menurunkan rata-rata ekspresi TNF-α dan pembentukan kepadatan kolagen yang mendekati pada kontrol negatif sehingga proses penyembuhan luka pada hewan model luka nosokomial dapat terjadi lebih cepat akibat dari pemberian salep kitosan dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

- Terapi ekstrak cangkang kerang darah (*Anadara* granosa) terhadap kesembuhan luka pada hewan model dengan konsentrasi 8% merupakan dosis efektif yang dapat menurunkan ekspresi TNF-α dengan rata-rata 8,05% dan mendekati kelompok kontrol negatif.
- 2. Terapi ekstrak cangkang kerang darah (*Anadara* granosa) terhadap kesembuhan luka pada hewan model dengan konsentrasi 8% merupakan dosis efektif yang dapat mempercepat pertumbuhan kolagen yang ditinjau dari kepadatan kolagen.

6.2 Saran

Perlu dilakukan studi lanjutan mengenai durasi waktu yang paling efektif terhadap ekspresi TNF-α dan pembentukan kepadatan kolagen pada hewan model luka nosokomial yang diterapi menggunakan salep kitosan asal cangkang kerang darah. Perlu diberikan perlakuan pada kontrol positif agar kesrawan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afranita, G., S. Anita, dan T. A. Hanifah. 2014. *Potensi Abu Cangkang Kerang Darah (Anadara granosa) sebagai Adsorben Ion Timah Putih*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Kampus Binawidya. Pekanbaru.
- Akbar, B. 2010. Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas. Adabia Press. Jakarta
- Anggraeni, Yuni. 2012. Preparasi dan Karakterisasi Film Sambung Silang Kitosan-Tripolifosfat yang Mengandung Asiatikosida sebagai Pembalut bioaktif untuk Luka. [Skripsi]. Depok. Universitas Indonesia.
- Arpornchayanon W, 2010. Effects of TNF-alpha inhibition on inner ear microcirculation and hearing function after acut loud noise in vivo.Dissertation.edoc.ub.uni-muenchen.de.
- Boateng, J. S., Kerr, H. M., Howard, N. E. S., dan Gillian, M.E. 2007. Wound Healing Dressing and Drug Delivery System: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97: 2892-2923.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hussy, D., and Schaellibaum, M. 2003. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Case of Bovine Mastitis. American Society for Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology, Vol.* 41, No. 2, Februari 2003, Pages 767-771.
- Dai, T., Kharkwal, G. B., Tanaka, M., Huang, Y., de Arce, V.C.B., dan Hamblin, M. 2011. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* 2(4): 296-315
- DeLeo, F.R., Diep, B.A., Otto, M. 2009. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *J Dent*, vol. 23, no. 1, hlm. 17-34.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial : Problematika Dan Pengendaliannya*. Jakarta : Penerbit Salemba Medika
- Djamaluddin, A. M. 2009. *Pemanfaatan Khitosan dari Limbah Krustasea untuk Penyembuhan Luka Pada Mencit (Mus musculus albinus)*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Febram, B. P., I. Wientarsih dan B. Pontjo. 2010. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var sapientum) dalam Proses Persembuhan Luka Pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Majalah Obat Tradisional*, 15(3), 121 137.
- Fischetti, A.V., Novick, R.P., Ferreti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.I. 2000. *Gram Positif*. ASM Press. Washington DC.

BRAWIJAY

- Ghufran, M. 2011. *Budidaya 22 Komoditas Laut untuk Konsumsi Lokal dan Ekspor*. Lily Publisher. Yogyakarta.
- Gurtner, G. C. 2007. Wound Healing: Normal and Abnormal. In: Throne CH, Beasly, R. W., Aston, S. J., Barlett, S. P., Gurtner, G. C., Spear, S. I., (Eds). *Grab and Smith's Plasctic Surgery 6th Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p: 15-22.
- Halleluyah, M. P., Sukari, A. H, Zaharil A. M. S, and Rahim A. H. 2015. Chitosan Scafold Enchancesn Growth Factor Release in Wound Healing and Tissue Regeneration. J. Dev. Biol. 2016, 4, 21; doi: 10.3390/jdb4020021.
- Harahap, S. 2011. Penggunaan Kitosan dari Kulit Udang dalam MenurunkanKadar Total Suspended (TSS) pada Limbah Cair Industri Plywood.
- Harper, D., Young A., and McNaught C,E. 2014. *The Physiology Of Wound Healing*. Elsevier Surgery.
- Hastuti, B. Dan N. Tulus. 2015. Sintesis Kitosan dari Cangkang Bulu (*Anadara inflata*) sebagai absorben ion CU²⁺ ISBN: 978-602-73159-0-7.
- Hosgood, G. 2009. BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction 2nd Edition. Publisher BSAVA. California.
- Junqueira, L.C., dan Carneiro, J. 1991. *Histologi Dasar (Basic Histology), Edisi V.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Junqueira, L.C., dan J, Carneiro. 2005. *Basic Histology: text and atlas. 11st Edition*. McGraw-Hill's Access Medicine.
- Karakecili, A.G., Cristiana, S., Menemse, G., and Giovanni M. 2008. Enhancement Of Fibroblastic Proliferation On Chitosan Surfaces By Immobilized Epidermal Growth Factor. Elsevier. Acta Biomaterialia 4 (2008) 989–996.
- Kartika, R.W. 2015. Perawatan Luka Kronis dengan *Modern Dressing Wound Care*. *Diabetic Center*. Vol. 42 No. 7.
- Kresno, S. B. 2003. Imunologi, Diagnosa dan Prosedur Laboratorium. Jakarta: Balai Penerbit FK UI 4-32.
- Kumar. V. Cotran R., dan Robbins. S.L. 2007. *Buku Ajar Patologi, Edisi Ketujuh*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Listyanti, A. R. 2006. Pengaruh Pemberian Getah Batang Pohon Pisang Ambon (*Mus parasidiaca var. Sapientum*) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*) [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

- Mercandetti, M. and Cohen, A., 2002. Wound Healing and Repair. http://www.emedicinemed scape.com. 18/12/13.
- Mcripley R. J. And R. R. Whitney.1976. Characterization and Quantitation of Experimental Surgical-Wound Infections Used to Evaluate Topical Antibacterial Agents. The Squibb Institute for Medical Research, Princeton. New Jersey. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* Vol.10. No. 1.
- Miloro, M., Ghali, G.E., Larsen, P.E., dan Waite, P.D. 2004. *Peterson's Principle Of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd Ed.* Hamilton: BC Decker
- Milton, A.A.P., Priya, G. B., Aravind, M., Parthasarathy, S., Saminathan, M., Jeeva, K. Agarwal, R. K. 2015. *Nosocomial Infections and Their Surveillance in Veterinary Hospitals. Advances in Animal and Veterinary Sciences*.
- Muliani, H. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). Jurusan Biologi F. MIPA UNDIP. Semarang. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* Vol. XIX, No. 1, Maret 2011.
- Nasution, L. H. 2012. Infeksi Nosokomial. Sumatera Utara. FK Universitas Sumatera Utara. *Vol.* 39. No.1 Tahun 2012: 36-41.
- Navarro-Gonzales J. F. And C. Mora-Fernandez. 2008. *The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephroparty*. Journal of American Society Nephroly. 19:433-442.
- Novriyansyah, R.2008. Prbedaan Kepadatan Kolagen Di Sekitar Luka Incisi Tikus Wistar yang Dibalut Kasa Konvensional dan Penutup Oklusif Hidrokoloid selama 2 sampai 14 hari. [*TESIS*]. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Paul, W. dan Sharma, C.P. 2004. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater. Artif. Organs.* Sysmex-Europe. 2015. *Fluorescence Flow Cytometry.* http://www.sysmexeurope.com/academy/knowledgeentre/measurementtechnologies/fluorescence-flow-cytometry.html. Diakses pada 22 Desember 2016.
- Pavletic, M. M. 2010. Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery. Third Edition. Wiley Blackwell. Massachusetts.
- Potter dan Perry. 2005. Buku Ajar Fundamental Keperawatan Konsep, Proses, dan Praktik. Edisi 4 volume 1. EGC. Jakarta.
- Romimohtarto, K., dan Juwana, S. 2001. *Biologi Laut Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*. Jakarta: Djambatan.
- Ratnawati, A., Djoni, I.R., dan Adri, S. 2014. Sintesis Dan Karakterisasi Kolagen dari Teripang-Kitosan sebagai Aplikasipembalut Luka. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Roseberg I., Torre J., Pallertta C., Talavera F., Stadelman W., and Slenkovich N. 2003. *Wound Healing Growth Factors*. May 12. Available Form URL: http://www.emedicine.com/plastic/topic457.htm
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., and Quinn, M.E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. 6 *Edition*. Pharmaceutical Press. London.
- Sabdono, A., Jusup, S, dan Nadya, C. 2014. Aktivitas Antioksidan Kitosan Yang Diproduksi Dari Cangkang Kerang Simping (*Amusium sp*) dan Kerang Darah (*Anadara sp*). *Jurnal of Marine Research*. 4(3): 395-404.
- Sahara, R. 2011. *Karakteristik Kerang Darah (Anadara granosa)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sujono, E. 2010. *Uji Antibakteri Senyawa N-Fenil-N'-(Klorobenzoil) Tiourea Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus.* [Skripsi]. Unika Widya Mandala. Surabaya.
- Sukmadadari, A.E. R. Ratnawati and T.E Hernowati. 2012. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi TNF-α pada Jaringan Hepar Tikus Wista yang diinduksi DMBA [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Suryadi, I. A., A. Asmarajaya, S. Maliawan. 2013. *Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka*. Ilmu Penyakit Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Denpasar. Bali.
- Sysmex-Europe. 2015. *Fluorescence Flow Cytometry*. http://www.sysmexeurope.com/academy/knowledgeentre/measurementtechnologies/fluorescence-flow-cytometry.html. Diakses pada 22 Desember 2016.
- Tahari, N.A. 2013. *Laporan Teknik Instrumentasi Laboratorium Biosistem* (*Hewan Coba*). Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Triyono, Bambang, 2015. Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar Yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan Yang Tidak diberi Levobupivakain [Tesis]. Program Magister Biomedik dan Ppds I Universitas Diponegoro Semarang.
- Werner S G. R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiology Review* 83: 835-870
- Williams, J. W. dan Moores A. 2009. BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction. London: BSAVA
- World Health Organization. 2002. Prevention Of Hospital-Acquired Infections A Practical Guide 2nd Edition. World Health Organization.

Yanhendri, dan Yenny, S.W. 2012. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Andala. CDK-194/Vol.39 No. 6.

