PENGARUH PEMBERIAN SEDIAAN POULTICE DAUN GAMAL (Gliricidia sepium) TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-1β DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI TERAPI LUKA INSISI PADA TIKUS

(Rattus norvegicus)

SKRIPSI

Oleh:

NISA AIN ARIANDINI 135130101111047



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2019

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka merupakan kerusakan sebagian jaringan tubuh yang disebabkan oleh trauma benda tajam atau tumpul, zat kimia, ledakan, perubahan suhu, gigitan hewan,dan sengatan listrik. Berdasarkan penyebabnya luka dapat dibedakan menjadi 2 yaitu luka terbuka dimana baia kulit atau jaringan dibawahnya mengalami kerusakan. Sedangkan luka tertutup merupakan luka yang kerusakannya disebabkan oleh trauma benda tumpul. Luka tertutup secara umum dikenal dengan luka memar (De jong, 2004). Menurut mekanismenya, luka yang dapat terjadi adalah luka insisi. Luka insisi merupakan luka yang terjadi karena teriris oleh instrumen yang tajam dan terjadi akibat pembedahan. Luka insisi ini termasuk dalam luka bersih atau aseptik yang biasanya tertutup oleh sutura atau jahitan setelah seluruh pembuluh darah yang luka terikat (Baroroh, 2011). Berdasarkan waktu penyembuhan luka dibagi menjadi 2 jenis yaitu luka akut dan luka kronis. Luka akut adalah luka trauma yang dapat sembuh dengan baik apabila tidak terjadi komplikasi pada luka dan penyembuhan sesuai dengan waktu yang diperkirakan. Sedangkan luka kronik adalah luka yang berlangsung lama dan dapat timbul kembali (Briant, 2007).

Penyembuhan luka meliputi empat fase utama yaitu fase hemostasis, inflamasi akut, proliferasi sel parekim dan remodeling jaringan ikat dan kompoen parenkim. Keempat fase tersebut akan diinisiasi, dimediasi dan diteruskan oleh mediator biokimia berupa sitokin dan *growth factor*. Sitokin yang akan berperan dalam penyembuhan luka salah satunya adalah interleukin-1Beta (IL-1β) yang merupakan sitokin pro inflamasi yang dapat meggambarkan kondisi inflamasi pada luka. Ekspresi IL-1β akan meningkat ketika jaringan kulit mengalami kerusakan yang disebabkan oleh luka dan IL-1β akan meningkatkan ekspresi faktor adhesi pada sel endotel yang akan mengaktifkan diapedesis sel radang ke lokasi luka untuk melawan agen infeksi yang mengontaminasi luka (Contassot ,*et al*,2012).

Respon inflamasi akut yang telah terjadi akan melibatkan sel – sel radang yang berupa netrofil dan makrofag. Infiltrasi neutrophil akan membersihkan daerah luka terhadap adanya

partikel asing yang kemudian akan dihancurkan oleh proses fagositosis makrofag. Monosit juga menginfiltrasi tepi luka kemudian menjadi makrofag aktif yang mengeluarkan *growth* factor seperti PDGF dan VEGF yang menginisiasi jaringan granulasi (Singer dan Clark, 1999).

Daun gamal (*Gliricidia sepium*) merupakan tanaman sejenis perdu dan dapat tumbuh dengan cepat di daerah tropis. Tanaman gamal diketahui memiliki kandungan zat aktif yaitu: flavonoid, tannin, polyphenol, saponin, hydrocyanic acid dan kumarin (Smith and Van Houtert, 1987). Kandungan flavonoid yang terdapat pada tanaman gamal bersifat anti inflamasi yang dapat mengurangi rasa sakit saat terjadi pembengkakan dan pendarahan saat terjadi luka

Oleh karena itu perlu dilakuka penelitian ini agar dapat mengetahui bahwa dalam pemberian salep ektrak daun Gamal (*Gliricidia sepium*) dapat mengobati luka pasca insisi serta menurunkan ekspresi IL-1β dan menurunkan jumlah sel radang.

1.2 Rumusan Masalah

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

- Apakah pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat menurunkan ekspresi IL-1β sebagai terapi pasca luka insisi pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
- 2. Apakah pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat berpengaruh dalam menurunkan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi?

1.3 Batasan Masalah

Dari rumusan masalah yang sudah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*)
jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 gram. Metode
Pemeliharaan dan Perlakuan Tikus pada penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan

- Komisi Etik Penelitian UB dengan nomor Sertifikat 1004-KEP-UB, terdapat pada lampiran 4.
- 2. Pembuatan keadaan pasca insisi pada hewan coba dilakukan dengan cara insisi pada bagian *median dorsal vertebrae* sepanjang 3 cm hingga mencapai lapisan *subcutan*, dijahit dan ditutup perban. (Sudrajat, 2006).
- 3. Daun Gamal (Gliricidia sepium) yang digunakan berasal dari Indonesia dan Filipina.
- 4. Pembuatan sediaan topikal daun Gamal (*Gliricidia sepium*) dilakukan dengan cara mencampurkan simplisia daun Gamal (*Gliriidia sepium*) dengan vaselin albumin (Naibaho, 2013). Pada setiap tikus diberikan sedian topikal daun gamal sebanyak 0,1mg selama 3 hari.
- 5. Pengamatan ekspresi IL-1β dengan menggunakan metode Imunohistokimia mengunakan mikroskop dengan perbsaran 40x dalam 5 lapang pandang.
- 6. Pengamatan jumlah sel radang dilakukan dengan mengamati preparat histopatologi luka dengan pewaraan Hematoksilin-Eosin (HE).
- 7. Analisa hasil menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji beda nyata jujur.
- 8. Pengukuran ekspressi IL-1β menggunakan *software imunoraatio* dan pengamatan jumlah sel radang mengguanakan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan penelitian

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

- Mengetahui pengaruh pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia terhadap penurunan ekspresi IL-1β pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi.
- 2. Mengetahui pengaruh pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia terhadap penurunan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norergicus*) pasca luka insisi.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi terhadap efek pemberian terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) tehadap penurunan ekspresi IL-1β dan penurunan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi serta membuktikan bahwa daun gamal (*Gliricidia sepium*) dapat dijadikan sebagai pegobatan alternatif untuk luka insisi.



PENGARUH PEMBERIAN SEDIAAN POULTICE DAUN GAMAL (Gliricidia sepium) TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-1β DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI TERAPI LUKA INSISI PADA TIKUS

(Rattus norvegicus)

SKRIPSI

Oleh:

NISA AIN ARIANDINI 135130101111047



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2019

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka merupakan kerusakan sebagian jaringan tubuh yang disebabkan oleh trauma benda tajam atau tumpul, zat kimia, ledakan, perubahan suhu, gigitan hewan,dan sengatan listrik. Berdasarkan penyebabnya luka dapat dibedakan menjadi 2 yaitu luka terbuka dimana baia kulit atau jaringan dibawahnya mengalami kerusakan. Sedangkan luka tertutup merupakan luka yang kerusakannya disebabkan oleh trauma benda tumpul. Luka tertutup secara umum dikenal dengan luka memar (De jong, 2004). Menurut mekanismenya, luka yang dapat terjadi adalah luka insisi. Luka insisi merupakan luka yang terjadi karena teriris oleh instrumen yang tajam dan terjadi akibat pembedahan. Luka insisi ini termasuk dalam luka bersih atau aseptik yang biasanya tertutup oleh sutura atau jahitan setelah seluruh pembuluh darah yang luka terikat (Baroroh, 2011). Berdasarkan waktu penyembuhan luka dibagi menjadi 2 jenis yaitu luka akut dan luka kronis. Luka akut adalah luka trauma yang dapat sembuh dengan baik apabila tidak terjadi komplikasi pada luka dan penyembuhan sesuai dengan waktu yang diperkirakan. Sedangkan luka kronik adalah luka yang berlangsung lama dan dapat timbul kembali (Briant, 2007).

Penyembuhan luka meliputi empat fase utama yaitu fase hemostasis, inflamasi akut, proliferasi sel parekim dan remodeling jaringan ikat dan kompoen parenkim. Keempat fase tersebut akan diinisiasi, dimediasi dan diteruskan oleh mediator biokimia berupa sitokin dan *growth factor*. Sitokin yang akan berperan dalam penyembuhan luka salah satunya adalah interleukin-1Beta (IL-1β) yang merupakan sitokin pro inflamasi yang dapat meggambarkan kondisi inflamasi pada luka. Ekspresi IL-1β akan meningkat ketika jaringan kulit mengalami kerusakan yang disebabkan oleh luka dan IL-1β akan meningkatkan ekspresi faktor adhesi pada sel endotel yang akan mengaktifkan diapedesis sel radang ke lokasi luka untuk melawan agen infeksi yang mengontaminasi luka (Contassot ,*et al*,2012).

Respon inflamasi akut yang telah terjadi akan melibatkan sel – sel radang yang berupa netrofil dan makrofag. Infiltrasi neutrophil akan membersihkan daerah luka terhadap adanya

partikel asing yang kemudian akan dihancurkan oleh proses fagositosis makrofag. Monosit juga menginfiltrasi tepi luka kemudian menjadi makrofag aktif yang mengeluarkan *growth* factor seperti PDGF dan VEGF yang menginisiasi jaringan granulasi (Singer dan Clark, 1999).

Daun gamal (*Gliricidia sepium*) merupakan tanaman sejenis perdu dan dapat tumbuh dengan cepat di daerah tropis. Tanaman gamal diketahui memiliki kandungan zat aktif yaitu: flavonoid, tannin, polyphenol, saponin, hydrocyanic acid dan kumarin (Smith and Van Houtert, 1987). Kandungan flavonoid yang terdapat pada tanaman gamal bersifat anti inflamasi yang dapat mengurangi rasa sakit saat terjadi pembengkakan dan pendarahan saat terjadi luka

Oleh karena itu perlu dilakuka penelitian ini agar dapat mengetahui bahwa dalam pemberian salep ektrak daun Gamal (*Gliricidia sepium*) dapat mengobati luka pasca insisi serta menurunkan ekspresi IL-1β dan menurunkan jumlah sel radang.

1.2 Rumusan Masalah

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

- Apakah pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat menurunkan ekspresi IL-1β sebagai terapi pasca luka insisi pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
- 2. Apakah pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat berpengaruh dalam menurunkan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi?

1.3 Batasan Masalah

Dari rumusan masalah yang sudah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*)
jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 gram. Metode
Pemeliharaan dan Perlakuan Tikus pada penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan

- Komisi Etik Penelitian UB dengan nomor Sertifikat 1004-KEP-UB, terdapat pada lampiran 4.
- 2. Pembuatan keadaan pasca insisi pada hewan coba dilakukan dengan cara insisi pada bagian *median dorsal vertebrae* sepanjang 3 cm hingga mencapai lapisan *subcutan*, dijahit dan ditutup perban. (Sudrajat, 2006).
- 3. Daun Gamal (Gliricidia sepium) yang digunakan berasal dari Indonesia dan Filipina.
- 4. Pembuatan sediaan topikal daun Gamal (*Gliricidia sepium*) dilakukan dengan cara mencampurkan simplisia daun Gamal (*Gliriidia sepium*) dengan vaselin albumin (Naibaho, 2013). Pada setiap tikus diberikan sedian topikal daun gamal sebanyak 0,1mg selama 3 hari.
- 5. Pengamatan ekspresi IL-1β dengan menggunakan metode Imunohistokimia mengunakan mikroskop dengan perbsaran 40x dalam 5 lapang pandang.
- 6. Pengamatan jumlah sel radang dilakukan dengan mengamati preparat histopatologi luka dengan pewaraan Hematoksilin-Eosin (HE).
- 7. Analisa hasil menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji beda nyata jujur.
- 8. Pengukuran ekspressi IL-1β menggunakan *software imunoraatio* dan pengamatan jumlah sel radang mengguanakan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan penelitian

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

- Mengetahui pengaruh pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia terhadap penurunan ekspresi IL-1β pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi.
- 2. Mengetahui pengaruh pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia terhadap penurunan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norergicus*) pasca luka insisi.

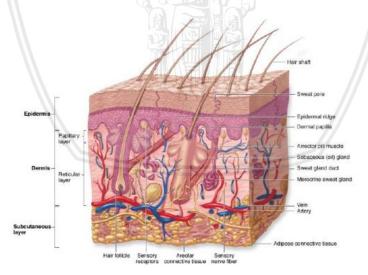
1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi terhadap efek pemberian terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) tehadap penurunan ekspresi IL-1β dan penurunan jumlah sel radang pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi serta membuktikan bahwa daun gamal (*Gliricidia sepium*) dapat dijadikan sebagai pegobatan **BAB**

2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit disebut juga dengan intergumen. Kulit terdiri atas 2 lapisan utama yaitu epidermis dan dermis (Gambar 2.1). Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasar dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Dibawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hypodermis yang pada beberapa tempat terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2013).



Gambar 2.1 Struktur kulit (Mescher, 2010)

Epidermis adalah lapisan terluar kulit yang hanya terdiri dari epitel berlapis gepeng dan lapisan tanduk. Epidermis tidak memiliki pembuluh darah maupun limfe, maka semua nutrient dan oksigen diperoleh ari kapiler pada lapisan dermis. Epidermis terdiri atas 5 lapisan dari

dalam ke luar yaitu stratum basal, spinosum, stratum granulosum, stratum lusidium dan stratum korneum (Kalangi, 2013).

a. Lapisan Stratum Basal

Lapisan stratum basal terletak paling dalam dan terdiri dari satu lapis sel yang tersusun berderet-deret di atas membran basal dan melekat pada dermis di bawahnya. Sel - selnya kuboid atau silindris. Intinya besar, jika dibanding ukuran selnya, dan sitoplasmanya basofilik. Pada lapisan ini biasanya terlihat gambaran mitotik sel, proliferasi selnya berfungsi untuk regenerasi epitel. Sel-sel pada lapisan ini bermigrasi ke arah permukaan untuk memasok selsel pada lapisan yang lebih superfisial. Pergerakan ini dipercepat oleh adalah luka, dan regenerasinya dalam keadaan normal cepat (Kalangi, 2013).

b. Lapisan Stratum Spinosum

Lapisan ini terdiri dari beberapa lapis sel berbentuk polygonal dengan inti lonjong dengan sitoplasma yang kebiruan. Pada dinding sel yang berbatasan dengan sel disebelahnya akan akan terlihat taju- taju yang seolah menghubungkan sel yang satu dengan yang lain. Pada taju tersebut terletak desmosome yang melekatkan sel – sel satu sama lain (Kalangi, 2013).

c. Lapisan Stratum Graulosum

Lapisan ini terdiri atas 2-4 lapisan sel gepeng yang mengandung banyak granula basofilik yang disebut granula kertohialin. Apabila dilihat dari mikroskop akan nampak partikel amorf tanpa membrane yang dikelilingi ribosom. Mikrofilamen melekat pada pemukaan granula (Kalangi, 2013).

d. Lapisan Lusidium

Lapisan ini dibentuk oleh 2-3 lapisan sel gepeng yang tembus cahaya dan agak eosinofiik. Taka da inti maupun organel pada sel-sel lapisan ini. Walaupun ada sedikit desmosom, tetapi pada lapisan ini adhesi kurang sehingga pada sajian seringkali tampak garis celah yang memisahkan stratum korneum dari lapisan lain di bawahnya (Kalangi, 2013).

e. Stratum Korneum

Lapisan ini terdiri atas banyak lapisan sel-sel mati, pipih dan tidak berinti serta sitoplasmanya digantikan oleh keratin. Selsel yang paling permukaan merupakan sisik zat tanduk yang terdehidrasi yang selalu terkelupas (Kalangi, 2013).

Dermis terdiri atas stratum papilaris dan stratum retikularis, lapis antara keduanya tidak tegas dan seratnya saling menjalin.

a. Stratum papilaris

Stratum papilaris tersusun lebih longgar dan ditandai oleh adanya papilla ermis yang jumlahnya variasi antara 50-250/mm². Sebagian besar papilla mengandung pembuluh – pembuluh kapiler yang memberi nutrisi pada epitel diatasnya. Papila lainnya mengandung badan akhir syaraf sensorik yaitu badan meissner (Kalangi, 2013).

b. Stratum Retikularis

Lapisan ini lebih tebal dan dalam Berkas-berkas kolagen kasar dan sejumlah kecil serat elastin membentuk jalinan yang padat ireguler. Pada bagian lebih dalam, jalinan lebih terbuka, rongga-rongga di antaranya terisi jaringan lemak, kelenjar keringat dan sebasea, serta folikel rambut. Serat otot polos juga ditemukan pada tempat-tempat tertentu, seperti folikel rambut, skrotum, preputium, dan puting payudara. Pada kulit wajah dan leher, serat otot skelet menyusupi jaringan ikat pada dermis. Otot-otot ini berperan untuk ekspresi wajah. Lapisan retikular menyatu dengan hipodermis/fasia superfisialis di bawahnya yaitu jaringan ikat longgar yang banyak mengandung sel lemak (Kalangi, 2013).

2.2 Luka

Luka merupakan rusaknya struktur dan fungsi anatomi normal akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksteral dan mengenai organ tertentu. Luka juga dapat disebabkan karena trauma benda tajam, benda tumpul, perubahan suhu, zat kimia, sengatan listrik dan gigitan hewan (Potter & Perry, 2005). Menurut mekanismenya, luka yang dapat

terjadi adalah luka insisi. Luka insisi merupakan luka yang terjadi karena teriris oleh instrumen yang tajam dan terjadi akibat pembedahan. Luka insisi ini termasuk dalam luka bersih atau aseptik yang biasanya tertutup oleh sutura atau jahitan setelah seluruh pembuluh darah yang luka terikat (Baroroh, 2011). Luka insisi dapat dibedakan berdasarkan tingkat kontaminasi:

- a. Luka bersih (*clean wounds*) merupakan luka insisi dengan teknik steril yang tidak mengenai saluran gastrointestinal, saluran kemih, saluran pernafasan dan genital. Luka ini tidak terinfeksi/kontaminasi.
- b. Luka bersih terkontaminasi (*clean-contaminated wound*) yaitu luka bersih yang data terkontminasi, misalnya luka insisi yang mengenai saluran gastrointestinal, saluran kemih, saluran genital dan pernafasan. Tingkat infeksi mencapai ±7%.
- c. Luka kontaminasi (*contaminated wound*) yaitu luka terbuka akibat kecelakaan atau operasi dengan krusakan besar yang menggunakan teknik asepsis dan kontaminasi dari saluran cerna. Tingkat infeksi mencapai ±15%
- d. Luka kotor (*infected wound*) yaitu luka terbuka terinfeksi yang terdapat mikroorganisme didalamnya. Tingkat infeksi mencapai 40% (Subandono dan Dian, 2017).

Berdasarkan lama waktu peyembuhan, luka dibagi menjadi 2 jenis yaitu luka akut dan luka kronis. Luka akut adalah luka trauma yang dapat sembuh dengan baik apabila tidak terjadi komplikasi pada luka, kriteria luka akut adalah luka baru, mendadak dan penyembuhan sesuai dengan waktu yang diperkirakan. Contoh dari luka akut adalah luka sayat, luka bakar dan luka tusuk. Luka kronik merupakan luka yang berlangsung lama dan dapat timbul kembali (rekuen) atau terjadi pada proses penyembuhan yang biasanya disebabkan oleh masalah multi faktor dari penderita. Luka kronik tidak berspon baik pada terapi dan memiliki tendesi untuk timbul kembali serta akan susah sembuh pada waktu yang diperkirakan (Briant, 2007).

2.3 Fase- Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka merupak proses pembentkan sehinga kembali seperti semula atau terjadinya pergantian jaringan yang rusak oleh jaringan baru melalui proses regenerasi dan reparasi (Kumar,2005). Secara umum terbagi menjadi 4 fase, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferas dan remodeling (Mackay & Miller, 2003).

a. Fase hemostasis

Pendarahan pada luka dapat berhenti karena tubuh memiliki respon meakanisme untuk menghentikan pendarahan yang terjadi akibat luka. Respon tesebut meliputi kontraksi otot polos pembuluh darah, agregasi trombosit, dan koagulasi darah. Kontraksi yang terjadi pada otot polos dapat menyebabkan hipoksia dan asidiosis pada jaringan yang akan meningkatkan produksi oksidasi nitrat, adenosine dan metabolit vasoaktif yang dapat menyebabkan refleks vasodilatasi. Kemudian sel mast akan mengeksresi histamine yang akan meningkatkan vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah. Proses ini akan memfasilitasi diapedesis sel radang ke jaringan luka (Kane, 1997). Menurut Morison (2004) vasokonstriksi dari sel pembuluh darah yang rusak diperkuat oleh serabut fibrin untuk membentuk sebuah bekuan.

b. Fase Inflamasi

Fase inflamasi akan terjadi pada hari ke 0-5. Fase ini terjadi untuk mencegah infeksi. Neutrophil yang menjadi responden pertama adalah sel motil yang akan masuk kedalam luka dalam waktu 1 jam dan akan meningkat hingga 48 jam setelah terjadi luka. Mekanisme neutrofil untuk menghancurkan benda asing terbagi menjadi 3 bagian. Mekanisme pertama, neutrofil akan memfagositosis benda asing. Mekanisme kedua, neutrofil akan mendegranulasi dan melepaskan zat-zat toksik (protase, neutrofil elasase, laktoferin dan cathepsin) yang akan menghancurkan mikroorganisme. Mekanisme ketiga neutrophil akan menghasikan kromatin dan protease yang akan menangkap dan membuuh mikroorganisme dalam ruang ekstraseluler, kemudian neutrophil akan menghasilkan apoptosis dengan difagositosiskan oleh makrofag. Makrofag merupakan sel fagositosit yang akan meningkat pada 48-72 jam setelah terjadi luka.

Makrofag akan memfagositositosis neutrophil yang apptosis dan mencerna sisa jaringan serta menghasilan sitokin seperti TNF- α , TGF- β dan IL-1. Sitokin tersebut akan merangsang fibroblast dan mempercepat pembentukan jaringan granulasi (Triyono, 2005).

c. Fase proliferasi

Poliferasi sel secara umumnya dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrisik, jejas, kematian sel atau bahkan oleh deformasi mekanis jaringan. Sel yang sedang berproliferasi berkembang melalui serangkaian tempat dan fase yang sudah ditentukan yang disebut siklus sel. Siklus tersebut terdiri atas fase pertumbuhan prasintesis1, fase pertumbuhan fase sintesis DNA, fase pertumbuhan pramitosis 2 dan fase mitosis (Dewi, 2010). Fase proliferasi, fibroblast akan meletakkan substansi dasar dan serabut serabut kolagen, maka terjadi peningkatan yang cepat pada kekuatan renggangan luka. Kapiler dibentuk oleh tunas endhotelia yag merupakan proses angiogenesis. Bekuan fibrin dari hasil fase I dikeluarkan apabila kapiler baru manyediakan enzim yang diperlukan. Inflamasin kan berkurang, jaringan yang dibentuk dari kapiler baru disebut dengan jaringn granulasi yang berwarna merah terang (Morison, 2004).

d. Fase remodeling

Fase ini terjadi proses pematangan yang terdiri dari penyerapan kembali jaringan yang berlebih, pengerutan sesuai dengan gaya gravitasi dan perupan kembali jaringan yang baru terbentuk. Fase ini berlangsung selama berbulan-bulan (Dewi, 2010). Menurut Peterson (2004) hubungan dari pembuluh darah akan menurun seiring dengan penurunan proses metabolisme dalam penyembuhan luka. Fibroblast akan mulai menghilang. Matriks kolagen tipe III akan digantikan oleh kolagen tipe I yang menyebabkan peningkatan *tensile strength* pada luka.

2.4 Sel radang

Sel radang terdiri dari leukosit atau sel darah putih yang merupakan unit mobil system pertahanan tubuh terhadap infeksi. Leukosit terdiri dari 2 sel yaitu sel polimorfonuklear

(granuler) dan sel monomuklear (agranuler) (Gambar 2.2). Sel polimorfonuklea rmeliputi basophil, eusinofil dan neutrophil. Sedangkan sel mononuclear meliputi limfosit, monosit dan sel plasma (Junqueira dan Carneiro, 1991).

2.4.1 Leukosit polimorfonuklear

Leukosit merupakan sel darah yang mengandung inti atau disebut juga dengan sel darah putih. Leukosit terdiri dari dua jenis yaitu leukosit polimorfouklear dan leukosit mononuclear. Leukosit polmorfouklear mengandung granula spesifik berupa tetesan setengah cair apabila dalam keadaan hidup di dalam sitoplasmanya. Leukosit polimorfonuklear ini mempunyai banyak inti yang memperlihatkan banyak variasi dalam bentuknya (Effendi, 203). Jenis – jenis leukosit polimorfonuklear adalah sebagai berikut:

a. Neutrofil

Neutrofil merupakan leukosit polimorfonuklear granular matur yang memilki daya lekat dengan kompleks imun dan kemampuan fagositosis. Neurofil memiliki jumlah terbanyak dalam sel darah yaitu ekitar 4.000-10.000 mm³ (Nusa, 2012). Neutrophil berdiameter 12-15µm dan memilik inti padat yang terdiri atas sitoplama pucat antara 2-5 lobus dengan rangka tidak teratur dan mengandung banyak granula berwarna merah jambu (azuroplik). Granula terbagi atas granula primer dan granula sekunder. Kedua graula berasal dari lisosom (Hoffbrand, 1996).

b. Basofil

Basofil berjumlah paling sedikit 0,5-1,5% leukosit, berukuran 10-12μm dengan inti yang berbentuk tidak teratur. Sitoplasma berwarna biru tua hingga ungu dan terisi granula yang lebih besar dan berbentuk irregular, seringkali granul menutupi inti. Basofil merupakan sel utama pada tempat peradangan dan membangkitkan reaksi hipersensitifitas dengan sekresi yang bersifat vasoaktif (Effendi, 2003).

c. Eusinofil

Jumlah eosinofil hanya 1-4% leukosit darah. Eosinofil memiliki garis tengah 9μm degan inti yang biasanya berlobus 2. Pada eosinofil reticulum motokondria dan apparatus golgi kurang berkembang. Eosinofil mempunyai pergerakan amuboid, dan mampu melakukan fagositosis, lebih lambat tapi lebih selektif dibanding neutrofil. Eosinofil memfagositosis komplek antigen dan anti bodi, ini merupakan fungsi eosinofil untuk melakukan fagositosis selektif terhadap komplek antigen dan antibody. Eosinofil mengandung profibrinolisin, diduga berperan mempertahankan darah dari pembekuan, khususnya bila keadaan cairnya diubah oleh proses-proses Patologi. Kortikosteroid akan menimbulkan penurunan jumlah eosinofil darah dengan cepat (Effendi, 2003).

2.4.2 Leukosit Mononuklear

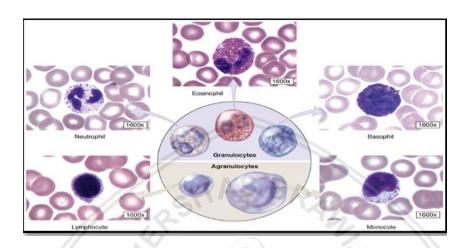
a. Monosit

Monosit berdiameter 16-20µm dan memiliki inti besar berbentuk oval atau berlekuk dengan kromatin mengelompok. Sitoplasma monosit berwarna biru pucat dan mengandung banyak vakuola. Granula sitoplasma juga sering ada. Perkusor monosit dalam sumsum tulang (monosit dan promoosit) aukar dibedakan dari meloblas dan monosit. Pada jaringan monosit akan beriferensiasi menjadi makrofag (Hoffbrand dan Pettit, 1996).

b. Limfosit

Limfosit yang terdapat dalam darah perifer berukurn kecil dan berdiameter lebih kecil dari 10µm. nucleus limfosit gelap, berbentuk lingkaran bahkan agak berlekuk dengan kelompok kromatin kasar dan tidak berbatas tegas. Sitoplasma limfosit berwarna biru muda

dan dalam kebanyakan sel terlihat seperti bingkai halus disekitar inti. Limfosit yang beredar berukuran lebih besar dengan diameter 12µm dengan sitoplasma yang banyak mengandung sedikit granula azuropilik. Bentuk yang lebih besar ini dipengaruhi oleh antigen (Hoffbrand dan Pettit, 1996).



Gambar 2.2 Macam-macam histoptologi sel radang (Mescher, 2010)

2.5 Interleukin 1 Beta (IL-1β)

Interleukin 1 atau IL-1 merupakan polipeptida yang dihasilkan pada proses inflamasi yang secara umum bersifat non-spesifik dan memiliki spectrum aktivitas imunologik yang luas. IL-1 berperan sebagai mediator inflamasi dengan onset akut dan kronik. Kelompok IL-1 juga berperan mengontrol limfosit. IL-1 terdiri dari 3 jenis yaitu IL α, IL β dan IL reseptor antagonis (IL-1Ra). IL-1 α dan IL-1β bersifat agonis yang menimbulkan reaksi radang atau yang disebut proinflamasi (Akagi, 1999). Interleukin-1β merupakan salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses kesembuhan luka terutama fase inflamasi. Sitokin merupakan polipeptida yang diproduksi sebagai respon pada reaksi imun dan inflamasi. Sitokin memiliki sifat *pleiotropic* yaitu bekerja pada beberapa sel target sekaligus dan *redundants* dimana beberapa sitokin dapat memiliki kerja yang sama pada sel target. Interleukin-1β berperan sebagai imunitas nonspesifik dan spesifik. Interleukin-1β disintesis dari pro-IL-1β berukuran 31 kDa yang berada di sitosol

repository.ub.ac.i

BRAWIIAYA

sampai kemudian dikonversi menjadi IL-1β matang berukuran 17,5 kDa karena pembelahan proteolitik oleh caspase-1.

Penghasil utama sitokin IL-1β yaitu monosit dan makrofag (Giraldo, 2013). Sitokin ini berperan sebagai sitokin proinflamasi yang diproduksi sebagai respon dari kerusakan jaringan. Reaksi tersebut antara lain infiltrasi neutrofil ke jaringan, migrasi makrofag, dan produksi sitokin proinflamasi lain (Patel, *et al.*, 2003). Interleukin-1β bekerja pada endotel dengan menginduksi eksresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Neutrofil, monosit dan limfosit kemudian mengenali molekul adhesi tersebut dan bergerak ke dinding pembuluh darah yang terputus selanjutnya ke jaringan luka (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

2.6 Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Daun gamal (*Gliricidia sepium*) merupakan tanaman sejenis perdu dan dapat tumbuh dengan cepat di daerah tropis (Gambar 2.3). Tumbuhan gamal dapat tumbuh pada berbagai tipe tanah dan pH rendah hingga tinggi serta tahan terhadap curah hujan yang rendah hingga tinggi. Daun tanaman gamal menyirip ganjil, helai daun berbentuk oval dan berhadap – hadapan dengan panjang sekitar 4-8cm, terdiri dari 7-17 helai daun, ujung daun meruncing dan jarang ada yang bulat. Panjang daun 19-30cm dengan ciri semakin ke ujung semakin melancip. Panjang tangkai daun sekitar 30cm dengan lebar 5cm. Daun gamal sering dimanfaatkan untuk pakan ternak sebagai makanan tunggal maupun sebagai campuran. Daun gamal tak jarang juga digunakan dalam dunia kesehatan yaitu ekstrak dau gamal mampu mengobati scabies pada kambing (Mayasari, 2012). Dari taksonomi daun gamal (*Gliricidia sepium*) memiliki tingkat taksonomi sebagai berikut.

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae

Subfamili : Faboidae

Genus : Gliricidia

Spesies : Gliricidia sepium (Martoatmodjo, 1973).



Gambar 2.3 Daun gamal (Gliricidia sepium) (Martoatmodjo, 1973)

Menurut Hartadi (1993) kandungan nutrisi dalam daun gamal adalah kadar potein 25,7%, serat kasar 13,3%, dan abu 8,4% Tanaman gamal diketahui memiliki kandungan zat aktif yaitu: flavonoid, tannin, polyphenol, saponin, hydrocyanic acid dan kumarin (Smith and Van Houtert, 1987). Kandungan flavonoid yang terdapat pada tanaman gamal bersifat anti inflamasi yang dapat mengurangi rasa sakit saat terjadi pembengkakan dan pendarahan saat terjadi luka. Flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dan antioksidan yang bertujuan untuk membantu meningkatkan kerja system imun dan penyembuhan luka (Ramdani, *et. al.*, 2014). Polifenol dan flavonoid merupakan senyawa golongan felonik yang dapat melawan bakteri gram negatif dan bakteri gram positif secara aktif dengan cara denaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri (Sabir, 2003).

2.7 Hewan Coba

BRAWIJAYA

Spesies yang sering digunakan sebagai hewan model pada penelitian mengenai mamalia adalah *Rattus norvegius* atau tikus putih. Tikus putih digunakan untuk mempelajari keadaan patologi yang kompleks. *Rattus norvegicus* memiliki beberapa keunggulan, yaitu mudah dalam penanganan dan pemeliharaan serta memiliki kemampuan reproduksi tinggi (Malole & Pramono, 1989). *Rattus norvegius* memiliki berat badan 450-520g pada jantan dan 250-300g pada betina, dengan kebutuhan makan 5-10g/100g berat badan dan kebutuhan minum 10mg/100g berat badan. Jangka hidup *Rattus norvergius* adalah 3-4 tahun (Gambar 2.4). Menurut (Wolfesohn & Lloyd, 2013) *Rattus norvergius* memiliki 3 galur yaitu *Sprague Dawley*, *Wistar* dan *Long Evans*. Galur *Sprague Dawley* memiliki tubuh yang raping kepala kecil, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, serta ukuran ekor lebih panjang dibanding badannya. *Galur Wistar* memliki kepala yang besar dan ekor yang pendek. Sedangkan galur *Long Evans* memiliki ukuran tubuh yang lebih kecil, serta bulu pada bagian tubuh depan berwarna hitam. Menurut Potter (2007) klasifikasi tikus putih *Rattus norvergius* adalah sebagai berikut:

Kindom : Animalia

Filum : Chordata

Sub filum : Vertebrata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Odontoceti

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : Rattus novergicus

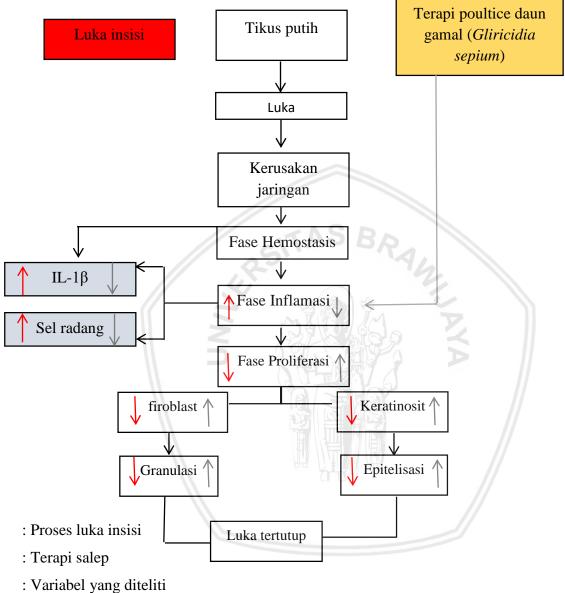


Gambar 2.3 Tikus Putih (Rattus norvegicus) (Potter, 2007).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



: Stimulasi

: Efek luka insisi

: Efek terapi ekstrak daun gamal

Pada hewan coba penelitian tikus putih (Rattus norvegicus) dilakukan insisi yang akan menyebabkan luka pada kulit. Saat terjadi luka maka tubuh akan berupaya untuk memperbaiki jaringan yang rusak. Upaya tubuh dalam memperbaiki kerusakan jaringan dimulai setelah awal terjadi luka dan melalui beberapa fase yaitu fase hemostasis yang berfungsi untuk menghentikan pendarahan dari pembuluh darah yang rusak dan terjadi dalam waktu beberapa menit setelah terjadi *injury*. Pada fase ini endotel dan jaringan yang rusak akan menghasilkan IL-1β sebagai salah satu mediator pro inflamasi. Selanjutnya luka akan memasuki fase inflamasi untuk menyingkirkan jaringan yang mati. Pada fase inflamasi akan meningkatkan IL-1β dan jumlah sel radang. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaktik akan menyebabkan sel radang seperti sel leukosit polimorfonuklear, makrofag dan limfosit begerak menuju luka. Sel radang akan menghasilkan *growth factor* dan radikal bebas. Apabila proses inflamasi berlansung berkepanjangan akan menimbulkan inflamsikronis yang merusak jaringan sehingga luka sembuh lebih lama.

Pemberian poultice daun gamal akan menurunkan ekspresi IL-1β dan jumlah sel radang pada fase inflamasi dan luka akan mengalami fase kesembuhan yang selanjutnya yaitu fase proliferasi. Pemberian salep daun gamal akan meningkatkan sel keratinosit dan mengalami proliferasi yang mempercepat epitelisasi. Pemberian salep akan meningkatkan fibroblast dan akan menstimulasi pembentukan granulasi. Fibroblast juga mengeluarkan substansi yaitu kolagen, elastin, *hyaluronic acid, fibronectin* dan *profeoglycans* yang akan memperbaiki jaringan – jaringan yang rusak pada luka. Tahap terakhir pada fase penyembuhan luka adalah fase remodeling dimana fibroblast akan berproliferasi untuk membetuk matriks ekstraseluler yang mengandung myofilamen yang disebut myofibroblast. Matriks ini akan menuju area luka dan berkontraksi untuk memperkecil area luka sehingga lama – lama luka akan menutup.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat menurunkan ekspresi IL-1β pada hewan coba pasca diberi perlakuan insisi.

2. Terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dan Indonesia dapat menurunkan jumlah sel radang pada hewan coba pasca diberi perlakuan insisi.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September hingga Oktober 2018. Laboratorium yang digunakan untuk melancarkan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Pembuatan simplisia folium di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- b) Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laoratorium Hewan Coba Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- c) Pembuatan Poultice dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- d) Pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Univeritas Brawijaya.
- e) Uji Imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi IL-1β dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah kadang tikus putih (*Rattus norvergus*), botol minum tikus putih, *dissecting set*, miroskop, autoclave, glove, masker, inkubator, cawan petri, gelas ukur, object glass, cover glass, wadah kaca tertutup, toples untuk pembuatan salep dan petri disc sebagai wadah organ.

Bahan yang dipersiapkan pada penelitian ini antara lain adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan stain wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250g, pakan tikus, air minum, daun gamal, NaCl fisiologis, ketamine xylazine, alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, Xylol, etanol 90%, etanol 80%. Etanol 70%, aquades, PBS (*Phospate Buffer Saline*), BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%, antibodi primer IL-1β, *Strep Avidin Horse Radish*

Peroxidase (SA-HRP), Diaminobenzidine (DAB), Kromogen Mayer Hematoxylin, minyak emersi, pewarna Hematoksilen-Eosin (HE), vaseline abumin.

4.3 Tahap Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- 1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
- 2. Pembuatan simplicia folium daun gamal (Gliricidia sepium).
- 3. Perlakuan luka incisi pada hewan coba.
- 4. Penjahitan luka insisi pada hewan coba.
- 5. Terapi poultice daun gamal (Gliricidia sepium).
- 6. Pengambilan dan pembuatan preparat histologi kulit.
- 7. Pengamatan ekspresi IL-1β dengan metode Imunohistokimia.
- 8. Tahap perhitungan jumlah sel radang dengan metode pewarnaan HE.
- 9. Analisis data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancanga eksprimental yang digunakan rancangan eksperimen sederhana dengan subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara acak dimana tiap kelomok terdiri dari 4 tikus (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
1. (Kontrol negatif)	Tanpa perlakuan
2. (Kontrol positif)	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae

3.	(Terapi 1) Daun	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae + pemberian
	gamal Filipina	poultice daun gamal (Gliricidia sepium) asal Filipina
4.	(Terapi 2) Daun	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae + pemberian
	gamal Indonesia	poultice daun gamal (Gliricidia sepium) asal Indonesia

4.5 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (Rattus norergicus) jantan strain wistar yang berumur 8-12 minggu dengan kisaran berat badan 150-250gram. Pakan dan minum disediakan secara *ad libitum*. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan, sehingga banyak perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus p $(n-1) \ge 15$ (Montgomery and Kowalsky, 2011).

T
$$(n-1) \ge 15$$
 Keterangan:

$$4 (n-1) \ge 15$$
 t: Jumlah Perlakuan

$$4n-4 \ge 15$$
 n: Jumlah ulangan yang diperlukan

4n > 19

$$n \ge 4,75$$

berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 5 kali setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*).

4.6 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*).

Variabel terikat : Jumlah sel radang dan ekspresi IL-1β

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin, umur, berat badan,

suhu, kandang, pakan dan air minum, perlakuan insisi, penggantian

kassa steril pada luka.

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini dibutuhkan 20 ekor hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan dengan umur 8-12 minggu dan berat badan sekitar 150-250 gram. Hewan coba diadaptasi selama 7 hari sebelum dilakukan penelitian dengan pemberian pakan standart berupa pellet dengan 10% berat badan 1 kali sehari. Hewan coba yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor hewan coba. Dalam 1 kelompok hewan coba dimasukkan dalam 1 kandang yang sama. Kandang hewan coba berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam kayu yang berfungsi menjaga kandang agar tidak lembab. Hewan coba dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim, Malang.

4.7.2 Pembuatan Simplisia Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Pembuatan simplisia daun gamal asal Filipina dan Indonesia menggunakan metode yang sama yaitu, sampel yang digunakan adalah bagian daun yag telah berwarna hijau sempurna dimana kadar senyawa aktif paling tinggi sehingga dapat memperoleh mutu yang baik. Daun yang telah disortir dicuci dengan air mengalir untuk menghiangkan mikroba dan kotoran yang menempel pada daun (Rivai, 2014). Menurut penelitian yang dilakukan di laboratorium Kimia Analitik Universitaas Mataram oleh Astiti dkk., (2016) daun gamal (Gliricidia sepium) yang sudah dikumpulkan dikeringkan dalam ruangan yang dilengkapi dengan kipas angin dan dengan suhu ruangan serta dilakukan pembalikan daun setiap hari

selama 8 hari agar daun dapat kering secara merata atau dapat pula daun dikeringkan dalam ruangan yang mendapat paparan sinar matahari selama 48 jam. Daun gamal yang telah kering kemudian ditimbang dan digiling hingga halus sehingga dapat menghasilkan tepung daun gamal.

4.7.3 Pembuatan Obat Topikal Poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Obat topikal yang digunakan merupakan jenis poultice atau tapel. Tapel merupakan sediaan obat topikan tradisional yang berbentuk pasta yang digunakan dengan cara melumurkan pada seluruh permukaan (Parwinata, 2017). Menurut Naibaho dkk., (2013) salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorbsi yang tinggi apabila dibandingkan dengan salep dengan basis lainnya. Poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) dibuat dengan bahan pembawa vaselin flavum yang kemudian poultice daun gamal dan vaselin flavum dicampurkan ke dalam mortar dan diaduk hingga merataagar dapat mencapai konsistensi poultice yang diinginkan.

4.7.4 Perlakuan Luka Insisi pada Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus novergicus*) yang akan digunakan dalam penelitian diberi tanda atau label pada bagian ekor. Kemudian tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianastesi terlebih dahulu mengunakan ketamine dengan dosis 10mg/kg secara intramuscular (IM), kemudian dicukur rambut – rambut disekitar area yang akan diinsisi dan didesinfeksi dengan alkohol pada bagian yang akan diinsisi (Lostapa, 2016). Daerah yang akan dilakukan insisi adalah *median dorsal vertebrae*. Insisi akan dibuat sepajang 2-3cm dengan kedalaman mencapai subcutan. Insisi dilakukan dengan menarik *scalpel* secara perlahan kearah *caudal* (Sudrajat, 2006). Tikus yang sudah dilukai dijahit menggunakan benang silk dan dikembalikan kedalam kandang individu yang sudah diberikan alas berupa *underpad* yang diganti secara berkala. Tikus harus diberikan pakan dan air minum setiap hari secara *ad libitum*. Peletakkan kandang harus ditempatkan pada ruangan yang tenang, cukup cahaya matahari, tidak bising serta diatur suhu dan

kelembabannya. Kebersihan kandang harus tetap terjaga dan *underpad* diganti 1 kali dalam 1 hari.

4.7.5 Pemberian Terapi Poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Pemberian poultice daun gamal (*Glircidia sepium*) dilakukan satu kali dalam sehari dengan cara mengoleskan sebanyak 0,1mg poultice pada area luka pasca insisi dan ditutup menggunakan melolin dan hepafix. Pengobatan dilakukan selama 3 hari. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap proses peyembuhan luka.

4.7.6 Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit pada hewan coba dilakukan eutanasi dengan cara dislokasi pada bagian leher. Pada bagian yang akan diambil jaringan kulitnya dibersihkan dari rambut yang tumbuh. Kulit digunting dengan ketebalan ± 3mm hingga kedalaman subcutan dengan luas $2x2cm^2$. Jaringan kulit yang telah diperoleh kemudian difiksasi dengan larutan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%. Kemudian jaringan didiamkan pada suhu kamar selama 48 jam (Febram, dkk. 2010).

4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Jaringan kulit yang telah di dapat difiksasi dengan menggunakan larutan Netral Buffer Formalin 10%, kemudian dipotong dan dimasukkan kedalam spesimen yang terbuat dari plastik. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi pada alkohol konsentrasi bertingkat yaitu alkohol 70%, 80%, 90% alkohol absolut I, absolut II masing masing selama jam 2 jam. Kemudian dilakukan penjernihan dengan menggunakan xylol dan dicetak dengan menggunakan paraffin sehingga sediaan tercetak di dalam blok – blok paraffin dan disimpan dalam lemari es. Blok - blok paraffin tersebut dipotong dengan mengunakan mikrotom dengan ketebalan 5μm. blok paraffin yang telah jadi dipotong menjadi 2 irisan sehingga dapat

digunakan untuk metode IHK dan pewarnaan HE. Satu irisan paraffin yang digunakan untuk metode IHK direkatkan menggunakan perekat *Poly L Lysine*. Hasil potongan diapungkan pada air hangat yang bersuhu 40° c yang bertujuan untuk meregangkan agar jaringan tidak berlipat (Suhita, 2013).

4.7.8 Pengukuran Ekspresi IL-1β Dengan Metode Imunohistokimia (IHK)

Pewarnaan Imunohistokimia diawalai dengan deparafinisasi dan rehidrasi preparat jaringan dengan cara merendam jaringan masing – masing dalam xylol 1, xylol 2 dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80% dan 70%) selama 5 menit. Kemudian slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali dan kemudian ditetesi dengan H₂O₂ 3% selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS ph 7,4 selama 5 menit sebayak 3 kali dan di blok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian cuci slide preparat dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *rabbit polyclonal* IL-1β dengan pengenceran 1:100 selama 24 jam pada suhu 4°C dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 manit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang dan dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian tetesi dengn kromogen 3,3 Diaminobenzidine (DAB) selama 1-10 menit pada suhu ruang dan kemudian dicuci kembali bengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan kromogen *Mayer Hematoxylin* selama 5 menit. *Mayer Hematoxylin* akan menjadi *counterstain* nucleus sehingga terwarnai biru (BIO-RAD, 2016). Cuci preparat dengan air mengalir kemudian dibilas dengan akuaden dan dikeringkan. *Mounting* preparat dengan entellan dan ditutup dengan cover glass. Hasil berupa preparat IHK diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan lima lapang

pandang dan didokumentasikan. Kemudian dilakukan pengukuran presentase area ekspresi IL-1β dengan menggunakan *software Imunoratio* untuk mengamati peningkatan ekspresi IL-1β yang ditandai dengan peningkata presentasi luas daerah yang terwarnai.

4.7.9 Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Jaringan yang sudah dipotong dengan ketebalan 5µm diambil dan dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu 30-40°c untuk menghilangkan kerutan pada potongan dan mencairkan paraffin. Jaringan ditempelkan dengan hati – hati kedalam cover glass dan teteskan albumin diatas potongan jaringan, lalu dengan menggunakan pinset dirapikan jaringan secara hati – hati. Kemudian panaskan objek glass tersebut dengan oven pada suhu 30-40°c. Tahapan pewarnaan HE yaitu pertama dilakukan deparafinisasi menggunakan Xylol I dan Xylol II yang masing masing dikerjakan dengan cara dicelup sebanyak 2-3 kali celup. Tahap berikutnya adalah Rehidrasi dengan cara dicelupkan pada alkohol bertingkat dan berurutan, pertama menggunakan alkohol 100%, 90%, 80% dan diakhiri dengan dibilas menggunakan air mengalir selama 1 menit. Kemudian dilakukan pewarnaa menggunakan Hematoxyin selama 5 menit dan dibilas dengan air selama 1 menit. Setelah dilakukan pewarnaan, tahap selanjutnya adalah differensiasi mengguanakan HCl 0,6% dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Kemudian dilakukan tahap blueing meggunakan Lithium karbonat 0,5% kemudian dibilas menggunakan air mengalir selama 1 menit dan dicelup sebentar dalam alkohol 95%. Kemudian dilakukan pewarnaan Eosin selama 3 menit dan dilakukan Dehidrasi menggunakan alkohol 80%, 90%, 100%, Xylol I dan Xylol II sebanyak 10 kali celup. Tahap terakhir yang dilakukan adalah tahapan Mounting menggunakan Entelan sebanyak 1-2 tetes. Hasil pewarnaan HE dapat diamati. Jumlah sel radang dihitung menggunakan mikrosop cahaya dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang dan didokumentasikan (Mulyanto, 2007). Sel radang dihitung dengan menggunakan software Image Raster. Pengamatan parameter jumlah sel radang dengam

melakukan pewarnaan HE untuk menghitung rata – rata jumlah sel radang dari lima lapang padang tiap sampel.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistika menggnakan *software* IBM SPSS *Statistic19*. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa hasil ekspresi IL-1 β dan jumlah sel radang dengan menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kepercayaan 95% (α = 0,05). ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan pada setiap kelompok dan untuk mengetahui hasil yang paling beda nyata dianjutkan dengan uji BNJ



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September hingga Oktober 2018. Laboratorium yang digunakan untuk melancarkan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Pembuatan simplisia folium di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- b) Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laoratorium Hewan Coba Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- c) Pembuatan Poultice dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- d) Pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Univeritas Brawijaya.
- e) Uji Imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi IL-1β dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah kadang tikus putih (*Rattus norvergus*), botol minum tikus putih, *dissecting set*, miroskop, autoclave, glove, masker, inkubator, cawan petri, gelas ukur, object glass, cover glass, wadah kaca tertutup, toples untuk pembuatan salep dan petri disc sebagai wadah organ.

Bahan yang dipersiapkan pada penelitian ini antara lain adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan stain wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250g, pakan tikus, air minum, daun gamal, NaCl fisiologis, ketamine xylazine, alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, Xylol, etanol 90%, etanol 80%. Etanol 70%, aquades, PBS (*Phospate Buffer Saline*), BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%, antibodi primer IL-1β, *Strep Avidin Horse Radish*

Peroxidase (SA-HRP), Diaminobenzidine (DAB), Kromogen Mayer Hematoxylin, minyak emersi, pewarna Hematoksilen-Eosin (HE), vaseline abumin.

4.3 Tahap Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- 1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
- 2. Pembuatan simplicia folium daun gamal (Gliricidia sepium).
- 3. Perlakuan luka incisi pada hewan coba.
- 4. Penjahitan luka insisi pada hewan coba.
- 5. Terapi poultice daun gamal (Gliricidia sepium).
- 6. Pengambilan dan pembuatan preparat histologi kulit.
- 7. Pengamatan ekspresi IL-1β dengan metode Imunohistokimia.
- 8. Tahap perhitungan jumlah sel radang dengan metode pewarnaan HE.
- 9. Analisis data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancanga eksprimental yang digunakan rancangan eksperimen sederhana dengan subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara acak dimana tiap kelomok terdiri dari 4 tikus (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
1. (Kontrol negatif)	Tanpa perlakuan
2. (Kontrol positif)	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae

3.	(Terapi 1) Daun	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae + pemberian
	gamal Filipina	poultice daun gamal (Gliricidia sepium) asal Filipina
4.	(Terapi 2) Daun	Luka insisi pada daerah median dorsal vertebrae + pemberian
	gamal Indonesia	poultice daun gamal (Gliricidia sepium) asal Indonesia

4.5 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (Rattus norergicus) jantan strain wistar yang berumur 8-12 minggu dengan kisaran berat badan 150-250gram. Pakan dan minum disediakan secara *ad libitum*. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan, sehingga banyak perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus p $(n-1) \ge 15$ (Montgomery and Kowalsky, 2011).

T
$$(n-1) \ge 15$$
 Keterangan:

$$4 (n-1) \ge 15$$
 t: Jumlah Perlakuan

$$4n-4 \ge 15$$
 n: Jumlah ulangan yang diperlukan

4n > 19

$$n \ge 4,75$$

berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 5 kali setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*).

4.6 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis terapi poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*).

Variabel terikat : Jumlah sel radang dan ekspresi IL-1β

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin, umur, berat badan,

suhu, kandang, pakan dan air minum, perlakuan insisi, penggantian

kassa steril pada luka.

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini dibutuhkan 20 ekor hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan dengan umur 8-12 minggu dan berat badan sekitar 150-250 gram. Hewan coba diadaptasi selama 7 hari sebelum dilakukan penelitian dengan pemberian pakan standart berupa pellet dengan 10% berat badan 1 kali sehari. Hewan coba yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor hewan coba. Dalam 1 kelompok hewan coba dimasukkan dalam 1 kandang yang sama. Kandang hewan coba berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam kayu yang berfungsi menjaga kandang agar tidak lembab. Hewan coba dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim, Malang.

4.7.2 Pembuatan Simplisia Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Pembuatan simplisia daun gamal asal Filipina dan Indonesia menggunakan metode yang sama yaitu, sampel yang digunakan adalah bagian daun yag telah berwarna hijau sempurna dimana kadar senyawa aktif paling tinggi sehingga dapat memperoleh mutu yang baik. Daun yang telah disortir dicuci dengan air mengalir untuk menghiangkan mikroba dan kotoran yang menempel pada daun (Rivai, 2014). Menurut penelitian yang dilakukan di laboratorium Kimia Analitik Universitaas Mataram oleh Astiti dkk., (2016) daun gamal (Gliricidia sepium) yang sudah dikumpulkan dikeringkan dalam ruangan yang dilengkapi dengan kipas angin dan dengan suhu ruangan serta dilakukan pembalikan daun setiap hari

selama 8 hari agar daun dapat kering secara merata atau dapat pula daun dikeringkan dalam ruangan yang mendapat paparan sinar matahari selama 48 jam. Daun gamal yang telah kering kemudian ditimbang dan digiling hingga halus sehingga dapat menghasilkan tepung daun gamal.

4.7.3 Pembuatan Obat Topikal Poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Obat topikal yang digunakan merupakan jenis poultice atau tapel. Tapel merupakan sediaan obat topikan tradisional yang berbentuk pasta yang digunakan dengan cara melumurkan pada seluruh permukaan (Parwinata, 2017). Menurut Naibaho dkk., (2013) salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorbsi yang tinggi apabila dibandingkan dengan salep dengan basis lainnya. Poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) dibuat dengan bahan pembawa vaselin flavum yang kemudian poultice daun gamal dan vaselin flavum dicampurkan ke dalam mortar dan diaduk hingga merataagar dapat mencapai konsistensi poultice yang diinginkan.

4.7.4 Perlakuan Luka Insisi pada Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus novergicus*) yang akan digunakan dalam penelitian diberi tanda atau label pada bagian ekor. Kemudian tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianastesi terlebih dahulu mengunakan ketamine dengan dosis 10mg/kg secara intramuscular (IM), kemudian dicukur rambut – rambut disekitar area yang akan diinsisi dan didesinfeksi dengan alkohol pada bagian yang akan diinsisi (Lostapa, 2016). Daerah yang akan dilakukan insisi adalah *median dorsal vertebrae*. Insisi akan dibuat sepajang 2-3cm dengan kedalaman mencapai subcutan. Insisi dilakukan dengan menarik *scalpel* secara perlahan kearah *caudal* (Sudrajat, 2006). Tikus yang sudah dilukai dijahit menggunakan benang silk dan dikembalikan kedalam kandang individu yang sudah diberikan alas berupa *underpad* yang diganti secara berkala. Tikus harus diberikan pakan dan air minum setiap hari secara *ad libitum*. Peletakkan kandang harus ditempatkan pada ruangan yang tenang, cukup cahaya matahari, tidak bising serta diatur suhu dan

kelembabannya. Kebersihan kandang harus tetap terjaga dan *underpad* diganti 1 kali dalam 1 hari.

4.7.5 Pemberian Terapi Poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium)

Pemberian poultice daun gamal (*Glircidia sepium*) dilakukan satu kali dalam sehari dengan cara mengoleskan sebanyak 0,1mg poultice pada area luka pasca insisi dan ditutup menggunakan melolin dan hepafix. Pengobatan dilakukan selama 3 hari. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap proses peyembuhan luka.

4.7.6 Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit pada hewan coba dilakukan eutanasi dengan cara dislokasi pada bagian leher. Pada bagian yang akan diambil jaringan kulitnya dibersihkan dari rambut yang tumbuh. Kulit digunting dengan ketebalan ± 3mm hingga kedalaman subcutan dengan luas $2x2cm^2$. Jaringan kulit yang telah diperoleh kemudian difiksasi dengan larutan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%. Kemudian jaringan didiamkan pada suhu kamar selama 48 jam (Febram, dkk. 2010).

4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Jaringan kulit yang telah di dapat difiksasi dengan menggunakan larutan Netral Buffer Formalin 10%, kemudian dipotong dan dimasukkan kedalam spesimen yang terbuat dari plastik. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi pada alkohol konsentrasi bertingkat yaitu alkohol 70%, 80%, 90% alkohol absolut I, absolut II masing masing selama jam 2 jam. Kemudian dilakukan penjernihan dengan menggunakan xylol dan dicetak dengan menggunakan paraffin sehingga sediaan tercetak di dalam blok – blok paraffin dan disimpan dalam lemari es. Blok - blok paraffin tersebut dipotong dengan mengunakan mikrotom dengan ketebalan 5μm. blok paraffin yang telah jadi dipotong menjadi 2 irisan sehingga dapat

digunakan untuk metode IHK dan pewarnaan HE. Satu irisan paraffin yang digunakan untuk metode IHK direkatkan menggunakan perekat *Poly L Lysine*. Hasil potongan diapungkan pada air hangat yang bersuhu 40° c yang bertujuan untuk meregangkan agar jaringan tidak berlipat (Suhita, 2013).

4.7.8 Pengukuran Ekspresi IL-1β Dengan Metode Imunohistokimia (IHK)

Pewarnaan Imunohistokimia diawalai dengan deparafinisasi dan rehidrasi preparat jaringan dengan cara merendam jaringan masing – masing dalam xylol 1, xylol 2 dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80% dan 70%) selama 5 menit. Kemudian slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali dan kemudian ditetesi dengan H₂O₂ 3% selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS ph 7,4 selama 5 menit sebayak 3 kali dan di blok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian cuci slide preparat dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *rabbit polyclonal* IL-1β dengan pengenceran 1:100 selama 24 jam pada suhu 4°C dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 manit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang dan dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian tetesi denga kromogen 3,3 Diaminobenzidine (DAB) selama 1-10 menit pada suhu ruang dan kemudian dicuci kembali bengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan kromogen *Mayer Hematoxylin* selama 5 menit. *Mayer Hematoxylin* akan menjadi *counterstain* nucleus sehingga terwarnai biru (BIO-RAD, 2016). Cuci preparat dengan air mengalir kemudian dibilas dengan akuaden dan dikeringkan. *Mounting* preparat dengan entellan dan ditutup dengan cover glass. Hasil berupa preparat IHK diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan lima lapang

pandang dan didokumentasikan. Kemudian dilakukan pengukuran presentase area ekspresi IL-1β dengan menggunakan *software Imunoratio* untuk mengamati peningkatan ekspresi IL-1β yang ditandai dengan peningkata presentasi luas daerah yang terwarnai.

4.7.9 Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Jaringan yang sudah dipotong dengan ketebalan 5µm diambil dan dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu 30-40°c untuk menghilangkan kerutan pada potongan dan mencairkan paraffin. Jaringan ditempelkan dengan hati – hati kedalam cover glass dan teteskan albumin diatas potongan jaringan, lalu dengan menggunakan pinset dirapikan jaringan secara hati – hati. Kemudian panaskan objek glass tersebut dengan oven pada suhu 30-40°c. Tahapan pewarnaan HE yaitu pertama dilakukan deparafinisasi menggunakan Xylol I dan Xylol II yang masing masing dikerjakan dengan cara dicelup sebanyak 2-3 kali celup. Tahap berikutnya adalah Rehidrasi dengan cara dicelupkan pada alkohol bertingkat dan berurutan, pertama menggunakan alkohol 100%, 90%, 80% dan diakhiri dengan dibilas menggunakan air mengalir selama 1 menit. Kemudian dilakukan pewarnaa menggunakan Hematoxyin selama 5 menit dan dibilas dengan air selama 1 menit. Setelah dilakukan pewarnaan, tahap selanjutnya adalah differensiasi mengguanakan HCl 0,6% dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Kemudian dilakukan tahap blueing meggunakan Lithium karbonat 0,5% kemudian dibilas menggunakan air mengalir selama 1 menit dan dicelup sebentar dalam alkohol 95%. Kemudian dilakukan pewarnaan Eosin selama 3 menit dan dilakukan Dehidrasi menggunakan alkohol 80%, 90%, 100%, Xylol I dan Xylol II sebanyak 10 kali celup. Tahap terakhir yang dilakukan adalah tahapan Mounting menggunakan Entelan sebanyak 1-2 tetes. Hasil pewarnaan HE dapat diamati. Jumlah sel radang dihitung menggunakan mikrosop cahaya dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang dan didokumentasikan (Mulyanto, 2007). Sel radang dihitung dengan menggunakan software Image Raster. Pengamatan parameter jumlah sel radang dengam

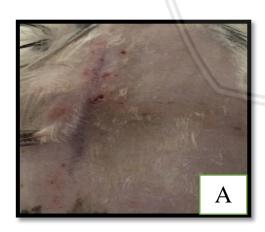
melakukan pewarnaan HE untuk menghitung rata – rata jumlah sel radang dari lima lapang padang tiap sampel.

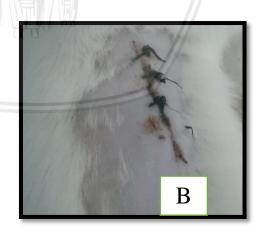
4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistika menggnakan software IBM SPSS Statistic19. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa hasil ekspresi IL-1β dan jumlah sel radang dengan menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan pada setiap kelompok dan untuk mengetahui hasil yang paling beda nyata dianjutkan dengan uji BNJ

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan kesembuhan luka insisi kulit tikus putih (Rattus norvegicus) berjenis kelamin jantan strain wistar yang diberikan terapi poultice daun gamal secara topikal menunjukan adanya perbedaan secara makroskopis antara kelompok perlakuan dengan kontrol negatif (K-) ditunjukkan pada Gambar 5.1









Gambar 5.1 Gambar makroskopis kesembuhan luka insisi tikus pada hari ke 3

Keterangan. (A) Kontrol negatif

- (B) Kontrol positif (Luka insisitanpa perlakuan terapi)
- (C) Terapi 1 (Luka insisi terapi poultice daun gamal Filipina)
- (D) Terapi 2 (Luka insisi terapi poultice daun gamal Indonesia)

Gambaran kesembuhan luka insisi pada kelompok kontrol negatif Gambar 5.1 (A) yaitu tikus normal tanpa adanya perlakuan luka dan perlakuan terapi pada kulit tikus putih. Pada Gambar 5.1 (B) yaitu tikus yang diberi perlakuan luka dengan cara insisi dan tanpa diberi terapi. Kondisi luka insisi tampak belum menyatu dengan sempurna serta menandakan fase penyembuhan luka berada pada fase inflamasi. Fase inflamasi terjadi pada hari ke 2-4. Fase inflamasi memiliki prioritas menyingkirkan jaringan mati dan mencegah infeksi yang menyebabkan patogen (Hunt, 2003). Pada kelompok terapi 1 Gambar 5.1 (C) yaitu tikus yang dilukai dengan cara insisi diberikan terapi poultice daun gamal yang berasal dari Filipina serta ditutup dengan melolin selama 3 hari. Luka di seluruh bagian insisi mulai menutup dan di beberapa bagian jahitan luka sudah menutup secara sempurna. Pada kelompok terapi 2 Gambar 5.1 (D) yaitu tikus yang dilukai dengan cara insisi dan diberi terapi berupa poultice daun gamal yang berasal dari Indonesia dan ditutup menggunakan melolin selama 3 hari.

Luka nampak mulai tertutup di sebagian besar area insisi namun belum tertutup secara sempurna dan terdapat sedikit keropeng. Keropeng merupakan kumpulan dari sel darah merah sel darah putih, platelet, fibrin dan plama yang mengering. Keropeng dapat melindungi

permukaan luka dan kontaminasi bakteri dan benda asing namun dapat memperpanjag waktu kesembuhan luka, karena keropeng menghambat proses epitelisasi (Flanagan, 2000). Kedua jenis terapi dihentikan pada hari ke-3. Tahap penyembuhan luka pada hari ke-3 berada pada fase inflamasi dimana adanya respon vascular dan seluler yang terjadi akibat perlukaan yang terjadi pada jaringan lunak serta menyebabkan peningkatan prostalglandin untuk menstimuli syaraf nyeri dan meningkatkan respon inflamasi (Kusumastuti., dkk. 2014).

5.2 Pengaruh Pemberian poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium) Terhadap Ekspresi Interleukin 1β pada Luka Insisi Tikus Putih (Ratus norvegicus)

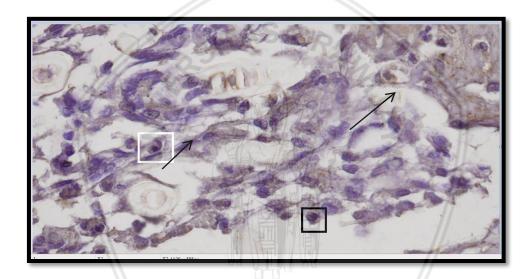
Pemeriksaan ekspresi Interleukin 1β (IL-1β) menggunakan metode immunohistokimia (IHK) yang merupakan metode pewarnaan untuk mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel yang menggunakan antibodi spesifik. Warna yang akan mucul adalah warna coklat yang akan menunjukkan adanya interaksi antara IL-1β dengan antibodi sekunder *rabbit polyconal* IgG yang ditambahkan. Sitokin Interleukin 1β (IL-1β) merupakan mediator kunci pada respons inflamasi. Interleukin 1β juga sebagai sitokin pro inflamasi yang kuat dan sangat penting sebagai respon pertahanan terhadap infeksi dan cedera (Castejon 2011). Sitokin Interleuin 1β pada fase akhir inflamasi sel radang akan menghasilkan *growth factor* yang diperlukan pada fase proliferasi dalam penyembuhan luka (Velnar, *et al.*, 2009)

Pengukuran presentase IL-1β menggunakan *software immunoratio* pada lima lapang pandang masing-masing sampel. *Software immunoratio* ini bekerja mengunakan algoritma dekonvolusi warna yang dapat memisahkan lebih dari satu pewarnaan melalui analisa spectrum absorbsi dan area pewarnaan yang tumpang tindih sehingga dapat mengenali DAB dan nukleus yang terwarnai pewarnaan hematoxylin kemudian dihitung presentasi are terwarnai DAB dari total area yang dilabel (Tuominem, *et al.*, 2010).

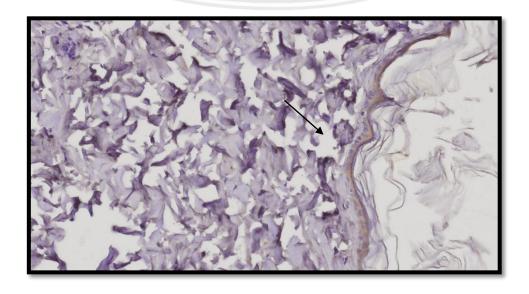
Data yang diperoleh akan dianalisa menggunakan *software IBM SPSS statistic*.

Berdasarkan statistika deskriptif didapat bahwa semua kelompok perlakuan menunujkkan nilai

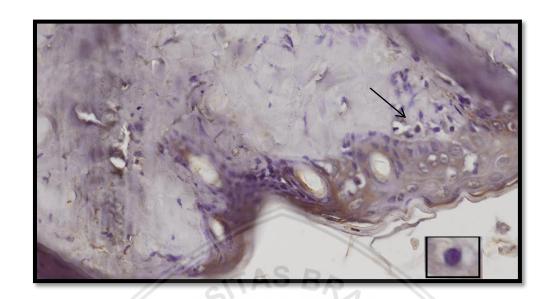
standart devinisi yang lebih kecil dari *mean*. Uji yang diakukan selanjutnya adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal.berdasarkan uji tersebut didapat bahwa data ekspresi IL-1β homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *one way* ANOVA. Pada uji *one way* ANOVA didapatkan hasil nilai signifikan <0,05 yang menunjukkan H0 ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan rata – rata yang signifikan, setelah itu dilakukan uji beda jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata – rata signifikan. Hasil dari uji BNJ tersebut disajikan pada **Tabel 5.2.**



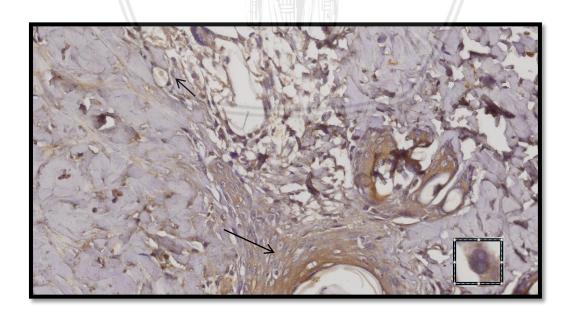
Gambar 5.2 Ekspresi IL-1 β pada kelompok kontrol positif (K+) Keterangan: Tanda panah menunjukkan sel radang yang terekspresi IL-1 β



Gambar 5.3 Ekspresi IL-1β pada kelompok kontrol negatif (K-) Keterangan: Tanda panah menunjukkan sel radang yang terekspresi IL-1β



Gambar 5.4 Ekspresi IL-1 β pada kelompok terapi 1 (T1) daun Gamal asal Filipina Keteragan: Tanda panah menunjukan sel radang yang terekspresi IL- β 1



Gambar 5.5 Ekspresi IL-1 β pada kelompok terapi 2 (T2) daun Gamal asal Indonesia Keterangan: Tanda panah menunjukan sel radang yang terekspresi IL- β 1

Tabel 5.1 Pengaruh pemberian poultice daun gamal secara topikal terhadap ekspresi IL- 1β

Kelompok	Ekspresi IL-1β	
	Rata rata (Ekspresi) \pm S D	Penurunan Tehadap K+ (%)
K- (Kontrol negatif)	41,80±9,28% ^a	33,74%
K+ (Kontrol positif)	75,54±11,19% ^b	-
T1 (Terapi 1) Filipina	28,10±7,35% a	47,44%
T2 (Terapi 2) Indonesia	58,68±8,20% ^b	16,86%

Ekspresi IL-1 β yang diukur menggunakan *software Immunoratio* memperoleh hasil seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1** yang selanjutnya akan dilanjutkan dengan uji statistika *one way* ANOVA dan uji *Tukey* dengan α =0,05. Hasil analisis statistik uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa pemberian terapi secara topikal menggunakan poultice daun gamal asal Filipina dan Indonesia berbeda secara signifikan (P<0,05) menurunkan presentase ekspresi IL-1 β jika dibandingkan dengan presentase ekspresi IL-1 β pada kontrol positif (K+). Berdasarka hasil uji *Tukey* bahwa terapi poltice asal Filipina (Terapi 1) dapat menurunkan ekspresi IL-1 β secara signifikan terhadap kontrol positif (K+), sedangkan pada terapi poutice asal Indonesia (Terapi 2) tidak dapat menurunkan ekspresi IL-1 β secara signifikan terhadap kontrol positif (K+).

Rata – rata ekspresi IL-1β pada kelompok kontrol negatif (K-) sebesar 41,80±9,28 yang digunakan sebagai indikator ekspresi IL-1β pada tikus normal tanpa perlakuan dan sebagai pembanding dengan kelompok kontrol positif (K+) dengan penurunan terhadap K+ sebesar 33,74%. Pada kondisi kulit normal tanpa luka, sitokin IL-1β terdapat di epidermis kulit dengan ekspresi yang rendah (Baliwang, *et al.* 2014). Ekspresi IL-1β pada kelompok K- berbeda secara signifikan dengan kelmpok K+. Ekspresi Interleukin 1β pada kondisi nomal atau fisiologis tergolong rendah. Fungsi Interleukin-1β pada kondisi fisiolgis adalah sebagai mediator inflamasi lokal (Sananta, dkk., 2017). Inteleukin-1β bersifat agonis yang akan menimbulkan

reaksi radang pada kondisi patologis. Interleukin-1β juga menstimulasi monosit dan makrofag untuk memproduksi lebih banyak sitokin lainnya dan dapat memicu *nuclear factor* yang berfungsi sebagai activator transkripsi gen dan memicu system enzim yang menaktivasi prostalglandin (Kusumadewy, 2012). Interleukin 1β juga menginduksi endotel untuk ekskresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) agar dapar dikenali sel radang yang nantinya akan diinfiltasi pada area perlukaan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Pada kelompok K+ rata – rata ekspresi IL-1 β yaitu 75,54±11,19% sehingga tampak adanya perbedaan peningkatan yang signifikan terhadap kelompok K–. Peningkatan ekspresi IL-1 β menujukkan adanya inflamasi yang disebabkan oleh luka insisi. IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi yang akan mengaktivasi monosit dan polimorfonuklear (PMN) sehingga IL-1 β dapat menstimulasi terjadinya inflamasi (Putra, 2014). Sebagian besar IL-1 β disekresikan oleh monosit dan sebagian oleh makrofag, sel endotelia, fibroblast dan epidermal yang diaktivasi oleh beberapa stimulus. IL-1 β meningkatkan ikatan PMN dan monist/makrofag terhadap sel endotelia, menstimulasi prouksi protalglandin danmelepaskan enzim lisosom. Produksi sitokin proinflamasi secara terus menerus akan mengakibatkan fase inflamasi yang berkepanjangan serta dapat memperpanjang waktu kesembuhan luka (Kusumadewy 2012).

Pada kelompok T1 (terapi poultice asal filipina) rata-rata ekspresi IL-1 β yaitu 28,10±7,35% dengan presentase penurunan sebesar 47,44% terhadap kelompok K+ dan berbeda secara signifkan (P<0,05) dengan kelompok kontrol negatif dan positif . Pada kelompok T2 (terapi topikal poultice daun gamal asal Indonesia) didapatkan rata-rata ekspresi IL-1 β yaitu 51,08±8,20% dengan jumlah presentase penurunan sebesar 16,86%. Ekspresi IL-1 β mengalami penurunan dibandingkan dengan K+. Penurunan ekspresi Interleukin 1 β terhadap K+ pada T1 (tarapi menggunakan daun asal Filipina) lebih besar dibandingkan dengan T2 (terapi menggunakan daun asal Indonesia). Poultice daun gamal asal Filipina dan asal

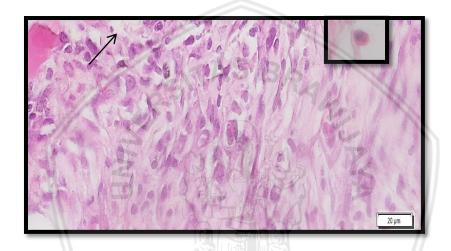
Indonesia memiliki kandungan flavonoid, saponin, alkaloid dan tannin sebagai antioksidan yang dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, hal ini menunjukkan bahwa pada terapi topikal poltice dapat menurunan ekspresi IL-1β yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yaitu luka insisi tanpa perlakuan pengobatan. Ekspresi IL-1β mengalami penurunan dikarenakan poultice daun gamal asal Filipina terdapat kandungan senyawa flavonoid, tannin dan saponin sebagai antiinflamasi sehingga memiliki aktivitas sebagai antiinflmasi dengan cara menghambat aktivitas enzim siklooksigease (COX) dan lipooksigenase serta merangsang makrofag untuk menghaslkan *growth factor* dan sitokin sehingga mempercepat memasuki fase proliferasi dan penyembuhan luka (Riansyah, dkk., 2015). Rendahnya ekspresi IL-1β pada luka menandakan proses peradangan sudah selesai dan proses kesembuhan luka memasuki fase proliferasi.

5.3 Pengaruh Pemberian Poultice Daun Gamal (Gliricidia sepium) Terhadap Jumlah Sel Radang pada Luka Insisi Tikus (Rattus norvegicus).

Pengamatan parameter sel radang dilakukan untuk mengukur gambaran inflamasi berdasarkan histopatologi. Gambaran histopatologi luka untuk menghitung jumlah sel radang pada masing – masing sampel dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang dan ditunjukkan pada (**Gambar 5.5**) berikut ini. Pengamatan parameter jumlah sel radang dilakukan dengan menghitung rata – rata jumlah sel radang dari lima lapang pandang tiap sampel.

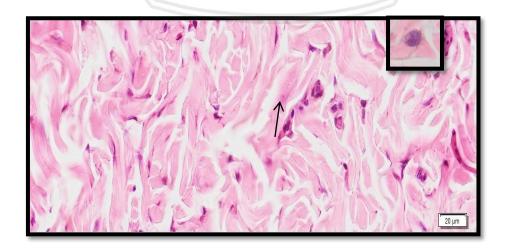
Tahap awal kesembuhan luka yaitu pada tahap inflamasi akut yang ditandai dengan peningkatan sel polimorfonuklear, terutama neutrophil yang berfungsi untuk memfagositosis bakteri dan debris seluler serta membersihkan area luka dari masuknya benda asing, infeksi mikroorganisme serta membersihkan jaringan yang luka. Setelah itu pada hari ketiga fungsi fagositosis polimorfonuklear akan digantikan oleh sel mononuclear yang menandakan tahap kesembuhan luka memasuki fase proliferasi (Komesu, *et al.*, 2004).

Pengamatan jumlah sel radang dilakukan menggunakan software Optilab viewer dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel radang menggunakan program ImageRaster. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan software IBM SPSS Statistic untuk dilakukan uji homogenitas, uji normalitas agar mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Jumlah sel radang pada setiap perlakuan diuji dengan uji *Oneway* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui bahwa kelompok memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan.



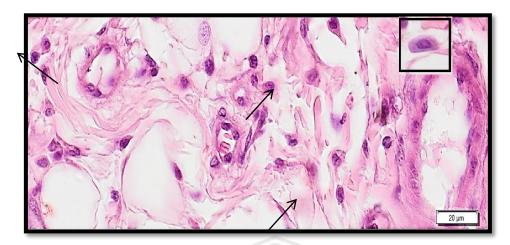
Gambar 5.6 Histopatologi jaringan kulit tikus dengan pewarnaan HE kelompok kontrol positif (perlakuan luka tanpa terapi). Terdapat sel radang pada perbesaran 40x lensa obyektif.

Keterangan : Tanda panah menunjukkan adanya sel radang.



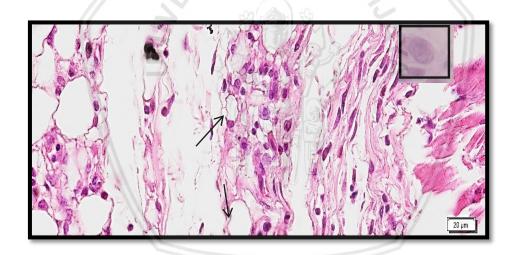
Gambar 5.7 Histopatologi jaringan kulit tikus dengan pewrnaan HE kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan). Terdapat sel radang pada perbesaran 40x.

Ketersngn : Tanda panah menunjukkan adanya sel radang.



Gambar 5.8 Histopatologi jaringan kulit tikus dengan pewarnaan HE kelompok terapi 1 (terapi topikal poultice daun gamal asal Filipina), terdapat sel radang pada lensa obyektif perbesaran 40x.

Keterngan :Tanda panah menunjukkan adanya sel radang.



Gambar 5.9 Histopatologi jarigan kulit tikus dengan pewarnaan HE kelompok terapi 2 (Terapi topikal poultice daun gamal Indonesia). Terdapat sel radang pada lensa obyektif perbesaran 40x,

Keterangan :Tanda panah menunjukkan adanya sel radang.

Tabel 5.2 Pengaruh pemberian poultice daun gamal secara topikal terhadap jumlah sel radang.

Kelompok	Jumlah Sel Radang	Jumlah Sel Radang
	Rata rata (Ekspresi) ± S D	Penurunan terhadap K+ (%)
K- (Kontrol negatif)	5,80±3,89 ^a	68,52%

K+ (Kontrol positif)	$74,32\pm36,81^{b}$	-
T1 (Terapi 1) Filipina	$20,20\pm8,34^{a}$	54,12%
T2 (Terapi 2) Indonesia	25,40±7,92a	48,92%

Keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (α <005) antara kelompok perlakuan

Jumlah sel radang dapat dihitung menggunakan *software image raster* dan akan memperoleh jumlah sel radang yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2** dan dilanjutkan dengan uji statistik *one way* ANOVA dan uji *Tukey* dengan α-0,05. Hasil uji statistik *one way* ANOVA akan menunjukkan bahwa pemberian terapi secara topikal menggunakan daun gamal asal Filipina dan Indonesia akan menurunkan jumlah sel radang pada luka secara signifikan dibandingkan dengan kontrol positif (K+). Berdasarkan hasil uji *Tukey* bahwa poultice asal Filipina (T1) dan poultice asal Indonesia (T2) mampu menurunkan jumlah sel radang secara signifikan terhadap kontrol positif (K+) maka p<0,05..

Jumlah sel radang pada kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan angka rata-rata sebesar 74,32±36,81. Kelompok kontrol positif merupakan hewan coba dengan perlakuan luka insisi tanpa terapi sehingga menyebabkan kerusakan pada jaringan dan mampu memperpanjang fase inflamasi. Jumlah sel radang pada kelompok kontrol positif (K+) cukup tinggi, hal ini terjadi akibat adanya luka insisi yang menyababkan kerusakan pada jaringan serta memperpanjang fase inflamasi pada luka. Makrofag dan neutrophil terjadi peningkatan dan menuju tempat terjadi kerusakan jaringan serta meningkatkan daya fagositosis terhadap benda asing. Sel-sel yang rusak akan mengeluarkan sitokin sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaktik menyebabkan sel makrofag, limfosit dan leukosit polimorfonuklear bergerak menuju luka, maka akan menyebabkan jumlah sel radang pada area luka terjadi peningkatan (Williams dan Moores, 2009).

Jumlah sel radang pada tikus kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan angka rata-rata sebesar 5,80±3,89 dengan penurunan sebesar 68,52% (**Tabel 5.1**) yang digunakan sebagai indikator jumlah sel radang pada tikus putih tanpa perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok K+ (kontrol positif). Rata-rata jumlah sel radang pada kelompok K- menunjukkan perbedaan yang cukup signifikan terhadap kelompok K+. Rendahnya jumlah sel radang pada K- disebabkan karena pada jaringan kulit tidak terjadi kerusakan sehingga tidak menimbulkan adanya reaksi imunologis. Sel radang yang terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-) berfungsi untuk melakukan fagositosis sel walaupun tidak terjadi respon imunologis.

Jumlah sel radang pada kelompok terapi 1 (T1) yaitu terapi menggunakan poultice daun gamal asal Filipina menunjukkan rata-rata sebesar 20,20±8,34 dengan penurunan presentase terhadap kontrol positif (K+) sebesar 54,12%. Kelompok terapi 2 (T2) menggunakan poultice daun gamal asal Indonesia menunjukkan rata-rata penurunan sel radang sejumlah 25,80±7,92 dengan presentase penurunan sebanyak 48,92% terhadap kelompok kontrol positif K+, sehingga masing-masing kelompok terapi berbeda nyata (p<0,05) terhadap kelompok kontrol positif. Angka pesentase kelompok terapi 1 dan kelompok terapi 2 menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada terapi topikal daun gamal Filipina dan Indonesia dapat menurunkan jumlah sel radang lebih baik dibandingkan dengan kontrol positif. Penurunan sel radang terjadi karena pada daun gamal terdapat kandungan flavonoid, saponin, alkaloid dan tannin sebagai mekanisme antiinflamasi dengan melalui efek penghambat aktifitas enzim siklooksigenase (COX) yang akan menghasilkan prostaglandin dan lipooksigenase. Hingga pelepasan histamine pada radang (Mardiana, 2012). Flavonoid juga akan menghambat akumulasi leukosit pada daerah inflamasi dan menurunkan jumlah leukosit immobil, serta dapat menghambat pelepasan histamine dari sel mast (Marbu, dkk., 2015). Flavonoid, saponin dan tannin memiliki kemampuan untuk menyembuhkan luka melalui mekanisme seluer yang berbeda – beda yaitu sebagai antiinflamasi, antimikroba dan sebagai antioksidan untuk menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas serta memberi nutrisi pada kulit. (Negara., dkk, 2014)



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan terkait dengan variable yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

- Pemberian obat topikal poultice daun gamal (Gliricidia sepium) asal Filipina dapat menurunkan ekspresi Interleukin-1β (IL-1β) pada jaringan kulit tikus (Rattus norvegicus) pasca luka insisi lebih baik dibandingkan dengan daun gamal asal Indonesia.
- 2. Pemberian obat topikal poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) asal Filipina dapat menurunkan jumlah sel radang pada jaringan kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi lebih baik dibandingkan dengan daun gamal asal Indonesia.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dari pemberian poultice daun gamal (*Gliricidia sepium*) serta dosis optimal terhadap luka model insisi pada hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akai, Y., W. Liu, K. Xie, B Zebrowski, R. M. Shaheen. 1999. Regulation Of Vascular Endhotelial Growth Fator Expression in Hman Colon Cancer by Interleukin-1. B.J. Cancer 80:1560 1.
- Astiti, L, G, S., Prisdiminggo dan T. Panjaitan. 2016. Efektifitas Ekstrak Daun Gamal (*Gliricidia sepium*) Terhadap Larva Cacing *Trichostrongylus sp.* Pada Kambing PE. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Nusa Tenggara Barat. Lombok
- Baliwang, J., D.H. Barnes, A. Johnston. 2014. Cytokines in Psoriasis. Cytokines 73 (2)
- Baroroh, D., B. 2011. Basic Nursing Departement: Konsep Luka. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- BIO-RAD. 2016. Immunohistochemistry: Tips and Tricks for your IHC-Paraffin Experiments. *Immunohistochemistry* 1-8
- Bratawidjaja, K. dan Rengganis. 2009. *Imunologi Dasar*. Edisi 1. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Briant, A.R., P. D Nix. 2007. Acute and Chronic Wounds Current Management Concepts. 3rd Editon. St Louis. Missouri. Mosby.
- Castejon, G. L and B. David. 2011. Understanding the Mechanism of IL-1β Secretion. Faculty of Life Science. University of Manchester. United Kingdom
- De Jong, W., dan R, Sjamsuhidayat . 2004. Buku Ajar Ilmu Bedah, Edis 2. Jakarta. EGC
- Dewi, S. P. 2010. Perbedaan Efek Pemberian Lendir Bekicot (*Achatini fulica*) dan Gel Bioplacenton Terhadap Penyembuhan Luka Berih Pada Tikus Putih. Univesitas Sebelas Maret. Surakarta
- Effendi, Z. 2003. Peranan Leukosit Sebagai Antiinfamasi Alergik Dalam Tubuh. Fakultas Kedokteran: Universitas Sumatera Utara
- Febram, B., I. Wientarsih dan . Pontjo. 2010. Activity Of Ambon Banana (*Musa Paradisiaa Var. Sapientum*) Stem Extract In Ointment Formulation On The Wound Healing Process Of Mice Skin (*Mus musulus Albinus*). Majalah Obat Tradional 15(3):121-137
- Giraldo, S. IL 1-β (Interleukin 1β). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematology. http://AtlasGenetCytogenetOncol.org/Genes/IL1BID40950ch2q13.html. Diakses pada 26 Februari 2018.
- Hartadi, H. 1993. Tabel Komposisi Pakan Untuk Indonesia. Cetakan III. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Hoffbrand, A. V da J. E. Pettit. 1996. Kapita Selekta: Hematologi (Essentian Haematology) Edisi II. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

- Hunt KT. 2003. Wound Healing. In Current Surgical Diagnosis and Treatment. 12th Ed. Mc Graw-Hill. USA.
- Junqueira, L. C., dan J Caneiro. 1991. Histologi Dasar (Basic Histology) Edisi V. Jakarta. EGC
- Kalangi, S. J. 2013. Histofisiologi Kulit. Bagian Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Sam Ratulangi. Manado
- Kane, D. P dan D. Krasner,. 1997. Chroic Wound Care 2nd Edition. Health Management Publication Inc.
- Komesu, M.C., M.B. Tanga, K.R. Buttros, C. Nakao. 2004. Effect of Acute Diabetes on Rat Cuntaneous Wound Healing. *Elsevier pathophysiology* 11 (2004) 63-67
- Kumar, V., A. K. Abbas dan N. Fausto. 2005. Robbins & Cotran Dasar Patologis Penyakit Edisi Ketujh.Jakarta: EGC.
- Kusumastuti, E. 2014. Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Ekstrak Etanolik Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) Studi *in vivo* Pada Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada. Jogjakarta.
- Kusumadewy, W. 2012. Perbandingan Kadar Interleukn-1β (IL-1β) Dalam Cairan krevikular Gingiva Arterior Mandibula Pasien Pada Tahap Awal Perawatan Ortodonti Menggunakan Braket *Self-Ligating* Pasif Dengan Braket Konvensional *Pre Adjusted* MBT. Fakultas Kedokteran Gigi. Unviersitas Indonesia. Jakarta
- Lostapa, I. W. F dan A. A. Gde Jaya Wardhita. 2016. Kecepatan Kesembuhan Luka Insisi Yang Diberi Amoksisili dan Asam Mefenamat Pada Tikus Putih. Universitas Udayana. Bali
- Malole, M.B.M dan Pramoo, C.S.U. 1989. Pengantar Hewan Hewan Perobaan di Laboratorium Bogor. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Marbun, E. M., M, Restuati. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Buas-Buas (*Premna pubescens Blume*) Sebagai Antiinflamasi Pada Edema Kaki Tikus Putih (*Rattus novergicus*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Medan.
- Mardiana, L. 2012. Daun Ajaib Tumpas Penyakit Kanker, Diabetes, Ginjal, Hepatitis, Kolesterol dan Jantung. Penerbit Penear Swadaya Depok. Jawa Barat.
- Martoatmodjo, S., I, Hamid., Soemartono. 1973. Gamal Pohon Serba Guna. Penerbit Balai Pustaka. Jakarta.
- Mayasari, D., E. D. Purbajanti dan Sutarno. 2012. Kualitas Hijauan Gamal (*Gliriidia sepium*) Yang Diberi Pupuk Organik Cair (POC) Dengan Dosis Berbeda. Universitas Dipnegoro. Semarang.
- Mescher, A. l. 2010. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas. McGraw Hill Medical. New York

- Montgomery, D., S. Kowalsky. 2011. Design and Analysis of Experiment. John Willey an Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2
- Morion, M.J. 2004. Manajemen Luka. Jakarta. EGC
- Mulyanto, K, C., 2007. Pewarnaan Hematoxilin Eosin (HE), Universitas Airlangga. Surabaya.
- Naibaho, O. H., V. Y. Y. Paulina, Y. Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstraj Daun Kemangi (Omicum sanctum L.) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Farmasi UI=NISTRAT 2(2).
- Negara, R. F., R. Ratnawati., dkk. 2014. Pengaruh Perawatan Luka Bakar Derajat II Menggunakan Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Pippr betle Linn*.) Terhadap Ketebalan Jarinan Granulasi Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang
- Nusa, K. C., F. J. Manik, N. Rampengan. 2015. Hubunga Ratio Neutrofil dan Lmfosit pada Penderita Penyakit Infeksi Virs Dengue. Jurnal eClinic 3 (1): 210-216
- Parwinata, I. 2017. Bahan Ajar: Obat Tradisional. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Udayana. Bali
- Patel, H.C., H. Boutin, S.M. and Allan. 2003. Interleukin-1 in The Brain Mechanism of Action in Acute Neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol 992:39-47
- Peterson. 2004. Principle's of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd Editio. London. BC Decker Inc.
- Potter, P.A, Perry. 2005. A.G.Buku Ajar Fundamental Keperawatan: Konsep. Proses dan Praktik Edisi 4. Volume 1. EGC. Jakarta
- Potter, W.P, 2007. Rats and Mice: Introductin and Use in ResearchHealth Sciences Center For Educational Resources Univerity of Washington.
- Ramdhani, N. Fitri., M, Christy., Jane. 2014. Uji Efek Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L*) Terhadap Penyembuhan Luka Insisi Pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Bagian Farmakologi dan Terapi. Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Riansyah, Y., L. Mulqie dan Ratu Choesrina. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* (L.)Lamk) Terhadap Tikus Wistar Jantan. Prodi Farmasi. Fakultas MIPA. Universitas Islam Bandung. Bandng Jawa Barat.
- Rivai, H., P. Eka Nanda danHumairh F. 2014. Pembuatan Dan Karakteristik Ekstrak Kering Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*). Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Singer, A. J dan R. A. F Clarck. 1999 Cuaneous Wound Healing. NEJM 341 (10): 738746

- Smith, O. B and M. F.J. Van Houtert. 1987. The Feeding Value of Gliricidia Sepium. World Animal Review, 62: 57-68
- Subandoo, J dan D. Ariningrum. 2017. Buku pedoman Keterampilan Klinis: Manajemen Luka. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Sudrajat, I. 2006. Perbandingan dan Hubungan Skor Histologi CD8+ dan Rasio Skor Histologi CD4+/CD8+ di Sekitar Luka Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain Pada Penyembuhan Luka Pasca Insisi.Universitas Diponegoro Semarang.
- Suhita, N., 1, W. Sudira., Ida Bagus Oka. 2013. Hitopatologi Ginjal Tikus Putih Akibat Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Peroral. Universitas Udayana. Bali.
- Triyono, B. 2005. Perbedaan Tampilan Kolagen Di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar yang Dieri Infiltrasi Penghlang Nyeri Levobupivakai dan Yang Tidak Diberi Levobupivakain. [M. Bimed Thesis]. Universitas Diponegoro.
- Velnar, T., T. Bailey and V. Smrkolj. 2009. The Wound Healing Process an Overview of Cellular and Molecular Mechanism. J Int Med Res 37(5):1528-42
- Williams, J. W. dan A. Moores. 2009. BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction. London: BSAVA
- Wolfensohn, S., dan M. Lloyd. 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Walfare. 4th Edition. Wiley-Blackwell. West Sussex