



**PENGARUH PEMBERIAN CHITOSAN
TOPIKAL TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT
DALAM PENYEMBUHAN LUKA PASCA
INSISI GINGIVA PADA *RATTUS NOVERGICUS***

**SKRIPSI
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN MEMPEROLEH
GELAR SARJANA**

**OLEH
HEIDY INDAH SARI
NIM : 115070407111002**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN CHITOSAN TOPIKAL
TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DALAM PENYEMBUHAN
LUKA PASCA INSISI GINGIVA PADA *RATTUS
NOVERGICUS***

Oleh :

HEIDY INDAH SARI
115070407111002

Telah diujikan di depan Majelis Penguji pada tanggal 30 Juli 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

drg. Delvi Fitriani, M.kes
NIP. 70120807120018

drg. Diena Fuadiyah, M.si
NIP. 20140586122912001

Malang
Mengetahui

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

drg. Yuliana R. Kumala, Sp.KG
NIP. 198004092008122004

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata didalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh sebagai SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70)

Malang, 31 Juli 2018

Yang menyatakan

Heidy Indah Sari
NIM 115070407111002

ABSTRAK

Heidy Indah Sari, 115070407111002, Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang, 31 Juli 2018, “Pengaruh Pemberian Chitosan Topikal terhadap Jumlah Limfosit dalam Penyembuhan Luka Pasca Insisi Gingiva pada *Rattus Novergicus*”, Pembimbing : (1) drg. Delvi Fitriani, M.kes (2) drg. Diena Fuadiyah, M.si

Insisi gingiva didefinisikan sebagai tindakan pemisahan gingiva atau mukosa dengan permukaan jaringan dibawahnya untuk mendapatkan visibilitas dan akses ke tulang dan permukaan gigi. Chitosan merupakan suatu zat yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan topikal terhadap jumlah limfosit dalam penyembuhan luka pasca insisi gingiva pada *Rattus novergicus*. Tikus dibagi 5 kelompok, kelompok kontrol negatif dan positif, serta 3 kelompok perlakuan (pemberian gel chitosan dengan konsentrasi berbeda). Insisi dilakukan diantara kedua insisivus rahang bawah lalu diberikan perlakuan sesuai kelompok. Tikus dibedah pada hari 7. Limfosit dihitung pada preparat dengan perwarnaan HE, diamati menggunakan mikroskop digital *Olympus* dengan perbesaran 400x. Hasil didapatkan jumlah fibroblas yang berbeda nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$) dengan rerata kelompok kontrol negatif 8,8 kontrol positif 12,6; perlakuan gel chitosan topikal 1,25% 6,2; perlakuan gel chitosan topikal 2,5% 5,4; perlakuan gel chitosan topikal 5% 3,2. Hasil yang dapat diambil dari penelitian ini adalah pemberian gel chitosan berpengaruh terhadap jumlah limfosit dalam proses penyembuhan luka, dengan konsentrasi efektif gel chitosan 5%.

Kata kunci : Insisi, penyembuhan luka, chitosan, limfosit

ABSTRACT

Heidy Indah Sari, 115070407111002, Dentistry Undergraduate Program, Dentistry Faculty of Brawijaya University Malang, 31st July 2018, “The Effect of Topical Chitosan to Lymphocytes cell in Post-incisional Gingiva Healing Process in *Rattus Novergicus*”, Supervisor: (1) drg. Delvi Fitriani, M.kes (2) drg. Diena Fuadiyah, M.si

Gingival incisions are defined as gingival or mucosal separation by the underlying tissue surfaces to gain visibility and access to bone and tooth surfaces. Chitosan is known for its accelerating effect on wound healing. This research is set to observe the effect of topical chitosan on *Rattus novergicus* lymphocytes count at wound healing process post incision. The group divided by 5 groups, which are negative and positive control groups, and 3 treatment groups with chitosan gel addition with different concentration. Incision is executed between the two mandibular incisive and then treated according to the groups. The rats are dissected on day 7. lymphocytes cell is counted on prepareate by HE coloring, observed with *Olympus* digital microscope with 400x magnification. The results shown a significant difference on lymphocytes cell count between treatment groups and positive control group ($p < 0,05$) with averages of negative control group 8,8; positive control group 12,6; treatment group with 1,25% chitosan gel 6,2; treatment group with 2,5 % chitosan gel 5,4; treatment group with 5 % chitosan gel 3,2. This conclude that addition of chitosan gel affect lymphocytes cell count on wound healing process with an effective chitosan gel dose of 5 %.

Keywords : Incision, wound healing, chitosan, lymphocyte

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	iii
ABSTRAK.....	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Akademik.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Insisi.....	5
2.1.1 Insisi Horizontal.....	5
2.1.1.1 Insisi Internal Bevel.....	5
2.1.1.2 Insisi Crevicular.....	5
2.1.1.3 Insisi Interdental.....	6
2.1.2 Insisi Vertikal.....	6
2.2 Fase Penyembuhan Luka	7
2.2.1 Fase Inflamasi.....	8
2.2.2 Fase Proliferasi.....	9
2.2.3 Fase Remodelling atau Maturasi.....	10
2.3 Limfosit	10
2.3.1 Jenis Limfosit	11
2.4 Chitosan	12
2.4.1 Peranan Chitosan	13

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	16
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	19
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	19
4.3 Variabel Penelitian	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	21
4.6 Definisi Operasional	22
4.7 Prosedur Penelitian.....	23
4.8 Analisis Data	28
4.9 Alur Penelitian.....	30
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil Penelitian	31
5.1.1 Hasil Penghitungan Jumlah Limfosit	32
5.2 Analisis Data	33
5.2.1 Uji Normalitas Data	34
5.2.2 Uji Homogenitas	34
5.2.3 Uji <i>Oneway ANOVA</i>	34
5.2.4 Uji Multiple Comparison.....	34
5.2.5 Uji Korelasi Pearson.....	35
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pengaruh Pemberian Chitosan Topikal Terhadap Jumlah Limfosit Pada Penyembuhan Luka Setelah Insisi Gingiva.	36
6.2 Perbedaan Jumlah Limfosit Antar Kelompok	37
6.3 Konsentrasi Chitosan Yang Paling Efektif Dalam PenyembuhanSetelah Insisi	39
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1Kesimpulan.....	41
7.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Mean dan Standar Deviasi Jumlah Limfosit..... 32



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Insisi Horizontal	6
Gambar 2.2	Insisi Vertikal	7
Gambar 2.3	Fase Penyembuhan Luka	7
Gambar 2.4	Proses Pembentukan Chitosan	14
Gambar 4.1	Insisi pada Tikus	23
Gambar 4.2	Kerangka Operasional Penelitian	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Dokumentasi Kegiatan	47
Lampiran 2	<i>Ethical Clearance</i>	49
Lampiran 3	Hasil Uji ANOVA dan <i>Multiple Comparison</i>	50
Lampiran 4	Hasil Uji Korelasi	52

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR SINGKATAN

>	: Lebih dari
<	: Kurang dari
PMN	: Polimorf nukleosit
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TGF- α	: <i>Transforming Growth Factor α</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
TNF- β	: <i>Tumor Necrosis Factor-β</i>
GlcNAc	: <i>N-acetyl-D-glucosamine</i>
GlcN	: <i>D-glucosamine</i>
CaCO ₃	: Kalsium Karbonat

ABSTRAK

Heidy Indah Sari, 115070407111002, Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang, 31 Juli 2018, “Pengaruh Pemberian Chitosan Topikal terhadap Jumlah Limfosit dalam Penyembuhan Luka Pasca Insisi Gingiva pada *Rattus Novergicus*”, Pembimbing : (1) drg. Delvi Fitriani, M.kes (2) drg. Diena Fuadiyah, M.si

Insisi gingiva didefinisikan sebagai tindakan pemisahan gingiva atau mukosa dengan permukaan jaringan dibawahnya untuk mendapatkan visibilitas dan akses ke tulang dan permukaan gigi. Chitosan merupakan suatu zat yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan topikal terhadap jumlah limfosit dalam penyembuhan luka pasca insisi gingiva pada *Rattus novergicus*. Tikus dibagi 5 kelompok, kelompok, kontrol negatif dan positif, serta 3 kelompok perlakuan (pemberian gel chitosan dengan konsentrasi berbeda). Insisi dilakukan diantara kedua insisivus rahang bawah lalu diberikan perlakuan sesuai kelompok. Tikus dibedah pada hari 7. Limfosit dihitung pada preparat dengan perwarnaan HE, diamati menggunakan mikroskop digital *Olympus* dengan perbesaran 400x. Hasil didapatkan jumlah fibroblas yang berbeda nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$) dengan rerata kelompok kontrol negatif 8,8 kontrol positif 12,6; perlakuan gel chitosan topikal 1,25% 6,2; perlakuan gel chitosan topikal 2,5% 5,4; perlakuan gel chitosan topikal 5% 3,2. Hasil yang dapat diambil dari penelitian ini adalah pemberian gel chitosan berpengaruh terhadap jumlah limfosit dalam proses penyembuhan luka, dengan konsentrasi efektif gel chitosan 5%.

Kata kunci : Insisi, penyembuhan luka, chitosan, limfosit

ABSTRACT

Heidy Indah Sari, 115070407111002, Dentistry Undergraduate Program, Dentistry Faculty of Brawijaya University Malang, 31st July 2018, “The Effect of Topical Chitosan to Lymphocytes cell in Post-incisional Gingiva Healing Process in *Rattus Novergicus*”, Supervisor: (1) drg. Delvi Fitriani, M.kes (2) drg. Diena Fuadiyah, M.si

Gingival incisions are defined as gingival or mucosal separation by the underlying tissue surfaces to gain visibility and access to bone and tooth surfaces. Chitosan is known for its accelerating effect on wound healing. This research is set to observe the effect of topical chitosan on *Rattus novergicus* lymphocytes count at wound healing process post incision. The group divided by 5 groups, which are negative and positive control groups, and 3 treatment groups with chitosan gel addition with different concentration. Incision is executed between the two mandibular incisive and then treated according to the groups. The rats are dissected on day 7. lymphocytes cell is counted on prepare by HE coloring, observed with *Olympus* digital microscope with 400x magnification. The results shown a significant difference on lymphocytes cell count between treatment groups and positive control group ($p < 0,05$) with averages of negative control group 8,8; positive control group 12,6; treatment group with 1,25% chitosan gel 6,2; treatment group with 2,5 % chitosan gel 5,4; treatment group with 5 % chitosan gel 3,2. This conclude that addition of chitosan gel affect lymphocytes cell count on wound healing process with an effective chitosan gel dose of 5 %.

Keywords : Incision, wound healing, chitosan, lymphocyte

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit yang sering terjadi dan menimbulkan masalah kesehatan gigi dan mulut. Penyakit periodontal merupakan penyakit dalam rongga mulut yang diderita oleh hampir semua manusia di dunia dan mencapai angka 50% dari jumlah populasi orang dewasa (Newman,2012). Di Indonesia sendiri, prevalensi penyakit periodontal yaitu sebesar 60% (SKRT,2011).

Penyebab penyakit periodontal adalah karena plak dan bukan karena plak. Penyebab penyakit periodontal karena plak yaitu faktor lokal, faktor sistemik, dalam masa pengobatan, malnutrisi. Sedangkan penyebab penyakit periodontal bukan karena plak yaitu bakteri spesifik, virus, jamur, genetik, lesi traumatik, reaksi benda asing (AAP,1999).

Salah satu penyakit periodontal adalah pembesaran gingiva yang terjadi karena adanya plak gigi. Istilah yang digunakan di klinik adalah *gingiva enlargement*. Pembesaran gingiva dapat dirawat dengan *scalling*, bila gingiva tampak lunak dan ada perubahan warna, terutama bila terjadi edema dan infiltrasi seluler, dengan syarat ukuran pembesaran tidak mengganggu pengambilan deposit pada permukaan gigi. Apabila pembesaran gingiva terdiri dari komponen fibrotik yang tidak bisa mengecil setelah dilakukan perawatan skeling atau ukuran pembesaran gingiva menutupi deposit pada permukaan gigi, dan mengganggu akses pengambilan deposit, maka perawatannya adalah pengambilan secara bedah (gingivektomi) (Carranza,2002)

Pada gingivektomi dilakukan Insisi gingiva. Insisi gingiva didefinisikan sebagai tindakan pemisahan gingiva atau mukosa dengan permukaan jaringan dibawahnya untuk mendapatkan visibilitas dan akses ke tulang dan permukaan gigi (Reddy, 2011). Tahapan yang dilakukan dalam insisi gingiva, yaitu dengan insisi horizontal dan vertikal yang dilakukan sepanjang margin gingiva dalam arah mesial dan distal (Carranza,2002).

Penyembuhan luka pasca insisi adalah proses penggantian jaringan yang rusak atau mati oleh jaringan yang baru dan sehat. Proses penyembuhan luka ini dibagi menjadi tiga fase penyembuhan yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi (Kumar *et al*, 2005). Pada fase inflamasi sel-sel inflamasi bermigrasi ke dalam luka (kemotaksis) yang ditandai oleh infiltrasi (secara berurutan) neutrofil, makrofag, dan limfosit. Limfosit berperan penting dalam pembentukan antibodi. Limfosit akan memproduksi antibodi sebagai respon terhadap antigen yang di bawa oleh makrofag (Tizard, 1982), limfosit akan menekan sel radang sehingga dapat membantu dalam proses penyembuhan luka.

Salah satu bahan alami yang populer di dunia medis adalah chitosan. Dalam dunia medis Chitosan digunakan untuk penyembuhan luka (Fernandes,2000). Chitosan merupakan produk turunan dari polimer chitin yaitu produk samping (limbah) dari kulit udang atau rajungan. Chitosan banyak dimanfaatkan dalam dunia pangan, medis, farmasi, dan bioteknologi (Khan,2002). Chitosan adalah polisakarida yang terbentuk dari β -(1 \rightarrow 4)- linked *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) dan *D*-glucosamine (GlcN). *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) merupakan turunan dari glucosamine yang memiliki fungsi sebagai pemercepat penyembuhan luka (Ueno, 2001).

Berdasarkan tinjauan di atas, penulis mengajukan sebuah gagasan penelitian mengenai peran chitosan sebagai penyembuhan luka pasca insisi gingiva dengan melihat limfosit sebagai titik ukur. Diharapkan hasil penelitian ini akan memberikan alternatif pengobatan baru dengan menggunakan chitosan sebagai penyembuhan luka pasca insisi gingiva di masa depan.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian chitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah limfosit setelah insisi gingiva pada *Rattus novergicus*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian chitosan topikal terhadap limfosit setelah insisi gingiva pada *Rattus novergicus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Menghitung perbedaan jumlah limfosit antara kelompok yang diberi perlakuan pemberian gel chitosan topikal dengan konsentrasi sebesar 1,25%, 2,5%, dan 5% dengan yang tidak diberi perlakuan pada hari ke-7.
- b. Menganalisis konsentrasi chitosan yang paling efektif dalam penyembuhan luka pasca insisi pada tikus *Rattus novergicus* pada hari ke-7

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat chitosan dalam bidang kedokteran gigi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat dijadikan sebagai dasar pertimbangan perusahaan industri obat maupun tenaga kesehatan untuk menciptakan suatu alternatif baru dalam penyembuhan luka pasca insisi gingiva.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Insisi

Insisi merupakan bagian dari tindakan yang dilakukan pada pembuatan periodontal flap (Reddy, 2011). Insisi adalah suatu pemotongan yang dibuat pada jaringan (Harty, 1995). Dalam pembuatan flap konvensional, insisi dibagi menjadi dua yaitu insisi horizontal dan insisi vertikal (Reddy, 2011)

2.1.1 Insisi horizontal

Dalam pembuatan flap periodontal, insisi horizontal terbagi menjadi 3 bagian yaitu insisi internal bevel, insisi crevicular dan insisi interdental (Bathla, 2011).

2.1.1.1 Insisi Internal bevel

Insisi internal bevel merupakan insisi pertama dalam pembuatan flap. Insisi dimulai 1-2 mm dari margin gingiva ke arah alveolar crest (Carranza, 2015). Tujuan dari insisi ini adalah untuk menghilangkan epitel yang terbentuk pada dinding poket, mempertahankan permukaan luar gingiva yang sehat dan mendapatkan tepi flap yang tajam serta tipis (Bathla, 2011).

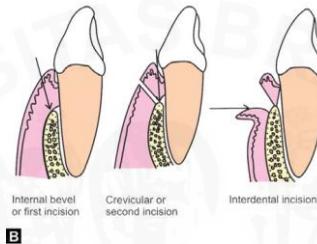
2.1.1.2 Insisi crevicular

Insisi crevicular merupakan insisi kedua dalam pembuatan flap. Insisi dimulai dari dasar poket ke arah margin tulang atau alveolar crest (Carranza, 2015). Insisi ini dilakukan dengan tujuan untuk memfasilitasi pembuangan jaringan inflamasi di daerah servikal gigi. Indikasi insisi crevicular ialah gingiva dan prosesus alveolaris yang tipis, poket periodontal yang dangkal, sebagai sayatan kedua dalam flap periodontal dan untuk mengurangi resesi gingiva pasca operasi untuk alasan estetik pada bagian anterior rahang atas (Bathla, 2011).

2.1.1.3 Insisi interdental

Insisi interdental merupakan insisi ketiga dalam pembuatan flap periodontal. Insisi ini bertujuan untuk menghilangkan krah gingiva yang mengelilingi gigi.

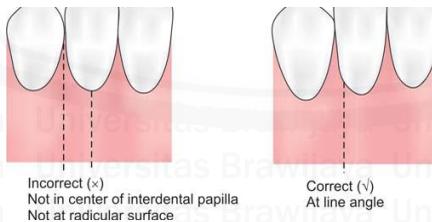
Gambar 2.1 Insisi Horizontal (Reddy, 2011)



2.1.2 Insisi vertikal

Insisi vertikal atau insisi oblik dapat digunakan pada salah satu sisi atau kedua sisi sebagai akhir dari insisi horizontal, bergantung pada desain dan tujuan dari flap (Carranza, 2015). Secara umum, insisi vertikal menghindari daerah lingual dan palatal serta daerah papilla interdental (Reddy, 2011). Desain dari insisi vertikal ini adalah untuk menghindari flap yang pendek dengan sayatan ke arah apical karena akan membahayakan suplai darah ke daerah flap (Carranza, 2015). Instrument yang digunakan untuk insisi vertikal adalah blade nomor 11 atau 15 (Bathla, 2011).

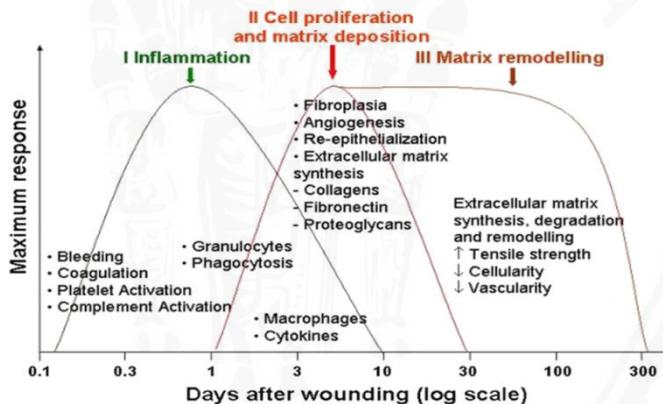
Gambar 2.2 Insisi Vertikal (Bathla, 2011)



2.2 Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka pasca gingivektomi ialah proses penggantian jaringan yang rusak atau mati oleh jaringan yang baru dan sehat. Secara fisiologis, tubuh dapat memperbaiki kerusakan jaringan tersebut sendiri. Penyembuhan luka ini terdiri atas tiga fase, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi atau remodeling. Antara fase yang satu dengan fase lainnya memiliki rentang waktu yang saling bersinggungan atau tumpang tindih (Arisanty, 2014). Pada fase inflamasi ditandai dengan banyaknya sel radang seperti leukosit polimorfonuklear. Setelah tanda-tanda radang mereda, terjadi fase proliferasi yang ditandai dengan epitelisasi, angiogenesis dan proliferasi fibroblas. Fibroblas akan mensintesis kolagen dan kolagen yang berlebihan akan diabsorpsi pada fase maturasi (Kumar *et al*, 2005).

Gambar 2.3 Fase Penyembuhan Luka



2.2.1 Fase Inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada awal kejadian atau saat luka terjadi hingga hari ke-3 atau ke-5. Pada fase ini terjadi dua kegiatan utama, yaitu respon vaskular dan respon inflamasi. Respon vaskular diawali dengan respon hemostatik tubuh selama 5 detik pasca luka. Sekitar jaringan yang luka mengalami iskemia yang merangsang pelepasan histamine dan zat vasoaktif yang menyebabkan

vasodilatasi, pelepasan trombosit, reaksi vasodilatasi dan vasokonstriksi, dan pembentukan lapisan fibrin. Lapisan fibrin ini akan membentuk scab atau keropeng di atas permukaan luka untuk melindungi luka dari kuman (Arisanty, 2014).

Respon inflamasi merupakan reaksi non spesifik tubuh dalam mempertahankan atau memberi perlindungan terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Respon ini diawali dari semakin banyaknya aliran darah ke sekitar luka yang menyebabkan bengkak, kemerahan, hangat atau demam, nyeri dan penurunan fungsi tubuh (Arisanty, 2014). Pada proses ini, yang pertama kali bekerja adalah neutrofil atau polimorfonukleosit (PMN). Respon inflamasi menyebabkan pembuluh darah mengalami kebocoran plasma dengan melepaskan PMN ke dalam jaringan sekitar luka. Neutrofil memfagositosis debris dan mikroorganisme serta memberikan garis pertahanan pertama terhadap infeksi. Neutrofil dibantu oleh sel mast lokal. Fibrin kemudian dipecah menjadi bagian produk degradasi dan menarik sel berikutnya yang terlibat (Suriadi, 2015). Peran limfosit adalah melepaskan limfokin yang sangat berpengaruh pada proses inflamasi. Limfokin mempengaruhi agregasi dan kemotaksis makrofag dalam proses penyembuhan luka. Fase inflamasi berakhir ditandai dengan menurunnya jumlah sel inflamasi kemudian dilanjutkan fase proliferasi dan remodeling

Tugas rekonstruksi merupakan proses yang kompleks dan membutuhkan sel-sel tertentu untuk mengarahkan proses ini. Sel yang bertindak sebagai kontraktor dalam penyembuhan luka adalah makrofag. Makrofag dapat memfagositosis bakteri dan memberi garis pertahanan kedua. Makrofag juga mengeluarkan berbagai kemotaktik komplemen dan faktor pertumbuhan seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β) dan *interleukin-1* (IL-1) untuk mengarahkan ke tahap berikutnya (Suriadi, 2015).

2.2.2 Fase Proliferasi

Fase proliferasi dimulai pada hari ke-2 sampai hari ke-24 yang terdiri dari proses destruktif (fase pembersihan), proses proliferasi atau granulasi (pelepasan sel-sel baru), dan epitelisasi. Pada fase destruktif, sel polimorf dan makrofag membunuh bakteri jahat dan terjadi proses debris atau pembersihan luka. Setelah

pembersihan dari debris, sel-sel lain bergerak dibawah arahan kontraktor untuk membangun kerangka jaringan baru. Sel tersebut adalah fibroblas yang mengeluarkan kerangka kolagen untuk regenerasi kulit lebih lanjut. Proses ini disebut juga proses granulasi, yaitu proses tumbuhnya sel-sel yang baru. Epitelisasi terjadi setelah tumbuh jaringan granulasi dan dimulai dari tepi luka yang mengalami proses migrasi membentuk lapisan tipis (warna merah muda) menutupi luka. Sel pada lapisan ini sangat rentan dan mudah rusak. Pada tahapan epitelisasi, sel akan mengalami kontraksi atau pergeseran hingga tepi luka menyatu dan ukuran luka mengecil (Arisanty, 2014).

Fase proliferasi ini terkadang juga disebut sebagai fase fibroplasia karena pada fase ini peran fibroblas sangat menonjol. Pada fase ini, fibroblas mengalami proliferasi dan mensintesis kolagen (Perdanakusma, 2007). Fibroblas muncul pertama kali secara bermakna pada hari ke-3 dan mencapai puncaknya pada hari ke-7. Faktor faktor yang mempengaruhi proliferasi dari fibroblas ini adalah *fibroblast growth factor 2* (FGF-2), *transforming growth factor- β* (TGF- β) dan *tumor necrosis factor- β* (TNF- β) (Peterson, 2004)

2.2.3 Fase Remodeling atau Pematangan

Setelah minggu ketiga, luka mengalami perubahan konstan, yang dikenal sebagai renovasi, yang dapat bertahan selama bertahun-tahun setelah cedera awal terjadi. Kolagen terdegradasi dan disimpan dalam mode ekuilibrium, sehingga tidak ada perubahan jumlah kolagen dalam luka. Deposisi kolagen dalam penyembuhan luka normal mencapai puncaknya pada minggu ketiga setelah luka. Kontraksi luka adalah proses yang berkelanjutan bagian dari proliferasi fibroblas khusus disebut myofibroblas, yang menyerupai sel-sel otot kontraktile halus. Kontraksi luka terjadi pada tingkat yang lebih besar dengan penyembuhan sekunder daripada penyembuhan primer. Kekuatan kontraksi maksimal luka dicapai pada minggu ke-12, dengan kemungkinan luka hanya memiliki 80% dari kekuatan tarik kulit asli yang telah tergantikan (Mercandetti *et al*, 2015).

2.3 Limfosit

Limfosit merupakan suatu famili sel yang berbentuk sferis dengan karakteristik morfologi yang sama. Limfosit dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok berdasarkan molekul-molekul permukaan yang mencolok (penanda), yang dapat dikenali dengan metode imunositokimia. Limfosit juga memiliki berbagai peran fungsional, dan semuanya berhubungan dengan reaksi imun dalam pertahanan terhadap serangan mikroorganisme, makro molekul asing, dan sel-sel kanker (Junqueira, et al., 2007). Limfosit merupakan sel utama pada sistem getah bening, memiliki ukuran yang relatif lebih kecil daripada makrofag dan neutrofil. Neutrofil memiliki umur tidak lebih dari 7-10 hari (Ibad, 2008). Limfosit memiliki rentang usia sekitar 100-300 hari. Selama periode ini, sebagian besar dari sel-sel ini secara kontinu beredar diantara jaringan limfoid, limfe, dan darah dengan menghabiskan waktu beberapa jam saja didalam darah. Dengan demikian, hanya sebagian kecil limfosit total yang transit di darah setiap waktu tertentu (Sherwood, 2001). Limfosit merupakan sel-sel bulat didalam darah manusia mempunyai diameter yang bervariasi antara 6 sampai 8 μm , walaupun beberapa diantaranya mungkin lebih besar. Kebanyakan hanya lebih besar sedikit dibandingkan eritrosit. Jumlah limfosit adalah 20 sampai 35 persen dari leukosit darah normal. Pada jaringan ikat, limfosit merupakan sel yang paling kecil diantara sel bebas, kebanyakan berukuran hanya 7 sampai 8 μm . Mereka memiliki inti bulat, gelap yang hampir memenuhi seluruh sel. Disekitar inti terdapat sedikit sitoplasma homogen yang basofil (Leeson et al., 1996). Limfosit biasanya tidak banyak terdapat dalam jaringan ikat, tetapi banyak pada jaringan ikat dibawah epitel pembatas saluran cerna dan saluran napas. Kebanyakan limfosit dalam jaringan ikat longgar diduga berasal dari sirkulasi darah. Pada biakan jaringan, limfosit terbentuk didalam jaringan ikat dan menetap disana. Tetapi sel-sel setiap waktu dapat masuk-keluar sirkulasi (Leeson et al., 1996).

2.3.1 Jenis Limfosit

Menurut Fawcet (2002) berdasarkan diameter dan jumlah relatif sitoplasmanya limfosit dibagi menjadi tiga, yaitu:

2.3.1.1 Limfosit kecil

Limfosit kecil mendominasi dalam darah, memiliki inti sferis yang mana terlihat lekukan kecil pada salah satu intinya yang bulat, kromatinnya padat dan tampak sebagai gumpalan kasar, sehingga inti lebih terlihat gelap pada sajian biasa. Sitoplasmanya sangat sedikit dan pada hapusan darah tampak sebagai tepian tipis disekitar inti. Limfosit hidup bersifat motil dan dapat menyusup diantara sel-sel endotel pembuluh darah. Mereka juga mampu bermigrasi melalui epitel basal lainnya (Junqueira, 2007). Berdasar sifat fungsionalnya limfosit kecil digolongkan dalam dua kelompok besar yaitu :

a) Limfosit T

Limfosit-T timbul dari dalam sel induk sumsum tulang yang bermigrasi di timus. Kemudian berdiferensiasi menjadi sel T dewasa dan meninggalkan timus. Sel T matur ikut aliran darah dan aliran limfe torakal dan juga berada di jaringan limfoid perifer. Sel T ini mengarahkan beragam unsur imunitas selular juga penting untuk menginduksi imunitas humoral yang berasal dari sel B terhadap antigen. Sel T berjumlah 60%-70% dari limfosit dalam sirkulasi darah dan juga merupakan tipe limfosit utama dalam selaput periarteriol limpa (Robbins, 2007). Limfosit T bertanggung jawab dalam pembentukan limfosit teraktivasi yang dapat membentuk imunitas diperantai sel. Ketika terpapar antigen yang sesuai, limfosit T akan berproliferasi dan melepaskan banyak sel T yang teraktivasi, yang kemudian akan masuk kedalam sirkulasi dan disebarkan keseluruh tubuh, melewati dinding kapiler masuk kedalam cairan limfe dan darah, dan bersirkulasi keseluruh tubuh demikian seterusnya, kadang-kadang berlangsung sampai berbulan-bulan atau bahkan bertahun-tahun (Guyton, 2008). Respon sel T terhadap antigen sangat bersifat spesifik, sama seperti respon antibodi sel B. Pada kenyataannya respon imun adaptif membutuhkan 22 22 bantuan sel T untuk memulainya dan sel T berperan penting untuk membantu melenyapkan patogen yang masuk. Ada tiga kelompok utama dari sel T yaitu sel T pembantu, sel T sitotoksik dan sel T supressor (Guyton, 2008).

b) Limfosit B

Limfosit b merupakan kelompok limfosit yang bertanggung jawab dalam pembentukan antibodi yang memberikan imunitas humoral. Limfosit B ini mula-mula diolah lebih dahulu dalam hati selama masa pertengahan kehidupan janin dan sesudah dilahirkan. Kemudian sel ini bermigrasi ke jaringan limfoid diseluruh tubuh dimana mereka menempati daerah yang sedikit lebih kecil daripada limfosit-T (Guyton, 2008). Menurut Leeson et al (1996), limfosit ini bertugas untuk memproduksi antibodi (humoral antibody response) yang beredar dalam peredaran darah dan mengikat secara khusus dengan antigen asing yang menyebabkan terbentuknya antigen asing terikat antibodi (Antibody-Coated Foreign Antigen). Kompleks ini mempertinggi kemampuan fagositosis dan penghancuran oleh sel pembunuh ("Nature Killer cell atau NK cell") dari organisme yang menyerang. Jumlah limfosit B dalam total limfosit normal pada manusia adalah sekitar 15 %. Nilai limfosit B mendapat rangsangan yang sesuai, akan membelah diri beberapa kali dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dalam jaringan dan menghasilkan immunoglobulin (Junqueira, 2007).

2.3.1.2 Limfosit Sedang

Menurut Bajpai (1989) limfosit sedang mempunyai ukuran 10-12 μm , dengan inti besar, eukariotik, sitoplasma lebih banyak dan mengandung retikulum endoplasma. 3. Limfosit besar Limfosit besar memiliki inti yang sedikit lebih besar dari limfosit kecil. Intinya bulat atau bengkok kecil pada salah satu sisinya. Pada mulanya sangat sulit membedakan limfosit besar dan monosit yang sepintas agak mirip. Namun pada 23 23 umumnya limfosit besar pada umumnya lebih sedikit kecil dari monosit dan jumlah sitoplasmanya tidak sebanyak pada monosit, dan meskipun intinya mungkin berlekuk kecil, tidak pernah berbentuk ginjal seperti pada monosit. Dilain pihak, bila dibandingkan dengan limfosit kecil, limfosit besar memiliki lebih banyak sitoplasma dan tingkat basofilia sitoplasma yang seimbang (Junqueira et al., 2007). Hammersen (1993) membagi limfosit menjadi dua yaitu limfosit magnus dan parvus berdasarkan gambaran histologisnya. Limfosit magnus mempunyai sitoplasma

lebih tebal, lebih banyak mengandung sitoplasma pucat dan mempunyai granula azurofilik lebih besar daripada limfosit parvus.

Limfosit merupakan sel inflamasi kronis dengan inti besar dan bulat serta memiliki sedikit sitoplasma. Limfosit berperan dalam respon imun spesifik, baik respon humoral yang dilaksanakan oleh limfosit B. maupun seluler yang dilakukan oleh limfosit T. Peran limfosit adalah melepaskan limfokin yang sangat berpengaruh pada proses inflamasi. Limfokin mempengaruhi agregasi dan kemotaksis makrofag dalam proses penyembuhan luka. Fase inflamasi berakhir ditandai dengan menurunnya jumlah sel inflamasi kemudian dilanjutkan fase proliferasi dan remodeling.

2.4 Chitosan

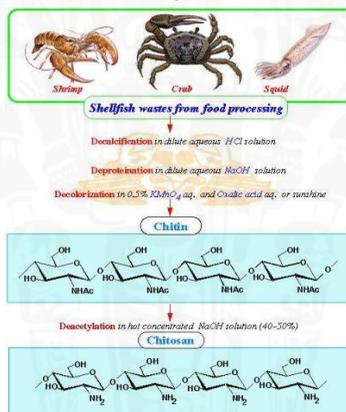
Chitosan pertama kali ditemukan pada 1811 oleh Henri Braconnot, seorang ahli kimia dan farmasi dari Prancis. Braconnot melihat bahwa substansi tertentu (chitin) yang ditemukan pada jamur tidak dapat larut pada asam sulfur (Dai *et al*, 2011). Chitosan adalah produk dari chitin dan salah satu dari polisakarida yang melimpah di alam. Disamping diketahui sebagai biopolimer, chitosan juga memiliki berat molekul yang tinggi dan merupakan komponen utama dari serangga dan krustasea. Chitosan adalah material yang sesuai untuk penyembuhan luka dikarenakan chitosan memiliki hemostatik yang baik dan memiliki efek analgesik (Gomathysankar, 2014).

Chitin adalah biopolimer yang paling melimpah (Rinaudo, 2006) dan biasa ditemukan pada invertebrata seperti krustasea atau kulit serangga, dan dapat juga ditemukan pada dinding sel alga hijau, dan ragi. Dalam skala industri, dua sumber utama dari chitosan adalah krustasea dan jamur *mycelia*; sumber hewani dapat berkurang karena bukan pada musimnya, stok menjadi terbatas, dan faktor tidak tetap dari ketersediaan produk dapat diantisipasi dengan penggunaan bahan lain yang memiliki karakteristik fisikokimia yang sama (Aranaz *et al*, 2009).

Chitosan merupakan produk alamiah yang merupakan turunan dari polisakarida chitin. Chitosan adalah polisakarida yang terbentuk dari β -(1 \rightarrow 4)- linked *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) dan *D*-glucosamine (GlcN). *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) merupakan turunan dari glucosamine yang memiliki fungsi sebagai pemercepat penyembuhan luka (Ueno *et al*, 2001). Bentuk chitosan

adalah padatan amorf berwarna putih dengan struktur kristal tetap dari bentuk awal chitin murni. Dalam cangkang crustasea, chitin terdapat sebagai mukopolisakarida yang berikatan dengan garam-garam anorganik, terutama kalsium karbonat (CaCO_3), protein dan lipida termasuk pigmen-pigmen. Oleh karena itu, untuk memperoleh chitin dari cangkang krustasea melibatkan proses pemisahan protein (deproteinasi) dan pemisahan mineral (demineralisasi). Sedangkan untuk mendapatkan chitosan dilanjutkan dengan proses deasetilasi. Saat derajat deasetilasi chitin mencapai 50% (bergantung kepada asal polimer), chitin menjadi larut dalam media asam cair dan dapat disebut chitosan (Rinaudo, 2006). Chitosan dapat dimanfaatkan di berbagai bidang seperti pada bidang biomedik, pangan, bioteknologi, pertanian, kosmetik dan lain sebagainya (Aranaz *et al*, 2009).

Gambar 2.4 Proses pembentukan chitosan



2.4.1 Peran Chitosan dalam Penyembuhan Luka

Fase awal penyembuhan luka ialah fase inflamasi. Pada fase ini terjadi masuknya neutrofil, makrofag, dan limfosit ke daerah luka. Neutrofil merupakan sel yang pertama menuju daerah luka, mencapai secara massal dalam 24 jam pertama. Neutrofil segera diikuti oleh makrofag yang dimana akan terpicat oleh apoptosis neutrofil (Gantwerker dan Hom, 2012). Mekanisme peradangan menghasilkan respon yang menetralisasi dan mengeliminasi antigen seperti bakteri, benda asing atau sel mati. Peran limfosit adalah melepaskan limfokin yang sangat berpengaruh pada proses inflamasi.

Limfokin mempengaruhi agregasi dan kemotaksis makrofag dalam proses penyembuhan luka. Fase inflamasi berakhir ditandai dengan menurunnya jumlah sel inflamasi kemudian dilanjutkan fase proliferasi dan remodeling

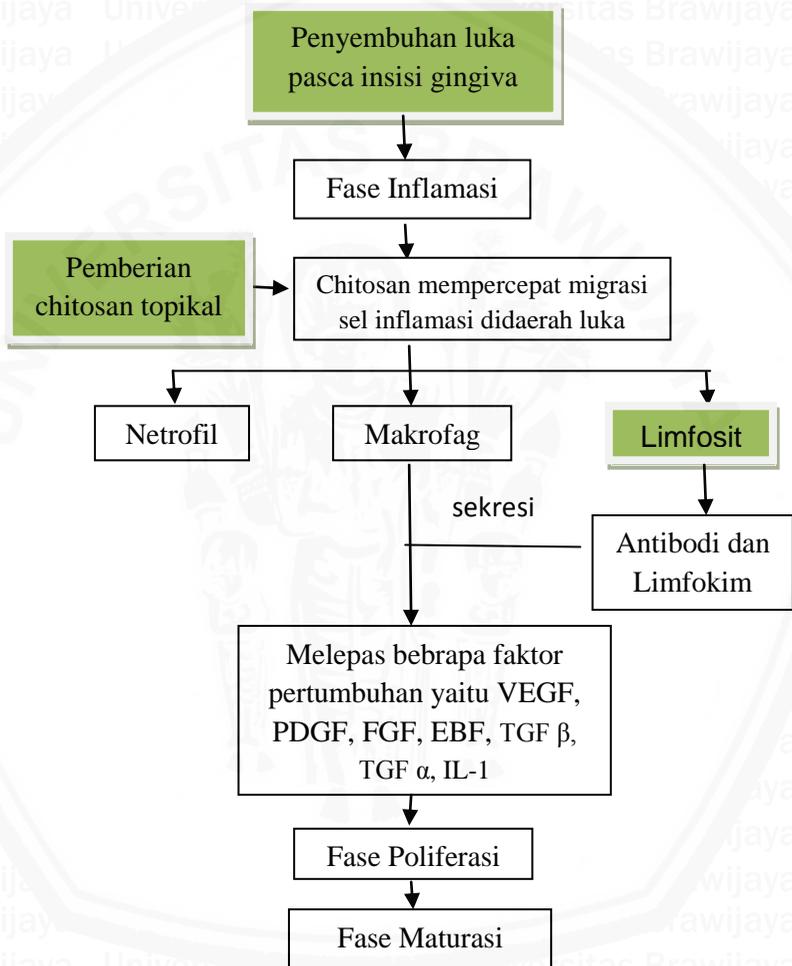
Selanjutnya adalah fase proliferasi dimana terjadi pembentukan jaringan granulasi yang diperankan oleh fibroblas. Pada fase ini terjadi pengkerutan luka dan epitelialisasi hingga menutup seluruh permukaan luka yang berlangsung selama 4 hari - 4 minggu (Kumar *et al.*, 2005). Pada minggu pertama fibroblas dihasilkan oleh derivat makrofag yaitu sitokin TGF- β 1, PDGF dan *fibroblast growth factor* (FGF) untuk memproliferasi dan mensintesa glikosaminoglikan, proteoglikan dan kolagen yang berfungsi untuk merekonstruksi jaringan.

Menurut Sezer *et all* (2007), epitel yang lebih tipis memiliki proses penyembuhan luka yang lebih baik. Peningkatan ketebalan epitel mencapai puncaknya di hari ke-14 disebabkan oleh fibroblas yang banyak bermigrasi pada area luka khususnya di hari ke 7-14 dan perlekatan antara kolagen- fibroblas di tepi epitel luka. Proses tersebut menyebabkan epitel semakin menebal agar lebih kuat dalam mengkerutkan dan menutup luka bersama-sama dengan fibroblas-kolagen. Fibroblas mulai meninggalkan area luka bersamaan dengan proses reepitelisasi yang terbentuk sempurna dan aktivasi kolagen yang memulai fase maturasi.

Hewan percobaan yang diberi chitosan memiliki resolusi neovaskularisasi yang lebih memadai, induksi fibroblas yang lebih cepat, dan serat kolagen yang lebih banyak (Chiba *et al*, 2006).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS



Keterangan : = tidak diteliti = diteliti

Tindakan insisi akan diikuti oleh fase awal penyembuhan luka yaitu fase inflamasi. Pada fase inflamasi, tubuh mengalami aktifitas bioselular dan biokimia, yaitu reaksi tubuh memperbaiki kerusakan kulit, sel darah putih memberikan perlindungan dari infeksi dan pembersihan benda asing yang menempel pada luka. Terdapat tiga sel inflamasi yang bermigrasi ke daerah luka yaitu neutrofil, makrofag dan limfosit. Limfosit merupakan sel yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Jumlah limfosit meningkat pada inflamasi kronis, karena limfosit bermigrasi ke daerah luka. Peran limfosit pada inflamasi kronis adalah sebagai respon hormonal dan seluler. Limfosit mengikat antigen, lalu akan teraktivasi dan mengeluarkan limfokin. Limfokin berperan dalam stimulasi dan aktivasi makrofag dalam melakukan fagositosis. Makrofag bertugas untuk memfagosit jejas dan sel PMN yang sudah mengalami apoptosis. Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan sitokin, yaitu IL-1 dan TNF yang akan mengaktivasi limfosit. Limfosit dan makrofag saling merangsang satu sama lain secara persisten untuk mampu menghilangkan agen antigen pemicu dan sel fibroblas telah membentuk jaringan yang kuat.

Makrofag berfungsi untuk membersihkan benda asing dari daerah luka. Selanjutnya makrofag akan mengeluarkan beberapa faktor pertumbuhan yaitu *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor β* (*TGF β*) dan *transforming growth factor α* (*TGF α*). Faktor faktor pertumbuhan ini berfungsi untuk menstimulasi migrasi dan proliferasi dari fibroblas. Setelah fase inflamasi akan dilanjutkan dengan fase proliferasi. Pada fase proliferasi, sel endotel akan membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) dengan bantuan protein VEGF, FGF, dan TSP-1. Pembentukan pembuluh darah baru dan jaringan granulasi merupakan tanda penting fase proliferasi karena jika tidak ada pembuluh darah baru atau jaringan granulasi merupakan tanda dari penyembuhan luka. Selanjutnya fibroblas akan terinduksi menjadi kolagen. Kolagen yang dihasilkan berfungsi untuk merekonstruksi jaringan. Fase terakhir ialah maturasi, pada fase ini terjadi remodelling unsur parenkim untuk mengembalikan fungsi jaringan dan remodeling unsur jaringan ikat untuk

memperoleh ketahanan jaringan yang lebih kuat dan yang terakhir ialah penyembuhan luka.

Chitosan merupakan polisakarida yang terbentuk dari β -(1 \rightarrow 4)-linked GlcNAc dan D-glucosamine (GlcN). Bagian dari chitosan yaitu GlcNAc berfungsi sebagai pemercepat penyembuhan luka. Pada proses penyembuhan luka dengan chitosan, mempercepat proses migrasi limfosit dengan ditandainya aktivasi makrofag. Oleh karena itu, pemberian chitosan secara topikal dapat mempercepat fase penyembuhan pasca insisi.

3.2 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian gel chitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah limfosit setelah insisi gingiva pada tikus Wistar.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*), dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Post Test Only Control Group Design*.

4.2 Sampel

Sampel penelitian adalah tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih dengan sekam yang diganti setiap hari. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

1. Jenis kelamin jantan.
2. Usia 6 - 8 minggu.
3. Berat badan 150 - 200 gram.
4. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi:

1. Tikus yang pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Penghitungan jumlah sampel didapatkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 p(n-1) &> 15 \\
 5(n-1) &> 15 \\
 5n-5 &> 15 \\
 5n &> 15 + 5 \\
 5n &> 20 \\
 n &> 4
 \end{aligned}$$

Keterangan: p = perlakuan

n = jumlah sampel tiap perlakuan

Jumlah sampel pada tiap perlakuan ialah 4 tikus dan 1 cadangan dengan total 5 perlakuan, sehingga total tikus yang digunakan ialah 25 tikus *Rattus norvegicus*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah salep chitosan dengan yang diberikan secara topikal yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok kontrol positif (KP) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah tanpa gel chitosan.
2. Kelompok kontrol negatif (KN) : Tikus tanpa perlakuan apapun.
3. Kelompok perlakuan I (P1) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 1,25%.
4. Kelompok perlakuan II (P2) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 2,5%.
5. Kelompok perlakuan III (P3) : Tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah dengan dosis gel 5%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah jumlah limfosit pada gingiva rahang bawah regio anterior tikus *Rattus norvegicus*.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol terdiri dari nutrisi makanan dan minuman hewan coba, kebersihan kandang, serta umur dan jenis hewan coba.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam jangka waktu ± 3 bulan, mulai Februari hingga April 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Adaptasi Tikus

Alat yang digunakan untuk adaptasi tikus adalah bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari kawat, botol air, dan neraca Sartorius untuk penimbangan berat badan tikus. Bahan yang dibutuhkan adalah sekam dan air.

4.5.2 Pembuatan Pakan Tikus

Untuk membuat pakan tikus digunakan timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan dan nampan. Bahan yang digunakan ialah PAR-S, terigu dan air.

4.5.3 Pembuatan Gel Chitosan

Untuk pembuatan gel chitosan topikal digunakan alat sentrifugasi dan timbangan. Bahan yang digunakan ialah bubuk chitosan dan gel gliserol fosfat.

4.5.4 Prosedur Insisi

Alat yang dibutuhkan dalam tindakan insisi adalah pinset, blade, blade holder dan periodontal probe. Bahan yang dibutuhkan adalah syringe, handscoon, masker, kentamine 0,2 ml, tampon dan alkhohol 70%.

4.5.5 Pembedahan Tikus

Alat yang dibutuhkan untuk pengorbanan dan pembedahan tikus adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul dan toples. Bahan yang dibutuhkan ialah kapas, kloroform 20 ml, formalin 100% 200ml, alkhohol, kapas dan tabung organ 20 buah.

4.5.6 Pembuatan Sediaan

Alat yang digunakan untuk pembuatan sediaan adalah mikrotom, *beaker glass* 250 ml, kuas, *obyek glass*, inkubator, hot plate 38-40°C, wadah, rak untuk pewarnaan, pipet dan *cover glass*. Bahan pembuatan sediaan yang digunakan ialah *xylol*, *hematoksilin*,

eosin, alkohol absolut, alkohol 90 %, alkohol 80 %, HCl 0,6%, *lithium carbonat* 0,5%, dan *entellan/canada* balsem.

4.5.7 Persiapan Analisis Histologi (Penghitungan Sel Limfosit)

Alat yang dibutuhkan untuk analisis histologi adalah preparat, *slide glass*, mikroskop cahaya (Olympus tipe BH-2, Olympus corp. Jepang), dan kamera digital untuk foto histologi.

4.6 Definisi Operasional

1. Chitosan

Serbuk chitosan diperoleh dari Swedish Chemical Agency, Swedia dan dibuat dalam bentuk gel. Pembuatan gel chitosan dilakukan dengan menformulasikan chitosan dengan gel pada konsentrasi 1,25%, 2,5% dan 5% kemudian dicampur sampai homogen. Gel chitosan topikal kemudian dioleskan pada bagian anterior gingiva yang telah di gingivektomi \pm 0,1 cc menggunakan spatula.

2. Jumlah Limfosit

Jumlah Limfosit merupakan penghitungan jumlah sel Limfosit yang tampak pada daerah luka pasca insisi. Jumlah sel Limfosit dihitung per 5 lapang pandang pada preparat sampel gingiva tikus dan diidentifikasi dalam pewarnaan HE

3. Insisi

Insisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan membuat sayatan pada gingiva tikus *Rattus norvegicus* sepanjang 2,5 mm dengan arah vertikal dari margin gingiva tikus ke arah apikal dan ketebalan 0,5 mm.

Gambar 4.1 Insisi pada tikus



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cara memperoleh Chitosan

Serbuk chitosan murni yang diperoleh dari Swedish Chemical Agent, Swedia

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Gel Chitosan

Gel chitosan topikal dibuat dengan cara melakukan sentrifugasi sekaligus pemanasan antara 10 ml gel dengan 1,25 gram, 2,5 gram, dan 5 gram bubuk chitosan. Gel yang digunakan terbuat dari gliserol fosfat. Gel dan bubuk chitosan tersebut dicampur sampai homogen. Dari percampuran gel dan bubuk chitosan tadi dihasilkan gel chitosan dengan konsentrasi 1,25%, 2,5% dan 5%. Perbedaan konsentrasi diambil untuk mengetahui perbedaan efek chitosan terhadap angiogenesis apabila konsentrasi yang diberikan berbeda. Konsentrasi ini diambil berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Fitri dan Sri (2013). Gel chitosan topikal kemudian dioleskan pada bagian anterior gingiva rahang bawah yang telah di insisi dengan volume $\pm 0,1$ cc.

4.7.3 Perawatan dan Pembuatan Makanan Tikus

Perawatan tikus menggunakan bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam dan penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

Pembuatan ransum makanan menggunakan timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan, sedangkan bahannya adalah PAR-S, terigu, air.

4.7.4 Tindakan Insisi

Insisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan membuat sayatan sepanjang 2,5 mm secara vertikal dari margin gingiva ke arah apikal gigi insisivus tikus pada rahang bawah. Dilakukan insisi gingiva dari margin gingiva ke arah apikal gigi insisivus rahang bawah tikus dengan menggunakan insersi blade skalpel menyudut sebesar 45° dengan permukaan gigi sedalam $\pm 0,5$ mm. Setelah dilakukan insisi luka tidak diberi obat tetapi akan diaplikasikan gel chitosan topikal sebagai akselerator penyembuhan

luka. Pada masing masing kelompok sampel diberi perlakuan yang berbeda. Kelompok sampel 1 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 1,25%. Kelompok sampel 2 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 2,5 % dan kelompok sampel 3 diberikan gel chitosan topikal dengan dosis 5%.

4.7.5 Pemberian Gel Chitosan Topikal Pada Kelompok Perlakuan

Pemberian gel chitosan topikal kepada kelompok perlakuan dilakukan sebanyak satu kali pasca insisi, dengan cara mengoleskan gel chitosan pada daerah luka insisi sebanyak $\pm 0,1$ cc menggunakan spatula setelah insisi selesai dilakukan (setelah kontrol pendarahan). Pada kelompok perlakuan I diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 1,25%, kelompok perlakuan II diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 2,5% dan kelompok perlakuan III diberikan gel chitosan dengan konsentrasi 5%.

4.7.6 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus *Rattus norvegicus* dilakukan pada hari ke 7 setelah perlakuan. Tikus diletakkan dalam sebuah wadah tertutup berisi kassa yang sudah direndam ether. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dipastikan benar-benar mati. Setelah tikus mati, dilakukan pembedahan pengambilan bagian mandibula tikus. Mandibula tikus diambil dan dimasukkan kedalam tabung organ yang sudah diisi dengan formalin 10%. Jasad tikus dikubur ke dalam tanah.

4.7.7 Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi Gingiva

Pertama merendam Jaringan dengan Larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%. Biasanya dilakukan dengan cara merendam jaringan di dalam zat-zat kimia yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Bahan pengawet yang rutin digunakan adalah larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10% dengan pH berkisar antara 6.5 - 7.5.

pH ideal adalah 7.0 Untuk membuat 1 liter BNF 10% yaitu dengan menimbang garam $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 4,0 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 6,5 gram larutkan dengan akuades 1 liter kemudian tambahkan 100 ml formaldehyde (37%-40%). Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1 : 10, sedangkan lamanya fiksasi minimal 2 hari.

Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan fiksatif matang, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus .

Keranjang yang di dalamnya berisi jaringan organ, dimasukkan ke dalam mesin pemroses otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut : ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), ethanol 90 % (2 jam), ethanol absolut (2 jam), ethanol absolute (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya.

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur (59 - 60°C) di vakum selama 30 menit. Keranjang diangkat *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair.

Cetakan dari bahan *stainless steel* dihangatkan di atas api bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara ditempat lain telah disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan.

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3 – 4 pm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas

permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi ewith, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

Timbang serbuk hematoksilin 1 gram, potasium aluminium sulfat sebanyak 50 gram dan sodium iodate sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam 1 liter akuades menggunakan alat pengaduk dengan sedikit dipanaskan, kemudian disimpan satu malam dalam temperatur ruangan. Keesokkan harinya larutan tersebut ditambahkan asam sitrat sebanyak 50 gram dan chloral hydrate sebanyak 50 gram. Larutan dipanaskan dan diaduk selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Larutan akan stabil selama 1- 2 tahun dalam botol berwarna gelap pada temperatur ruangan.

Timbang serbuk eosin sebanyak 7,5 gram, eritrosin sebanyak 7,5 gram dan kalsium klorida sebanyak 2,5 gram dilarutkan dalam akuades 1 liter kemudian disaring. Larutan akan stabil selama 6 - 12 bulan dalam botol gelap pada temperatur ruangan. Lithium karbonat sebanyak 1,5 gram dilarutkan dengan akuades 1 liter dan diaduk hingga homogen.

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan xylol 3 menit, xylol 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol absolut 3 menit, ethanol 90% 3 menit, ethanol 80% 3 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan hematoksilin 6-7 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan pembiru 1 menit, air keran 1 menit, larutan eosin 1 - 5 menit, bilas dengan air keran 1 menit, ethanol 80 % 10 celupan, ethanol 90 % 10 celupan, ethanol absolut 10 celupan, ethanol absolute 1 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit.

Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop (Mohamad, 2001).

4.7.8 Penghitungan Jumlah Limfosit pada Gingiva

Pengamatan jumlah limfosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop digital Olympus dengan

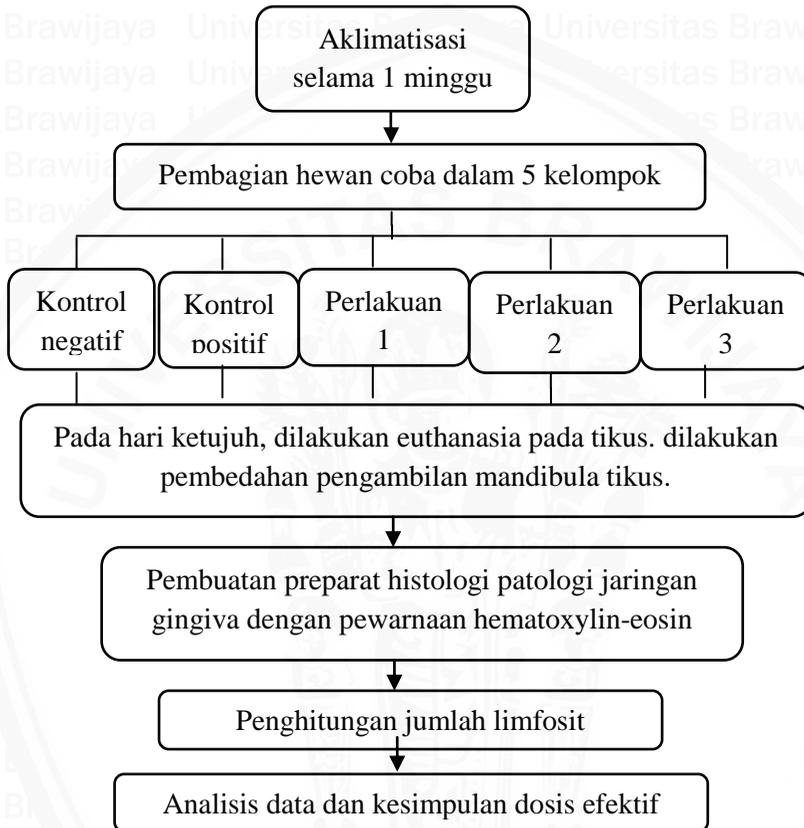
pembesaran 400 kali dan kemudian dibuat foto preparat. Sampel pada sediaan dibagi menjadi lima lapang pandang dan jumlah limfosit dihitung di tiap lapang pandang.

4.8 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan yang bermakna pada pengamatan setiap variabel berdasarkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol maka data yang normal dan varian homogen dianalisis dengan menggunakan uji *one way Anova*. Jika salah satu data tidak normal atau varian tidak homogen atau keduanya, menggunakan uji Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antar variabel menggunakan uji korelasi-regresi. Uji korelasi Pearson digunakan jika data berdistribusi normal dan jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji korelasi Spearman

4.9 Alur Penelitian

Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian



BAB V

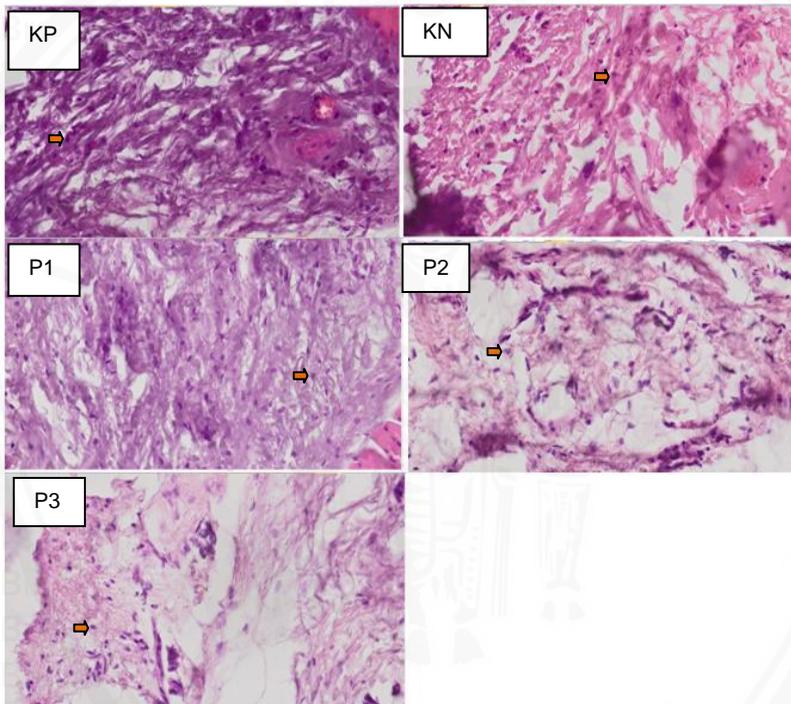
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Post Test Only Control Group Design* yang terdiri dari 5 kelompok tikus jantan. Kelompok 1 adalah kelompok tikus dengan perlakuan insisi pada rahang bawah tanpa pemberian gel chitosan (kontrol positif), kelompok 2 merupakan kelompok tikus tanpa perlakuan apapun (kontrol negatif), kelompok 3 adalah kelompok tikus yang diberi gel chitosan topikal dengan konsentrasi 1,25%, kelompok 4 adalah kelompok tikus yang diberi gel chitosan topikal dengan konsentrasi 2,5%, dan kelompok 5 adalah kelompok tikus yang diberi gel chitosan topikal dengan konsentrasi 5%. Perlakuan pada kelompok 3, 4, dan 5 yaitu pengolesan gel chitosan, dilakukan sesaat setelah insisi. Kemudian tikus dimonitor selama 7 hari. Pada hari ketujuh, dilakukan pengorbanan pada tikus dan dilanjutkan dengan pembedahan mandibula tikus untuk mengambil jaringan gingiva dari mandibular. Setelah pembedahan mandibula selesai dilakukan, jasad tikus dikubur di dalam tanah. Selanjutnya dilakukan proses pembuatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE), lalu dilakukan penghitungan jumlah limfosit menggunakan mikroskop.

5.1.1 Hasil Perhitungan Jumlah Limfosit Pada Daerah Luka

Gambar 5.1 Histopatologi Jaringan limfosit Gingiva Rahang Bawah. Keterangan: Kontrol Positif (dilakukan insisi tanpa gel chitosan); Kontrol Negatif (tanpa perlakuan apapun); P1 (dilakukan insisi dan pemberian gel chitosan topikal 1,25%); P2 (dilakukan insisi dan pemberian gel chitosan topikal 2,5%); P3 (dilakukan insisi dan pemberian gel chitosan topikal 5%). Pewarnaan dengan Hematoxylin-Eosin, perbesaran 400x.



Berdasarkan hasil pewarnaan *Hematoxylin-eosin* jaringan gingiva pasca insisi rahang bawah tikus putih *Rattus norvegicus* didapatkan gambaran jumlah limfosit yang tampak sedikit pada kelompok kontrol negatif. Pada kelompok positif terdapat gambaran limfosit dengan jumlah lebih banyak dibandingkan kelompok negatif, namun jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan

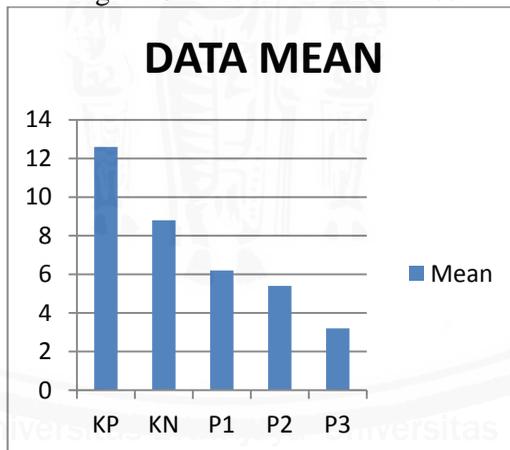
jumlah limfosit terlihat memiliki perbedaan. Ketiga kelompok perlakuan memiliki jumlah limfosit yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kelompok yang memiliki jumlah limfosit paling sedikit adalah kelompok perlakuan tiga dengan pemberian gel chitosan konsentrasi 5%.

Penyajian data hasil perhitungan limfosit ditulis dengan format $\text{mean} \pm \text{standar deviasi}$.

Tabel 5.1 Mean Jumlah Limfosit

Kelompok	Mean Limfosit
A. Kontrol Positif	12,6
B. Kontrol Negatif	8,8
C. Perlakuan 1 Gel Chitosan 1,25 %	6,2
D. Perlakuan 2 Gel Chitosan 2,5 %	5,4
E. Perlakuan 3 Gel Chitosan 5 %	3,2

Diagram 5.1 Mean Jumlah Limfosit



Berdasarkan diagram rerata diatas menunjukkan bahwa jumlah limfosit pada kelompok perlakuan lebih sedikit dibandingkan

dengan kelompok positif namun lebih banyak dibanding kelompok negatif. Pada kelompok kontrol negatif atau tanpa perlakuan memiliki rata rata jumlah limfosit paling sedikit yaitu 8,8. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (dilakukan insisi tanpa pemberian gel chitosan) memiliki rata rata jumlah limfosit paling banyak diantara semua kelompok yaitu 12,6. Pada perlakuan 1 dengan pemberian gel chitosan topikal 1,25 % rata rata jumlah limfosit adalah 6,2. Selanjutnya pada perlakuan 2 dengan pemberian gel chitosan topikal 2,5% rata rata jumlah limfosit adalah 5,4. Dan yang terakhir pada perlakuan 3 dengan pemberian gel chitosan topikal 5% jumlah rata rata limfosit ialah 3,2. Kelompok perlakuan yang memiliki jumlah limfosit paling sedikit ialah kelompok 3 (pemberian gel chitosan topikal 5%) dengan jumlah sel limfosit 3,2.

5.2 Analisis Data

Hasil pengukuran kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas ragam, uji *One-way ANOVA*, *Post Hoc Multiple Comparison test*.

5.2.1 Uji Normalitas Data

Pada penelitian ini, pengujian normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji normalitas terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan $p>0,05$. Signifikansi data untuk jumlah limfosit adalah 0,200. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan $p=0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga dari pengujian normalitas disimpulkan uji normalitas telah terpenuhi dan data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan Levene's Test. Uji homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan $p>0,05$. Dari hasil analisis data didapatkan nilai signifikansi uji homogenitas ragam didapatkan 0,183. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan

$p=0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada $0,05$. Sehingga pengujian ini dapat diketahui bahwa uji homogenitas ragam telah terpenuhi.

5.2.3 Uji Oneway ANOVA

Kedua pengujian yaitu uji normalitas dan uji homogenitas ragam yang melandasi uji One Way Anova telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan uji Oneway Anova. Analisis dengan menggunakan uji *Oneway ANOVA* bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan nilai jumlah limfosit antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan jumlah limfosit yang signifikan antar kelompok. Perbedaan rata-rata jumlah limfosit dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji *Oneway ANOVA* ini Hipotesis Null yang diajukan adalah tidak ada perbedaan nilai jumlah limfosit. Dari hasil pengujian didapatkan bahwa nilai $p=0,000$ dan berdasarkan hasil tersebut maka hipotesis Null ditolak sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan jumlah limfosit pada daerah luka pasca insisi antara kelompok secara bermakna.

5.2.4 Uji Post Hoc Multiple Comparison

Analisis mengenai perbedaan jumlah dari kelima kelompok dapat diketahui dalam *Post Hoc Multiple Comparison Test*. Metode Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey. Pada uji Post Hoc Tukey, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$ serta pada interval kepercayaan 95%. Berdasarkan output uji tersebut didapatkan hasil bahwa tiap kelompok perlakuan memiliki jumlah limfosit yang berbeda.

5.2.5 Uji Korelasi Pearson

Korelasi pearson digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Hal ini, didapatkan kekuatan korelasi $r = (-0,298)$ yang menunjukkan terdapat korelasi yang kuat antara pemberian gel chitosan topikal dengan jumlah limfosit. Arah korelasinya adalah negatif, sehingga semakin tinggi konsentrasi chitosan yang diberikan

maka semakin sedikit jumlah limfosit pada jaringan gingiva yang terbentuk.



BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel chitosan topikal dengan berbagai dosis terhadap jumlah limfosit pada gingiva tikus strain wistar setelah insisi. Konsentrasi gel chitosan topikal yang digunakan berdasarkan Fitri dan Sri (2013). Menurut Fitri dan Sri (2013), chitosan dengan konsentrasi 1,25% berpengaruh pada jumlah limfosit dibandingkan kontrol positif dan konsentrasi 5% menunjukkan efek yang lebih signifikan terhadap jumlah limfosit.

6.1 Pengaruh Pemberian Gel Chitosan Topikal Terhadap Jumlah Limfosit Pada Penyembuhan Luka Pasca Insisi

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian gel chitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah limfosit pada penyembuhan luka pasca insisi. Chitosan dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan cara mempercepat migrasi dari sel sel inflamasi dan meningkatkan fase granulasi dalam penyembuhan luka. Selain itu, struktur dari chitosan yaitu GlcNAc juga mampu meningkatkan aktivasi makrofag. Dalam proses penyembuhan luka, makrofag berfungsi untuk mensintesis faktor pertumbuhan yang dibutuhkan dalam penyembuhan luka (Ueno, 2001). Faktor pertumbuhan ini berfungsi untuk menstimulasi munculnya fibroblas pada daerah luka (Townsend, 2008).

Chitosan memiliki fungsi yang sama seperti glukan yaitu sebagai agen aktivasi makrofag dan mempercepat produksi sitokinin dari makrofag (Ueno, 2001). Berdasarkan penelitian Masuoka *et al.* (2005), chitosan memiliki kemampuan untuk meningkatkan paruh waktu basic FGF dibanding kelompok kontrol dengan cara melindunginya agar tidak terdegradasi oleh panas atau enzim-enzim yang mungkin merusaknya.

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Wardono (2009), menyatakan bahwa pemberian salep chitosan 2,5% pada luka mengalami penyembuhan yang lebih cepat dan lebih baik.

Berdasarkan penelitian lain yang dilakukan oleh Fitri dan Sri (2013) menunjukkan bahwa salep chitosan berpengaruh pada penyembuhan luka pada tikus putih. Penelitian ini menggunakan salep chitosan dengan konsentrasi chitosan 1,25%, 2,5% dan 5%. Pada penelitian tersebut menyatakan bahwa salep chitosan yang paling baik adalah salep chitosan dengan konsentrasi 5%. Dalam pengamatan histology tugas akhir ini pemberian salep chitosan 5% menunjukkan jumlah limfosit paling rendah di antara kelompok perlakuan lain dengan ketebalan epitel paling tipis.

6.2 Perbedaan Jumlah Limfosit Antar Kelompok Perlakuan

Berdasarkan hasil penelitian, terdapat perbedaan jumlah limfosit antara kelompok yang diberikan gel chitosan topikal dengan kelompok yang tidak diberikan gel chitosan topikal. Kelompok kontrol negatif atau tanpa perlakuan memiliki rata rata jumlah limfosit sebesar 8,8. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (dilakukan insisi tanpa pemberian gel chitosan) memiliki rata rata jumlah limfosit paling banyak diantara semua kelompok yaitu 12,6. Pada perlakuan 1 dengan pemberian gel chitosan topikal 1,25 % rata rata jumlah limfosit adalah 6,2. Selanjutnya pada perlakuan 2 dengan pemberian gel chitosan 2,5% rata rata jumlah limfosit adalah 5,4. Dan yang terakhir pada perlakuan 3 dengan pemberian gel chitosan 5% jumlah rata rata limfosit ialah 3,2. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi chitosan topikal yang diberikan, maka jumlah limfosit pada daerah luka semakin sedikit.

Pada penelitian yang sama, peneliti lain menghitung skoring kolagen didapatkan hasil sebagai berikut serat kolagen kelompok kontrol negatif terlihat menyebar serta tebal (skor 3), pada kontrol positif kolagen terlihat tipis (skor 1), pada kelompok perlakuan 1 dengan gel chitosan 1,25 % kolagen terlihat menyebar namun tipis (skor 2), pada kelompok perlakuan 2 dengan gel chitosan 2,5% kolagen mulai terlihat menyebar dan tebal (skor 3) dan pada kelompok perlakuan 3 dengan gel chitosan 5 % kolagen terlihat menyebar dan tebal (skor 3) (Izzudin, 2015). Berdasarkan hasil tersebut, perbedaan konsentrasi chitosan berpengaruh terhadap produksi kolagen. Pemberian chitosan topikal menunjukkan penurunan jumlah limfosit pada tiap kelompok perlakuan disertai dengan peningkatan produksi kolagen. Hasil ini didukung pula oleh

penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa chitosan dapat meningkatkan induksi proliferasi limfosit dan produksi kolagen (Ueno., 1999).

Pada data jumlah limfosit, dilakukan analisis data dan didapatkan hasil *p-value* sebesar 0,000. Dari hasil analisa tersebut dapat diartikan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada semua kelompok yang dibandingkan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel chitosan topikal dengan konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap perbedaan jumlah limfosit pada jaringan gingiva pasca insisi pada tikus *Rattus norvegicus*.

Untuk mengetahui hubungan konsentrasi gel chitosan topikal dengan jumlah limfosit, maka dilakukan uji korelasi. Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa pada analisis korelasi diperoleh angka signifikansi -0,298 yang berarti terdapat hubungan (korelasi) yang kuat antara pemberian gel chitosan topikal terhadap jumlah limfosit. Hal ini didukung pula oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pemberian chitosan secara topikal berpengaruh terhadap jumlah limfosit dalam penyembuhan luka (Ueno, 2001).

Penyembuhan luka pasca insisi adalah proses penggantian jaringan yang rusak atau mati oleh jaringan yang baru dan sehat. Proses penyembuhan luka ini dibagi menjadi tiga fase penyembuhan yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi (Kumar *et al*, 2005). Pada fase inflamasi sel-sel inflamasi bermigrasi ke dalam luka (kemotaksis) yang ditandai oleh infiltrasi (secara berurutan) neutrofil, makrofag, dan limfosit. Limfosit berperan penting dalam pembentukan antibodi. Pada fase inflamasi, jumlah limfosit mencapai puncak pada hari ketujuh setelah terjadi luka (Townsend, 2008). Pada penelitian ini, jumlah limfosit pada hari ketujuh hanya terlihat sedikit atau dapat dikatakan menurun. Jumlah limfosit dalam penelitian ini menurun karena Limfosit akan memproduksi antibodi sebagai respon terhadap antigen yang masuk di bawa oleh makrofag. Hal ini dikarenakan pada penelitian ini diberikan gel chitosan topikal yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Efek pemberian gel chitosan adalah mempercepat infiltrasi sel sel inflamasi ke daerah luka sehingga proses penyembuhan luka terjadi lebih cepat dari biasanya (Ueno, 2001). Dengan demikian hipotesis pemberian gel chitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah sel limfosit setelah insisi gingiva pada tikus wistar terbukti.

6.3 Konsentrasi Gel Chitosan Topikal Yang Paling Efektif Dalam Penyembuhan Luka Pasca Insisi

Dalam penelitian ini, kelompok perlakuan dengan pemberian gel chitosan topikal 5% memiliki jumlah limfosit yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya yaitu 3,2. Hal ini menunjukkan bahwa chitosan mampu mempercepat Limfosit akan memproduksi antibodi sebagai respon terhadap antigen yang masuk di bawa oleh makrofag, sehingga proses penyembuhan luka terjadi lebih cepat. Sehingga dapat dikatakan konsentrasi chitosan yang paling efektif dalam proses penyembuhan luka adalah gel chitosan topikal 5%. Pada penelitian ini, jumlah limfosit paling sedikit terdapat pada kelompok kontrol negatif. Hal ini dikarenakan tidak terdapat luka pada jaringan kelompok perlakuan tersebut sehingga tidak terjadi migrasi dan proliferasi limfosit.

Walaupun hipotesis dari penelitian ini telah terbukti, namun masih terdapat beberapa kelemahan yaitu tidak dapat dilakukan instruksi post insisi sehingga chitosan kemungkinan tertelan dan tidak terserap ke dalam jaringan secara sempurna. Selain itu kurangnya pemberian gel chitosan topikal juga menjadi kelemahan dari penelitian ini. Pada penelitian ini, gel chitosan topikal hanya diberikan satu kali yaitu pada hari pertama sesaat setelah dilakukan insisi. Pemberian gel chitosan topikal seharusnya dilakukan selama 7 hari berturut-turut hingga tikus dikorbankan. Kelemahan lainnya adalah tidak dilakukan pemberian dressing pada daerah luka pasca insisi, sehingga dapat terjadi kontak gel chitosan topikal dengan saliva. Selain hal hal tersebut faktor-faktor lain seperti lingkungan, tingkat stress dan makanan juga dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka.

Dari keseluruhan uraian di atas, dapat disimpulkan bahwa hipotesa yang dibuat dalam penelitian ini terbukti bahwa gel chitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah sel limfosit setelah insisi gingiva pada tikus *Rattus novergicus* yaitu menurunkan jumlah limfosit dan mempercepat terbentuknya kolagen sehingga penyembuhan luka menjadi lebih cepat.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengaruh gel chitosan topikal terhadap jumlah limfosit setelah insisi gingiva pada tikus *Rattus novvergicus*, maka dapat disimpulkan bahwa:

- a. Pemberian cchitosan topikal berpengaruh terhadap jumlah limfosit setelah insisi gingiva tikus *Rattus novvergicus* pada hari ke-7
- b. Konsentrasi gel chitosan topikal yang paling efektif dalam penyembuhan luka setelah insisi pada tikus *Rattus novvergicus* adalah gel chitosan topikal dengan konsentrasi 5%.

7.2 Saran

- a. Penelitian lebih lanjut mengenai variasi konsentrasi gel chitosan topikal yang paling optimal untuk penyembuhan luka pasca insisi.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek samping dari gel chitosan topikal untuk penyembuhan luka pasca insisi.
- c. Penelitian lebih lanjut mengenai gel chitosan topikal dengan subjek manusia sehingga dalam beberapa waktu ke depan gel chitosan topikal dapat digunakan sebagai alternatif obat yang membantu percepatan proses penyembuhan luka pada gingiva.

DAFTAR PUSTAKA

- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol*, 2009;3:203–30.
- Arisanty, Irma P. 2014. *Manajemen Perawatan Luka: Konsep Dasar*, EGC, Jakarta, hal 29-35.
- Bathla, Sahlu. 2011. *Periodontic Revisited*, Jaypee Brothers Medical Publishers, India, page 353.
- Benavente, M. Adsorption of Heavy Metal Ions Onto Chitosan. www.kth.se (diakses pada: 13 Desember 2015 pukul 09.00)
- Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. 2015. *Clinical Periodontology 12th Editio*, Elsevier Saunders, Missouri, p. 578-580.
- Chiba Y, Kamada A, Sugashima S, Taya K, Matsubuchi S, Saito T, et al. Effects of Intravenous Administration of Chitosan Oligosaccharide on The Wound Healing Process of Oral Mucosal Injury in Mice. *Ohu University Journal. Japan*, 2006; 33 (4): 207-213.
- Cohen, Edward S. 2009. *Atlas Of Cosmetic And Reconstructive Periodontal Surgery*, People's Medical Publishing House, Shelton, Connecticut, p. 39-44.
- Dai T, Tanaka M, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*, 2011; 9(7): 857–879.
- Departemen Kesehatan RI. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2011: Laporan Nasional. Jakarta: 2011.

Eroschenko, Victor P. 2010. *Atlas Histologi DiFiore Dengan Korelasi Fungsional*, EGC, Jakarta, hal. 59.

Enoch, Stuart. *Celular, Molecular, and Biochemical Differences in the Pathophysiology of Healing Between Acute Wounds, Chronic Wounds and Wounds in Age*. www.worldwidewounds.com (diakses pada 16 November 2015 pukul 15.10).

Fawcett, Don W. 2002. *Buku Ajar Histologi Ed.12*, EGC, Jakarta, hal. 107-109.

Fernandes J.C., Tiera M.J., Winnik F.M. Chitosan nanoparticles for non-viral gene therapy. *ACS Symp Ser.* 2006;934:177–200.

Fitri R, Sri T. Pengaruh Salep Chitosan Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimia Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dengan Pengamatan Histologi. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta; 2013.

Flanagan, M. MA, BSc, DipN, Cert Ed, ONC, RGN. The physiology of wound healing. *Journal Of Wound Care*, 2000; 9 (6): 299-300.

Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clin Plastic Surg*, 2012; 39: 85–97.

Greenberg, Martin S, Glick Michael, Ship Jonathan A. 2008. *Burket's Oral Medicine*, BC Decker Inc, Hamilton, p. 181.

Gomathysankar, Sankaralakshmi, Halim A., Yacoob N. Proliferation of Keratinocytes Induced by Adipose-Derived Stem Cells on a Chitosan Scaffold and Its Role in Wound Healing, a Review. *Archives of Plastic Surgery*, 2014; 41: 452-457.

Izzudin, Miqdad Muhammad. 2015. *Pengaruh Pemberian Chitrosan Topikal Terhadap Pembentukan Kolagen Dalam*

Penyembuhan Luka PASca Gingivektomi Pada Tikus (Rattus novergicus) Galur Wistar. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Khan TA, Peh KK, 2002, Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553887>

Kumar V, Abbas A, Fausto N. 2005. *Pathologic Basic of Disease*, Elsevier Saunders Inc, Philadelphia, p. 129 – 134.

Leeson. 2003. *Buku Ajar Histologi Edisi 5*, EGC, Jakarta, hal. 122.

Linawati H. "Chitosan Bahan Alami Pengganti Formalin". Departemen Teknologi Perairan (THP) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor (FKIK-IPB);2006. Available from: <http://health.kompas.com/read/2008/01/10/23135026/Chitosan..Limbah.Kulit.Udang.untuk.Diabetes.dan.Hipertensi>

Masuoka K, Ishihara M, Asazuma T, Hattori H, Matsui T, et al . The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. *Biomaterials*, 2005; 26: 3277-3284.

Mercandetti M, Cohen A. Wound healing and repair. Medscape (Updated: Mar 12,2015). Available from: URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>.

Mescher, Anthony L. 2012. *Histologi Dasar Junqueira Teks & Atlas*, EGC, Jakarta, hal. 70.

Mitchell, Ricard N *et all*. 2008. *Robbins & Cotran Buku Saku Dasar Patologis Penyakit Edisi 7*, EGC, Jakarta, hal. 30.

Mohamad M. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilindan Eosin (H&E). Balai Penelitian Veteriner, 2001.

- Nield-Gehrig, Jill S. 2008. *Foundation Of Periodontics For The Dental Hygienist*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 5,126.
- Perdanakusuma, David S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka*. Makalah disajikan dalam Seminar “*From Caring to Curing, Pause Before You Use Gauze*”, JW Marriot Hotel Surabaya, 5 September 2007.
- Peterson, Larry J. 2004. *Peterson’s Principle of Oral and Maxillofacial Surgery* 2nd ed, BC Decker Inc Hamilton, London, p. 3-17.
- Reddy, Shantipriya. 2011. *Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics*, Jaypee Brothers Publisher, New Delhi, p. 151-155.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 2006; 31:603–32.
- Ruszczak, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003; 55 (12): 1595–1611.
- Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. Chitosan Film Containing Fucoidan as a Wound Dressing for Dermal Burn Healing: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 2007; 8 (2): E1-E8.
- Suriadi. 2015. *Pengkajian Luka dan Penanganannya*, CV Agung Seto, Jakarta, hal. 30-34.
- Suryono. 2015. *Bedah Dasar Periodonsia*, Deepublish, Yogyakarta, hal. 89.
- Townsend, Courtney M, Beauchamp Daniel, Evers B. Mark, Mattox Kenneth L. 2008. *Sabiston Textbook Of Surgery 18th Edition*, Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 191-206.
- Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumuraa M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for

healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 1999; 20: 1407-1414.

Ueno H, Mori Takashi, Fujinaga Toru. Topical formulation and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 52: 105-115.

Wardono, A. (2009). *Pengaruh Kitosan Secara Topikal Terhadap Penyembuhan Luka pada Kulit Tikus Putih (Rattus Novergicus) Terinduksi Asam Sulfat*. KTI. Program Sarjana Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta.