

**PENGARUH TERAPI GEL GETAH POHON
JARAN(*Lannea coromandelica*) TERHADAP EKSPRESI
TGF- β DAN HISTOPATOLOGI KULITPADA
LUKA KASTRASI TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINFEKSI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

**Oleh:
DINI APRILIA WULANDARI
155130107111009**



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

repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI GEL GETAH POHON
JARAN(*Lannea coromandelica*) TERHADAP EKSPRESI
TGF- β DAN HISTOPATOLOGI KULITPADA
LUKA KASTRASI TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINFEKSI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
DINI APRILIA WULANDARI
155130107111009



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**Pengaruh Terapi Gel Getah Pohon Jaran (*Lannea coromandelica*)
Terhadap Ekspresi TGF- β Dan Histopatologi Kulit Pada Luka
Kastrasi Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinfeksi
*Staphylococcus aureus*****Oleh:****DINI APRILIA WULANDARI
155130107111009**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Maret 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19810504 200501 1 001**drh. Indah Amalia Amri, M.Si**
NIK. 201304 870925 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dini Aprilia Wulandari

NIM : 155130107111009

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Pengaruh Terapi Gel Getah Pohon Jaran (*Lannea coromandelica*) Terhadap Ekspresi TGF- β Dan Histopatologi Kulit Pada Luka Kastrasi Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Maret 2019

Yang Menyatakan,

Dini Aprilia Wulandari
NIM. 155130107111009

**Pengaruh Terapi Gel Getah Pohon Jaran (*Lannea coromandelica*)
Terhadap Ekspresi TGF- β Dan Histopatologi Kulit Pada Luka
Kastrasi Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinfeksi
*Staphylococcus aureus***

ABSTRAK

Infeksi bakteri pada luka kastrasi dapat memperlama kesembuhan luka. Luka kastrasi yang tidak aseptis dapat menjadi *port of entry* dari bakteri patogen *Staphylococcus aureus* sehingga luka menjadi semakin parah dan sembuh lebih lama. Oleh karena itu dibutuhkan terapi untuk mempercepat kesembuhan luka serta memiliki sifat antimikroba untuk mengatasi infeksi pada luka kastrasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi TGF- β serta histopatologi pada jaringan luka kastrasi yang diterapi menggunakan gel getah pohon jaran (*Lannea coromandelica*). Gel getahpohon jaran dibuat dengan basis CMC NA dengan konsentrasi getah pohon jaran 5%, 10%, dan 15%. Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat 200-250 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol negatif yang dijahit lukanya dengan benang silk steril dan diterapi gentamisin sulfat 0.1%. Kelompok 2 adalah kelompok kontrol positif yang dijahit lukanya dengan benang silk yang dikontaminasi *S. aureus* 10^5 CFU/ml. Kelompok 3, 4, dan 5 adalah kelompok yang dijahit lukanya dengan benang silk yang dikontaminasi *S. aureus* dan diterapi gel getah pohon jaran dengan konsentrasi masing-masing 5%, 10%, dan 15%. Ekspresi TGF- β pada preparat IHK diamati menggunakan *immunoratio*. Analisis data dilakukan dengan uji *one way ANOVA* dan uji *tukey*. Terapi gel getahpohon jaran konsentrasi 10% menunjukkan peningkatan signifikan terhadap ekspresi TGF- β . Pemberian gel getahpohon jaran konsentrasi 10% menunjukkan hasil terapi yang paling baik dilihat dari perbaikan jaringan luka berdasarkan pembentukan jaringan granulasi pada histopatologi kulit.

Kata kunci : TGF- β , histopatologi kulit, gel getahpohon jaran (*Lannea coromandelica*)

Potency of *Lannea coromandelica* Gel as a Therapy of Castration Wound in Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) Infected by *Staphylococcus aureus* for TGF- β Expression and Skin Histopathology

ABSTRACT

Castration is causing open cuts wound in skin. Wound healing process can be contaminated by microorganism. One of the bacteria causing wound infections is *Staphylococcus aureus* which can make longer time duration of wound healing process. Therefore, effective therapy method is needed to shorten wound healing time with antimicrobial activity. This research is aim to know the effect of *Lannea coromandelica* gel therapy on TGF- β expression and skin histopathology. The *Lannea coromandelica* gel was made of CMC NA base with three types concentration 5%, 10%, and 15%. Animal model in this research is male rat (*Rattus norvegicus*) 200-250 gram aged eight to twelve week-old. The animal model was divided into five group, each group contains of four rats. First group is negative control group, which is sutured with sterile silk and aseptic method with gentamicine sulphate 0.1% therapy. Second group is positive control which is sutured with *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml contaminated suture with bacteria. The third, fourth, fifth group were underwent therapy with 5%, 10%, dan 15% *Lannea coromandelica* gel which is sutured with *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml contaminated silk. The parameter of this research are TGF- β expressions which are measured by immunohistochemistry and histopathological of wound. The data was analyzed with one way ANOVA test and Tukey's HSD (Honestly Significance Difference) range test with 95% confidence level ($\alpha = 0.05$). Therapy of *Lannea coromandelica* gel concentration of 10% showed a significant increase in TGF- β expressions in the castration model of rat (*Rattus norvegicus*) skin. *Lannea coromandelica* gel concentration of 10% shows the results of good therapy seen based on repair of wound tissue through granulation tissue formation from histopathology of the skin

Keyword : TGF- β , skin histopathology, *Lannea coromandelica* gel

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmatNYA sehingga skripsi yang berjudul “Pengaruh Terapi Gel Getah Pohon Jaran (*Lannea coromandelica*) Terhadap Ekspresi TGF- β Dan Histopatologi Kulit Pada Luka Kastrasi Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*” dapat tersusun hingga selesai .

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini banyak halangan dan rintangan yang terjadi sehingga dalam menyelesaikannya harus melibatkan banyak pihak. Penulis menyampaikan terima kasih atas bantuan dari pihak yang telah berkontribusi :

1. Dr. drh. Sri Murwani, MP selaku pembimbing Program Kreativitas Mahasiswa selama penelitian ini berlangsung yang telah memberikan inspirasi dan motivasi selama penyelesaian penelitian ini.
2. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah memberikan fasilitas untuk penyelesaian skripsi ini.
3. Bapak Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D selaku Pembimbing I, drh Indah Amalia Amri, M.Si. selaku Pembimbing II yang telah memberikan saran dan nasehat dalam penyelesaian skripsi ini.
4. drh Ajeng Aeka N, M. Sc dan drh Fidi Nur Aini E.P.D, M, Si selaku Penguji yang telah memberikan tambahan saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.

5. Dosen pembimbing akademik drh Yudit Oktanella, M.Si yang telah membantu kelancaran studi penulis dan telah memberimotivasi serta inspirasi.
6. Ketua Jurusan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya drh Fajar Shodiq Permata, M.Biotech dan Wakil Dekan Bidang Akademik drh Dyah Ayu Oktavianie, M. Biomed yang telah membantu kelancaran proses akademik.
7. Keluargatercinta Ayah Didik, Mama Endang, Mbah Sahmah, Mbak Dista, Mas Abby, Mas Daanish, Dek Ammar, Dek Lily yang telah memberikandoa, inspirasi, semangat dan segala bentuk dukungan yang terbaik.
8. Nurfitriyana Firsty selaku satu-satunya teman seperjuangan, penelitian dan teman skripsi.
9. Teman – temanku: Indra Darpa Kusuma, Liza Sadda, Eka Aditya, Annisa Larasati, Rahmi Elfira, Gusti Aulia, Aulia Fadil dan semua teman yang telah berkontribusi dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
10. Teman kelas Asique 2015 A dan DNA 2015.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini sehingga perlu saran dari pembaca untuk perkembangan dan perbaikan penulisan serta penelitian kedepannya.

Malang, 18 Maret 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah Penelitian	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tikus Putih	6
2.2 Kastrasi	8
2.3 Luka Insisi.....	9
2.3.1 Fase Hemostasis.....	10
2.3.2 Fase Inflamasi	10
2.3.3 Fase Proliferasi	11
2.3.4 Fase Remodeling	12
2.4 Struktur Kulit Skrotum	13
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.6 Gentamisin Sulfat.....	18
2.7 Pohon Jaran	19
2.8 Gel	21
2.9 <i>Transforming Growth Factor-β</i>	22
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	26
3.2 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.2 Alat dan Bahan	29
4.3 Sampel Penelitian.....	30
4.4 Rancangan Penelitian	30
4.5 Variabel Penelitian	32
4.6 Tahapan Penelitian	32
4.7 Prosedur Kerja	32



4.7.1 Persiapan Hewan Coba	32
4.7.2 Prosedur Pembuatan Gel Getah Pohon Jaran.....	32
4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri.....	34
4.7.4 Pembuatan Benang Kontaminasi	35
4.7.5 Pembuatan Hewan Model Kastrasi	35
4.7.6 Terapi Gel Air Pohon Jaran	35
4.7.7 Koleksi Jaringan Kulit	35
4.7.8 Pembuaan Histopatologi Kulit	36
4.7.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia	38
4. 8 Analisa Data	38
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 PengaruhGetahPohonJaranTerhadapHistopatologiKulit.....	42
5.2 PengaruhGetahPohonJaranTerhadapEkspresi TGF- β	52
BAB 6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	66
6.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	73



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Kelompok Perlakuan.....	30
5.1 Rata – Rata Ekspresi TGF- β	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tikus Putih	6
2. Anatomi Urogenital Tikus Jantan	8
3. Potongan Melintang Kulit Skrotum	16
4. Berkas Otot Tunika Dartos	17
5. Bentuk <i>Staphylococcus aureus</i>	18
6. Gambar makroskopisluka	40
7. Gambar histopatologikulit.....	46
8. Gambar ekspresi TGF- β	55
9. Gambar histogram rata-rata ekspresi TGF- β	61



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik	42
Lampiran 2. Perhitungan Dosis	43
Lampiran 3. Pembuatan Suspensi Bakteri	44
Lampiran 4. Formulasi Gel	45
Lampiran 5. Prosedur Pembuatan Suspensi Bakteri	46
Lampiran 6. Kerangka Operasional	47
Lampiran 7. Langkah Kerja Penelitian	48
Lampiran 8. Data PresentaseEkspresi TGF- β	77
Lampiran 9. PresentasePeningkatanJumlahEkspresi TGF- β	78
Lampiran 10. Analisa StatistikaEkspresi TGF- β	79



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor – β</i>
IL-1- β	<i>Interleukin-Iβ</i>
OH	<i>Ovaryhysterectomy</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
HE	<i>Hematoxylen-Eosin</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
SA-HRP	<i>Strep Advin-Horseradish</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PMN	<i>Polimorfonuklear</i>
RAL	<i>Rancangan Acak Lengkap</i>
BNJ	<i>Beda Nyata Jujur</i>
HSD	<i>Honest Significance Diference</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CMC Na	<i>Carboxymethylcellulose Natrium</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
BB	<i>Berat Badan</i>
NaCl	<i>Natrium Chloride</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teknik sterilisasi reproduksi pada hewan jantan dinamakan kastrasi atau *orchietomy*, sedangkan pada hewan betina dinamakan *ovariohysterectomy*. Kastrasi merupakan suatu usaha untuk menghilangkan fungsi reproduksi hewan jantan dengan cara menghambat proses pembentukan dan pengeluaran sperma. Tujuan *orchietomy* adalah untuk mengatasi kanker prostat, kanker testis, dan selain itu hewan jantan yang dikastrasi pembawaannya akan lebih tenang dan pertumbuhannya cepat (Komang dan Kusumawati, 2011). Proses kastrasi akan menyebabkan luka insisi pada bagian skrotum. Keberhasilan dari penyembuhan luka ini menjadi tujuan utama dalam proses perawatan luka kastrasi.

Tahapan penyembuhan luka terdiri dari beberapa fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi atau fase *remodeling*. Menurut Gurtner (2007), fase awal yakni hemostasis merupakan mekanisme untuk menghentikan perdarahan yang terjadi akibat luka. Kemudian dilanjutkan dengan fase inflamasi dimulai segera setelah terjadinya cedera, dengan tujuan untuk menyingkirkan jaringan yang mati dan mencegah infeksi. Fase proliferasi berlangsung kemudian di mana akan terjadi keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan regenerasi jaringan. Fase terakhir adalah fase *remodeling* yang bertujuan untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktural dari luka.

Fungsi TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) juga berpengaruh secara positif pada fase proliferasi yaitu kemotaksis. TGF- β berperan dalam kemotaksis dan mediator inflamasi untuk berbagai jenis sel imun, termasuk *polimorfonuklear* (PMN) (basofil, eosinofil, neutrofil dimulai 24-48 jam setelah terjadi luka) dan monosit (dimulai 48-96 jam setelah terjadi luka). TGF- β berpartisipasi dalam kedua proses untuk merangsang respon imun awal sebagai sitokin proinflamasi, melalui perekrutan PMN, dan membatasi terjadinya respon inflamasi sebagai sitokin antiinflamasi (Gilbert *et al.*, 2016).

Proses penyembuhan luka kastrasi dapat terhambat akibat adanya infeksi mikroorganisme patogen yang dapat memperlama kesembuhan luka bahkan memperparah kondisi luka tersebut. Letak luka kastrasi menjadi lebih rentan terkontaminasi oleh mikroorganisme yang terdapat pada urin ataupun feses yang mengkontaminasi luka. Bakteri yang dapat mengkontaminasi luka adalah *Staphylococcus aureus* sebesar 20%, *Pseudomonas aeruginosa* 16%, *Escherichia coli* 10% (Nasution, 2012). *Staphylococcus aureus* termasuk dalam flora normal pada kulit pasien yang dapat mengkontaminasi luka dan menyebabkan terjadinya infeksi luka. (Shrestha *et al.*, 2009). Pengobatan luka pada umumnya adalah pemberian obat antibiotik dan antiinflamasi, tetapi penggunaan jenis obat antibiotik saat ini sedang menjadi perhatian utama karena dapat memicu resistensi. Akibat dari bakteri *multidrug resistant* dapat mengakibatkan morbiditas tinggi, biaya perawatan tinggi dan durasi pengobatan lama akibat sulitnya mengeliminasi bakteri dari tubuh (Milton *et al.*, 2015). Karena adanya dampak jangka panjang dari penggunaan antibiotik tersebut

sehingga dibutuhkan adanya alternatif bahan obat lain sebagai pengganti obat antibiotik. Salah satu alternatif yang dapat digunakan sebagai antibiotik adalah bahan herbal dari tanaman.

Pohon jaran (*Lannea coromandelica*) merupakan jenis tanaman herbal medis yang banyak tumbuh di daerah tropis dan penting digunakan dalam metode pengobatan tradisional terhadap konjungtivitis, diabetes, tukak lambung, odontalgia, disentri, dan diare (Wirastuty, 2016). Bahan kimia yang terkandung dalam *Lannea coromandelica* antara lain, polifenol (tannin, dihidroflavonol), flavonoid (quercetin, kaempferol, isoquercetin), flavonol, sterol (β -sitosterol), saponin, dan antioksidan (Shahriyaret *et al.*, 2016). Flavonoid, senyawa golongan fenol memiliki aktivitas antiseptik, sedangkan saponin memiliki kemampuan sebagai pembersih sehingga efektif dalam proses penyembuhan luka. Bahan kimia yang terkandung dalam pohon jaran memiliki aktivitas antiinflamasi, antinoseptik (Sathish *et al.*, 2010). Kulit batang dari pohon jaran berguna dalam mengobati luka, memar, bisul, ophthalmia, asam urat, stomatitis ulseratif, odontalgia, diare dan disentri (Prajapathi dan Kumar, 2005). Kulit batang pohon jaran mengandung aktivitas antimikroba, aktivitas trombolitik, antioksidan yang dapat membantu proses penyembuhan luka dan mencegah terjadinya infeksi nosokomial pada luka pasca operasi. Penggunaan getah pohon jaran dalam bentuk sediaan gel karena gel memiliki kelebihan seperti stabilitas yang baik, berupa sediaan halus, mudah terdistribusi merata, mudah digunakan, mudah disimpan, mampu menjaga kelembapan kulit (Kuncari dkk., 2014).

Berdasarkan tinjauan di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel getah pohon jaran (*Lannea coromandelica*) terhadap histopatologi kulit dan ekspresi TGF- β yang berperan dalam membantu mempercepat proses kesembuhan luka kastrasi pada tikus putih (*rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian ini antara lain :

- 1.2.1 Apakah pemberian gel getah pohon jaran dapat digunakan sebagai terapi luka kastrasi berdasarkan gambaran histopatologi kulit ?
- 1.2.2 Apakah gel getah pohon jaran dapat digunakan sebagai terapi luka kastrasi berdasarkan ekspresi TGF- β ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada :

- a. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 200 - 250 gram dengan umur 8-12 minggu yang telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No : 974-KEP-UB. **Lampiran 1.**
- b. Anestesi untuk pembuatan hewan model luka menggunakan kombinasi Ketamine HCl (dosis 40-75mg/kg BB) dan Xylazine (dosis 5-12mg/kg BB) (Plumb,2008). **Lampiran 2.**

- c. Terapi gel getah pohon jaran pada luka kastrasi dilakukan sebanyak satu kali sehari sebanyak 1 gram selama 8 hari (Satish *et al.*, 2010).
- d. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) dengan metode Imunohistokimia dan gambaran histopatologi kulit.
- e. Pembuatan hewan model kastrasi dibuat dijahit dengan benang silk 3/0 yang dikontaminasi dengan *Staphylococcus aureus* (10^5 CFU/ml) (Dai *et al.*, 2011). Penjahitan dilakukan dengan jarum *tapper* pola *simple continuous suture*.
- f. Perbaikan jaringan luka diamati dari preparat histopatologi luka dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

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

1. Mengetahui efek terapi pemberian gel getah pohon jaran (*Lannea coromandelica*.) terhadap perbaikan jaringan luka kastrasi tikus putih.
2. Mengetahui efek terapi pemberian gel getah pohon jaran (*Lannea coromandelica*) terhadap ekspresi TGF- β pada luka kastrasi tikus putih.

1.5 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya dan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel getah pohon jaran terhadap ekspresi TGF- β dan perbaikan penyembuhan luka kastrasi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pemanfaatan pemberian gel getah pohon jaran

diharapkan dapat digunakan sebagai terapi penyembuhan luka yang bersifat antiinflamasi dan mempercepat regenerasi luka.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Taksonomi tikus putih menurut Sharp *et al* (2010) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Sub-ordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Species : *Rattus norvegicus*



Gambar 1. Tikus Putih Galur Wistar (Sharp *et al*,2010)

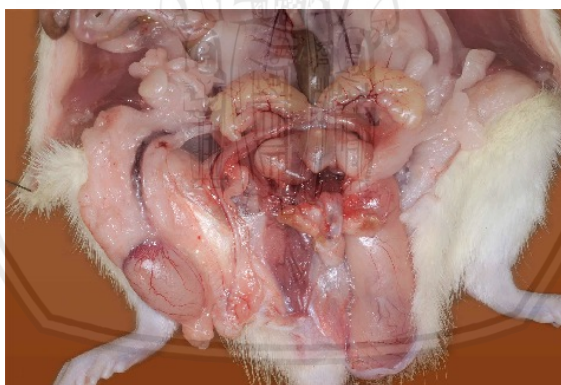
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan pertama yang didomestikasi murni untuk kepentingan ilmiah. Tikus digunakan sebagai hewan coba untuk penelitian biomedis dan pengujian pra klinik untuk mempelajari genetika, penyakit, efek obat, dan topik lainnya dalam bidang kesehatan dan medis.

Tikus wistar merupakan strain yang paling populer dan paling sering digunakan sebagai hewan coba penelitian. Ciri dari tikus wistar adalah memiliki kepala kecil, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang lebih pendek dari ukuran tubuhnya. Tikus wistar diketahui merupakan strain pertama yang ditetapkan sebagai hewan coba. Penggunaan tikus jenis ini dipilih karena mudah untuk di *handling*, reproduksinya cepat, meskipun hewan dan manusia dapat menunjukkan perbedaan anatomi dan fisiologis secara teknis tetapi secara fungsional dan genetik DNA 99% lebih mirip manusia dibanding mencit (Alexandru, 2011).

Pemilihan umur hewan coba sangat penting harus disesuaikan dengan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Untuk dapat menentukan umur tikus dapat dilihat dari beberapa hal seperti mempelajari fase – fase kehidupan dan perilakunya. Tikus putih memiliki rentang hidup 2,0 – 3,5 tahun, mulai sapih pada umur 3 minggu (21 hari), fase kematangan seksual atau pubertas mulai umur 6 minggu (40-60 hari), fase pra dewasa umur 63-70 hari, fase kematangan sosial umur 5-6 bulan (160-180hari) dan fase penuaan saat umur 15-24 bulan. Tikus umur 4–5 minggu dikategorikan sebagai tikus muda (*young*) yang belum matang seksual (*immature*); tikus umur 6–7 minggu adalah tikus pradewasa atau dewasa awal (*subadult*) yang sistem reproduksinya telah berkembang (*puberty*) namun belum mampu kawin karena spermatozoa belum motil (*infertile*); tikus umur 8–9 minggu merupakan tikus dewasa (*adult*) yang telah matang seksual dan siap kawin (*mature*) sehingga tepat dijadikan sebagai hewan model dalam penelitian sistem reproduksi dewasa. (Fitria dkk., 2015).

2.2 Kastrasi

Kastrasi merupakan suatu usaha untuk menghilangkan fungsi reproduksi hewan jantan dengan cara menghambat proses pembentukan dan pengeluaran sperma. Bahwa tujuan *orchietomy* adalah untuk mengatasi kanker prostat, kanker testis, dan gangguan penyakit atau abnormalitas pada testis. Hewan jantan yang dikastrasi pembawaannya akan lebih tenang dan pertumbuhannya cepat (Komang dan Kusumawati, 2011). Menurut Hanif (2017) kastrasi merupakan cara untuk sterilisasi reproduksi pada hewan jantan yang penting dilakukan dengan tujuan untuk menghentikan perkembangan biakan karena adanya ledakan populasi, seperti pada populasi kucing liar.



Gambar 2. Anatomi Urogenital Tikus Jantan (Low, 2016)

Prosedur kastrasi dilakukan dengan melakukan sayatan pada bagian tengah skrotum, kemudian dikuakkan lapisan tunica pada testis. Testis, vas deferens, jaringan lemak dan epidermis disayat secara perlahan. Kemudian pembuluh darah dipisahkan kemudian di ligasi dan testis dipotong. Kulit skrotum di jahit dan rata

– rata akan sembuh pada hari ke 7 hari pasca operasi. Jahitan pada kulit dapat dilepas pada hari ke 7 sampai hari ke 10 (River, 2017).

2.3 Luka Insisi

Luka didefinisikan sebagai kerusakan atau gangguan pada struktur dan fungsi anatomi normal. Luka dapat terjadi mulai dari kerusakan sederhana yang hanya merusak integritas dari epitel kulit atau dapat lebih dalam, membentang hingga ke jaringan subkutan dan merusak struktur lainnya seperti tendon, otot, pembuluh darah, dan organ parenkim bahkan dapat juga hingga merusak tulang. Luka dapat terjadi akibat proses patologis baik kerusakan patologis secara eksternal maupun internal yang melibatkan organ. Respon fisiologis dari terjadinya luka terhadap kerusakan pembuluh darah yang menyebabkan adanya perdarahan adalah dengan vasokonstriksi pembuluh darah dan koagulasi, aktivasi komplemen dan bekerjanya respon inflamasi (Gilbert *et al.*, 2016).

Proses penyembuhan luka secara normal terjadi melalui rangkaian koordinasi dinamis dan kompleks dari sel tubuh mulai dari perdarahan, koagulasi, inisiasi respon inflamasi akut terhadap luka, regenerasi, migrasi, dan proliferasi dari jaringan ikat dan sel parenkimal sintesis protein matriks ekstraseluler, remodeling dari jaringan parenkim dan jaringan ikat baru serta deposisi kolagen. Tahapan akhir dari proses penyembuhan luka adalah meningkatnya kekuatan jaringan luka. Proses penyembuhan luka tersebut terjadi pada saat yang bersamaan segera sesaat setelah terjadinya luka melibatkan serangkaian tahapan berkelanjutan yang diinisiasi oleh : (1) sel mediator inflamasi dan *growth factor*; (2) interaksi antar sel maupun interaksi matriks ekstraseluler yang akan

mengendalikan proliferasi, migrasi dan diferensiasi; (3) rangkaian epitelisasi, fibroplasia dan angiogenesis; (4) kontraksi luka ; (5) remodeling (Velnar *et al.*, 2009).

Tahapan dalam proses penyembuhan luka dapat dibedakan menjadi beberapa tahapan berdasarkan waktu penyembuhan luka. Perbaikan jaringan luka dipicu oleh adanya kerusakan yang kemudian dibedakan menjadi 4 tahapan berdasarkan waktu penyembuhan luka menurut Velnar *et al.*, (2009):

1. Fase koagulasi dan hemostasis

Sesaat setelah terjadinya luka, terjadi mekanisme fisiologis tubuh berupa reaksi koagulasi dan hemostasis yang bertujuan untuk mencegah hilangnya darah secara berlebihan. Hal ini merupakan cara untuk melindungi fungsi vital dari sistem vaskular, tujuan lainnya adalah berupa tujuan jangka panjang, yaitu untuk membuat matriks lebih menemukan sel – sel yang dibutuhkan untuk fase penyembuhan luka yang selanjutnya. Keseimbangan yang dinamis dalam penyembuhan luka terjadi antara sel endotel, trombosit, koagulasi, regulasi fibrinolisis hemostasis, untuk menentukan jumlah fibrin yang dibutuhkan di jaringan luka untuk membantu progress penyembuhan luka. Rangsangan yang dihasilkan akan menyebabkan ekstrasvasi pembuluh darah di jaringan luka kemudian terjadi reflek syaraf di sekitar jaringan luka untuk melakukan vasokonstriksi sel otot polos dengan cepat. Reflek vasokonstriksi ini hanya bersifat sementara dalam waktu beberapa menit, kemudian akan terjadi hipoksia dan asidosis pada daerah sekitar luka yang disebabkan oleh relaksasi pasif. Perdarahan dapat berlanjut jika tidak ada pembentukan fibrin plug. Untuk

membantu mencegah kehilangan darah tersebut terjadi agregasi platelet dan pembentukan clot fibrin. Komponen platelet bekerja sama dengan kolagen dan matriks ekstraseluler lainnya hingga akan memicu pelepasan *clotting factor* dari platelet hingga kemudian terjadi pembekuan darah, yang terdiri dari fibronectin, fibrin, vitronectin dan trombospondin. Pembekuan darah tidak hanya penting untuk mengikat platelet tetapi juga untuk migrasi matriks ekstraseluler untuk membantu melanjutkan proses penyembuhan luka ke fase selanjutnya, yaitu fase inflamasi. Sitoplasma dari platelet mengandung *growth factor* dan sitokin, seperti : *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), *epidermal growth factor* dan *insulin-like growth factor*. Molekul tersebut akan membantu proses penyembuhan luka dengan mengaktifkan dan mengikat neutrofil, makrofag, sel endotel dan fibroblas.

2. Fase Inflamasi

Fase inflamasi terjadi melibatkan sel inflamasi seluler dan humoral yang bertujuan untuk mempertahankan barrier sistem imun tubuh dalam melawan mikroorganisme. Fase inflamasi dibagi menjadi dua, yaitu fase inflamasi awal (*early inflammatory phase*) dan inflamasi fase akhir (*late inflammatory phase*). Fase inflamasi awal dimulai sesaat setelah terjadinya koagulasi meliputi aktivasi komplemen dan inisiasi reaksi molekuler yang menyebabkan terjadinya reaksi infiltrasi neutrofil yang berfungsi untuk mencegah infeksi. Neutrofil memiliki peranan penting untuk memfagositosis yang bertujuan untuk menghancurkan sel bakteri, maupun partikel asing yang akan merusak jaringan. Neutrofil akan mulai aktif bekerja di jaringan luka pada 24- 46 jam pasca terjadinya luka dengan

dibantu oleh *chemoattractive agents* seperti TGF- β . Aktivitas neutrofil akan berakhir dalam beberapa hari seiring dengan habisnya semua partikel asing maupun bakteri yang mengkontaminasi jaringan luka. Setelah tugas tersebut selesai neutrofil akan di eliminasi atau mengalami apoptosis tanpa diikuti oleh rusaknya jaringan lain oleh *remnants cell* dan *apoptotic bodies* yang kemudian di fagosit oleh makrofag.

Fase inflamasi akhir terjadi pada 48-72 jam pasca terjadinya luka. Makrofag akan muncul di sekitar jaringan luka diikuti dengan fagositosis oleh monosit yang berkembang menjadi makrofag. Makrofag dibawa ke jaringan luka oleh *chemoattractive agent* seperti clotting factor, komponen komplemen, sitokin (PDGF, TGF- β ,) yang bekerja untuk menghasilkan kolagen. TGF- β berperan sebagai mediator untuk mengaktifkan keratinosit, fibroblas, dan sel endotel. Penurunan dari jumlah makrofag dan monosit akan berpengaruh secara langsung terhadap proses penyembuhan luka karena akan mengganggu perlekatan antar jaringan luka disebabkan oleh terlambatnya proliferasi fibroblas dan maturasi serta akan menghambat proses angiogenesis yang menyebabkan fibrosis dan waktu penyembuhan luka menjadi lebih lama. Sel paling terakhir yang masuk dalam fase inflamasi adalah sel limfosit, 72 jam pasca terjadinya luka.

3. Fase proliferasi

Ketika terjadi cedera, haemostasis telah tercapai dan terjadi respon imun, terjadi perbaikan jaringan luka akut, maka fase proliferasi akan dimulai pada hari ketiga setelah terjadi luka dan akan berlangsung selama 2 minggu setelahnya. Fase ini ditandai dengan migrasi dari fibroblas dan pembentukan matriks

ekstraseluler baru yang berfungsi sebagai pembentuk jaringan sementara dengan membentuk fibrin dan *fibronectin*. Sehingga secara makroskopik luka akan tampak terbentuk jaringan granulasi.

4. Fase Remodeling

Fase *remodeling* merupakan fase terakhir dari penyembuhan luka. Sebagai fase terakhir fase ini berfungsi untuk perkembangan jaringan epitel baru dan pembentukan jaringan ikat terakhir. Sintesis dari matriks ekstraseluler dari fase proliferasi dan *remodeling* diinisiasi oleh perkembangan dari jaringan granulasi. Fase ini akan berakhir dalam waktu 1 hingga 2 tahun atau terkadang dalam jangka waktu yang lebih lama lagi. Bersamaan dengan maturasi dari matriks ekstraseluler diameter kolagen bertambah, *hyaluronic acid* dan fibronectin di degradasi. Kekuatan jaringan luka meningkat secara bertahap seiring bertambahnya kolagen di jaringan tersebut. Kekuatan dari kolagen fiber di jaringan luka tersebut hanya dapat kembali sekitar 80% dibandingkan kekuatan asli dari jaringan yang tidak pernah mengalami luka sebelumnya. Capaian kekuatan akhir dari jaringan ikat bergantung pada lokalisasi dan durasi dari perbaikan jaringan luka, tetapi kekuatan asli dari jaringan tidak akan pernah kembali. Sintesis kolagen terjadi secara terus menerus selama 3 minggu awal setelah terjadinya luka, proses ini disebut juga equilibrium atau *steady state*. Enzim matrix metalloprotease digunakan untuk degradasi kolagen diproduksi oleh neutrofil, makrofag dan fibroblas di jaringan luka.

2.4 Struktur Kulit Skrotum

Sistem integumen terdiri dari kulit dan struktur turunannya. Kulit terdiri atas tiga lapisan : epidermis, dermis, dan jaringan subkutan. Menurut Kolarsick, *et al.*, 2011) susunan lapisan kulit adalah sebagai berikut :

a. Epidermis

Struktur dasar dari epidermis sama pada semua mamalia, yang membedakan hanyalah ketebalan, bentuk tubuh hewan, kompleksitas dari permukaan tubuh hewan, keberadaan atau perkembangan dari stratum lucidum. Pada kebanyakan hewan coba yang telah dipelajari lapisan epidermis hewan yang tipis juga memiliki stratum korneum yang tipis dan diskontinuitas atau bahkan tidak berkembangnya stratum lucidum. Pada hewan coba tikus dari bagian yang terdapat sedikit rambut seperti mukosa hidung, telapak kaki, bibir, dan kulit di daerah sekitar os ischium (*ischial callosities*) memiliki stratum granulosum yang tipis.

b. Dermis

Dermis merupakan sistem yang terintegrasi dari *fibrous, filamentous, amorphous connective tissue* yang berfungsi sebagai penghubung dari stimulus menuju ke saraf dan jaringan vaskular, terdapat fibroblas, makrofag, dan sel mast. Sel lain yang terdapat di dermis yaitu bagian dari sel darah seperti limfosit, sel plasma, dan leukosit untuk membantu respon stimulus di dermis. Dermis berfungsi untuk melindungi tubuh cedera, mengikat air, dan juga termoregulasi. Pada dermis terdapat folikel rambut yang berfungsi sebagai sensibilitas *cutaneus* karena didekat folikel rambut terdapat saraf sensoris. Semua mamalia berambut

kecuali manusia memiliki sinus folikel rambut yang disebut sebagai *vibrissae* letaknya disekitar moncong. Pada beberapa kelompok hewan glandula sebaceous dapat membentuk sebuah organ tersendiri, misalnya pada rodensia dan *logomorph* memiliki harderian gland yang tersusun atas kelenjar sebaceous retroorbital dan dikelilingi oleh sel myoepitel. Bagian inguinal pada kelinci, bagian preputium dari tikus dan mencit semua terdiri atas kelenjar sebaceous.

c. Subkutan.

Jaringan subkutan tersusun atas lobulus sel lemak atau liposit yang memisahkan jaringan fibrosa dengan pembuluh darah dan kolagen. Jaringan subkutan ini yang membuat tubuh memiliki daya apung, dan berfungsi sebagai penyimpanan energi. Kulit skrotum memiliki struktur yang bergelombang, memiliki pigmen.

Skrotum pada sistem reproduksi jantan. memiliki bentukan anatomi yang unik pada manusia serta beberapa spesies mamalia darat lainnya. Skrotum menyambung dengan kulit bagian bawah dari abdomen, lokasinya tepat dibawah penis dan didepan anus. Dinding skrotum berupa lapisan kulit tipis dengan jaringan otot polos (*tunica dartos*). Kulit pada bagian ini mengandung pigmen lebih banyak daripada area di sekitarnya dan memiliki banyak glandula sebaceous (produksi minyak) dan kelenjar keringat dan sedikit rambut. Kedua bagian dari skrotum dari bagian luar dipisahkan oleh sekat pemisah yang disebut *raphae*. Dari bagian dalam, *raphae* menghubungkan dengan otot pemisah, sekat yang membagi skrotum menjadi dua area. Fungsi dari skrotum adalah untk melindungi testis dan menjaga testis dari suhu yang lebih rendah dari suhu tubuh. Testis akan mendekati

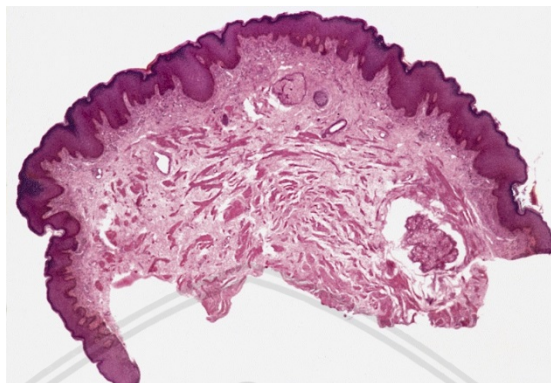
bagian tubuh jika kondisi cuaca dingin, saat tubuh bergerak, dan saat ada stimulus seksual tetapi akan mengembang lagi ketika suhu normal seperti biasanya. Skrotum pada hewan hampir menempel pada tubuh, pada tikus dan kuda testis dilindungi oleh sistem pembuluh darah disekitarnya. Kegagalan skrotum untuk mendinginkan suhu testis saat demam atau pada saat kondisi cuaca panas akan menyebabkan sterilitas sementara (Britannica, 2018). Gambaran stuktur kulit skrotum pada **Gambar 3** tersusun atas lapisan epidermis dan sebagian dermis.



Gambar 3. Gambar Potongan Melintang Kulit Skrotum (Cubilla *et al.*, 2018)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan nogueira (1977) pada kulit skrotum opossum (*Didelphis azarae*) dilaporkan bahwa kulit skrotum menutupi testis dan *spermatic cord*. Bagian epidermis skrotum terdiri dari tiga lapis tersusun atas sel pipih di bagian paling superficial dan mengandung sedikit granula keratohyalin. Bagian dermis terdiri dari lapisan tipis dari jaringan ikat padat dan terdapat sel melanosit di bagian subepitel. Pada dermis terdapat folikel rambut dan glandula sebaceous *unilobular*. Kelenjar keringat, apokrin dan tubular dengan myoepitelial besar. Kelenjar ekstretori dibatasi oleh epitel cuboid selapis. Di bagian dalam dari dermis terdapat sedikit folikel rambut dan kelenjar keringat. Dermis menyatu dengan jaringan subkutan dibawahnya yang mengandung banyak jaringan

adiposa. *Tunica dartos* berkembang kurang baik dengan sedikit pilinan otot paralel seperti pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Berkas otot pada *tunica dartos* terletak di bawah epitel *squamous* terkeratinisasi (Cubilla *et al.*, 2018).

Tunica vaginalis parietalis dapat dilepaskan dengan mudah dari bagian kulit di atasnya. Secara mikroskopis *tunica vaginalis* terdiri dari tiga lapisan.. lapisan paling dalam terdiri dari mesothelium peritoneal dan subepitel jaringan ikat longgar yang mengandung sedikit sel. Lapisan tengah terdiri atas jaringan ikat padat dengan serat kolagen tebal yang tersusun paralel satu sama lain bercampur dengan fibroblas dan fibrosit. Serabut sarat myelin dan kantung melanosit terkadang ditemukan di lapisan ini. Lapisan paling luar terdiri dari substansi dasar dan beberapa jenis sel. Jumlah melanin yang sangat banyak di skrotum berhubungan dengan fungsi skrotum itu sendiri sebagai termoregulator dari testis.

2.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri flora normal pada kulit dan selaput mukosa, termasuk jenis bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0.7 – 1.2 μm (**Gambar 5**), susunan bentuknya tidak teratur mirip seperti anggur, bersifat fakultatif anaerob, tidak membentuk spora dan non motil dan tumbuh optimal

pada suhu 37°C. Pada media padat, koloni bakteri tumbuh berwarna abu - abu hingga kuning keemasan, bentuk halus, sedikit menonjol, bundar dan berkilau (Fischetti, *et al.*, 2000).

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Ferianto (2012) adalah sebagai berikut :

Divisi : Protophyta

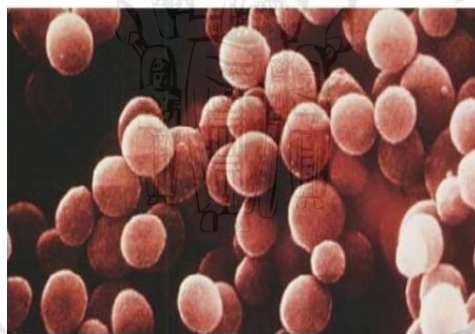
Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Famili : Micrococceae

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*



Gambar 5. *Staphylococcus aureus* pada mikroskop elektron (Emilda *et al.*, 2016)

Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi pada luka karena memiliki faktor virulensi yang terdiri dari :

1. Protein permukaan seperti protein adhesin, hemagglutinin, glikoprotein dan fibronectin yang berperan untuk kolonisasi pada jaringan tubuh hospes.
2. Invasin seperti leukocidin, kinase, dan hyaluronidase yang membantu penyebaran bakteri ke dalam jaringan.

3. Faktor permukaan yang menghalangi fagositosis bakteri oleh sel imun seperti kapsul dan protein A.
4. Faktor kimia seperti karotenoid dan produksi katalase yang meningkatkan ketahanan bakteri saat di fagositosis.
5. Reaksi imunologis (Protein A, koagulase dan *clotting factor*).
6. Toksin perusak membran (hemolysin, leucotoxin, leukocidin) dan eksotoksin (Dewi, 2013).

Spesies bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dibedakan dengan *Staphylococcus* lainnya menggunakan media diferensial MSA (*Mannitol Salt Agar*) karena spesies *S. aureus* dapat memfermentasi mannitol yang terdapat dalam media sehingga koloni menjadi kuning, sementara *Staphylococcus* yang lain tidak dapat memfermentasi mannitol. Selain itu MSA juga dapat digunakan sebagai medium selektif untuk menentukan *Staphylococcus* pathogen karena *Staphylococcus* yang tidak pathogen tidak dapat tumbuh di MSA (Murwani, 2015).

Spesies bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dibedakan dengan *Staphylococcus* lainnya menggunakan media diferensial MSA (*Mannitol Salt Agar*) karena spesies *S. aureus* dapat memfermentasi mannitol yang terdapat dalam media sehingga koloni menjadi kuning, sementara *Staphylococcus* yang lain tidak dapat memfermentasi mannitol. Selain itu MSA juga dapat digunakan sebagai medium selektif untuk menentukan *Staphylococcus* pathogen karena *Staphylococcus* yang tidak pathogen tidak dapat tumbuh di MSA. Uji katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus* sp dengan *Streptococcus*

sp. Uji koagulasi dapat dilakukan untuk mengetahui patogenesis *S.aureus*. (Murwani, 2015).

2.6 Gentamisin Sulfat

Penggunaan antibiotik saat ini banyak dimanfaatkan untuk mencegah infeksi akibat rusaknya jaringan kulit pada penanganan luka. Gentamisin sulfat merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang memiliki efek farmakologi untuk melawan infeksi dari berbagai strain bakteri meliputi : *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella*, *non pigmented serratia* dan juga *Staphylococcus aureus* (Jasmadi dkk., 2016). Golongan Aminoglikosida meliputi amikasin, gentamisin, neomisin, netilmisin, streptomisin dan tobramisin semua aminoglikosida bersifat bakterisidal. Gentamisin merupakan aminoglikosida yang banyak dipilih dan digunakan secara luas untuk terapi infeksi. Gentamisin memiliki spektrum antibakteri yang luas, tetapi tidak efektif terhadap kuman anaerob, serta memiliki aktifitas yang lemah terhadap *Streptococcus hemolyticus* dan *pneumococcus* (Pionas, 2018). Gentamisin sulfat menghambat banyak galur *Staphylococcus* dan koliform serta bakteri gram negatif lainnya. Obat ini aktif sendiri, tetapi juga sinergistik dengan antibiotik golongan β -laktam terhadap *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Sternotrophomas*, dan basil gram negatif lainnya. (Deck dan Winston, 2013).

2.7 Pohon Jaran (*Lannea coromandelica*)

Lannea coromandelica merupakan salah satu tanaman herbal medis yang penting digunakan dalam sistem pengobatan tradisional orang pribumi. Pohon

Jaran anggota dari keluarga Anacardiaceae dikenal sebagai Jhingini dalam bahasa Sanskerta, woderatau Pohon Ash India.

Taksonomidaripohonjaranadalahsebagaiberikut :

Kingdom : Plantae
Filum : Magnoliophyta
Kelas : Spermatophyta
Ordo : Sapindales
Family : Anacardiaceae
Genus : Lannea
Spesies : *L. Coromandelica*



Gambar 5. Pohon Jaran (Ravikumar, 2017).

Jenis tanaman ini banyak terdapat di Asia tropis. Kulit batangnya berguna dalam mengobati luka, memar, bisul, ophthalmia, asam urat, stomatitis ulseratif, odontalgia, keseleo, diare dan disentri (Prajapathi dan Kumar, 2005). Getah batang pohon jaran juga berguna dalam bisul kusta dan rebusan kulit batang dapat

digunakan untuk mengobati sakit gigi dan masalah gusi serta dapat digunakan dalam menorrhagia dan metorrhagia (Shashikanth *et al.*, 2014).

Berdasarkan temuan hasil dari penelitian Kaur *et al.*, (2013) disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang *L. coromandelica* memiliki potensi besar sebagai antimikroba dan senyawa antijamur terhadap mikroorganisme dan dapat digunakan dalam pengobatan yang disebabkan oleh mikroorganisme. Kandungan dari ekstrak kulit pohon jaran adalah senyawa etanolik. menunjukkan aktivitas yang lebih kuat terhadap semua bakteri yang diuji. Namun, hasil uji ekstrak kulitbatang *L. Coromandelica* menunjukkan hasil efektivitas sebagai anti jamur. Oleh karena itu, *L. coromandelica* bisa dipilih untuk analisis lebih lanjut sebagai anti bakteri yang dapat digunakan untuk menemukan produk alami bioaktif yang dapat berfungsi sebagai petunjuk dalam pengembangan antimikroba baru yang mengatasi masalah terapeutik yang belum terpenuhi.

Pohon jaran (*Lannea coromandelica*) merupakan jenis tanaman herbal medis yang banyak tumbuh di daerah tropis dan penting digunakan dalam metode pengobatan tradisional terhadap konjungtivitis, diabetes, tukak lambung, odontalgia, disentri, dan diare (Wirastuty, 2016). Bahankimia yang terkandung dalam *Lannea coromandelica* antara lain, polifenol (tannin, dihidroflavonol), flavonoid (quercetin, kaempferol, isoquercetin). Flavonol (physicion, leucocyanidine, leucodelphidin, dan leucodelphid). Sterol (β -sitosterol), saponin, dan antioksidan (Shahriyaret *al.*, 2016). Flavonoid merupakan senyawa golongan fenol memiliki aktivitas antiseptik, sedangkan saponin memiliki kemampuan sebagai pembersih sehingga efektif dalam

proses penyembuhan luka. Bahankimia yang terkandung dalam pohon jaran memiliki aktivitas antiinflamasi, antinosisseptif (Sathish *et al.*, 2010). Kulit batang dari pohon jaran berguna dalam mengobati luka, memar, bisul, ophalmia, asam urat, stomatitis ulseratif, odontalgia, diare dan disentri (Prajapathi dan Kumar, 2005). Kulit batang pohon jaran mengandung aktivitas antimikroba, aktivitas trombolitik, antioksidan yang dapat membantu proses penyembuhan luka dan mencegah terjadinya infeksi nosokomial pada luka pasca operasi. Penggunaan getah pohon jaran dalam bentuk sediaan gel karena gel memiliki kelebihan seperti stabilitas yang baik, berupa sediaan halus, mudah terdistribusi merata, mudah digunakan, mudah disimpan, mampu menjaga kelembapan kulit (Kuncari dkk., 2014).

2.8 Gel

Obat topikal merupakan salah satu obat yang sering dipakai untuk terapi dermatologi. Obat topikal tersedia dalam berbagai pilihan bentuk sediaan. Jenis obat topikal ini mengandung dua komponen dasar, yaitu zat pembawa (vehikulum) dan zat aktif. Zat aktif merupakan komponen obat topikal yang berfungsi untuk memberi efek terapeutik, sedangkan zat pembawa adalah bagian inaktif dari sediaan obat topikal yang dapat berupa bahan cair maupun padat yang berfungsi untuk membawa zat aktif tersebut berkontak dengan kulit. Zat pembawa yang ideal harus mudah dioleskan, mudah dibersihkan, tidak mengiritasi, dan menyenangkan dari segi kosmetik (Yanhendri, 2012). Salah satu pilihan sediaan obat topikal adalah gel.

Sediaan gel secara topikal dapat meningkatkan efektivitas dan kenyamanan. Keuntungan lain sediaan gel antara lain mudah merata apabila dioleskan pada kulit, memberikan sensasi dingin, dan tidak menimbulkan bekas di kulit (Yulia dkk., 2012). Menurut Sayuti (2015) gel adalah sediaan semipadat yang terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar terpenetrasi oleh suatu cairan. Sediaan gel dipilih karena mudah mengering, membentuk lapisan film yang mudah dicuci dan memberikan rasa dingin di kulit. Untuk mendapatkan formula optimal gel dilakukan secara *trial and error*. Penambahan bahan pembentuk masa gel dilakukan untuk mendapatkan karakteristik sediaan sesuai dengan spesifikasi/parameter kriteria yang diharapkan. Bahan dasar gel yang digunakan berupa CMC (*Carboxymethylcellulose*) yang berfungsi sebagai *gelling agent* (pembentuk massa gel), propilen glikol dan gliserin berfungsi sebagai humektan (zat yang dapat melembapkan) dan nipagin (metil paraben) berfungsi sebagai bahan pengawet sediaan.

2.9 Transforming Growth Factor – β (TGF- β)

Respon perbaikan luka terdiri dari beberapa rangkaian tahapan, yaitu hemostasis, proliferasi, maturasi dan remodeling. *Transforming Growth Factor – β* (TGF- β) memegang peranan penting dalam respon perbaikan luka yang disebut efek pleiotropic dari TGF- β yang meliputi proses regulasi sel proliferasi, diferensiasi, migrasi, invasi dan kemotaksis dari epitel, bagian dari sel fibroblas dan jaringan sel imun yang terlibat dari sel inflamasi, migrasi sel, dan maturasi untuk regenerasi dari pembuluh darah fungsional, proses tersebut terjadi selama

angiogenesis. *Transforming Growth Factor – β* (TGF- β) berperan dalam proses pembentukan kapiler baru sebagai mediator yang berperan mensuplai oksigen dan makanan atau nutrisi yang dibutuhkan oleh luka selama proses penyembuhan dan regenerasi jaringan luka, proses ini disebut angiogenesis. Terdapat 3 sel utama pada luka yang berperan dalam produksi *Transforming Growth Factor – β* , yaitu platelet, fibroblast, dan monosit sehingga jika terjadi kerusakan pada suatu jaringan tubuh maka secara otomatis platelet, monosit, dan fibroblast akan diproduksi secara besar besaran di dalam tubuh (Faler,2006).

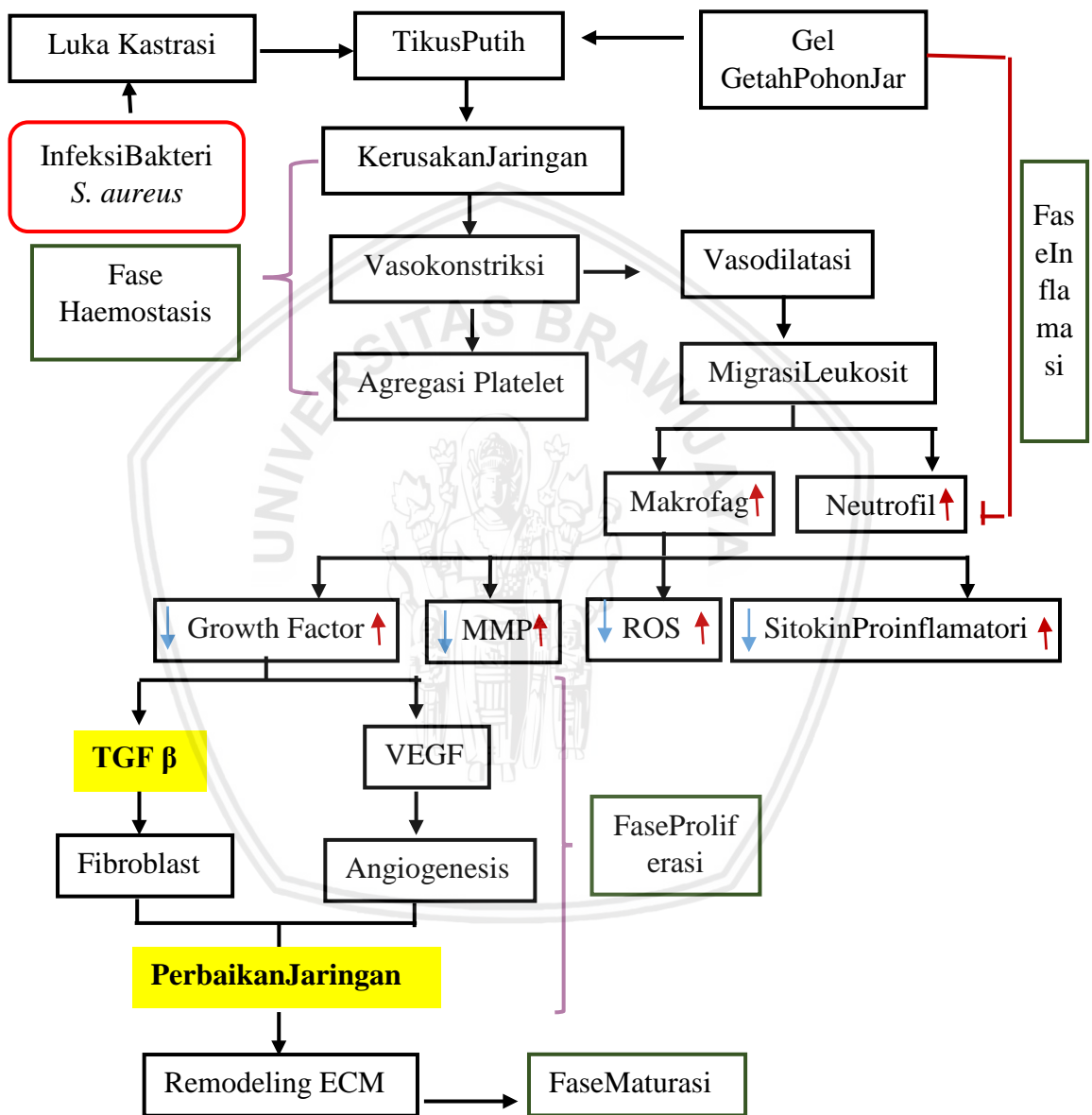
Secara fisiologis peranan TGF- β mulai melakukan interaksi yang dinamis dalam proses awal penyembuhan luka, yaitu dalam fase hemostasis dan fase inflamasi. Bersamaan dengan perlukaan pada jaringan, pembuluh darah juga mengalami ruptur dan menghasilkan pelepasan platelet (trombosit) ke sub endotel yang menyebabkan agregasi platelet, degranulasi dan mengaktifkan komponen. Platelet akan menginduksi komponen koagulasi sehingga terbentuk clot fibrin yang akan bekerja sebagai fase hemostasis. Bersamaan dengan fase hemostasis TGF- β berperan sebagai kemoatraktan dan mediator inflamasi dari beberapa sel imun, terdiri dari neutrofil dan sel polimorfonuklear (PMN) lainnya (basofil, eosinofil, sel mast, dimulai dari 24-48 jam setelah terjadi luka) dan sirkulasi monosit (48-96 jam setelah terjadinya luka. Dalam fase proliferasi terdapat 3 fase utama yang dipengaruhi oleh TGF- β , yaitu : re-epitelisasi, angiogenesis, dan sintesis ECM (*extracellular matrix*). Sebagai respon dalam perbaikan luka, sel epitelial di sekitar jaringan luka akan teraktivasi. Migrasi dan proliferasi dari sel epitelial dipengaruhi oleh kerja TGF- β yang terdapat di epidermis sebagai sitokin

hemostasis akan membantu proses hiperplasia epitel kemudian TGF- β membantu proses re-epitelisasi dan membantu penutupan jaringan luka. Peranan penting TGF- β dalam proses angiogenesis yaitu dengan melakukan invasi pada jaringan luka dengan dibantu oleh kapiler(Gilbert *et al.*, 2016).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : variabel bebas ↓ : efek gel getah pohon jaran ↓ : reaksi fisiologis
- : variabel terikat ↑ : efek infeksi *S.aureus* ⊣ : menghambat

Tahapan penyembuhan luka dimulai segera sesaat setelah terjadinya luka. Luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* akan menyebabkan kerusakan pada jaringan kulit. Fase pertama terjadi fase hemostasis yang berfungsi untuk menghentikan perdarahan. Tahapan selanjutnya adalah fase inflamasi akut yang berfungsi untuk menyingkirkan jaringan mati dan melawan mikroorganisme patogen yang menginfeksi luka. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin pro inflamatori yang berperan untuk kemotaksis dari sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaksis akan membantu sel radang (*polimorfonuklear*, limfosit, makrofag) untuk menuju jaringan luka. Sel radang akan melakukan pertahanan terhadap sel bakteri yang menyebabkan infeksi pada luka. Makrofag akan menghasilkan MMP (*Matrix Metalloproteinase*), sitokin dan radikal bebas. Apabila proses inflamasi berlangsung berkepanjangan, maka dapat menimbulkan infeksi kronis sehingga akan menyebabkan rusaknya jaringan luka sehingga waktu penyembuhan luka akan semakin lama.

Gel getah pohon jaran yang dioleskan pada luka akan menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah di sekitar jaringan luka sehingga kemudian akan menginisiasi sel mast untuk mensekresikan histamin yang dapat meningkatkan vasodilatasi dan permeabilitas dari pembuluh darah. Ketika terjadi vasokonstriksi saat itu sel endotel akan menghasilkan TGF- β untuk regenerasi pembuluh darah baru dalam dalam proses angiogenesis. Banyaknya pembuluh darah yang terbentuk di jaringan luka akan meningkatkan pembentukan fibroblas. TGF- β juga berfungsi sebagai kemoaktraktan fibroblas ke jaringan luka.

Getah pohon jaran memiliki fungsi sebagai antibakteri dan antiinflamasi sehingga dapat mempersingkat waktu terjadinya inflamasi. TGF- β juga berfungsi sebagai inhibitor terjadinya inflamasi. Setelah jumlah sel radang menurun maka akan dimulai proses proliferasi. Pada fase proliferasi sel akan mempercepat proses epitelisasi. Gel getah pohon jaran akan membantu proliferasi fibroblas sehingga membentuk jaringan granulasi dan terjadi pembentukan jaringan ikat. Tahapan terakhir dalam fase penyembuhan luka adalah remodeling atau maturasi. Dalam fase ini fibroblas mulai meninggalkan jaringan granulasi, warna kemerahan dari jaringan akan berkurang karena pembuluh darah sudah mengalami regenerasi dan serat fibrin dari kolagen semakin banyak untuk memperkuat terbentuknya jaringan ikat.

3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka hipotesa dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Terapi pemberian gel getah pohon jaran dapat memperbaiki jaringan luka kastrasi yang diamati dari preparat histopatologi kulit tikus putih.
2. Terapi pemberian gel getah pohon jaran dapat meningkatkan ekspresi TGF- β pada luka kastrasi tikus putih.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2018 di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk pembuatan benang dikontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml.
2. Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
3. Laboratorium Farmakologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk pembuatan gel getah pohon jaran.
4. Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika Malang untuk pembuatan preparat histopatologi kulit.
5. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan preparat imunohistokimia.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain : seperangkat kandang tikus, penutup kandang, spuit 1 ml, *dissecting set*, alu, mortir, gelas ukur, spatula, pemanas air, jarum taper ½ GT, osse bulat, pot sampel, pipet, glove, masker,

mikroskop, timbangan, cawan petri, cover glass dan objek glass, bunsen, *waterbath*, *biosafety cabinet*.

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain : tikus putih jantan berat 200-250 gram, akuades, Nacl fisiologis, benang silk 3/0, alkohol 70%, ketamine, xylazine, formalin 10%, bakteri *S.aureus*, CMC NA, propilen glikol, gliserin, larutan standar Mc Farland, nipagin, pakan BR 1, media *nutrient agar*.

4.3 Penetapan Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*rattus norvegicus*) jantan dengan berat 200-250 gram berumur 8-12 minggu. penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, sehingga banyaknya pengulangan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus menurut Kusriningrum (2008) :

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

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL). Rancangan acak lengkap digunakan apabila satuan percobaan homogen atau seragam. Tiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan tikus yang diterapi gel getah pohon jaran. (**Lampiran 6**). Dosis yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya

oleh Sathish *et al* (2010) tentang efektivitas salep ekstrak kulit batang pohon jaran pada luka insisi tikus putih dengan membandingkan antara ekstraksi 10% kulit batang pohon jaran menggunakan pelarut *methanol*, ekstraksi dengan pelarut *acetone* dan dibandingkan dengan *framycetin sulphate cream* sehingga dalam penelitian ini digunakan kombinasi dosis getah pohon jaran 5%, 10 % dan 15% . Kelompok perlakuan dalam penelitian ini terdapat pada **Tabel 4.1**.

Kelompok	Perlakuan
K- (Kontrol Negatif)	Tikus dikastrasi tanpa diinfeksi <i>S.aureus</i> serta terapigentamisin 0.1% selama 8 hari
K+ (Kontrol Positif)	Tikus dikastrasi dan diinfeksi <i>S.aureus</i>
P1 (Perlakuan 1)	Tikus dikastrasi dan diinfeksi <i>S.aureus</i> serta terapi gel getah pohon jaran 5% selama 8 hari
P2 (Perlakuan 2)	Tikus dikastrasi dan diinfeksi <i>S.aureus</i> serta terapi gel getah pohon jaran 10% selama 8 hari
P3 (Perlakuan 3)	Tikus dikastrasi dan diinfeksi <i>S.aureus</i> serta terapi gel getah pohon jaran 15% selama 8 hari

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas : dosis terapi gel ekstrak getah pohon jaran (*Lannea coromandelica*) dan bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml.
- b. Variabel terikat : histopatologi kulit dan kadar relatif TGF- β .
- c. Variabel kontrol : homogenitas tikus putih meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kandang serta perlakuan hewan model kastrasi.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Pembuatan gel getahpohon jaran
3. Pembuatan suspensi bakteri *S.aureus* 10^5 CFU/ml.
4. Pembuatan hewan model kastrasi
5. Terapi gel getahpohon jaran
6. Pengambilan sampel kulit dan pembuatan preparat histopatologi.
7. Pembuatan preparat imunohistokimia
8. Pengamatan histopatologi kulit
9. Pengamatan kadar relatif TGF- β
10. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan hewan coba

Sampel penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba jenis kelamin jantan dengan berat badan 200-250 gram dan berumur 8

sampai 12 minggu. Tikus diadaptasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian dan dibandingkan secara individu. Menurut (Sharp *et al*, 2010) hewan coba diberi minum secara *ad libitum* dan pakan berbentuk pelet sebanyak 10 % berat badan. Kandang tikus menggunakan kandang individu menggunakan sekat kawat sebagai penutup. Tikus tersebut dipelihara secara individu di Laboratorium fisiologi hewan.

4.7.2 Prosedur Pembuatan Gel Getah Pohon Jaran

Pembuatan gel getahpohon kayu jaran menggunakan simplisia getahbatang pohon jaran yang telah dikoleksi. Pembuatan gel menurut Wirastuty (2016) dengan menggunakan aquadest pada suhu 80°C, dilarutkan CMC (*Carboxymethylcellulose*) diaduk hingga homogen. Ditambah nipagin sampai larut dan homogen. Propilenglikol dan gliserin diaduk hingga homogen ditambahkan getahpohon jaran diaduk secara kontinu hingga terbentuk gelyang homogen (Wirastuty,2016).

Cara pembuatan gel getahpohon jaran adalah disiapkan semua bahan yang akan digunakan. Bahan ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan formulasi basis gel CMC dapat dilihat pada (**Lampiran 4**).Pembuatan gel konsentrasi 5 % dibuat dengan melarutkan getahyang telah dipanaskan 80°C. Ditambahkan CMC dan diaduk sampai homogen. Ditambahkan gliserin, getahpohon jaran, propilen glikol dan getahkemudian diaduk terus menerus hingga terbentuk gel. Prosedur yang sama dilakukan pada gel dengan konsentrasi 10% dan 15%.

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dibuat dengan mengencerkan 1 osse kultur murni *Staphylococcus aureus* dari *NA Slant* ke dalam 2 mL NB steril kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kemudian kultur cair dari *Staphylococcus aureus* disetarakan dengan larutan standar Mc.Farland No.1 (kekeruhan bakteri 3×10^8 CFU/ml). Selanjutnya biakan bakteri diencerkan menggunakan *aquadest sterile* hingga konsentrasinya menjadi 10^5 CFU/ml (Sujono,2010) terdapat pada **(Lampiran 5)**.

4.7.4 Pembuatan Benang Dikontaminasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Benang silk 3/0 yang akan digunakan dikontaminasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml. Benang tersebut dipotong sekitar 10 cm kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi pengenceran suspensi *Staphylococcus aureus* yang telah dihomogenkan selama 10 detik kemudian benang direndam selama 30 menit. (Hendarto, 2016). **(Lampiran 7)**.

4.7.5 Pembuatan Hewan Model Kastrasi Pada Tikus Putih

Perlakuan terhadap hewan model telah memperoleh persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Commitee*) Universitas Brawijaya No: 974-KEP-UB. Masing – masing tikus di beri label pada kandang individu sesuai dengan kelompok perlakuannya. Kemudian tikus putih (*rattus norvegicus*) dianestesi menggunakan kombinasi Ketamine HCl (dosis (dosis 40-75mg/kg BB) dan Xylazine (dosis 5-12mg/kg BB) (Plumb,2008). Campuran Ketamine-Xylazine 1:1 diinjeksikan melalui rute intramuskular (Plumb,2008) Perhitungan dosis anestesi terdapat pada **(Lampiran 2)**. Bagian testis tikus yang

akan dikastrasi dibersihkan dengan air sabun dan dilakukan pencukuran pada daerah skrotum kemudian di bersihkan secara aseptis menggunakan alkohol 70%. Setelah itu tikus diposisikan pada *dorsal recumbency* dan dibuat sayatan pada bagian garis tengah skrotum dengan panjang sekitar 1 cm. Buat sayatan kembali lebih dalam hingga terbuka semua lapisan *tunica*. Tekan salah satu testis hingga keluar dari lapisan *tunica*. Kemudian dipisahkan secara perlahan bagian lemak yang terdapat disekitar *spermatic cord*. Pisahkan vas deferens dan pembuluh darah kemudian lakukan ligasi pada bagian tersebut. Lakukan pemeriksaan pada ligasi di daerah pembuluh darah kemudian potong testisdengancara yang sama pada testis sebelahnya. Dilakukan penjahitan pada skrotum dengan tipe jahitan *continuoussuture* dan dibersihkan dengan NaCl fisiologis (Jimenez,2014). Gel getah pohon jaran dan gentamisin sulfat diaplikasikan sekali sehari sebanyak 1 gram selama 8 hari terapi (Satish *et al*, 2010).

4.7.6 Terapi Gel Getah Pohon Jaran

Pemberian gel getahpohon jaran sebagai terapi dilakukan satu kali sehari dengan mengoleskan gel pada luka jahitan selama 8 hari sebanyak 1 gram. Kemudian setiap hari juga penting dilakukan pengawasan terhadap luka kastrasi pada tikus putih secara makroskopis.

4.7.7 Koleksi Jaringan Kulit

Koleksi jaringan kulit pada tikus putih model kastrasi dilakukan pada hari ke 16. Euthanasi hewan coba tikus putih model kastrasi di lakukan dengan metode dislokasi *cervical*. Tikus diposisikan rebah dorsal kemudian dikoleksi organ bagian skrotum kemudian dimasukkan kedalam pot sampel berisi formalin 10%.

4.7.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Pembuatan preparat histologi menurut penelitian Setiorini (2012) terdiri dari beberapa tahapan :

a. Pemrosesan jaringan

Potongan jaringan kulit tikus yang telah dikoleksi kemudiandidehidrasidenganalkoholbertingkat (70%, 80%, 90%, dan95%) yang masing-masing selama 24 jam dan alkoholabsolut (I, II, dan III) masing-masing selama 1 jam. Tahapberikutnyaadalahinfiltrasiparafinkedalamjaringan denganmemasukkansampe l jaringan kedalamparafin cair I, II, dan III masing-masing selama 1 jam dengan suhu 60°C. Setelah itudilakukanpenanamanorgan dalamparafin (*embedding*), kemudiandibuatblok-blokjaringan sesuaiukuran organ. Blok jaringan dipotong setebal 5 μ m denganmikrotom. Hasilpotongandirendamdalamakuades (suhuruang), kemudiandimasukkankedalam akuades yang dipanaskan dalam *waterbath* (suhu 37°C).

b. Deparafinisasi

Sebelum tahappewarnaan, dilakukandeparafinisasi dan rehidrasidengancaramencelupkansediaanjaringan kedalam *xylol* III, II, dan I masing-masing selama 5 menit dilanjutkandengan alkoholabsolut III, II, dan I, alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 3 menit. Dicucidengan air kranselama 5 menit dilanjutkandenganakuades.

c. Pewarnaan Hematoxilin-Eosin (HE)

Pewarnaan jaringan diawali dengan pemberian hematoxilin selama 3 menit, lalu direndam dalam air kran selama 10 menit dan akuades selama 5 menit, dilanjutkan pewarnaan dengan Eosin selama 2 menit. Tahap pewarnaan diakhiri dengan dehidrasi pada alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, absolut I, II masing-masing beberapa detik, kemudian absolut III selama 1 menit. Lalu dilanjutkan dengan *clearing* pada *xylol* I, II selama beberapa detik dan *xylol* III selama satu menit, diakhiri dengan *mounting* (penutupannya dengan *coverglass*) menggunakan *entellan*. Sediaan jaringan yang telah selesai diwarnai kemudian diamati menggunakan mikroskop.

4.7.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat dalam *xylol* 1, *xylol* 2 dan alkohol bertingkat (100%, 95%, 90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selanjutnya ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (Bovine Serum Albumin) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer anti rat TGF- β selama semalam pada suhu 40°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder rabbit anti rat IgG berlabel biotin kemudian diinkubasi dengan strept avidin horse radish peroxidase (SAHRP) selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci

kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetes dengan kromagen *diaminobenzidine* (DAB) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *mayerhematoxylin* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Preparat di mounting dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x dengan lima bidang lapangan pandang. Hasil pengamatan ekspresi TGF- β tampak warnanya kecoklatan (Setiorini, 2012). Hasil pewarnaan diamati dengan *software immunoratio*.

4.8 Analisa Data

Data hasil pengamatan ekspresi TGF- β (*Transforming Growth Factor – β*) diamati dengan *software immunoratio* dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Sedangkan data hasil pengamatan preparat histopatologi kulit dianalisis secara kualitatif dengan metode deskriptif berdasarkan perbaikan jaringan luka dengan bantuan optilab dengan perbesaran 100x dan 400x.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah dikastrasi dengan melakukan insisi pada bagian kulit skrotum diberikan terapi gel getah pohon jarak dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% pada daerah luka tersebut. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah tanda-tanda penyembuhan luka setelah luka diberikan terapi getah pohon jarak dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% secara mikroskopis. Sebelum sampel diproses menjadi preparat histologi, terlebih dahulu dilakukan pengamatan secara makroskopis yang dinilai dari adanya gejala inflamasi pada daerah luka, kerapatan penutupan luka, serta pembentukan keropeng di daerah luka.

Gambaran makroskopis jaringan kulit pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3 yang telah dilakukan insisi pada bagian kulit skrotum dapat dilihat pada **Gambar 5.1**. Kelompok tikus kontrol negatif (**Gambar 5.1 A**) yang diberi perlakuan insisi dan diterapi dengan gentamisin sulfat 0.1% tanpa infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan luka telah menutup dan permukaan luka sudah bersih dari keropeng. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.1 B**) yang diberi perlakuan insisi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* tanpa di beri terapi pada daerah luka belum menutup, masih terdapat gejala inflamasi berupa edema dan kemerahan. Pada kelompok perlakuan 1 dilakukan insisi pada kulit skrotum,

diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diterapi menggunakan gel
getah pohon jaran pada bagian luka dengan konsentrasi



5% (**Gambar 5.1 C**) menunjukkan kemerahan memudar, terdapat sedikit keropeng dan lukamasi sedikit terbuka. Pada kelompok perlakuan 2 yang telah dilakukan insisi pada kulit skrotum, diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diterapi menggunakan gel getah pohon jaran pada bagian luka dengan konsentrasi 10% (**Gambar 5.1 D**) menunjukkan luka yang telah menutup dan tidak terdapat keropeng. Pada kelompok perlakuan 3 yang telah dilakukan insisi pada kulit skrotum, diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diterapi menggunakan gel getah pohon jaran pada bagian luka dengan konsentrasi 15% (**Gambar 5.1 E**) menunjukkan luka yang masih belum menutup, dan masih terdapat keropeng.

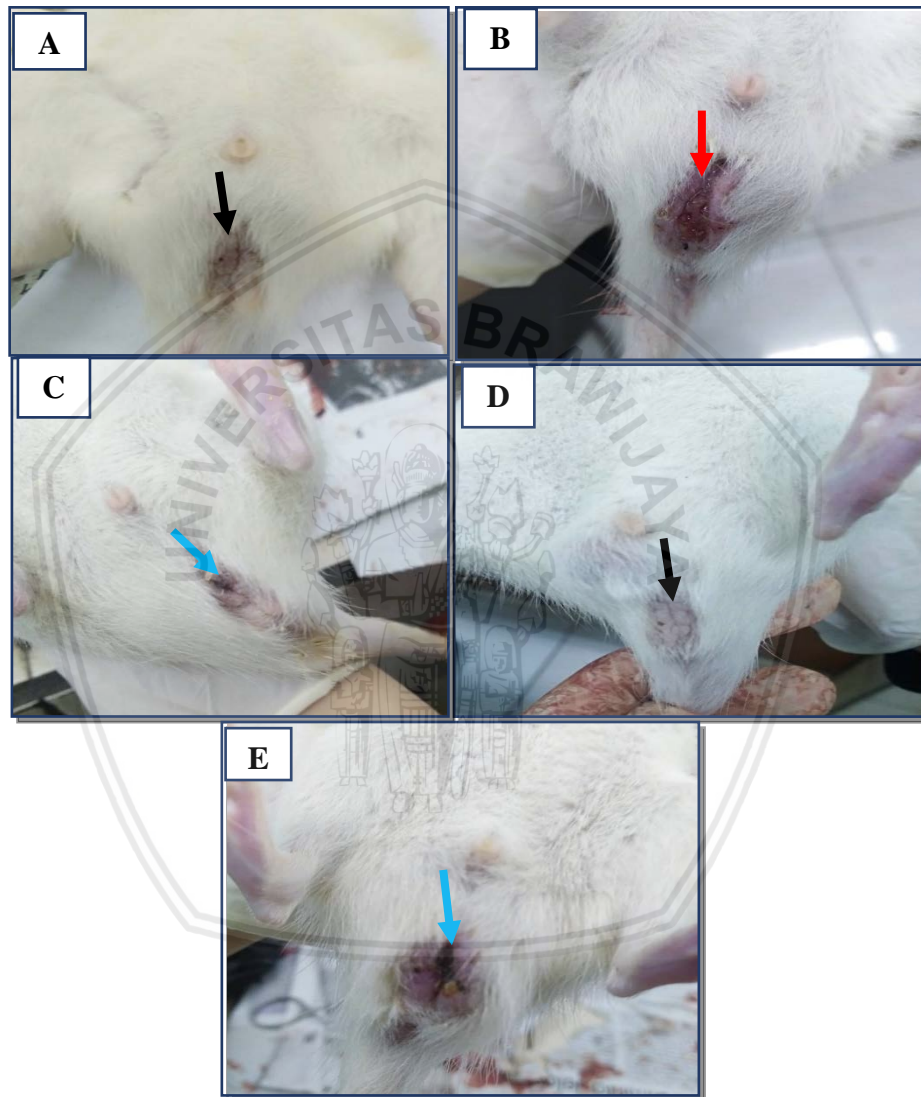
Berdasarkan gambaran makroskopis kelompok kontrol positif memiliki gambar klinis luka yang paling buruk ditandai dengan masi tampak adanya rubor (warna kemerahan) serta tampak lembab dan belum menutup yang menandakan bahwa luka masih berada dalam fase inflamasi. Kondisi luka pada tahap inflamasi akan menunjukkan gejala klinis edema, kemerahan, dan nyeri (Alvregat al., 2015). Pada kelompok kontrol positif tidak diberikan terapi sehingga proses penyembuhan luka hanya mengandalkan reaksi fisiologis dari tubuh hewan. Secara normal tubuh akan berusaha menormalkan kembali kondisi abnormal dengan proses penyembuhan secara alami. Tahap fisiologis penyembuhan luka terdiri dari fase inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Fase inflamasi berlangsung dari mulai terjadinya luka sampai kurang lebih hari ke 3 dengan tujuan untuk mengeliminasi benda asing yang dapat memperparah kondisi luka (Wombeogo & Kuubire, 2014).

Gangguan penyembuhan luka yang terlihat pada kelompok kontrol positif adalah adanya warnakemerahan atau hiperemi.

Hiperemi merupakan bentuk perubahan vaskular yang merupakan salah satu komponen utama pada respon inflamasi akut. Respon ini berlangsung selama 24-48 jam pertama dan dapat menetap hingga 2 minggu pascaperlakuan. Selain itu gejala adanya inflamasi adalah adanya perubahan vaskular (yaitu ditandai dengan adanya warnakemerahan rubor) pada kulit yang disertai dengan rasa hangat (kalor), nyeri (dolor) dan pembengkakan (tumor) (Yunanda dan Rinanda, 2017).

Adanya infeksi bakteri *S.aureus* juga dapat menghambat fase penyembuhan luka sehingga kondisi luka semakin parah dan waktu penyembuhan luka menjadi lebih lama. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu patogen utama yang dapat menyebabkan infeksi pada mukosa kulit atau pada jaringan luka (Rosalina dkk., 2010) bahkan dalam kondisi infeksi yang parah bakteri *S.aureus* dapat menyebabkan infeksi piogenik dan sepsis pada saat masa penyembuhan pasien pascakabedah (Ekawati dkk., 2018). Infeksi bakteri pada luka dapat memperparah kondisi luka sehingga waktu penyembuhan lebih lama karena adanya inflamasi sehingga berdasarkan makroskopis kelompok kontrol negatif menunjukkan hasil penyembuhan luka yang lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan karena kontrol positif mendapat perlakuan infeksi bakteri dan tidak diberikan terapi tambahan hanya mengandalkan respon fisiologis normal

daritubuhhewanbasedangkan pada
kelompokkontrolnegatifpenyembuhanlukanyalebihcepat dan
lebihbaikkarenamemangtidakdiinfeksi bakteri dan selainitu juga diberiterapi.



Gambar 5.1. Gambar Makroskopis Luka Pada Tikus Model Kastrasi Hari Ke 9.

Keterangan : A. Kontrol(-) (→) lukamenutup.

B. Kontrol(+) (→) terdapatgejalainflamasi.

C. P 1, (→) lukamenutup, (→) terdapatkeropeng.

D. P 2, (→) lukamenutup.

E. P 3, (→) terdapatkeropeng

Kelompok perlakuan 2 merupakan tikus yang diberi perlakuan kastrasi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian diterapi menggunakan gel getah pohon jaran dengan konsentrasi 10% menghasilkan penyembuhan luka yang paling optimal dibandingkan kelompok perlakuan lainnya yaitu kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan kastrasi dan diinfeksi bakteri menggunakan terapi gel getah pohon jaran pada bagian luka dengan konsentrasi 5% dan kelompok perlakuan 3 dengan perlakuan kastrasi dan diinfeksi bakteri menggunakan terapi gel getah pohon jaran pada bagian luka dengan konsentrasi 15%. Berdasarkan gambar klinis luka pada kelompok P2 kondisi luka sudah menutup, dan tidak ada keropeng. Terbentuknya keropeng menunjukkan bahwa luka sudah memasuki tahapan proliferasi karena pada saat itu terjadi migrasi yang melibatkan pergerakan sel epitel dan fibroblas ke area luka untuk menggantikan jaringan yang rusak kemudian sel akan beregenerasi di tepi dan menutup bagian yang luka di bawah keropeng disertai dengan penebalan epitel (Lestari dkk., 2016). Berdasarkan gambar makroskopis penyembuhan luka yang paling optimal didapat dari dosis getah pohon jaran dengan konsentrasi 10% yang menunjukkan keropeng sudah mulai mengelupas. Hal ini berarti luka sudah semakin membaik.

Terkelupasnya keropeng terjadi karena jaringan di bawahnya sudah mengering dan tepi-tepi luka mulai tertarik ke tengah. Hal tersebut baru dapat terjadi setelah sel-sel baru pada jaringan luka sudah terbentuk (Vonnadkk., 2015). Namun karena pengamatan secara makroskopis hanya dilakukan secara visual

pada bagian luarnya sehingga hasil yang diperoleh bersifat subjektif maka diperlukan pengamatan secara histopatologi agar hasil yang diperoleh lebih akurat.

5.1 Pengaruh Pemberian Gel Getah Pohon Jaran (*Lanneacoromandelic*) Terhadap Histopatologi Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Kastrasi

Kulit merupakan suatu jaringan yang memiliki peranan penting sebagai pelindung tubuh yang melapisi seluruh bagian tubuh dengan fungsi untuk melindungi jaringan yang berada di bawahnya. Jaringan kulit tersusun atas beberapa lapisan utama, yaitu lapisan epidermis, dermis dan hipodermis atau subkutan. Lapisan epidermis sendiri memiliki beberapa lapisan penyusun, antara lain stratum korneum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basale atau stratum germinativum. Pada lapisan dermis memiliki dua lapisan penyusun, yaitu stratum papilar dan retikular (Junquiera, 2007). Perlakuan insisi pada hewan coba akan menyebabkan kerusakan hingga mencapai bagian subkutan. Proses reepitelisasi pada luka bertujuan untuk mengembalikan kondisi dan struktur normal dari kulit tersebut. Pada penelitian ini dilakukan kastrasi yang menyebabkan luka pada bagian kulit skrotum tikus.

Penyembuhan luka melibatkan beberapa tahapan, yaitu pada fase hemostasis *clot fibrin* yang berfungsi menutup luka sementara dengan membentuk keropeng yang akan lepas dari permukaan luka setelah 10-18 jam tergantung jenis dan kedalaman luka. Keropeng terdiri atas fibrin dan sel mati (neutrofil). Pada fase inflamasi terdiri dari aktivasi platelet yang digunakan untuk pembentukan *clot*

fibrin dan sekresiagenkemotaksis yang kemudian diikutiirekrutmenneutrofil yang bertugasmembersihkanlukadari bendaasingtermasukbakteri, sel T bertugasuntukmengatasiinflamasi dan rekrutmenmonosit), sertaaktifasimakrofaguntukmembersihkan debris (Su and Richmond, 2015).Peranandarifaseinflamasiadalahuntukmembersihkanlukadari antigen dan molekulsebelummemperbaikikulit.

Faseperbaikanjaringanlukadilakukandengancaramemulihkanbagiandarikulityang rusakseperti epidermis (melalui fasereepitelisasi), dermis, dan struktur pembuluhdarah. Saatterjadilukanormalnyaterjadipenebalan epidermis yang sifatnyasementara yang tujuannyaadalahmelindungijaringandibawahnya dan untuk proses regenerasijaringan.Pada fasematurasiterusterjadireorganisasikolagen dan akanmembuatjaringanmenguatkembali dalambeberapa bulan. Tujuanfasematurasiiniadalahmenyempurnakanterbentuknyajaringanbarumenjadi jaringanpenyembuhankuat dan bermutu. Adapun yang dapatdiamati pada hasilgambaranhistopatologidaripenelitianiniyaituperbaikanjaringan di area luka yang ditandaidenganpembentukanjaringangranulasihinggaterbentuknyajaringan ikat. Faseproliferasiterjadipada harike 1-2 setelafterjadiluka pada faseiniakanberkaitansecarahistologisdenganhiperplasiasepitel.

Selbaruakanmembentukmarginasi di sekitar jaringan luka dan menempel pada substratum dari epidermis dan akan menggantikansel – seldibawahnya yang rusaksecaraberganti denganselbarulainnya yang datangmenujukedaerahluka. Perlekatandarisepitel yang baruakanmembentuksatulapisanbaru pada epidermis tetapilapisantersebutnantinyaakandiresruksiuntukmengembalikanlapisan

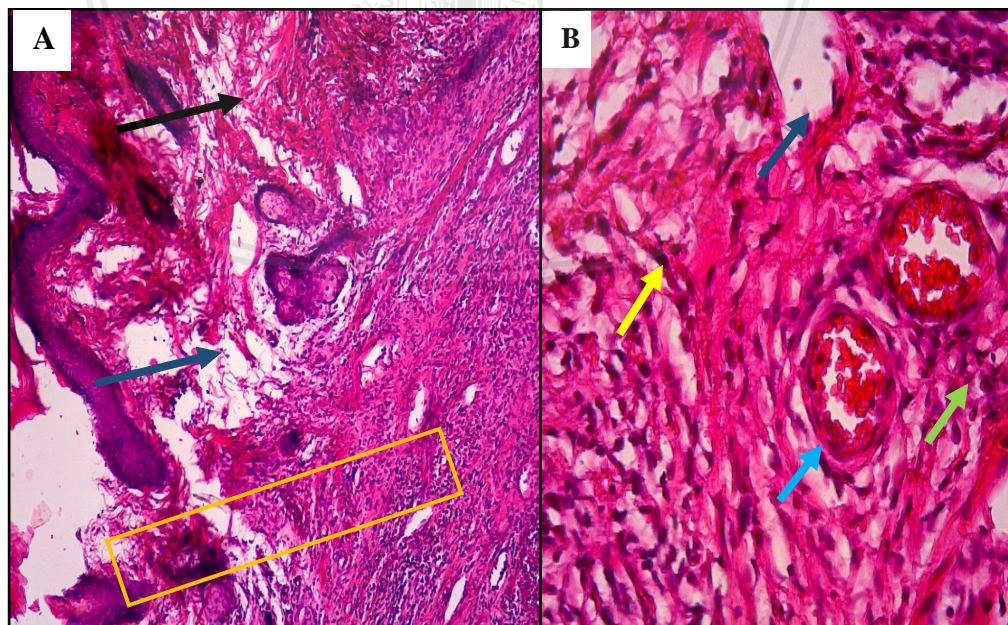
epidermis yang asli seperti semula dengan bantuan fibril kolagen tipe VII yang khusus untuk membantu proses epitelisasi (Theoret, 2107). Ketika proses granulasi dimulai dari bagian folikel rambut walaupun komponen bagian ini telah rusak akibat trauma dan jaringan ikat akan mengelilingi bagian folikel rambut. Kemudian jaringan granulasi akan bertumbuh dan menyatu dengan jaringan lain. Pada jaringan granulasi akan didapati oleh makrofag, fibroblas, dan pembuluh darah yang menempel pada lembaran matriks dari serabut kolagen, fibronektin dan asam hialuronat. Fibroblas akan mengalami kolonisasi dan memulai pembentukan jaringan granulasi dengan menghasilkan kolagen dan fibronektin seluler. Serabut kolagen akan tersusun parallel antar *dermal-epidermal junction* dan sepanjang tepi an luka (Rittle, 2016).

Pengamatan gambaran histopatologi kulit dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Pengamatan dilakukan dengan membandingkan antar kelompok perlakuan dan dianalisis secara deskriptif menggunakan perbesaran 100x dan 400x untuk mengamati perbaikan jaringan yang terbentuk pada daerah insisi. Hasil pengamatan terhadap perbaikan gambaran histopatologi kulit dapat dilihat pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2**), kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.3**), kelompok terapi gel getah pohon jaran 5% (**Gambar 5.4**), kelompok terapi gel getah pohon jaran 10% (**Gambar 5.5**), kelompok terapi gel getah pohon jaran 15% (**Gambar 5.6**).

Pada **Gambar 5.2** adalah kelompok kontrol positif perbesaran 100x yang dapat dilihat perbedaan antara area insisi dan area kulit normal pada

bagian epidermis nyata tampak daerah insisi mengalami kerusakan bagian epidermis. Pada proses penyembuhan luka yang normal perbaikan jaringan epidermis ditandai dengan permukaan epidermis sudah menutup dan epidermis akan menebal karena adanya proses reepitelisasi yang diakibatkan oleh hiperplasia sel epitel. Menutupnya epidermis pada bagian luka disebut dengan *epidermal closure* hal ini dapat digunakan sebagai salah satu parameter dalam mengamati perbaikan jaringan luka dengan mengamati pembentukan lamina basalis pada epidermis serta diferensiasi lapisan epidermis lainnya, yaitu lapisan spinosum dan granulosum (Gupta, 2015). Reepitelisasi merupakan tahapan perbaikan luka meliputi migrasi dan diferensiasi sel epitel yang akan mengembalikan integritas kulit yang hilang akibat luka. Proses reepitelisasi akan menghasilkan kembali lapisan epidermis yang utuh untuk menutup luka sehingga kembali ke keadaan normal. Semakin cepat proses reepitelisasi akan membuat struktur epidermis kulit segera mencapai keadaan normal (Kalangi, 2013). Edema dapat dilihat pada bagian bawah lamina basalis atau pada lapisan *papillary dermis* ditandai dengan pelebaran ruang antar sel karena meningkatnya jumlah cairan yang berada pada bagian interstisial (Patuzek et al., 2017). Pada **Gambar 5.2. B.** merupakan hasil perbesaran 400x merupakan hasil perbesaran daerah insisi yang menunjukkan adanya sel radang disekitar daerah insisi, terlihat adanya dilatasi pembuluh darah. Hal ini sesuai jika ditinjau dari gambaran makroskopis yang menunjukkan bahwa luka masih mengalami gejala inflamasi berupa kemerahan yang

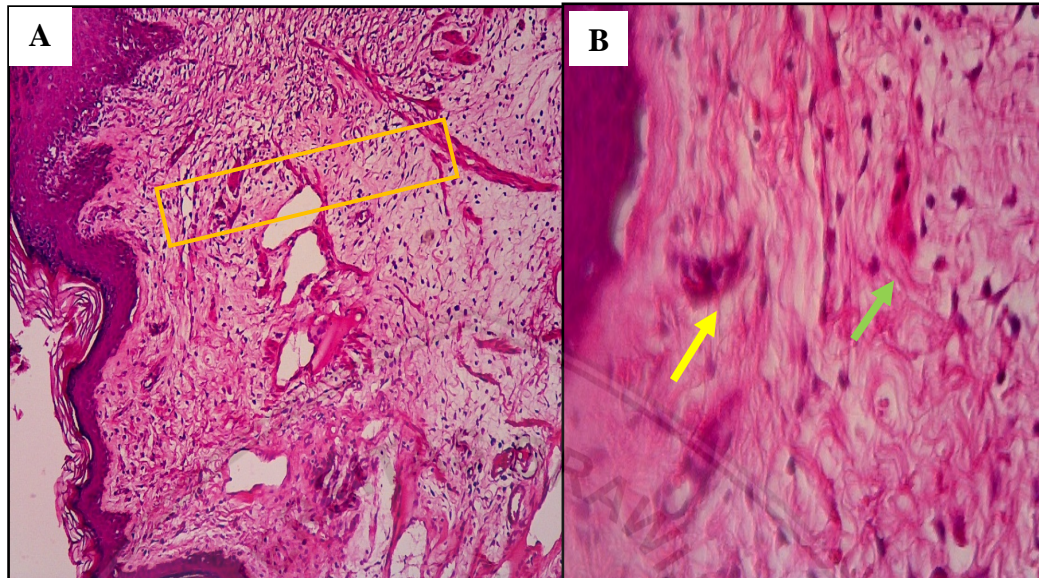
dapat dilihat pada gambar mikroskopis berupa adanya hiperemise hingga pada gambar makro tampak merah dan juga adanya edema pada gambar makro. Proses inflamasi menyebabkan perubahan permeabilitas vaskular pada berupavasodilatasi pembuluh darah untuk meningkatkan aliran darah ke jaringan lunak hingga menyebabkan gejala rubor, kemudian peningkatan permeabilitas kapiler ini menyebabkan peningkatan aliran darah serta cairan jaringan yang mengalami cedera hingga protein plasma dapat keluar dari pembuluh darah ke ruang interstisial (Gupta, 2015).



Gambar 5.2. Histopatologi Kulit Kelompok Kontrol Positif (A) 100x, (B) 400x.

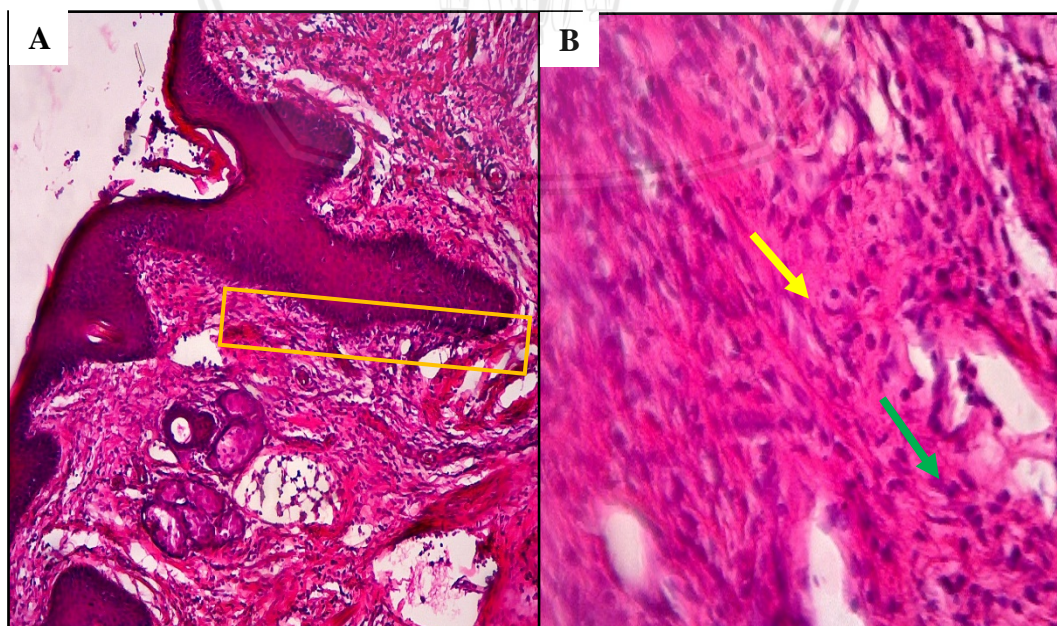
Keterangan : A. () daerah insisi, () folikel rambut, () edema.

B. lapisan dermis pada daerah insisi, (→) fibroblas, (→) makrofag, (→) hiperemi.



Gambar 5.3. Histopatologi Kulit Kelompok Kontrol Negatif. (A) 100x, (B) 400x.

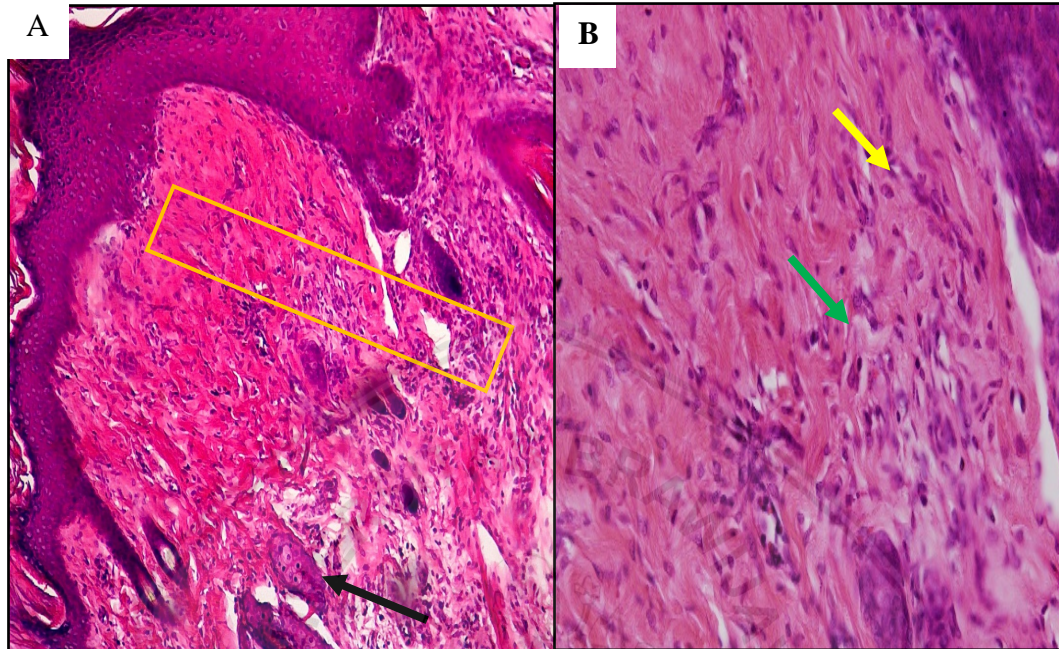
Keterangan : A. (□) daerah insisi. B. lapisan dermis pada daerah insisi, (→) fibroblast, (→) makrofag.



Gambar 5.4. Histopatologi Kulit Kelompok P1. (A) 100x, (B) 400x.

Keterangan : A. (□) daerah insisi.

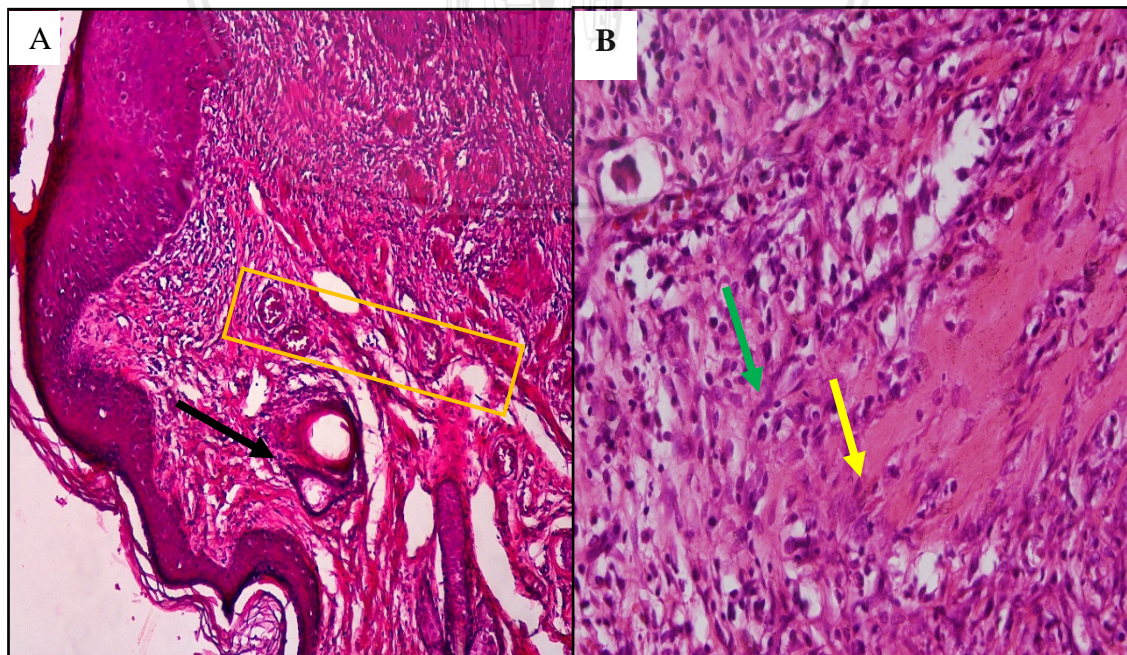
B. lapisan dermis pada daerah insisi, () fibroblas, () makrofag.



Gambar 5.5. Histopatologi Kulit Kelompok P2 (A) 100x, (B) 400x.

Keterangan : A. () daerah insisi, () folikel rambut.

B. lapisan dermis pada daerah insisi, () fibroblas, () makrofag.



Gambar 5.6. Histopatologi Kulit Kelompok P3. (A) 100x, (B) 400x.

Keterangan : A. () daerah insisi, () folikel rambut.

B. lapisan dermis pada daerah insisi, () fibroblas, () makrofag.

Kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.3**) tampak self fibroblas yang mulai membentuk susunan jaringan granulasi yang lebih rapat jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Granulasi merupakan salah satu tanda kemajuan penyembuhan luka yang terlihat pada fase proliferasi (Mandal et al., 2015). Fase ini berlangsung segera setelah fase inflamasi berakhir dan ditandai dengan proliferasi fibroblas yang sangat menonjol. Jaringan granulasi terdiri dari fibroblas, pembuluh kapiler yang baru terbentuk, makrofag dan serabut kolagen (Simon et al., 2014). **Gambar 5.3.A.** Merupakan hasil perbesaran 100x. Lapisan epidermis pada area insisi akan terlihat lebih tebal dibandingkan lapisan kulit yang normal serta memiliki jaringan ikat padat yang tidak teratur dengan serabut kolagen yang terorientasi acak.

Pada jaringan sekitar luka akan mulai terbentuk jaringan granulasi untuk memperbaiki jaringan yang rusak dan membentuk jaringan ikat baru akibat fibroblas aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke dalam area luka, kemudian akan berproliferasi serta mengeluarkan beberapa substansi yang berperan dalam membangun jaringan baru. Ketika jaringan granulasi sudah tersusun dan telah terbentuk lamina basal yang tersusun oleh kolagen tipe III maka area tersebut siap dijadikan bantalan epidermis untuk melakukan proliferasi (Parampsi, 2013) **Gambar 5.3.B.** merupakan perbesaran 400x terlihat sedikit sel makrofag, self fibroblas sudah menghasilkan serabut kolagen dan mulai terbentuk susunan jaringan ikat. Pembentukan jaringan ikat pada hari ke 7

sudah dapat diamati adanya serat kolagen matur yang akan tersusun dengan arah serat horizontal dan teratur sedangkan pada fase inflamasi susunan jaringan ikat cenderung ke arah vertikal atau radial yang tersusun acak (Sultana *et al.*, 2009).

Kelompok perlakuan terapi gel pohon jaran dengan konsentrasi 5% dapat dilihat pada **Gambar 5.4.A.** Merupakan perbesaran 100x yang dapat dilihat perbedaan antara area insisi dan area kulit normal berdasarkan penebalan epidermisnya. Area luka pada gambar histopatologi kulit ditandai dengan area kosong yang tidak ditumbuhi oleh folikel rambut, lalu kemudian pada saat jaringan luka mengalami kontraksi sudah memasuki fase remodeling folikel rambut akan mengalami migrasi umumnya pada hari ke 14. Migrasi folikel rambut erat kaitannya dengan kontraksi luka (Lemoet *al.*, 2010). **Gambar 5.4.B.** merupakan hasil perbesaran 400x merupakan hasil perbesaran daerah insisi yang terlihat sel makrofag, banyak terdapat sel fibroblas di antara jaringan granulasi.

Fibroblas berpindah menuju luka akibat adanya *growth factors* yang diekspresikan oleh makrofag dan zat kimia yang dari matriks yang rusak. Fibroblas berperan dalam sintesis kolagen dan substansi dasar sehingga merupakan salah satu sel yang berperan dalam penyembuhan luka. Fibroblas bersama dengan sel radang dan kolagen membentuk jaringan granulasi 1-2 hari setelah perlukaan (Velnaret *al.*, 2009).

Kelompok perlakuan terapi gel getah pohon jaran 10% pada **Gambar 5.5.A.** Merupakan perbesaran 100x yang dapat dilihat perbedaan antara area insisi dan area

kulit normal berdasarkan penebalan epidermisnya. Epidermis pada kelompok ini tampak mengalami penebalan karena sedang mengalami proses regenerasi epidermis agar struktur epidermis dapat kembali seperti semula (Sultana *et al.*, 2009). **Gambar 5.5.B** merupakan perbesaran 400x merupakan perbesaran daerah insisi yang terlihat sel makrofag, terdapat banyak sel fibroblas dan jaringan granulasi yang membentuk susunan jaringan ikat lebih rapat dan teratur jika dibandingkan kelompok lainnya. Fibroblas merupakan sel yang mensintesis komponen jaringan ikat. Proliferasi fibroblas dipengaruhi oleh peningkatan makrofag pada luka yang menghasilkan faktor pertumbuhan dimulai sejak hari ke-3 hingga hari ke-5 dan terus berlanjut sesuai dengan jenis luka yang terbentuk. Jaringan ikat yang terbentuk akan menghubungkan tepi luka yang menyebabkan terjadinya proses kontraksi (Shenoy, *et al.* 2009).

Kelompok perlakuan terapi gel pohon jaran 15%. **Gambar 5.6.A.** Merupakan hasil perbesaran 100x yang dapat dilihat perbedaan antara area insisi dan area kulit normal berdasarkan penebalan epidermisnya **Gambar 5.6.B.** merupakan hasil perbesaran 400x merupakan hasil perbesaran daerah insisi yang terlihat sel makrofag dan susunan jaringan ikat yang agak rapat. Penyembuhan luka setelah 7 hari pada umumnya kolagen akan membentuk ikatan interfibril yang rapat pada jaringan sehingga akan terbentuk susunan jaringan ikat horizontal dan

rapisebagai tandabawalukasudahmemasukitahapanpenyembuhan yang baik (Sultana *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dari Islam dan Tahara (2017) kandungan pohon jaran berupa flavonoid, saponin dan tannin, dihidroflavonol dan alkaloid telah dilakukan uji fitokimia dari bahan ekstrak kulit batang pohon jaran yang diekstrak menggunakan beberapa pelarut antara lain : *acetone*, *methanol*, *ethyl acetate*, *diethyl ether* serta dilakukan uji antibiotik dan hasilnya ekstrak kulit batang pohon jaran memiliki kemampuan zona hambat terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogens*. Penelitian dari Wirastuty (2016) membandingkan antara gel ekstrak kulit batang pohon jaran 3% yang diekstrak menggunakan *methanol* 70% dibandingkan dengan efek terapi dari gel basis CMC Na tanpabahan aktif juga dengan efek terapi dari gel bioplacenton, hasilnya adalah efek penyembuhan luka bakar yang paling optimal diperoleh pada kelompok perlakuan dengan terapi gel ekstrak kulit batang pohon jaran 3% hal ini disebabkan karena bahan aktif yang terkandung dalam pohon jaran adalah saponin, flavonoid dan tannin. Sedangkan pada penelitian Satish *et al* (2010) melakukan penelitian pengaruh ekstrak kulit batang pohon jaran terhadap proses penyembuhan luka insisi. Pada penelitian tersebut membandingkan antara pengaruh ekstrak kulit pohon jaran 10 % yang diekstrak menggunakan pelarut *methanol*, dan pelarut *acetone* kemudian kemampuan penyembuhan luka dari gel ekstrak kulit batang pohon jaran 10% tersebut dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diobati dengan gel

bioplacenton dan *framycetinesulphate cream* 1% dan hasil penyembuhan yang paling optimal adalah pada kelompok yang diterapi gel ekstrak kulit batang pohon jaran 10% dengan pelarut methanol pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa kemampuan penyembuhan luka insisi menggunakan antierapi ekstrak kulit batang pohon jaran tersebut disebabkan oleh kandungan bahan aktifnya yaitu berupa flavonoid dan dihidroflavonol yang memiliki aktivitas antimikroba dalam penyembuhan luka.

Kandungan flavonoid pada tumbuhan herbal telah banyak dibuktikan dapat mempercepat penyembuhan luka dengan meningkatkan proses epitelisasi. Epitelisasi yang merupakan proses pembaharuan epitel setelah terjadinya luka, melibatkan proliferasi dan migrasi sel epitel menuju pusat luka dan kontraksi luka disebabkan oleh aksi miofibroblas. Flavonoid telah dibuktikan dapat meningkatkan migrasi dan proliferasi sel epitel, pembentukan jaringan granulasi, serta meningkatkan migrasi dan aktivitas miofibroblas. Flavonoid dapat meningkatkan epitelisasi dan pembentukan jaringan granulasi pada luka yang dapat terjadi karena peningkatan produksi kolagen dan angiogenesis pada luka. Proses ini merupakan indikator proses penyembuhan luka dan menunjukkan bahwa flavonoid dapat merangsang mekanisme yang terkait dengan penyembuhan luka dan regenerasi jaringan. Studi yang dilakukan Muralidharet *al.*, (2011) menunjukkan bahwa flavonoid secara nyata dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan peningkatan laju kontraksi luka, penurunan periode epitelisasi, peningkatan deposisi kolagen, dan

terbentuknya jaringan granulasi. Saponin yang dapat memacu pertumbuhan kolagen dalam proses penyembuhan (Igbino sadkk., 2009). Kandungan getah pohon jaran selain flavonoid dan saponin, yaitu tannin. Tannin adalah salah satu golongan senyawa polifenol yang juga banyak dijumpai pada tanaman. Tannin dapat didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang dapat berperan sebagai antioksidan biologis (Noerdkk., 2018) sehingga getah pohon jaran dapat membantu proses penyembuhan luka secara optimal karena memiliki fungsi sebagai antiinflamasi, antibiotik, juga antioksidan.

Berdasarkan hasil penelitian Calsum (2018) dilaporkan bahwa pemberian terapi ekstrak tanol kulit batang pohon jaran memiliki aktivitas penyembuhan luka sayat pada tikus putih karena fungsinya sebagai astringent pada luka. Astringent adalah salah satu kelompok zat yang menyebabkan kontraksi atau penyusutan jaringan yang mengurangi suplai darah dengan *mempersempit* pembuluh darah mengurangi bengkak, dapat mengeringkan sekresi yang berlebihan dan untuk menghentikan pendarahan (Calsum, dkk., 2018).

Berdasarkan hasil pengamatan pada gambaran histopatologi kulit antar kelompok kontrol yang diterapi gentamisin 0.1% dengan kelompok perlakuan yang diterapi gel getah pohon jaran konsentrasi 5%, 10%, dan 15% gel getah pohon jaran dapat diamati bahwa terapi gel getah pohon jaran mampu membantu penyembuhan paling baik pada kelompok P2 karena luka telah melewati fase inflamasi dengan baik dan regenerasi jaringan luka sudah mengalami fase proliferasi dengan adanya proliferasi self fibroblas dan pembentukan jaringan granulasi.

5.2 Pengaruh Pemberian Gel Getah Pohon Jaran (*Lanneacoromandelic*) Terhadap Jaringan Kulit Model Kastrasi Dengan Metode IHK (Imunohistokimia)

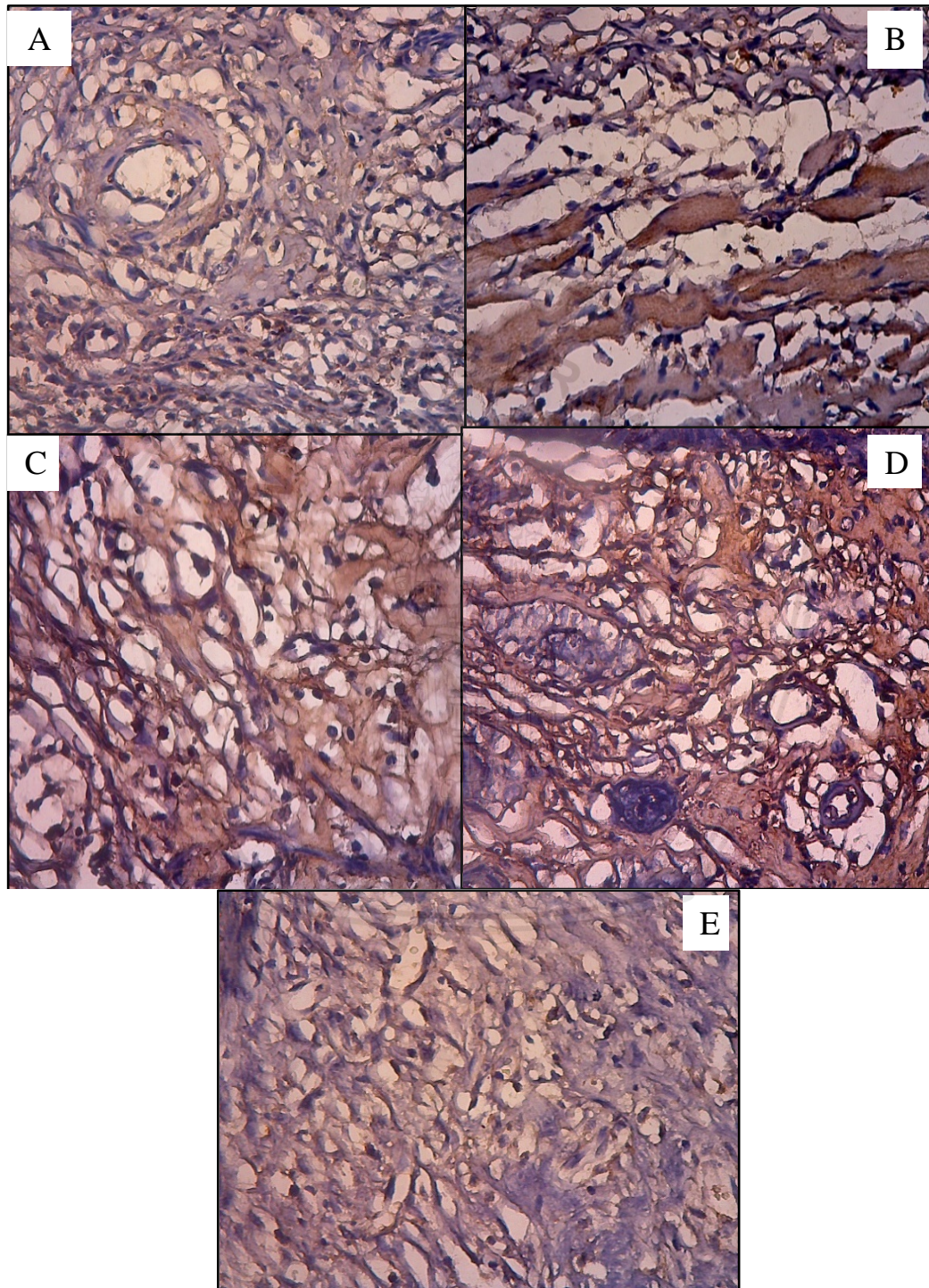
Perbaikan jaringan luka dipicu oleh adanya kerusakan pada jaringan dan kemudian akan terjadi serangkaian tahapan penyembuhan luka yang terdiri dari 4 fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi. Proses penyembuhan luka secara normal terjadi melalui rangkaian koordinasi dinamis dan kompleks dari sel tubuh mulai dari perdarahan, koagulasi, inisiasi respon inflamasi akut terhadap luka, regenerasi, migrasi, dan proliferasi dari jaringan ikat dan sel parenkimal sintesis protein matriks ekstraseluler, remodeling dari jaringan parenkim dan jaringan ikat baru serta deposisi kolagen. Pada fase proliferasi terjadi proses reepitelisasi, neovaskularisasi dan pembentukan jaringan granulasi yang dibantu oleh makrofag sebagai sel yang mampu mengekspresikan mediator kesembuhan luka, seperti faktor pertumbuhan fibroblas atau disebut juga *Fibroblas Growth Factor* (FGF), faktor pertumbuhan pengubah atau disebut *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), Interleukin dan juga *Matriks Metalloprotease* (MMP). MMP memiliki peran penting untuk aktifasi sel – sel pada matriks ekstraseluler. MMP menghancurkan sel permukaan atau sel molekul matriks ekstraseluler yang mengubah matriks atau menyebabkan interaksi sel-sel serta melepaskan *growth factor*. MMP berperan dalam migrasi sel, diferensiasi sel, pertumbuhan sel, dan juga apoptosis (Hidayat, 2015). Makrofag pada fase proliferasi akan mengekspresikan

TGF- β yang berfungsi sebagai kemotaksis fibroblas ke area luka. Makrofag merupakan hasil diferensiasi dari sel monosit yang kemudian menjadi makrofag matang. Makrofag yang aktif atau makrofag proinflamasi (M1 makrofag) berperan untuk melawan antigen salah satunya adalah bakteri, juga komponen yang rusak di sekitar jaringan luka dengan cara fagositosis. Selain itu makrofag juga berfungsi untuk mengekspresikan berbagai mediator proinflamasi dan sitokin. Dalam proses penyembuhan luka ketika makrofag telah selesai dalam mengatasi inflamasi pada jaringan yang luka secara otomatis peran makrofag tersebut akan berubah dari sel pro inflamasi kemudian menjadi sel antiinflamasi. Makrofag antiinflamasi (M2 Makrofag) dapat mengekspresikan berbagai mediator antiinflamasi, enzim protease, dan protease inhibitor, serta *growth factor* (Pratama, 2017). Selain berperan sebagai sel pro inflamasi dan antiinflamasi makrofag juga berperan penting dalam tahapan proses penyembuhan luka selanjutnya yaitu dalam tahapan fibrosis dan angiogenesis. fibrosis merupakan tahapan penting dalam penyembuhan luka untuk membantu pemulihan jaringan yang rusak dan membantu jaringan tersebut bertahan terhadap lingkungan di luar tubuh. Angiogenesis merupakan tahapan penting untuk pemulihan atau pembentukan pembuluh darah baru sehingga jaringan bisa mendapatkan suplai nutrisi secara optimal (Christina, 2015).

Transforming Growth Factor β (TGF- β)

merupakan sitokin polipeptida multifungsional yang diekspresikan oleh berbagai sel dalam tubuh seperti platelet, makrofag, limfosit T dan fibroblast. Pengukuran presentase hasil ekspresi TGF- β dilakukan dengan bantuan *software Immunoratio*. Ekspresi TGF- β diekspresikan dengan warna coklat pada area luka. Warna coklat yang muncul dihasilkan dari ikatan antara antigen pada jaringan dengan antibody yang diberikan. Antibody primer akan berikat dengan antigen pada jaringan dan antibody sekunder yang diikuti dengan perubahan enzim SA-HRP (*StreptaAvidin Horseradish Peroxidase*) dan substrat berupa kromagen DAB sehingga menghasilkan warna kecoklatan pada target yang spesifik.

Peningkatan ekspresi TGF- β pada proses penyembuhan luka bertujuan untuk membantu proses proliferasi luka. Untuk bisa memasuki fase proliferasi luka harus menyelesaikan fase inflamasi terlebih dahulu. Fase inflamasi merupakan salah satu fase terpenting untuk keberhasilan penyembuhan luka karena semakin cepat luka bisa melewati fase proliferasi maka luka dapat segera mengalami proliferasi yang artinya waktu penyembuhan luka akan semakin cepat. Pada tahapan proliferasi akan terjadi migrasi epitel untuk memperbaiki jaringan yang rusak yang ditandai dengan proliferasi sel fibroblast jaringan luka dengan bantuan faktor pertumbuhan salah satunya adalah TGF- β . Sehingga ketika memasuki fase proliferasi TGF- β akan meningkat.



Gambar 5.3 Ekspresi TGF- β Jaringan Kulit Skrotum Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Metode Imunohistokimia (Lapisan Dermis Perbesaran 400x).
Keterangan : A. Kontrol Negatif.

- B.** Kontrol Positif.
C. Terapi Gel Getah Pohon Jaran 5%.
D. Terapi Gel Getah Pohon Jaran 10%.
E. Terapi Gel Getah Pohon Jaran 15%.

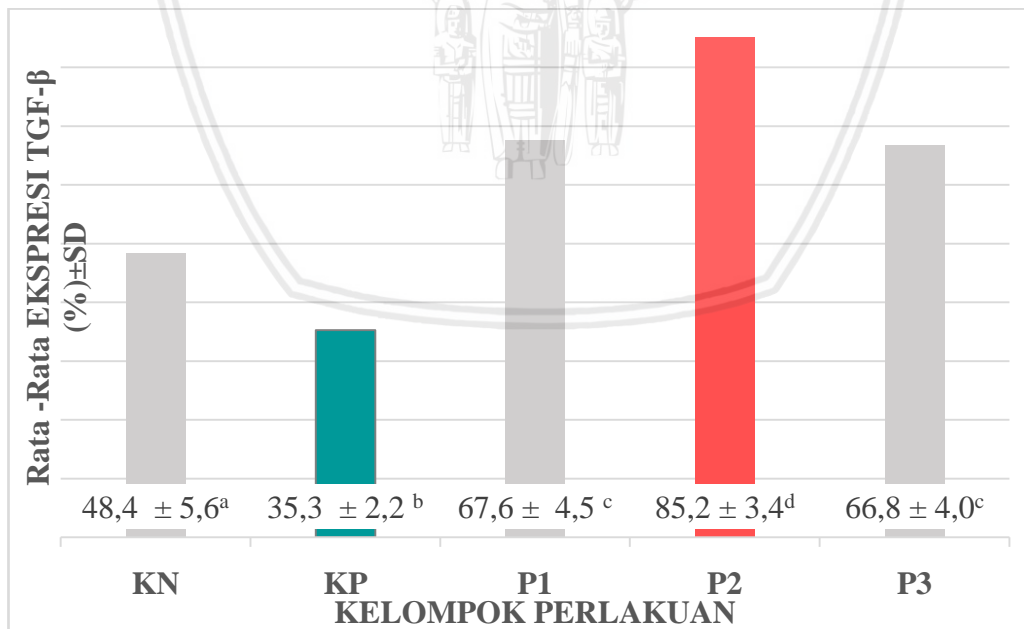
Berdasarkan **Tabel 5.1**, diketahui bahwa rata – rata ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol negatif yang diberikan perlakuan insisi tanpa infeksi bakteri *S. aureus* dan di terapi dengan gentamisin 0.1% adalah $35,265 \pm 2,160^b$. Hal tersebut menunjukkan bahwa TGF- β diekspresikan pada kondisi luka normal tanpa keadaan infeksi. Menurut Guanqun (2005) TGF- β berperan penting dalam menjaga homeostasis jaringan dengan meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel serta deposisi ECM. Pada kondisi fisiologi terjadi apoptosis atau kematian sel yang terprogram, dengan demikian diperlukan peran factor pertumbuhan seperti TGF- β untuk membantu penyembuhan jaringan luka dan meregulasi jaringan yang mati tersebut.

Tabel 5.1 Data Ekspresi TGF- β hari ke 9

Kelompok	Rata-Rata Ekspresi TGF- β (%) \pm SD	Peningkatan Terhadap K(+)	Penurunan Terhadap K(+)
Kontrol Positif	35,3 \pm 2,2 ^b	-	-
Kontrol Negatif	48,4 \pm 5,6 ^a	-	27,1%
Terapi Gel 5%	67,6 \pm 4,5 ^c	91,6%	-
Terapi Gel	85,2 \pm 3,4	141,6%	-

10%	d		
Terapi Gel	66,8	89,1%	-
15%	$\pm 4,0^c$		

Pada **Gambar 5.4** ditunjukkan histogram rata – rata ekspresi TGF- β pada semua kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok kontrol positif terlihat bahwa rata – rata ekspresi TGF- β menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan semua kelompok perlakuan sedangkan rata – rata ekspresi TGF- β yang paling meningkat ditunjukkan pada kelompok P2. Pada kelompok P1 dan P3 tidak terlalu tampak perbedaan peningkatan rata – rata ekspresi TGF- β di antara dua kelompok perlakuan tersebut tetapi terdapat peningkatan rata – rata ekspresi TGF- β jika dibandingkan dengan kontrol negatif.



Gambar 5.4 Histogram Rata – Rata Ekspresi TGF- β .

Keterangan: ■ Ekspresi TGF- β rendah.

■ Ekspresi TGF- β tinggi.

KN adalah kontrol negatif (kastrasi tanpa infeksi bakteri dan diterapi gentamisin 0.1%)

KP adalah kontrol positif (kastrasi dengan infeksi bakteri)

P1 adalah kelompok perlakuan 1 (kastrasi dengan infeksi bakteri dan terapi gel pohon jaran 5%).

P2 adalah kelompok perlakuan 2 (kastrasi dengan infeksi bakteri dan terapi gel pohon jaran 10%)

P3 adalah kelompok perlakuan 3 (kastrasi dengan infeksi bakteri dan terapi gel pohon jaran 15%).

Hasil Analisa statistik menunjukkan bahwa perlakuan lukainsisi pada tikus kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diberi perlakuan insisi dan diinfeksi bakteri *S.aureus* tanpa diterapi menunjukkan ekspresi TGF- β dengan rata-rata $48,385 \pm 5,598^a$ yang dapat digunakan sebagai acuan dalam mengetahui peningkatan atau penurunan dari ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan lainnya. Kelompok kontrol positif menunjukkan adanya penurunan rata-rata dari kelompok kontrol negatif. Hal ini dapat disebabkan karena luka pada kontrol positif masih berada pada fase inflamasi, sehingga banyak ekspresi mediator inflamasi dan terdapat sedikit faktor pertumbuhan.

Kelompok P1 yaitu tikus yang diinsisi dan diberi dan diterapi gel getah pohon jaran konsentrasi 5% menunjukkan rata-rata ekspresi TGF- β $67,575 \pm 4,500^c$ dengan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol positif yaitu adanya peningkatan ekspresi TGF- β yaitu sebesar 91,6% tetapi tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kelompok P3 yang diterapi dengan getah pohon jaran konsentrasi 15%. Hal

ini menunjukkan bahwa kelompok P1 mampu meningkatkan ekspresi TGF- β namun memiliki pengaruh yang hampir sama dengan kelompok P3.

Kelompok P2 yaitu tikus yang diinsisi, diinfeksi bakteri *S.aureus* dan diterapi dengan gel getah pohon jarak konsentrasi 15% memiliki rata-rata ekspresi TGF- β sebesar $85,22 \pm 3,403^d$ menunjukkan perbedaannya dengan kelompok kontrol positif dengan peningkatan sebesar 141,6%. Kelompok P2 menunjukkan peningkatan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok P2 lebih tinggi daripada kelompok P1 dan P2 sehingga ini menunjukkan bahwa kelompok P2 memiliki pengaruh lebih baik dalam meningkatkan ekspresi TGF- β dibandingkan kelompok P1 dan P3.

Kelompok P3 yaitu tikus yang diinsisi, diinfeksi *S.aureus* dan diberikan terapi gel getah pohon jarak konsentrasi 15% memiliki rata-rata ekspresi TGF- β sebesar $66,715 \pm 4,031^c$ menunjukkan perbedaannya dengan kelompok kontrol positif dengan peningkatan sebesar 89,1%. Namun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok P1 sehingga ini menunjukkan bahwa pemberian gel getah pohon jarak konsentrasi 5% dan 15% memiliki pengaruh yang sama dalam peningkatan ekspresi TGF- β . Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa gel getah pohon jarak dapat meningkatkan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dan berbeda nyata terhadap kelompok kontrol negatif. Ekspresi tertinggi ditunjukkan oleh kelompok perlakuan dengan terapi gel getah pohon jarak dengan konsentrasi 10%. Pemberian gel air pohon jarak pada

kelompok perlakuan adalah untuk membantu proses penyembuhan luka terutama di fase inflamasi.

Flavonoid pada pohon jaranakan menginduksi produksi transforming growth factor (TGF)-beta, yang meregulasi ekspresi matriks ekstraseluler (ECM) dan matriks metaloproteinase (MMP) yang berperan dalam migrasi sel epitel. Luka yang diberi gel

getah pohon jaran dengan kandungan zat aktif tersebut akan merangsang proliferasi fibroblas, dan fibroblas yang teraktivasi akan menyekresikan kolagen dan membentuk jaringan granulasi. Terbentuknya jaringan granulasi yang sempurna akan menutup permukaan luka.

Pembentukan jaringan granulasi mengakhiri fase proliferasi proses penyembuhan luka dan dimulai pematangan dalam fase remodeling.

Berdasarkan uji tukey hasil terapi gel getah pohon jaran pada kelompok P1 dan P3 tidak berbeda nyata karena dua kelompok tersebut memiliki notasi yang sama yang berarti bahwa hasil terapi antar kelompok P1 dan P3 tidak berbeda nyata. Hasil tersebut dapat disebabkan karena p1 menggunakan konsentrasi getah 5% sehingga terlalu rendah dan untuk konsentrasi 15% konsentrasinya terlalu tinggi sehingga tidak efektif. Jumlah pemberian yang paling efektif adalah 10%.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat disimpulkan bahwa :

1. Perbaikan jaringan lukainsisidari gambaran histopatologi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) paling optimal adalah pada terapi gel getah pohon jaran (*Lanneacoromandelica*) konsentrasi 10%.
2. Rata-rata ekspresi TGF- β paling tinggi adalah pada terapi gel getah pohon jaran (*Lanneacoromandelica*) konsentrasi 10%.

6.2 SARAN

1. Penelitian selanjutnya sebaiknya melakukan proses ekstraksi getah pohon jaran terlebih dahulu menggunakan pelarut *methanol* 70% sebelum melakukan uji fitokimia.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan konsentrasi gel lebih tinggi untuk mengetahui efektivitas dan toksisitas dari terapi gel getah pohon jaran.
3. Penelitian menggunakan bakteri *S.aureus* sebaiknya melakukan konfirmasi terlebih dahulu menggunakan media MSA (*Mannitol Salt Agar*) dan melakukan uji patogenisitas *S.aureus* menggunakan uji koagulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarenga, M.B., Francisco, A.A., Oliveira, S. M. J. V., Silva, F. M. B.; Shimoda, G. T., Damiani, L. P. Episotomy healing assesment: Redness, Oedema, Ecchymosis, Discharge, Approximation (REEDA) Scale Reliability. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2015; 23(1):162-8.
- Angelis, G. D., Murthy, A. Beyersmann, J. And Harbarth., 2010. *Estimating The Impact of Healthcare-associated Infection on Length of Stay and Costs*. *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 16. No. 12.
- Britannica. 2018. *Scrotum*. Encyclopedia Britannica Inc. <https://www.britannica.com/science/scrotum>. Diakses tgl 23 Oktober 2018.
- Calsum, Umi & Khumaidi, Akhmad & Khaerati, Khildah. (2018). Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus* L.). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*. 4. 113. 10.22487/j24428744.2018.v4.i2.11078.
- Dai, T., Kharkwal, G. B., Tanaka, M., Huang, Y., de Arce, V.C.B dan Hamblin, M. 2011. *Animal Models of External Traumatic Wound Infections Virulence*. 2(4) : 296-315.
- Deck, D. H dan Winston, L. G., 2013 Aminoglikosida dan Spektinomisin. Dalam : B.G. Katzung, S. B. Masters dan A. J. Trevor, eds. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, pp. 929-938.
- Dewi, Amalia Kusuma. 2013. *Isolasi, Identifikasi, dan Uji Sensitivitas Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sains Veteriner* 31 (2). ISSN : 0126-0421.
- Ekawati, E.R., Y, Siti N. H., Herawati, D. 2018. Identifikasi Kuman Pada Pus Dari Luka Infeksi Kulit. *Jurnal Sains Health*. Vol 2. No. 1.
- Emilda, J.K. 2016. *Bacteriological Clinical and Molecular Properties of Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*. Shodganga. Delhi University.
- Ferianto, A. 2012. Pola Resistensi *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Mastitis pada Sapi Perah di Wilayah Kerja KUD Argopuro Krucil Probolinggo Terhadap Antibiotika [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Fischetti, A. V., Novick, R. P., Ferreti, J. J., Portnoy, D. A., and Rood, J. I., 2000. *Gram Positif*. ASM Press. Washington DC.
- Fitria, Laksmindra., Mulyati., Tiraya, C.M., Budi, A.S. 2015. *Profil Reproduksi Jantan Tikus (Rattus norvegicus Berkenhout, 1769) Galur Wistar Stadia Muda, Pradewasa, dan Dewasa.* *Jurnal Biologi Papua*. Vol. 7 No. 1 hl. 29-36.
- Cubilla, A., Chaux, A. *Scrotum - normal*. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/penscrotumscrotumnormal.html> . Accessed October 20th, 2018.
- Gilbert, R.W.D., Vickaryous, M., K and Alicia, M. 2016. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoform in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Journal Dev. Biol.* 2016, 4, 21; doi; 10.3390/jdb402021.
- Gupta, Akriti., Kumar, Pramood. 2015. Assesment of The Histological State of Wound Healing. *Plastic Aesthetic Research*;2 : 239-42.
- Hanif, A., Dharmawan, M. T. T., Pangestu, A. S. 2017. *Castrate : Solusi Menekan Ledakan Populasi Kucing Lokal*. Universitas Gajah Mada.
- Hendarto, K.R.D. 2016. *Efek Terapi Salep Kitosan Cangkang Kerang Darah (Anadara granosa) Pada Hewan Model Luka Infeksi Nosokomial Pasca Operasi Berdasarkan Kadar Relatif Tgf- β dan Pembentukan Jaringan Ikat*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Isrofah., Sagiran., Afandi, M. 2015. *Efektifitas Salep Ekstrak Daun Binahong (Andera cordifolia (Ten) Steenis) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Bakar Derajat 2 Termal Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. *Muhammadiyah Journal of Nursing*.
- James, W.D., Berger, T.G., & Elston, D.M. (2006). *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology (10th ed.)*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Jasmadi, Rodi., Salim, M.N., Harris, Abdul., Aisyah, Siti., Armansyah. T., Amirudin. 2016. *Efektivitas Salep Getah Jarak Pagar 10% (Jatophracurcas Linn.) dan Gentamisin 0.1 % Terhadap Percepatan Penyembuhan Luka bakar Derajat II Pada Kulit Mencit (Mus musculus)*. *Jurnal Medika Veterinaria* Vol. 10 No. 2. E-ISSN : 2503-1600.
- Juwita, Harlystiarini, T. Widyaputri, A. Effendi, E.M Kaiin, Nurhidayat. 2010. *Tingkat pertumbuhan dan analisa protein sel-self fibroblas fetal tikus hasil kultur in vitro*. *Jurnal IPB*. Vol 1. No 2 (2010).

- Jimenez, Anna. 2014. Standard Operating Procedure Rodent Castration. *Comparative Medicine Animal Resources Centre*.
- Khan, H. A., Baig, F. K., Mehboob, R. 2017. *Nosocomial Infections : Epidemiology, Prevention, Control, and Surveillance. Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 7 (5) : 478 : 482.
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M. A., Godwin, C. 2011. Anatomy and Physiology of Skin. Chapter 1. *Journal of the Dermatology Nirsess Association*.
- Komang WS dan Kusumawati D. 2011. *Bedah Veteriner*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya : Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Kuncari, E.S., Iskandarsyah, Praptiwi. 2014. Evaluasi, Uji Stabilitas Fisik Dan Sinergis Sediaan Gel Yang Mengandung Minoksidil, Apigenin, dan Perasan Herba Seledri. *Buletin Penelitian Kesehatan*. Vol. 4 hlm. 213-222.
- Islam, Tofazzal&Tahara, Satoshi. (2000). Dihydroflavonols from *Lanneacoromandelica*. *Phytochemistry*. 54. 901-7. 10.1016/S0031-9422(00)00048-0.
- Lemo, Niksa., Marginac, Genevieve., Gomez, R.Y., *et al.* 2010. Cutaneous Reepithelization and Wound Contraction After Skin Biopsies in Rabbits : A Mathematical Model for Healing and Remodeling Index. *VETERINARSKI ARHIV*. 80 (5). 637-652.
- Lestari, Fetri., Gadri, Amila., Darma, G.C.E., Kartika, Rikka. 2016. Efek Hidrogel Jarak Cina (*Jatophramultifida* Linn.) Berbasis Keragenan Kappa dan Keragenan Iota Terhadap Penyembuhan Luka Tikus Wistar Jantan. *Jurnal Pharmacia*. Vol 6. No. 2. 117-122.
- Low, Peter., Molnar, Kinga., Kriska, Gyorgy. 2016. *Dissection of The Rat (Rattus norvegicus)*. In : Atlas Anatomy and Histology pp 325-339. Springer, Cham.
- Mandal, AM, Sene P, Manggang, RKJ. 2015. A Review on Indian Medicinal Plants and Their Role in Wound Healing Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(6):2204-2224.
- Maswadeh, H.M., Semreen, M.H., Naddaf, A.R. 2006. *Anti-Inflammatory Activity of Achillea And Ruscuc Topical Gel on Carragenan-Induced Paw Edema*

in Rats. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. Vol. 63 No. 4 pp. 227-280.

Milton, A.A.P., Priya, G.B., Aravind, M., Parthasarathy, S., Saminathan, M., Jeeva, K. Agarwal, R. K. 2015. *Nosocomial Infection and Their Surveillance in Veterinary Hospitals*. Advances in Animal and Veterinary Sciences.

Montagna, W. 1967. Comparative Anatomy and Physiology of the Skin. Archives of Dermatology, 96(4), 357. doi:10.1001/archderm.1967.0161004000

Murwani, Sri. 2015. Dasar – Dasar Mikrobiologi Veteriner. UB Press.

Nasution, I. H. 2012. *Infeksi Nosokomial*. Sumatera Utara. FK. Universitas Sumatera Utara. Vol. 39. No.1 Tahun 2012: 36-41

Pastuszek, Piotr & Krecicki, Tomasz & Zalesska-Krecicka, Maria & Jelen, Michal & Rak, Jerzy & Krajewska, B. (2017). Histological and electron microscopic investigation of Reinke's edema. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 54. 61-4.

Pionas Pusat Informasi Obat Nasional. 2018. *Aminoglikosida*. <http://pionas.pom.go.id/ioni/bab-5-infeksi/51-antibakteri/514-aminoglikosida>. Diakses 06 Oktober 2018.

Plumb, D.C. 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook. 6 th ed.* Wisconsin: Pharma Vet. Inc.

Prajapathi ND and Kumar U. *Agro's Dictionary of medicinal plants, Agrobios (India)*. 2005; pp.185.

Ravikumar, K. 2017. Raw Drug-*Lanneacoromandelic*. envis.frlht.org

Rittle, Laure. 2016. Cellular Mechanism of Skin Repair In Human And Other Mammals. *J.CellCommun. Signal*. 10:102-120.

River, Charles. 2017. *Castration : Uni Castration*. Criver Laboratories International. North America : Surgical Service.

Rosalina, Dewi., Martodiharjo, Sunarko., Listiawan, M. H. 2010. Staphylococcus Sebagai Penyebab Tersering Infeksi Penyakit Pada Semua Erosi Kulit Dermatitis Vesikobulosa. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin*. Vol. 2 No. 22.

Satish, R., Ahmed, M. H., Natrajan, K., Lalitha, K. G. 2010. *Evaluation of Wound Healing and Antimicrobial Activity of Lannea coromandelic (Houtt) Merr.* Journal of Pharmacy Research, 3 (6), 1225-1228.

- Sayuti, Mohammad. (2017). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian Dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis Hippuris*).
- Setiorini, Yeni. 2012. *Deteksi Secara Imunohistokimia Imunoglobulin A (IgA) Pada Usus Halus Tikus Yang Diberi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Enteropathogenic Echerichia Coli (EPEC)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Shenoy, C., M.B Patil, R. Kumar and S. Patil. 2009. Preliminar Phytochemical Investigation and Wound Healing Activity of *Allium cepa* Linn. (liliaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2 (2):167-175
- Shrestha, B., Porkhrel, B., and Mohapatra, T. 2009. *Study of Nosocomial Isolates Staphylococcus aureus With Special Reference to Metichicillin Resistant S.aureus in A Veterinary Care Hospital in Nepal*. *Nepal Med Cell J* 2009; 11(2); 123-126.
- Su.Y., Richmond A.2015.Chemokine regulation of neutrophil infiltration of skin wounds. *Adv Wound Care* 4:631–640.
- Sultana, Jachmen., Molla, M.R., Kamal, M. *et al.* 2009. Histological Difference In Wound Healing In Maxillofacial Region In Patients With or Without Risk Factors.
- Sumbayak, E. M., 2016. *Fibroblas : Struktur dan Perannya Dalam Penyembuhan Luka*.Bagian Histologi. Jakarta. : Fakultas Kedokteran. Universitas Kristen Krida.
- Sujono, E. 2010. *Uji Antibakteri Senyawa N-Fenil-N'-(Klorobenzoil) Tiourea Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus*. Skripsi. Unika Widya Mandala. Surabaya.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj,V., 2009. *The Wound Healing Process : An Overview of The Cellular and Molecular Mechanism*. *The Journal of International Medical Research*. 37: 1528 – 1542.
- Wombeogo, M. &Kuubire, C.B., 2014. *Trauma and Emergency Health Care Manual*, Bloomington: AuthorHouseTM UK Ltd.
- Yanhendri., Yenny, Satya Widya. 2012. *Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi*. CDK-194/Vol. 39 No.6

- Yunanda, Visa., Rinanda, Tristia. 2017. Aktivitas Penyembuhan Luka Sediaan Topikal Ekstrak Bawang Merah (*Allium cepa*) Terhadap Luka Sayat Kulit Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Veteriner*. Vol 16 No. 4 : 606-614.
- Yulia, A., Esti, H, Tutiek P., 2012, Karakteristik Sediaan dan Pelepasan Natrium Diklofenak dalam Sistem Niosom dengan Basis Gel Carbomer 940, *Pharma Scientia*, 1 (1):2.

