

TESIS

PERBANDINGAN EFEKTIFITAS TOPIKAL SERBUK CHITOSAN DENGAN TULLE PADA SEL PMN, SEL FIBROBLAS DAN EPITELISASI LUKA FULL-THICKNESS

Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorik
Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) Jantan



KK
KK: A
TKD 16/11
ROZ
P

ROZIANA

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010

**PERBANDINGAN EFEKTIFITAS TOPIKAL SERBUK *CHITOSAN*
DENGAN *TULLE* PADA SEL PMN, SEL FIBROBLAS DAN EPITELISASI
LUKA *FULL-THICKNESS***

**Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorik
Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) Jantan**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

ROZIANA

NIM. 090810201 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

Tanggal 3 Februari 2010

iii

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL : 3 FEBRUARI 2010

Pembimbing Ketua



Prof. H. Ari Gunawan, dr., MS., Ph.D

NIP. 130 531 759

Pembimbing



Moch. Wirono Aman S., dr., MS

NIP. 130 809 175

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D

NIP. 130 541 984

Diuji pada

Tanggal 3 Februari 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : H. Abdoel Kamid Iskandar, dr., MS

Anggota : Prof. H. Ari Gunawan, dr., MS., Ph.D

Moch. Wirono Aman, S., dr., MS

Hj. Iskantijah B. R., dr., MS

H. Sudibjo, dr., MS

H. Chairul Anwar, drh., MS

LEMBAR PERNYATAAN TIDAK MELAKUKAN PLAGIAT

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Roziana, dr

NIM : 090810201 M

menyatakan bahwa Tesis ini merupakan hasil karya saya sendiri, dan bukan merupakan duplikasi ataupun plagiasi (jiplakan) dari hasil penelitian orang lain. Sepengetahuan saya, topik/judul dari Tesis ini belum pernah ditulis oleh orang lain.

Apabila Tesis ini terbukti merupakan hasil duplikasi atau plagiasi (jiplakan) dari hasil penelitian orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi yang diberikan oleh Tim Penguji.

Demikian Surat Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 3 Februari 2010

Yang Menyatakan

Roziana



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 27/EC/KEPK/FKUA/2009

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

Perbandingan Efektifitas Topikal Serbuk Chitosan dengan Tulle pada Sel PMN, Sel Fibroblas dan Epitelisasi Luka Full-Thickness

**Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorik pada Tikus Putih
(*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) Jantan**

PENELITI UTAMA :

Roziana, dr (NIM: 090810201/M)

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Lab. Unit Hewan Coba Dept. Biokimia dan Lab. Histoteknik Departemen Anatomi
Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Surabaya, 28 Desember 2009

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis yang berjudul : “Perbandingan Efektifitas Topikal Serbuk *Chitosan* Dengan *Tulle* Pada Sel PMN, Sel Fibroblas Dan Epitelisasi Luka *Full-Thickness*, Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorik Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) Jantan ” ini. Penyusunan tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister dalam program studi Ilmu Kedokteran Dasar dengan minat studi Anatomi-Histologi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Dalam penyusunan tesis ini, berbagai pihak telah banyak memberikan kontribusi sehingga dalam kesempatan ini saya ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada para pembimbing yaitu H. Prof. dr. Ari Gunawan, MS., Ph.D sebagai pembimbing ketua dan dr. Moch. Wirono AS, MS sebagai pembimbing, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, serta doa restunya selama penulisan tesis maupun selama menempuh pendidikan di Bagian Anatomi-Histologi Universitas Airlangga.

Terimakasih juga sebesar-besarnya kepada penguji proposal dan tesis sekaligus dosen saya : H. dr. Abdoel Kamid Iskandar, MS., Hj. dr. Iskantijah BR., MS, H. dr. Sudibjo, MS dan H. drh. Chairul Anwar, MS yang telah memberikan banyak masukan serta pengetahuan yang bermanfaat, sehingga penulisan tesis ini diharapkan menjadi lebih baik.

Ucapan terimakasih saya hanturkan pula kepada Rektor Universitas Syiah Kuala : Prof. DR. Darni M. Daud, MA yang telah memberikan kesempatan dan izin mengikuti pendidikan magister di Universitas Airlangga; rasa terimakasih tak terhingga kepada pimpinan sekaligus dosen saya dr. Syahrul, SpS sebagai Dekan, DR. dr. Mulyadi, Sp.P sebagai Wakil Dekan I, Drs. Zulfitri, M. Biomed sebagai Wakil Dekan II, dr. Azwar Sp.THT-KL sebagai Wakil Dekan III dan DR. dr. Zinatul Hayati, Sp.MK sebagai Wakil Dekan IV serta segenap civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala atas izin, bantuan dan dorongan yang begitu besar kepada saya selama menjalani studi magister di Universitas Airlangga.

Terimakasih sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Airlangga : Prof. DR. Fasich, Apt. dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga : Prof. DR. dr. Muhammad Amin Sp. P(K) atas segala bantuan dan kemudahan yang telah diberikan selama pendidikan; Prof. DR. dr. Harjanto, JM., AIF sebagai ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) dan Prof. dr. Retno Handajani, MS., PhD selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar-S2 atas bimbingan dan dorongan yang telah diberikan selama mengikuti hingga menyelesaikan Program Magister; seluruh staf pengajar Bagian Anatomi-Histologi atas ilmu, bimbingan dan dorongan yang tak terhingga selama mengikuti pendidikan; seluruh staf pegawai Bagian Anatomi-Histologi dan Unit Laboratorium Hewan Coba atas bantuan dan kerjasamanya yang baik selama pendidikan dan proses penelitian berlangsung.

Bapak dan Umami tercinta : Drs. H. Waliyuddin Daud, M.Si dan Hj. Fauziah, S.Pd; Abang dan adik-adik tersayang : Fauzan, ST, Rosita, S. Ked dan

Mutia Hanum yang selalu senantiasa mendoakan dan memberikan dorongan serta semangat yang tinggi sehingga pendidikan dapat terlaksana dengan baik. Untuk suami tercinta : dr. Syahrul Ramadhan, atas segala jerih payah, dorongan dan perhatiannya selama ini serta yang terpenting kesabarannya yang luar biasa menjalani rutinitas tanpa didampingi istri selama 1,5 tahun terakhir ini. Kepada teman dan sahabat seperjuangan di Program Magister IKD khususnya Minat Studi Anatomi-Histologi : dr. Tri Hartini Yuliatwati atas segala dukungan, kerjasama, bantuan dan sarannya selama pendidikan dan penelitian. Dan kepada semua pihak yang tidak tercantumkan membantu terlaksananya tesis ini, saya ucapkan terima kasih atas dukungan dan doanya.

Akhirnya, dengan segenap kerendahan hati saya sebagai manusia biasa mohon maaf atas segala kekurangan. Semoga tesis ini dapat berguna bagi kita semua.

RINGKASAN

PERBANDINGAN EFEKTIFITAS TOPIKAL SERBUK *CHITOSAN*
DENGAN *TULLE* PADA SEL PMN, SEL FIBROBLAS DAN EPITELISASI
LUKA *FULL-THICKNESS*

Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorik
Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) Jantan

Roziana

Penyembuhan luka merupakan serangkaian kompleks biologis yang melibatkan sejumlah besar sel, sitokin, faktor pertumbuhan, *protease* dan komponen ekstraseluler yang berperan dalam restorasi integrasi jaringan yang rusak. Proses penyembuhan luka diperiksa dan digambarkan oleh *Schultz* sebagai suatu proses yang tumpang tindih melibatkan 5 tahap yang kompleks baik biokimia dan seluler, mencakup proses : hemostasis, inflamasi, migrasi, proliferasi dan maturasi.

Pemberian obat secara topikal ditujukan agar penetrasi obat dikulit lebih cepat dan segera mencapai target. Kegunaan dan khasiat pengobatan secara topikal didapat dari pengaruh fisik dan kimiawi obat yang diaplikasikan diatas kulit yang sakit.

Aplikasi klinis *chitosan* dan *tulle* pada penyembuhan luka khususnya luka *full-thickness* telah banyak dilakukan, namun demikian masih belum banyak penelitian yang membandingkan keduanya. Pada penelitian ini yang diamati adalah mengenai gambaran dan jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitel selama masa penyembuhan luka *full-thickness* pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

Dengan penelitian ini kami ingin mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah sel PMN, jumlah sel fibroblas dan tebal epitel pada luka *full-thickness* tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang dibandingkan antara pemberian serbuk *chitosan* dengan *tulle*.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental murni laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Design* dan data penelitian dianalisis secara statistik menggunakan Anova untuk mencari perbedaan variabel antar hari pengamatan pada kelompok dan variabel yang sama; dan *t-test* untuk membandingkan hasil parameter kedua kelompok perlakuan; dengan derajat kemaknaan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

Penelitian dilakukan dengan memberikan perlakuan berupa luka *full-thickness* dengan ukuran 1x1 cm terhadap 50 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan kedalaman hingga jaringan subkutan. 50 ekor tikus ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 25 ekor untuk kelompok *chitosan* dan 25 ekor lainnya untuk kelompok *tulle* di atas luka. Pemberian serbuk *chitosan* diberikan sebanyak 10 mg atau kira-kira menutupi seluruh permukaan luka; sedangkan *tulle* diberikan pada masing-masing luka sampai menutupi seluruh permukaan luka.

Tiap hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan hari ke-15, sebanyak 10 ekor tikus dikorbankan, yaitu 5 ekor tikus untuk kelompok *chitosan* dan 5 tikus lainnya untuk kelompok *tulle*. Luka dieksisi sekitar 0,5 cm dari tepi luka awal dimana sebelumnya diberikan terlebih dahulu penanda pada tempat pertama dilukai dengan menggunakan spidol. Hasil eksisi jaringan kulit dibuat menjadi sediaan histologi metode parafin dengan pewarnaan HE.

Sediaan diamati menggunakan teknik fotografi dan fotomikroskopi *Motic Image Plus 2.0 ML*, dengan pembesaran objektif 4x, 10x dan 40x. Sel PMN dan sel fibroblas dihitung secara manual, sedangkan tebal epitel diukur menggunakan penggaris *software Motic Image Plus 2.0 ML* kalibrasi objektif 40x dengan satuan mikrometer (mikron).

Dari data penelitian rata-rata jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitel, *chitosan* cenderung lebih awal menstimulasi munculnya sel PMN, yang kemudian menurun seiring mendekati penyembuhan; jumlah sel fibroblas muncul lebih banyak semenjak dini; dan epitelisasi yang lebih cepat dibandingkan kelompok *tulle*. Data penelitian tersebut di analisis dengan Anova 1 arah (berbeda bila $p < 0,05$), perbedaan bermakna ditemukan pada jumlah sel PMN, jumlah sel fibroblas dan tebal epitel di kelompok *chitosan* disetiap hari pengamatan;

sedangkan kelompok *tulle*, perbedaan bermakna hanya tampak pada variabel tebal epitel disetiap hari pengamatan. Untuk melihat pasangan hari pengamatan mana yang menunjukkan perbedaan dari tiap variabel, maka dilanjutkan dengan uji LSD. Dengan *t-test* menunjukkan adanya perbedaan bermakna jumlah sel PMN, jumlah sel fibroblas dan tebal epitel antara kelompok perlakuan *chitosan* dengan *tulle*.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna jumlah sel PMN, jumlah sel fibroblas dan tebal epitelisasi antara kelompok *chitosan* dan *tulle*, dimana *chitosan* cenderung menstimulasi jumlah sel PMN, sel fibroblas dan epitelisasi sejak dini sehingga diharapkan luka menyembuh lebih cepat.

Perlu dilakukan penelitian pada luka *full-thickness* pada hewan percobaan yang struktur kulit mendekati struktur kulit manusia, seperti : babi, sehingga aplikasinya lebih baik; pembuatan sediaan topikal *chitosan* dalam bentuk lain, seperti *gel*, kasa atau lainnya sehingga lebih mudah diserap dan tidak mengganggu luka.

SUMMARY

COMPARISON OF EFFECTIVENESS BETWEEN TOPICAL CHITOSAN'S POWDER AND TULLE ON PMN, FIBROBLAST AND EPITHELIZATION IN FULL-THICKNESS WOUND

**A True Laboratory Experimental Research In Male White Rats
(Rattus norvegicus strain Wistar)**

Roziana

Wound healing is a series of biological processes involving large number of cells, cytokines, growth factors, proteases and extracellular components that play a role in the restoration of damaged tissue integration. The wound healing is examined and described by Schultz as an overlapping processes that involves 5 stages biochemical and cellular processes, including: hemostasis, inflammation, migration, proliferation and maturation.

The penetration of the drug through the skin and reaching to the target can be faster through topical drug administration. The benefits and efficacy of topical treatment based on the physical and chemical effects of the drug applied over the sore skin.

Clinical application of chitosan and tulle in wound healing, particularly in full-thickness wounds have been carried out. However, the studies that comparing both of them had not been done. In this study, number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium during full-thickness wound healing in male white rats (*Rattus norvegicus* Wistar strain) are carried out.

The aim of this study is comparing the differences number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium of chitosan and tulle application on full-thickness wound.

The study was a laboratory experimental with The Post Test Only Design. Data were analyzed statistically using Anova for differences in each days of observation on every variables in the same group and t-test to compare the parameters of both groups treatment; with significance level of less than 0.05 ($p < 0.05$).

The study was conducted by giving full-thickness wounds to 50 male white rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar). The wound size is 1x1 cm, and the depth is up to subcutaneous tissue. 50 rats were divided into 2 groups : 25 rats for the chitosan group and the other for the tulle group. The chitosan's powder (10 mg) and tulle were given to cover the entire surface of the wound.

In the 3rd, 6th, 9th, 12th and the 15th days of wound healing process, as many as 10 rats were sacrificed, 5 rats from the chitosan group and 5 rats from tulle group. Wound was excised approximately 0.5 cm from the edge of the initial injury which previously awarded first marker in the first place harmed by using markers. The histological preparations were made using paraffin method with HE staining.

Preparations were observed using Motic Image Plus 2.0 ML on 40, 100 and 400 magnification. Thus PMN and fibroblasts were counted manually, while the thickness of epithelium was measured using a Motic Image Plus 2.0 ML software with a 40x objective calibration, using micrometers (microns) unit.

Data showed that the average number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium, chitosan tend to stimulate the emergence of PMN cells earlier, which then decreases; number of fibroblasts appeared earlier; and the epitelization faster than the tulle. Research data was analyzed with one way Anova (significant if $p < 0.05$), found significant differences in the number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium in chitosan group each day of observation; while the tulle group, significant differences appeared only on the variable the thickness of epithelium each day of observation. To see a couple of days of observation which shows the difference of each variable, then followed by LSD test. T-test showed significant differences in the number of PMN, fibroblasts and the thickness of epithelium between chitosan and tulle groups.

In conclusion, there are significant differences in the number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium between chitosan and tulle groups. Chitosan tends to stimulate the number of PMN cells, fibroblasts and epitelization earlier, expected the wound healing faster.

The application of wound healing process will be better if the research done on full-thickness wounds in animal models of skin structure approaching the

structure of human skin, such as : swine. The making of chitosan in topical forms, such as a gel, bandage or other form is indicated, so more easily absorbed and does not disturb the wound.

ABSTRACT
COMPARISON OF EFFECTIVENESS BETWEEN TOPICAL
CHITOSAN'S POWDER AND TULLE ON PMN, FIBROBLAST AND
EPITHELIZATION IN FULL-THICKNESS WOUND

A True Laboratory Experimental Research In Male White Rats
(Rattus norvegicus strain Wistar)

Roiziana

The wound healing process involves 5 stages of biochemical and cellular process, including : hemostasis, inflammation, migration, proliferation and maturation. The penetration of the drug through the skin and reaching to the target can be faster through topical drug administration. In this study, number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium during full-thickness wound healing in male white rats (*Rattus norvegicus* Wistar strain) compared to the treatment groups chitosan with tulle.

The study was a laboratory experimental with The Post Test Only Design. Data were analyzed statistically using Anova and T-test with significance level of less than 0.05 ($p < 0.05$). It conducted by giving full-thickness wounds to 50 male white rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar). The wound size is 1x1 cm, and the depth is up to subcutaneous tissue. 50 rats were divided into 2 groups : 25 rats for the chitosan group and the other for the tulle group. The chitosan's powder (10 mg) and tulle were given to cover the entire surface of the wound. Each rats were observed and sacrificed every day of the 3rd, 6th, 9th, the 12th until the 15th day.

By t-test showed significant differences in the number of PMN cells, fibroblasts and the thickness of epithelium between the treatment group chitosan with tulle. In conclusion, there are significant differences in the number of PMN cells, the number of fibroblasts and the thickness of epithelium between groups chitosan and tulle. Chitosan tends to stimulate the number of PMN cells, fibroblasts and epithelization since an earlier stage which is expected to heal wounds faster.

Keywords : chitosan, tulle, PMN cells, fibroblasts, the thickness of epithelium

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Lembar Pernyataan Tidak Melakukan Plagiat	vi
Lembar Keterangan Kelaikan Etik	vii
Ucapan Terima Kasih	viii
Ringkasan	xi
<i>Summary</i>	xiv
<i>Abstract</i>	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Akademis	4
1.4.2. Manfaat Terapan	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Kulit dan Penyembuhan Luka Pada Kulit	6
2.2. Peranan <i>Tulle</i> Terhadap Penyembuhan Luka	18

2.3. Peranan <i>Chitosan</i> Terhadap Penyembuhan Luka	19
2.4. Pemilihan Hewan Percobaan	21
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	22
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	22
3.2. Hipotesis	23
BAB 4 METODE PENELITIAN	25
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	25
4.2. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	27
4.3. Variabel Penelitian	28
4.3.1. Klasifikasi Variabel	28
4.3.2. Definisi Operasional	28
4.4. Bahan Penelitian	30
4.4.1. Bahan Perlakuan	30
4.4.2. Bahan Pemeriksaan	30
4.5. Instrumen Penelitian	31
4.6. Lokasi, Waktu dan Prosedur Penelitian	32
4.6.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	32
4.6.2. Persyaratan Etik Penelitian	33
4.6.3. Pemeliharaan & Pembagian Daerah Uji Coba Pada Hewan Percobaan ..	35
4.6.4. Perlakuan Hewan Percobaan	36
4.6.5. Euthanasia	36
4.6.6. Pengambilan Jaringan Luka Pada Kulit Tikus Putih	37
4.6.7. Pembuatan Sediaan Histologis dan Pewarnaan	37
4.6.8. Pengumpulan Data	40
4.7. Cara Pengolahan dan Analisis Data	41
4.8. Kerangka Operasional Penelitian	42
BAB 5 DATA PENELITIAN DAN ANALISIS DATA PENELITIAN	43
5.1. Data Penelitian	44
5.1.1. Jumlah Sel PMN	44

5.1.2. Jumlah Sel Fibroblas	47
5.1.3. Tebal Epitelisasi	49
5.2. Analisis Data Penelitian	51
5.2.1. Kelompok Chitosan	52
5.2.2. Kelompok Tulle	53
BAB 6 PEMBAHASAN	55
6.1. Sel PMN	56
6.2. Sel Fibroblas	57
6.3. Tebal Epitel	59
BAB 7 PENUTUP	61
7.1. Kesimpulan	61
7.2. Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-3	44
Tabel 5.2. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-6	45
Tabel 5.3. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-9	45
Tabel 5.4. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-12	45
Tabel 5.5. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-15	45
Tabel 5.6. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-3	47
Tabel 5.7. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-6	47
Tabel 5.8. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-9.....	47
Tabel 5.9. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-12	48
Tabel 5.10. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-15	48
Tabel 5.11. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-3	49
Tabel 5.12. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-6	50
Tabel 5.13. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-9	50
Tabel 5.14. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-12.....	50
Tabel 5.15. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-15.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Klasifikasi Luka	8
Gambar 2.2. Mekanisme Penyembuhan Luka	16
Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual Penelitian	22
Gambar 4.1. Rancangan Penelitian	25
Gambar 5.1. Jumlah rata-rata sel PMN <i>Chitosan-Tulle</i>	46
Gambar 5.2. Jumlah rata-rata sel fibroblas <i>Chitosan-Tulle</i>	48
Gambar 5.3. Jumlah rata-rata tebal epitel <i>Chitosan-Tulle</i>	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pengamatan <i>Chitosan</i> dan <i>Tulle</i>	68
Lampiran 2. Uji Normalitas Data	70
1. Kelompok <i>Chitosan</i>	70
2. Kelompok <i>Tulle</i>	72
Lampiran 3. Uji ANOVA	74
1. Kelompok <i>Chitosan</i>	74
2. Kelompok <i>Tulle</i>	74
Lampiran 4. Uji LSD	75
1. Kelompok <i>Chitosan</i>	75
2. Kelompok <i>Tulle</i>	77
Lampiran 5. Uji <i>t-test</i>	79
1. Sel PMN	79
2. Sel Fibroblas	80
3. Tebal Epitel	81
Lampiran 6. Gambaran Mikroskopis Sel PMN	82
Lampiran 7. Gambaran Mikroskopis Sel Fibroblas	87
Lampiran 8. Gambaran Mikroskopis Tebal Epitel	92
Lampiran 9. Alat dan Bahan Penelitian	97
Lampiran 10. Perlakuan	99

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Masalah

Luka dapat digambarkan sebagai suatu kecacatan atau cedera pada kulit yang diakibatkan oleh gangguan fisik atau termal yang timbul baik secara patologis maupun fisiologis (Boateng *et al.*, 2007).

Variasi penyembuhan luka tergantung pada tipe luka (bersih/kotor, invasif/tidak), lokasi luka (daerah wajah lebih cepat menyembuh daripada ekstremitas bawah), ukuran luka (luas/tidak), komorbiditas, nutrisi dan ada tidaknya trauma sebelumnya (Rivera *et al.*, 2007).

Adanya variasi ini telah mendorong terciptanya obat-obat luka yang efektif dan efisien dalam penyembuhan luka, termasuk biaya yang murah serta memberikan rasa nyaman kepada pasien (Kato *et al.*, 2003).

Metode pengobatan luka dengan *tulle* telah dikenal sejak perang dunia ke I. Meskipun *tulle* mampu melindungi luka, namun efek perlindungan ini akan hilang pada saat permukaan *tulle* menjadi basah baik oleh karena eksudat luka maupun cairan dari luar luka. Ini memungkinkan *tulle* akan makin melekat ke luka dan mengakibatkan rasa sakit serta gangguan pada jaringan baru yang terbentuk ketika *tulle* dilepaskan. Pada akhirnya penyembuhan luka akan lebih lama dan timbul rasa ketidaknyamanan pada pasien (Harianto, 2005; Boeteng *et al.*, 2007).

Berbagai metode telah dikembangkan dalam penanganan luka untuk menghasilkan penyembuhan luka yang optimal dan seminimal mungkin mampu mengurangi rasa sakit pasien. Pendekatan terapeutik yang dilakukan saat ini

adalah menggunakan bahan biomaterial polimer yang dirancang sedemikian rupa menjadi bio-kompatibel sehingga tidak menimbulkan hipersensitif oleh tubuh dan *biodegradable* yaitu dapat dipecah menjadi mikromolekul sehingga dapat diserap tubuh, namun non toksik. Salah satu bahan yang telah teruji dapat menimbulkan regenerasi jaringan adalah *chitosan* (Jiang *et al.*, 2008).

Sebagai negara maritim, Indonesia sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk turunannya. Kitin dapat diisolasi dari serangga dan jamur, kerangka dan cangkang hewan golongan *Arthropoda*, *Molusca*, *Nematoda* dan *Crustacea*. Limbah udang dapat mencapai 30-40% dari berat udang. Limbah cangkang rajungan di Cirebon saja berkisar 10 ton per hari yang berasal dari sekurangnya 20 industri kecil. *Chitosan* tersebut masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan. Data statistik menunjukkan negara yang memiliki industri pengolahan kerang menghasilkan sekitar 56.200 ton limbah. Pendayagunaan *chitin* dan *chitosan* selain bermanfaat terhadap medis, juga memberikan manfaat terhadap pelestarian lingkungan (Meidina *et al.*, 2004).

Saat ini *tulle* dan *chitosan* sama-sama telah dikenal sebagai bahan aktif dalam penyembuhan luka. Beberapa penelitian menemukan bahwa *chitosan* dapat mengaktivasi sel-sel imun, sel-sel inflamasi seperti PMN, makrofag, fibroblas dan sel-sel *angioendothelial* yang kesemuanya berperan pada proses penyembuhan luka (Ueno, Mori *et al.*, 2001), yang tidak seluruhnya dimiliki oleh *tulle*. Selain itu, *tulle* juga memiliki kelemahan karena tidak melarut, sehingga setiap pergantian pembalut, *tulle* harus diangkat yang berakibat terganggunya kembali proses granulasi, sedangkan penggunaan *chitosan* dapat dalam bentuk tablet

(oral), butiran/serbuk atau *gel* (Ueno, Mori *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003; Boeteng *et al.*, 2007; Kryger *et al.*, 2007).

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan bermakna jumlah sel PMN pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*?
2. Apakah terdapat perbedaan bermakna jumlah sel fibroblas pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*?
3. Apakah terdapat perbedaan bermakna tebal epitelisasi pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Mempelajari perbandingan efektifitas topikal serbuk *chitosan* dengan *tulle* terhadap proses penyembuhan luka *full-thickness* tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Melihat ada tidaknya perbedaan bermakna jumlah sel PMN pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.
2. Melihat ada tidaknya perbedaan bermakna jumlah sel fibroblas pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.
3. Melihat ada tidaknya perbedaan bermakna tebal epitelisasi pada proses penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademis

Mengetahui perbandingan efektifitas topikal serbuk *chitosan* dengan *tulle* terhadap jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitelisasi luka *full-thickness* pada kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

1.4.2. Manfaat Terapan

1. Sebagai bahan masukan dan bahan pertimbangan bagi tim medis, khususnya yang sering menangani pasien dengan trauma luka *full-thickness*, bahwa serbuk *chitosan* mampu menyembuhkan luka dengan

tingkat kenyamanan dan keamanan yang diharapkan lebih baik dibandingkan dengan luka yang ditutup *tulle*.

2. Sebagai bahan pertimbangan bahwa dengan pendayagunaan *chitosan* selain bermanfaat dalam ilmu pengetahuan, juga membantu pelestarian lingkungan dengan meminimalisasi limbah udang.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kulit & Penyembuhan Luka Pada Kulit

Kulit merupakan organ tubuh paling luar dan membatasi bagian dalam tubuh dari lingkungan luar, dapat dibedakan menjadi kulit tipis dan kulit tebal. Berbeda dengan kulit tebal, kulit tipis memiliki epidermis yang tipis, berambut dan terdapat diseluruh tubuh kecuali telapak tangan dan telapak kaki yang merupakan bagian kulit tebal. Secara histologi, kulit terbagi atas 3 lapisan pokok, yaitu epidermis; dermis atau korium; dan jaringan subkutan atau hipodermis. **Epidermis** disusun oleh jaringan epitel berlapis pipih bertanduk yang terdiri atas 5 lapisan dari dalam keluar :

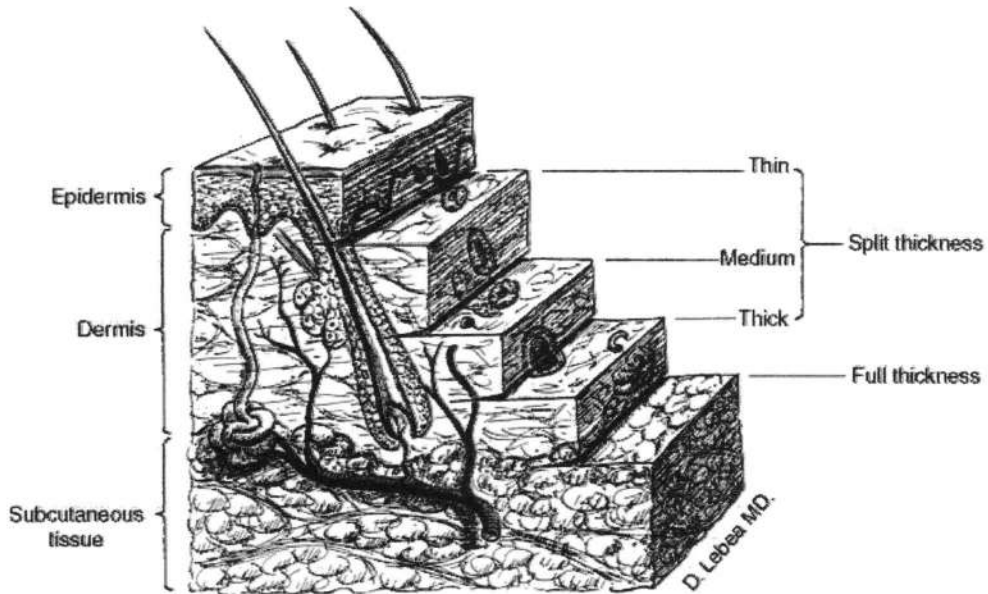
- a. *Stratum basale* : selapis sel silindris, mengalami mitosis dan sitoplasma mengandung pigmen.
- b. *Stratum spinosum/malphigi* : beberapa lapis sel polihedris yang tampak seperti berduri, mengalami mitosis.
- c. *Stratum granulosum* : 2-4 lapis sel polihedris rendah (*diamond shape*), sitoplasma mengandung butir-butir keratohialin.
- d. *Stratum lucidum* : tampak homogen dan transparan, mengandung *eleidin*.
- e. *Stratum korneum* : mengalami keratinisasi dan tampak homogen.
- f. *Stratum disjunctum* : *stratum korneum* yang terlepas.

Dermis terdiri atas 2 lapisan :

- a. *Stratum papillare/spongiosum* : tepat dibawah epidermis, jaringan ikat padat tidak teratur, sabut kolagen halus, mempunyai dermal papil dan kaya pembuluh darah.
- b. *Stratum retikulare/compactum* : dibawah *stratum retikulare*, jaringan ikat padat tidak teratur, sabut kolagen kasar, pembuluh darah jarang.

Jaringan Subkutis/hipodermis adalah lapisan dibawah kulit yang terdiri atas jaringan ikat kendor dan sering terisi jaringan lemak yang disebut **panikulus adiposus** (Junqueira LC, Carneiro J, 2007).

Menurut *Wound Healing Society*, definisi luka adalah hasil resultan dari kerusakan struktur & fungsi anatomik jaringan normal (Boateng *et al.*, 2007). Klasifikasi luka pada kulit berdasarkan jumlah lapisan kulit yang terlibat meliputi : *superficial wound* yaitu luka dangkal sebatas lapisan epidermis. Bila melibatkan lapisan epidermis dan sebagian dermis disebut *partial-thickness/split-thickness wound*, sedangkan dikatakan *full-thickness wound* bila jaringan rusak mencapai lemak subkutan atau lebih dalam (Boateng *et al.*, 2007, Rivera *et al.*, 2007).



Gambar 2.1. Klasifikasi Luka (Eriksson E, Svensjo T, 2004)

Penyembuhan luka meliputi proses biologis yang spesifik terkait dengan fenomena umum pertumbuhan dan regenerasi jaringan (Granick *et al.*, 2007). Tubuh berusaha menormalkan kembali semua kondisi abnormal akibat luka dengan proses penyembuhan. Penyembuhan luka merupakan serangkaian kompleks biologis yang melibatkan sejumlah besar sel, sitokin, faktor pertumbuhan, *protease* dan komponen ekstraseluler yang berperan dalam restorasi integrasi jaringan yang rusak (Harianto, 2005). Proses penyembuhan luka diperiksa dan digambarkan oleh *Schultz* sebagai suatu proses yang tumpang tindih melibatkan 5 tahap yang kompleks baik biokimia dan seluler, mencakup proses : hemostasis, inflamasi, migrasi, proliferasi dan maturasi. *Cooper* menambahkan adanya proses molekuler dalam proses penyembuhan luka, sehingga perlu pendekatan molekuler dan seluler untuk membantu meningkatkan manajemen perawatan luka (Boateng *et al.*, 2007).

2.1.1. Hemostasis

Terjadi segera setelah luka terbentuk. Perdarahan mengaktifkan hemostasis yang diprakarsai oleh komponen eksudat seperti faktor-faktor pembekuan (Enoch *et al.*, 2003; Boeteng *et al.*, 2007; Kryger *et al.*, 2007). Proses ini diawali dengan aktivasi hemostasis untuk menutup kebocoran pembuluh darah berupa vasokonstriksi dan agregasi trombosit hingga terbentuk plak hemostatik. Pada saat terjadi luka, komponen epidermis, dermis dan pembuluh darah kulit rusak, sehingga sel darah perifer memasuki daerah luka. Setelah trombosit masuk kemudian kontak dengan debris dan kolagen yang rusak, akan mengalami agregasi dan degranulasi. Granul alfa yang dilepaskannya mengandung faktor yang dapat mempengaruhi pembekuan, akibatnya sistem koagulasi dan komplemen mulai teraktivasi. Faktor intrinsik dan ekstrinsik akan menyebabkan aktivasi protrombin menjadi trombin, yang merubah fibrinogen menjadi fibrin. Fibrin selanjutnya mengalami deposisi dan polimerasi menjadi trombus (*clot*) yang stabil. Trombus ini menjadi substrat bagi sel-sel radang yang bermigrasi dan melekat ke daerah luka (Harianto, 2005).

2.1.2. Inflamasi

Fase peradangan terjadi hampir bersamaan dengan hemostasis, terjadi dalam beberapa menit hingga 24 jam setelah cedera dan berlangsung selama 3 hari. Ini melibatkan proses seluler dan vaskuler (Boateng *et al.*, 2007; Gurtner, 2007). Setelah vasokonstriksi transien, terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah kecil di sekitarnya sebagai akibat aktivasi sistem koagulasi dan sistem komplemen. Bradikinin adalah vasodilator dan merupakan faktor permeabilitas

vaskular kuat yang diaktivasi oleh faktor *Hageman* dalam sistem koagulasi. Sistem komplemen mengaktivasi anafilaktosin *C3a* dan *C5a* yang secara langsung meningkatkan permeabilitas vaskular serta menarik neutrofil dan monosit ke daerah luka. Ikatan antar sel-sel endotel lokal kemudian akan terputus, sehingga memudahkan migrasi sel-sel inflamasi di daerah luka (Harianto, 2005). Selama proses ini, platelet yang teraktivasi akan mengalami degranulasi, melepaskan bermacam-macam produk seperti *fibronectin*, *serotonin*, *adenosin difosfat*, dan *tromboksan A-2*. Selain itu juga melepaskan faktor pertumbuhan seperti *platelet-derived growth factor (PDGF)* dan *transforming growth factor- β (TGF- β)*, suatu *chemoattractant* kuat terhadap sel-sel inflamasi dan fibroblas. PDGF dihasilkan oleh trombosit dan makrofag yang teraktivasi, berfungsi sebagai agen kemotaktik untuk neutrofil, fibroblas serta makrofag pada konsentrasi yang rendah, sedangkan pada konsentrasi yang tinggi merupakan mitogen yang poten. *TGF- β* dihasilkan oleh trombosit dan monosit yang teraktivasi, memiliki sejumlah besar aktivitas biologik yang penting dalam rangkaian proses inflamasi dan perbaikan jaringan. *TGF- β* menstimulasi langsung fibroblas untuk menghasilkan kolagen dan *fibronectin* secara *in vitro* dan *in vivo*, pemberian *TGF- β* pada hewan coba merangsang pembentukan jaringan granulasi dan penyembuhan luka insisi. (Ueno, Nakamura *et al.*, 2001; Harianto, 2005). Berbagai faktor pertumbuhan telah dilaporkan berpartisipasi dalam proses penyembuhan luka, diantaranya : *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*, *Fibroblast Growth Factor (FGF)*, *Transforming Growth Factor- β (TGF- β)*, *Insulin – like Growth Factor-1 (IGF-1)*, *Human Growth Hormon* dan *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor (GM-CSF)* (Mann *et al.*, 2001; Boateng

et al., 2007 ; Granick *et al.*, 2007). Pada pemeriksaan immunohistokimia, ekspresi *IGF-1* timbul setelah hari kedua paska insisi kulit tikus (Todorovic *et al.*, 2008). Dalam sebuah studi tentang pengaruh *GM-CSF* terhadap ketebalan luka pada jaringan kulit tikus disimpulkan bahwa *GM-CSF* merupakan komponen penting dalam penyembuhan luka. Kekurangan faktor pertumbuhan ini mengakibatkan tertundanya penyembuhan luka dan terbentuknya jaringan baru dengan kualitas buruk (Mann *et al.*, 2001).

Leukosit (neutrofil yang disusul monosit) dan protein-protein plasma masuk dalam luka (48-72 jam setelah cedera). Neutrofil sampai di daerah luka melalui penempelan pada sel-sel endotel (molekul *L selectin*) dan *diapedesis* atau migrasi diantara sel-sel endotel menuju daerah inflamasi. Neutrofil menelan debris, benda asing dan bakteri serta melepaskan sitokin untuk menarik dan mengaktivasi monosit dan limfosit. Neutrofil memerlukan oksigen untuk membunuh bakteri sehingga pertahanan pertama tergantung pada aliran darah yang membawa oksigen ke luka. Selama beberapa minggu sel-sel ini akan melepaskan bermacam-macam polipeptida yang dikenal sebagai *growth factor* yang selanjutnya menghasilkan bermacam-macam pesan berkaitan dengan proses penyembuhan luka yaitu sintesis DNA dan pembelahan sel (Harianto, 2005; Granick *et al.*, 2007; Gurtner, 2007). Infiltrasi neutrofil mencapai puncaknya sekitar 24 jam pertama, kemudian menurun begitu monosit tiba. Dalam waktu 2-3 hari, populasi sel-sel radang akan bergeser dan didominasi monosit. Monosit selanjutnya berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag tidak hanya melanjutkan fagositosis debris jaringan dan bakteri, tetapi juga mensekresi *TGF- β* yang akan merangsang proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen, *interleukin-1 (IL-1)* dan

Tumor Necrosis Factor (TNF). Kekurangan monosit dan makrofag akan menyebabkan perubahan yang bermakna dalam proses penyembuhan luka karena debridemen yang buruk, terlambatnya proliferasi fibroblas, deposisi kolagen dan angiogenesis yang tidak adekuat (Harianto, 2005; Granick *et al.*, 2007).

Selama fase inflamasi terjadi perubahan komposisi matriks luka. Mula-mula didominasi fibrin sebagai akibat hemostasis. Begitu juga peningkatan permeabilitas vaskular, terjadi transudasi komponen plasma seperti komplemen, antibodi dan lainnya. Glikosaminoglikan dan proteoglikan akan menggantikan fibrin selama fase transudasi ini berlangsung (Silbernagl *et al.*, 2000; Harianto, 2005).

2.1.3. Migrasi

Fase migrasi melibatkan gerakan sel epitel dan fibroblas ke daerah luka untuk menggantikan jaringan yang rusak melalui rangsangan kemotaktik dan *peptide growth factor*. Sel-sel ini tumbuh mulai dari tepi luka, tumbuh diatas luka yang disertai penebalan epitel (Boateng *et al.*, 2007).

2.1.4. Proliferasi

Fase proliferasi umumnya terjadi hari 4-21 setelah cedera (Gurtner, 2007). Terdapat 3 proses penting dalam fase ini, yaitu : angiogenesis, proliferasi fibroblas dan epitelialisasi.

2.1.4.1. Angiogenesis

Permukaan luka relatif iskemik, sehingga penyembuhan luka tidak akan efektif bila aliran darah untuk membawa nutrien tidak diperbaiki. Makrofag melepaskan bahan kimia yang dikenal sebagai faktor angiogenesis yang merupakan *chemoattractant* sel-sel mesotelial dan sel-sel endotel vaskular. Sel-sel endotel berproliferasi dan membentuk *capillary bud* yang kemudian saling bertautan satu dengan lainnya pada permukaan luka membentuk *capillary bed* (*neovaskularisasi*). Re-epitelisasi dini akan menurunkan derajat hiperemi luka dengan terhentinya rangsangan angiogenik. Dengan penutupan luka, akan terjadi regresi kapiler diikuti hilangnya *hiperemi* seiring dengan menurunnya kebutuhan metabolik (Enoch *et al.*, 2000; Harianto, 2005; Granick *et al.*, 2007). Injeksi *chitosan* pada model tikus iskemik diabetik tungkai, akan menginduksi angiogenesis dengan pelepasan terkontrol dari *Fibroblast Growth Factor-2* (*FGF-2*). *FGF-2* merupakan bagian dari molekul *FGF* yang terbukti mempunyai efek angiogenik. *FGF-2* juga mampu meningkatkan proliferasi sel, motilitas, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel, serta berperan penting dalam proses regenerasi normal secara *in vivo*, yaitu : perkembangan embrio, *angiogenesis*, *osteogenesis*, *chondrogenesis* dan penyembuhan luka. Sehingga *chitosan* memiliki potensi sebagai agen angiogenik atau menstimulasi proses angiogenesis secara dini pada awal penyembuhan luka melalui *FGF-2* (Fujita *et al.*, 2007).

2.1.4.2. Proliferasi Fibroblas

Pada luka *full-thickness*, deposisi jaringan ikat khususnya *collagen crosslinking* merupakan proses utama untuk perbaikan dermis, dan sel kuncinya



adalah fibroblas. Fibroblas mulai terlihat pada hari kedua setelah trauma dan semakin nyata pada hari ke-3 dan ke-4. Hal ini terjadi karena sekresi faktor pertumbuhan yang mempengaruhi migrasi dan aktivasi sel ini. Fibroblas berperan dalam sintesis kolagen (mulai hari 3-5 paska trauma) yang merupakan komponen primer struktur jaringan baru. Deposisi kolagen di dalam luka terjadi secara bersamaan dengan degradasi proteoglikan. Kolagen adalah komponen terakhir dan permanen matriks luka. Kolagen menentukan *tensile strength* suatu luka, oleh karena merupakan protein struktural utama jaringan ikat (Harianto, 2005; Gurtner *et al.*, 2007). Molekul *chitosan* mampu mempercepat kontraksi dan penutupan luka, serta mendorong migrasi fibroblas dan sel-sel peradangan (Ishihara *et al.*, 2001).

2.1.4.3. Re-epitelisasi

Setiap penyembuhan luka membutuhkan 3 mekanisme dasar berupa : kontraksi, deposisi matriks jaringan ikat dan epitelisasi. Epitelisasi merupakan proses kompleks yang melibatkan sel epitel berupa perubahan struktur interna sel epitel, migrasi, proliferasi dan diferensiasi. Re-epitelisasi berlangsung 5-10 hari pada luka superfisial atau beberapa bulan tergantung ukuran defek, suplai nutrisi, jumlah sel basal yang tersisa dan lingkungan luka. Proses ini membutuhkan interaksi elemen epidermal dan dermal. Komponen dermal yang utama termasuk *fibronectin* yang bersama alur fibrin dan kolagen memungkinkan pelepasan epidermal, migrasi dan perlekatan ulang. *Fibronectin* juga secara langsung merangsang proliferasi sel. *Epidermal Growth Factor (EGF)* yang dilepaskan oleh makrofag dan platelet, secara aktif merangsang sel-sel immatur di sekitar

membran basal dan di asesori dermal, untuk proliferasi, bermigrasi, dan menjadi matur (Chin GA, *et al.* 2005 ; Harianto, 2005).

2.1.5. Maturasi (*Remodelling*)

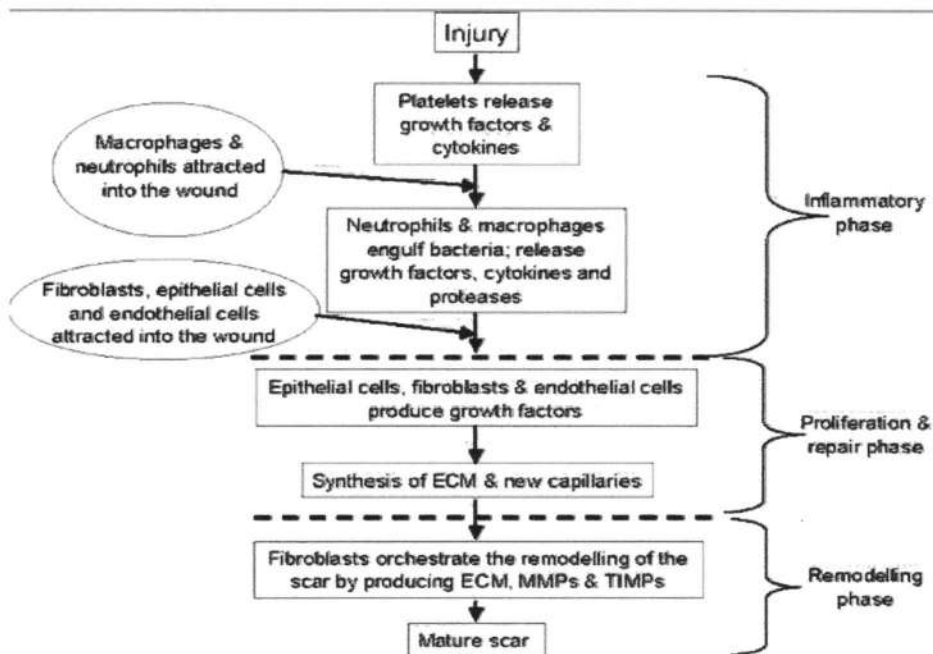
Berlangsung pada hari ke 14 – 2 tahun (Kryger *et al.*, 2007). Perubahan dari jaringan granulasi menjadi jaringan parut melibatkan perubahan dalam komposisi sintesis *Extracellular Matrix (ECM)*, bahkan setelah sintesis dan deponisinya, *ECM* jaringan parut akan terus diubah dan dilakukan *remodelling*, untuk mendapatkan hasil akhir berupa keseimbangan antara sintesis dan degradasi *ECM*. Degradasi kolagen dan komponen *ECM* lainnya dilakukan oleh suatu kelompok *metalloproteinase*, meliputi : kolagenase interstisial, yang memecah kolagen *fibril* tipe I, II dan III; *gelatinase* (kolagenase tipe IV), yang memecah kolagen *amorf* dan *fibronectin*; dan *stromelisin*, yang mengatabolisasi berbagai unsur pokok *ECM*, termasuk *proteoglikan*, *laminin*, *fibronektin* dan kolagen *amorf* (Tomic-Canic M, 2004; Kumar *et al.*, 2007).

Secara umum *remodelling* luka merupakan hasil dari :

1. Peningkatan *collagen cross-linking*, yang akan meningkatkan kekuatan luka.
2. Aktivitas *kolagenase* yang menguraikan akumulasi kolagen yang berlebihan.
3. Regresi jaringan kapiler permukaan yang berlebihan akibat kebutuhan metabolisme yang menurun.
4. Menurunnya proteoglikan dan kemudian kandungan air.

(Harianto, 2005; Granick *et al.*, 2007).

Pada fase ini peranan *TGF-beta 2* sangat penting dalam mencegah pembentukan jaringan parut (Chin GA, *et al.* 2005; Fujita *et al.*, 2007).



Gambar 2.2. Mekanisme Penyembuhan Luka (Enoch *et al.*, 2003)

Penyembuhan Luka Secara Intensi Primer

Pada luka dimana terdapat sedikit jaringan yang hilang, seperti pada luka bersih yang dibuat akibat tindakan bedah, atau pada laserasi yang tepinya dirapatkan plester kulit, maka penyembuhan terjadi secara intensi primer, yaitu dengan menyatukan kedua tepi luka berdekatan dan saling berhadapan. Jaringan granulasi yang dihasilkan sangat sedikit. Reepitelisasi sempurna terjadi dalam waktu 10-14 hari dengan menyisakan jaringan parut tipis yang cepat menghilang (Morison, 2004).

Penyembuhan Luka Secara Intensi Sekunder

Penyembuhan terjadi secara intensi sekunder bila didapatkan kehilangan jaringan yang signifikan seperti luka terbuka kronis (dekubitus & ulkus tungkai), demikian juga beberapa luka akibat operasi yang dengan sengaja dibiarkan terbuka, abses atau *sinus pilonidal* yang dibiarkan terbuka. Jaringan granulasi yang terdiri atas kapiler-kapiler darah baru yang disokong jaringan ikat, terbentuk didasar luka dan sel-sel epitel bermigrasi ke pusat permukaan luka, dan dari pulau-pulau jaringan epitel yang berhubungan dengan folikel rambut, kelenjar sebacea dan kelenjar sudorifera. Proses epitelisasi sempurna juga terjadi sekitar 10-14 hari (Morison, 2004).

Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

a. Faktor Intrinsik

- Faktor-faktor fisiologis normal yang berkaitan dengan usia
- Faktor-faktor patofisiologi umum, seperti : anemia, penurunan daya tahan terhadap infeksi, gangguan metabolik dan endokrin, malnutrisi dan gangguan kardiovaskular
- Kondisi lokal yang merugikan pada tempat luka, seperti : benda asing, eksudat berlebihan, dehidrasi, infeksi luka, edema, jaringan nekrotik dan pengelupasan jaringan yang luas, dan lain-lain

b. Faktor Ekstrinsik

- Penatalaksanaan luka yang tidak tepat
- Efek merugikan dari terapi lain : kemoterapi, pemakaian steroid jangka panjang, terapi radiasi

(Morison, 2004; Kryger *et al.*, 2007).

2.2. Peranan *Tulle* Terhadap Penyembuhan Luka

Pengelolaan luka yang efektif tergantung pada beberapa faktor, antara lain : jenis luka yang dirawat, proses penyembuhan, kondisi pasien termasuk ada tidaknya penyakit penyerta, lingkungan dan sosial, serta sifat fisik dan kimia dari obat luka (James, 1994; Aldini, 2008).

Tulle adalah lembaran penutup luka yang steril, berbentuk jala lebar, terbuat dari bahan katun dan sering diolesi dengan *soft paraffin*, berwarna kuning atau *vasilinum flavum*, sehingga dikenal juga dengan nama *paraffin gauze*. *Lumere* yang memperkenalkan pertama kali pemakaian *tulle* pada perang dunia I sebagai obat lokal luka tembak. Pada perang dunia II, *Wallace of Edinburgh* menggunakannya sebagai obat penutup luka bakar. *Tulle* disusun dari bahan dasar lemak katun, *soft paraffin* dan antibiotika *ointment (paramicetin sulfat)* sebagai antibiotika topikal. Pemberian *tulle* memberikan sedikit oklusi, mengatur hidrofilik luka yang dibutuhkan *bed* luka untuk penyembuhan luka optimal, parafin mencegah pelengketan dengan luka sehingga tidak mengganggu proses penyembuhan luka dan mengurangi rasa nyeri pada waktu penggantian penutup luka (Watcher *et al.*, 1989; Harianto, 2005). *Tulle* sebaiknya digunakan pada luka yang bersih dan kering (Boateng *et al.*, 2007).

2.3. Peranan *Chitosan* Terhadap Penyembuhan Luka

Cangkang atau kerangka kepala udang mengandung 20-30% senyawa kitin, 21% protein dan 40-50% mineral. Kitin merupakan polisakarida terbesar kedua setelah selulosa yang mempunyai rumus kimia poli (*2-asetamida-2-dioksi-β-D-Glukosa*) dengan ikatan β-glikosidik (1,4) yang menghubungkan antar unit ulangnya. Struktur kimia kitin mirip dengan selulosa, hanya dibedakan oleh gugus yang terikat pada atom C2. Jika pada selulosa gugus yang terikat pada atom C2 adalah *OH*, maka pada kitin yang terikat adalah gugus asetamida. Kitin tidak mudah larut dalam air, sehingga penggunaannya terbatas (Williams, 2002; Hargono *et al.*, 2008).

Zat kitin diisolasi dari udang melalui 2 proses, yaitu : deproteinasi dan demineralisasi. Deproteinasi merupakan proses pengurangan protein melalui proses ekstraksi menggunakan larutan alkali kuat, konsentrasi 3-6 N, dicuci menggunakan aquades, untuk menghilangkan sisa alkali dalam solid dan kemudian direaksikan menggunakan asam hidroklorida 20% untuk melepaskan gugus CaCO_3 . Disini CaCO_3 akan bereaksi dengan HCl membentuk CaCl_2 yang larut dalam air. Campuran ini kemudian akan disaring untuk mendapatkan zat padat kitin, setelah sebelumnya dicuci kembali menggunakan aquades (Williams *et al.*, 2002).

Kitin di ubah menjadi *chitosan* melalui proses deasetilasi. Proses ini berupa penghilangan gugus asetil (CH_3CHO) dari gugus amino zat kitin dengan menambahkan NaOH 20-50% kemudian dipanaskan dengan suhu 80-120 derajat *celcius*. Melalui proses penyaringan, akhirnya didapatkan *chitosan* (Williams *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2003).

Kitin dan derivatnya telah dikenal untuk mempercepat penyembuhan luka sejak penelitian dari Pruden, dkk (1957), mengidentifikasi *N-acetyl-D-glucosamine* (GlcNAc) sebagai komponen tulang rawan ikan hiu yang mempunyai potensi mempercepat penyembuhan luka (Ueno, Mori *et al.*, 2001). Namun dengan modifikasi kimiawi dapat diperoleh senyawa turunan kitin yang mempunyai sifat kimia yang lebih baik. Salah satu turunan kitin adalah *chitosan*.

Chitosan juga merupakan polisakarida yang terdiri atas unit-unit β -[1 \rightarrow 4] -linked GlcNAc dan *D-glucosamine* (GlcN). Mengandung ikatan polikationik biopolimer (Berger *et al.*, 2003), memungkinkan terjadinya interaksi dengan unsur anion dalam tubuh seperti *glycosaminoglycan* dan *proteoglycan* (Kim *et al.*, 2008). *Chitosan* tidak larut dalam air, sedikit larut dalam HCl dan HNO₃ dan H₃PO₄, tidak larut dalam H₂SO₄. *Chitosan* tidak beracun, mudah mengalami biodegradasi dan bersifat polielektronik. Disamping itu *chitosan* dapat dengan mudah berinteraksi dengan zat-zat organik lainnya seperti protein dan lemak (Kim *et al.*, 2008; Vinsova *et al.*, 2008; Shelma *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008).

Telah banyak penelitian melaporkan bahwa *chitosan* sebagai material dalam perbaikan jaringan kulit pada beberapa tahap penyembuhan luka, seperti : pada proses hemostasis, meningkatkan regenerasi jaringan dan stimulasi sintesis fibroblas menjadi kolagen (Mariappan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2008), dan mempercepat proses granulasi selama penyembuhan luka (Ueno, 2001; Kim *et al.*, 2008). Proses kerja *chitosan* dalam penyembuhan luka adalah : *chitosan* mampu mempercepat migrasi PMN pada fase inflamasi, meningkatkan produksi faktor pertumbuhan *TGF- β* dan *PDGF* dimana faktor pertumbuhan ini mendorong terjadinya proliferasi fibroblas dan produksi ECM. Akhirnya terbentuklah

granulasi dan mempercepat penyembuhan luka (Ueno, 2001; Ueno, Mori *et al.*, 2001).

LD50 *chitosan* telah dilaporkan, dimana toksisitas akut akan terjadi pada pemberian > 1,5 gram/KgBB secara oral pada tikus, > 10gram/KgBB secara subkutan pada mencit, >5,2 gram/KgBB pada mencit dan > 3,0 gram/KgBB pada tikus bila diberikan secara intraperitoneal (Ueno, Mori *et al.*, 2001)

2.4. Pemilihan Hewan Percobaan

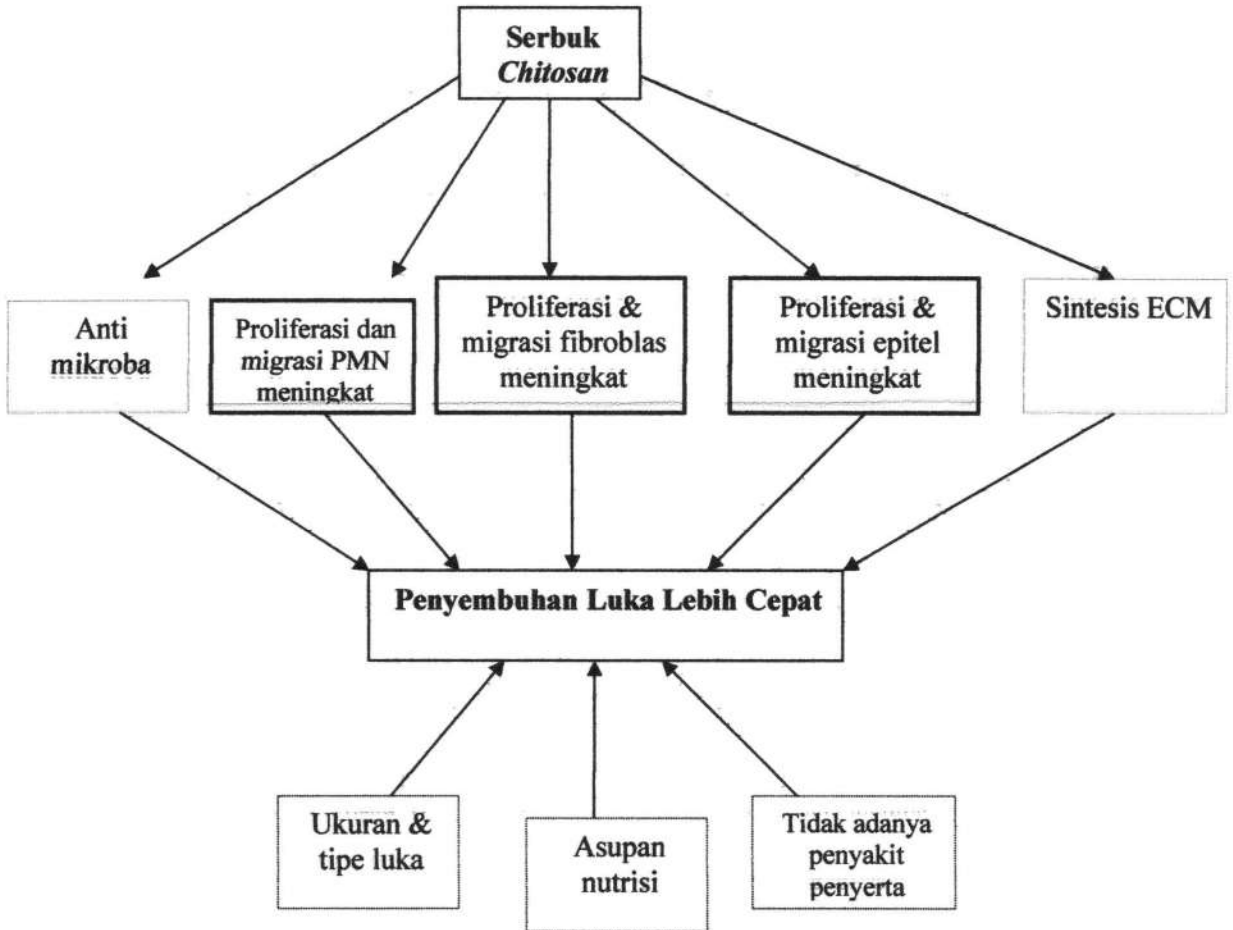
Tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan digunakan dalam penelitian ini karena beberapa alasan, yaitu :

1. Tikus putih mudah diperoleh, harganya relatif murah dan cukup jinak sehingga pemberian perlakuan dapat dilakukan dengan mudah (Kusumawati D, 2004).
2. Tikus Putih memiliki struktur kulit lebih tipis sehingga kemungkinan perdarahan, kehilangan cairan, infeksi dan kontraksi luka akibat insisi *full-thickness* minimal, serta pengamatan penyembuhan luka menjadi lebih mudah (Davidson, 1998).
3. Tikus putih telah digunakan secara luas pada studi penyembuhan luka & uji efek obat penyembuhan luka (Dorset-Martin & Wysocki AB, 2008).

BAB 3

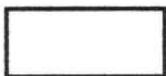
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan :



: Yang akan diteliti

Chitosan sebagai agen dalam mempercepat penyembuhan luka melalui peningkatan proliferasi dan infiltrasi sel *PMN* pada tepi luka telah dilaporkan (Ueno, Mori *et al.*, 2001). Makrofag memiliki peranan besar pada proses penyembuhan luka, dengan melepaskan beberapa mediator biologik dan memfagositosis benda asing (Mann *et al.*, 2001). Nishimura dkk melaporkan bahwa *chitosan* dapat menstimulasi makrofag untuk memproduksi *interleukin (IL)*-1. Efek positif-negatif dari *IL-1* seperti halnya *IL-6* dan *TNF- α* , dapat mengakibatkan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen (Nishimura *et al.*, 1986 *cit* Ueno, Mori *et al.*, 2001; Mariapan *et al.*, 1999). Penelitian kultur *Monocyte-derived macrophages (MDM)* dengan *chitosan* secara *in vitro* ternyata dapat menghasilkan *transforming growth factor (TGF- β 1)* dan *platelet derived growth factor (PDGF)*, dimana *TGF- β 1* dan *PDGF* ini berperan penting dalam proses penyembuhan, termasuk dalam sintesis *Extracellular Matrix (ECM)* (Ueno, Mori *et al.*, 2001; Ueno, Nakamura *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2009). Efek antimikroba dan bakteriostatik *chitosan* juga telah dilaporkan (Aimin *et al* 1999, Choi *et al* 2002, Je and Kim, 2002 *cit* Ueno, Mori *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2008; Burkatovskaya *et al.*, 2008). Efek-efek *chitosan* yang telah dilaporkan diatas, membuktikan bahwa *chitosan* mampu mempercepat proses penyembuhan luka.

3.2. Hipotesis

Berdasarkan kerangka konseptual diatas, maka dapat dikemukakan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Ada perbedaan bermakna jumlah sel PMN pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.
2. Ada perbedaan bermakna jumlah sel fibroblas pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.
3. Ada perbedaan bermakna tebal epitelisasi pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*.

BAB 4

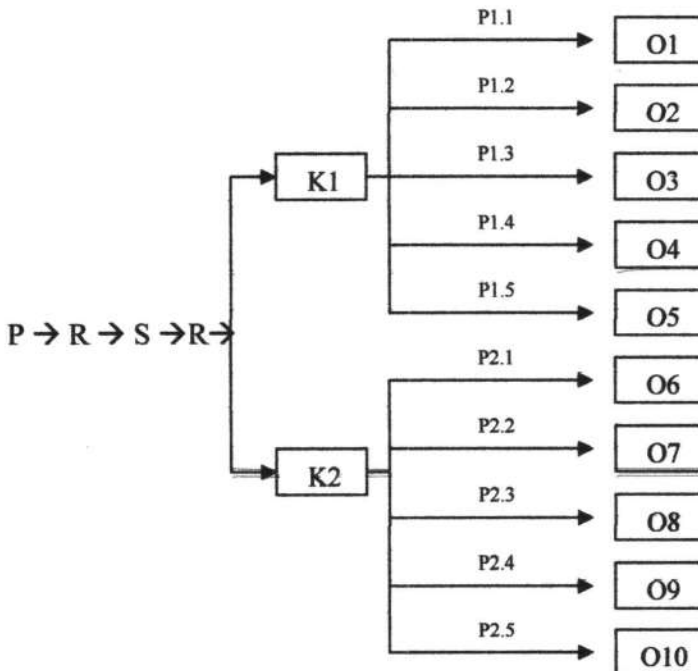
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Design* (Ueno, Mori *et al.*, 2001; Harianto, 2005; Zainuddin, 2000).

Rancangan penelitian ini dilakukan sebagai langkah untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kecepatan penyembuhan luka antara pemberian *chitosan* dan *tulle* pada luka *full-thickness* pada kelompok perlakuan yang sama, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

Secara sistematis, rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Zainuddin, 2000) :



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

- P** : Populasi **R** : Randomisasi **S** : Sampel
- K1** : Kelompok perlakuan dengan pemberian *Tulle*
- K2** : Kelompok perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg
- P1.1** : Perlakuan dengan pemberian *Tulle* s/d hari ke-3
- P1.2** : Perlakuan dengan pemberian *Tulle* s/d hari ke-6
- P1.3** : Perlakuan dengan pemberian *Tulle* s/d hari ke-9
- P1.4** : Perlakuan dengan pemberian *Tulle* s/d hari ke-12
- P1.5** : Perlakuan dengan pemberian *Tulle* s/d hari ke-15
- P2.1** : Perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg s/d hari ke-3
- P2.2** : Perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg s/d hari ke-6
- P2.3** : Perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg s/d hari ke-9
- P2.4** : Perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg s/d hari ke-12
- P2.5** : Perlakuan dengan pemberian serbuk *Chitosan* 10 mg s/d hari ke-15
- O1** : Data kelompok K1 setelah 3 hari perlakuan
- O2** : Data kelompok K1 setelah 6 hari perlakuan
- O3** : Data kelompok K1 setelah 9 hari perlakuan
- O4** : Data kelompok K1 setelah 12 hari perlakuan
- O5** : Data kelompok K1 setelah 15 hari perlakuan
- O6** : Data kelompok K2 setelah 3 hari perlakuan
- O7** : Data kelompok K2 setelah 6 hari perlakuan
- O8** : Data kelompok K2 setelah 9 hari perlakuan
- O9** : Data kelompok K2 setelah 12 hari perlakuan
- O10** : Data kelompok K2 setelah 15 hari perlakuan

4.2. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi penelitian adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang diperoleh di unit hewan coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Sebagai sampel penelitian adalah tikus putih jantan yang berusia 40-60 hari (usia dewasa) dengan berat badan 200-300 gram. Besar sampel ditetapkan menurut rumus sebagai berikut (Dawson-Saunders, 1991 *cit* Harianto, 2005) :

$(k-1)(n-1) > 20$, karena yang dibandingkan adalah perlakuan luka (k =kelompok) dengan *chitosan* dan *tulle* pada evaluasi setiap hari mulai hari ke-3 hingga hari ke-15, dengan $k=2$, maka rumus perbandingan menjadi :

$$(2-1)(n-1) > 20$$

$$(n-1) > 20/1$$

$$n > 21$$

Dari rumus diatas diperoleh besar sampel untuk tiap kelompok minimal 21 ekor. Karena selama perlakuan terdapat kemungkinan mati (f) \pm 10%, maka besar sampel tersebut dikalikan $1 / 1-f$ (Madiono B dkk., 2006), sehingga besar sampel minimal tiap kelompok adalah 25 ekor dan besar sampel keseluruhan 50 ekor tikus putih jantan. Terdapat 5 kelompok hari pengamatan yaitu hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15; sehingga masing-masing kelompok pengamatan terdiri atas 5 ekor tikus yang diberikan serbuk *chitosan* dan 5 ekor tikus yang diberikan *tulle* diatas luka.

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara random karena populasi pada penelitian ini dianggap homogen, maka cara random yang digunakan adalah *simple random sampling* (Zainuddin, 2000).

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas (independen)

Serbuk *Chitosan & Tulle*

b. Variabel tergantung (dependen)

- Jumlah sel PMN
- Jumlah sel fibroblas
- Tebal epitelisasi

c. Variabel kendali

- Umur dan jenis kelamin hewan percobaan
- Berat badan hewan percobaan
- Ukuran luka
- Waktu perlakuan
- Pemeliharaan dan perawatan hewan percobaan

4.3.2. Definisi Operasional

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini didefinisikan sebagai berikut :

1. Serbuk *chitosan* adalah *chitosan* yang didapatkan dari salah satu produsen dikemas dalam kapsul, tiap kapsul mengandung 0,15 gram

serbuk *chitosan*. Sebanyak 10 mg *chitosan* (Ueno, Mori *et al.*, 2001) diberikan setiap hari, hingga hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15.

2. *Tulle* adalah lembaran penutup luka yang steril, berbentuk jala lebar, terbuat dari katun dan diolesi dengan *soft paraffin* berwarna kuning atau *vasilinum flavum*.
3. Jumlah sel PMN adalah banyaknya sel-sel PMN yang ditemukan pada 3 tempat lapangan pandang, yaitu bagian pinggir kanan, tengah dan pinggir kiri luka dengan pembesaran 400x pada setiap sediaan. Sebelumnya penentuan luas daerah pandang dilakukan dengan pembesaran 40x dan 100x.
4. Jumlah fibroblas adalah banyaknya sel-sel fibroblas yang ditemukan pada 3 tempat lapangan pandang, yaitu bagian pinggir kanan, tengah dan pinggir kiri luka dengan pembesaran 400x pada setiap sediaan. Sebelumnya penentuan luas daerah pandang dilakukan dengan pembesaran 100x.
5. Tebal epitelisasi adalah panjang lapisan sel epitel mulai dari sel epitel kuboid pada lamina basalis sampai lapisan epitel pipih pada permukaan paling atas mulai dari tepi luka. Diukur menggunakan penggaris *software motis plus 2.0 ML* pada 3 tempat lapangan pandang, yaitu bagian pinggir kanan, tengah dan pinggir kiri luka dengan pembesaran 400x pada setiap sediaan.
6. Umur dan jenis kelamin yaitu umur tikus putih dewasa yaitu 40-60 hari dengan jenis kelamin jantan.

7. Berat badan hewan coba sebelum perlakuan adalah berat badan rata-rata pada tikus putih jantan dewasa yaitu 200-300 gram yang diukur dengan timbangan dalam satuan gram.
8. Ukuran luka adalah luka yang dibuat pada kulit tikus berbentuk bujur sangkar berukuran 1 x 1 cm dengan mengikutsertakan dermis hingga jaringan subkutan.
9. Waktu perlakuan adalah setiap 5 kelompok yang masing-masing terdiri atas 10 ekor tikus diberikan perlakuan pada waktu yang sama dan diamati masing-masing sampai hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15.
10. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan di tempat yang sama, yaitu di Laboratorium Biokimia FK Unair) dengan kondisi kandang sama serta pemberian makanan standar dan minum air aquades yang sama.

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan perlakuan

Bahan yang digunakan pada hewan coba adalah :

- a. Serbuk *chitosan*
- b. *Tulle*
- c. Betadin 10% untuk antisepsis sebelum luka di buat.

4.4.2. Bahan pemeriksaan

- a. Jaringan kulit tikus putih
- b. Bahan untuk pembuatan preparat histologis metode *paraffin* :

- larutan *Bouin* untuk fiksasi yang di buat dari (Liben, 1992) :
 - asam pikrat jenuh 1,22% 750 ml
 - formaldehid 37-40% 250 ml
 - asam asetat *glacial* 50 ml
 - alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan absolut untuk dehidrasi
 - larutal *Xylol* atau *Xylene* untuk *clearing*
 - *paraffin* cair untuk blok jaringan
 - albumin *Meyyer*, dibuat dari putih telur dan gliserin 1 : 1
 - *Enthelan* untuk *mounting*
- c. Bahan untuk pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) :
- larutan *Xylol*
 - alkohol absolut
 - alkohol 95%
 - air kran
 - larutan *Hematoxyline*
 - Alkohol asam (*acid alcohol*) 1%
 - larutan *Ammonia*
 - larutan *Eosin*

4.5. Instrumen Penelitian

4.5.1. Alat untuk pemeliharaan tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*)

jantan :

- a. Kandang tempat pemeliharaan
- b. Botol untuk tempat minum

- c. Tempat makanan

4.5.2. Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan kulit :

- a. Spuit 1 CC, Ketamin HCL
- b. Alat fiksasi dan deseksi hewan percobaan
- c. Botol kecil dengan tutup untuk fiksasi jaringan
- d. Seperangkat alat bedah minor

4.5.3. Alat *Euthanasia*

- a. Tang Dekapitasi

4.5.4. Alat untuk pembuatan dan pengamatan histologis :

- a. Mikrotom
- b. *Object glass* dan *cover glass*
- c. Cetakan dari logam yang berbentuk L untuk *embedding*
- d. *Water bath*
- e. *Staining jar*
- f. Mikroskop cahaya
- g. Alat pengukur mikrometer

4.6. Lokasi, Waktu dan Prosedur Penelitian

4.6.1. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia FK Unair untuk pemeliharaan, pembiakan dan perlakuan hewan percobaan serta pengambilan

jaringan. Preparasi jaringan dan pengambilan data penelitian akan dilakukan di laboratorium Anatomi-Histologi FK Unair. Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Desember 2009 - Januari 2010.

4.6.2. Persyaratan etik penelitian

Prinsip dasar pertimbangan etik penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan percobaan salah satunya harus memenuhi prinsip pemanfaatan hewan 3'R :

1. *Replacement* : mengganti hewan percobaan dengan alternatif lain :
 - *Replacement relatif* : masih menggunakan hewan percobaan : sel, jaringan atau organ hewan vertebrata
 - *Replacement absolut* : tidak menggunakan hewan percobaan : galur sel, *invitro* (kultur sel/jaringan)
2. *Reduction* : menggunakan model alternatif agar dapat mengurangi jumlah hewan percobaan yang digunakan, misal : metode statistik, program komputer, teknik biokimia.
3. *Refinement* : meminimalisasi atau menghindari penderitaan dari rasa nyeri maupun distress, dengan cara : gunakan analgesia atau anastesi.

(Sektiani B, 2009).

Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan tikus putih dalam kandang, pemberian makan minum, aliran udara ke dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya. Pemakaian metode *euthanasia* dalam bidang keilmuan sangat penting perannya, apabila ditinjau dari segi manfaatnya. *Decapitation* (dekapitasi) merupakan teknik metode *euthanasia* secara fisik dengan jalan memotong kepala

hewan menggunakan peralatan tajam dengan tujuan untuk memutus kepekaan saraf tulang belakang (Setiatin, 2004; Gnadt, B. J, 2006).

Menurut *The Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS) (1985) terdapat 11 Prinsip Pedoman Internasional untuk Penelitian Biomedik yang berhubungan dengan hewan, yaitu :

1. Kemajuan ilmu hayati, serta perbaikan cara pengobatan untuk manusia dan hewan di masa depan masih membutuhkan penelitian dengan menggunakan hewan percobaan.
2. Model matematik, simulasi komputer dan penggunaan jaringan biologis secara *in-vitro* harus digunakan, apabila diperlukan.
3. Penggunaan hewan percobaan dilakukan, apabila benar benar bermanfaat untuk kepentingan kesehatan manusia, dan kemajuan ilmu kedokteran atau ilmu hayati.
4. Spesies hewan percobaan yang digunakan harus yang tepat, dengan jumlah minimal, dan kualitas yang baik, sehingga menghasilkan hasil penelitian yang valid.
5. Peneliti harus mampu memperlakukan hewan percobaan sebagai hewan yang mempunyai perasaan.
6. Melakukan perawatan dengan baik, menggunakan teknik teknik yang menyenangkan dan menimbulkan stress, dan menimbulkan rasa nyeri.
7. Peneliti harus sadar bahwa suatu tindakan yang menyebabkan nyeri pada manusia juga akan menimbulkan nyeri pada hewan percobaan terutama vertebrata.

8. Suatu prosedur yang menyebabkan rasa nyeri sementara atau stress sementara harus dihindari dengan memberikan pengobatan sedasi, analgesik atau anastesi prosedur bedah, atau yang menimbulkan nyeri tidak boleh dilakukan pada hewan percobaan dalam kondisi tidak di bius walaupun dalam kondisi *paralise*.
9. Apabila dalam pelaksanaan penelitian atau pada akhir penelitian hewan percobaan mengalami nyeri yang hebat harus dilakukan euthanasia.
10. Kondisi kehidupan hewan percobaan untuk penelitian biomedik harus sebaik-baiknya, sebaiknya hewan percobaan dalam perawatan seorang dokter hewan, yang berpengalaman dalam pengetahuan hewan percobaan di laboratorium.
11. Pimpinan atau Ketua laboratorium yang menggunakan hewan percobaan bertanggung jawab atas semua prosedur terhadap hewan percobaan.

(KEPK-Badan Litbang Kesehatan, 2009).

Sebelumnya usulan penelitian telah diuji dan disetujui kelayakan etik di Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) FK UNAIR pada tanggal 21 Desember 2010 (terlampir).

4.6.3. Pemeliharaan dan pembagian daerah uji coba pada hewan percobaan

Sebelum diberikan perlakuan, tikus putih diaklimatisasi selama 1 minggu di laboratorium Biokimia FK Unair. Tikus putih dipelihara pada kandang ukuran 40 x 30 cm yang ditutup kawat kasa dan dilengkapi dengan tempat makan-minum serta beralaskan sekam. Masing-masing kandang ditempati 5 tikus (**Lampiran 9**) (Smith JB *et al.*, 1988). Makanan tikus putih menggunakan makanan standar dan

minum air aquades. Untuk menjaga kebersihan kandang, sekam diganti setiap 2 hari sekali.

Pada 50 ekor tikus putih akan dibuat luka *full-thickness* ukuran 1x1 cm pada punggung. Teknik pembuatan luka dilakukan mengikuti prosedur aseptis (Waynforth HB *et al.*, 1992). Tikus dipilih secara acak untuk menentukan 5 kelompok pengamatan mikroskopis hari ke 3, 6, 9, 12 dan 15 setelah pembuatan luka. Masing-masing kelompok terdiri atas 10 ekor tikus putih jantan umur 40-60 hari dengan berat sekitar 200-300 gram.

4.6.4. Perlakuan hewan percobaan

Sebanyak 50 ekor tikus putih terlebih dahulu dibius dengan penyuntikan Ketamin 20-40 mg/kgbb secara intramuskuler. Anestesi umum terjadi selama 20-40 menit setelah penyuntikan dan *recovery* sempurna dicapai setelah 1,5 jam (Kusumawati, 2004). Kemudian dilanjutkan pencukuran bulu pada punggung untuk mempermudah proses insisi (**Lampiran 10**). Dilakukan antisepsis pada daerah luka menggunakan *betadine* 10% lalu dipersempit dengan duk steril. Dibuat luka *full thickness* pada punggung tikus putih jantan berbentuk bujur sangkar dengan ukuran 1x1 cm hingga lapisan subkutan. Sebanyak 25 ekor tikus putih jantan diberikan bubuk *chitosan* pada luka dan 25 ekor tikus putih jantan lainnya dengan *tulle*. Kemudian luka dirawat secara tertutup dengan kasa steril.

4.6.5. *Euthanasia*

Berdasarkan prinsip 3'R, maka euthanasia yang dilakukan adalah dengan metode dekapitasi, yaitu dengan jalan memotong kepala hewan menggunakan

peralatan tajam dengan tujuan untuk memutus kepekaan saraf tulang belakang. Dekapitasi pada hewan percobaan harus dilakukan dibawah pengaruh anastesi (Rigalli A, 2009). Kemudian tikus diletakkan di papan bedah untuk pengambilan jaringan kulit pada punggung tikus putih jantan pada setiap kelompok perlakuan (**Lampiran 10**).

4.6.6. Pengambilan jaringan luka pada kulit tikus putih

Pengambilan jaringan luka dilakukan dengan mengikutsertakan jaringan sehat hingga kedalaman otot pada hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15. Luka di eksisi kira-kira 0,5 cm diluar tepi luka (tepi luka awal diberi tanda dengan spidol). Sampel jaringan luka diletakkan dan dibungkus menggunakan kertas saring yang diberi lubang-lubang kemudian di fiksasi dengan cara dimasukkan ke dalam formalin 10% hingga minimal 4-5 hari (**Lampiran 10**)

4.6.7. Pembuatan sediaan histologis dan pewarnaan

Setelah jaringan di fiksasi, kemudian dibawa ke laboratorium Histologi untuk dibuat sediaan histologik metode *paraffin* dengan pewarnaan HE, karena dengan pewarnaan HE dapat diketahui dengan jelas bentuk sel-sel PMN, fibroblas dan tebal epitelisasi. Sediaan dibuat dengan membuat potongan pada bagian tengah jaringan yang diambil secara longitudinal.

a. Langkah-langkah pembuatan sediaan histologik metode *paraffin* sebagai berikut :

1. Fiksasi : dengan larutan *Bowin*
2. Dehidrasi : dengan larutan alkohol 70% selama 2 jam

- dengan larutan alkohol 80% selama 2 jam
dengan larutan alkohol 90% selama 2 jam
dengan larutan alkohol 95% selama 2 jam
dengan larutan alkohol absolut I selama 1 jam
dengan larutan alkohol absolut II selama 1 jam
3. *Clearing* : dengan larutan *XyloI* I selama 2 jam
dengan larutan *XyloI* II selama 2 jam
 4. *Infiltrasi* : paraffin cair I selama 3 jam
paraffin cair II selama 3 jam
paraffin cair III selama 3 jam
 5. *Embedding* : dicetak bentuk blok kemudian didinginkan selama 24 jam
 6. *Tramming* : dikepris menjadi cetakan yang rapi
 7. *Sectioning* : dilakukan penyayatan/pemotongan dengan mikrotom,
dengan tebal 5-7 mikron
 8. *Mounting* : hasil potongan diletakkan diatas *object glass* yang diberi
albumin *Meyer*, dikeringkan dan sediaan siap untuk
diwarnai.
- b. Langkah-langkah pewarnaan dengan HE adalah sebagai berikut :
1. Mula-mula dilakukan separafinisasi dengan *Xylene* selama 2,5 menit
untuk menghilangkan parafin dari jaringan, ini dilakukan berturut-turut ke
dalam 3 tabung *Xylene*.

2. Setelah itu dimasukkan ke dalam alkohol berturut-turut alkohol absolut, alkohol absolut dan alkohol 95% masing-masing 1 sampai 2 menit untuk menarik *Xylene*.
3. Lalu dicuci menggunakan air kran beberapa kali.
4. Kemudian dicat dengan larutan *Hematoxyline* selama 15 menit. *Hematoxyline* berguna untuk mengecat inti sel.
5. Lalu dicuci dengan air kran beberapa kali untuk mencuci/menghilangkan sisa-sisa pengecatan.
6. Kemudian dilakukan diferensiasi dengan alkohol asam 1% sebanyak beberapa celupan sampai intensitas warna inti seperti yang dikehendaki.
7. Lalu dicuci dengan air kran selama 1 menit untuk menghilangkan kelebihan kerja alkohol asam.
8. Setelah itu dicelupkan ke dalam larutan *ammonia* selama 30 detik untuk membirukan inti.
9. Kemudian di cuci beberapa kali di dalam air kran untuk menghilangkan sisa-sisa basa, sebab bila tidak dihilangkan akan menghambat pengecatan dengan *Eosin*.
10. Untuk melihat apakah pengecatan inti sudah cukup, maka sediaan dilihat dibawah mikroskop sinar. Pewarnaan dianggap cukup bila nukleus berwarna biru terang (bilamana diperlukan, diferensiasi dapat diulangi).
11. Kemudian dicat dengan *Eosin* beberapa kali celupan selama 2 menit untuk mengecat sitoplasma.
12. Setelah itu dilakukan dehidrasi dengan alkohol 95% beberapa kali celupan, yang juga berfungsi untuk menghilangkan sisa-sisa *Eosin*.

13. Proses dehidrasi diulangi kembali selama 1 menit berturut-turut ke dalam tabung alkohol 95%, alkohol absolut, dan alkohol absolut kembali.
14. Akhirnya dilakukan penjernihan dengan 3 tabung *Xylene*, dimana masing-masing dicelupkan selama kurang lebih 2 menit untuk menghilangkan alkohol. Bila pengecatan baik, sitoplasma akan berwarna merah muda.
15. Setelah pengecatan selesai, sediaan ditutup dengan gelas penutup, setelah terlebih dahulu diberi *Enthelan*.
16. Tandai sediaan dengan memberikan label identifikasi dan kemudian dikeringkan.

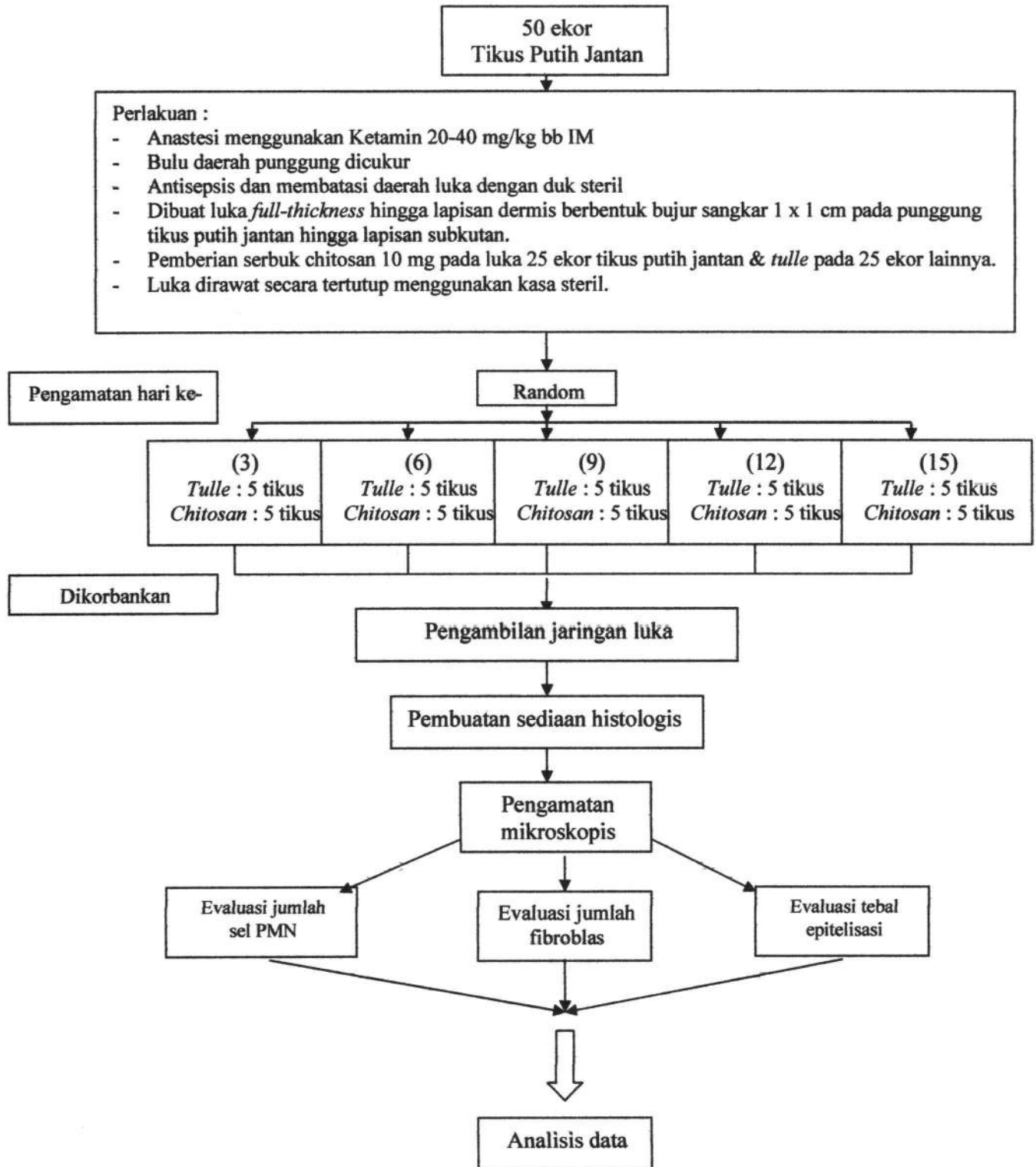
4.6.8. Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara melihat sediaan histologis jaringan luka kulit tikus putih dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran okuler 10x dan pembesaran objektif 4x, 10x dan 40x. Luka dievaluasi setiap hari mulai hari ke-3, 6, 9, 12 dan ke-15, dimana setiap harinya dilakukan pengamatan masing-masing 10 ekor tikus yang masing-masing terdiri atas 5 ekor tikus putih jantan dengan pemberian serbuk *chitosan* dan *tulle* pada 5 ekor tikus putih jantan lainnya. Dilakukan evaluasi awal di hari ke-3 karena umumnya proliferasi dan migrasi sel PMN, pembentukan fibroblas dan perubahan proses epitelisasi mulai terjadi. Sedangkan evaluasi hari terakhir hari ke-15 karena proses migrasi epitel dan fibroblas dalam *resurfacing* permukaan luka *full-thickness* pada kulit tikus umumnya telah lengkap.

4.7. Cara Pengolahan dan Analisis Data

Parameter yang diuji adalah jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitelisasi yang diukur pada satuan waktu mulai hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15. Hasil parameter dari 2 kelompok ini dibandingkan dengan menggunakan uji statistik *t-test*, sedangkan untuk mencari perbedaan variabel antar hari pengamatan pada kelompok dan variabel yang sama di analisis dengan anova 1 arah (Zainuddin, 2000). Analisis data menggunakan SPSS 17.

4.8. Kerangka Operasional Penelitian



BAB 5**DATA PENELITIAN DAN ANALISIS DATA PENELITIAN**

Pada penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan berupa luka *full-thickness* dengan ukuran 1x1 cm terhadap 50 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan kedalaman hingga jaringan subkutan. 50 ekor tikus ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 25 ekor untuk kelompok *chitosan* dan 25 ekor lainnya untuk kelompok *tulle* diatas luka. Pemberian serbuk *chitosan* diberikan sebanyak 10 mg (Ueno, Mori *et al.*, 2001) atau kira-kira menutupi seluruh permukaan luka; sedangkan *tulle* diberikan pada masing-masing luka sampai menutupi seluruh permukaan luka. Masing-masing pengobatan diamati dan dikorbankan setiap hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 hingga hari ke-15.

Tiap hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan hari ke-15, sebanyak 10 ekor tikus dikorbankan, yaitu 5 ekor tikus untuk kelompok *chitosan* dan 5 tikus lainnya untuk kelompok *tulle*. Luka dieksisi sekitar 0,5 cm dari tepi luka awal dimana sebelumnya diberikan terlebih dahulu penanda pada tempat pertama dilukai dengan menggunakan spidol. Hasil eksisi jaringan kulit dibungkus menggunakan kertas saring yang diberi lubang-lubang, kemudian di fiksasi menggunakan formalin 10% dan didiamkan minimal 4-5 hari. Selanjutnya dibawa ke laboratorium histologi untuk proses pembuatan sediaan histologi dan pewarnaan dengan menggunakan pewarnaan HE.

Dari sediaan histologi jaringan kulit tikus putih jantan ini, dilakukan pengamatan terhadap gambaran dan jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitelisasi berdasarkan pengamatan hari ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 hingga hari-15.

Sediaan diamati menggunakan teknik fotografi dan fotomikroskopi *Motic Image Plus 2.0 ML*, dengan pembesaran objektif 4x, 10x dan 40x. Sel PMN dan sel fibroblas dihitung secara manual, sedangkan tebal epitel diukur menggunakan penggaris *software Motic Image Plus 2.0 ML* kalibrasi objektif 40x dengan satuan mikrometer (mikron).

5.1. Data Penelitian

Data dari hasil penelitian ini berupa data jumlah sel PMN; jumlah sel fibroblas dan tebal epitelisasi (mikron) pada jaringan kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

5.1.1. Sel PMN

Sel PMN atau sel Polimorfonuklear terdiri atas sel neutrofil segmen yang diamati pada pembesaran 400x, dimana pengamatan dilakukan masing-masing di 3 tempat : pinggir kanan, tengah dan pinggir kiri luka. Pada luka, akumulasi sel PMN terjadi selama fase inflamasi dan bertahan hingga 5-6 hari tergantung besarnya luka.

Data lengkap hasil perhitungan jumlah sel PMN terdapat pada **Lampiran**

1. Adapun rata-rata (*mean*) dan simpangan baku (standar deviasi) data hasil perhitungan jumlah sel PMN pada *chitosan* dan *tulle* adalah sebagai berikut :

Hari ke-3 :

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	319,5333 ± 39,05665
Tulle	5	62,3333 ± 23,46510

Tabel 5.1. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-3

Hari ke-6

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	4,8000 ± 2,03579
Tulle	5	57,7333 ± 79,39612

Tabel 5.2. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-6**Hari ke-9**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	0
Tulle	5	12,9333 ± 25,97691

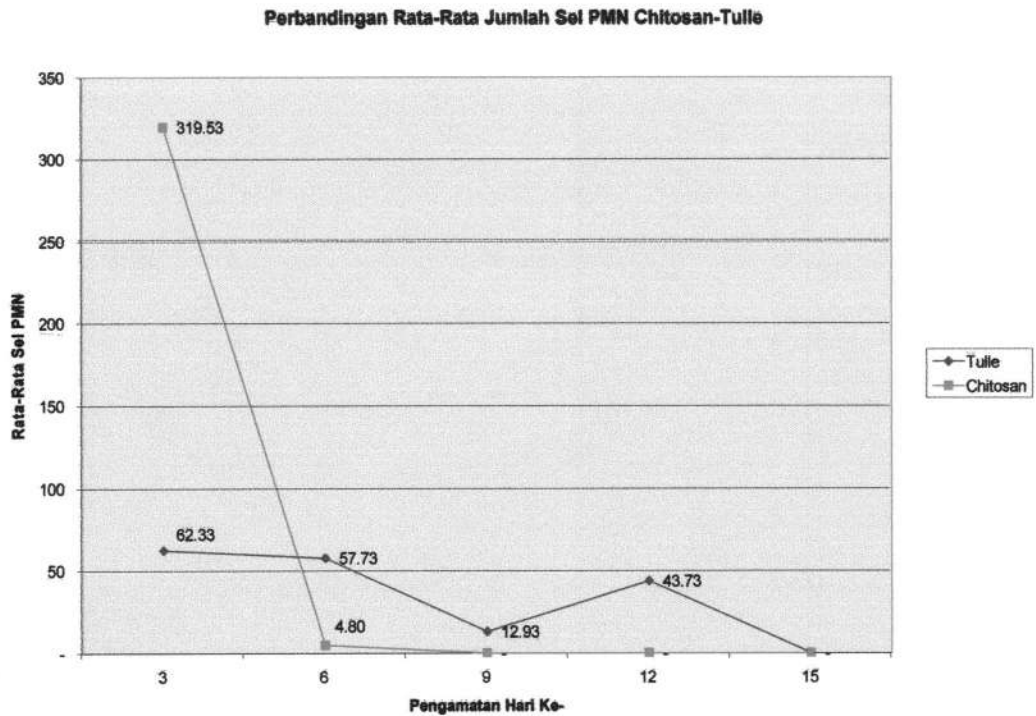
Tabel 5.3. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-9**Hari ke-12**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	0
Tulle	5	43.7333 ± 96.67511

Tabel 5.4. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-12**Hari ke-15**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	0
Tulle	5	0

Tabel 5.5. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel PMN hari ke-15



Gambar 5.1. Jumlah rata-rata sel PMN *Chitosan-Tulle*

Dari hasil perhitungan jumlah sel PMN, terjadi peningkatan jumlah sel PMN yang sangat ekstrim pada luka yang diberikan serbuk *chitosan* pada hari ke-3, namun makin menurun hingga pada akhirnya tidak didapatkan jumlah sel PMN sama sekali mulai hari ke-9. Hal ini sesuai dengan mekanisme penyembuhan luka secara normal, dimana jumlah sel PMN harusnya meningkat selama fase inflamasi dan semakin menurun dengan bertambahnya hari mendekati penyembuhan. Pada kelompok *tulle*, peningkatan jumlah sel PMN juga terjadi, namun tidak seekstrim *chitosan*, dan ditemukan jumlah sel PMN yang tetap meningkat pada kelompok *tulle* hari ke-12.

5.1.2. Jumlah Sel Fibroblas

Selama fase proliferasi pada proses penyembuhan, sel fibroblas memegang peranan penting. Fibroblas mengalami proliferasi dan mensintesis kolagen. Serat kolagen yang terbentuk menyebabkan adanya kekuatan untuk bertautnya tepi luka. Perhitungan jumlah sel fibroblas dilakukan dengan pembesaran 400x, dan perhitungan dilakukan di 3 tempat : pinggir kanan, tengah dan pinggir kiri luka. Data *mean* dan standar deviasi yang didapatkan adalah sebagai berikut (data lengkap hasil perhitungan jumlah sel fibroblas terdapat pada **Lampiran 1**) :

Hari ke-3 :

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	92,4000 ± 15,31412
Tulle	5	37,0667 ± 27.81826

Tabel 5.6. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-3

Hari ke-6

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	62,0000 ± 11,94432
Tulle	5	28,0667 ± 23,99583

Tabel 5.7. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-6

Hari ke-9

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	26,0667 ± 11,22349
Tulle	5	16,5333 ± 14,01111

Tabel 5.8. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-9

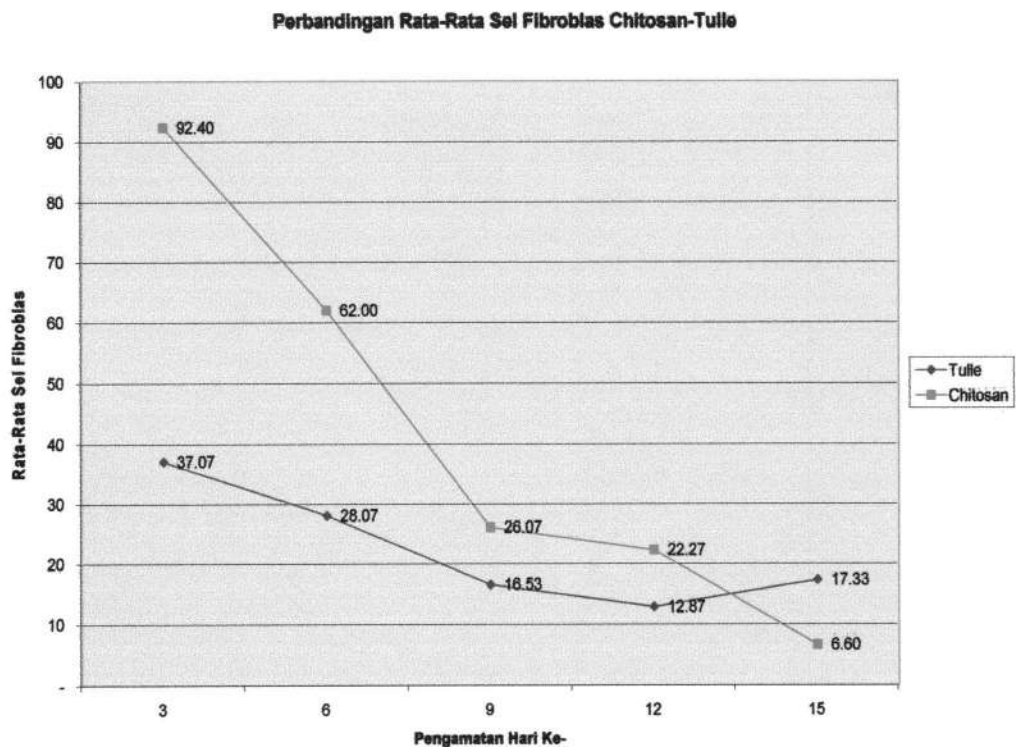


Hari ke-12

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	22,2667 ± 3,05869
Tulle	5	12,8667 ± 8,18400

Tabel 5.9. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-12**Hari ke-15**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	6.6000 ± 2.29008
Tulle	5	17.3333 ± 10.49074

Tabel 5.10. Jumlah rata-rata dan simpangan baku sel fibroblas hari ke-15**Gambar 5.2. Jumlah rata-rata sel fibroblas Chitosan-Tulle**

Dari hasil perhitungan jumlah sel fibroblas tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan, didapatkan rata-rata terjadi penurunan jumlah sel fibroblas makin mendekati hari ke-15. Ini disebabkan makin banyaknya jumlah sel fibrosit; dan jumlah serat kolagen yang disintesis fibroblas makin banyak memadati area luka. Kelompok *chitosan* cenderung memiliki peningkatan jumlah sel fibroblas yang lebih cepat dibandingkan kelompok *tulle*, diikuti juga dengan makin banyaknya serat kolagen yang menutupi area luka.

5.1.3. Tebal Epitelisasi

Tebal epitelisasi adalah panjang epitel yang diukur mulai dari *stratum basale* hingga *stratum terluar*. Tebal epitelisasi diukur menggunakan penggaris dari *software motic image plus 2.0 ML* menggunakan kalibrasi 40x objektif dengan satuan mikrometer (mikron), dan dilakukan 3 kali perhitungan pada setiap pengamatan, yaitu di bagian pinggir kanan luka, tengah dan pinggir kiri luka. Data lengkap pengukuran tebal epitel terdapat pada **Lampiran 1**. Adapun rata-rata (*mean*) dan standar deviasi tebal epitelisasi masing-masing kelompok adalah :

Hari ke-3 :

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	0
Tulle	5	0

Tabel 5.11. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-3

Hari ke-6

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	11,1747 ± 2,54822
Tulle	5	5,2773 ± 5,31847

Tabel 5.12. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-6**Hari ke-9**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	41,6047 ± 7,42014
Tulle	5	22,8417 ± 5,71743

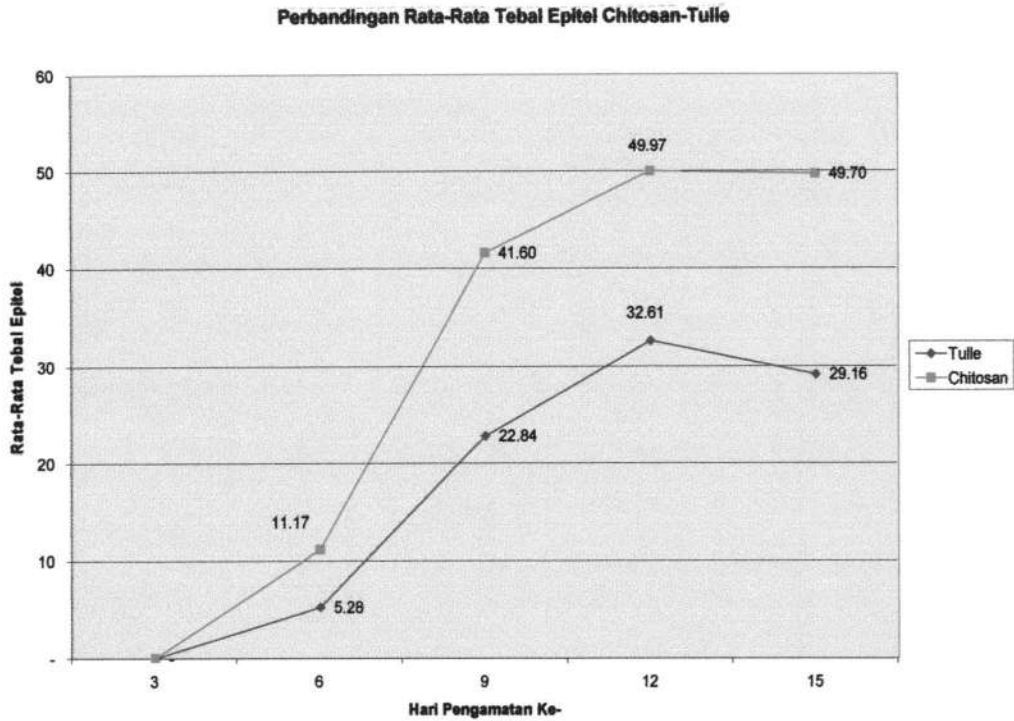
Tabel 5.13. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-9**Hari ke-12**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	49,9727 ± 1,19916
Tulle	5	32,6053 ± 6,91672

Tabel 5.14. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-12**Hari ke-15**

Kelompok	Jumlah Pengamatan	Rata-Rata (mean) dan Simpangan Baku (SD)
Chitosan	5	49,7000 ± 15,29500
Tulle	5	29,1643 ± 6,20920

Tabel 5.15. Jumlah rata-rata dan simpangan baku tebal epitel hari ke-15



Gambar 5.3. Jumlah rata-rata tebal epitel *Chitosan-Tulle*

Dari hasil pengukuran tebal epitel didapatkan bahwa epitelisasi mulai tampak pada hari ke-6 dan proliferasi meningkat hingga hari ke-12 dan ke-15. Tampak bahwa epitelisasi berlangsung lebih cepat pada kelompok *chitosan* dibandingkan kelompok *tulle*.

5.2. Analisis Data Penelitian

Data-data yang telah dikumpulkan berupa jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitelisasi dari keseluruhan sampel, selanjutnya dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode anova satu arah untuk menentukan ada tidaknya perbedaan pada masing-masing hari pengamatan pada kelompok perlakuan yang sama (*chitosan/tulle*), bila terdapat perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui pada kelompok hari ke berapa

perbedaan muncul dari masing-masing variabel dalam kelompok perlakuan yang sama. Uji *t-test* digunakan untuk mengetahui perbedaan variabel antara kelompok *chitosan* dan *tulle* pada pengamatan hari yang sama. Sebelum dilakukan analisis, dilakukan uji kenormalan data menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk menentukan apakah kelompok tersebut berdistribusi normal atau tidak. Kelompok data dikatakan berdistribusi normal bila hasil *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* memiliki nilai *significance level* atau derajat kemaknaan $> 0,05$ ($p > 0,05$). Dari hasil uji normalitas, semua data berdistribusi normal (**Lampiran 2**).

5.2.1. Kelompok Chitosan

Rangkuman hasil analisis varian satu arah pada kelompok *chitosan* dapat dilihat di **Lampiran 3**.

Berdasarkan hasil analisis varian satu arah pada kelompok *chitosan*, ditemukan perbedaan bermakna pada semua variabel. Untuk mengetahui pasangan kelompok hari yang mana memiliki perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Data lengkap hasil uji LSD terdapat di **Lampiran 4**.

Pada kelompok *chitosan* jumlah sel PMN perbedaan bermakna ditemukan pada pasangan kelompok hari ke-3 dengan ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15. Perbedaan jumlah sel fibroblas terdapat diantara kelompok hari ke-3 dengan ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15; hari ke-6 dengan hari ke-9, ke-12 dan ke-15; hari ke-9 dengan hari ke-15; dan hari ke-12 dengan hari ke-15. Sedangkan pada variabel tebal epitel,

perbedaan tampak pada kelompok hari ke-3 dengan hari ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15; hari ke-6 dengan hari ke-9, ke-12, dan ke-15.

5.2.2. Kelompok *Tulle*

Rangkuman hasil analisis varian (Anova) satu arah terdapat pada **Lampiran 3**.

Dikatakan terdapat perbedaan bila $p < 0,05$, sehingga berdasarkan analisis diatas tampak bahwa hanya variabel tebal epitel saja yang memiliki perbedaan pada kelompok *tulle*. Untuk mengetahui pasangan kelompok hari pengamatan yang mana memiliki perbedaan ukuran tebal epitel, maka analisis dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) (**Lampiran 4**).

Hasil uji LSD tebal epitel pada kelompok *tulle* menunjukkan perbedaan ditemukan pada pasangan kelompok hari ke-3 dengan ke-9; hari ke-3 dengan ke-12; hari ke-3 dengan hari ke-15; hari ke-6 dengan ke-9; hari ke-6 dengan ke-12; hari ke-6 dengan ke-15; dan hari ke-9 dengan ke-12. Sedangkan lainnya tidak berbeda.

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan masing-masing variabel antara kelompok *chitosan* dan *tulle* maka dilakukan metode *t-test*. Bila $p < 0,05$ maka dikatakan terdapat perbedaan antara 2 kelompok perlakuan (*chitosan* dan *tulle*) pada masing-masing pengamatan hari yang sama.

a. Sel PMN

Hasil uji *t-test* dapat dilihat di **Lampiran 5**. Data menunjukkan terdapat perbedaan jumlah sel PMN pada hari ke-3 antara kelompok *chitosan* dengan

kelompok *tulle*. Jumlah sel PMN pada kelompok *chitosan* dan *tulle* meningkat sejak hari ke- 3 atau pada fase inflamasi dan makin menurun seiring dengan mendekati masa penyembuhan. Sedangkan tidak ditemukan perbedaan secara statistik antar keduanya pada pengamatan hari lainnya.

b. Sel Fibroblas

Berdasarkan uji *t-test* (**Lampiran 5**), perbedaan jumlah sel fibroblas antara kelompok *chitosan* dan *tulle* terdapat pada hampir semua hari pengamatan. Fibroblas berperan dalam sintesis serat kolagen. Semakin banyaknya sel fibroblas, maka serat kolagen yang disintesis akan semakin banyak pula. Secara mikroskopis padatnya kolagen menunjang proses penyembuhan yang cepat yang ditandai dengan makin tingginya kekuatan bertautnya tepi luka. Pada kelompok *tulle* umumnya kolagen yang dibentuk lebih sedikit dan lebih jarang dibandingkan kelompok *chitosan*.

c. Tebal Epitel

Dengan uji *t-test* (**Lampiran 5**), terdapat perbedaan ukuran tebal epitel hampir disemua hari pengamatan antara kelompok *chitosan* dengan *tulle*, kecuali hari ke-3 dan ke-6. Kelompok *chitosan* cenderung memiliki epitel yang lebih tebal dibandingkan kelompok *tulle*.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penyembuhan luka merupakan serangkaian kompleks biologis yang melibatkan sejumlah besar sel, sitokin, faktor pertumbuhan, *protease* dan komponen ekstraseluler yang berperan dalam restorasi integrasi jaringan yang rusak (Harianto, 2005). Proses penyembuhan luka diperiksa dan digambarkan oleh *Schultz* sebagai suatu proses yang tumpang tindih melibatkan 5 tahap yang kompleks baik biokimia dan seluler, mencakup proses : hemostasis, inflamasi, migrasi, proliferasi dan maturasi (Boateng *et al.*, 2007).

Pemberian obat secara topikal ditujukan agar penetrasi obat dikulit lebih cepat dan segera mencapai target. Kegunaan dan khasiat pengobatan secara topikal didapat dari pengaruh fisik dan kimiawi obat yang diaplikasikan diatas kulit yang sakit. Pengaruh fisik adalah mengeringkan, membasahi, melembutkan, mendinginkan dan proteksi dari pengaruh buruk dari luar. Sedangkan pengaruh kimiawi adalah membunuh atau menghambat organisme spesifik dikulit.

Aplikasi klinis *chitosan* dan *tulle* pada penyembuhan luka khususnya luka *full-thickness* telah banyak dilakukan, namun demikian masih belum banyak penelitian yang membandingkan keduanya. Pada penelitian ini yang diamati adalah mengenai gambaran dan jumlah sel PMN, sel fibroblas dan tebal epitel selama masa penyembuhan luka *full-thickness* pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan. Tepi luka dengan jelas dapat diketahui dengan adanya diskontinuitas epitel, serbukan sel-sel radang dan fibroblas.

6.1. Sel PMN

Ekstravasasi sel-sel PMN biasanya terjadi beberapa menit-24 jam dan dapat bertahan hingga 3 hari, namun tergantung juga oleh ukuran dan besarnya kedalaman luka (Chin GA, 2005). Sel PMN diperlukan untuk mencegah dan mengikat kuman-kuman dan benda asing (fagositosis dan elaborasi enzim degradatif) sehingga diharapkan penyembuhan luka yang cepat dapat terjadi (Mitchell RN, Cotran RS, 2007). Selain itu sel radang ini juga menghasilkan mediator yang merangsang sintesis matriks ekstraseluler (*ECM*) yang baru (Chin GA, 2005; Mitchell RN, Cotran RS, 2007). Sistem komplemen mengaktivasi anafilaktosin *C3a* dan *C5a* yang secara langsung meningkatkan permeabilitas vaskular serta menarik neutrofil dan monosit ke daerah luka. IL-1 berperan dalam mempengaruhi *adhesi* dan transmigrasi sel PMN ke area luka.

Dari hasil perhitungan jumlah sel PMN pada hari-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15 (**Lampiran 6**), sel PMN umumnya meningkat di awal penyembuhan yaitu hari ke-3 yang kemudian turun tajam pada hari-hari selanjutnya mendekati penyembuhan. *Chitosan* cenderung lebih awal menstimulasi munculnya sel PMN dibandingkan *tulle*, namun pada akhirnya juga menurun drastis seiring mendekati penyembuhan jaringan luka. Berdasarkan analisa statistik *t-test*, hanya pada hari ke-3 terdapat perbedaan bermakna antara pemakaian *chitosan* dan *tulle*, namun secara histologis, pada kelompok *tulle* masih diketemukannya sel-sel PMN dan sel inflamasi lainnya hingga hari ke-9. Ini diakibatkan jumlah sel PMN diawal yang tidak adekuat, sehingga memungkinkan terjadinya infeksi atau mengakibatkan penyembuhan luka menjadi lebih lama. Selain itu, dengan Anova tampak bahwa pada kelompok *chitosan*, perbedaan jumlah rata-rata sel PMN

muncul diantara berbagai hari pengamatan, sehingga perlu dilakukan uji LSD untuk mencari pasangan hari ke berapa yang menunjukkan perbedaan. Hasil uji LSD menunjukkan perbedaan muncul khususnya antar hari ke-3 dengan hari lainnya, dimana jumlah sel PMN meningkat di awal penyembuhan (hari ke-3) dan kemudian menurun sejalan dengan makin menyembuhnya luka. Sedangkan pada kelompok *tulle*, tidak ditemukan adanya perbedaan jumlah rata-rata sel PMN pada berbagai hari pengamatan, atau jumlah sel rata-rata jumlah sel PMN hampir sama disetiap harinya. Ueno dkk (2001) dalam penelitiannya menemukan bahwa luka yang diberikan serbuk *chitosan* mempunyai gambaran dan jumlah sel PMN yang lebih banyak dan muncul lebih dini dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan. *Chitosan* menstimulasi migrasi sel-sel inflamasi seperti sel PMN pada fase paling awal dari proses penyembuhan luka, dengan jalan menstimulasi IL-1 (Ueno, Mori *et al.*, 2001).

6.2. Sel Fibroblas

Fase proliferasi umumnya terjadi hari 4-21 setelah cedera (Gurtner, 2007). Fibroblas mulai terlihat pada hari kedua setelah trauma dan semakin nyata pada hari ke-3 dan ke-4. Hal ini terjadi karena sekresi faktor pertumbuhan yang mempengaruhi migrasi dan aktivasi sel ini. Fibroblas berperan dalam sintesis kolagen (mulai hari 3-5 paska trauma) yang merupakan komponen primer struktur jaringan baru (Harianto, 2005; Gurtner *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan adanya perbedaan bermakna jumlah fibroblas diantara kelompok *chitosan* dan *tulle* kecuali pada hari ke-9 dan ke-15. Jumlah fibroblas ditemukan lebih banyak pada *chitosan* dibandingkan *tulle*

pada setiap hari pengamatan yang mengartikan bahwa jumlah kolagen hasil sintesis fibroblas juga lebih banyak pada kelompok *chitosan* daripada *tulle*; dan jumlah fibroblas ini makin menurun mendekati penyembuhan. Penurunan ini disebabkan makin banyaknya fibroblas yang berubah menjadi fibrosit dan semakin padatnya kolagen pada saat mendekati penyembuhan. Dengan Anova tidak ditemukan perbedaan jumlah rata-rata sel fibroblas disetiap hari pengamatan pada kelompok *tulle*. Sedangkan kelompok *chitosan*, ditemukan perbedaan jumlah rata-rata fibroblas diantara masing-masing hari pengamatan, sehingga perlu dilakukan uji LSD untuk menentukan pasangan hari pengamatan yang mana menunjukkan perbedaan. Berdasarkan uji LSD, tampak bahwa setiap hari pengamatan menunjukkan perbedaan jumlah satu sama lain kecuali antara pengamatan hari ke-9 dengan ke-12 yang mempunyai gambaran rata-rata jumlah sel fibroblas yang sama.

Pada hari ke-9 dan ke-15, tampak bahwa jumlah fibroblas tidak berbeda antara kelompok *chitosan* dengan *tulle*. Akan tetapi, secara mikroskopis (Lampiran 7), tampak kolagen yang dihasilkan pada kelompok *chitosan* lebih banyak dan padat dibandingkan kelompok *tulle*, dimana kolagen ini berperan sebagai *tensile strength*. Berdasarkan asumsi ini dapat disimpulkan luka yang diberikan *chitosan* mengakibatkan kontraksi dan penutupan luka lebih cepat dengan kekuatan luka yang lebih baik dibandingkan *tulle*. *Chitosan* meningkatkan produksi faktor pertumbuhan *TGF- β* dan *PDGF* dimana faktor pertumbuhan ini mendorong terjadinya proliferasi fibroblas (Ueno, 2001; Ueno, Mori *et al.*, 2001).

6.3. Tebal Epitel

Re-epitelisasi berlangsung 5-10 hari pada luka superfisial atau beberapa bulan tergantung ukuran defek, suplai nutrien, jumlah sel basal yang tersisa dan lingkungan luka. Dengan *t-test*, tampak perbedaan bermakna ketebalan epitel antara kelompok *chitosan* dan kelompok *tulle*. Secara mikroskopis (Lampiran 8), epitelisasi kelompok *chitosan* muncul lebih dini dan mempunyai ketebalan yang lebih besar dibandingkan kelompok *tulle*.

Uji Anova menunjukkan perbedaan rata-rata ketebalan epitel terdapat pada kelompok *chitosan* maupun kelompok *tulle*. Sehingga perlu dilanjutkan dengan uji LSD. Dengan uji LSD, perbedaan ketebalan epitel justru terjadi di pertengahan hari pengamatan (hari ke-6 sampai dengan hari ke-12) pada kelompok *tulle*, sedangkan pada kelompok *chitosan* ditemukan perbedaan ketebalan epitel disetiap hari pengamatan, yaitu makin menebal dan tertutup sempurna diakhir pengamatan. Pengaruh *chitosan* terhadap epitelisasi ini disebabkan stimulasinya terhadap *TGF- β* yang berfungsi meningkatkan maturasi (diferensiasi dan keratinisasi) lapisan epidermal (Ueno, Mori *et al.*, 2001; Chin GA, 2005).

Dari laporan penelitian diketahui bahwa *chitosan* dan *tulle* sama-sama merupakan bahan aktif yang membantu mempercepat penyembuhan luka dan saat ini keduanya telah banyak digunakan sebagai obat luka. Berdasarkan sifat biomekanik, *chitosan* dan *tulle* juga sama-sama memenuhi persyaratan sebagai obat luka, namun *chitosan* mengandung substansi biologi aktif yang berpengaruh terhadap migrasi sel PMN, sel fibroblas dan epitelisasi lebih dini.

Pada penelitian Ueno, Mori, dkk (2001) ditemukan bahwa *chitosan* merupakan bahan biopolimer yang dapat menstimulasi makrofag untuk sintesis

berbagai faktor pertumbuhan pada penyembuhan luka. Salah satunya adalah *transforming growth factor- β* (*TGF- β*) dan *platelet derived growth factor* (*PDGF*) (Ueno, Mori *et al.*, 2001; Ueno, Nakamura *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2009). *TGF- β* dan *PDGF* mendorong proliferasi sel fibroblas (Mitchell RN, Cotran RS, 2007) juga membantu meningkatkan maturasi lapisan epidermal (Chin GA, 2005), sehingga selain menambah jumlah sel fibroblas faktor pertumbuhan ini juga berpengaruh terhadap proses epitelisasi. Nishimura dkk juga melaporkan bahwa *chitosan* dapat menstimulasi makrofag untuk memproduksi *interleukin* (*IL*)-1. Efek positif-negatif dari *IL-1* seperti halnya *IL-6* dan *TNF- α* , dapat mengakibatkan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen (Nishimura *et al.*, 1986 cit Ueno, Mori *et al.*, 2001; Mariapan *et al.*, 1999). *IL-1* juga berperan meningkatkan *adhesi* dan transmigrasi sel PMN ke area luka. Sel PMN yang tinggi diperlukan pada awal penyembuhan selain untuk fagositosis juga menghasilkan mediator yang merangsang sintesis matriks ekstraseluler (*ECM*) yang baru.

Walaupun *chitosan* dan *tulle* pada akhirnya mampu menutup luka dengan baik, namun secara mikroskopis tampak bahwa jumlah kolagen yang dihasilkan keduanya tidaklah sama. Efek *chitosan* terhadap proliferasi fibroblas menghasilkan sabut-sabut kolagen yang lebih padat dan teratur, sehingga kekuatan jaringan luka lebih baik. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana hubungan langsung *chitosan* terhadap sabut kolagen dan antisipasinya terhadap terbentuknya jaringan parut, mengingat peningkatan jumlah sabut kolagen yang berlebihan juga berpotensi buruk terhadap estetika luka.

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan :

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan :

1. Ada perbedaan bermakna jumlah sel PMN pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*, dimana perbedaan ini tampak pada hari ke-3 pengamatan, yaitu jumlah sel PMN pada kelompok *chitosan* lebih tinggi daripada kelompok *tulle*. Sedangkan hari pengamatan lainnya tidak menunjukkan perbedaan jumlah rata-rata sel PMN, dimana jumlah sel PMN semakin sedikit hingga tidak ditemukan sama sekali mendekati hari ke-15.
2. Ada perbedaan bermakna jumlah sel fibroblas pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan menggunakan serbuk *chitosan* dibandingkan dengan *tulle*, dimana perbedaan ini tampak pada hari ke-3, ke-6, dan hari ke-12, yaitu jumlah fibroblas lebih banyak ditemukan pada kelompok *chitosan* daripada kelompok *tulle*. Pada hari ke-9 dan ke-15 tidak ditemukan perbedaan jumlah fibroblas antara kedua kelompok, namun secara mikroskopis, jumlah kolagen kelompok *chitosan* lebih padat dan banyak dibandingkan kelompok *tulle*.
3. Ada perbedaan bermakna tebal epitelisasi pada penyembuhan luka *full-thickness* kulit tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan

dengan menggunakan serbuk *chitosan* yang dibandingkan dengan *tulle*, dimana perbedaan tampak hampir diseluruh hari pengamatan sejak epitelisasi terjadi (ke-9 sampai dengan ke-15), yaitu tebal epitel lebih besar ditemukan pada kelompok *chitosan* dibandingkan kelompok *tulle*.

7.2. Saran :

1. Mengacu pada kesimpulan, *chitosan* dapat digunakan sebagai bahan alternatif obat alam (rangka hewan) untuk pengobatan luka *full-thickness* yang ekonomis, efektif dan efisien.
2. Perlu dilakukan penelitian pada luka *full-thickness* pada hewan percobaan yang struktur kulit mendekati struktur kulit manusia, seperti : babi, sehingga aplikasinya lebih baik.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pembuatan sediaan topikal *chitosan* dalam bentuk lain, seperti *gel*, kasa atau lainnya yang diharapkan pemakaian obat lebih mudah diserap dan tidak mengganggu luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldini NN, Fini M, Giardino R, 2008. From Hippocrates to Tissue Engineering : Surgical strategies in Wound Treatment. *World Journal of Surgery* 32 : 2114-2121.
- Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB, Song YH, Alt EU, 2009. Human Adipose-Derived Stem Cells Seeded on Silk Fibroin-Chitosan Scaffold Enhance Wound Repair in Murine Soft Tissue Injury Model. *Stem Cell* 27 : 250-258.
- Berger, Reist, 2003. Structure and Interactions in Chitosan Hydrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 : 35-52.
- Boateng SJ, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM, 2007. Wound Healing Dressing and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 : 2892-2923.
- Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR, 2008. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and non-infected wounds in mice. *Wound Repair & Regeneration* 16 : 425-431.
- Chin GA, Diegelmann RF, Schultz GS, 2005. Celular and Molecular Regulation of Wound Healing. In (Falabella AF, Kirsner RS, eds). *Wound Healing*. New York : Taylor & Francis Group, pp. 17-26.
- Davidson JM, 1998. Animal models for wound repair. *Arch dermatol Res* 290 : S1-S11.
- Dorset-Martin WA, Wysocki AB, 2008. Rat Models of Skin Wound Healing. In (Conn, P.M., eds). *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa : Humana Press, p : 631.
- Enoch S, Harding K, August 8th 2003. Wound Bed Preparation : The Science Behind the Removal of Barriers to Healing. Available from URL : <http://www.medscape.com/viewarticle/459733>.
- Eriksson E, Svensjo T, 2004. Autologous Skin Transplantation. In (Rovee DT, Maibach HI, eds). *The Epidermis In Wound Healing*. New York : CRC Press, pp. 291.
- Fontana CR, Dos Santos Junior DS, Bosco JM, Spolidorio DM, Marcantonio RAC, 2008. Evaluation of Chitosan Gel as Antibiotic and Photosensitizer Delivery. *Drug Delivery* 15 : 417-422.

- Fujita M, Ishihara M, Shimizu M., Obara K, Nakamura S, Kanatani Y, Moromoto Y, Takase B, Matsui T, Kikuchi M, Maehara T, 2007. Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectible chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in rat hindlimb ischemia model. *Wound Repair & Regeneration* 15 : 58-65.
- Gnadt BJ, 2006. Ethical & Legal Perspective. In (Suckow MA, Weisbrath SH, Franklin CL, eds). *The Laboratory Rat*, 2nd Edition, New York : American College of Laboratory Animal Medicine Sense, pp: 666-677.
- Gurjala A, Howard MA, 2007. Dressing. In (Kryger ZB, Sisco M, eds). *Practical Plastic Surgery*. Texas : Landes Bioscience, pp :12-19.
- Gurtner GC, 2007. Wound Healing : Normal & Abnormal. In (Thorne CH, eds). *Grabb & Smith's Plastic Surgery*, 6th Edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, pp : 15-20.
- Hargono, Abdullah, Sumantri I, 2008. Pembuatan Kitosan dari Limbah Cangkang Udang Serta Aplikasinya dalam Mereduksi Kolesterol Lemak Kambing. *Reaktor* 12 : 53-57.
- Harianto A, 2005. Perbandingan Pemakaian Membran Amnion dan *Tulle* pada Epitelisasi Luka *Full Thickness*. Karya Ilmiah akhir PPDS I Ilmu Bedah Umum, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ishihara M, Ono K, Sato M, Nakanishi K, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Fujita M, Kikuchi M, Kurita A, 2001. Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair & Regeneration* 9 : 513-521.
- James H., 1994. Wound dressings in Accident and Emergency Departments. *Accident and Emergency Nursing* 2 : 87-93.
- Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT, 2008. Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and regenerative Medicine. *Current Topics in Medicine Chemistry* 8 : 354-364.
- Junqueira LC, Carneiro J, 2007. *Histologi Dasar Teks & Atlas*, Jakarta : EGC, hal : 355-363.
- Kato Y, Onishi H, Machida Y, 2003. Application of Chitin and Chitosan Derivates in the Pharmaceutical Field. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 4 : 303-309.
- KEPK-Badan Litbang Kesehatan, July 2nd 2009. Etik Penggunaan Hewan Percobaan Dalam Penelitian Kesehatan. Available from URL : <http://www.litbang.depkes.go.id/download/materi020709/SOSIALISASI%20ETIK%20PENGGUNAAN%20HP%20%282009%29.pdf>.

- Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS, 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26 : 1-21.
- Knill CN, Kennedy JF, Mistry J, Mirafteb M, Smart G, Grocock MR., Williams HJ, 2004. Alginate fibers modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 55 : 65-76.
- Mitchell RN, Cotran RS, 2007. Pemulihan Jaringan : Regenerasi dan Fibrosis Sel. Dalam (Kumar, Cotran, Robbins, eds). *Buku Ajar Patologi*. Alih bahasa : Prasetyo A, Pendit, BU, Priliono, T. Jakarta : EGC, hal : 75-79.
- Kusumawati, D, 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press, hal : 99.
- Liben P, 1992. *Pengetahuan Teknik Laboratorium*. Surabaya : Program Pasca Sarjana.
- Lu L, Galiano RD, 2007. Wound Healing and Principles of Wound Care. In (Kryger ZB, Sisco M, eds). *Practical Plastic Surgery*. Texas : Landes Bioscience, pp :1-3.
- Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman, Purwanto H, 2006. Perkiraan Besar Sampel. Dalam (Sastroasmoro S, Ismael S, eds). *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Jakarta : Binarupa Aksara, hal : 282-283.
- Mann A, Breyhahn K, Schirmacher P, Blessing M, 2001. Keratinocyte-Derived Granulocyte±Macrophage Colony stimulating Factor Accelerates Wound Healing : stimulation of Keratinocyte Proliferation, Granulation Tissue Formation, and vascularization. *The Journal of Investigative Dermatology* 117 : 1482-1390.
- Mariappan MR, Alas EA, Prager MD, 1999. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen – fibroblast interactions. *Wound Repair & Regeneration* 7 : 400-406.
- Meidina, Sugiyono, Janie SL, Suhartono MT, 2004. Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan Yang Diproduksi Menggunakan Kitonase Dari Isolat B. *Licheniformis MB-2*. Available from URL : http://www.iptek.net.id/ind/pustaka_pangan/pdf/prosiding/oral/GB06-Meidina.pdf
- Morison MJ, 2004. *Manajemen Luka*. Alih bahasa : Tyasmono A.F. Jakarta : EGC, hal. 5, 10-13.

- Rigalli A, 2009. Euthanasia. In (Rigalli A, Di Loreto VE, eds). *Experimental Surgical Models in The Laboratory Rat*. New York : Taylor & Francis Group, pp. 31-32.
- Rivera AE, DO, Spencer JM, 2007. Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clinics in Dermatology* 25 : 39-48.
- Schultz GS, 2007. The Physiology of Wound Bed Preparation. In (Granick MS, Gamelli RL, eds). *Surgical Wound Healing and Management*. New York : Informa Healthcare USA, Inc, pp. 1-11.
- Sektiari B, 2009. *Aspek Etik Pada Penelitian Dengan Hewan Coba*. Surabaya : FK Unair, hal : 11-13.
- Setiatin ET, Dec 20th 2004. Euthanasia : Tinjauan Etik Pada Hewan. Available from URL : http://www.rudycr.com/PPS702-ipb/09145/enny_tantini_setiatin.pdf.
- Shelma, Paul W, Sharma, 2008. Chitin Nanofibre Reinforced Thin Chitosan Films for Wound Healing Application. *Trens Biomaterials Artif. Organs* 22 : 107-111.
- Silbernagl S, Lang F, 2000. Tissue Repair. In Blood. In *Color Atlas of Pathophysiology*. New York : Thieme, pp : 50-51.
- Singh A, Halder S, Menon GR, Chumber S, Misra MC, Sharma LK, Srivastava A, 2003. Meta-analysis of Randomized Controlled Trials on Hydrocolloid Occlusive dressing Versus Conventional Gauze Dressing in Healing of Chronic Wounds. *Asian Surgical* 24 : 326-332.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia, pp: 37-44, 56-57,
- Tjokroprawiro A, Pudjirahardjo WJ, Putra ST, 2002. *Pedoman Penelitian Kedokteran*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Todorovic V, Pesko P, Micev M, Bjelovic M, Budec M, Micic M, Brasanac D, Ilic-Stojanovic O, 2008. Insulin-like growth factor in wound healing of rat skin. *Regulatory Peptides* 150 : 7-13.
- Tomic-Canic M, Agren MS, Alvarez OM, 2004. Epidermal Repair and Chronic Wound. In (Rovee DT, Maibach HI, eds). *The Epidermis In Wound Healing*. New York : CRC Press, pp. 26-34.
- Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T, 2001. Evaluation effects of chitosan for the ekstracellular matrix production by

- fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* 22 : 2125-2130.
- Ueno H, 2001. Study on mechanisms of wound healing acceleration by chitosan. *Japanese Journal of Veterinary Research* 49 : 35-36.
- Ueno H, Mori T, Fujinaga T, 2001. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52 : 105-115.
- Vinsova J, Vavrikova E, 2008. Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosan. *Curret Pharmaceutical Design* 14 : 1311-1326.
- Volger GA, 2006. Anesthesia & Analgesia. In (Suckow MA, Weisbrath SH, Franklin CL, eds). *The Laboratory Rat*, 2nd Edition, New York : American College of Laboratory Animal Medicine Sense, pp: 54-55.
- Watcher MA, Wheeland RG, 1989. The Role of Topical Agents in the Healing of Full-Thickness Wounds. *Journal of Dermatologic Surgery & Oncology* 15 : 1188-1195.
- Waynforth HB, Flecknell PA, 1992. *Experimental and Surgical Technique in The Rat*, second edition. London : Academic Press Limited, pp: 157-181.
- Williams D, 2002 The Enabling Technological Advantages of Chitin. *Medical Device Technology* : 8-12.
- Xingfeng G, Wei Z, Chunlin H, Changzheng W, 2009. Experimental Study of Effect of Chitosan/Alginate Dressing on Wound Immersed in Seawater. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* 23 : 708-712.
- Zainuddin M, 2000. *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Pasca Sarjana Universitas Airlangga, hal : 51-55, 80-81.

Lampiran 1**Data Pengamatan Chitosan dan Tulle****Hari ke-3**

Ket	Chitosan					Tulle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PMN	414	526	483	422	512	138	32	42	126	142
Fibroblas	62	88	58	86	82	85	36	18	38	54
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMN	288	462	446	418	382	31	56	27	68	24
Fibroblas	118	108	98	127	76	106	42	8	22	16
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMN	76	106	86	94	78	98	43	33	48	27
Fibroblas	132	131	106	62	52	62	28	8	21	12
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Hari ke-6

Ket	Chitosan					Tulle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PMN	18	6	12	8	6	105	5	214	2	15
Fibroblas	64	58	46	82	67	66	12	43	9	12
Epitel	11.39	20.81	18.47	12.71	9.42	0	7.47	0	12.57	15.05
PMN	1	3	8	6	2	88	4	311	0	3
Fibroblas	85	69	54	61	43	54	10	54	8	8
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMN	0	0	2	0	0	63	14	32	4	6
Fibroblas	88	62	81	44	26	44	14	65	12	10
Epitel	21.2	19.86	23.35	11.59	18.82	0	9.33	0	14.93	11.39

Hari ke-9

Ket	Chitosan					Tulle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PMN	0	0	0	0	0	4	62	4	0	0
Fibroblas	14	26	47	12	22	14	36	18	8	5
Epitel	36.41	31.42	46.59	46	54.6	26.99	45.14	36.67	27.49	36.13
PMN	0	0	0	0	0	6	62	2	0	0
Fibroblas	18	35	38	16	57	12	46	24	10	6
Epitel	40.25	32.99	54.39	44.31	37.7	26.66	0	0	20.42	0
PMN	0	0	0	0	0	0	54	0	0	0
Fibroblas	12	28	14	14	38	6	38	14	4	7
Epitel	24.16	36.23	44.77	50.66	43.59	28.8	9.93	40.84	24.46	38.87

Hari ke-12

Ket	Chitosan					Tulle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PMN	0	0	0	0	0	335	0	0	0	0
Fibroblas	25	24	21	24	10	36	17	3	2	9
Epitel	36.35	44.37	39.66	65.58	46.89	49.71	40.59	48.3	35.31	43.7
PMN	0	0	0	0	0	269	0	0	2	1
Fibroblas	28	18	32	17	15	28	4	3	8	22
Epitel	41.78	48.09	59.29	38.87	48.86	0	0	23.18	47.67	0
PMN	0	0	0	0	0	46	0	0	3	0
Fibroblas	22	28	16	28	26	12	10	6	16	17
Epitel	68.8	58.9	56.15	45.56	50.44	42.34	46.97	41.23	35.01	28.59

Hari ke-15

Ket	Chitosan					Tulle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PMN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibroblas	6	8	11	9	6	22	18	36	8	4
Epitel	33.09	37.26	42.83	49.48	90.13	34.07	29.58	59.5	48.57	39.86
PMN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibroblas	2	7	10	5	10	18	26	33	6	6
Epitel	34.07	77.23	60.87	53.39	73.98	30.01	7.82	0	6.68	0
PMN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibroblas	2	5	8	4	6	15	30	21	11	6
Epitel	15.56	37.29	52.87	39.91	47.54	43.81	39.16	45.81	59.84	24.97

Lampiran 2**1. Uji Normalitas Kelompok Chitosan****a. Sel PMN**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		PMN hari ke-3	PMN hari ke-6	PMN hari ke-9	PMN hari ke-12	PMN hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	319.5333	4.8000	.0000	.0000	.0000
	Std. Deviation	39.05665	2.03579	.00000 ^c	.00000 ^c	.00000 ^c
Most Extreme Differences	Absolute	.217	.212			
	Positive	.138	.212			
	Negative	-.217	-.174			
Kolmogorov-Smirnov Z		.485	.473			
Asymp. Sig. (2-tailed)		.973	.978			
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						
c. The distribution has no variance for this variable. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed.						

b. Sel Fibroblas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		Fibroblast hari ke-3	Fibroblast hari ke-6	Fibroblast hari ke-9	Fibroblast hari ke-12	Fibroblast hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	92.4000	62.0000	26.0667	22.2667	6.6000
	Std. Deviation	15.31412	11.94432	11.22349	3.05869	2.29008
Most Extreme Differences	Absolute	.176	.267	.245	.395	.197
	Positive	.139	.267	.245	.186	.174
	Negative	-.176	-.245	-.226	-.395	-.197
Kolmogorov-Smirnov Z		.393	.596	.548	.883	.440
Asymp. Sig. (2-tailed)		.998	.869	.925	.417	.990
a. Test distribution is Normal.						

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		Fibroblast hari ke-3	Fibroblast hari ke-6	Fibroblast hari ke-9	Fibroblast hari ke-12	Fibroblast hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	92.4000	62.0000	26.0667	22.2667	6.6000
	Std. Deviation	15.31412	11.94432	11.22349	3.05869	2.29008
Most Extreme Differences	Absolute	.176	.267	.245	.395	.197
	Positive	.139	.267	.245	.186	.174
	Negative	-.176	-.245	-.226	-.395	-.197
Kolmogorov-Smirnov Z		.393	.596	.548	.883	.440
Asymp. Sig. (2-tailed)		.998	.869	.925	.417	.990
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						

c. Tebal Epitel

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		Epitel hari ke-3	Epitel hari ke-6	Epitel hari ke-9	Epitel hari ke-12	Epitel hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000	11.1747	41.6047	49.9727	49.7000
	Std. Deviation	.00000 ^c	2.54822	7.42014	1.19916	15.29500
Most Extreme Differences	Absolute		.225	.291	.197	.245
	Positive		.155	.259	.197	.235
	Negative		-.225	-.291	-.150	-.245
Kolmogorov-Smirnov Z			.503	.650	.440	.548
Asymp. Sig. (2-tailed)			.962	.792	.990	.924
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						
c. The distribution has no variance for this variable. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed.						

2. Uji Normalitas Kelompok *Tulle*

a. Sel PMN

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		PMN hari ke-3	PMN hari ke-6	PMN hari ke-9	PMN hari ke-12	PMN hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	62.3333	57.7333	12.9333	43.7333	.0000
	Std. Deviation	23.46510	79.39612	25.97691	96.67511	.00000 ^c
Most Extreme Differences	Absolute	.187	.334	.444	.468	
	Positive	.187	.334	.444	.468	
	Negative	-.183	-.241	-.309	-.325	
Kolmogorov-Smirnov Z		.418	.748	.993	1.047	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.995	.631	.277	.223	
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						
c. The distribution has no variance for this variable. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed.						

b. Sel Fibroblas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		Fibroblast hari ke-3	Fibroblast hari ke-6	Fibroblast hari ke-9	Fibroblast hari ke-12	Fibroblast hari ke-15
N		5	5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	37.0667	28.0667	16.5333	12.8667	17.3333
	Std. Deviation	27.81826	23.99583	14.01111	8.18400	10.49074
Most Extreme Differences	Absolute	.325	.348	.262	.222	.205
	Positive	.325	.348	.262	.222	.205
	Negative	-.177	-.260	-.226	-.139	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		.726	.779	.586	.495	.457
Asymp. Sig. (2-tailed)		.667	.578	.882	.967	.985
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						

c. Tebal Epitel

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
	Epitel hari ke-3	Epitel hari ke-6	Epitel hari ke-9	Epitel hari ke-12	Epitel hari ke-15	
N	5	5	5	5	5	
Normal Parameters^{a,b}	Mean	.0000	5.2773	22.8417	32.6053	29.1643
	Std. Deviation	.00000 ^c	5.31847	5.71743	6.91672	6.20920
Most Extreme Differences	Absolute		.239	.377	.209	.231
	Positive		.239	.208	.209	.198
	Negative		-.161	-.377	-.164	-.231
Kolmogorov-Smirnov Z		.535	.843	.468	.516	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.937	.475	.981	.953	
a. Test distribution is Normal.						
b. Calculated from data.						
c. The distribution has no variance for this variable. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed.						

Lampiran 3**1. Uji ANOVA Kelompok Chitosan**

ANOVA						
		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
PMN	Between Groups	405430.844	4	101357.711	331.328	.000
	Within Groups	6118.267	20	305.913		
	Total	411549.111	24			
Fibroblast	Between Groups	24182.533	4	6045.633	58.383	.000
	Within Groups	2071.022	20	103.551		
	Total	26253.556	24			
Epitel	Between Groups	10874.282	4	2718.571	45.778	.000
	Within Groups	1187.708	20	59.385		
	Total	12061.990	24			

2. Uji ANOVA Kelompok Tulle

ANOVA						
		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
PMN	Between Groups	15257.618	4	3814.404	1.130	.371
	Within Groups	67500.933	20	3375.047		
	Total	82758.551	24			
Fibroblas	Between Groups	1990.960	4	497.740	1.444	.256
	Within Groups	6892.000	20	344.600		
	Total	8882.960	24			
Epitel	Between Groups	4236.318	4	1059.080	35.933	.000
	Within Groups	589.481	20	29.474		
	Total	4825.799	24			

Lampiran 4**1. Uji LSD Kelompok Chitosan**

Multiple Comparisons							
LSD							
Dependent Variable	(I) Pengamatan	(J) Pengamatan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PMN	Hari Ke-3	Hari Ke-6	314.73333 [*]	11.06189	.000	291.6586	337.8080
		Hari Ke-9	319.53333 [*]	11.06189	.000	296.4586	342.6080
		Hari Ke-12	319.53333 [*]	11.06189	.000	296.4586	342.6080
		Hari Ke-15	319.53333 [*]	11.06189	.000	296.4586	342.6080
	Hari Ke-6	Hari Ke-3	-314.73333 [*]	11.06189	.000	-337.8080	-291.6586
		Hari Ke-9	4.80000	11.06189	.669	-18.2747	27.8747
		Hari Ke-12	4.80000	11.06189	.669	-18.2747	27.8747
		Hari Ke-15	4.80000	11.06189	.669	-18.2747	27.8747
	Hari Ke-9	Hari Ke-3	-319.53333 [*]	11.06189	.000	-342.6080	-296.4586
		Hari Ke-6	-4.80000	11.06189	.669	-27.8747	18.2747
		Hari Ke-12	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747
		Hari Ke-15	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747
	Hari Ke-12	Hari Ke-3	-319.53333 [*]	11.06189	.000	-342.6080	-296.4586
		Hari Ke-6	-4.80000	11.06189	.669	-27.8747	18.2747
		Hari Ke-9	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747
		Hari Ke-15	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747
Hari Ke-15	Hari Ke-3	-319.53333 [*]	11.06189	.000	-342.6080	-296.4586	
	Hari Ke-6	-4.80000	11.06189	.669	-27.8747	18.2747	
	Hari Ke-9	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747	
	Hari Ke-12	.00000	11.06189	1.000	-23.0747	23.0747	
Fibroblast	Hari Ke-3	Hari Ke-6	30.40000 [*]	6.43587	.000	16.9750	43.8250
		Hari Ke-9	66.33333 [*]	6.43587	.000	52.9083	79.7583
		Hari Ke-12	70.13333 [*]	6.43587	.000	56.7083	83.5583
		Hari Ke-15	85.80000 [*]	6.43587	.000	72.3750	99.2250
	Hari Ke-6	Hari Ke-3	-30.40000 [*]	6.43587	.000	-43.8250	-16.9750

		Hari Ke-9	35.93333 [*]	6.43587	.000	22.5083	49.3583
		Hari Ke-12	39.73333 [*]	6.43587	.000	26.3083	53.1583
		Hari Ke-15	55.40000 [*]	6.43587	.000	41.9750	68.8250
Hari Ke-9	Hari Ke-3	-66.33333 [*]	6.43587	.000	-79.7583	-52.9083	
	Hari Ke-6	-35.93333 [*]	6.43587	.000	-49.3583	-22.5083	
	Hari Ke-12	3.80000	6.43587	.562	-9.6250	17.2250	
	Hari Ke-15	19.46667 [*]	6.43587	.007	6.0417	32.8917	
Hari Ke-12	Hari Ke-3	-70.13333 [*]	6.43587	.000	-83.5583	-56.7083	
	Hari Ke-6	-39.73333 [*]	6.43587	.000	-53.1583	-26.3083	
	Hari Ke-9	-3.80000	6.43587	.562	-17.2250	9.6250	
	Hari Ke-15	15.66667 [*]	6.43587	.024	2.2417	29.0917	
Hari Ke-15	Hari Ke-3	-85.80000 [*]	6.43587	.000	-99.2250	-72.3750	
	Hari Ke-6	-55.40000 [*]	6.43587	.000	-68.8250	-41.9750	
	Hari Ke-9	-19.46667 [*]	6.43587	.007	-32.8917	-6.0417	
	Hari Ke-12	-15.66667 [*]	6.43587	.024	-29.0917	-2.2417	
Epitel	Hari Ke-3	Hari Ke-6	-11.17467 [*]	4.87382	.033	-21.3413	-1.0080
		Hari Ke-9	-41.60467 [*]	4.87382	.000	-51.7713	-31.4380
		Hari Ke-12	-49.97267 [*]	4.87382	.000	-60.1393	-39.8060
		Hari Ke-15	-49.70000 [*]	4.87382	.000	-59.8666	-39.5334
	Hari Ke-6	Hari Ke-3	11.17467 [*]	4.87382	.033	1.0080	21.3413
		Hari Ke-9	-30.43000 [*]	4.87382	.000	-40.5966	-20.2634
		Hari Ke-12	-38.79800 [*]	4.87382	.000	-48.9646	-28.6314
		Hari Ke-15	-38.52533 [*]	4.87382	.000	-48.6920	-28.3587
	Hari Ke-9	Hari Ke-3	41.60467 [*]	4.87382	.000	31.4380	51.7713
		Hari Ke-6	30.43000 [*]	4.87382	.000	20.2634	40.5966
		Hari Ke-12	-8.36800	4.87382	.101	-18.5346	1.7986
		Hari Ke-15	-8.09533	4.87382	.112	-18.2620	2.0713
	Hari Ke-12	Hari Ke-3	49.97267 [*]	4.87382	.000	39.8060	60.1393
		Hari Ke-6	38.79800 [*]	4.87382	.000	28.6314	48.9646
		Hari Ke-9	8.36800	4.87382	.101	-1.7986	18.5346
		Hari Ke-15	.27267	4.87382	.956	-9.8940	10.4393
	Hari Ke-15	Hari Ke-3	49.70000 [*]	4.87382	.000	39.5334	59.8666
		Hari Ke-6	38.52533 [*]	4.87382	.000	28.3587	48.6920

Hari Ke-9	8.09533	4.87382	.112	-2.0713	18.2620
Hari Ke-12	-.27267	4.87382	.956	-10.4393	9.8940

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

2. Uji LSD Tebal Epitel Kelompok Tulle

Multiple Comparisons							
LSD							
Dependent Variable	(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Pengama tan	Pengama tan	Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
Epitel	Hari Ke-3	Hari Ke-6	-5.27733	3.43360	.140	-12.4397	1.8850
		Hari Ke-9	-22.84167*	3.43360	.000	-30.0040	-15.6793
		Hari Ke-12	-32.60533*	3.43360	.000	-39.7677	-25.4430
		Hari Ke-15	-29.16433*	3.43360	.000	-36.3267	-22.0020
	Hari Ke-6	Hari Ke-3	5.27733	3.43360	.140	-1.8850	12.4397
		Hari Ke-9	-17.56433*	3.43360	.000	-24.7267	-10.4020
		Hari Ke-12	-27.32800*	3.43360	.000	-34.4904	-20.1656
		Hari Ke-15	-23.88700*	3.43360	.000	-31.0494	-16.7246
	Hari Ke-9	Hari Ke-3	22.84167*	3.43360	.000	15.6793	30.0040
		Hari Ke-6	17.56433*	3.43360	.000	10.4020	24.7267
		Hari Ke-12	-9.76367*	3.43360	.010	-16.9260	-2.6013
		Hari Ke-15	-6.32267	3.43360	.080	-13.4850	.8397
	Hari Ke-12	Hari Ke-3	32.60533*	3.43360	.000	25.4430	39.7677
		Hari Ke-6	27.32800*	3.43360	.000	20.1656	34.4904
		Hari Ke-9	9.76367*	3.43360	.010	2.6013	16.9260
		Hari Ke-15	3.44100	3.43360	.328	-3.7214	10.6034

Hari Ke- 15	Hari Ke-3	29.16433*	3.43360	.000	22.0020	36.3267
	Hari Ke-6	23.88700*	3.43360	.000	16.7246	31.0494
	Hari Ke-9	6.32267	3.43360	.080	-.8397	13.4850
	Hari Ke- 12	-3.44100	3.43360	.328	-10.6034	3.7214
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.						

Lampiran 5**1. Uji *T-test* Sel PMN**

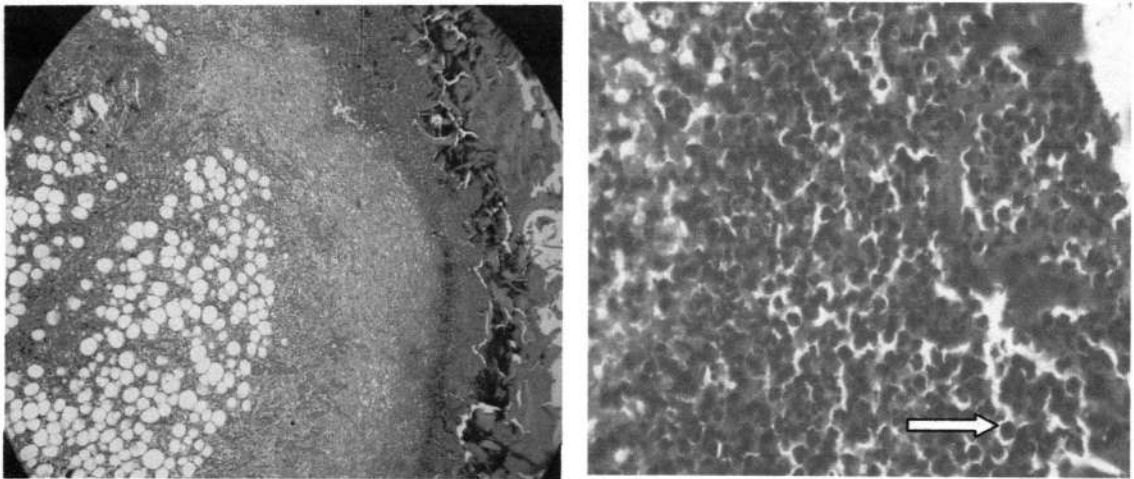
		F	Sig.	T	Sig. (2-tailed)	Kesimpulan
PMN hari ke-3	Equal variances assumed	.524	.490	-12.622	.000	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-12.622	.000	
PMN hari ke-6	Equal variances assumed	12.516	.008	1.490	.174	Tidak ada perbedaan
	Equal variances not assumed			1.490	.210	
PMN hari ke-9	Equal variances assumed	7.053	.029	1.113	.298	Tidak ada perbedaan
	Equal variances not assumed			1.113	.328	
PMN hari ke-12	Equal variances assumed	7.110	.029	1.012	.341	Tidak ada perbedaan
	Equal variances not assumed			1.012	.369	

2. Uji *T-test* Sel Fibroblas

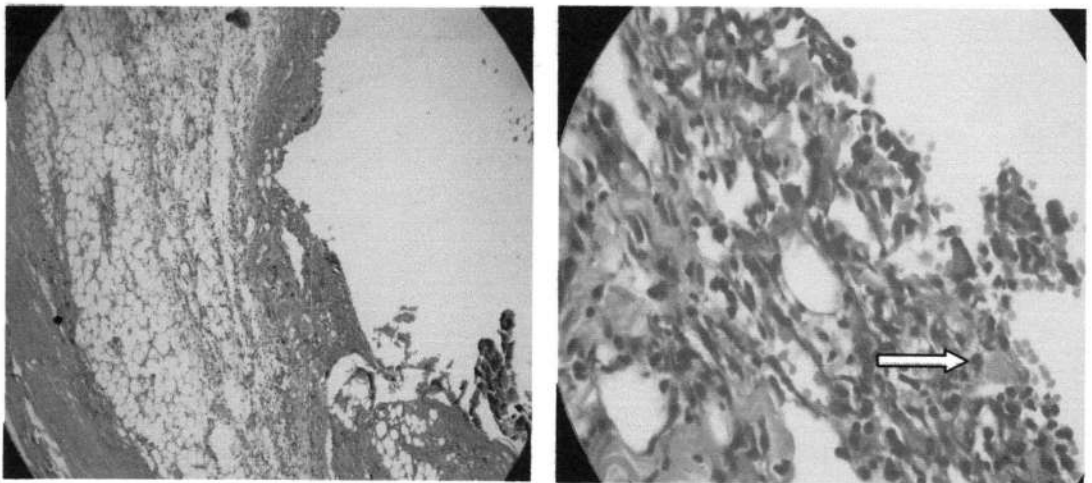
		F	Sig.	T	Sig. (2-tailed)	Kesimpulan
Fibroblas hari ke-3	Equal variances assumed	.723	.420	-3.896	.005	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-3.896	.007	
Fibroblas hari ke-6	Equal variances assumed	9.424	.015	-2.831	.022	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-2.831	.031	
Fibroblas hari ke-9	Equal variances assumed	.045	.837	-1.187	.269	Tidak Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-1.187	.271	
Fibroblas hari ke-12	Equal variances assumed	3.863	.085	-2.406	.043	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-2.406	.060	
Fibroblas hari ke-15	Equal variances assumed	9.740	.014	2.235	.056	Tidak ada perbedaan
	Equal variances not assumed	.723		2.235	.083	

3. Uji *T-test* Tebal Epitel

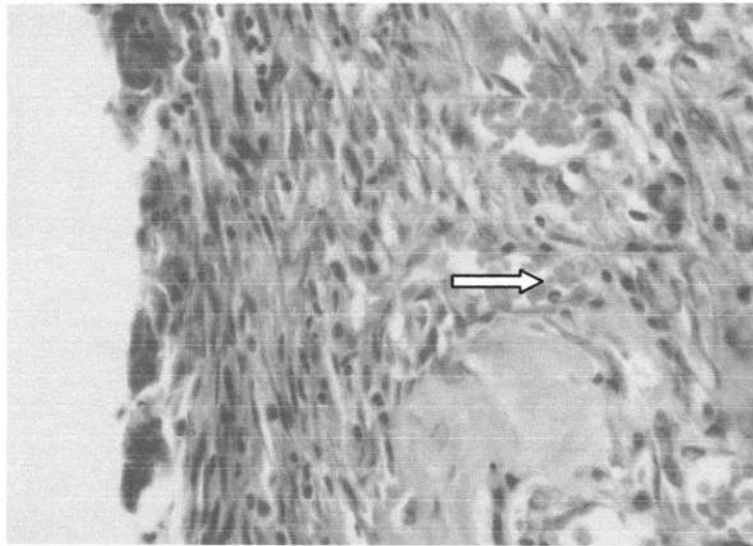
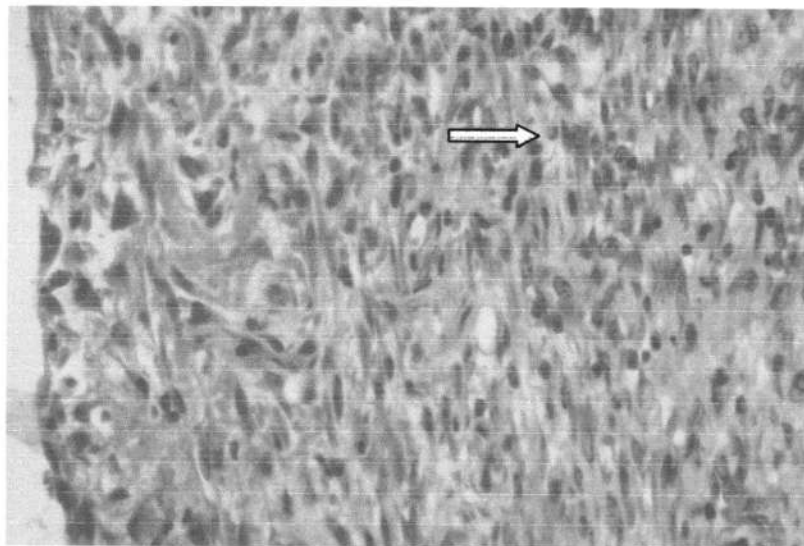
		F	Sig.	T	Sig. (2-tailed)	Kesimpulan
Tebal epitel hari ke-6	Equal variances assumed	3.249	.109	-2.236	.056	Tidak ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-2.236	.069	
Tebal epitel hari ke-9	Equal variances assumed	1.830	.213	-4.479	.002	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-4.479	.002	
Tebal epitel hari ke-12	Equal variances assumed	10.876	.011	-5.532	.001	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-5.532	.004	
Tebal epitel hari ke-15	Equal variances assumed	.862	.380	-2.782	.024	Ada perbedaan
	Equal variances not assumed			-2.782	.037	

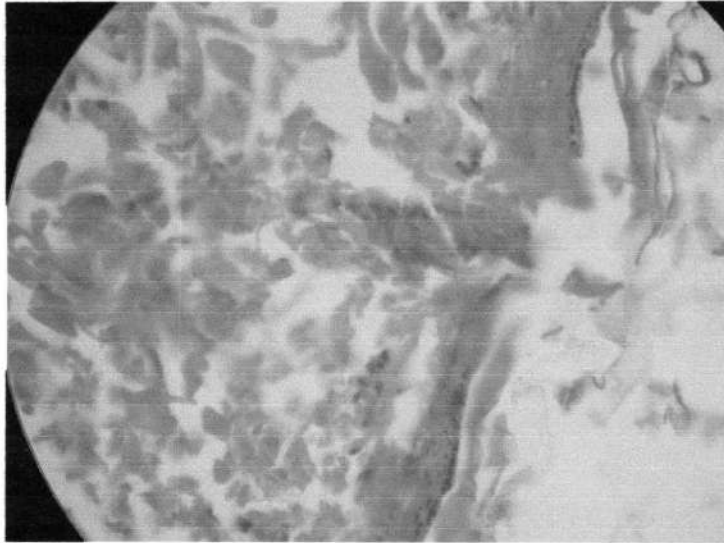
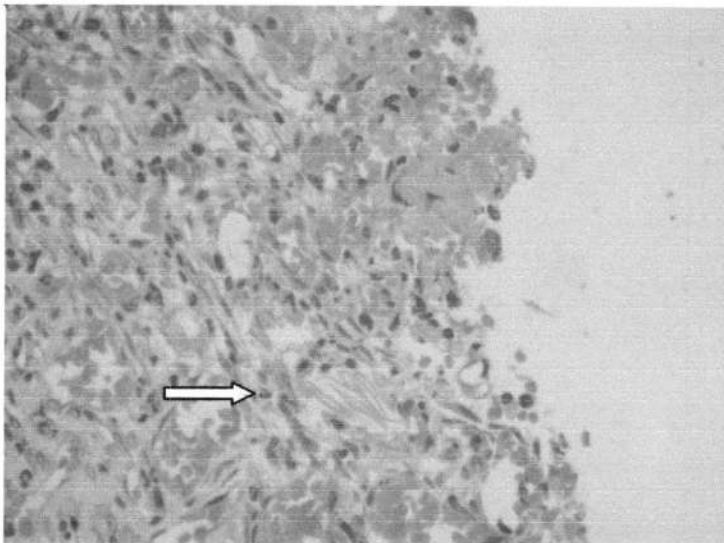
Lampiran 6**Gambaran Mikroskopis Sel PMN****1. Hari ke-3 (Pembesaran 40 dan 400x)****a. *Chitosan***

Tanda panah menunjukkan sel PMN

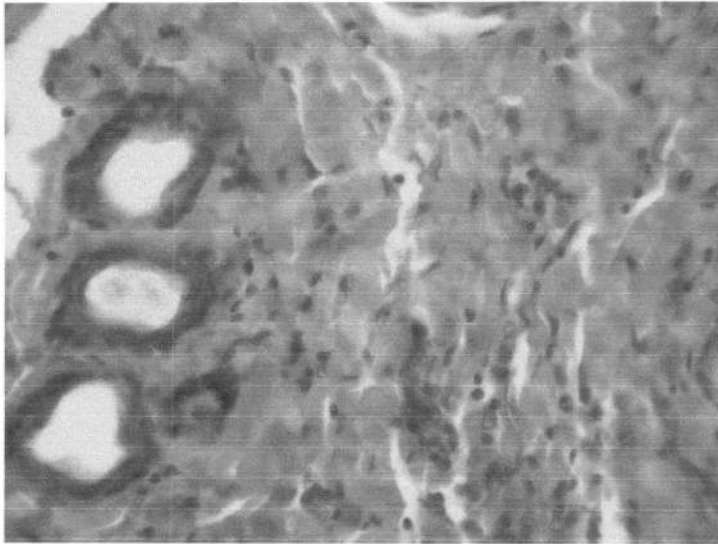
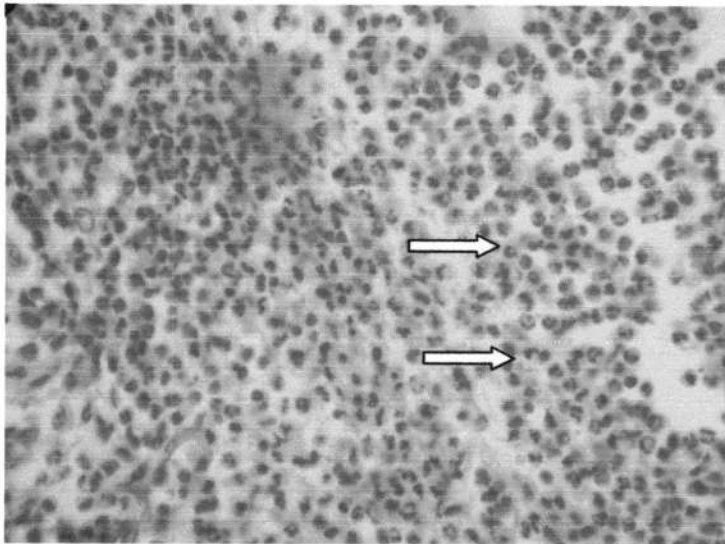
b. *Tulle*

Tanda panah menunjukkan sel PMN

2. Hari ke-6 (Pembesaran 400x)**a. Chitosan****Tanda panah menunjukkan sel PMN****b. Tulle****Tanda panah menunjukkan sel PMN**

3. Hari ke-9 (Pembesaran 400x)**a. Chitosan****b. Tulle**

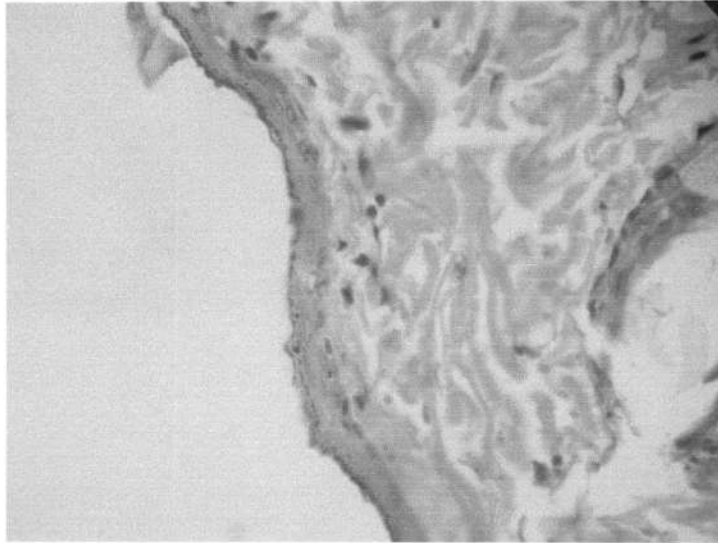
Tanda panah menunjukkan sel PMN

4. Hari ke-12 (Pembesaran 400x)**a. *Chitosan*****b. *Tulle***

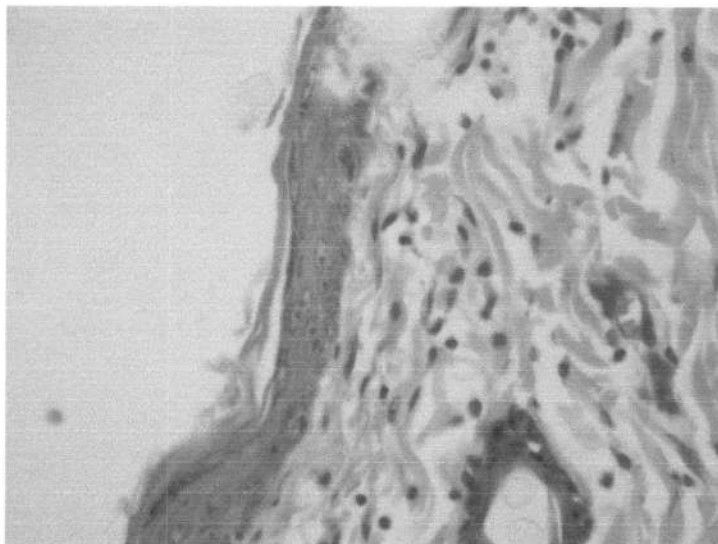
Tanda panah menunjukkan sel PMN

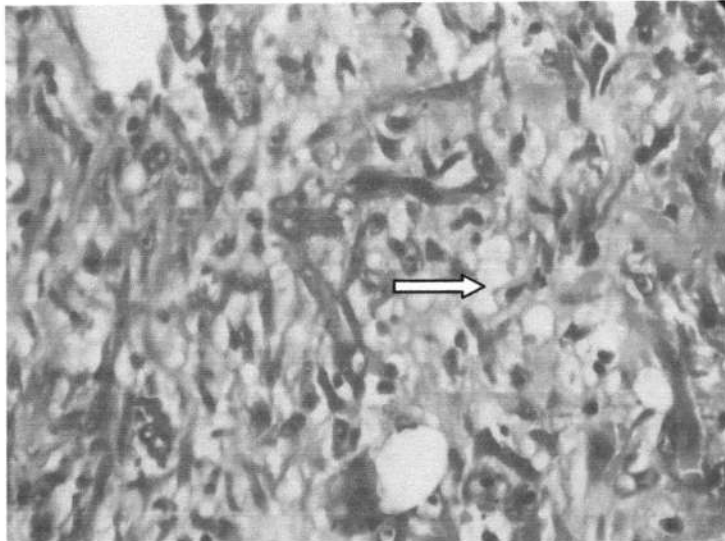
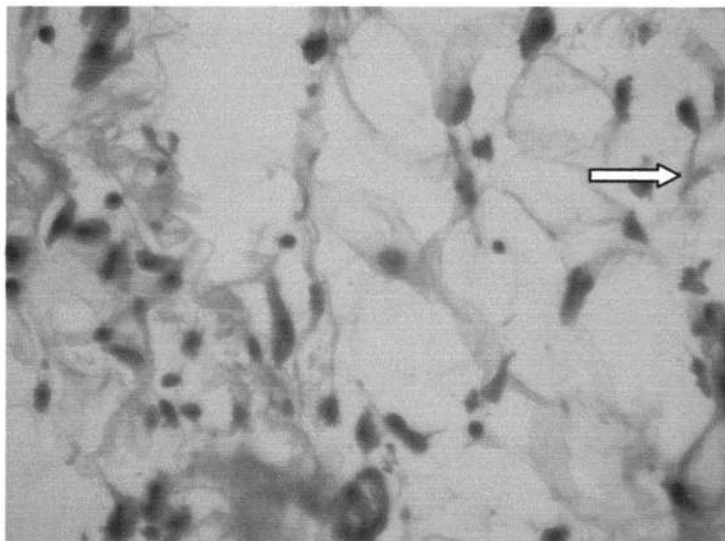
5. Hari ke-15 (Pembesaran 400x)

a. *Chitosan*

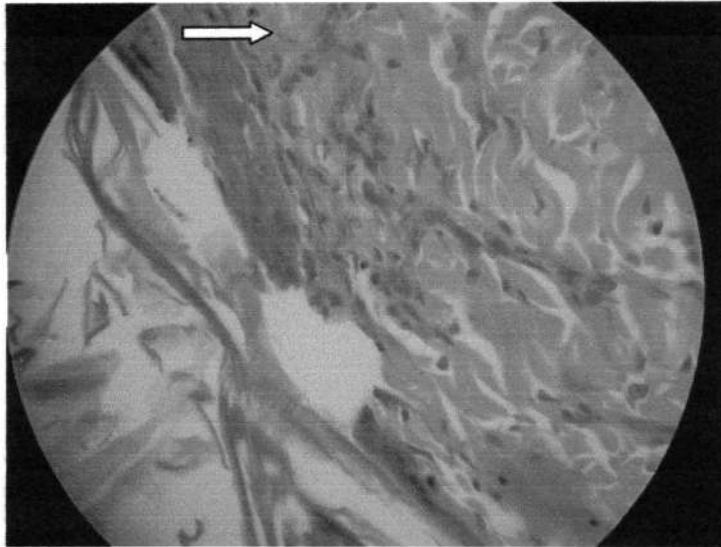
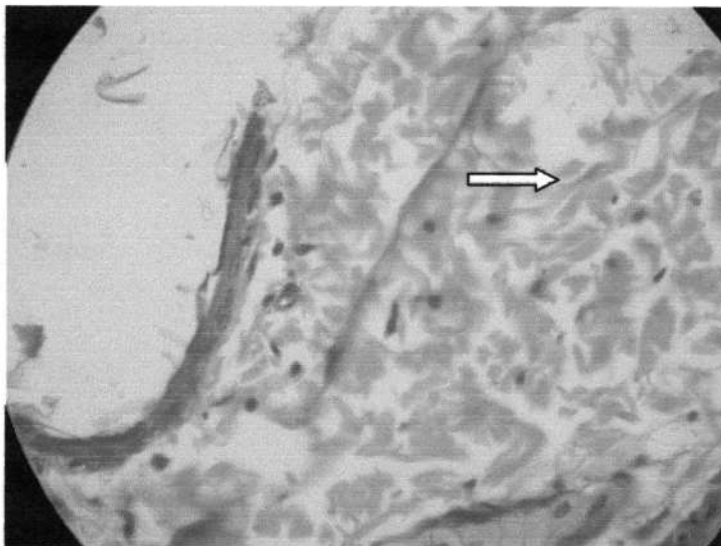


b. *Tulle*

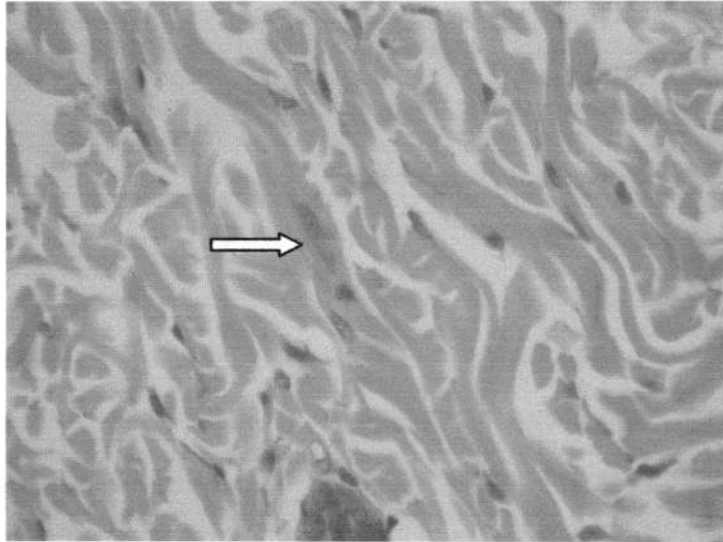
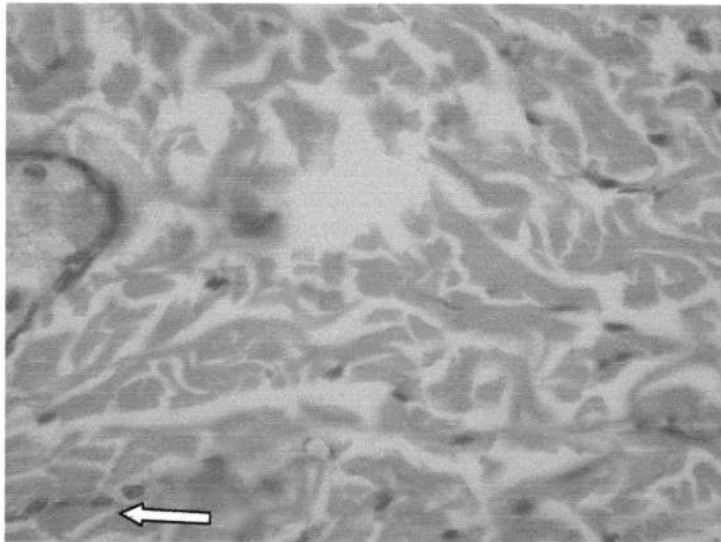


Lampiran 7**Gambaran Mikroskopis Sel Fibroblas****1. Hari ke-3 (Pembesaran 400x)****a. Chitosan****b. Tulle**

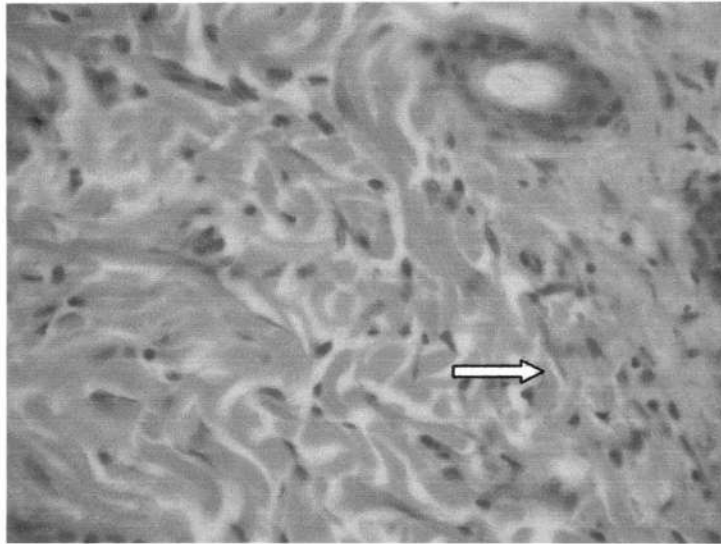
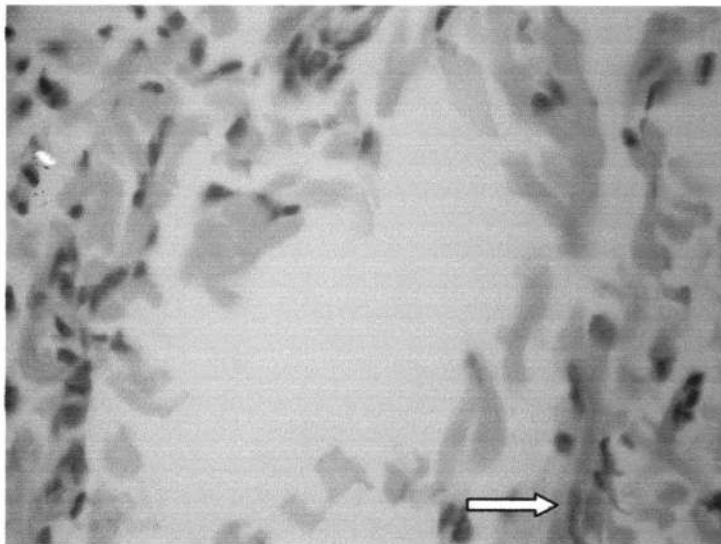
Tanda panah menunjukkan sel fibroblas

2. Hari ke-6 (Pembesaran 400x)**a. Chitosan****b. Tulle**

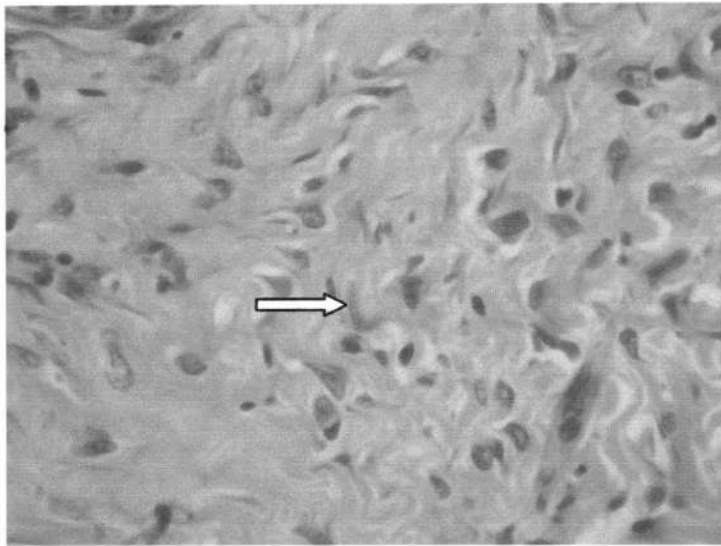
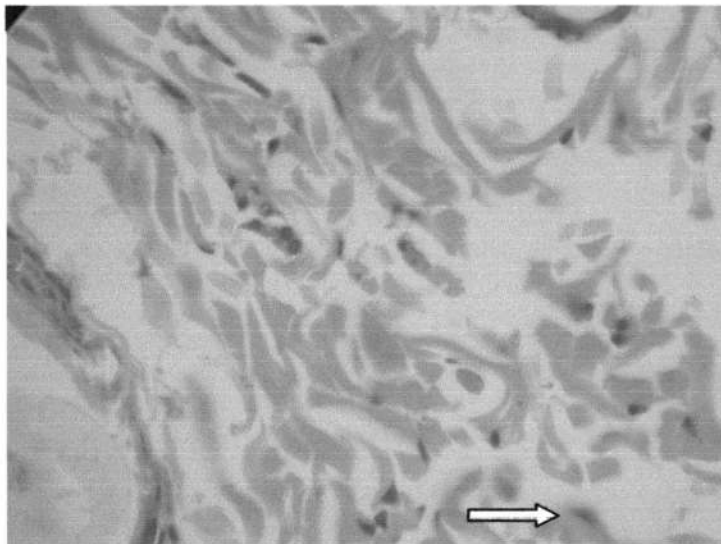
Tanda panah menunjukkan sel fibroblas

3. Hari ke-9 (Pembesaran 400x)**a. *Chitosan*****b. *Tulle***

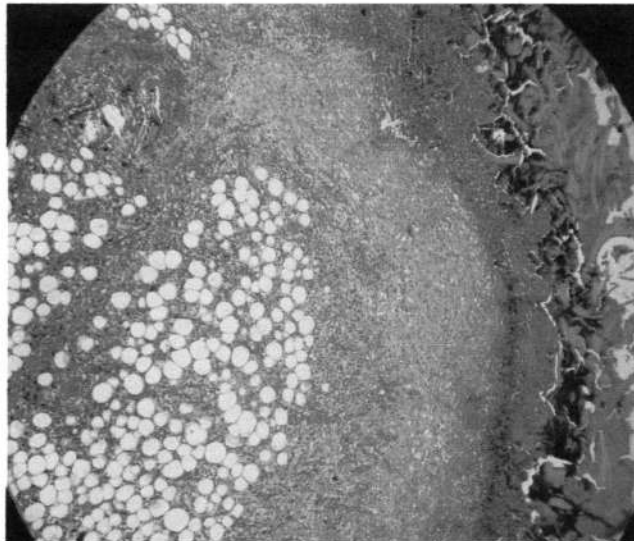
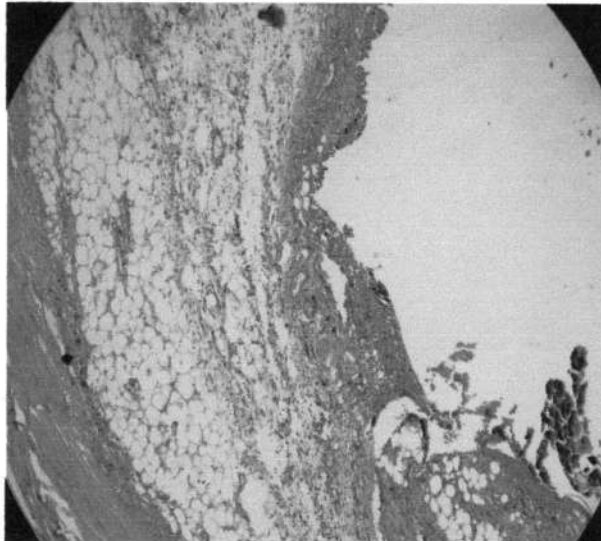
Tanda panah menunjukkan sel fibroblas

4. Hari ke-12 (Pembesaran 400x)**a. *Chitosan*****b. *Tulle***

Tanda panah menunjukkan sel fibroblas

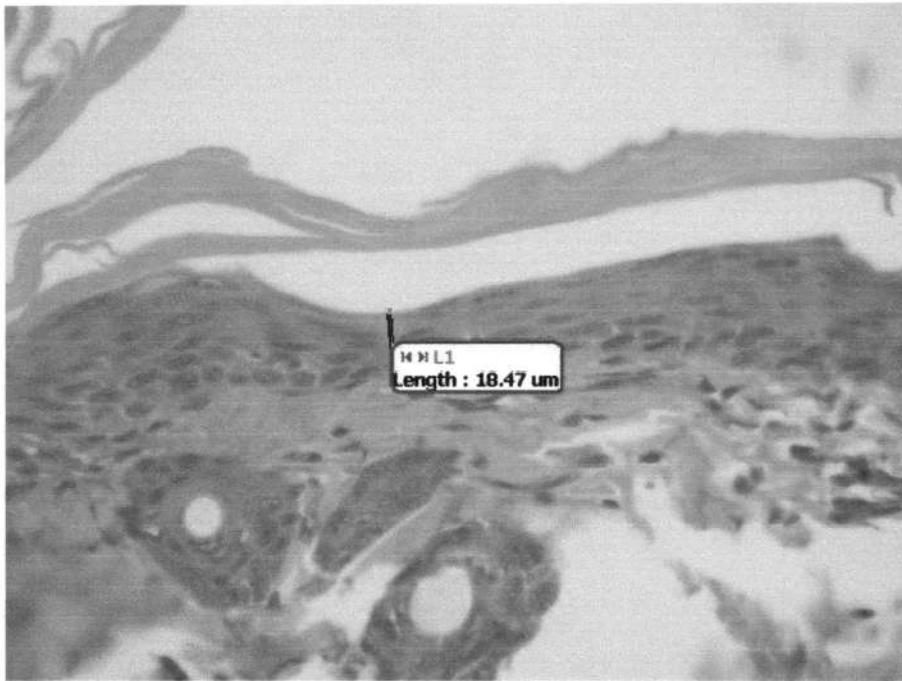
5. Hari ke-15 (Pembesaran 400x)**a. *Chitosan*****b. *Tulle***

Tanda panah menunjukkan sel fibroblas

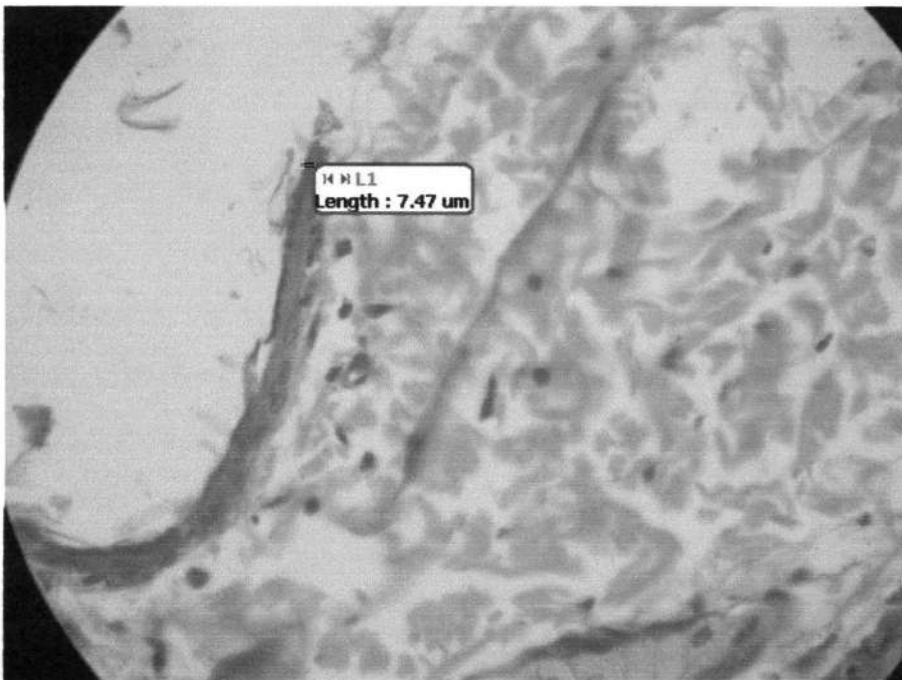
Lampiran 8**Gambaran Mikroskopis Tebal Epitel****1. Hari ke-3 (Pembesaran 40x)****a. *Chitosan*****b. *Tulle*****Belum tampak epitelisasi**

2. Hari ke-6 (Pembesaran 400x)

a. *Chitosan*

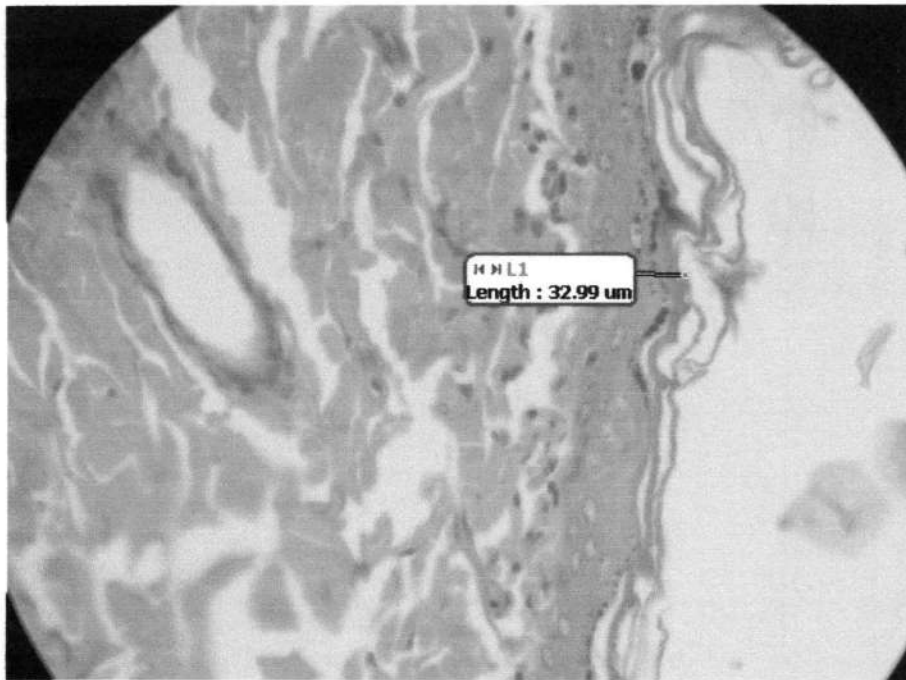


b. *Tulle*

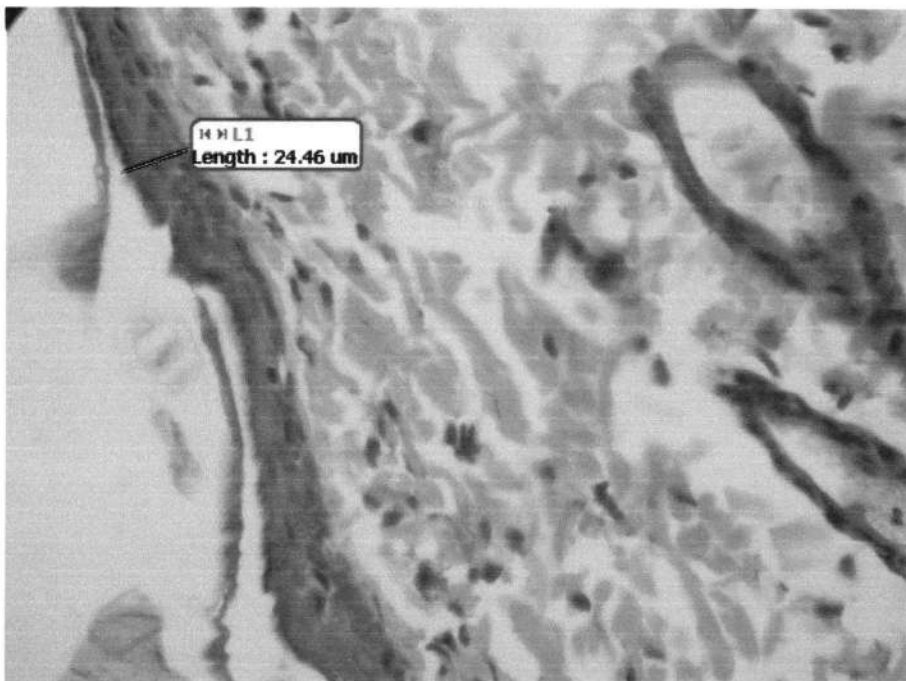


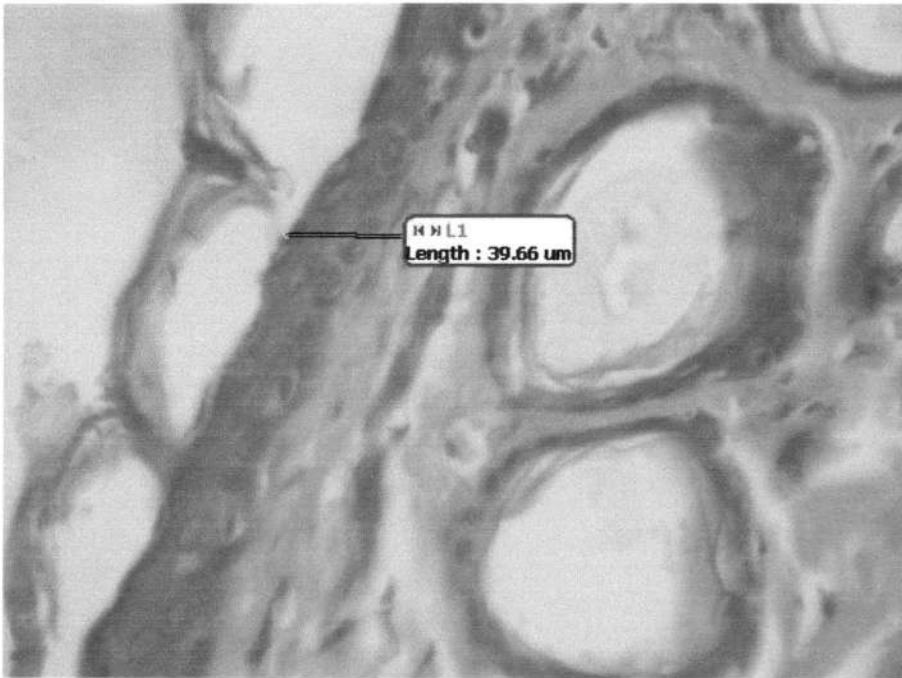
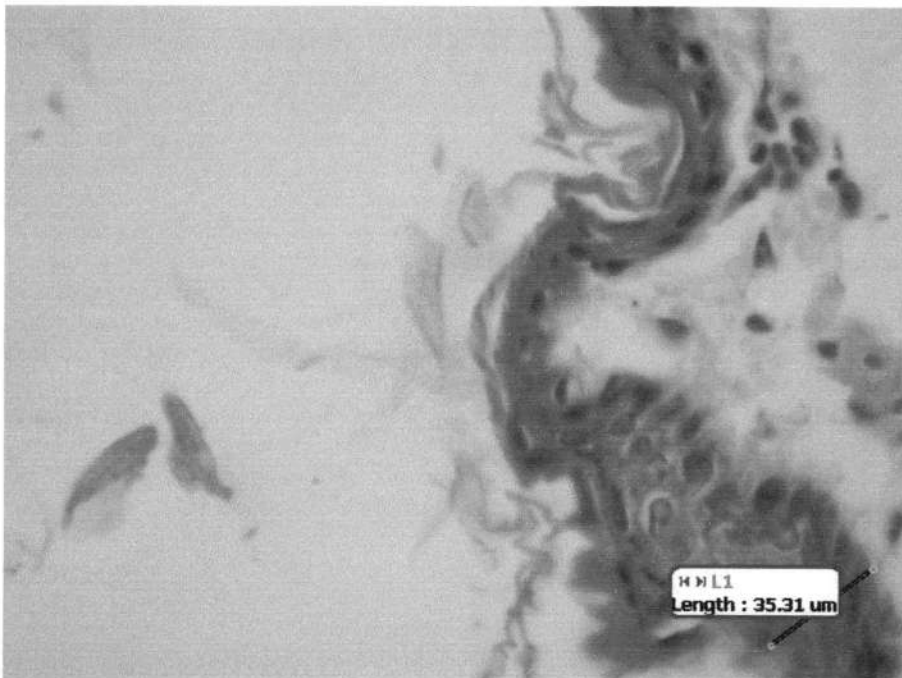
3. Hari ke-9 (Pembesaran 400x)

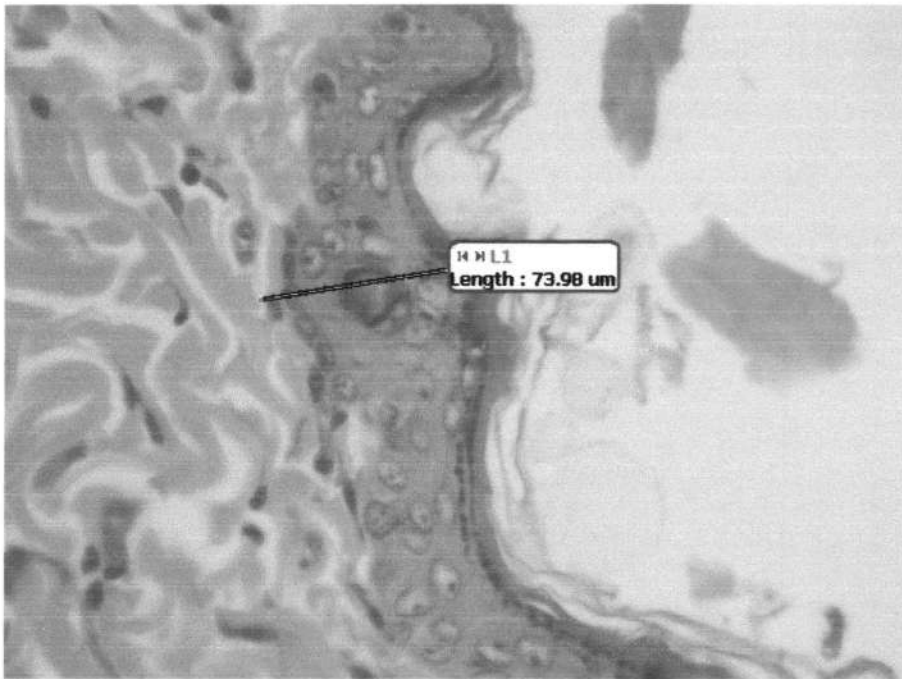
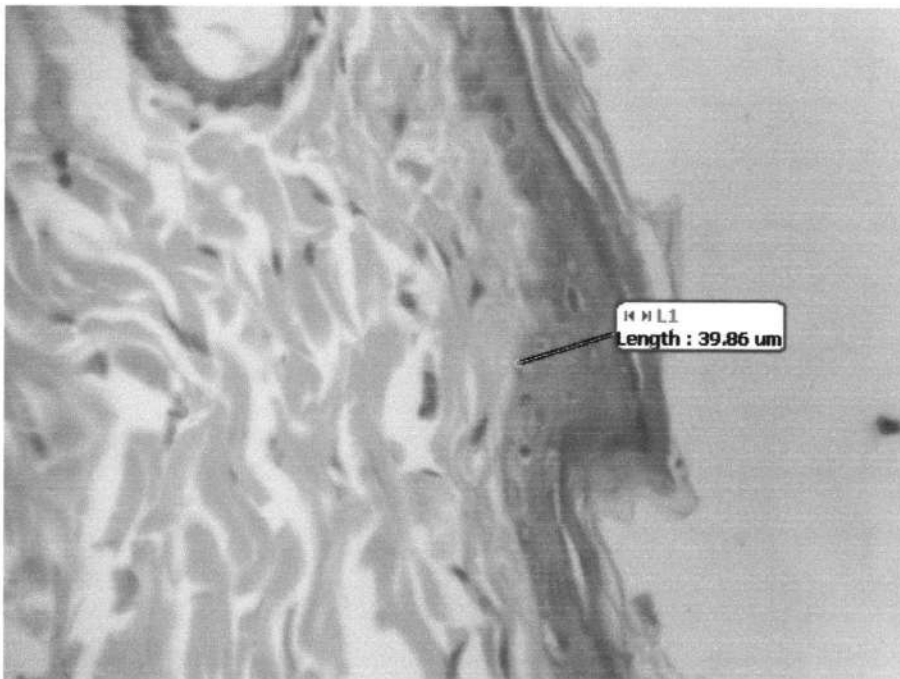
a. *Chitosan*



b. *Tulle*



4. Hari ke-12 (Pembesaran 400x)**a. Chitosan****b. Tulle**

5. Hari ke-15 (Pembesaran 400x)**a. Chitosan****b. Tulle**

Lampiran 9**Alat & Bahan Penelitian****Chitosan****Tulle****Ketamin**



Perlengkapan Bedah



Kandang @ 5 Tikus

Lampiran 10

Perlakuan



Injeksi Ketamin



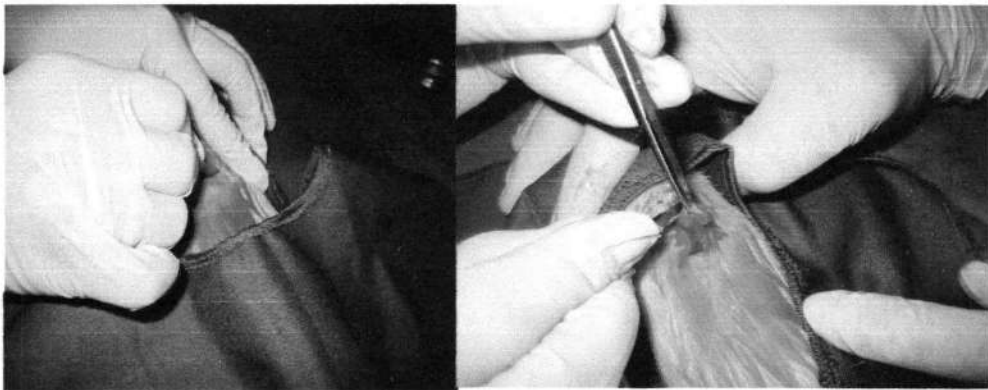
Asepsis & Antiseptis



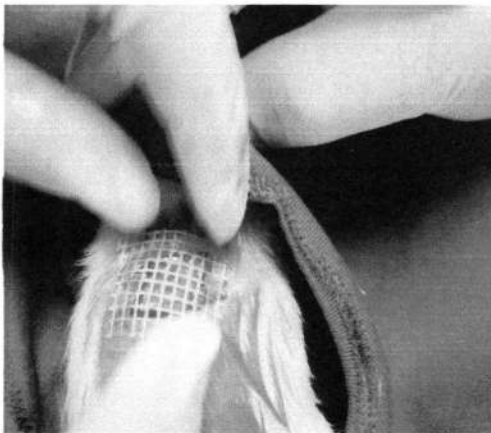
Pencukuran



Siap di bedah



Proses Pembuatan Luka *Full Thickness*



Luka ditutup *Tulle*

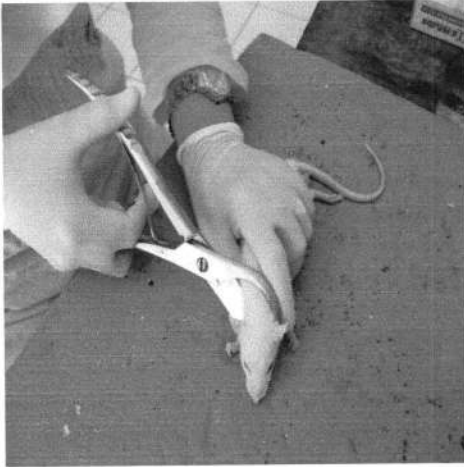


Luka ditutup *Chitosan*

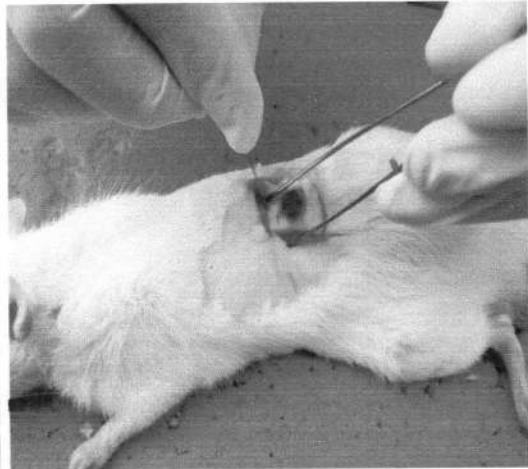


Luka ditutup *Kasa Steril*

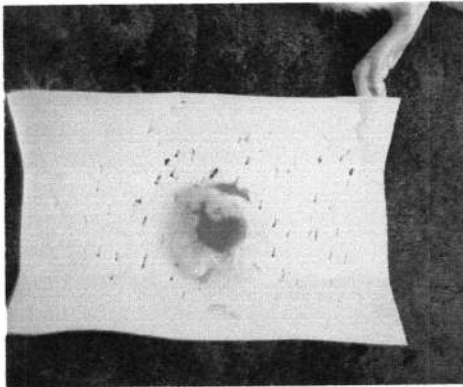




Dekapitasi



Eksisi Jaringan



Fiksasi Jaringan