

KB 1/10-2
11.02/20
11/10

TESIS

IDENTIFIKASI ALGINAT DARI *Sargassum ilicifolium* DAN *Sargassum duplicatum* SERTA UJI AKTIVITAS KOMBINASI ALGINAT DENGAN EKSTRAK BUAH OKRA TERHADAP PENYEMBUHAN LUKA TERBUKA MENCIT DIABETIK



**ZULFA NAILUL ILMI
NIM 081724253001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2020**

HALAMAN PRASYARAT GELAR

IDENTIFIKASI ALGINAT DARI *Sargassum ilicifolium* DAN *Sargassum duplicatum* SERTA UJI AKTIVITAS KOMBINASI ALGINAT DENGAN EKSTRAK BUAH OKRA TERHADAP PENYEMBUHAN LUKA TERBUKA MENCIT DIABETIK

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Magister Kimia
pada Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Oleh:

ZULFA NAILUL ILMI
NIM 081724253001

PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Tanggal 6 Januari 2020

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

IDENTIFIKASI ALGINAT DARI *Sargassum ilicifolium* DAN *Sargassum duplicatum* SERTA UJI AKTIVITAS KOMBINASI ALGINAT DENGAN EKSTRAK BUAH OKRA TERHADAP PENYEMBUHAN LUKA TERBUKA MENCIT DIABETIK

Oleh :
ZULFA NAILUL ILMI
NIM 081724253001

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji dan diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Kimia
Pada tanggal 6 Januari 2020

Pembimbing I

Prof. Dr. Pratiwi Pudjiastuti, M.Si.
NIP. 196102051986012001

Pembimbing II

Dr. Dwi Winarni, M.Si.
NIP. 196511071989032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 198307022009121005

UCAPAN TERIMAKASIH

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT, atas limpahan rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Identifikasi Alginat Dari *Sargassum ilicifolium* dan *Sargassum duplicatum* Serta Uji Aktivitas Kombinasi Alginat dengan Ekstrak Buah Okra Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka Mencit Diabetik”**. Tesis ini disusun dalam rangka persyaratan meraih gelar magister sains, program studi magister kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan bimbingan serta motivasi kepada penulis, khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Pratiwi Pudjiatuti, M.Si selaku dosen pembimbing I, serta ketua payung penelitian Mandat yang telah meluangkan waktu dan memberikan tenaga untuk membimbing, memberikan saran, dan nasihat dalam penyusunan tesis ini.
2. Dr. Dwi Winarni, M.Si. selaku dosen pembimbing II, yang telah meluangkan waktu dan memberikan tenaga untuk membimbing, memberikan saran, dan nasihat dalam penyusunan tesis ini.
3. Rico Ramadhan S.Si., M.P., Ph.D., Satya Candra Wibawa Sakti, M.Sc., Ph.D., dan Mochamad Zakki Fahmi, S.Si, M.Si., Ph.D selaku dosen penguji tesis yang telah membimbing dengan memberikan kritik dan saran untuk penyempurnaan tesis ini.
4. Mochamad Zakki Fahmi, S.Si, M.Si., Ph.D. selaku dosen wali yang telah memberikan motivasi, dukungan, dan bimbingan selama masa perkuliahan dan penyusunan tesis ini.
5. Bapak dan Ibu dosen-dosen kimia Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memberikan ilmu dan nasihat pada masa perkuliahan.
6. Kedua orang tua Bapak H. Mufadhol, S.Pd dan Ibu Hj. Dra. Inayah, Suami Moch. Irfa Igfiri, serta keluarga yang telah memberikan dukungan baik secara moral maupun materi sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
7. Rekan-rekan penelitian mandat 2019 yang telah membantu dan bekerja sama selama berlangsungnya payung penelitian Mandat.
8. Rekan-rekan magister Kimia angkatan 2017 yang telah memberikan motivasi dan dukungan doa untuk kelancaran penulisan tesis ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis membutuhkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi kesempurnaan tesis ini.

Surabaya, 6 Januari 2020
Penulis

Zulfa Nailul Ilmi

Ilmi, Z. N., 2019. Identifikasi Alginat dari *Sargassum ilicifolium* dan *Sargassum duplicatum* Serta Uji Aktivitas Kombinasi Alginat Dengan Ekstrak Buah Okra Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka Mencit Diabetik. Tesis ini di bawah bimbingan Dr. Pratiwi Pudjiatuti, M.Si dan Dr. Dwi Winarni, M.Si. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit dengan kadar glukosa darah yang lebih tinggi dari keadaan normal. DM dapat menyebabkan komplikasi luka terbuka ulkus atau gangrene, serta rentan terhadap masalah kulit termasuk infeksi bakteri dan jamur. Alginat dari *Sargassum ilicifolium* dan *Sargassum duplicatum* memiliki aktivitas antibakteri dan berperan sebagai absorber yang kuat untuk menyerap eksudat dan mempercepat regenerasi sel. Okra mengandung senyawa flavonoid yang berperan sebagai agen antioksidan, antidiabetik, antiinflamasi sehingga dapat mempercepat proliferasi dan migrasi sel. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi alginat dan mengevaluasi efek kombinasi ekstrak alginat-buah okra pada luka diabetes. Hasil analisis SEC-MALLS menunjukkan bahwa alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* memiliki berat molekul dan *Polydispersity index* (Ip) masing-masing sebesar $3,45 \times 10^4$ g/mol; 1,73 dan $2,65 \times 10^4$ g/mol; 1,70. Kedua alginat diidentifikasi sebagai polisakarida tunggal dan homogen. Analisis spektra $^1\text{H NMR}$ diperoleh struktur alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* dengan rasio M/G masing-masing sebesar 0,77 dan 0,91 yang mengandung homopolimer. Ekstrak buah okra memiliki total kandungan flavonoid sebesar 43,96 mg(QE)/g ekstrak. Ekstrak okra dan kombinasi alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*-okra memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (IC_{50} =65,87; 75,94; 79,34 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* termasuk antioksidan sedang (IC_{50} =120,88; 125,31 $\mu\text{g/mL}$). Penelitian ini telah dilakukan secara in vivo menggunakan mencit jantan (strain BALB/c, 3-4 months, 20-35 g) yang dibagi menjadi 18 kelompok. Kelompok dibagi menjadi 3 kelompok kontrol normal (KN) dan 15 kelompok diabetik. 15 kelompok diabetik dibagi menjadi masing-masing 3 kelompok kontrol diabetik (KD), kontrol alginat *S. ilicifolium* (KAI), kontrol alginat *S. duplicatum* (KAD), perlakuan alginat *S. ilicifolium*-okra (P1), dan perlakuan alginat *S. duplicatum*-okra (P2). Perlakuan dilakukan dalam tiga waktu yang berbeda: 3, 7, 14 hari dan dosis perlakuan 50 mg/kg BB untuk kombinasi alginat-okra dan 100 mg/kg BB untuk alginat. Pemberian ekstrak buah okra yang dikombinasikan dengan alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes secara signifikan dari hari ke 1-14 ($p < 0,05$). Pemberian alginat *S. ilicifolium*, *S. duplicatum* dan/atau ekstrak buah okra dapat menurunkan jumlah neutrofil, makrofag, dan lebar luka hingga hari ke 14 secara signifikan ($p < 0,05$). Tetapi meningkatkan jumlah fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen hingga hari ke 14 secara signifikan ($p < 0,05$). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak alginat dan buah okra berperan sebagai antioksidan untuk mempercepat penyembuhan luka terbuka mencit diabetes yang diinduksi STZ.

Kata Kunci : Okra, Alginat, *Sargassum*, Mencit Diabetik, Penyembuhan Luka

Ilmi, Z. N., 2019. Identification of Alginat *Sargassum ilicifolium* and *Sargassum duplicatum* and The Activity of Combination of Alginat-Okra Fruit Extract as Open Wound Healing on Diabetic Mice. The final research is under guidance of Dr. Pratiwi Pudjiatuti, M.Si and Dr. Dwi Winarni, M.Si. Department of Chemistry, Science and Technology Faculty, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a disease with a blood glucose level that is higher than normal. DM cause the complications of open wound ulcers or gangrene, as well as susceptible to skin problems including bacterial and fungal infections. Alginat of *Sargassum ilicifolium* and *Sargassum duplicatum* have antibacterial activity and highly absorbent to infiltrate exudate and speed up the regeneration of cells. Okra contains of flavonoid that act as antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory agents. It can accelerate the proliferation and migration of cells. The purpose of this research is to identify alginate and evaluate the effects of a combination of alginate-okra fruit extracts on diabetic wounds. The results of the SEC-MALLS analysis showed that alginate *S. ilicifolium* and *S. duplicatum* have molecular weight and Polydispersity index (IP) as 3.45×10^4 g/mol; 1.73 and 2.65×10^4 g/mol; 1.70, respectively. Both alginates were identified as single and homogeneous polysaccharides. The Spectra analysis of ^1H NMR acquired the structure of alginate *S. ilicifolium* and *S. duplicatum* with a ratio of M/G as 0.77 and 0.91 containing homopolymer, respectively. Okra fruit extract has a total of flavonoids content of 43.96 mg (QE)/g extract. Okra fruit extracts and combinations of alginate *S. ilicifolium* and *S. duplicatum*-Okra have strong antioxidant activity ($\text{IC}_{50} = 65,87; 75.94; 79.34 \mu\text{g/mL}$), whereas alginate *S. ilicifolium* and *S. duplicatum* include moderate antioxidants ($\text{IC}_{50} = 120,88; 125.31 \mu\text{g/mL}$). This research has been conducted in vivo using male mice (strains BALB/c, 3-4 months age, 20-35 g weight were divided into 18 groups. There were 3 normal control groups (KN) and 15 groups of diabetic. 15 groups of diabetics were divided into 3 diabetic control groups (KD), alginate *S. ilicifolium* control (KAI), alginate *S. duplicatum* control (KAD), treatment of alginate *S. ilicifolium*-okra (P1), and treatment of alginate *S. duplicatum*-okra (P2). The treatments were carried out in three different times: 3, 7, 14 days and treatment dose was 50 mg/kg of BB for combination of alginate-okra fruit and 100 mg/kg BB for alginate. Okra fruit extract combined with alginate *S. ilicifolium* and *S. duplicatum* may significantly lower blood glucose levels of diabetes from day 1 to 14 ($p < 0.05$). The administration of both alginate and okra fruit extracts can decrease the number of neutrophil cells, macrophages, and the width of the wound until the 14th days significantly ($p < 0.05$). But it increases the number of fibrocyte cells, fibroblasts, and collagen density up to the 14th days significantly ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that the administration of alginate and okra fruit extract serves as an antioxidant to accelerate the open wound healing on diabetic mice.

Keywords : Okra, Alginate, *Sargassum*, Diabetic Mice, Wound Healing

Abstract of the thesis titled "IDENTIFIKASI ALGINAT" by ZULFA NAILUL ILMI. The abstract discusses the identification of alginate, a natural polysaccharide derived from brown algae. It mentions the use of various chemical and physical methods to identify the compound, including the use of reagents like iodine and formalin. The thesis is a part of a research project conducted at the Faculty of Chemistry, Universitas Airlangga.

IDENTIFIKASI ALGINAT

The main body of the thesis contains several chapters. Chapter I is the Introduction, which discusses the importance of alginates in various industries, particularly in food and pharmaceuticals. Chapter II is the Literature Review, where the author discusses the properties and uses of alginates. Chapter III is the Materials and Methods, detailing the procedures used for the identification of alginates. Chapter IV is the Results and Discussion, where the author presents the findings of the study and discusses them in relation to the literature. Chapter V is the Conclusion, summarizing the main findings of the research. The thesis is written in Indonesian and is approximately 100 pages long.

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Zulfa Nailul Ilmi
NIM : 081724253001
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Master (S-2)



Menyatakan bahwa tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penelitian tesis saya yang berjudul:

IDENTIFIKASI ALGINAT DARI *Sargassum ilicifolium* DAN *Sargassum duplicatum* SERTA UJI AKTIVITAS KOMBINASI ALGINAT DENGAN EKSTRAK BUAH OKRA TERHADAP PENYEMBUHAN LUKA TERBUKA MENCIT DIABETIK.

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 6 Januari 2020



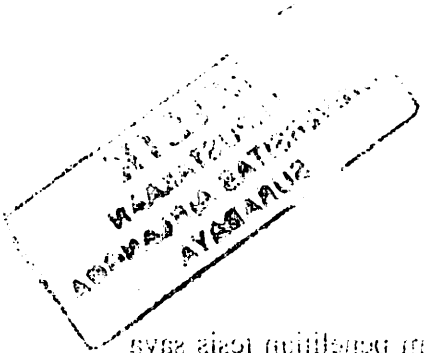
Zulfa Nailul Ilmi

NIM 081724253001

IDENTIFIKASI ALGINAT

yang terdapat dalam buku ini adalah sebagai berikut:

Nama Penulis :	Zulfa Nailul Ilmi
NPM :	10010210113011301
Program Studi :	Ilmu Kimia
Departemen :	Departemen Kimia
Universitas :	Universitas Airlangga



Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

1. Uji Kimia

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

1. Uji Kimia

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

Identifikasi alginat dapat dilakukan dengan menggunakan uji kimia sebagai berikut:

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DALAM	i
HALAMAN PRASYARAT GELAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
LEMBAR PERNYATAAN ORISINILITAS	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Sargassum</i>	6
2.1.1 <i>Sargassum ilicifolium</i> (Turner) C.Agardh	6
2.1.2 <i>Sargassum duplicatum</i> (J.Agardh).....	8
2.2 Asam Alginat.....	9
2.3 Tanaman Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	12
2.4 Kandungan Flavonoid Buah Okra dan Bioaktivitasnya	15
2.5 Diabetes Melitus.....	18
2.5.1 Definisi dan deskripsi diabetes melitus	18
2.5.2 Klasifikasi diabetes melitus	20
2.5.3 Faktor penyebab diabetes melitus.....	22
2.6 Luka Terbuka Penderita Diabetes (<i>Ulcer/Gangrene Diabetic</i>).....	23
2.6.1 Deskripsi <i>ulcer/gangrene diabetic</i>	23
2.6.2 Faktor penyebab <i>ulcer/gangrene diabetic</i>	24
2.6.3 Pengobatan luka terbuka diabetes (<i>ulcer/gangrene diabetic</i>)...	25
2.6.4 Mekanisme penyembuhan <i>ulcer/gangrene diabetic</i>	27
2.7 Anatomi dan Histologi Kulit	29

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..	33
3.1 Kerangka Konseptual	33
3.2 Hipotesis Penelitian	35
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.2 Bahan dan Peralatan Penelitian	37
4.2.1 Bahan penelitian	37
4.2.2 Peralatan penelitian	37
4.3 Cara Kerja	38
4.3.1 Ekstraksi asam alginat	38
4.3.2 Identifikasi asam alginat	39
4.3.3 Ekstraksi buah okra (<i>Abelmoschus Esculentus L.</i>)	40
4.3.4 Penentuan total kandungan flavonoid ekstrak buah okra	40
4.3.5 Uji Antioksidan alginat, ekstrak buah okra, dan kombinasinya	41
4.3.6 Persiapan dan induksi mencit diabetik	42
4.3.7 Pengukuran kadar glukosa darah	42
4.3.8 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba	43
4.3.9 Pembuatan luka pada mencit putih jantan	45
4.3.10 Pembuatan sediaan salep untuk perlakuan topikal	45
4.3.11 Pembuatan preparat histopatologi jaringan kulit	46
4.3.12 Teknik pengambilan data perbaikan jaringan kulit	47
4.3.13 Analisis data	49
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	52
5.1 Identifikasi Alginat	52
5.1.1 Rendemen alginat	52
5.1.2 Analisis FTIR	53
5.1.3 Analisis ¹ H-NMR	56
5.1.4 Analisis SEC-MALLS	58
5.2 Total Kandungan Flavonoid Ekstrak Buah Okra	59
5.3 Uji Antioksidan Alginat, Okra, dan Kombinasi Alginat-okra	60
5.4 Pengaruh Alginat dan Okra Terhadap Kadar Glukosa Darah	64
5.5 Pengaruh Alginat dan Okra Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka	67
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	81
6.1 Kesimpulan	81
6.2 Saran	81
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	95

DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Persentase dan Rasio M/G dari Alginat	10
Tabel 2.2	Nilai nutrisi okra mentah per 100 g	13
Tabel 2.3	Kadar glukosa darah normal dan penderita diabetes	20
Tabel 2.4	Fase penyembuhan ulkus kaki diabetik	29
Tabel 4.1	Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji	44
Tabel 5.1	Rendemen total natrium alginat	52
Tabel 5.2	Vibrasi gugus fungsi alginat dalam FTIR	55
Tabel 5.3	Analisis ¹ H-NMR dari alginat	58
Tabel 5.4	Berat molekul dari natrium alginat	59
Tabel 5.5	Uji antioksidan ekstrak okra, alginat, dan kombinasinya	61

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Morfologi <i>Sargassum ilicifolium</i>	7
Gambar 2.2	Morfologi <i>Sargassum duplicatum</i>	8
Gambar 2.3	Struktur kimia natrium alginat dan asam alginat	9
Gambar 2.4	Morfologi tumbuhan dan buah okra	12
Gambar 2.5	Kerangka dasar senyawa flavonoid	15
Gambar 2.6	Struktur kimia klasifikasi flavonoid	18
Gambar 2.7	Perbandingan kulit normal dan terkena ulkus	24
Gambar 2.8	Anatomi <i>cross-section</i> kulit	31
Gambar 3.1	Kerangka konsep penelitian	33
Gambar 4.1	Skema pembagian kelompok hewan uji	43
Gambar 4.2	Ilustrasi pembuatan luka terbuka pada mencit	45
Gambar 4.3	Ilustrasi penggunaan aplikasi imageJ	48
Gambar 4.4	Morfologi sel dan jaringan	49
Gambar 4.5	Diagram alir penelitian	51
Gambar 5.1	Spektrum FTIR dari alginat	53
Gambar 5.2	Struktur asam manuronat dan guluronat	57
Gambar 5.3	Mekanisme <i>scavenging</i> ROS pada flavonoid dan alginat	62
Gambar 5.4	Perbandingan rata-rata kadar glukosa darah	65
Gambar 5.5	Histologi lebar luka	69
Gambar 5.6	Histologi sel parameter luka	70
Gambar 5.7	Perbandingan rata-rata parameter luka	72

DAFTAR ISI

1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Lampiran	Halaman
Lampiran 1.	Perhitungan rendemen natrium alginat	95
Lampiran 2.	Spektrum FTIR	95
Lampiran 3.	Spektrum ¹ H-NMR dan penentuan rasio M/G	96
Lampiran 4.	SEC-MALLS dan penentuan berat molekul	99
Lampiran 5.	Hasil Total kandungan flavonoid ekstrak okra	99
Lampiran 6.	Hasil Uji antioksidan	101
Lampiran 7.	Data kadar glukosa darah	104
Lampiran 8.	Analisis statistik kadar glukosa darah	105
Lampiran 9.	Data lebar luka	107
Lampiran 10.	Analisis statistik lebar luka	107
Lampiran 11.	Data jumlah neutrofil	110
Lampiran 12.	Analisis statistik jumlah neutrofil	110
Lampiran 13.	Data jumlah makrofag	112
Lampiran 14.	Analisis statistik jumlah makrofag	112
Lampiran 15.	Data jumlah fibrosit	115
Lampiran 16.	Analisis statistik jumlah fibrosit	115
Lampiran 17.	Data jumlah fibroblas	117
Lampiran 18.	Analisis statistik jumlah fibroblas	117
Lampiran 19.	Data densitas kolagen	119
Lampiran 20.	Analisis statistik densitas kolagen	119
Lampiran 21.	Identifikasi <i>Sargassum</i>	121
Lampiran 22.	Identifikasi buah okra	122
Lampiran 23.	Hasil uji laik etik penelitian	123
Lampiran 24.	Dokumentasi penelitian	124

DAFTAR SINGKATAN

IRS-1	: <i>Insulin receptor substrate-1</i>
ROS/RNS	: <i>Reactive Oxygen/Nitrogen Species</i>
AGE	: <i>Advanced Glycation End-product</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor- β</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MMPs	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
TIMPs	: <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
<i>S. ilicifolium</i>	: <i>Sargassum ilicifolium</i>
<i>S. duplicatum</i>	: <i>Sargassum duplicatum</i>
SEC-MALLS	: <i>Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering</i>
FTIR	: <i>Fourier-transform infrared</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
DPPH	: <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
PP	: <i>Postprandial</i>

BAB I
PENDAHULUAN



BAB I

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus adalah salah satu penyakit yang paling umum di dunia dengan persen kematian dan terjadinya komplikasi yang tinggi karena disfungsi kontrol kadar glukosa darah, kerusakan pada metabolisme protein dan lipid (Majid *et al.*, 2016). Hiperglikemia memicu terjadinya kenaikan stres oksidatif dan resistensi insulin sehingga menyebabkan luka terbuka dengan proses penyembuhan jangka panjang hingga menyebabkan amputasi. Luka yang timbul juga disebabkan oleh kerusakan saraf sensori, motorik, dan otonom. Data epidemiologi menunjukkan bahwa 2,8% populasi dunia menderita diabetes pada tahun 2000 dan meningkat hingga 4,4% pada tahun 2030. Indonesia menduduki peringkat ketujuh dunia untuk prevalensi penderita diabetes sebesar 6,9% dan persentase kematian mencapai 6% (American Diabetes Association, 2015). Persentase kejadian amputasi pada penderita luka diabetes sekitar 50-70% dan dilaporkan satu kaki diamputasi setiap 30 detik akibat luka diabetes (Vijayakumar *et al.*, 2018).

Penurunan efektifitas penyembuhan luka diabetes disebabkan oleh produksi sitokin dan *growth factor* yang berlebih sehingga memperlambat tahap proses penyembuhan luka yang meliputi fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan maturasi (Grieb *et al.*, 2011). Setiap tahap pada proses penyembuhan luka dipengaruhi parameter yang berperan penting dalam penyembuhan luka seperti sel-neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, densitas kolagen, dan lebar luka. Penurunan efektifitas parameter tersebut menjadi faktor utama kegagalan proses penyembuhan luka diabetes (Veves *et al.*, 2001). Penyembuhan luka kronis pada penderita diabetes dapat dipercepat melalui penurunan kadar glukosa darah dan lipid, menurunkan kadar *Reactive Oxygen and Nitrogen Species* (ROS/RNS) sehingga terjadi penurunan stres oksidatif dan resistensi insulin (Sabitha *et al.*, 2011). Hal tersebut menyebabkan peningkatan normalitas produksi makrofag sehingga laju produksi sitokin dan *growth factor* kembali normal untuk proses penyembuhan luka diabetes.

Metode penyembuhan luka pada penderita diabetes telah banyak dilaporkan seperti pemberian insulin yang cukup, penggunaan antibiotik, *surgical debridement* pada luka kronis (Lebrun *et al.*, 2010), *off-loading area* ulkus (Pham *et al.*, 2000), penggunaan penutup luka (*wound dressing*) dengan kandungan krim silver sulphadiazine, gel polyhexamethylene biguanide (PHMB), dan yodium. Pendekatan lain yang dilakukan meliputi cangkok kulit dan penggantian jaringan, rekonstruksi vaskular, atau terapi oksigen hiperbarik (Babitha *et al.*, 2017). Tetapi, metode tersebut memiliki kelemahan yaitu biaya yang cukup tinggi dan penggunaan zat kimia berlebih sehingga dapat menyebabkan komplikasi dan efek samping jangka panjang pada penderita diabetes (Prompers *et al.*, 2008).

Indonesia memiliki sumber daya plasma nutfah berupa rumput laut sebesar 6,42% dari total biodiversitas rumput laut dunia dengan jumlah spesies sebesar 555 jenis (Santoso *et al.*, 2004). Rumput laut memiliki potensi ekonomis untuk bahan baku industri dan kesehatan karena kandungan polisakarida berupa alginat, karaginan, dan agar yang tinggi (Bixler dan Porse, 2011). Rumput laut coklat (*brown marine algae*) jenis *Sargassum*, *Turbinaria* dan *Padina* merupakan sumber utama penghasil alginat seperti spesies *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* (Winarno, 1996). Alginat merupakan komponen struktural utama dari getah rumput laut coklat sebesar 50% yang diperoleh dari hasil ekstraksi *Sargassum* (Ode, 2014). Alginat dari hasil ekstraksi rumput laut coklat berupa asam alginat yang dapat menjadi bentuk garamnya dan mengandung ion seperti ion natrium untuk membentuk natrium alginat setelah penambahan Na_2CO_3 . Identifikasi alginat dapat digunakan untuk mengetahui komposisi rasio residu asam manuronat (M) dan asam guluronat (G) dalam alginat yang mempengaruhi sifat fisik atau sifat kimianya (Ip, 2011). Alginat banyak dimanfaatkan di bidang industri yang digunakan sebagai bahan pengental, pengatur keseimbangan, pengemulsi dan pembentuk lapisan tipis yang tahan terhadap minyak. Selain itu, alginat memiliki sifat biokompatibilitas dan toksisitas yang rendah. Oleh karena itu, alginat banyak digunakan untuk industri tekstil, farmasi, pangan dan bahan kosmetik (Mushollaeni *et al.*, 2014).

Natrium alginat dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan luka karena dapat mempertahankan kondisi lembab pada daerah luka, sebagai agen antibakteri,

dan menyerap cairan luka/eksudat sebagai agen hemostatik (Dyson *et al.*, 1991). Hal tersebut dikarenakan adanya pertukaran ion pada daerah luka yaitu pelepasan ion dari serat alginat dengan cairan luka sehingga kelembaban daerah luka menjadi terjaga dan memicu terjadinya regenerasi sel (Suzuki *et al.*, 1998). Alginat dengan komposisi residu asam guluronat (G) yang lebih tinggi daripada asam manuronat (M) memiliki struktur yang rigid/kaku sehingga meningkatkan ketersediaan ion alginat untuk lebih mudah dalam penyerapan cairan luka dan donor proton sebagai antioksidan (Szekalska *et al.*, 2016). Kemampuan *radical scavenging* pada fraksi polisakarida bergantung pada berat molekul alginat antara 12-35 kDa. Penurunan berat molekul di bawah 12 kDa dapat mempengaruhi rantai konformasi atau kandungan asam guluronat akibat degradasi yang tinggi, sehingga menurunkan kemampuan *radical scavenging* (Şen, 2011). Natrium alginat juga digunakan sebagai agen antioksidan yang dapat menurunkan kadar ROS/RNS (Sellimi *et al.*, 2015). Sediaan salep yang mengandung natrium alginat dapat dikombinasikan dengan ekstrak tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, sehingga diharapkan dapat mempercepat proses penyembuhan luka kronis pada penderita diabetes.

Abelmoschus esculentus L. yang dikenal sebagai tanaman okra mengandung banyak karbohidrat, mineral, dan vitamin (Adelakun *et al.*, 2009). Buah okra mengandung banyak senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi sebagai penghambat radikal bebas. Selain itu, flavonoid dapat menurunkan kadar *Reactive Oxygen and Nitrogen Species* (ROS/RNS) sehingga memicu penurunan stres oksidatif (Liao *et al.*, 2012). Beberapa penelitian menunjukkan buah okra dapat digunakan sebagai obat alternatif seperti untuk iritasi lambung (Lengsfeld *et al.*, 2004), penstabil glukosa darah, radang paru-paru, radang tenggorokan (Sabitha *et al.*, 2011), asma, penurunan kadar glukosa darah dan kolesterol (Sengkhampan *et al.*, 2009). Selain itu, ekstrak buah okra memiliki aktivitas antidiabetik dan antihiperlipidemik melalui normalisasi glukosa darah dan penurunan profil lipid (Panneerselvam, 2011). Ekstrak buah okra juga dapat mempercepat penyembuhan luka melalui induksi produksi sitokin/*growth factor* (Gouma *et al.*, 2016).

Berdasarkan beberapa literatur yang telah diketahui, penyembuhan luka diabetes menggunakan kombinasi ekstrak natrium alginat dan buah okra belum dilaporkan.

Penelitian ini akan melakukan ekstraksi dan identifikasi natrium alginat dari *S. ilicifolium* (Turner) C.Agardh dan *S. duplicatum* (J.Agardh) mengenai gugus fungsi, berat molekul dan rasio asam manuronat/asam guluronat (M/G). Natrium alginat dikombinasikan dengan ekstrak buah okra sebagai sediaan salep untuk mempercepat proses penyembuhan luka terbuka mencit diabetik. Uji aktivitas dilakukan secara berkala dengan melakukan uji histopatologi pada jaringan kulit mencit, sehingga diharapkan dapat digunakan untuk mengetahui efektivitas senyawa metabolit dalam proses penyembuhan luka diabetes.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan dapat diambil beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana identifikasi gugus fungsi, berat molekul, dan rasio M/G natrium alginat dari rumput laut coklat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan IC_{50} dari natrium alginat, ekstrak buah okra, dan kombinasi alginat-okra?
3. Bagaimana pengaruh penggunaan salep dari natrium alginat yang dikombinasi dengan ekstrak buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) terhadap kadar glukosa darah mencit diabetik?
4. Bagaimana aktivitas salep dari kombinasi ekstrak terhadap jumlah sel radang (neutrofil), fibrosit, fibroblas, makrofag, densitas kolagen, dan lebar luka dalam gambaran histologi jaringan kulit pada penyembuhan luka terbuka?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah diuraikan dapat ditetapkan beberapa tujuan penelitian sebagai berikut:

1.3.1 Tujuan umum

Menemukan metode penyembuhan alternatif untuk luka terbuka pada penderita diabetes.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Melakukan identifikasi gugus fungsi, berat molekul, dan rasio M/G natrium alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan IC_{50} dari natrium alginat, ekstrak buah okra, dan kombinasi alginat-okra.
3. Mengetahui pengaruh penggunaan salep dari kombinasi natrium alginat dan buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) terhadap kadar glukosa darah mencit diabetik.
4. Mengetahui aktivitas salep dari kombinasi ekstrak terhadap jumlah sel radang (neutrofil), fibrosit, fibroblas, makrofag, densitas kolagen, dan lebar luka dalam gambaran histologi jaringan kulit pada penyembuhan luka terbuka.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai potensi natrium alginat dan ekstrak buah okra sebagai metode alternatif untuk penyembuhan luka terbuka pada penderita diabetes. Selain itu, penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dan sumber referensi untuk pengembangan ilmu pengetahuan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA



2.1 *Sargassum*

Sargassum merupakan salah satu jenis genus makroalga planktonik dengan ordo *Fucales* dari rumput laut coklat *brown marine algae* (*Phaeophyceae*). *Sargassum* termasuk jenis tumbuhan kosmopolitan yang banyak ditemukan di daerah perairan karang dan pantai sebagai sumber penghasil alginofit untuk industri alginat (Costa, 2003). Beberapa spesies *Sargassum* tersebar di seluruh samudera dengan iklim tropis dengan perairan dangkal dan terdapat terumbu karang. *Sargassum* dikenal karena spesies planktonik yang mengambang bebas. *Sargassum* memiliki bentuk *thallus* silindris dan pipih, mempunyai gelembung udara yang pada umumnya bersifat soliter, serta panjangnya mencapai 7 meter dengan warna *thallus* coklat (Aslan, 1998).

Sargassum memiliki *thallus* tebal dan lebat setinggi 2 meter dengan *creeping holdfast* 18 mm yang tertutup epifit dan pasir; *Stipe terete* yang halus dengan bekas cabang setinggi 10 mm; cabang primer berdiameter 1,0-2,5 mm sedangkan cabang sekunder radial yang halus berdiameter 0,5-2,0 mm; Daun primer *ovate*, *lanceolate*, atau *oblanceolate* dengan panjang 20-75 mm dan lebar 6-22 mm; Daun sekunder muncul dalam pola alternatif pada batang yang seringkali berpasangan, *ovate*, *spathulate*, atau *lanceolate* dengan panjang 10-59 mm dan lebar 3-20 mm yang berwarna coklat sedang hingga coklat tua; tepi daun bagian ujung dapat dibagi menjadi dua dan membentuk bentuk lengkungan, dasar asimetris; vesikel pada umumnya berbentuk bulat, sebagian memanjang atau obovoid dengan tekstur yang halus berdiameter 2-7 mm; *receptacle* berbentuk sederhana atau bercabang dengan panjang 2-9 mm atau 2-6,5 mm dan diameter 1-2 mm; *antheridia* berbentuk oval dengan panjang 11-21 μm dan lebar 7-13 μm (Pereira, 2016).

2.1.1 *Sargassum ilicifolium* (Turner) C.Agardh

S. ilicifolium (Turner) C.Agardh merupakan ganggang coklat tropis dan subtropis yang terdistribusi di daerah pantai terbuka Samudra India, Asia (Cina, Jepang, Taiwan, Indonesia, Malaysia, Filipina, Singapura, Vietnam), New Zealand,

Australia, Samudra Pasifik (Mikronesia, Fiji, Mariana, Solomon) (Paul *et al.*, 1996). *S. ilicifolium* adalah rumput laut teluk yang memanjang dengan banyak sumbu bercabang tempat munculnya cabang lateral. *S. ilicifolium* memiliki pigmen fotosintesis seperti klorofil, dan senyawa bioaktif atau metabolit sekunder seperti karoten, steroid, terpenoid mannitol, polisakarida, asam alginat, serta mengandung alginat di dinding sel disertai plastida lamella tilakoid. Selain itu, *S. ilicifolium* berwarna coklat atau kuning kecoklatan karena mengandung pigmen fucoxantin (Yan *et al.*, 1998; Bhaskar dan Miyashita, 2005). *S. ilicifolium* dikenal sebagai sumber yang kaya senyawa aktif biologis secara struktural dengan potensi farmasi dan biomedis yang luar biasa. Oleh karena itu, berbagai literatur melaporkan *S. ilicifolium* memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antiinflamasi, antibakteri, *anti-aging*, *antifungal*, antioksidan, *neuroprotective* (Sumithra dan Arunachalam, 2014; kang *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2009). Klasifikasi ilmiah dari tanaman *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh sebagai berikut:

Empire	: Eukaryota
Kingdom	: Cromista
Filum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>S. ilicifolium</i> (Turner) C. Agardh

(Pereira, 2016).



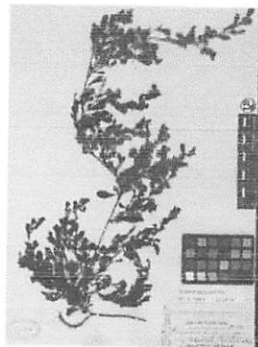
Gambar 2.1 Morfologi *S. ilicifolium* (Turner) C. Agardh (Kitayama, 1931).

2.1.2 *Sargassum duplicatum* (J. Agardh)

S. duplicatum (J. Agardh) merupakan ganggang coklat yang terdistribusi di perairan Filipina, pulau Jawa Indonesia. *S. duplicatum* mengandung pigmen fucoxantin sehingga berwarna coklat atau kuning kecoklatan (Yan *et al.*, 1998). *S. duplicatum* mengandung protein 2,97%, lemak 0,26%, senyawa anti tumor, anti bakteri, anti virus alginat, dan beberapa mineral. Selain itu, *S. duplicatum* mengandung senyawa bioaktif alkaloid, saponin, quinon, fenolik, steroid, dan flavonoid. Oleh karena itu, beberapa literatur melaporkan bahwa *s. duplicatum* memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti antifouling, antioksidan, anti kanker, anti bakteri dan antiinflamasi (Santi *et al.*, 2014). Secara morfologi, *S. duplicatum* memiliki kemiripan dengan *S. ilicifolium* karena berasal dari famili yang sama. Klasifikasi ilmiah dari tanaman *Sargassum duplicatum* (J. Agardh) sebagai berikut:

Empire	: Eukaryota
Kingdom	: Chromista
Filum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>S. duplicatum</i> (J. Agardh)

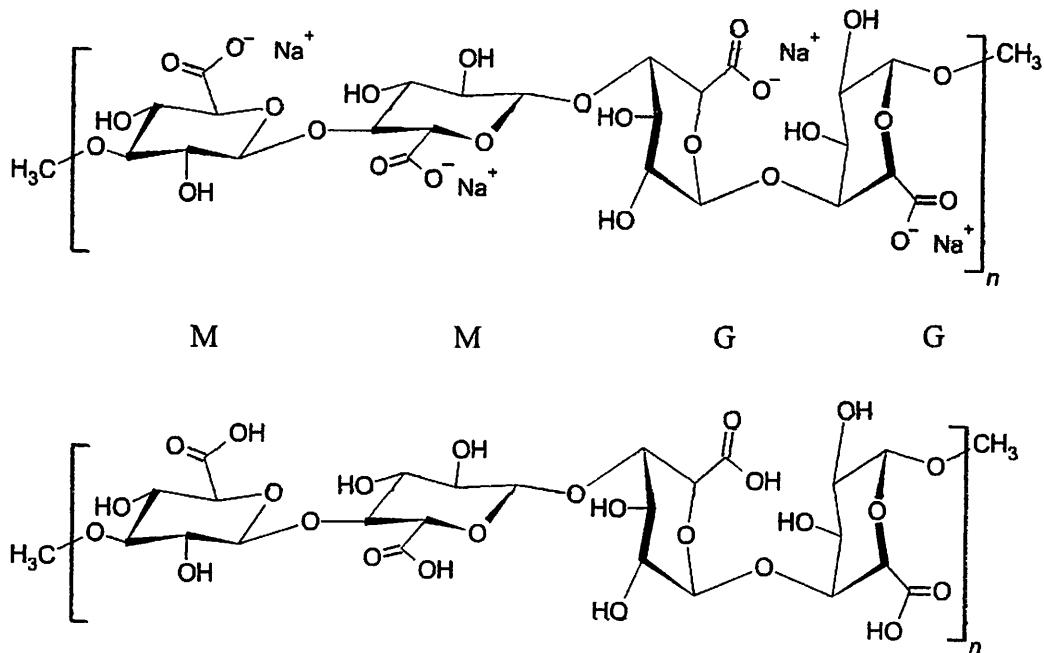
(Pereira, 2016).



Gambar 2.2 Morfologi *S. duplicatum* (J. Agardh) (Bory, 1828).

2.2 Asam Alginat

Alginat merupakan sekelompok polisakarida anionik yang cukup melimpah di alam sebagai komponen struktural yang berasal dari dinding sel ganggang cokelat (*brown algae*) (Szekalska *et al.*, 2016). Alginat tersedia dalam bentuk asam alginat dan garamnya dari hasil ekstraksi ganggang coklat (*Phaeophyceae*) seperti *L. hyperborean*, *L. digitate*, *L. japonica*, *Ascophyllum nodosum*, dan *Macrocystis pyrifera* (Grasdalen *et al.*, 1991). Alginat termasuk dalam biopolimer linier yang terdiri dari residu 1,4-linked α -L-guluronic acid (G) dan 1,4-linked β -D-mannuronic acid (M) yang diatur dalam pola homogen (poli-G, poli-M) atau pola heterogen (MG). Urutan rantai polimer yang dihasilkan bergantung pada organisme ganggang cokelat sehingga membentuk komposisi urutan monomer blok M- dan blok G- yang berbeda.



Gambar 2.3 Struktur kimia dari natrium alginat dan asam alginat (Venkatesan *et al.*, 2017).

Alginat pada umumnya memiliki susunan molekul yang rigid karena tersusun dari enam-anggota cincin gula sehingga rotasinya terbatas di sekitar ikatan glikosidik. Kekakuan rantai juga dipengaruhi oleh gaya elektrostatis antara gugus

bermuatan pada rantai polimer (Hecht dan Srebnik, 2018). Kekakuan rantai tidak hanya bergantung pada kekuatan ionik, tetapi juga pada komposisi monomer alginat $MG < MM < GG$ (Smidsrød *et al.*, 1973). Oleh karena itu, sifat fisik dan mekanik alginat dipengaruhi oleh urutan blok M dan G (Draget *et al.*, 2005). Residu G dalam ion alginat dapat berinteraksi dengan ion natrium (Na^+) membentuk garam natrium alginat akibat *chain-chain association* dan pembentukan *junction zone* (Hecht dan Srebnik, 2018).

Tabel 2.1 Persentase *Mannuronic acid* dan *Guluronic acid*, serta Rasio M/G dari Asam Alginat yang berasal dari berbagai rumput laut komersial^a (Venkatesan *et al.*, 2017).

Spesies	Mannuronic acid (%)	Guluronic acid (%)	Rasio M/G	Referensi
<i>Ascophyllum rodosum</i>	64,5	35,5	1,82	(3)
	60,0	40,0	1,5	(4)
<i>Ecklonia</i> Fronds			2,64-3,08 ^c	(6)
<i>Cava</i> Stipes			1,39-2,91 ^c	(6)
<i>Laminaria digitata</i>	53,7	46,3	1,16	(3)
	59,0	41,0	1,43 ^b	(3)
<i>Laminaria hyperborean</i>	38,3	61,7	0,62	(2)
Fronds	56,0	44,0	1,28	(3)
Stipes			0,46 ^b	(3)
<i>Laminaria japonica</i>	69,3	30,7	2,26 ^b	(7)
Basal part			2,34-3,18 ^c	(7)
Apical part			1,61-2,02 ^c	(7)
<i>Macrocystis pyrifera</i>				
Australian			1,38	(2)
American	61,0	39,0	1,56	(3)
Fronde			1,52	(7)
Stipe	50,5	49,5	1,02	(7)
Airbladder			1,41	(7)
<i>Undaria pinnatifida</i>			1,45-2,65 ^c	(7)
<i>Sargassum vulgare</i>	44,0	56,0	0,78	(8)

(1) Haug *et al.*, 1974; (2) Penman dan Sanderson, 1972; (3) Haug dan Larsen, 1962; Grasdalen *et al.*, 1979; (4) Haug, 1964; (5) Kim, 1984; (6) Ji dan Wang, 1984; (8) Sari-Chmayssem *et al.*, 2015.

^a Kecuali dinyatakan lain, sampel asam alginat disiapkan di laboratorium dari rumput laut yang sesuai.

^b Sampel asam alginat dibuat dari alginat komersial.

^c Range menunjukkan variasi musiman selama 1 tahun.

Garam natrium alginat banyak digunakan pada bidang industri, karena terlarut dalam air, sedangkan bentuk asam alginat dan magnesium atau kalsium alginat tidak larut dalam air (Pereira, 2018). Sifat dari natrium alginat yaitu memiliki kemampuan untuk membentuk gel dengan penambahan garam-garam kalsium atau natrium akibat terjadinya *chelating* antara rantai L-guluronic acid dengan ion kalsium atau natrium (Coultate dan Thom, 2009). Alginat secara umum diaplikasikan pada beberapa bidang industri seperti produksi material makanan, farmasi, kosmetik, kesehatan, pupuk, dan tekstil karena memiliki sifat *biocompatibility*, toksisitas yang rendah, harga yang relatif murah dan penstabil emulsi, dan gelasi yang lembut setelah penambahan kation divalen (Pilnik dan Rombouts, 1985). Alginat digunakan pada industri makanan untuk menstabilkan campuran dispersi, emulsi, meningkatkan viskositas dan membentuk gel (Toft *et al.*, 1986). Alginat dapat digunakan pada produksi kapsul dan dikonsumsi sebagai minuman untuk menurunkan kadar gula darah. Pada bidang industri tekstil, alginat digunakan sebagai zat aditif pewarna tekstil (McCormick, 2001). Alginat memiliki kemampuan untuk menghilangkan adsorpsi logam berat seperti Cd, Cr, dan Cu (Papageorgiou *et al.*, 2008). Alginat dapat diaplikasikan sebagai *wound dressing* untuk penyembuhan luka, sebagai *bioactive agent delivery* untuk pelepasan obat secara terkontrol, sebagai transplantasi sel pada rekayasa jaringan organ (Langer dan Vacanti, 1993).

Proses ekstraksi alginat biasanya menggunakan lima langkah tanpa memperhatikan prosesnya diantaranya yaitu fragmentasi bahan baku menjadi bentuk yang kecil untuk membuat pemrosesan lebih mudah, konversi garam alginat menjadi asam alginat melalui *pretreatment* asam untuk menghancurkan dinding sel, konversi asam alginat menjadi natrium alginat melalui ekstraksi basa dan pelarutan asam alginat, isolasi residu biomassa, pengendapan dan pengeringan natrium alginat yang terlarut (Venkatesan *et al.*, 2017). Ekstraksi dan purifikasi alginat pada umumnya didasarkan pada konversi dari bentuk tidak larut dalam dinding sel ganggang menjadi bentuk yang larut menggunakan garam natrium yang diikuti dengan pelarutan dan pengendapan secara berturut-turut untuk menghilangkan kotoran (Rinaudo, 2008). Garam natrium seperti natrium klorida dapat

mengendapkan filtrat ekstrak ganggang coklat sehingga membentuk garam alginat. Pengubahan garam alginat menjadi asam alginat setelah penambahan HCl encer dan dilakukan pemurnian lebih lanjut sehingga diperoleh serbuk natrium alginat (Qin, 2008).

2.3 Tanaman Okra (*Abelmoschus esculentus* L.)

Okra (*A. esculentus* L.) merupakan tumbuhan dari famili *Malvaceae* yang dikenal dengan nama *Lady's finger*, bhindi di India, okra, ochro, okoro, quingombo, gombo, kopi arab, kacang bendi di asia tenggara (Singh *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2014). Okra termasuk sayuran penting yang banyak ditemukan di berbagai negara dengan iklim tropis, subtropis dan saat ini secara luas di ekspor dari Afrika ke Asia, Eropa Selatan, dan Amerika (Kumar *et al.*, 2013). Tanaman Okra ditanam secara komersial di banyak negara seperti Indonesia, India, Jepang, Turki, Iran, Afrika Barat, Yugoslavia, Bangladesh, Afghanistan, Pakistan, Myanmar, Malaysia, Thailand, Brasil, Ethiopia, Siprus, dan Amerika bagian Selatan (Qhureshi, 2007). Klasifikasi ilmiah tanaman okra sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Genus	: <i>Abelmoschus</i>
Spesies	: <i>A. esculentus</i>

(Kumar *et al.*, 2013).



(a)



(b)

Gambar 2.4 Morfologi (a) tumbuhan okra; (b) buah okra (*A. esculentus* L.) (Kumar *et al.*, 2013).

Tanaman okra termasuk tanaman dikotil dengan batang okra tegak bercabang yang tingginya mencapai 0,5-4 meter seperti spesies kapas, kakao, dan *Hibiscus*. Tanaman ini banyak tumbuh di tanah subur kaya humus yang dikeringkan di bawah sinar matahari dengan pH sekitar 6-6,7 tetapi dapat toleran pada berbagai jenis tanah dengan pH 5,5-8,0. Selain itu, tanaman Okra sensitif terhadap embun beku, suhu rendah, dan kondisi kekeringan sehingga pertumbuhan dan perkembangan optimum buah okra dicapai pada suhu 20-30°C (Roy *et al.*, 2014). Tanaman okra terdiri dari beberapa bagian yaitu buah, daun, akar, biji, dan bunga. Daun okra disebut sebagai *long-petioled* dengan panjang daun dan tangkai sekitar 10-20 cm dan 50 cm. Bunga dari tanaman okra termasuk hermaphrodit dan *self compatibility* dengan diameter 4-8 cm yang memiliki 5 kelopak putih kekuningan yang sering disertai bintik merah atau ungu di dasar kelopak. Buah okra memanjang dan runcing dengan panjang sekitar 10-25 cm, diameter 1,5-3 cm, berisi biji bulat, dan mengandung lendir.

Tabel 2.2 Nilai nutrisi okra mentah per 100 g (USDA database, 2017)

Energi	Nilai Nutrisi
Karbohidrat	7,45 g (140 kJ)
Gula	1,48 g
Fiber	3,2 g
Lemak	0,19 g
Protein	2 g
Air	90,19 g
Vitamin A	36 µg (7%)
Tiamin (B ₁)	0,2 mg (17%)
Riboflavin (B ₂)	0,06 mg (5%)
Niacin (B ₃)	1 mg (7%)
Vitamin C	23 mg (28%)
Vitamin E	0,27 mg (2%)
Vitamin K	31,3 µg (30%)
Kalsium	82 mg (8%)
Fe	0,62 mg (5%)
Mg	57 mg (16%)
K	299 mg (6%)

Bagian-bagian dari tanaman okra memiliki manfaat yang sangat banyak dalam pencegahan atau terapi kondisi kesehatan patologis, aplikasi makanan dan

non makanan karena mengandung banyak komponen bioaktif pada bagian tanaman okra. Polong okra mengandung senyawa polifenolik, karoten, asam folat, tiamin, riboflavin, niacin, Vitamin C, asam oksalat, dan asam amino (Roy *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2012; Gemede *et al.*, 2015; Petropoulos *et al.*, 2018). Biji okra mengandung senyawa polifenolik, *oligomer catechin*, turunan flavonol, protein, dan *oil fraction* (Arapitsas, 2008; Adalakun *et al.*, 2009; Jarret *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Steyn *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2016). Akar okra mengandung karbohidrat, glikosida flavonol, mineral, tannin (Sunilson *et al.*, 2008; Idris *et al.*, 2009). Daun okra mengandung glikosida flavonol (Caluete *et al.*, 2014). Tanaman okra mengandung senyawa turunan flavonol (quercetin) paling banyak sekitar 11,10-33,22 mg/100g dengan rasio quercetin/total flavonoid sebesar 41% (USDA database, 2014). Bagian bunga, buah, daun, dan biji memiliki sifat antioksidan, persentase total fenolik dan flavonoid yang berbeda (Liao *et al.*, 2012). Nilai nutrisi okra mentah per 100 gram dituliskan pada Tabel 2.2 berikut ini.

Tanaman okra banyak dimanfaatkan dalam bidang industri makanan dan farmasi karena kandungan senyawa bioaktifnya. Biji okra sebagai sumber protein dan minyak digunakan sebagai pengganti kopi tanpa kafein, pengganti garam aluminium dalam pemurnian air (Calisir *et al.*, 2005). Akar dan batang okra dimanfaatkan untuk membersihkan jus tebu dari gula merah (Chauhan, 1972). Buah dan batang dewasa yang mengandung serat kasar dimanfaatkan dalam industri kertas, biogas dan bahan bakar (Martin, 1982; Dahiya dan Vasudevan, 1987). Serat okra juga dapat mengendalikan kadar gula dalam darah, sebagai obat efektif untuk ulkus, dan membersihkan zat beracun atau kolesterol jahat dalam hati (Jain, 2012). Okra dimanfaatkan sebagai terapi sebagai anti diuretik, *hypoglycemic*, *hypocholesterolemic*, antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, antikonstipasi, antikanker, antidiabetik (Viuda-Martos *et al.*, 2010).

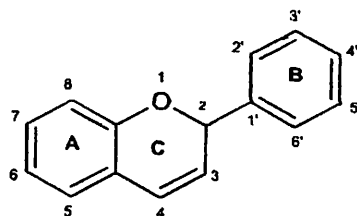
Ekstrak bunga okra memiliki aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik yang ditunjukkan melalui nilai aktivitas DPPH *radical scabenging* tinggi (Geng *et al.*, 54). Biji okra memiliki aktivitas antioksidan sehingga memiliki kemampuan *reducing agent*, *radical scavenging* DPPH, anion superoksida, dan radikal hidroksi

yang baik. Selain itu, dapat menurunkan aktivitas GPT dan GOT serta meningkatkan aktivitas SOD dan CAT (Hu *et al.*, 2014).

2.4 Kandungan Flavonoid Buah Okra dan Bioaktivitasnya

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki struktur polifenol dan berasal dari produk alami seperti buah-buahan dan sayuran (Panche *et al.*, 2016). Senyawa flavonoid sebagai produk alami didapatkan melalui proses ekstraksi dari tanaman yang dapat ditemukan pada beberapa bagian tanaman sehingga menjadi kelas senyawa yang khas pada tanaman tingkat tinggi. Flavonoid dalam bagian tanaman digunakan untuk pertumbuhan dan pertahanannya melawan *plaque* (Havsteen, 2002). Flavonoid mudah ditemukan pada pigmen bunga tanaman angiospermae dan dapat ditemukan di semua bagian tanaman (Dewick, 2001).

Flavonoid memainkan peran penting pada berbagai aktivitas biologis dalam tumbuhan, hewan, dan bakteri. Flavonoid disintesis di lokasi tertentu pada bagian tumbuhan yang bertanggung jawab atas warna dan aroma bunga untuk membantu proses perkecambahan biji dan spora, serta pertumbuhan dan perkembangan bibit (Griesbach, 2005). Selain itu, flavonoid berfungsi sebagai molekul sinyal, senyawa *allopathic*, *phytoalexins*, agen detoksifikasi dan senyawa pertahanan antimikroba. Saat ini ada sekitar 6000 flavonoid yang berkontribusi dalam pigmen warna-warni buah-buahan, rempah-rempah, sayuran dan tanaman obat (Samanta *et al.*, 2011). Flavonoid memiliki struktur umum dengan kerangka yang terdiri dari karbon-15 (C-15) tersusun dari dua cincin fenil (cincin A dan B) dan cincin heterosiklik (cincin C) sehingga struktur karbonnya C6-C3-C6. Cincin A biasanya menunjukkan pola substitusi phloroglucinol. Kerangka dasar senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.4 berikut ini.



Gambar 2.5 Kerangka dasar senyawa flavonoid (Panche *et al.*, 2016).

Flavonoid dapat diklasifikasikan menjadi sub-kelas yang berbeda berdasarkan struktur kimia dan biasanya dibagi lagi menjadi beberapa sub-kelompok sebagai berikut:

1. Flavonol

Flavonol merupakan sub-kelas flavonoid dengan gugus keton yang memiliki blok proantosianidin. Flavonol banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan seperti bawang, kangkung, selada, tomat, apel, anggur merah, berry, dan teh. Contoh senyawa flavonol yaitu quercetin, myricetin, fisetin, kaempferol. Flavonol memiliki gugus hidroksil pada posisi karbon 3 dalam cincin C yang dapat mengalami glikosilasi dan keberagaman dalam pola metilasi dan hidroksilasi. Flavonol termasuk sub-kelompok flavonoid yang paling umum dan terbesar seperti halnya kandungan quercetin dalam berbagai makanan nabati (Iwashina, 2013).

2. Flavon

Flavon merupakan sub-kelas penting dari flavonoid yang banyak ditemukan di daun, bunga, dan buah-buahan sebagai glukosida. Sub-kelas flavon memiliki ikatan rangkap antara posisi 2 dan 3, serta keton di posisi 4 dari cincin C. Flavon dari sayuran dan buah-buahan sebagian besar memiliki gugus hidroksil pada posisi 5 cincin A. Proses hidroksilasi sebagian besar terjadi di posisi 7 cincin A atau posisi 3' dan 4' cincin B, tetapi posisi hidroksilasi dapat bervariasi bergantung pada klasifikasi taksonomi sayuran dan buah tertentu. Sumber utama flavon ditemukan di seledri, paprika merah, mint, ginkgo biloba, parsley. Contoh senyawa sub-kelas flavon yaitu Luteolin, apigenin, tageretin.

3. Flavanon

Flavanon merupakan sub-kelas flavonoid yang disebut juga sebagai dihidroflavon yang tidak memiliki cincin C jenuh sehingga ikatan rangkap antara posisi 2 dan 3 yang jenuh. Hal tersebut merupakan perbedaan struktural yang khas dengan sub-kelas dari senyawa flavonoid. Flavanon banyak ditemukan dalam semua buah jeruk seperti jeruk, lemon dan anggur.

Contoh senyawa flavanon yaitu Hesperitin, naringenin, dan eriodictyol. Senyawa ini bertanggung jawab atas rasa pahit dari jus dan kulit buah jeruk.

4. Flavanol

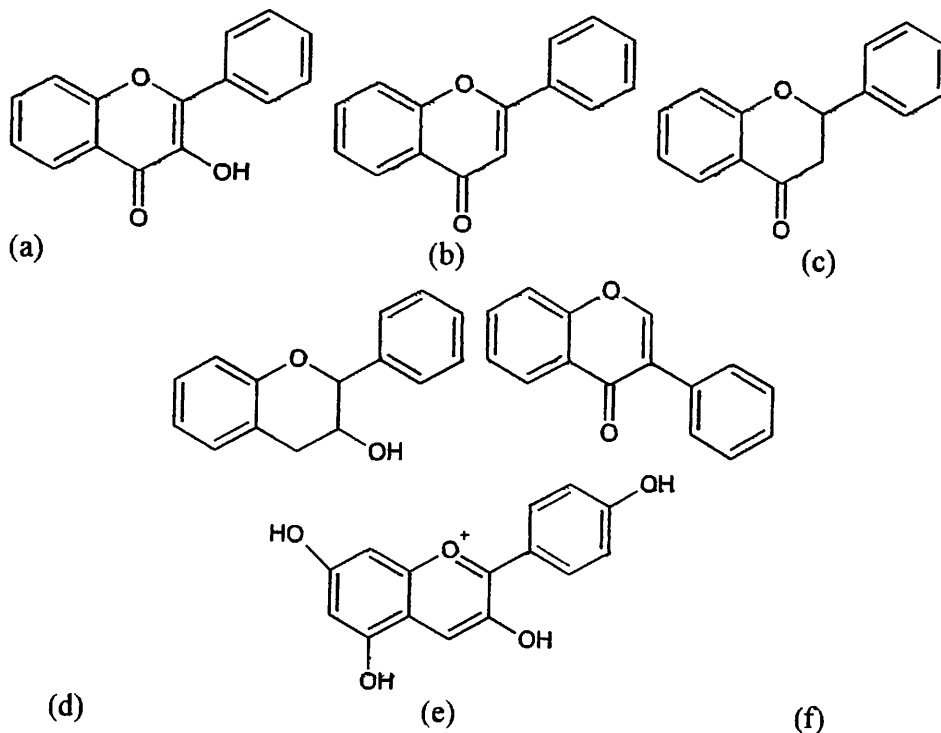
Flavanol disebut juga sebagai dihidroflavonol atau katekin yang merupakan turunan 3-hidroksi dari flavanon. Flavanol juga disebut sebagai (Flavan-3-ol) karena gugus hidroksil terikat pada posisi karbon 3 cincin C. flavanol tidak memiliki ikatan rangkap antara posisi karbon 2 dan 3. Flavanol banyak ditemukan di pisang, apel, blueberry, persik, dan pir (Panche *et al.*, 2016).

5. Antosianin

Antosianin merupakan pigmen yang bertanggung jawab atas warna pada tanaman, bunga dan buah-buahan. Contoh dari senyawa antosianin yaitu *Cyanidin*, *delphinidin*, *malvidin*, *pelargonidin* dan *peonidin*. Senyawa tersebut banyak ditemukan pada berbagai buah seperti *cranberry*, *blackcurrant*, anggur merah, anggur merlot, raspberry, strawberry, blueberry, bilberry, dan blackberry. Warna antosianin bergantung pada pH dan metilasi atau asilasi pada gugus hidroksil dalam cincin A dan B (Iwashina, 2013).

6. Isoflavonoid

Isoflavonoid merupakan sub-kelompok flavonoid yang besar dan khas yang banyak ditemukan dalam tanaman kacang dan polongan. Contoh senyawa isoflavonoid seperti *genistein* dan *daidzein* umumnya dianggap sebagai fitoestrogen karena aktivitas estrogeniknya pada model hewan sehingga menginduksi perubahan hormon dan metabolisme yang dapat mempengaruhi berbagai jalur penyakit (Szkudelska dan Nogowski, 2007).



Gambar 2.6 Struktur dari klasifikasi senyawa flavonoid; (a) Flavonol; (b) Flavon; (c) Flavanon; (d) Flavanol; (e) Isoflavonoid; (f) Antosianin (Panche *et al.*, 2016).

2.5 Diabetes Melitus

2.5.1 Definisi dan deskripsi diabetes melitus

Diabetes merupakan kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia atau kadar glukosa tinggi abnormal akibat kerusakan sekresi insulin, sensitivitas insulin, atau keduanya. Beberapa proses patogenik yang terlibat dalam pengembangan diabetes yaitu penghancuran autoimun sel β pankreas dengan defisiensi insulin yang menyebabkan resistensi terhadap aksi insulin. Dasar kelainan metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak pada diabetes yaitu kurangnya aksi insulin pada jaringan target. Defisiensi aksi insulin terjadi akibat sekresi insulin yang tidak cukup dan/atau berkurangnya respon jaringan terhadap insulin. Gangguan sekresi insulin dan kerusakan aksi insulin sering dijumpai bersamaan dalam satu pasien, tetapi jika ditemukan salah satu kelainan saja, maka penyebab utamanya adalah hiperglikemia (Diabetes care, 1997). Gejala

hiperglikemia ditandai timbulnya poliuria, polidipsia, penurunan berat badan, polifagia, dan penglihatan yang kabur.

Penderita diabetes umumnya juga mengalami tekanan darah tinggi (hipertensi), kadar insulin kronis yang tinggi (hyperinsulinemia), dan kadar kolesterol tidak sehat serta kadar lemak darah tinggi (hyperlipidemia). Sehingga memungkinkan terjadinya komplikasi jangka panjang yang meliputi:

1. Penyakit pembuluh darah (*diabetic angiopathy*), aterosklerosis, kondisi jantung dan stroke. Gangguan kardiovaskular merupakan penyebab utama kematian penderita diabetes.
2. Penyakit ginjal (*diabetic nephropathy*). Penyebab utama penyakit ginjal stadium akhir merupakan diabetes, sehingga memerlukan perawatan dialisis atau transplantasi ginjal.
3. Penyakit mata (*diabetic retinopathy*) seperti glaukoma dan katarak yang disebabkan oleh diabetes sehingga terjadi gangguan penglihatan bahkan kebutaan.
4. Kerusakan saraf (*diabetic neuropathy*) termasuk dalam neuropati perifer yang sering menyebabkan nyeri atau mati rasa pada anggota gerak. Neuropati otonom dapat menghambat pencernaan (*gastroparesis*), serta berkontribusi pada disfungsi seksual dan inkontinesia. Neuropathy juga mengganggu pendengaran dan indera lainnya.
5. Gangguan berpikir seperti demensia, penyakit Alzheimer, dan defisit kognitif lainnya. Gangguan tersebut disebabkan karena adanya resistensi insulin di otak.
6. Infeksi dan luka. Kondisi kaki dengan adanya gangguan kulit seperti bisul dapat menyebabkan radang di bagian luka hingga terjadinya amputasi kaki dan kaki nontraumatik. Infeksi yang rentan terjadi yaitu infeksi saluran kemih, infeksi jamur, sariawan, dan penyakit periodontal.
7. Kanker atau tumor di usus besar, pankreas hati, dan beberapa organ lain ditingkatkan oleh diabetes.
8. Gangguan muskuloskeletal seperti osteoporosis hingga sindrom *restless leg* atau sindrom myofascial pain.

9. Komplikasi kehamilan seperti resiko preeklampsia, keguguran, dan cacat lahir ditingkatkan karena diabetes.
10. *Insulin shock* merupakan hipoglikemia tahap lanjut yang disebabkan oleh jumlah obat insulin yang berlebihan atau agen antidiabetik tertentu.
11. Diabetik ketoacidosis merupakan kurangnya insulin yang dapat memaksa tubuh untuk membakar lemak untuk mendapatkan glukosa yang dikonversi membentuk energi, tetapi menghasilkan produk samping beracun berupa keton.

(CDCP, 2005; Frank, 2004; Jawa *et al.*, 2004).

Tabel 2.3 Kadar glukosa darah pada penderita diabetes dan normal (ADA, 2007; JDC, 2019; AACE, 2010).

Waktu Pengecakan	Kadar Glukosa Darah Tanpa Diabetes	Kadar Glukosa Darah Penderita Diabetes
Puasa (Sebelum Sarapan)	< 100 mg/dL	80 – 130 mg/dL (ADA) 70 – 130 mg/dL (JDC) < 110 mg/dL (AACE)
Sebelum Makan 2 Jam Setelah Makan	< 110 mg/dL < 140 mg/dL	70 – 130 mg/dL (JDC) < 180 mg/dL (ADA & JDC)
1-2 Jam Setelah Makan Waktu Tidur	< 120 mg/dL	< 140 mg/dL (AACE) 90 – 150 mg/dL (JDC)
A1C levels	< 5,7 %	< 7%

2.5.2 Klasifikasi diabetes melitus

Diabetes melitus terdapat dalam beberapa bentuk dan klasifikasi yang berbeda. Suatu tipe diabetes pada seorang individu seringkali bergantung pada keadaan pada saat proses diagnosis. Beberapa variasi dari jenis-jenis diabetes meliputi:

1. Diabetes tipe 1

Diabetes tipe 1 merupakan suatu penyakit autoimun dimana sistem kekebalan tubuh secara keliru menghancurkan sel β pankreas sebagai penghasil insulin. Diabetes tipe ini pada umumnya lebih cepat berkembang dibandingkan dengan jenis diabetes lainnya. Diabetes tipe 1 lebih banyak didiagnosis pada anak-anak dan remaja serta sebagian orang dewasa muda. Pasien harus memberikan obat

insulin secara teratur untuk bertahan hidup. Diabetes tipe 1 dahulu disebut sebagai *juvenile diabetes and insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM), tetapi istilah tersebut tidak akurat karena anak-anak dapat mengembangkan jenis diabetes lain. Jenis tipe 1 berkembang pada usia lebih dari 30 tahun dan disebut *latent autoimmune diabetes of adulthood* (LADA). Terkadang pasien dengan diabetes autoimun mengembangkan resistensi insulin karena adanya kenaikan berat badan atau faktor genetik sehingga disebut sebagai diabetes ganda.

2. Diabetes tipe 2

Diabetes tipe 2 terjadi karena adanya gangguan metabolisme yang melibatkan berat badan dan resistensi insulin. Pada pasien diabetes tipe 2, pada awalnya pankreas menghasilkan insulin tetapi tubuh mengalami kesulitan untuk menggunakan hormon pengontrol glukosa, sehingga pankreas tidak dapat memproduksi insulin yang cukup bagi tubuh. Menurut *International Diabetes Federation*, Diabetes tipe 2 merupakan tipe diabetes yang paling umum mencapai 85%-95% kasus di negara maju dan lebih dari 95% di negara berkembang. Pada kasus jenis diabetes tipe 2 diawali dengan prediabetes yaitu kadar glukosa (glukosa darah) di atas normal tetapi belum cukup tinggi untuk diagnosis diabetes. Prediabetes dapat dicegah melalui olahraga dan diet untuk penurunan berat badan. Diabetes tipe 2 dahulu disebut sebagai *Adult-onset diabetes and non-insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM). Istilah tersebut tidak akurat karena anak-anak juga dapat mengembangkan penyakit ini dan beberapa pasien memerlukan terapi insulin.

3. Diabetes gestasional

Diabetes gestasional terjadi akibat gangguan metabolisme sementara yang dapat dialami oleh wanita non-diabetes sebelum kehamilan, biasanya pada trimester ketiga. Perubahan hormon, kelebihan berat badan, dan riwayat diabetes pada keluarga berkontribusi pada diabetes tipe ini. Menurut *American Diabetes Association*, sekitar 4% wanita hamil menderita diabetes gestasional. Diabetes gestasional dapat menyebabkan masalah bagi ibu dan bayi seperti preeklampsia, *premature delivery*, macrosomia (bayi besar), penyakit kuning,

dan kesulitan bernapas pada bayi. Tipe diabetes ini biasanya berakhir ketika kehamilan terjadi, tetapi meningkatkan resiko diabetes tipe 2 dikemudian hari bagi ibu dan anak.

4. Diabetes sekunder

Diabetes yang disebabkan oleh kondisi lain yang berkontribusi sebagai sumber potensial. Sumber potensial yang menyebabkan penyakit ini seperti pankreatitis, cystic fibrosis, sindrom Down, dan hemochromatosis. Perawatan medis yang dapat menyebabkan diabetes yaitu corticosteroid, immunosupresif lain, diuretic, dan pancreatectomy. Diabetes sekunder dikenal sebagai *maturity-onset diabetes of the young (MODY)* karena biasanya didiagnosis pada pasien sebelum usia 25 tahun dengan berat badan normal. Penyakit ini biasanya disebabkan oleh cacat genetik yang diwarisi oleh orang tua.

(ADA, 2007; Riaz, 2009).

2.5.3 Faktor penyebab diabetes melitus

Diabetes melitus pada umumnya dianggap sebagai penyakit multifactorial yang melibatkan beberapa kondisi predisposisi dan faktor resiko. Beberapa faktor dan penyebab resiko penyakit diabetes antara lain yaitu:

1. Genetik dan riwayat keluarga : gen-gen tertentu berkontribusi dalam beberapa jenis diabetes seperti tipe 1 dan 2. Riwayat medis keluarga juga berpengaruh pada resiko diabetes. Menurut American Diabetes Association, seseorang yang orang tuanya mengidap penyakit diabetes tipe 1 akan memiliki peluang 10-25% untuk terserang penyakit tersebut, sedangkan seseorang yang orang tuanya mengidap diabetes tipe 2 akan memiliki peluang 50%.
2. Berat badan dan jenis tubuh : kegemukan dan obesitas merupakan faktor utama diabetes tipe 2 dan gestasional. Kelebihan lemak disekitar perut (obesitas sentral) meningkatkan resistensi insulin dan sindrom metabolik sehingga memicu terjadinya penyakit diabetes.
3. Jenis kelamin : menurut National Institutes of Health (NIH), laki-laki bertanggung jawab atas 53% kasus diabetes orang dewasa di Amerika, karena peningkatan kadar testosterone rendah (hipogonadisme pria) yang dikaitkan dengan resistensi insulin.

4. Tingkat aktivitas fisik : kurangnya olahraga teratur menjadi salah satu faktor terjadinya obesitas dan diabetes.
5. Penyakit lain : kondisi medis seperti hipertensi, hiperlipidemia, asma, *sleep apnea* dikaitkan dengan diabetes tipe 2, sedangkan penyakit autoimun dikaitkan dengan diabetes tipe 1. Diabetes sekunder disebabkan penyakit pankreatitis, hemochromatosis, gangguan endokrin.
6. Pola hidup tidak sehat : merokok dan mengonsumsi minuman alkohol berlebihan dapat berkontribusi dalam resiko diabetes berbagai jenis.

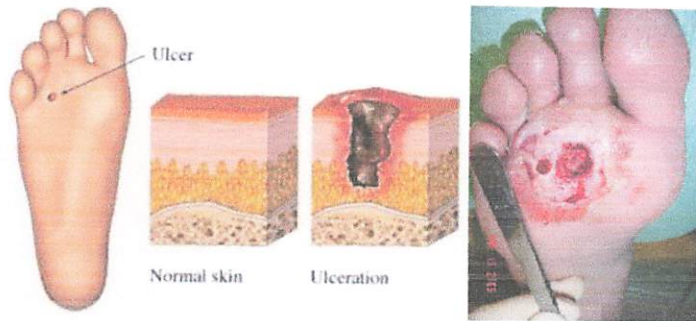
(Lipsky *et al.*, 2004; Mokabberi dan Ravakhah, 2007; ADA, 2007).

2.6 Luka Terbuka Penderita Diabetes (*Ulcer/Gangrene Diabetic*)

2.6.1 Deskripsi *ulcer/gangrene diabetic*

Luka terbuka merupakan cedera yang melibatkan kerusakan eksternal atau internal dalam jaringan tubuh terutama pada kulit. Penderita diabetes melitus sering mengalami luka kronis yang menjadi komplikasi umum dan menyebabkan amputasi. Luka diabetes kronis terjebak dalam keadaan inflamasi persisten dengan peningkatan kadar sitokin dan protease pro-inflamasi bersamaan dengan gangguan ekspresi faktor pertumbuhan (Eming *et al.*, 2014). *Ulcer/gangrene diabetic* merupakan salah satu bentuk komplikasi kronik diabetes melitus yang berupa luka terbuka pada permukaan kulit dan disertai dengan kematian jaringan setempat dan invasi oleh bakteri yang menyebabkan pembusukan (Baron *et al.*, 2003). Luka terbuka atau ulkus pada penderita diabetes menyebabkan kerusakan sebagian (*partial thicknes*) atau keseluruhan (*full thickness*) pada kulit dan dapat meluas ke jaringan bawah kulit, tendon, otot atau persendian akibat abnormalitas saraf dan gangguan pembuluh darah arteri perifer. Kondisi tersebut timbul sebagai akibat terjadinya peningkatan kadar gula darah yang tinggi sehingga terjadi penurunan respon imun dan rentan terhadap infeksi. Ulkus atau luka yang tidak dilakukan penanganan yang tepat dan tidak dapat sembuh dalam waktu lama dapat menyebabkan organ bagian luka menjadi terinfeksi. Ulkus kaki, infeksi, neuroarthropati dan penyakit arteri perifer sering mengakibatkan *gangrene* dan amputasi ekstremitas bagian bawah (Parmet dan Sharon, 2005; Frykberg, *et al.*,

2000). Berikut ini perbandingan jaringan normal dan jaringan yang telah terbentuk ulkus.



Gambar 2.7 Perbandingan antara jaringan kulit normal dan jaringan yang terkena ulkus dan contoh ulkus kaki (Frykberg, *et al.*, 2000).

2.6.2 Faktor penyebab *ulcer/gangrene diabetic*

Luka atau ulkus pada penderita diabetes biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu:

a. Diabetik neuropati

Diabetik neuropati merupakan salah satu manifestasi dari diabetes melitus yang dapat menyebabkan terjadinya luka diabetes. Pada kondisi ini, sistem saraf yang terlibat yaitu saraf sensoris, motorik, dan otonom. Neuropati perifer pada penyakit diabetes melitus dapat menimbulkan kerusakan pada serabut saraf. Kerusakan serabut saraf motorik menimbulkan kelemahan otot, atrofi otot, dan deformitas sehingga memudahkan terbentuknya kalus. Kerusakan serabut sensoris akibat rusaknya serabut mielin mengakibatkan penurunan sensasi nyeri sehingga memudahkan terjadinya ulkus kaki. Kerusakan serabut otonom akibat denervasi simpatik menimbulkan kulit kering dan terbentuknya fisura kulit dan edema kaki.

b. *Pheripheral vascular diseases*

Pheripheral vaskular diseases terjadi karena adanya arteriosklerosis dan aterosklerosis. Arteriosklerosis terjadi penurunan elastisitas dinding arteri, sedangkan aterosklerosis terjadi akumulasi *plaques* pada dinding arteri berupa kolesterol, lemak, sel otot halus, monosit, fagosit, dan kalsium.

c. Trauma

Penurunan sensasi nyeri pada kaki dapat menyebabkan trauma akibat pemakaian alas kaki. Trauma kecil atau trauma yang berulang seperti pemakaian sepatu yang sempit menyebabkan tekanan ulserasi pada kaki.

d. Infeksi

Infeksi adalah keluhan yang sering terjadi pada pasien diabetes melitus. Infeksi ini biasanya terdiri dari polimikroba. Hiperglikemik merusak respons imunologi sehingga menyebabkan leukosit gagal melawan patogen yang masuk dan juga menurunkan suplai darah yang menyebabkan kurangnya antibiotik secara efektif sampai pada luka.

(Baron *et al.*, 2003).

2.6.3 Pengobatan luka terbuka diabetes (*ulcer/gangrene diabetic*)

Penyembuhan luka adalah mekanisme tindakan awal yang bekerja dengan baik. Luka kronis tidak dapat sembuh secara alami dan memerlukan beberapa tingkat intervensi terapi sebagai perawatan klinis setelah diagnosis kronisitas luka. Ciri kunci penyembuhan luka adalah perbaikan bertahap dari matriks ekstraseluler yang hilang dan membentuk komponen terbesar dari lapisan kulit (Nomiko, 2006). Namun dalam beberapa kasus, gangguan tertentu atau gangguan psikologis mengganggu proses penyembuhan luka. Diabetes melitus adalah salah satu gangguan metabolik yang menghambat langkah normal proses penyembuhan luka.

Berkaitan dengan ulkus kaki yang terinfeksi, keberadaan mikroorganisme tidak cukup untuk menentukan apakah terjadi infeksi. Tanda-tanda seperti peradangan dan purulensi merupakan indikator terbaik untuk mengetahui infeksi aktif. Organisme yang paling umum menyebabkan infeksi adalah *staphylococcus* (Turns, 2013). Perawatan terdiri dari debridemen, penggunaan perban yang tepat, pengelolaan penyakit arteri perifer, dan penggunaan antibiotik yang tepat untuk melawan *pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus*, *streptococcus* dan strain anaerob), dan revaskularisasi arteri.

a. Penggunaan antibiotik

Durasi penggunaan antibiotik bergantung pada tingkat keparahan infeksi dan dapat berkisar antara 1-6 minggu atau lebih. Antibiotik digunakan ketika

terjadi infeksi dan berlanjut sampai infeksi telah sembuh, bukan hanya penyembuhan ulkus. Pilihan antibiotik bergantung pada strain bakteri lokal umum yang diketahui menginfeksi ulkus.

b. Pembalut luka (*wound dressing*)

Ada banyak jenis dressing yang digunakan untuk mengobati ulkus kaki diabetik seperti *filler* absorpsi, *dressing* hidrogel, dan hidrokoloid. Tidak ada bukti yang baik bahwa satu jenis *dressing* lebih baik daripada yang lain untuk penyembuhan ulkus kaki diabetik. Pemilihan *dressing* untuk penyembuhan luka kronis, disarankan untuk mempertimbangkan biaya produk. *Dressing* hidrogel mungkin menunjukkan sedikit keuntungan dibandingkan dengan dressing standar, tetapi kualitas penelitian menjadi perhatian. *Dressing* dan krim yang mengandung perak belum diteliti dengan baik atau penggunaan *dressing* alginat.

c. *Total contact casting*

Total contact casting (TCC) merupakan perancangan gips khusus untuk meringankan berat kaki (*off-loading*) pada pasien ulkus diabetes. Pembungkusan kaki (jari kaki dan kaki bagian bawah) dalam gips digunakan untuk mendistribusikan berat dan tekanan dari kaki atas ke bawah selama gerakan sehari-hari sehingga pasien dapat tetap bergerak. TCC untuk melindungi luka, membiarkan jaringan yang rusak beregenerasi dan menyembuhkannya. TCC juga menjaga pergelangan kaki berputar selama berjalan, yang membantu mencegah kekuatan geser dan puntir yang dapat semakin merusak lukanya.

d. Oksigen hiperbarik

Pada tahun 2015, ulasan Cochrane menyimpulkan bahwa untuk orang dengan ulkus kaki diabetik, terapi oksigen hiperbarik mengurangi risiko amputasi dan dapat meningkatkan penyembuhan hingga 6 minggu.

e. Terapi luka tekanan negatif (*negative pressure wound therapy*)

Perawatan ini menggunakan vakum untuk menghilangkan kelebihan cairan dan limbah seluler yang biasanya memperpanjang fase inflamasi penyembuhan luka (Hamilton *et al.*, 2018).

2.6.4 Mekanisme penyembuhan *ulcer/gangrene diabetic*

Penyembuhan luka atau *wound healing* merupakan proses yang kompleks dan berurutan serta melibatkan beberapa tahap pemulihan seperti pembekuan darah dan pemeliharaan hemostasis, respons imunologis terhadap infeksi patogen dan puing-puing sel, epitelisasi ulang jaringan yang rusak, pembentukan jaringan parut, dan akhirnya renovasi jaringan (Moura *et al.*, 2014). Berbagai proses dalam setiap fase perlu dilakukan secara serempak sehingga jaringan kulit cepat terbentuk kembali dan infeksi dapat dihilangkan sebagai parameter keberhasilan penyembuhan luka. Tetapi pada beberapa penderita diabetes, penyembuhan luka terganggu yang ditandai dengan adanya fase yang berbeda dan tidak terjadi serempak sehingga menyebabkan ulkus kronis yang gagal sembuh. Berikut ini tahap dalam proses penyembuhan luka.

1. Hemostasis

Pada permulaan cedera jaringan kapiler darah memasuki dasar luka untuk mengurangi kehilangan darah terus menerus. Komponen humoral dan seluler seperti fibrinogen dan trombosit akan menghalangi kehilangan darah dan memberikan sinyal pada fase penyembuhan luka awal (Molnar, 2006; Diegelmann dan Evans, 2004). Fibrinogen diaktifkan untuk membentuk serat fibrin yang memerangkap trombosit sebagai respon epitel. Faktor koagulasi akan dilepaskan ketika trombosit bersentuhan dengan komponen matriks ekstraseluler (ECM) untuk pembentukan gumpalan darah dengan jaringan yang terluka (Sheffield dan Smith, 2002). Fase ini berlangsung beberapa menit hingga beberapa jam pada keadaan normal.

2. Inflamasi

Fase inflamasi ditandai dengan invasi neutrofil dan makrofag untuk fagosit pada daerah luka dalam 24 jam pertama setelah cedera (Enoch *et al.*, 2006). Neutrofil fagositosis partikel asing, bakteri, dan komponen sel nekrotik akan dilepaskan disertai dengan *chemotactic factor* yang menarik monosit untuk keluar dari pembuluh darah dan memasuki jaringan yang terluka (Mathieu, 2002). Sel-sel tersebut sangat penting dalam proses penyembuhan luka karena

berkontribusi terhadap angiogenesis, deposisi matriks, dan epitelisasi. Fase inflamasi biasanya berlangsung selama beberapa hari (Byrne dan Owen, 2002).

3. Proliferasi

Fibrosit dan fibroblas merupakan sel yang terlibat sangat dominan di daerah luka selama fase proliferaatif. Proliferasi fibroblas bergantung pada oksigen, sehingga tekanan parsial oksigen perifer diperlukan untuk penyembuhan luka (Bauer *et al.*, 2005). Fibroblas memiliki kemampuan untuk memproduksi kolagen sebagai komponen utama ECM. Pembuluh darah yang baru terbentuk memasuki jaringan kolagen melalui angiogenesis untuk membentuk jaringan granulasi. Sel-fibrosit, fibroblas, dan makrofag bermigrasi lebih jauh ke dalam luka sebagai kontribusi dalam penyembuhan luka. Fibroblas umumnya berdiferensiasi menjadi myofibroblas dan menghasilkan kekuatan tarik dalam luka yang menyebabkan kontraksi dan penutupan luka lebih lanjut. Faktor pertumbuhan seperti TGF- β , PDGF, dan VEGF diproduksi untuk mengaktifkan migrasi dan proliferasi keratinosit, sehingga membentuk lapisan epitel yang menutupi bagian atas luka (Sheffield dan Smith, 2002).

4. Maturasi atau *Remodelling*

Fase *remodelling* berlangsung selama beberapa bulan atau bertahun-tahun. Ikatan silang kolagen ditingkatkan dan ECM diubah menjadi struktur yang lebih matang dengan integritas yang lebih besar selama fase ini. Penutupan luka sempurna terjadi dan kekuatan luka meningkat dari 20% kekuatan Tarik normal pada 3 minggu setelah cedera menjadi 80% dalam 2 tahun karena kontraksi myofibroblas (Natarajan *et al.*, 2000).

Tabel 2.4 Perubahan besar yang diamati pada fase penyembuhan luka ulkus kaki diabetik (Pereira *et al.*, 2017)

Fase wound healing	Perubahan besar yang diamati pada ulkus diabetik
Hemostasis	Keadaan hiperkoagulatif hemostasis dengan penurunan fibrinolisis Gumpalan fibrin lebih padat dan fibronectin seluler yang meningkat
Inflamasi	Sekresi sitokin pro-inflamasi yang berlebihan Polarisasi makrofag M1 yang berlebihan Kerusakan jaringan yang berlebihan Mengurangi aliran darah ke luka Pembatasan kemotaksis leukosit
Proliferasi	Berkurangnya proliferasi dan migrasi keratinosit Penurunan produksi ECM fibroblas Angiogenesis berkurang Mobilisasi sel progenitor endotel terganggu
Maturasi	Remodelling ECM yang rusak oleh fibroblas Peningkatan level inang dan MMP bakteri sehingga meningkatkan degradasi ECM

2.7 Anatomi dan Histologi Kulit

Kulit merupakan organ tubuh terbesar yang dihitung sekitar 15% dari total berat badan orang dewasa. Kulit memiliki banyak fungsi penting bagi tubuh diantaranya yaitu sebagai perlindungan terhadap penyerangan fisik, kimia, dan biologis eksternal; sebagai *thermoregulation* untuk pengaturan suhu tubuh melalui kelenjar keringat dan pembuluh darah untuk pencegahan kelebihan dan kekurangan air dari tubuh; reseptor kulit untuk merasakan sentuhan, tekanan, sakit, dan suhu; sebagai fungsi metabolisme yang terlibat dalam produksi vitamin D dan trigliserida dalam jaringan adiposa subkutan (Kanitakis, 2002). Kulit terdiri dari tiga lapisan yaitu lapisan epidermis, dermis, dan jaringan subkutan.

1. Lapisan epidermis

Epidermis merupakan lapisan terluar yang terdiri dari sel keratinosit dan sel dendritik. Epidermis menampung beberapa sel lain seperti melanosit, sel Langerhans, dan sel Merkel. Ketebalan epidermis bervariasi antara 0,07-0,12 mm, namun dapat mencapai ketebalan 0,8 mm pada telapak tangan dan 1,4 mm

pada telapak kaki Epidermis dibagi lagi menjadi 5 lapisan dari atas ke bawah yaitu :

- a. Stratum korneum (lapisan tanduk) merupakan lapisan terluar dan terdiri atas 15 – 20 lapisan sel. Keratin tersusun tidak teratur sedangkan serabut elastis dan retikulernya lebih sedikit.
- b. Stratum lusidum terdapat langsung di bawah lapisan korneum berupa lapisan tipis yang homogen, terang, jernih, dan batas sel tak terlihat. Lapisan ini tampak lebih jelas di telapak tangan dan kaki yang terdiri dari protein eleidin.
- c. Stratum granulosum (lapisan keratohialin) terdiri dari 2 – 4 lapis sel skuamus yang rapat dan berbentuk polihedral rendah atau belah ketupat pipih, dan sejajar sumbu panjang permukaan kulit. Lapisan ini tampak jelas pada telapak tangan dan kaki.
- d. Stratum spinosum (stratum Malphigi) tersusun beberapa lapis sel di atas stratum basal. Sel lapisan ini berbentuk polihedral dengan inti bulat/lonjong. Pada mikroskop biasanya tampak mempunyai tonjolan sehingga tampak seperti duri yang disebut "*prickle cell / spina*" dan terlihat saling berhubungan dan di dalamnya terdapat tonjolan fibril sebagai "*intercellular Bridge*". Pada lapisan ini terjadi mitosis dan terdapat pigmen melanin.
- e. Stratum basal (stratum germinativum/stratum silindrikum/stratum pigmentosum) tersusun dari selapis sel-sel pigmen basal, berbentuk silindris, batas kurang jelas, inti berbentuk lonjong dan dalam sitoplasmanya terdapat melanin. Pada lapisan basal ini terdapat sel-sel mitosis dan berfungsi reproduktif.

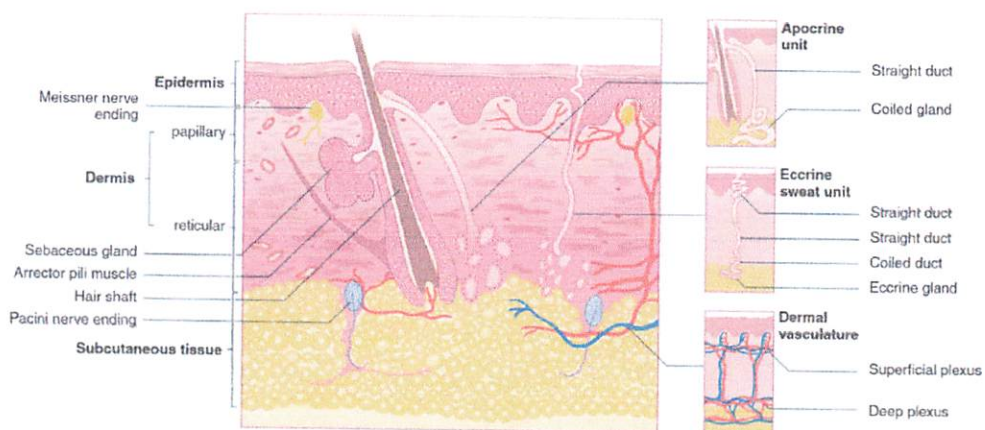
(James *et al.*, 2006).

2. Lapisan dermis

Dermis merupakan sistem terpadu jaringan ikat berserat, berfilamen, dan amorf yang mengakomodasi masuknya stimulus melalui saraf dan jaringan pembuluh darah. Dermis terdiri dari sebagian besar kulit dan memberikan kelenturan, elastisitas, dan kekuatan tarik dari kulit. Dermis melindungi tubuh dari cedera

- mekanis, mengikat air, membantu pengaturan termal, dan termasuk reseptor rangsangan sensorik. Dermis terdiri dari sebagian besar kulit dan memberikan kelenturan, elastisitas, dan kekuatan tariknya. Tebal lapisan ini sekitar 0,6 mm pada kulit tipis dan sampai 3 mm atau lebih pada telapak tangan dan kaki sedangkan ketebalan rata – rata sekitar 2 mm. Lapisan ini terdiri atas 2 lapisan:
- Stratum papillare (stratum Spongiosum) merupakan bagian yang menonjol ke epidermis, berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah. Lapisan ini terdiri dari fibroblas dan jenis sel jaringan ikat lain yang tersebar luas antara berkas-berkas serat kolagen halus terutama kolagen tipe III.
 - Stratum retikulare (stratum kompakum) merupakan bagian yang menonjol ke arah subkutan dan lebih tebal dibanding stratum papillare. Lapisan ini terdiri dari serabut-serabut penunjang seperti serabut kolagen, elastin, dan retikulin. Dasar (matriks) lapisan ini berupa cairan kental asam hialuronat dan kondroitin sulfat, dan terdapat fibroblas. Serabut kolagen dibentuk oleh fibroblas, membentuk ikatan (bundel) yang mengandung hidroksi prolin dan hidroksisilin. Serabut retikulin mirip dengan kolagen muda. Serabut elastin biasanya bergelombang, berbentuk amorf dan mudah mengembang serta lebih elastis.

(Kofarsick, 2011).



Gambar 2.8 Anatomi *Cross-section* kulit (James *et al.*, 2006)

Dermis berinteraksi dengan epidermis dalam mempertahankan sifat-sifat kedua jaringan selama perkembangan morfogenesis dari *dermal-epidermal*

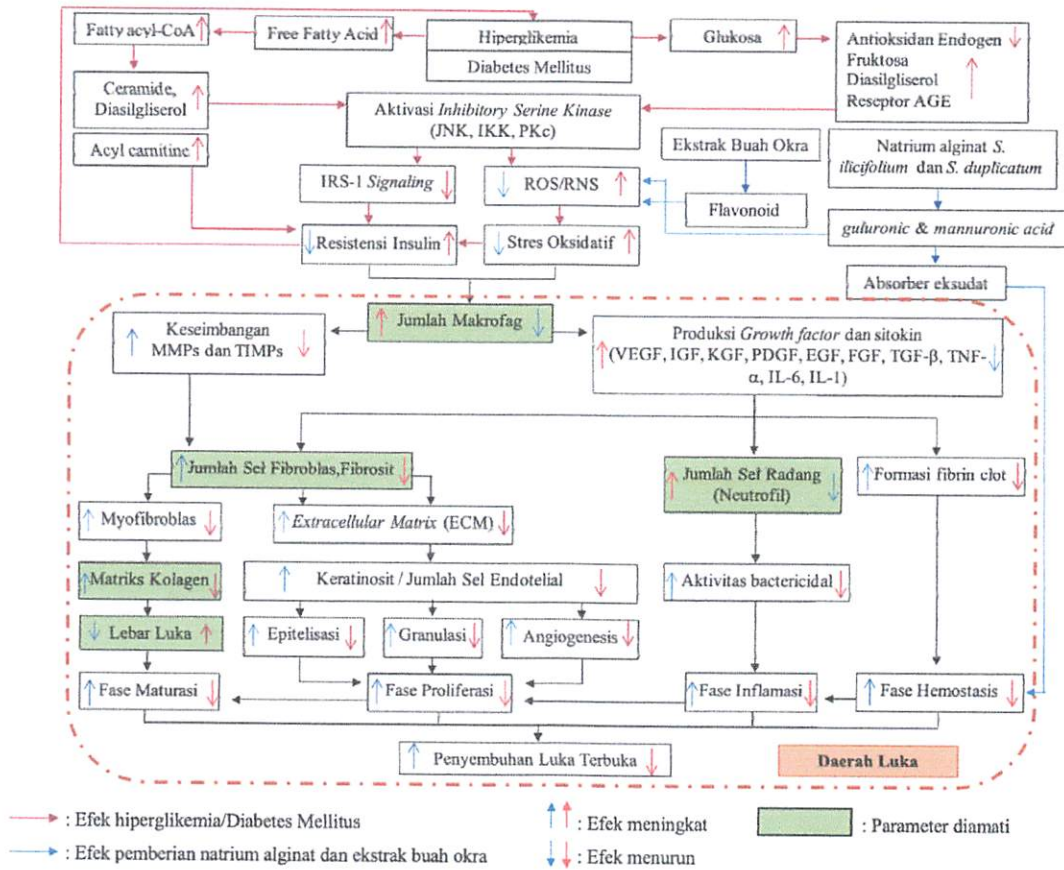
junction serta berkolaborasi dalam memperbaiki dan memperbarui kulit ketika penyembuhan luka. *Interface* antara epidermis dan dermis dibentuk oleh zona membran basal berpori yang memungkinkan pertukaran sel dan cairan serta menyatukan dua lapisan (James *et al.*, 2006). Komponen matriks seperti kolagen dan jaringan ikat elastis bervariasi dalam lapisan dermis bergantung pada kedalaman dan *remodelling* pada kulit normal dalam proses patologis, dan sebagai respons terhadap rangsangan eksternal (Chu, 2008).

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS PENELITIAN



BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Kondisi hiperglikemia (kadar glukosa darah tinggi) dapat menyebabkan kadar *free fatty acid* tinggi. Glukosa dalam darah mengalami proses autooksidasi melalui beberapa jalur (*pathway*) yaitu *advanced glycation end-product pathway* (AGEs), *diacylglycerol formation* and *PKc pathway*, *hexosamine pathway*, dan *polyol pathway*. Proses tersebut menghasilkan fruktosa, diasilgliserol, dan reseptor AGE yang tinggi, sehingga menyebabkan antioksidan endogen menjadi menurun. Kondisi tersebut menghambat aktivasi *Inhibitory Serine Kinase* yang menyebabkan kadar ROS/RNS tinggi hingga memicu terjadinya kenaikan stress oksidatif. *Free fatty acid* dikonversi menjadi *fatty acyl-CoA* hingga menghasilkan senyawa *acyl*

carnitine, ceramide, dan diasilgliserol yang menghambat aktivasi Inhibitory Serine Kinase. Hal tersebut dapat menyebabkan respon sinyal IRS-1 terhadap insulin menurun dan mengakibatkan resistensi insulin. Stress oksidatif yang terjadi berkontribusi terhadap peningkatan resistensi insulin dan bisa memicu terjadinya hiperglikemia lebih lanjut.

Resistensi insulin dan stress oksidatif yang terjadi menimbulkan produksi makrofag berlebih sehingga dapat meningkatkan laju sekresi sitokin dan *growth factor* seperti PDGF (*platelet-derived growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor- β*), TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), FGF (*fibroblast growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), dan berbagai macam interleukin (IL) menjadi berlebih. Hal tersebut dapat menyebabkan penurunan inisiasi vasokonstriksi dan formasi fibrin clot pada tahap awal penyembuhan luka terbuka sehingga fase hemostasis menurun. Selain itu, jumlah sel radang (neutrofil) menjadi berlebih sehingga aktivitas dalam fagositosis partikel, bakteri dan sel nekrosis tidak efisien yang berakibat pada kerusakan jaringan berlebih yang mengindikasikan penurunan fase inflamasi. Proses fagositosis bakteri menyebabkan timbulnya eksudat atau cairan akibat infeksi bakteri. Eksudat yang berlebih menyebabkan kelembaban daerah luka menjadi menurun yang berdampak pada penurunan fase inflamasi. Kadar sitokin dan *growth factor* yang berlebih dapat menurunkan produksi sel endotelial sehingga menyebabkan penurunan proses angiogenesis. Penurunan jumlah fibroblas juga disebabkan peningkatan kadar sitokin dan *growth factor* sehingga mengakibatkan sintesis dan deposisi *extracellular matrix* (ECM) menurun sehingga proses granulasi menjadi menurun. Jumlah fibroblas yang menurun mengakibatkan berkurangnya sekresi keratinosit dan menurunkan proses epitelisasi. Penurunan proses epitelisasi, granulasi, dan angiogenesis dapat menyebabkan fase proliferasi menurun. Kadar fibroblas yang rendah juga menurunkan ekspresi myofibroblas sehingga sintesis matriks kolagen dan jarak epitelisasi juga menurun yang mengakibatkan penurunan fase maturasi/*remodeling*.

Matrix metalloproteinase (MMPs) merupakan sebuah protease yang berperan penting dalam pengaturan degradasi matrik ekstraseluler (ECM) dan deposisi untuk

reepitelisasi luka. Sedangkan *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs) merupakan regulator utama MMP sehingga berperan sebagai inhibitor spesifik. Makrofag yang berlebih dapat menyebabkan ketidakseimbangan protein matriks dan inhibitorynya sehingga terjadi penurunan jumlah fibrosit/fibroblas. Hal tersebut menyebabkan penurunan sintesis matriks kolagen sehingga lebar luka menjadi meningkat dan fase maturasi/*remodeling* menjadi menurun. Fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan maturasi yang menurun mengakibatkan penurunan proses reepitelisasi yang ditandai melalui lebar luka yang meningkat. Hal tersebut mengindikasikan penundaan penyembuhan luka terbuka (*open wound healing*).

Natrium alginat yang mengandung *guluronic acid* (G) dan *mannuronic acid* (M) dari *S. ilicifolium* atau *S. duplicatum* dapat digunakan sebagai agen hemostatik karena berperan sebagai absorber eksudat atau cairan luka sehingga dapat menjaga kelembaban daerah luka yang meningkatkan fase hemostasis dan inflamasi. Selain itu, kandungan residu guluronat yang tinggi dalam natrium alginat memiliki peningkatan potensi antioksidan. Ekstrak buah okra memiliki kandungan flavonoid yang memiliki potensi antioksidan. Pemberian ekstrak buah okra dan natrium alginat yang memiliki potensi antioksidan sebagai *scavenger* dari ROS/RNS dapat menurunkan produksi makrofag yang berlebih sehingga terjadi penurunan produksi sitokin dan *growth factor* yang berlebih, serta peningkatan keseimbangan MMPs dan TIMPs. Hal tersebut dapat meningkatkan efisiensi formasi fibrin clot, jumlah sel radang (neutrofil), jumlah fibrosit/fibroblas, matriks kolagen, dan penurunan lebar luka. Kondisi tersebut mempercepat proses penyembuhan luka terbuka (*open wound healing*) mencit diabetik melalui fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan maturase.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian Natrium alginat dengan ekstrak buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) akan berpengaruh terhadap persentase jumlah neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, jaringan ikat kolagen, serta lebar luka pada proses penyembuhan luka terbuka mencit diabetik yang diinduksi STZ.

- H₀ : Pemberian natrium alginat dan ekstrak buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) dengan dosis masing-masing 100mg/kg BB dan 50 mg/kg BB tidak berpengaruh terhadap persentase jumlah neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, jaringan ikat kolagen, serta lebar luka.
- H₁ : Pemberian natrium alginat dan ekstrak buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) dengan dosis masing-masing 100mg/kg BB dan 50 mg/kg BB berpengaruh terhadap persentase jumlah neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, jaringan ikat kolagen, serta lebar luka.

BAB IV
METODE PENELITIAN

BAB IV

METODE PENELITIAN



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Histologi Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Identifikasi natrium alginat dilakukan di University of York (York, England). Waktu penelitian dilakukan selama 5 bulan.

4.2 Bahan dan Peralatan Penelitian

4.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu rumput laut coklat *S. ilicifolium* dari perairan pulau Kei Maluku dan *S. duplicatum* dari perairan Madura, identifikasi spesies dilakukan di Pusat Penelitian Oseanografi LIPI Jakarta, buah okra (*A. esculentus*) dari pasar Sopenyono Surabaya dan identifikasi spesies di Laboratorium Biosistem Program Studi Biologi Universitas Airlangga, larutan KOH 0,1% (merck), larutan HCl 1% (merck), larutan HCl 10% (merck), larutan Na₂CO₃ 2% (merck), larutan NaOCl 4% (merck), isopropil alkohol (merck), etanol 96%, vaselin, akuades, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), mencit putih jantan, makanan standar mencit, *streptozotocin*, bufer sitrat 0,1 M, spray *ethylchloride*, alkohol, xylol, parafin, gliserin, formalin 10 %, pewarna HE (hematoxylin dan eosin), larutan standar kuersetin, AlCl₃ 10%, kalium asetat 5%.

4.2.2 Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu kaca arloji, cawan penguap, botol semprot, corong gelas, kertas perkamen, kotak aseptis, timbangan digital, lemari pendingin, *waterbath*, *rotary evaporator*, *vacuum pump*, corong Büchner, pipet tetes, batang pengaduk, pinset, gunting bedah, mortar dan pestle, *Beaker glass*, labu ukur, gelas ukur, botol kaca, pipet mohr, *ball* pipet, kertas saring, kertas pH, termometer, *hot plate*, *magnetic stirrer*, kawat kasa, glukometer dan *strip test*, mikrotom, mikroskop listrik, botol maserasi, homogenizer, wadah

jaringan (kaset), spektrofotometer UV-Vis, *Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering* (SEC-MALLS), *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), *ELISA Reader*.

4.3 Cara Kerja

4.3.1 Ekstraksi asam alginat

Metode ekstraksi alginat dari rumput laut coklat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* yang digunakan merujuk pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Jakarta dengan modifikasi dari beberapa metode yang dilakukan LIPI di laboratorium Produk Alam Laut (Rasyid, 2003). Sampel sebanyak 200 g rumput laut coklat dicuci dengan air tawar, kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Sampel digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk rumput laut coklat ditambahkan larutan KOH 0,1% perbandingan (1:75 b/v) dan didiamkan selama 1 jam untuk menghilangkan kandungan lignin, kemudian dilakukan penyaringan. Residu yang diperoleh ditambahkan dengan larutan HCl 1% perbandingan (1:30 b/v) dan didiamkan selama 1 jam untuk proses demineralisasi. Kemudian dilakukan penyaringan kembali dan residu yang diperoleh dicuci dengan akuades hingga pH netral.

Residu rumput laut coklat ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 2% perbandingan (1:30 b/v) pada suhu $60^\circ\text{C} - 70^\circ\text{C}$ selama 2 jam dengan pengadukan konstan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian dilakukan penyaringan. Ekstrak hasil penyaringan ditambahkan dengan larutan HCl 10% sedikit demi sedikit hingga pH 2,8-3,2 dan membentuk gel. Gel yang diperoleh ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 2% sedikit demi sedikit hingga pH 7 dan terbentuk gel filtrat kembali. Gel filtrat yang terbentuk dilakukan proses *bleaching* menggunakan larutan NaOCl 4% perbandingan (1:2 v/v) selama 15 jam. Filtrat yang terbentuk kemudian dimurnikan dalam isopropil alkohol sedikit demi sedikit disertai pengadukan dan dibiarkan selama 30 menit hingga terbentuk serat Natrium alginat. Serat asam alginat yang diperoleh kemudian dilakukan pengeringan pada suhu ruang dan setelah kering dihaluskan dengan mortar hingga terbentuk serbuk asam

alginat. Persentase hasil asam alginat ditentukan dengan membandingkan berat kering sebelum dan sesudah ekstraksi (%).

4.3.2 Identifikasi asam alginat

a. *Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering (SEC-MALLS)*

Size exclusion chromatography (SEC) digabungkan dengan multi-angle laser light scattering (MALLS) digunakan untuk penentuan berat molekul alginat. Penggunaan SEC-MALLS dengan sel K5 (50 μL) dan dua detektor: laser He-Ne ($\lambda = 690 \text{ nm}$) serta dengan differential refractive index (DRI). Sistem ini menggunakan kolom [OHPAK SB-G Guard Column, OHPAK SB806, 804 dan 803 HQ Columns (Shodex)] yang dielusi dengan NaNO_3 0,1 M pada 0,7 mL/menit. Pelarut disaring melalui filter 0,1 μm dan disaring melalui kolom *upstream* 0,45 μm . Sampel diinjeksikan melalui full loop 100 μL . Data yang dikumpulkan dianalisis menggunakan paket perangkat lunak Astra 4,50 (Fenoradosoa *et al.*, 2010). Berat molekul yang diperoleh berupa *weight-average molecular weight* (M_w) dan *number-average molecular weight* (M_n) dan ditentukan nilai *Polydispersity index* dari perbandingan M_w dan M_n .

b. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)*

Spektra IR direkam dengan alat Shimadzu IRTracer-100 FT-IR spektrofotometer untuk penentuan gugus fungsi alginat. Sampel natrium alginat dikeringkan selama 8 jam pada suhu 56°C di bawah vakum. Sampel dilarutkan dalam KBR (10% w/w) sehingga terbentuk menjadi pelet. Sampel dalam pelet KBR direkam dalam total 16 scan dengan resolusi 4 cm^{-1} pada kisaran bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} (Venkatesan *et al.*, 2017).

c. *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*

Spektra ^1H NMR direkam dengan alat Bruker Avance DPX 300 spektrometer 300 MHz. Spektra diperoleh menggunakan waktu akuisisi 1,36 detik, *pulse width* 7 μs , waktu relaksasi 1 detik, dan 256 scan. Konsentrasi sampel yang digunakan 10 mg/mL (1,0% b/v) dalam deuterium oksida (D_2O) sebagai pelarut (TSP, Aldrich, Milwaukee, WI). Sampel yang dilarutkan dalam D_2O dilakukan *freeze dried* untuk menggantikan proton yang ditukar dengan deuterium. (Fenoradosoa *et al.*, 2010).

Secara kuantitatif, fraksi mol G dan GG dikaitkan dengan sinyal area/integrasi dari masing-masing puncak. Integrasi yang diperoleh ditunjukkan dalam I_A (area puncak guluronat G_1), I_B (area puncak manuronat M_1), dan I_C (area puncak guluronat G_5). Fraksi mol setiap komposisi F_M dan F_G digunakan untuk menentukan rasio M/G alginat dengan menggunakan persamaan yang mengacu pada penelitian Grasdalen *et al.* (1979):

$$\begin{array}{lll}
 F_G & = I_A / (I_B + I_C) & F_M + F_G = 1 \\
 F_{GG} & = I_C / (I_B + I_C) & M/G = \frac{F_M}{F_G} \\
 & & F_{MG} = F_{GM} \\
 & & F_{GG} + F_{GM} = F_G \\
 & & F_{MM} + F_{MG} = F_M \\
 & & \eta = \frac{F_{MG}}{F_G \times F_M}
 \end{array}$$

Dimana F_G merupakan fraksi guluronat, F_M merupakan fraksi manuronat, F_{GG} merupakan fraksi dimer guluronat, F_{MG} atau F_{GM} merupakan fraksi dimer manuronat dan guluronat, dan η merupakan nilai viskositas alginat.

4.3.3 Ekstraksi buah okra (*Abelmoschus Esculentus* L.)

Seluruh bagian buah okra digunakan sebagai bahan ekstrak. Proses ekstraksi buah okra dilakukan menggunakan metode maserasi (Ahiakpa *et al.*, 2014). Buah okra hijau segar seberat 4 kg dipotong-potong hingga membentuk bagian yang lebih kecil, kemudian diangin-anginkan hingga kering tanpa adanya sinar matahari selama 6 hari. Potongan buah okra yang telah kering digiling hingga halus, kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca dan ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 (b/v) untuk proses maserasi. Proses maserasi diulang hingga pelarut etanol jernih. Ekstrak etanol buah okra dilakukan filtrasi untuk pemisahan dengan residu menggunakan *filter vacuum*. Pelarut etanol diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu sekitar 50°C, hingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) buah okra. Ekstrak kasar buah okra kemudian dikering bekukan dengan menggunakan *freeze drying*.

4.3.4 Penentuan total kandungan flavonoid ekstrak buah okra

Penentuan total kandungan flavonoid dari buah okra dilakukan dengan metode aluminium klorida kolorimetri dengan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Ahiakpa *et al.*, 2013). Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi standar dan absorbansi ditentukan pada

panjang gelombang 415 nm. 5 mg standar kuersetin dilarutkan dalam 5 mL etanol sebagai larutan stok. Larutan stok dibuat variasi konsentrasi sebesar 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Ekstrak kasar ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol. Setiap larutan standar kuersetin dan larutan sampel diambil 1 mL untuk ditambahkan dengan AlCl_3 10% 1 mL serta kalium asetat 5% 8 mL, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 415 nm sehingga diperoleh nilai absorbansi. Kurva standar diplotkan antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = bx + a$. Absorbansi ekstrak yang telah diperoleh dimasukkan dalam persamaan regresi linear. Total kandungan flavonoid dinyatakan sebagai mg *equivalent quercetin* (QE)/ g ekstrak buah okra dengan formula berikut ini.

$$C = \frac{C_1 \times V \times FP}{m}$$

Dimana C merupakan total flavonoid (mg QE/g ekstrak), C_1 merupakan konsentrasi QE yang diperoleh dari kurva standar (mg/L), V merupakan volume larutan (L), FP merupakan faktor pengenceran, dan massa ekstrak okra yang digunakan (g).

4.3.5 Uji Antioksidan alginat, ekstrak buah okra, dan kombinasi alginat-buah okra

Uji DPPH dilakukan pada serbuk alginate, ekstrak kasar buah okra, dan kombinasi alginat-buah okra menggunakan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) untuk mengetahui aktivitas antioksidan IC_{50} dari ekstrak. Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ dan larutan stok ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dalam metanol. larutan stok ekstrak dilakukan pengenceran dengan beberapa konsentrasi (200; 150; 125; 100; 75; 50; 35; 25; 15; 12,5; 10; 6,5 $\mu\text{g/mL}$). Uji DPPH dilakukan dengan menggunakan 96 *well plate* dengan masing-masing *well* berisi 100 μL larutan sampel dan 50 μL larutan DPPH. Setelah diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit, absorbansi ditentukan dengan ELISA reader pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas DPPH *scavenging* ditentukan menggunakan rumus berikut ini

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} ditentukan dari *plotting* grafik antara DPPH *scavenging* (%) dengan

konsentrasi larutan sampel hingga diketahui persamaan $y=ax+b$ (Raisi-Nafchi *et al.*, 2016).

4.3.6 Persiapan dan induksi mencit diabetik

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa strain BALB/c sebanyak 36 ekor, berumur 3-4 bulan, dan berat badan rata-rata 20-35 gram. Mencit diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Mencit ditempatkan pada kandang plastik yang tertutup dengan kawat kasa dan dikondisikan pada ruang atau kandang hewan yang berventilasi dengan sistem penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Mencit dilakukan aklimasi selama 2 minggu dan kemudian diinduksi dengan *streptozotocin* menjadi mencit diabetik. Proses induksi mencit diabetik berdasarkan penelitian Novelli *et al.* (2010). Mencit diberikan perlakuan lard (minyak babi) selama 3 minggu dengan dosis 0,3 mL secara per oral yang bertujuan agar mencit berada pada kondisi *high fat diet* untuk diabetes melitus tipe II. Mencit diukur kadar glukosa darah dan ditimbang berat badan sebelum dan sesudah lard. Mencit diinduksi dengan *streptozotocin* (STZ) menggunakan metode *multiple low dose* yang bertujuan agar dapat menginduksi diabetes melitus tipe II. *Streptozotocin* dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4,5 dengan dosis 30 mg/kg BB dan diinjeksikan pada mencit selama 8 hari secara intraperitoneal (i.p). Volume larutan STZ yang diinjeksikan pada masing-masing mencit sebanyak 0,15 mL. Kadar glukosa darah mencit diukur kembali pada hari ke 3, 7 dan 14 setelah dilakukan induksi.

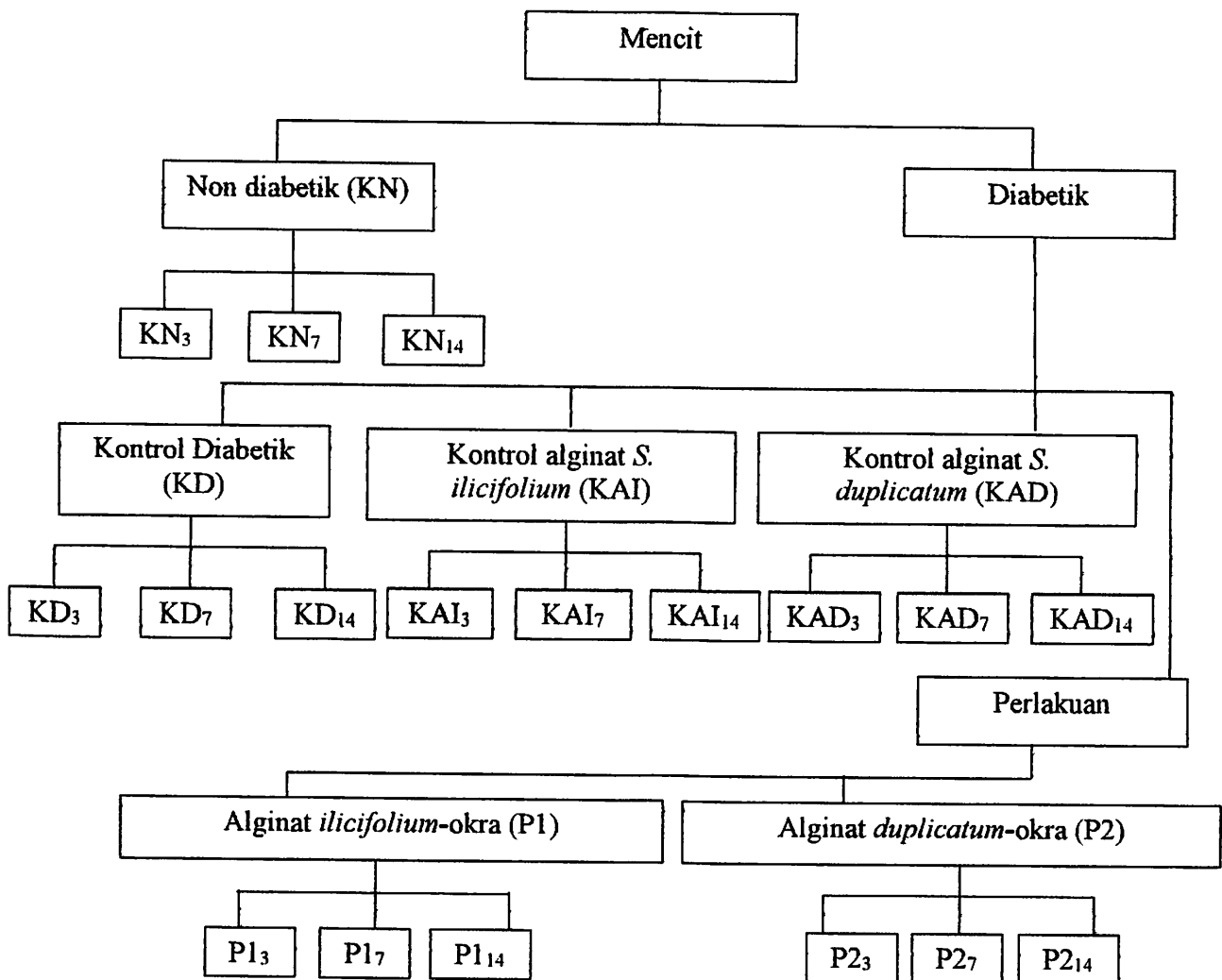
4.3.7 Pengukuran kadar glukosa darah

Kadar glukosa darah puasa dan kadar glukosa darah 2 jam PP (*postprandial*) diukur menggunakan alat glukometer pada hari ke 1 sebelum dan sesudah proses induksi STZ, serta pada hari ke 3, 7, 14 setelah perlakuan berdasarkan penelitian Sandu *et al.* (2005). Pengukuran dilakukan pada sampel darah yang diambil dari pembuluh vena di daerah ekor mencit yang telah dipuasakan. Kadar glukosa darah puasa dinyatakan dalam mg/dL. Penentuan kadar glukosa darah dengan glukometer menggunakan *test strips*. Darah mencit ditempatkan pada *test strips* sekali pakai untuk memonitor glukosa dalam darah. Pada umumnya prinsip kerja glukometer untuk menentukan konsentrasi glukosa dalam larutan yang didasarkan pada

teknologi elektrokimia (metode amperometri atau kolorimetri) untuk melakukan pengukuran (Tonyushkina dan Nichols, 2009).

4.3.8 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba

Hewan uji dikelompokkan menjadi 18 kelompok untuk pengamatan 3 hari, 7 hari, dan 14 hari berdasarkan skema pada Gambar 4.1. Setiap kelompok terdiri dari 2 ekor mencit berdasarkan persamaan Federer: $(t-1)(r-1) \geq 15$, di mana t adalah banyaknya kelompok hewan coba dan r adalah jumlah replikasi sehingga diperoleh jumlah replikasi sebanyak 2 (Montgomery, 2001).



Gambar 4.1 Skema pembagian kelompok hewan uji dalam penelitian

Mencit non diabetik (normal) dibagi dalam 3 kelompok digunakan sebagai kelompok kontrol (KN₃; KN₇; KN₁₄), sedangkan mencit diabetik hasil induksi STZ

dibagi menjadi 3 kelompok kontrol diabetik (KD₃; KD₇; KD₁₄) dan 3 kelompok kontrol yang diberikan alginat (KA₃; KA₇; KA₁₄) dengan dosis masing-masing 100 mg/kg BB. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan 1 (P1₃; P1₇; P1₁₄) yang diberikan vaselin-alginat *ilicifolium*-okra dan 3 kelompok perlakuan 2 (P2₃; P2₇; P2₁₄) yang diberikan vaselin-alginat *duplicatum*-okra dengan masing-masing dosis tunggal 50 mg/kg BB. Dosis yang digunakan mengacu pada hasil uji antioksidan (IC₅₀). Perlakuan dilakukan pada hari ke-3, 7, dan 14. Perlakuan hewan uji dituliskan dalam Tabel 4.1. Angka di belakang kode kelompok pada Gambar 4.1 dan Tabel 4.1 menunjukkan hari perlakuan yaitu hari ke 3, 7, dan 14.

Tabel 4.1 Pembagian kelompok dan perlakuan pada hewan coba

Kelompok hewan coba	STZ	Lard	Vaselin	Alginat <i>S. ilicifolium</i> dosis 100 mg/kgBB	Alginat <i>S. duplicatum</i> dosis 100 mg/kgBB	Ekstrak Okra dosis 50 mg/kgBB
KN ₃ , KN ₇ , KN ₁₄	-	-	+	-	-	-
KD ₃ , KD ₇ , KD ₁₄	+	+	+	-	-	-
KAI ₃ , KAI ₇ , KAI ₁₄	+	+	+	+	-	-
KAD ₃ , KAD ₇ , KAD ₁₄	+	+	+	-	+	-
P1 ₃ , P1 ₇ , P1 ₁₄	+	+	+	+	-	+
P2 ₃ , P2 ₇ , P2 ₁₄	+	+	+	-	+	+

Keterangan :

(+) menunjukkan adanya perlakuan

(-) menunjukkan tidak adanya perlakuan

Kelompok perlakuan :

KN₃ : Kelompok kontrol non diabetik hanya diberikan vaselin

KN₇ : Kelompok kontrol non diabetik hanya diberikan vaselin

KN₁₄ : Kelompok kontrol non diabetik hanya diberikan vaselin

KD₃ : Kelompok kontrol diabetik hanya diberikan vaselin

KD₇ : Kelompok kontrol diabetik hanya diberikan vaselin

KD₁₄ : Kelompok kontrol diabetik hanya diberikan vaselin

KAI₃ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*

KAI₇ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*

KAI₁₄ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*

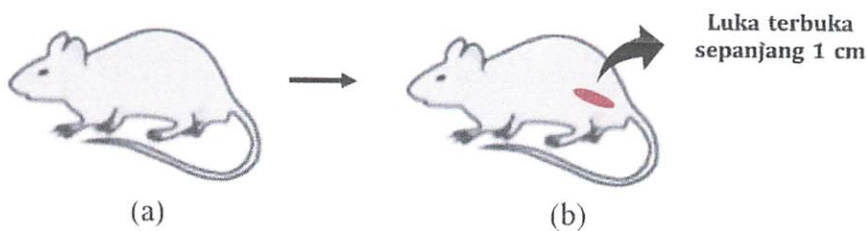
KAD₃ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *duplicatum*

KAD₇ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *duplicatum*

- KAD₁₄ : Kelompok kontrol diabetik pemberian vaselin-alginat *duplicatum*
 P1₃ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*-okra
 P1₇ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*-okra
 P1₁₄ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *ilicifolium*-okra
 P2₃ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *duplicatum*-okra
 P2₇ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *duplicatum*-okra
 P2₁₄ : Kelompok perlakuan pemberian vaselin-alginat *duplicatum*-okra

4.3.9 Pembuatan luka pada mencit putih jantan

Setiap mencit dicukur rambutnya pada bagian *glutea* (pantat) yang akan diberikan luka dan kemudian disemprotkan dengan *Ethylchloride* sebagai penghilang rasa sakit pada mencit sebelum dilukai. Pada bagian yang telah disemprotkan *Ethylchloride* dibuat luka terbuka sepanjang 1 cm dengan cara pengirisan kulit dengan menggunakan pinset tidak steril sehingga diharapkan akan membentuk luka terbuka. Penelitian ini akan dilakukan uji laik etik di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Berikut ini ilustrasi pembuatan luka pada mencit putih jantan.



Gambar 4.2 Ilustrasi pembuatan luka terbuka pada mencit (a) mencit belum dilukai; (b) mencit telah diberikan luka sepanjang 1 cm

4.3.10 Pembuatan sediaan salep untuk perlakuan topikal

Sediaan salep menggunakan medium vaselin putih. Serbuk natrium alginat dan/atau ekstrak kasar buah okra ditambahkan dalam aditif vaselin, kemudian dicampurkan melalui proses homogenisasi menggunakan *homogenizer* hingga tercampur merata membentuk sediaan salep vaselin-alginat *ilicifolium*, vaselin-alginat *duplicatum*, vaselin-alginat *ilicifolium*-okra, dan vaselin-alginat *duplicatum*-okra (Suyanto *et al.*, 2017). Dosis sediaan salep yang digunakan sebesar 100 mg/kg BB untuk alginat dan 50 mg/kg BB untuk ekstrak buah okra. Sediaan salep diaplikasikan secara topikal pada luka terbuka di bagian luka mencit

setiap hari sebanyak 150 mg. Mencit diamati perkembangannya pada hari ke 3, 7, dan 14.

4.3.11 Pembuatan preparat histopatologi jaringan kulit

Preparat histopatologi dibuat dari jaringan kulit pada lapisan epidermis kulit mencit diabetik menggunakan pewarnaan *hematoxylin eosin*. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Tahap pembuatan preparat histopatologi diantaranya yaitu:

1. Tahap pembedahan untuk mengambil organ kulit pada bagian *glutea* dengan cara pemotongan lapisan epidermis dengan ketebalan ± 3 mm dan luas sekitar 1 cm^2
2. Tahap fiksasi dengan cara perendaman organ kulit menggunakan larutan formalin 10% selama 24 jam. Pada tahap ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kerusakan pada jaringan
3. Tahap pencucian (*washing*) dan dehidrasi, yang diawali dengan cara memotong secara melintang organ kulit yang telah difiksasi menjadi 2 bagian yang sama, kemudian sampel tersebut dicuci dengan air mengalir selama 2 jam dan dimasukkan dalam wadah jaringan. Sampel dilakukan dehidrasi dengan cara perendaman alkohol dari konsentrasi paling rendah hingga paling tinggi (70%, 80%, 95%) masing-masing selama 90 menit dan alkohol absolut sebanyak 3 kali selama 90 menit untuk menghilangkan kadar air.
4. Tahap infiltrasi dan penanaman (*embedding*) diawali dengan *clearing* sampel dengan xylol I selama 1 jam, xylol II selama 75 menit, dan xylol III selama 90 menit. Kemudian sampel dimasukkan ke parafin cair I selama 90 menit, kemudian dimasukkan kembali ke dalam parafin cair II selama 2 jam pada suhu $56-60^\circ\text{C}$. Sampel jaringan dimasukkan ke dalam cetakan yang berisi parafin cair hingga parafin mengeras.
5. Tahap pemotongan (*sectioning*) dan inkubasi, pada tahap ini diawali dengan pembukaan cetakan parafin dan pengambilan *block* parafin yang berisi sampel. Hasil *block* dimasukkan dalam plastic berisi air dan diletakkan dalam *freezer* selama 15 menit. *Block* parafin dipotong dengan ketebalan

irisian $\pm 2-5 \mu\text{m}$. Hasil dari pemotongan dimasukkan ke dalam *water bath* suhu 50°C hingga pita hasil irisan mengembang. Inkubasi jaringan dilakukan di atas *hot plate* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Inkubasi berfungsi menguapkan air yang terbawa hasil potongan hingga jaringan menempal kuat.

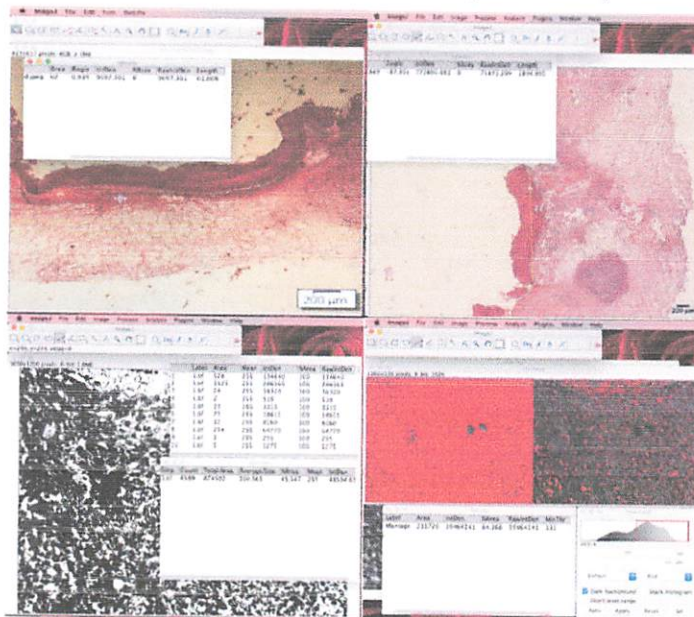
6. Tahap pewarnaan (*staining*), pada tahap ini spesimen dilakukan proses deparafinisasi dengan xylol selama 3 kali dengan masing-masing waktu 5 menit. Spesimen direhidrasi menggunakan alkohol (100%, 95%, 90%, 80% dan 70%) selama 2 menit pada setiap konsentrasi. Kemudian dicelupkan air mengalir selama 3 menit dan diwarnai dengan Meyer *hematoxylin* selama 7 menit. Spesimen yang sudah diwarnai diberikan air mengalir selama 3 menit dan dilakukan *counterstain* dengan *eosin* selama 7 kali, kemudian dicelupkan dalam air selama 3 kali. Spesimen dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian spesimen dilakukan *clearing* menggunakan xylol I dan II selama 2 menit.
7. Tahap penutupan (*mounting*) dilakukan dengan cara penempelan *cover glass* dengan *mounting media*.

4.3.12 Teknik pengambilan data perbaikan jaringan kulit

Preparat histopatologi jaringan kulit diamati di bawah mikroskop cahaya dan perhitungan persentase jumlah sel radang (neutrofil), makrofag, fibroblas, fibrosit, lebar luka, dan densitas kolagen ditentukan dengan aplikasi ImageJ. Pengamatan dilakukan dalam 3 lapang pandang (LP1, LP2, LP3), dengan perbesaran 400 kali. Ilustrasi pengamatan untuk penentuan jumlah sel, lebar luka, dan densitas kolagen di bawah mikroskop cahaya dengan aplikasi imageJ ditunjukkan pada Gambar 4.3.

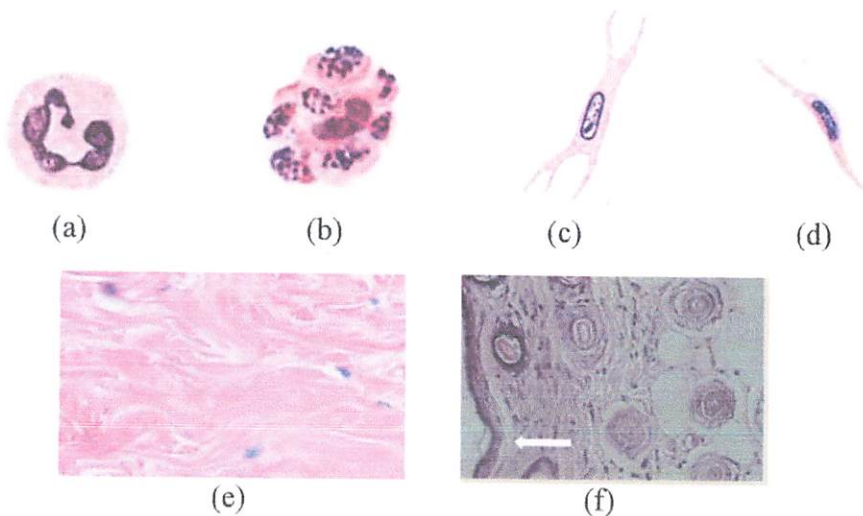
1. Gambar histopatologi dilakukan kalibrasi ukuran pixel gambar dengan cara memilih *straight line selection tool* → gambar garis lurus sepanjang acuan untuk kalibrasi → klik *analyze* → *Set scale* untuk mengatur skala → *known distance* “200” untuk lebar luka dan “20” untuk densitas kolagen dan jumlah sel → *unit of measurement* “ μm ”.

2. Untuk menghitung lebar luka klik *straight line selection tool* → gambar garis lurus sepanjang luka terbuka → *analyze* → *measure* → muncul hasil panjang atau lebar luka.
3. Untuk menentukan persentase jumlah sel dilakukan dengan cara *edit* → *options* → *conversions to "scale when converting"*. Klik *image* → *type* → 16-bit untuk mengubah ke *greyscale*. Klik *image* → *adjust* → *threshold* untuk mengetahui semua struktur yang akan dihitung. Klik *analyze* → *analyze particle* → Memasukkan Size yang telah dikalibrasi dengan cara *image* → *properties*. Untuk mendapatkan informasi gambar selain area dilakukan dengan klik *analyze* → *set measurement* → memilih parameter yang diinginkan.
4. Untuk menentukan densitas kolagen dengan cara klik *image* → *type* → *RGB stack* → *image* → *stacks* → *make montage* → klik gambar hasil montage → *image* → *adjust* → *threshold* → gradiensi warna diatur sesuai dengan keberadaan serabut kolagen pada lapang pandang → *analyze* → *set measurement*, centang kolom *area*, *area fraction*, *limit to threshold*, dan *display tabel* → *analyze* → *measure* → hasil akan ditampilkan pada tabel berupa persentase keberadaan serabut kolagen dalam persen (%).



Gambar 4.3 Ilustrasi penggunaan aplikasi imageJ (a) kalibrasi; (b) lebar luka; (c) persentase jumlah sel; (d) densitas kolagen (Honold, 2015).

Neutrofil pada preparat histologi berwarna merah kebiruan dengan bentuk bulat seperti bercak darah dimana terdapat tiga lobus nukleus. Makrofag berbentuk bulat tidak teratur berwarna merah kebiruan. Fibroblas memiliki sitoplasma bercabang mengelilingi nukleus berbentuk lonjong dengan satu atau dua nukleus. Fibrosit memiliki bentuk lebih kecil dibandingkan fibroblas dan tidak bercabang. Serat kolagen merupakan salah satu jenis jaringan ikat yang memiliki warna putih dengan struktur bercabang-cabang. Sel epitel berada pada permukaan jaringan kulit dengan bentuk pipih berlapis. Jika terjadi luka pada kulit maka sel epitel akan membelah, sedangkan jika luka terbuka mulai sembuh maka jarak epitel yang membelah akan semakin kecil. Bentuk dari setiap sel ditunjukkan pada Gambar 4.4.

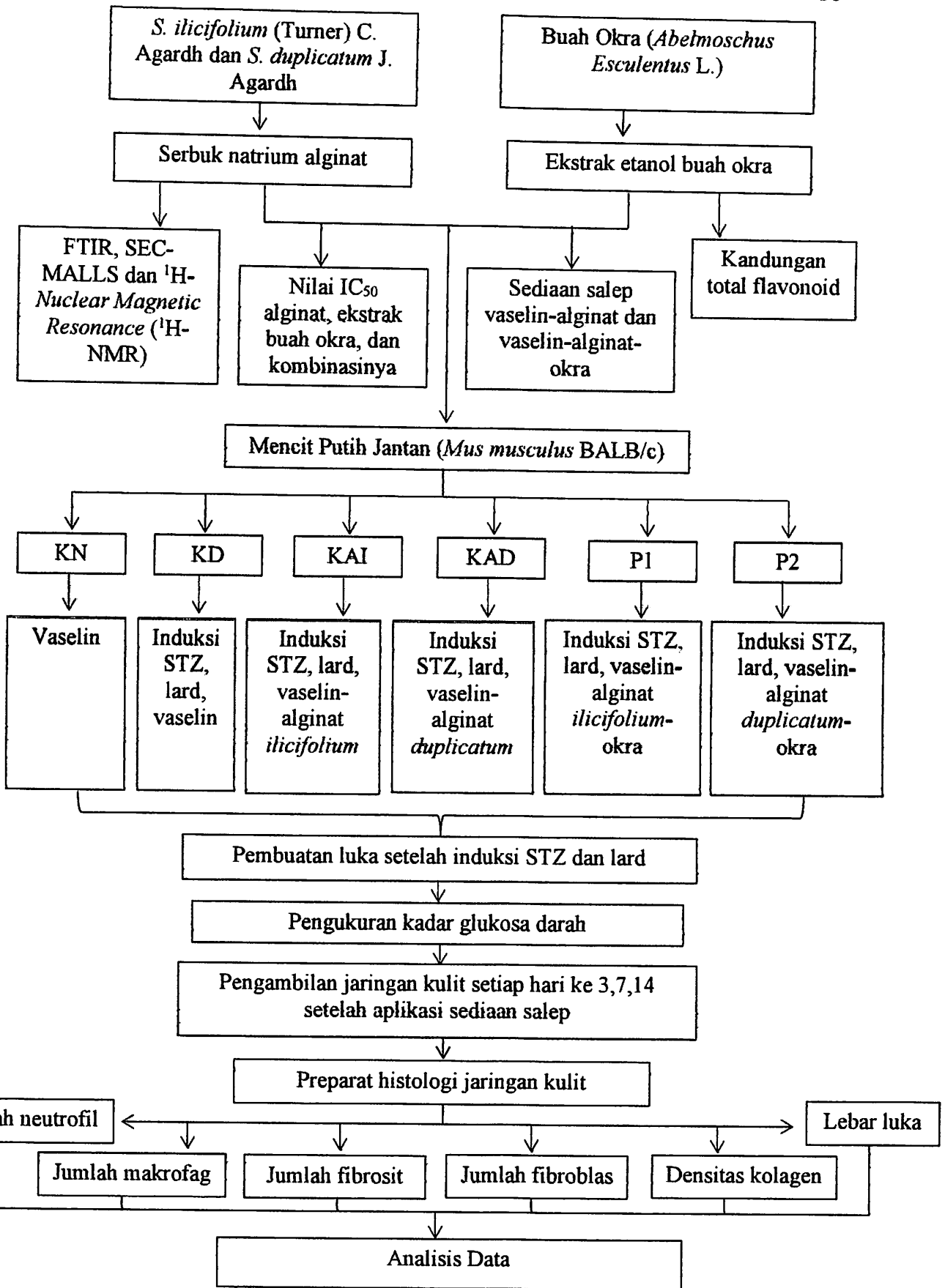


Gambar 4.4 Morfologi (a) sel radang neutrofil; (b) makrofag; (c) fibroblas; (d) fibrosit; (e) serat kolagen; (f) daerah luka (Amita *et al.*, 2017)

4.3.13 Analisis data

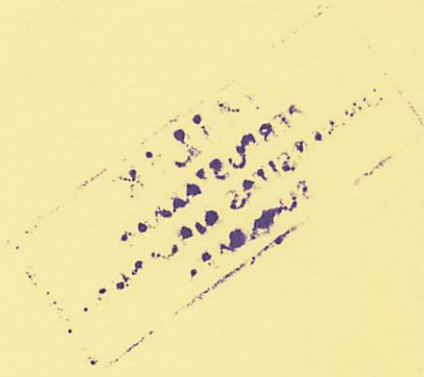
Data hasil pengamatan yang diperoleh (persentase jumlah sel radang (neutrofil), fibroblas, fibrosit, makrofag, densitas kolagen, dan lebar luka) dilakukan analisis statistik menggunakan program SPSS 20.0 untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang berbeda. Analisis data meliputi uji normalitas dan uji homogenitas sebaran data dengan uji *one-sample* Kolmogorov Smirnov dan uji Levene. Persentase jumlah neutrofil, fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov dan homogenitas Levene, kemudian

dilakukan uji *one-way* Anova dan Duncan pada $\alpha=0,05$ untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar kelompok. Sedangkan lebar luka dan jumlah makrofag dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov dan uji Kruskal Wallis pada $\alpha=0,05$, kemudian dilakukan uji Mann-Whitney pada $\alpha=0,05$ untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar kelompok.



Gambar 4.5 Diagram alir penelitian

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Identifikasi Alginat

Asam alginat diekstraksi dari *Sargassum ilicifolium* dan *Sargassum duplicatum*. Ekstraksi alkali dengan Na_2CO_3 yang digunakan dalam penelitian ini menyajikan asam alginat sebagai natrium alginat. Prosedur alkali diperlukan untuk proses pertukaran ion (Indrani dan Budianto, 2013). Alginat yang diperoleh kemudian dilakukan identifikasi meliputi analisis FT-IR, SEC-MALLS, $^1\text{H-NMR}$.

5.1.1 Rendemen alginat

Alginat diperoleh dari hasil ekstraksi rumput laut coklat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*. Perhitungan rendemen total alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* dapat dilihat pada Lampiran 1. Berdasarkan Tabel 5.1, sampel rumput laut coklat yang digunakan masing-masing sebesar 150 g. Berat akhir alginat yang diperoleh dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* masing-masing sebesar 21,536 g dan 18,210 g. Berdasarkan hasil perhitungan persentase rendemen total dari hasil ekstraksi rumput laut coklat *S. ilicifolium* diperoleh sebesar 14,36% sedangkan rendemen *S. duplicatum* diperoleh sebesar 12,14%.

Tabel 5.1 Rendemen total natrium alginat

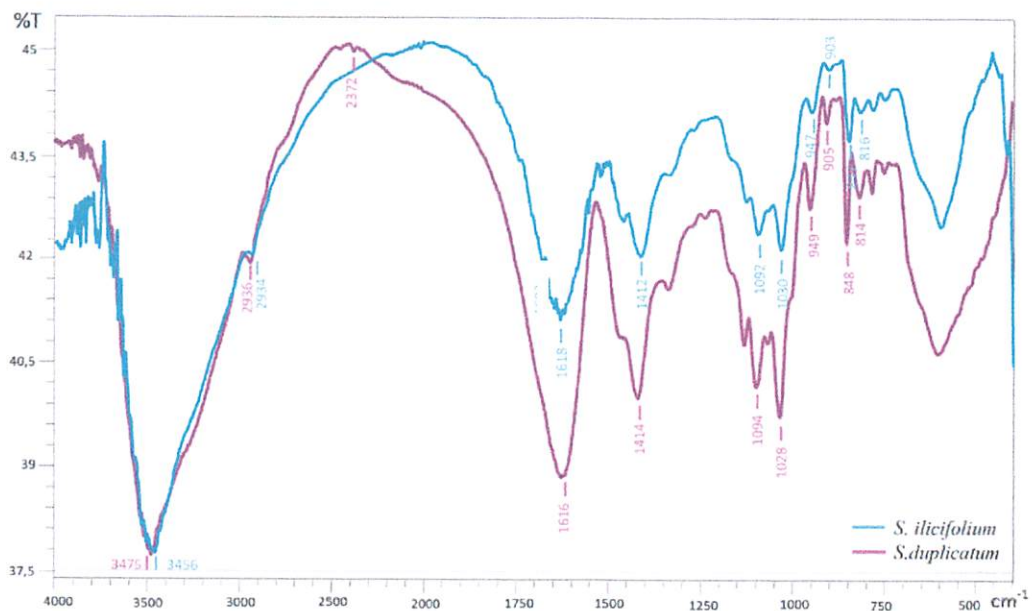
No.	Sampel	Berat awal (g)	Berat akhir (g)	Rendemen (%)	Referensi
1.	<i>S. ilicifolium</i>	150	21,536	14,36	Penelitian
2.	<i>S. duplicatum</i>	150	18,210	12,14	Penelitian
3.	<i>S. ilicifolium</i>	150	21,39	14,26	Ganapathi <i>et al.</i> , 2013
4.	<i>S. turbinarioides</i>	25	2,5	10	Fenoradosoa <i>et al.</i> , 2009
4.	<i>S. vulgare</i>	100	40	40	Sari-Chmayssem <i>et al.</i> , 2016

Hasil ekstraksi alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* lebih tinggi dibandingkan dengan *C. barbata* dan *S. turbinarioides* masing-masing 9,9 dan 10 % (Sellimi *et al.*, 2015; Fenoradosoa *et al.*, 2009). Tetapi, hasil ekstraksi lebih rendah dibandingkan dengan *C. implexa*, *L. variegata*, dan *S. vulgare* sebesar 29,15;

27,57; dan 40% (Viswanathan *et al.*, 2014; Gholamipoor *et al.*, 2013; Sari-Chmayssem *et al.*, 2016). Hasil ekstraksi *S. ilicifolium* mendekati ekstraksi pada penelitian Ganapathi *et al.* (2013) dengan rendemen 14,26%. Pada umumnya kandungan alginat dalam berbagai jenis rumput laut coklat sangat bervariasi bergantung pada metode dan spesies yang digunakan untuk ekstraksi (Larsen *et al.*, 2003).

5.1.2 Analisis FTIR

Analisis Fourier Transform Infrared (FTIR) digunakan untuk menentukan gugus fungsi dalam alginat. Hasil analisis spektroskopi FTIR dapat dilihat pada Lampiran 2. Gambar 5.1 menunjukkan gambar spektrum FTIR alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*. Tabel vibrasi gugus fungsi alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* ditunjukkan dalam Tabel 5.2.



Gambar 5.1 Spektrum FTIR dari alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*

Berdasarkan Gambar 5.1 mengenai spektrum FTIR alginat *S. ilicifolium* terdapat beberapa puncak serapan pada daerah 3457 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 947 cm^{-1} , 903 cm^{-1} , 847 cm^{-1} , 816 cm^{-1} . Puncak serapan lebar di 3457 cm^{-1} menunjukkan adanya *stretching* gugus hidroksil O-H dan sinyal lemah di 2934 cm^{-1} menunjukkan *stretching* C-H. Puncak yang kuat pada 1618 cm^{-1} menunjukkan *asymmetric stretching* (O-C=O) gugus karboksilat dan

1412 cm^{-1} menunjukkan *symmetric stretching* gugus karboksilat dalam alginat (Pereira *et al.*, 2013). *Stretching* C-O-C dari cincin piranosa asam manuronat dan asam guluronat berada pada pita serapan 1092 cm^{-1} dan 1030 cm^{-1} (Fenorradosoa *et al.*, 2010). Daerah anomerik dari karbohidrat berada pada daerah antara 950 cm^{-1} dan 750 cm^{-1} (Mathlouthi dan Koenig, 1986). Puncak pada 947 cm^{-1} menunjukkan *stretching* residu *uronic acid* yaitu C-O-C pada 1,4 *glycosidic linkage* dan puncak kecil pada 903 cm^{-1} menunjukkan vibrasi C-H *bending* dari residu α -L-guluronic acid (Chandía *et al.*, 2001). Sedangkan puncak 816 cm^{-1} menunjukkan vibrasi C-H *bending* residu β -D-mannuronic acid. Menurut Ganapathi *et al.* (2013) tentang spektrum FTIR alginat *S. ilicifolium*, pita serapan luas 3414 cm^{-1} sebagai gugus hidroksil dan 2927 cm^{-1} sebagai C-H *stretching*. Pita serapan 1633 cm^{-1} dan 1413 cm^{-1} menunjukkan *asymmetric stretching* dan *symmetric stretching* gugus karboksilat. Pita khas dari C-O-C *stretching* cincin piranosa asam manuronat, guluronat, dan ikatan glikosidik pada daerah 1097 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , dan 941 cm^{-1} . Sedangkan pita serapan 902 cm^{-1} dan 802 cm^{-1} sebagai C-H *bending* dari asam guluronat dan manuronat

Berdasarkan Gambar 5.1 mengenai spektrum FTIR alginat *S. duplicatum* memiliki beberapa puncak serapan pada daerah 3475 cm^{-1} , 2936 cm^{-1} , 1616 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} , 1094 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 949 cm^{-1} , 905 cm^{-1} , 849 cm^{-1} , 814 cm^{-1} . Seperti halnya vibrasi gugus fungsi pada spektrum *S. ilicifolium*, alginat *S. duplicatum* memiliki range pita serapan yang tidak jauh berbeda dengan alginat *S. ilicifolium*. 3475 cm^{-1} menunjukkan *stretching* O-H dan 2936 cm^{-1} menunjukkan *stretching* C-H. Puncak serapan 1616 cm^{-1} menunjukkan *asymmetric stretching* gugus karboksilat dan 1414 cm^{-1} menunjukkan *symmetric stretching* gugus karboksilat. Pita serapan 1094 cm^{-1} menunjukkan *stretching* C-O-C cincin piranosa pada unit manuronat dan 1028 cm^{-1} menunjukkan *stretching* C-O-C cincin piranosa pada unit guluronat. *Stretching* C-O-C pada ikatan glikosidik *uronic acid* ditunjukkan dalam pita serapan 949 cm^{-1} . Vibrasi C-H *bending* dari α -L-guluronic acid ditunjukkan oleh pita serapan 905 cm^{-1} sedangkan vibrasi C-H *bending* dari β -D-mannuronic acid ditunjukkan oleh pita serapan 814 cm^{-1} . Menurut Indrani dan Budianto (2013) tentang spektrum FTIR alginat *S. duplicatum*, pita serapan luas

antara 3401 cm^{-1} menunjukkan *stretching* gugus O-H, pita sekitar 1626 cm^{-1} dan 1421 cm^{-1} menunjukkan *stretching* asimetris dan simetris gugus karboksilat. Puncak lain yang khas pada pita 1027 cm^{-1} berasal dari gugus eter (C-O-C). Berdasarkan Lampiran 2, spektrum *S. duplicatum* terdapat pita serapan 2372 cm^{-1} sebagai pita CO_2 akibat kondisi atmosfer pada laboratorium yang sering ditemui pada analisis sampel polisakarida, sehingga perlu silikagel untuk menyerap uap air.

Tabel 5.2 Vibrasi gugus fungsi alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*

No	Bilangan Gelombang (cm^{-1})					Jenis Vibrasi
	<i>S. ilicifolium</i>		<i>S. duplicatum</i>		Silverstein ^c	
	Penelitian	Ref ^a	Penelitian	Ref ^b		
1.	3457	3414	3475	3401	3450	O-H <i>stretching</i>
2.	2934	2927	2936	2929	2900	C-H <i>stretching</i>
3.	1618	1633	1616	1626	1600	<i>Asymmetric stretching</i> O-C=O
4.	1412	1413	1414	1421	1400	<i>Symmetric stretching</i> O-C=O
5.	1092	1097	1094	1090	1100	C-O-C <i>stretching</i> cincin piranosa (M)
6.	1030	1035	1028	1027	1040	C-O-C <i>stretching</i> cincin piranosa (G)
7.	947	941	949	946	920	C-O-C <i>stretching</i> 1,4 glycosidic linkage
8.	903	902	905	900	880	C-H <i>bending</i> (G)
9.	816	802	814	815	780	C-H <i>bending</i> (M)

^aanalisis FTIR Bio-Rad FTIR-40-model, USA (Ganapathi *et al.*, 2013)

^banalisis FTIR alginat FTIR Spectroscopy (SpectrumOne, Perkin Elmer, Japan) (Indrani dan Budianto, 2013)

^creferensi dari literatur buku spektroskopi FTIR (Silverstein *et al.*, 2005)

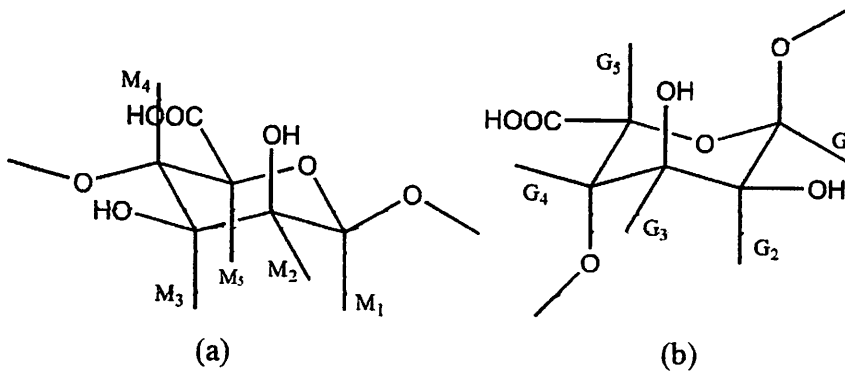
Ref : Referensi

Hasil analisis spektrum FTIR alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* tidak jauh berbeda dengan spektrum FTIR alginat dari spesies lain dengan Genus yang sama (*Sargassum*) seperti *S. vulgare*, *S. wightii*, dan *S. turbinarioides* dari beberapa penelitian yang telah dilakukan (Sari-Chmayssem *et al.*, 2016; Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2018; Fenoradosoa *et al.*, 2010).

5.1.3 Analisis ¹H-NMR

Analisis spektroskopi ¹H-NMR digunakan untuk penentuan komposisi atau pola struktur dan rasio M/G dalam molekul alginat (Larsen *et al.*, 2003). Spektrum ¹H-NMR memberikan komposisi dari unit guluronat dan mannuronat (F_G, F_M) sehingga dapat diketahui rasio komposisi unit guluronat dan mannuronat (rasio M/G). Selain itu, kemungkinan komposisi residu guluronat dan mannuronat lain juga dapat ditentukan (F_{GG}, F_{MM}, F_{MG}, F_{GM}) (Grasdalen *et al.*, 1983). Penentuan rasio M/G dari ekstrak alginat pada umumnya menggunakan pendekatan metode dari Grasdalen *et al.* (1979).

Berdasarkan hasil penelitian ini, spektrum ¹H-NMR dari alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* serta hasil rasio M/G ditunjukkan pada Lampiran 3. Spektrum ¹H-NMR alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* memiliki hasil yang tidak jauh berbeda. Molekul alginat secara struktural dapat dikenali dari konfigurasi α dan β glikosidik sehingga memiliki bentuk anomer α -guluronat dan β -mannuronat. Proton anomer α -guluronat dan β -mannuronat ditunjukkan oleh G₁ dan M₁ pada daerah 5-6 ppm dan 4,3-5 ppm (Cui, 2005). Berdasarkan spektrum NMR, proton anomer asam guluronat (G₁) ditemukan pada 4,98 ppm sebagai area sinyal I (I_A), H₅ dari asam guluronat ditemukan pada daerah 4,13; 4,14 ppm sebagai sinyal area III (I_C), sedangkan proton anomer asam mannuronat (M₁) ditemukan pada 4,40 ppm sebagai sinyal area II (I_B). Area proton (I_A, I_B, I_C) ditentukan melalui integrasi setiap puncak dan digunakan untuk menentukan rasio M/G dari alginat dengan persamaan dari penelitian Grasdalen *et al.* (1979). Pada geseran kimia daerah ~4,20 ppm ditemukan sinyal proton H₅ dari residu G pusat (MG₅M, GG₅M) dalam triad MGM atau GGM. Selain itu juga ditemukan sinyal proton M₁G yang berarti adanya residu M yang bertetangga dengan residu G. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Grasdalen *et al.* (1979).



Gambar 5.2 Struktur kimia (a) asam mannuronat dan (b) asam guluronat

Rasio M/G dari alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* yang diperoleh pada penelitian ini masing-masing sebesar 0,71 dan 0,83. Berdasarkan rasio M/G yang telah diperoleh, dapat diketahui bahwa alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* mengandung komposisi unit guluronat sebesar $F_G=0,62$; 0,54 sedangkan komposisi unit manuronat sebesar $F_M=0,38$; 0,46. Komposisi unit guluronat lebih besar jika dibandingkan dengan unit manuronat sehingga rasio M/G dari *S. ilicifolium* lebih rendah dari *S. duplicatum*. Rasio M/G dari *S. ilicifolium* lebih kecil daripada *S. turbinarioides* dan *S. vulgare* yang termasuk dalam satu genus masing-masing sebesar 0,94 dan 0,78, tetapi rasio M/G *S. duplicatum* lebih besar daripada *S. vulgare*. Parameter η diperoleh dari fraksi F_{MG} , F_G , dan F_M yang digunakan untuk menentukan tipe blok dari struktur alginat. Jika nilai $\eta < 1$, maka sampel alginat yang diekstrak memiliki struktur tipe blok homopolimer (Grasdalen *et al.*, 1979). Pada penelitian ini diperoleh nilai η dalam alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* masing-masing sebesar 0,45 dan 0,68. Nilai η yang diperoleh pada kedua jenis alginat kurang dari 1, sehingga dapat disimpulkan bahwa alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* memiliki struktur tipe blok homopolimer. Berdasarkan penelitian Fenoradosoa *et al.*, 2009 dan Sari-Chmaysssem *et al.*, 2016 diperoleh nilai η masing-masing sebesar 0,50 dan 0,20 yang termasuk blok homopolimer yang mengandung blok poliguluronat.

Tabel 5.3 Analisis $^1\text{H-NMR}$ dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*

Keterangan	<i>S. ilicifolium</i>	<i>S. duplicatum</i>	<i>S. turbinarioides</i> ^a	<i>S. vulgare</i> ^b
F _G	0,62	0,54	0,52	0,56
F _M	0,38	0,46	0,48	0,44
F _{GG}	0,514	0,37	0,39	0,51
F _{MG}	0,106	0,17	0,25	0,05
Rasio M/G	0,61	0,85	0,94	0,78
η	0,45	0,68	0,50	0,20

^aanalisis $^1\text{H-NMR}$ menggunakan Bruker Advance 300 spectrometer 300 MHz (Fenoradosoa *et al.*, 2009)

^banalisis $^1\text{H-NMR}$ menggunakan Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (Sari-Chmayssem *et al.*, 2016)

5.1.4 Analisis SEC-MALLS

Analisis SEC-MALLS digunakan untuk menentukan berat molekul dan distribusi berat molekul dari sampel natrium alginat. Hasil analisis SEC-MALLS dapat dilihat pada Lampiran 4. Berat molekul dan *polydispersity index* dari alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* ditunjukkan pada Tabel 5.4. Fraksi natrium alginat yang diekstraksi dari *S. ilicifolium* terdiri dari polisakarida dengan berat molekul rata-rata *weight-average molecular weight* (M_w) sebesar $3,45 \times 10^4$ Da dan *number-average molecular weight* (M_n) sebesar $2,00 \times 10^4$ Da. Sedangkan alginat *S. duplicatum* memiliki nilai *weight-average molecular weight* (M_w) sebesar $2,65 \times 10^4$ Da dan *number-average molecular weight* (M_n) sebesar $1,56 \times 10^4$ Da. Berat molekul alginat mempengaruhi sifat antioksidan dalam *radical scavenging* (Şen, 2011). Berat molekul alginat antara 12-35 kDa atau $1,2 \times 10^4 - 3,5 \times 10^4$ Da memiliki kemampuan *radical scavenging*. Penurunan berat molekul hingga dibawah 12 kDa menyebabkan penurunan struktur kompak dalam molekul alginat sehingga menurunkan fleksibilitas rantai. Hal tersebut dapat mempengaruhi ketersediaan ion molekul alginat untuk kemampuan *radical scavenging* (Şen dan Atik, 2012). Berdasarkan literatur, berat molekul produk alginat komersial dari rumput laut coklat sekitar $0,32 - 4,0 \times 10^5$ Da (Rinaudo, 2007). Berat molekul alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* lebih rendah dibandingkan dengan M_w dan M_n dari *S. turbinarioides* ($5,528 \times 10^5$ g/mol dan $3,852 \times 10^5$ Da) tetapi lebih besar

dari *S. vulgare* (110 Da dan 220 Da) dalam satu Genus (Fenoradosoa *et al.*, 2009; Sari-Chmayssem *et al.*, 2016).

Polydispersity index (PDI) menunjukkan distribusi massa molekul dalam sebuah polimer. PDI pada umumnya digunakan untuk menentukan keseragaman dari polimer. Suatu polimer bersifat homogen jika memiliki nilai *polydispersity index* (\bar{D}) mendekati 1 atau kurang dari 2 (Atkins dan Paula, 2010). Nilai *polydispersity index* dari alginat *S. ilicifolium* diperoleh dari perhitungan M_w/M_n sebesar 1,73. Sedangkan nilai *polydispersity index* dari alginat *S. duplicatum* diperoleh sebesar 1,70. Alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* memiliki karakter *polydisperse* yang rendah yaitu nilai PDI kurang dari 2 yang menunjukkan bahwa polisakarida alginat bersifat homogen. Nilai PDI dari alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* lebih besar dari alginat *S. turbinarioides* dan *S. vulgare* dengan nilai PDI sebesar 1,43 dan 0,5 (Fenoradosoa *et al.*, 2009; Sari-Chmayssem *et al.*, 2016).

Tabel 5.4 Hasil berat molekul dari natrium alginat

No.	Sampel	M_w (Da)	M_n (Da)	Polydispersity Index (PDI) \bar{D}	Referensi
1.	<i>S. ilicifolium</i>	$3,45 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	1,73	Penelitian ^a
2.	<i>S. duplicatum</i>	$2,65 \times 10^4$	$1,56 \times 10^4$	1,70	Penelitian ^a
3.	<i>S. turbinarioides</i>	$5,528 \times 10^5$	$3,852 \times 10^5$	1,43	Fenoradosoa <i>et al.</i> , 2009 ^a
4.	<i>S. vulgare</i>	110	220	0,5	Sari-Chmayssem <i>et al.</i> , 2016 ^b

^apenentuan berat molekul menggunakan HPSEC-MALLS

^bpenentuan berat molekul menggunakan (aqueous phase SEC)

5.2 Total Kandungan Flavonoid Ekstrak Buah Okra

Data hasil penentuan total kandungan flavonoid pada ekstrak buah okra dapat dilihat pada Lampiran 5. Total flavonoid dari ekstrak buah okra dilakukan menggunakan standar kuersetin dengan variasi konsentrasi. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan dengan berbagai konsentrasi larutan standar kuersetin. Berdasarkan kurva standar, diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,0105x - 0,0161$; $R^2 = 0,9989$. Absorbansi sampel diperoleh sebesar 0,451 dengan 10 kali

pengenceran. Absorbansi sampel disubstitusikan ke dalam persamaan regresi linear kurva standar sehingga diperoleh nilai konsentrasi kuersetin sebesar 44,49 ppm. Total flavonoid dari ekstrak buah okra yang diperoleh sebesar 43,96 mg QE/g ekstrak buah okra.

Okra mengandung senyawa kuersetin sebagai flavonoid utama karena 70% senyawa antioksidan total dalam okra berasal dari turunan kuersetin (Shui dan Peng, 2004). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa berbagai komponen okra memiliki kandungan flavonoid yang tinggi. Kandungan total flavonoid tertinggi terdapat pada komponen buah, daun, dan bunga (Lin *et al.*, 2008). Total flavonoid dari ekstrak okra telah dikonfirmasi berhubungan dengan kemampuan antioksidan dalam semua ekstrak organ tanaman meskipun persentasenya bervariasi (Liao *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini ekstrak okra mengandung total flavonoid sebesar 43,96 mg (QE)/g ekstrak okra atau 4,40% ($y = 0,0105x - 0,0161$; $R^2 = 0,9989$). Total kandungan flavonoid dari ekstrak okra pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak okra hijau penelitian lain sebesar 20,03 mg (QE)/g dan 0,898 – 1,031 mg (QE)/g okra (Anjani *et al.*, 2018; Janson *et al.*, 2017). Tetapi kandungan flavonoid dari ekstrak okra pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak segar buah okra penelitian lain sebesar $50,525 \pm 0,013 - 63,786 \pm 0,013$ mg (QE)/g (Bogninou *et al.*, 2018). Berdasarkan literatur, kandungan total flavonoid suatu ekstrak tanaman sangat bervariasi yang bergantung pada metode ekstraksi, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (Liao *et al.*, 2012).

5.3 Uji Antioksidan Alginat, Okra, dan Kombinasi Alginat-okra

Uji antioksidan dilakukan pada alginat dari *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum*, ekstrak buah okra, dan kombinasi alginat-ekstrak buah okra. Data hasil uji antioksidan dari alginat *S. ilicifolium*, *S. duplicatum*, ekstrak okra, dan kombinasi alginat-ekstrak buah okra dapat dilihat pada Lampiran 6. Senyawa DPPH merupakan radikal bebas yang stabil sehingga dapat digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas (Vanselow, 2007). Aktivitas *scavenging* radikal DPPH oleh suatu ekstrak menyebabkan perubahan intensitas warna dari

ungu menjadi tidak berwarna dan diamati pada panjang gelombang 517 nm (Prieto, 2016). Aktivitas *scavenging* radikal DPPH ditunjukkan oleh nilai IC_{50} , nilai IC_{50} terendah mengindikasikan aktivitas tertinggi sebagai DPPH *scavenger* (Belattmania *et al.*, 2016). Sifat antioksidan ditentukan melalui nilai IC_{50} setiap ekstrak. Sifat antioksidan dikategorikan menjadi 4 jenis yaitu antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, antioksidan kuat jika nilai IC_{50} antara 51-100 $\mu\text{g/mL}$, antioksidan sedang jika nilai IC_{50} antara 101-150 $\mu\text{g/mL}$, dan antioksidan lemah jika nilai IC_{50} lebih dari 151 $\mu\text{g/mL}$ (Blois, 1958). Hasil uji antioksidan dapat dilihat pada Tabel 5.5.

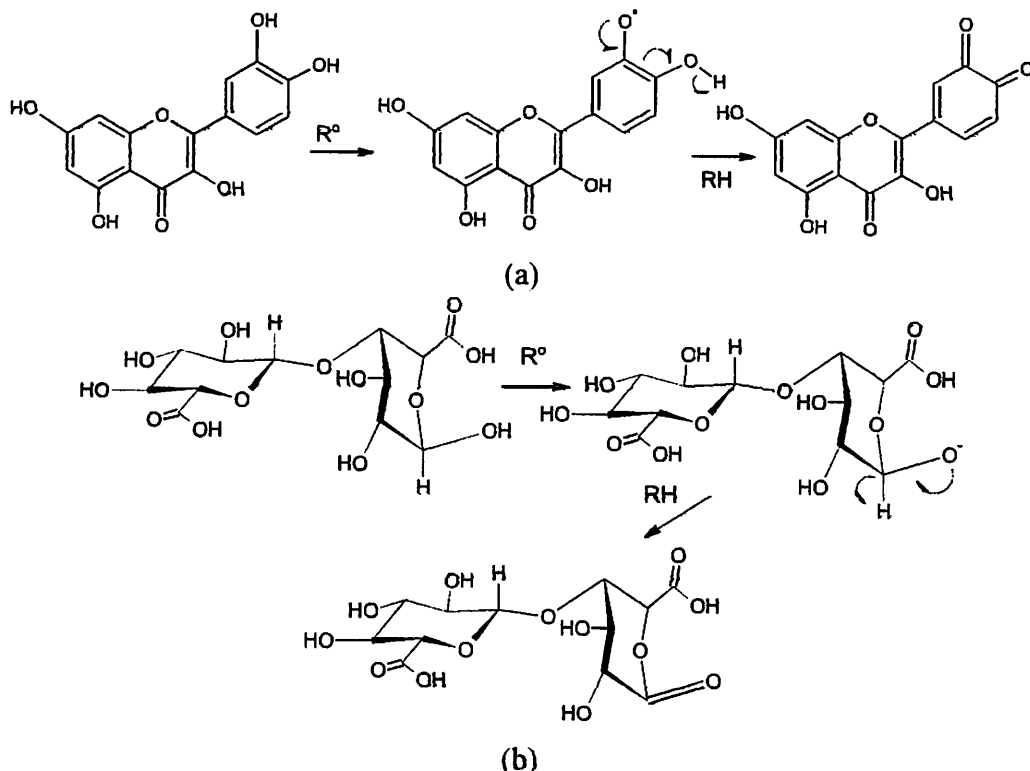
Tabel 5.5 Hasil uji antioksidan ekstrak okra, alginat, dan kombinasi alginat-okra

No.	Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Keterangan
1.	Natrium alginat <i>S. ilicifolium</i>	120,88	Antioksidan sedang
2.	Natrium alginat <i>S. duplicatum</i>	125,31	Antioksidan sedang
3.	Buah okra	65,87	Antioksidan kuat
4.	Kombinasi alginat <i>S. ilicifolium</i> -Okra	75,94	Antioksidan kuat
5.	Kombinasi alginat <i>S. duplicatum</i> -Okra	79,34	Antioksidan kuat
6.	Asam askorbat	55,89	Antioksidan kuat

Berdasarkan Tabel 5.5, dapat diketahui bahwa hasil uji antioksidan dari variasi sampel yang memiliki nilai IC_{50} yang berbeda. Aktivitas antioksidan tertinggi yaitu kontrol positif asam askorbat (55,89 $\mu\text{g/mL}$) dan diikuti ekstrak buah okra (65,87 $\mu\text{g/mL}$). Antioksidan ekstrak buah okra tidak jauh berbeda dengan kontrol positif asam askorbat yang termasuk dalam antioksidan kuat. Aktivitas antioksidan kombinasi alginat *S. ilicifolium*-okra (75,94 $\mu\text{g/mL}$) lebih tinggi dibandingkan kombinasi alginat *S. duplicatum*-okra (79,34 $\mu\text{g/mL}$) dan termasuk dalam antioksidan kuat. Aktivitas antioksidan alginat *S. ilicifolium* (120,88 $\mu\text{g/mL}$) lebih tinggi daripada alginat *S. duplicatum* (125,31 $\mu\text{g/mL}$) dan termasuk dalam antioksidan sedang.

Aktivitas antioksidan flavonoid tergantung pada susunan gugus fungsi struktural. Mekanisme yang mendasari sifat antioksidan senyawa flavonoid yaitu

free radical scavenging. Flavonoid memiliki potensial redoks yang lebih rendah sehingga secara termodinamika mampu mereduksi radikal bebas seperti superoksida, peroksil, alkoksil, dan radikal hidroksil melalui donor atom hidrogen (*Scavenging ROS*) seperti Gambar 5.3 (Kumar dan Pandey, 2013). Aktivitas reduksi gugus hidroksil fenolik menyebabkan flavonoid mampu menyumbangkan atom hidrogen sehingga terjadi delokalisasi produk radikal fenoksi untuk melindungi terhadap kerusakan jaringan dari ROS (Verma *et al.*, 2012). Gugus fungsi flavonoid yang berperan pada aktivitas antioksidan yaitu ikatan rangkap ($C_2=C_3$) dan gugus 4-karbonil pada cincin C, gugus hidroksil, gugus metoksi, dan glikosilasi. Gugus 4-karbonil mampu menginduksi pergeseran elektron melalui efek resonansi. Ikatan rangkap ($C_2=C_3$) tak jenuh memberikan peningkatan konjugasi antara cincin C dengan cincin A/B. Demikian pula, keterkaitan gugus hidroksil (5-OH) dengan konjugasi 4-karbonil dan $C_2=C_3$ meningkatkan delokalisasi elektron pada cincin B sehingga secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan (Wang *et al.*, 2018).



Gambar 5.3 Mekanisme *scavenging ROS* pada (a) flavonoid dan (b) alginat (Kumar dan Pandey, 2013; Sari-Chmayssem *et al.*, 2015)

Mekanisme antioksidan yang mungkin dari polisakarida dapat terjadi melalui donor atom hidrogen untuk *scavenging* radikal bebas. Selain itu, penangkapan atom hidrogen anomerik dari monosakarida berperan pada kemampuan *scavenging* radikal bebas (Wang *et al.*, 2005). Beberapa ciri struktural dari polisakarida seperti berat molekul, komposisi monosakarida, ketersediaan gugus hidroksil, dan ikatan hidrogen molekuler memberikan efek pada aktivitas *scavenging* (Lo *et al.*, 2011). Menurut Şen (2011), kemampuan *scavenging* radikal bebas natrium alginat bergantung pada struktur (blok G atau M) dari sampel dengan berat molekul antara 12-35 kDa. Selain itu, peningkatan aktivitas antioksidan dari natrium alginat dikaitkan dengan peningkatan kandungan monomer G. Jika kandungan monomer G lebih besar daripada monomer M (rasio M/G rendah), maka potensi antioksidan akan meningkat. Hal tersebut dikarenakan residu D-manuronat dengan poli β -(1-4) cenderung membentuk struktur untai putar kiri 3 lipatan (*3-fold left-handed helix*) yang menghasilkan ikatan hidrogen intramolekul yang lemah antara gugus fungsi hidroksil (OH) dengan rantai utama. Sedangkan residu L-guluronat dengan poli α -(1-4) cenderung membentuk rantai heliks terpotong 2 lipatan (*2-fold screw helical chains*) yang stabil dengan membentuk ikatan hidrogen antara gugus karboksil dan hidroksil antar molekul. Terbentuknya ikatan glikosidik diaksial pada blok G memungkinkan peningkatan halang sterik dan menyebabkan terhambatnya rotasi di sekitar ikatan glikosidik, sehingga dapat menurunkan fleksibilitas blok G yang memberikan sifat kaku dan ikatan hidrogen yang lebih mudah terputus. Hal tersebut mempengaruhi ketersediaan gugus hidroksil dalam natrium alginat untuk mendonorkan protonnya (Şen dan Atik, 2012). Ketersediaan gugus hidroksil dalam proses *scavenging* radikal bebas mempengaruhi aktivitas antioksidan yang terkandung dalam molekul alginat.

Berdasarkan penelitian ini, *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* memiliki berat molekul antara 12-35 kDa sehingga memiliki potensi aktivitas antioksidan. Alginat dari *S. ilicifolium* memiliki rasio M/G yang lebih rendah daripada alginat *S. duplicatum* yang menunjukkan kandungan blok G *S. ilicifolium* lebih tinggi daripada *S. duplicatum*. Oleh karena itu, alginat *S. ilicifolium* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada alginat *S. duplicatum*. Ekstrak okra dan

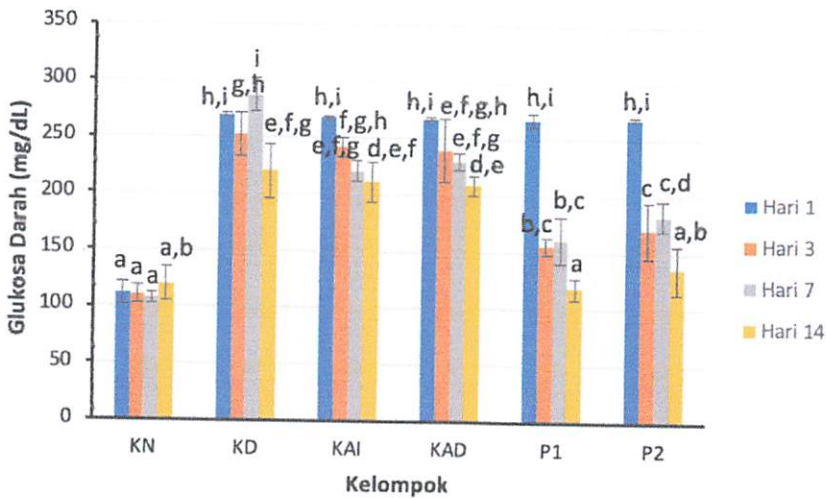
kombinasi alginat-ekstrak buah okra memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, karena ekstrak buah okra mengandung gugus flavonoid yang berperan penting dalam proses *scavenging* radikal bebas. Penambahan natrium alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* dengan ekstrak buah okra menurunkan nilai IC_{50} dalam kombinasi natrium alginat-okra. Tetapi penambahan natrium alginat tersebut dapat menstabilkan flavonoid dalam ekstrak buah okra. Hal tersebut dikarenakan, residu D-manuronat dan L-guluronat yang terhubung dengan poli (1-4) cenderung membentuk diaksial links dengan ikatan hidrogen intramolekul atau ektramolekul pada senyawa flavonoid yang lebih stabil (Fang *et al.*, 2007).

5.4 Pengaruh Alginat dan Okra Terhadap Kadar Glukosa Darah

Data kadar glukosa darah mencit pada hari ke 1, 3, 7, dan 14 dapat dilihat pada Lampiran 7 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 8. Perbandingan rata-rata kadar glukosa darah setiap kelompok mencit diabetik disajikan pada Gambar 5.4. Kadar glukosa darah 2 jam PP (*postprandial*) diukur menggunakan alat glukometer pada hari ke 1 setelah induksi STZ serta pada hari ke 3, 7, dan 14 setelah pemberian perlakuan. Uji normalitas kadar glukosa darah menunjukkan bahwa berdistribusi normal ($p=0,851$; $p>0,05$). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas Lavene menunjukkan bahwa data bersifat homogen ($p=0,073$; $p>0,05$). Data dilanjutkan uji *one-way* Anova yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,001$; $p<0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui signifikansi setiap kelompok.

Hasil uji Duncan menunjukkan mencit diabetik kelompok KD, KAI, KAD, P1, dan P2 pada hari 1 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan yang menunjukkan kelompok diabetik berada pada kondisi yang sama. Kelompok KN memiliki kadar glukosa darah normal pada hari ke 1 hingga 14. Kelompok KD pada hari ke 1, 3, 7, dan 14 memiliki kadar glukosa darah tertinggi dibandingkan dengan kelompok lain ($270\pm 2,12$ mg/dL; $253\pm 19,09$ mg/dL; $288\pm 14,85$ mg/dL; $220\pm 24,04$ mg/dL). Kelompok KD tidak berbeda signifikan dengan kelompok KAI dan KAD pada hari ke 1 hingga 14. Kelompok KAI dan KAD tidak mengalami penurunan glukosa darah yang signifikan hingga hari ke 14. Sedangkan kelompok P1 dan P2

mengalami penurunan glukosa darah yang signifikan hingga hari ke 14. Kelompok P1 dan P2 tidak berbeda signifikan dengan kelompok KN pada hari ke 3, 7, dan 14. Antara kelompok KAD dengan KAI dan kelompok P1 dengan P2 tidak ada perbedaan yang signifikan pada hari ke 1, 3, 7, dan 14.



Gambar 5.4 Perbandingan rata-rata kadar glukosa darah dari masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke 1, 3, 7, dan 14. Huruf berbeda di atas diagram menunjukkan perbedaan bermakna dari hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$). KN: kontrol normal, KD: kontrol diabetik, KAI: kontrol alginat *S. ilicifolium* 100 mg/kg BB, KAD: kontrol alginat *S. duplicatum* 100 mg/kg BB, P1: perlakuan alginat *S. ilicifolium*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB, P2: perlakuan alginat *S. duplicatum*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB.

Streptozocin (STZ) merupakan turunan senyawa glukosamin-nitrosourea yang mampu menghasilkan oksigen reaktif sehingga menyebabkan kerusakan sel β pulau pankreas dan akhirnya terjadi penghambatan sekresi insulin (Szkudelski, 2001). Kadar glukosa *Postprandial* (PP) ditentukan sebagai glukosa darah puasa atau 2 jam setelah makan (ADA, 2012). Diabetes didiagnosis ketika glukosa darah puasa ≥ 200 mg/dL, sedangkan kondisi normal ≤ 180 mg/dL. Kondisi diabetes menyebabkan gangguan metabolik kompleks yang terkait dengan resistensi insulin, gangguan sinyal insulin, disfungsi β -sel, kadar glukosa abnormal, dan perubahan metabolisme lipid. Hal tersebut dikarenakan terjadinya peradangan dan peningkatan stres oksidatif (Testa *et al.*, 2016). Kondisi diabetes menyebabkan kadar ROS meningkat yang tidak diimbangi dengan pasokan antioksidan yang

cukup sehingga meningkatkan stres oksidatif. Stres oksidatif memicu adanya gangguan sinyal insulin sehingga terjadi resistensi insulin. Sel- β pankreas tidak optimal dalam sekresi insulin sehingga tidak dapat memberikan sinyal pada sel lemak, otot, dan hati untuk menyerap glukosa dan mengubahnya menjadi glikogen dan trigliserida yang dijadikan sumber energi dalam tubuh, sehingga kadar glukosa dalam darah tetap cenderung tinggi.

Kelompok diabetik (KD) pada hari ke 1 hingga 14 tetap berada pada kondisi diabetes dengan kadar glukosa darah > 200 mg/dL. Sebaliknya, pada kelompok normal (KN) memiliki kadar glukosa darah yang normal pada hari ke 1 hingga 14 < 150 mg/dL karena kondisi normal memicu sekresi insulin tercukupi untuk kontrol glukosa darah. Pemberian natrium alginat pada kelompok KAI dan KAD dapat menurunkan glukosa darah yang tidak signifikan atau tidak mendekati normal. Hal tersebut mengindikasikan bahwa natrium alginat berperan penting sebagai absorber eksudat luka. Penurunan kadar glukosa berkaitan dengan aktivitas antioksidan natrium alginat dari *Sargassum* (Husni *et al.*, 2016). Penurunan kadar glukosa darah yang tidak signifikan antara kelompok KAI dengan KAD disebabkan karena aktivitas antioksidan natrium alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* termasuk antioksidan sedang, sehingga kemampuan *scavenging* radikal bebas untuk mengurangi stres oksidatif dan menurunkan glukosa darah tidak berbeda signifikan (Draget *et al.*, 2000). Penambahan ekstrak buah okra pada kombinasi alginat-okra (P1 dan P2) dapat menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan. Penurunan tersebut dikarenakan peran aktivitas antioksidan kuat dari ekstrak buah okra dalam menyeimbangkan sistem produksi radikal bebas dan *scavenging* radikal bebas. Aktivitas *scavenging* radikal bebas dari flavonoid dapat menurunkan kadar ROS melalui penurunan aktivasi inhibitor PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) sehingga menurunkan aktivasi *advanced glycation end-product pathway* (AGEs), *diacylglycerol formation* and PKc *pathway*, *hexosamine pathway*, *polyol pathway* dan kontrol glukosa dalam darah menjadi normal (Hossain *et al.*, 2016). Penurunan kadar glukosa darah antara kelompok P1 dengan P2 tidak berbeda signifikan dikarenakan nilai IC_{50} kedua kelompok tidak jauh berbeda sehingga memiliki kemampuan *scavenging* radikal bebas yang hampir sama.

5.5 Pengaruh Alginat dan Okra Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka

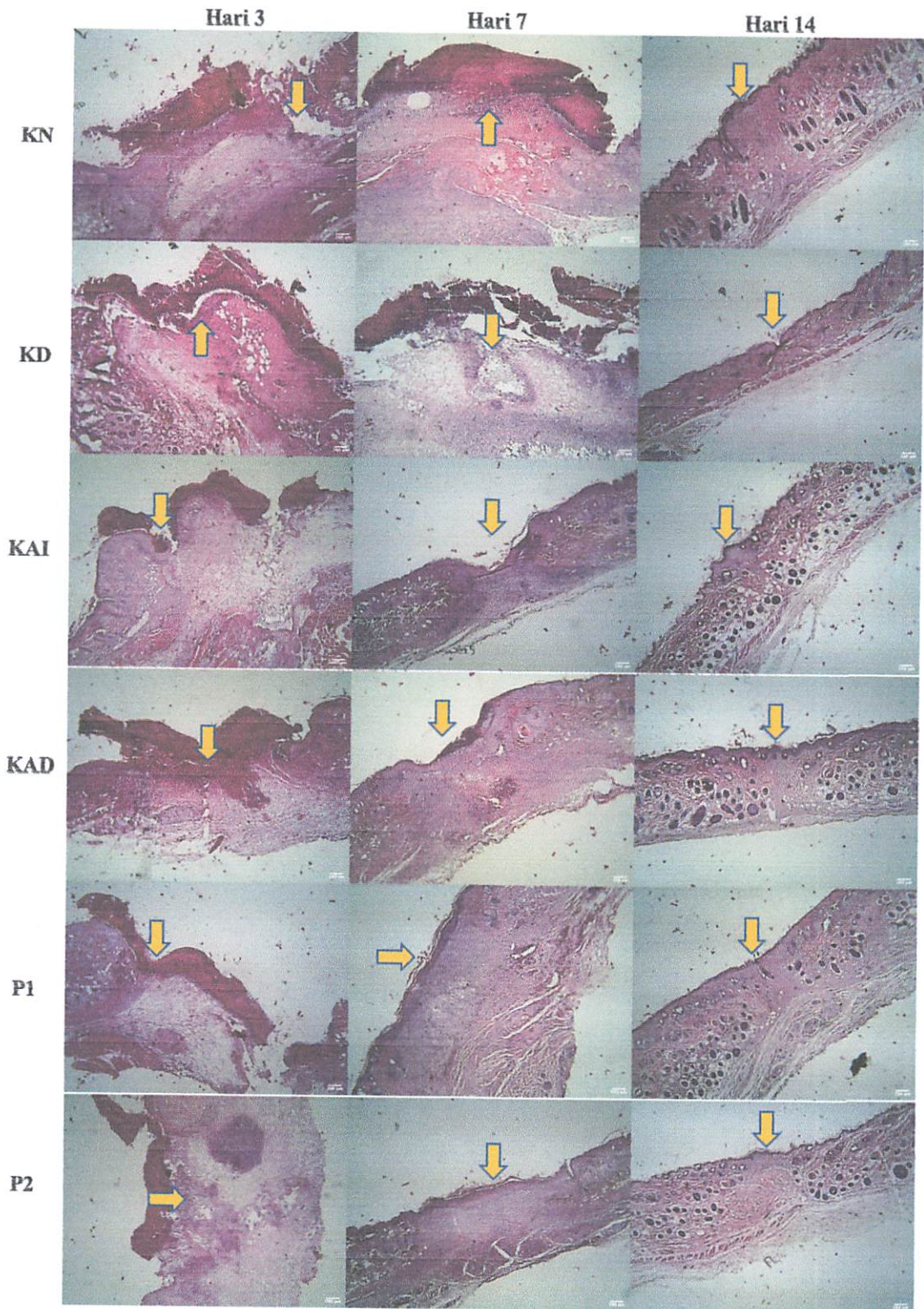
Diabetes melitus menurunkan kemampuan metabolisme glukosa yang mengakibatkan terjadinya kondisi hiperglikemia sehingga memperlambat proses penyembuhan luka. Luka diabetes ditandai dengan luka akut dan kronis akibat tahap proses penyembuhannya yang tidak lengkap dan tidak terkoordinasi. Luka diabetes menunjukkan fase inflamasi yang berkepanjangan terkait dengan gangguan produksi dan regulasi beberapa sitokin dan *growth factor* sehingga menghambat pembentukan jaringan granulasi dan pengurangan kekuatan tarik pada luka. Sel-sel yang terlibat dalam proses penyembuhan luka meliputi neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, keratinosit untuk pembentukan kolagen (Patel *et al.*, 2019). Pada kondisi normal, proses penyembuhan luka diawali hemostasis untuk mencegah kehilangan darah dan invasi bakteri. Kemudian diikuti fase inflamasi untuk produksi sel *pro-inflammatory* (neutrofil dan makrofag) bersama dengan sitokin dan *growth factor* lain untuk membersihkan debris dan patogen pada daerah luka. fase proliferasi membentuk jaringan baru, pembuluh darah baru (angiogenesis) dan konstruksi matriks untuk mengisi daerah luka. Fase maturasi (*remodeling*) sebagai fase akhir untuk meningkatkan kekuatan tarik dari matriks ekstraseluler yang terbentuk dan mengurangi pasokan darah ke daerah yang luka (Singh *et al.*, 2013).

Formulasi topikal pada lapisan kulit memungkinkan pelepasan senyawa aktif yang menembus melalui kulit dan memasuki sirkulasi sistemik. Epidermis memiliki lapisan stratum corneum dengan karakteristik penghalang dan ketahanan terhadap air sehingga berperan sebagai lapisan utama yang membatasi penyerapan obat melalui kulit (Ruela *et al.*, 2016). Menurut Andrews *et al.* (2013) pengangkatan stratum corneum atau epidermis meningkatkan permeabilitas kulit secara drastis. Selain itu, senyawa aktif dapat penetrasi melalui kelenjar keringat dan di seluruh folikel rambut dengan kelenjar sebaceous yang termasuk saluran terbuka ke luar permukaan kulit disebut sebagai *Transappendageal route* (Mathes *et al.*, 2014; Rastogi dan Yadav, 2012). Dengan demikian, zat aktif natrium alginat dan ekstrak buah okra seperti flavonoid mungkin memungkinkan menembus melalui kulit

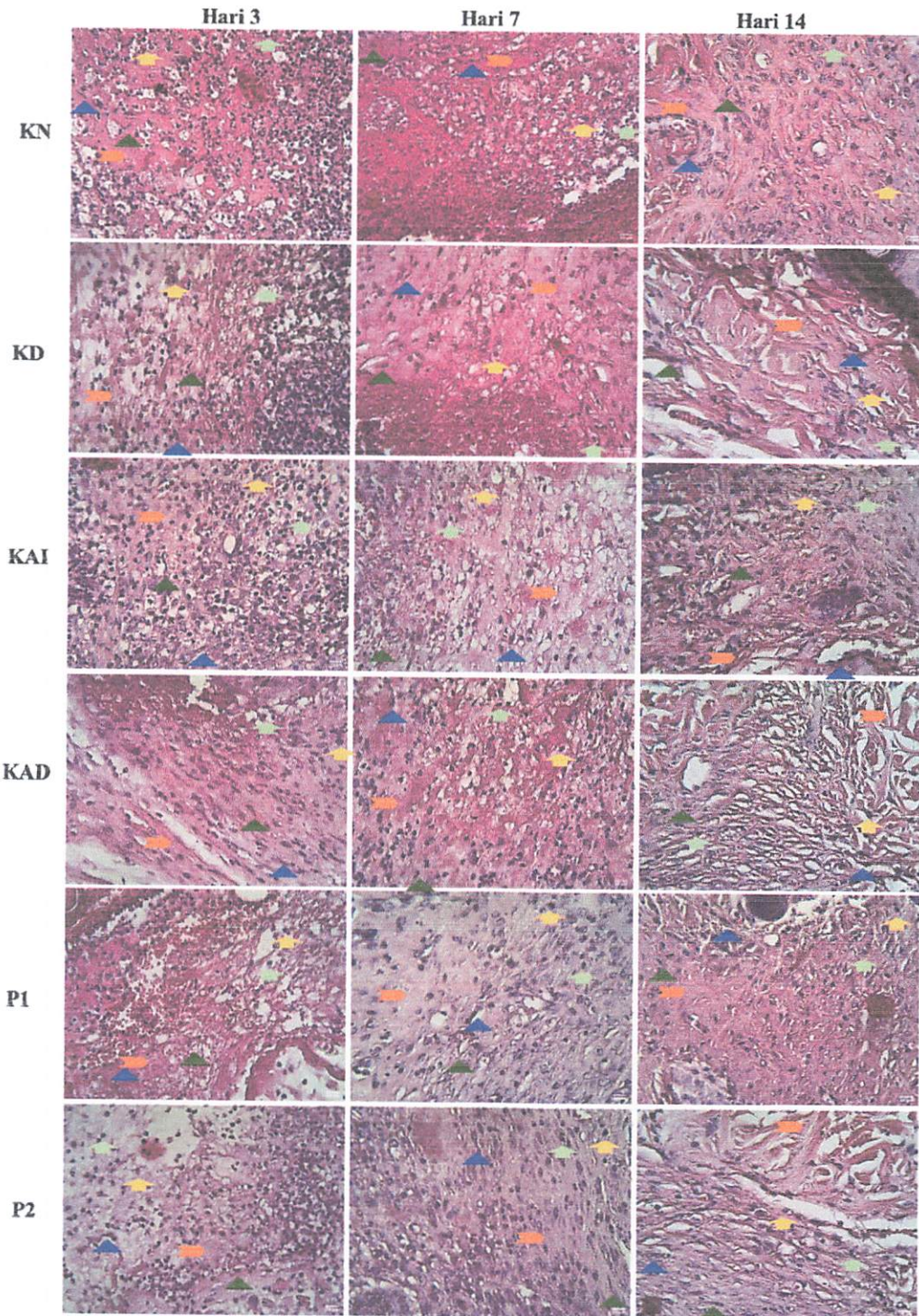
dan memasuki pembuluh darah atau sirkulasi sistemik. Selain itu, pembuatan luka terbuka kulit mencit pada lapisan epidermis dapat menjadi jalur masuknya zat aktif sediaan ke dalam kulit.

Sediaan salep yang digunakan pada penelitian ini menggunakan vaselin sebagai base yang mengandung natrium alginat dan ekstrak buah okra. Vaseline cenderung membentuk lapisan oklusif pada permukaan kulit sehingga dapat mencegah kehilangan air berlebih dan peningkatan keadaan hidrasi dari stratum corneum pada kulit (Patzelt *et al.*, 2012). Hidrasi yang terjadi pada kulit dapat meningkatkan penetrasi zat aktif (Daniels dan Knie, 2007). Vaseline memberikan kontak berkepanjangan antara formulasi salep dengan kulit karena vaselin cenderung bertahan lama pada permukaan kulit. Vaseline sebagai base yang dapat menembus ke dalam lipid stratum corneum dari lapisan kulit (Patzelt *et al.*, 2012). Natrium alginat dan flavonoid akan mengalami proses difusi ke permukaan formulasi salep sehingga zat aktif dapat dilepaskan dari vaselin ke permukaan kulit (Christensen *et al.*, 2011).

Histologi jaringan kulit mencit dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6. Berdasarkan Gambar 5.5 menunjukkan lebar luka atau daerah luka yang belum mengalami re-epitelisasi sempurna. Pada hari ke-3 semua kelompok masih terdapat sumbat hemostasis di daerah luka. Pada hari ke-7 kelompok KN dan KD masih terdapat sumbat hemostasis, tetapi kelompok KAI, KAD, P1, dan P2 tidak terdapat sumbat hemostasis di daerah luka. Pada hari ke-7 kelompok KD masih terdapat luka yang terbuka, sedangkan kelompok yang lain sudah mulai mengalami proses re-epitelisasi atau penutupan daerah luka. Pada hari ke-14 kelompok KD masih terdapat luka yang terbuka, meskipun sudah terdapat serat kolagen dan folikel rambut. Sedangkan kelompok lainnya sudah mengalami reepitelisasi sempurna yang ditandai penutupan luka sempurna, tumbuhnya folikel rambut, dan serat kolagen.



Gambar 5.5 Histologi lebar luka pada hari ke 3, 7, dan 14 yang ditunjukkan oleh garis panah berwarna kuning 🏷️. KN: kontrol normal, KD: kontrol diabetik, KAI: kontrol alginat *S. ilicifolium* 100 mg/kg BB, KAD: kontrol alginat *S. duplicatum* 100 mg/kg BB, P1: perlakuan alginat *S. ilicifolium*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB, P2: perlakuan alginat *S. duplicatum*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB.

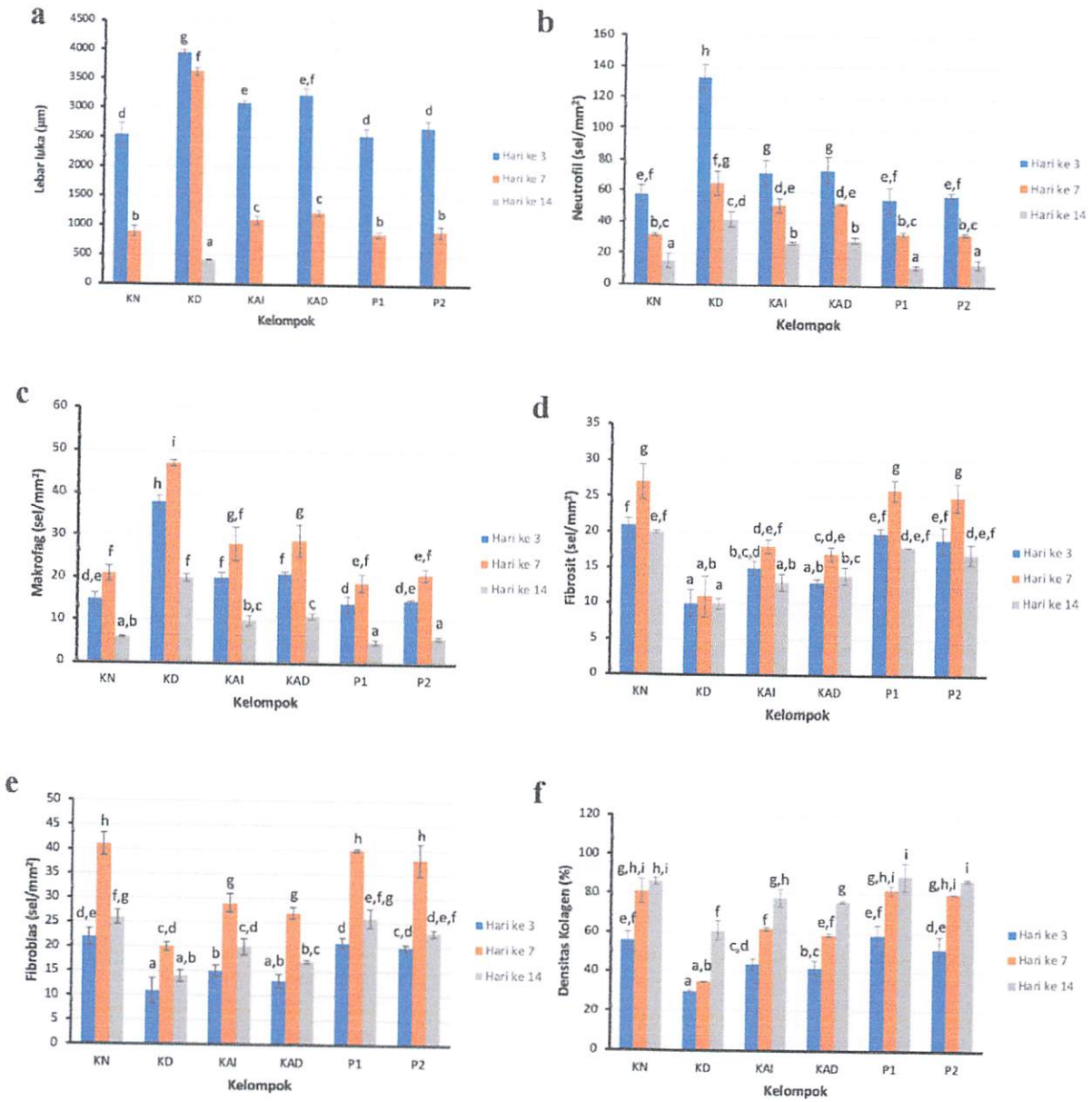


Gambar 5.6 Histologi sel parameter luka pada hari ke 3, 7, dan 14 yang ditunjukkan oleh simbol yang berbeda: Neutrofil; Makrofag; Fibrosit; Fibroblas; Densitas Kolagen. KN: kontrol normal, KD: kontrol diabetik, KAI: kontrol alginat *S. ilicifolium* 100 mg/kg BB, KAD: kontrol alginat *S. duplicatum* 100 mg/kg BB, P1: perlakuan alginat *S. ilicifolium*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB, P2: perlakuan alginat *S. duplicatum*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB.

Berdasarkan Gambar 5.6 menunjukkan parameter luka seperti neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen. neutrofil banyak ditemukan pada hari ke 3 dan semakin berkurang hingga hari ke 14. Makrofag, fibrosit, dan fibroblas ditemukan hingga hari ke 7 dan berkurang pada hari ke 14. Serat kolagen ditemukan banyak pada hari ke 14. Kelompok KD ditemukan neutrofil dan makrofag yang berlebihan, tetapi fibrosit, fobroblas, dan serat kolagen ditemukan paling sedikit jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pengamatan dari perbesaran histologi dari Gambar 5.6 dilakukan analisis hingga diperoleh histogram pada setiap parameter luka (lebar luka, neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen) yang ditunjukkan pada Gambar 5.7.

Data rata-rata pengukuran lebar luka dapat dilihat pada Lampiran 9 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 10. Perbandingan rata-rata lebar luka menciit untuk setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.7(a). Uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p=0,159$; $p>0,05$), sehingga data dilanjutkan ke uji homogenitas Lavene ($\alpha=0,05$) menunjukkan data tidak homogen ($p=0,000$; $p<0,05$). Selanjutnya, uji Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,007$; $p<0,05$), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

Berdasarkan Gambar 5.7(a) tentang grafik lebar luka, dapat dilihat bahwa kelompok KD memiliki lebar luka yang paling tinggi pada hari ke 3, 7, dan 14 ($3956\pm 52,22 \mu\text{m}$; $3631\pm 74,83 \mu\text{m}$; $424\pm 5,19 \mu\text{m}$), dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sedangkan kelompok perlakuan (P1) memiliki lebar luka paling rendah pada hari 3, 7, dan 14 ($2547\pm 123,20 \mu\text{m}$; $867\pm 53,31 \mu\text{m}$; $0\pm 0 \mu\text{m}$). Pada hari ke 14, hanya kelompok KD yang masih terdapat lebar luka dibandingkan dengan kelompok lainnya. Lebar luka semakin menurun hingga hari ke 14 yang terjadi secara signifikan pada semua kelompok. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa kelompok KD berbeda signifikan dengan kelompok lain pada hari ke 3, 7, 14. Kelompok KN tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan P1 dan P2, tetapi berbeda signifikan dengan kelompok KD, KAI dan KAD. Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok KAI dengan KAD dan kelompok P1 dengan P2.



Gambar 5.7 Perbandingan rata-rata (a) lebar luka uji Mann-Whitney; (b) jumlah neutrofil uji Duncan; (c) jumlah makrofag uji Mann-Whitney; (d) jumlah fibrosit uji Duncan; (e) jumlah fibroblas uji Duncan; (f) densitas kolagen uji Duncan, dari masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke 3, 7, dan 14. Huruf berbeda di atas diagram menunjukkan perbedaan bermakna dari hasil uji Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). KN: kontrol normal, KD: kontrol diabetik, KAI: kontrol alginat *S. ilicifolium* 100 mg/kg BB, KAD: kontrol alginat *S. duplicatum* 100 mg/kg BB, P1: perlakuan alginat *S. ilicifolium*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB, P2: perlakuan alginat *S. duplicatum*-ekstrak buah okra 50 mg/kg BB.

Data rata-rata perhitungan jumlah neutrofil dapat dilihat pada Lampiran 11 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 12. Perbandingan rata-rata jumlah neutrofil untuk setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.7(b). Uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p=0,638$; $p>0,05$), sehingga data dilanjutkan ke uji homogenitas Lavene ($\alpha=0,05$) menunjukkan data homogen ($p=0,137$; $p>0,05$). Selanjutnya, uji *one-way* Anova ($\alpha=0,05$) menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,002$; $p<0,05$), kemudian dilanjutkan uji Duncan. Berdasarkan Gambar 5.7(b) tentang grafik pengukuran jumlah neutrofil, dapat dilihat bahwa kelompok KD memiliki jumlah neutrofil paling tinggi pada hari ke 3, 7, dan 14 ($133\pm 8,25$ sel/mm²; $65\pm 7,54$ sel/mm²; $42\pm 4,71$ sel/mm²), jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Sedangkan kelompok perlakuan (P1) memiliki jumlah neutrofil paling rendah pada hari 3, 7, dan 14 ($55\pm 8,25$ sel/mm²; $33\pm 1,65$ sel/mm²; $12\pm 1,18$ sel/mm²). Jumlah neutrofil semakin menurun dari hari ke 3 hingga hari ke 14. Penurunan yang terjadi pada setiap kelompok terjadi secara signifikan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kelompok KD berbeda signifikan dengan kelompok lainnya pada hari ke 3, 7, dan 14. Kelompok KN tidak berbeda signifikan dengan kelompok P1 dan P2, tetapi berbeda signifikan dengan kelompok KD, KAI dan KAD. Kelompok KAI dengan KAD dan kelompok P1 dengan P2 tidak menunjukkan berbeda signifikan.

Data rata-rata perhitungan jumlah makrofag dapat dilihat pada Lampiran 13 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 14. Perbandingan rata-rata jumlah makrofag setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.7(c). Data hasil pengukuran jumlah makrofag dianalisis uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan data terdistribusi normal ($p=0,242$; $p>0,05$), kemudian dilanjutkan uji homogenitas Lavene ($\alpha=0,05$) menunjukkan data tidak homogen ($p=0,001$; $p<0,05$). Data dilanjutkan uji Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,009$; $p<0,05$), sehingga dilakukan analisis uji Mann-Whitney untuk setiap kelompok. Berdasarkan Gambar 5.7(c) tentang grafik pengukuran jumlah makrofag, kelompok KD memiliki jumlah makrofag tertinggi dibandingkan dengan kelompok lain pada hari

Data rata-rata perhitungan jumlah fibroblas dapat dilihat pada Lampiran 17 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 18. Perbandingan rata-rata jumlah fibroblas untuk setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.7(e). Data hasil pengukuran jumlah fibroblas dari analisis histologi jaringan kulit dilakukan analisis statistik. Uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan data terdistribusi normal ($p=0,604$; $p>0,05$), kemudian dilanjutkan uji homogenitas Lavene ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan data homogen ($p=0,380$; $p>0,05$). Data dilanjutkan uji *one-way* Anova ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p=0,012$; $p<0,05$), kemudian dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui signifikansi antar kelompok. Berdasarkan Gambar 5.7(e) tentang grafik pengukuran jumlah fibroblas, kelompok KD memiliki jumlah fibroblas paling rendah jika dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke 3, 7, dan 14 ($11\pm 2,59$ sel/mm²; $20\pm 0,94$ sel/mm²; $14\pm 1,18$ sel/mm²). Sedangkan kelompok KN memiliki jumlah fibroblas paling tinggi pada hari ke 3, 7, dan 14 ($22\pm 1,65$ sel/mm²; $41\pm 2,36$ sel/mm²; $26\pm 1,41$ sel/mm²). Jumlah fibroblas perlakuan P1 mendekati kelompok KN pada hari ke 3, 7, dan 14 ($21\pm 0,94$ sel/mm²; $40\pm 0,24$ sel/mm²; $26\pm 1,89$ sel/mm²). Jumlah fibroblas meningkat pada hari ke 7 dan menurun pada hari ke 14 secara signifikan untuk semua kelompok. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kelompok KD berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok lain pada hari ke 3, 7, dan 14. Kelompok KN menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok KD, KAI, dan KAD, tetapi tidak berbeda signifikan terhadap kelompok P1 dan P2. Kelompok KAI dengan KAD dan kelompok P1 dengan P2 menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan pada hari ke 3, 7, dan 14.

Data rata-rata perhitungan densitas kolagen dapat dilihat pada Lampiran 19 dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 20. Perbandingan rata-rata densitas kolagen untuk setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.7(f). Data hasil pengukuran densitas kolagen dilakukan analisis statistik uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan data terdistribusi normal ($p=0,329$; $p>0,05$), kemudian dilakukan uji homogenitas Lavene ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan data homogen ($p=0,128$; $p>0,05$). Data dilakukan uji *one-way* Anova

($\alpha=0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,015$; $p<0,05$), sehingga data dilanjutkan uji Duncan. Berdasarkan Gambar 5.7(f) tentang grafik pengukuran densitas kolagen, kelompok KD memiliki densitas kolagen terendah jika dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke 3, 7, dan 14 ($30\pm0,6$ %; $35\pm0,05$ %; $61\pm4,96$ %). Sedangkan kelompok perlakuan P1 memiliki densitas kolagen tertinggi pada hari ke 3, 7, dan 14 ($59\pm5,05$ %; $82\pm2,14$ %; $89\pm7,01$ %). Densitas kolagen mengalami peningkatan hingga hari ke 14 untuk semua kelompok. Hasil uji Duncan menunjukkan kelompok KD berbeda signifikan terhadap kelompok lainnya pada hari ke 3, 7, dan 14. Kelompok KN berbeda signifikan dengan kelompok KD, KAI, dan KAD pada hari ke 3, 7, dan 14, tetapi tidak berbeda signifikan terhadap kelompok P1 dan P2. Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok KAI dengan KAD, dan kelompok P1 dengan P2.

Proses penyembuhan luka terbuka pada kondisi normal akan mengikuti proses hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan maturasi pada daerah luka secara baik karena efektivitas produksi sitokin dan *growth factor* yang diperlukan untuk perekrutan sel-sel pada penyembuhan luka terbuka. Pada kondisi normal, lebar luka akan menutup secara perlahan sekitar hari ke 7 hingga 14. Hal tersebut sesuai dengan kelompok KN yang mengalami penurunan lebar luka hingga hari ke 7 dan penutupan sempurna pada hari 14. Perekrutan neutrofil oleh pro-inflamasi mediator IL-1 dan TNF- α ke dalam jaringan luka akan terjadi pada fase hemostasis dan inflamasi sekitar hari ke 1 hingga 3 setelah terjadinya luka untuk membangun jaringan hemostasis melalui fagositosis mikroba dan perekrutan makrofag (Ellis *et al.*, 2018). Hal tersebut sesuai dengan produksi neutrofil kelompok KN tertinggi pada hari ke 3 dan penurunan hingga hari ke 14. Makrofag melakukan sekresi sitokin pro-inflamatory seperti IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α serta sitokin dan *growth factor* lainnya (Sica dan Manotovani, 2012). Secara normal, makrofag bertransisi sebagai anti-inflamasi untuk produksi sitokin dan *growth factor* seperti TGF- β , PDGF, FGF-2, VEGF yang berperan sebagai deposisi matriks dan berfungsi untuk fagositosis mikroba, sel mati, jaringan nekrosis, atau metabolit beracun sehingga menjaga kondisi bersih pada luka (Larouche *et al.*, 2018; Gordon dan Taylor, 2005). Makrofag berperan penting dalam penyembuhan luka terutama

pada angiogenesis, fibroplasia, proliferasi sel, dan transisi dari fase inflamasi pada hari ke 5-7 (Ellis *et al.*, 2018). Hal tersebut sesuai dengan produksi makrofag kelompok KN semakin meningkat hingga hari ke 7 dan menurun pada hari 14. Fibrosit dan fibroblas secara normal berperan dalam produksi matrik ekstraseluler (ECM) dan meningkatkan angiogenesis untuk pembentukan pembuluh darah dan proliferasi sel aktif hingga pembentukan kolagen (Grieb dan Bucala, 2012). Migrasi dan aktivitas fibrosit dan fibroblas ke area luka distimulasi oleh beberapa sitokin dan *growth factor* seperti PDGF, IL-1, TNF- α , TGF- β , FGF, KGF yang diproduksi oleh trombosit dan makrofag (desJardins-Park *et al.*, 2018). Fibrosit dan fibroblas dibutuhkan pada fase proliferasi sekitar hari ke 5-7 dan mengalami penurunan secara normal pada hari ke 14 ketika ECM luka yang baru terbentuk memiliki kekuatan tarik yang sama dengan jaringan sehat disekitarnya (Hinz *et al.*, 2007). Hal tersebut sesuai dengan jumlah fibrosit dan fibroblas dari kelompok KN yang tertinggi pada hari ke 7 dan mengalami penurunan hingga hari ke 14 saat terbentuk ECM dengan kekuatan tarik yang kuat. Fibroblas berdiferensiasi menjadi myofibroblas dengan bantuan beberapa *growth factor* seperti PDGF, TGF- β , FGF. Myofibroblast memproduksi fibril kolagen yang disusun dalam struktur berserat matrik ekstraseluler (ECM) sebagai kerangka untuk epitelisasi dan fase maturasi (*remodelling*) kolagen hingga terjadi penutupan luka pada hari ke 14 (Bainbridge, 2013). Hal tersebut sesuai dengan densitas kolagen kelompok KN yang semakin meningkat hingga hari ke 14 dan mengindikasikan bahwa densitas kolagen berperan dalam penutupan luka sempurna.

Kondisi diabetes melitus atau hiperglikemia menyebabkan kadar ROS meningkat dan memicu stres oksidatif sehingga mengganggu fase penyembuhan luka dan terbentuk luka kronis. Selain itu, kondisi diabetes melitus memicu peningkatan sekresi neutrofil dan makrofag berlebih yang menyebabkan ekspresi molekul pro-inflamasi berlebih sehingga menurunkan sitokin anti-inflamasi dan memicu inflamasi kronis. Beberapa neutrofil mengalami migrasi terbalik yang mendistribusikan kembali neutrofil ke lokasi lain yang menyebabkan peradangan berlebih (de Oliveira *et al.*, 2016). Kondisi diabetes dapat mengganggu migrasi dan proliferasi sel secara fungsional sehingga menurunkan kemampuan fibrosit dan

fibroblas dalam produksi matrik ekstraseluler untuk sintesis kolagen (Walker *et al.*, 2018; Buranasin *et al.*, 2018). Hal tersebut sesuai dengan kelompok KD yang mengalami re-epitelisasi tidak sempurna hingga hari ke 14 yang ditandai masih terdapat lebar luka pada hari ke 14. Kelompok KD terjadi sekresi berlebih neutrofil dan makrofag jika dibandingkan dengan kelompok KN, sehingga jumlah neutrofil dan makrofag kelompok KD berbeda signifikan dengan kelompok KN. Pada kelompok KD terjadi produksi fibrosit dan fibroblas yang rendah dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok KN. Gangguan migrasi fibrosit dan fibroblas juga menyebabkan pembentukan kolagen yang tidak maksimal pada kelompok KD yang berbeda signifikan dengan kelompok KN.

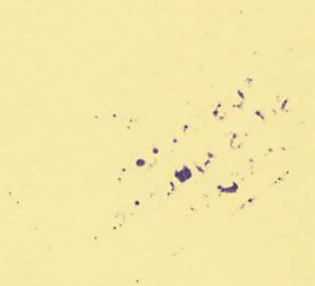
Penambahan natrium alginat *S. ilicifolium* pada kelompok KAI dan *S. duplicatum* pada kelompok KAD dapat mengoptimalkan proses penyembuhan luka terbuka diabetik yang ditunjukkan pada semua parameter luka. Penambahan natrium alginat pada kelompok KAI dan KAD dapat menurunkan lebar luka, neutrofil, makrofag secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KD dan penurunan mendekati kelompok KN. Selain itu, penambahan natrium alginat pada kelompok KAI dan KAD dapat meningkatkan fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KD dan peningkatan mendekati kelompok KN. Hal tersebut dikarenakan pemberian natrium alginat dapat berperan langsung sebagai absorber eksudat (agen hemostasis) sehingga menjaga kondisi lembab pada daerah luka secara fisiologis dan memungkinkan pertukaran oksigen yang cukup. Proses tersebut mempercepat fase hemostasis untuk penyembuhan luka. Sifat absorber dari natrium alginat dipengaruhi oleh proporsi residu M/G. Kandungan residu guluronat (G) yang tinggi mengakibatkan rotasi terhambat disekitar *linkage* glikosidik sehingga meningkatkan kemungkinan pertukaran ion untuk absorber luka dan donor proton pada proses *scavenging* radikal bebas (Uzun, 2018). Selain itu, dipengaruhi oleh potensi antioksidan dari natrium alginat yang berperan langsung sebagai *radical scavenger* ROS dan menurunkan stres oksidatif pada kondisi diabetes sehingga mempercepat penyembuhan luka melalui pembentukan jaringan granulasi, reepitelisasi, penurunan jumlah neutrofil, makrofag, serta peningkatan produksi fibrosit,

fibroblas, dan serat kolagen. Kelompok KAI dan KAD mengalami perubahan parameter luka mendekati kelompok KN tetapi masih terdapat perbedaan yang signifikan pada hari ke 3, 7, 14 dibandingkan kelompok KN. Hal tersebut mengindikasikan pemberian natrium alginat kurang efektif pada penyembuhan luka diabetik. Kelompok KAI pada semua parameter luka tidak berbeda signifikan dengan kelompok KAD. Hal tersebut dikarenakan rasio M/G dan nilai IC_{50} natrium alginat sebagai antioksidan pada kelompok KAI yang tidak berbeda jauh dengan kelompok KAD.

Penambahan kombinasi natrium alginat *S. ilicifolium* dengan ekstrak buah okra pada kelompok P1 dan natrium alginat *S. duplicatum* dengan ekstrak buah okra pada kelompok P2 dapat mengoptimalkan penyembuhan luka diabetik pada semua parameter luka (menurunkan lebar luka, neutrofil, makrofag, dan meningkatkan fibrosit, fibroblas, kolagen) secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KD dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok KN. Hal tersebut mengindikasikan bahwa penambahan kombinasi natrium alginat dan ekstrak buah okra memiliki kemampuan optimal untuk penyembuhan luka terbuka diabetik. Penyembuhan luka diabetik yang optimal dikarenakan peran natrium alginat sebagai absorber eksudat luka serta potensi antioksidan natrium alginat dan ekstrak buah okra yang berperan sebagai *radical scavenger* terhadap ROS untuk menurunkan stres oksidatif sehingga mengoptimalkan sekresi sitokin dan *growth factor* untuk migrasi dan proliferasi neutrofil, makrofag, fibrosit, dan fibroblas dalam pembentukan serat kolagen dalam susunan matriks ekstraseluler. Kelompok P1 pada semua parameter luka lebih efektif jika dibandingkan dengan kelompok P2 karena potensi antioksidan dan kandungan residu guluronat (G) alginat pada kelompok P1 lebih besar daripada kelompok P2 sehingga meningkatkan kemungkinan pertukaran ion pada absorber eksudat luka dan *scavenging* radikal bebas. Tetapi, kelompok P1 tidak berbeda signifikan dengan kelompok P2 pada semua parameter luka. Hal tersebut dikarenakan rasio M/G dan nilai IC_{50} sebagai antioksidan pada kedua kelompok tersebut yang tidak berbeda jauh. Kelompok P1 dan P2 lebih efektif dalam penyembuhan luka diabetik jika dibandingkan dengan kelompok KAI dan KAD untuk semua parameter luka. Hal tersebut dikarenakan ekstrak buah okra

dalam kelompok P1 dan P2 memiliki sifat antioksidan kuat jika dibandingkan dengan natrium alginat pada kelompok KAI dan KAD yang memiliki sifat antioksidan sedang. Penyembuhan luka diabetik yang optimal pada kelompok P1 dan P2 berhubungan dengan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan pada kelompok P1 dan P2 oleh natrium alginat dan ekstrak buah okra sebagai efek antioksidan.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN



6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang diperoleh sebagai berikut:

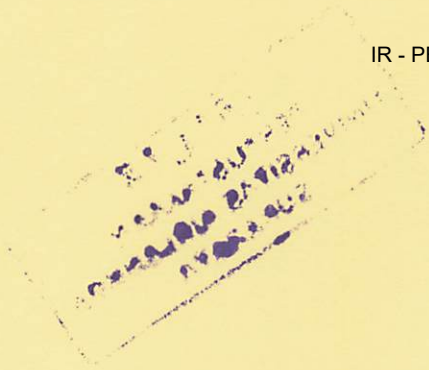
1. Hasil identifikasi natrium alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* menunjukkan adanya gugus fungsi khas dari struktur alginat dengan berat molekul masing-masing $3,45 \times 10^4$ Da dan $2,65 \times 10^4$ Da. Rasio M/G kedua alginat yang diperoleh masing-masing sebesar 0,61 dan 0,54 sebagai blok homopolimer dengan kandungan asam guluronat yang lebih besar.
2. Hasil uji antioksidan diperoleh nilai IC_{50} dari natrium alginat *S. ilicifolium* (120,88 $\mu\text{g/mL}$) dan natrium alginat *S. duplicatum* (125,31 $\mu\text{g/mL}$) sebagai antioksidan sedang, ekstrak buah okra (65,87 $\mu\text{g/mL}$) sebagai antioksidan kuat, kombinasi alginat *S. ilicifolium*-okra (75,94 $\mu\text{g/mL}$) dan alginat *S. duplicatum*-okra (79,34 $\mu\text{g/mL}$) sebagai antioksidan kuat dengan kandungan total flavonoid ekstrak buah okra sebesar 43,96 mg(QE)/g ekstrak.
3. Pemberian salep kombinasi natrium alginat *S. ilicifolium*-okra dan *S. duplicatum*-okra dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetik.
4. Pemberian salep natrium alginat *S. ilicifolium*, *S. duplicatum* dan ekstrak buah okra dapat memberikan efek antioksidan sehingga meningkatkan efektifitas perekrutan neutrofil, makrofag, fibrosit, fibroblas, dan densitas kolagen untuk mempercepat proses penyembuhan luka terbuka pada mencit diabetik.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, penulis menyarankan untuk penelitian selanjutnya dilakukan analisis NMR dan karakterisasilain yang lebih lengkap, sehingga dapat mengetahui urutan blok dari struktur alginat maupun sifat fisik dan sifat kimia secara detail. Hal tersebut untuk mengetahui peran alginat dalam proses

penyembuhan luka terbuka. Selain itu, variasi penggunaan dosis perlu dilakukan untuk penelitian selanjutnya sehingga dapat menentukan dosis optimum kombinasi alginat *S. ilicifolium* dan *S. duplicatum* dengan ekstrak buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) dalam penyembuhan luka terbuka mencit diabetik.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Adelakun, O.E., Oyelade, O.J., Ade-Omowaye, B.I., Adeyemi, I.A., and Van de Venter, M., 2009, Chemical Composition and The Antioxidative Properties of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) Flour, *Food Chemistry Toxicology*, 47(1), 1123-6.
- Ahiakpa, J. K., Amoatey, H. M., Amenorpe, G., Apatey, J., Aych, E. A., Quartey, E. K., and Agbemavor, W. S., 2014, Mucilage Content of 21 Accessions of Okra (*Abelmoschus* spp L.), *Science Agricultural*, 2(2), 96-101.
- American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology, 2010, Statement on the use of hemoglobin A1C for the diagnosis of diabetes, *Endocrine Practice*, 16(4), 155-156
- American Diabetes Association, 2015, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 38(1), 8-16.
- American Diet Association (ADA), 2012, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 35(2), 64-71.
- Amita, K., Balqis, U., dan Iskandar, C.D., 2017, Gambaran histopatologi penyembuhan luka sayat pada mencit (*Mus musculus*) menggunakan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia (tenore) steenis*), *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(3), 584-591.
- Andrews, S.N., Jeong, E., Prausnitz, M.R., 2013, Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum, *Pharmaceutical Research*, 30(4), 1099-109.
- Arapitsas, P., 2008, Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. *Food Chemistry*, 110(1), 1041-1045.
- Atkins, P., and Paula, J.D., 2010, Atkins' Physical Chemistry: 9th edition. University Press, Oxford.
- Babitha, S., Rachita, L., Karthikeyan, K., Shoba, E., Janani, I., and Poornima, B., 2017, Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International Journal Pharmaceutics*, 523(1), 52-90.
- Bainbridge, P., 2013, Wound healing and the role of fibroblasts, *Journal of wound care*, 22(8), 113-116.
- Baron, A., Robert, and Donn, B., 2003, *Psikologi Sosial* edisi sepuluh. Airlangga, Jakarta.

- Bhaskar, N., and Miyashita, K., 2005, Lipid composition of *Padina tetratomica* brown seaweed of the west coast of India, *Indian Journal Fish*, 52(3), 263-8.
- Bixler, H.J. and Porse, H., 2011, A decade of Change in The Seaweed Hydrocolloids Industry, *Journal Applied Phycology*, 23(5), 3.
- Belattmania, Z., Reani, A., Barakate, M., Zrid, R., Elatouani, S., Hassouani, M., Eddaoui, A., Bentiss, F., Sabour, B., 2016, Antimicrobial, antioxidant and alginate potentials of *Dictyopteris polypodioides* (Dictyotales, Phaeophyceae) from the Moroccan Atlantic coast, *Der Pharma Chemica*, 8(2), 216-226.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181(1), 1199-1200.
- Bogninou G.S.R., Bigo A.P.H., Gnanwe M., Agbangnan D.C.P., Chabi N.W., Yedomonhan H., Avlessi F., 2018, Phytochemical Composition and Antioxydant Capacity of *Abelmoschus esculentus* L. Fresh Immature Fruits, *American Journal of Food Science and Technology*, 6(5), 223-227.
- Calisir, S., Ozcan, M., Haciseferogullari, H., and Yildiz, M. U., 2005, A study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta*) seeds, *Journal of Food Engineering*, 68(1), 73-78.
- Caluete, M.E.E., de Souza, L.M.P., dos Santos Ferreira, E., de Franca, A.P., de Akneuda Gadelha, C.A., de Souza Aquino, J., and Santi-Gadelha, T., 2014, Nutritional, antinutritional, phytochemical status of okra leaves (*Abelmoschus esculentus*) subjected to different processes, *African Journal Biotechnology*, 14(4), 683-687.
- Capapas, C.A., Reas, D.D., 2012, Wound healing activity of the extract from the fresh fruits of Okra, *Abelmoschus esculentus* (Linn.,1753) on rabbits. *Health Research and Development Information Network*, 2(1), 32-39.
- Chauhan, D. V. S., 1972, *Vegetable Production in India*, 3rd ed., Agra India, Ram Prasad and Sons.
- Chandía, N.P., Matsuhiro, B., Vásquez, A.E., 2001, Alginate acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, 46(3), 81-87.
- Chen, Y., Yu, Q., and Xu, C., 2017, A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(10), 14904-14910.

- Christensen, J.M., Chang, C.M., Le, H., Pham, L., Bendas, E., 2014, Hydrocortisone diffusion through synthetic membrane, mouse skin, and Epiderm™ cultured skin, *Arch Drug Info*, 4(2), 10-22.
- Costa, M., 2003, Potential hazard of hexavalent chromate in our drinking water, *Journal Toxicology Applied Pharmacology*, 188(3), 368-375.
- Cui SW. 2005. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Application 1st Ed, CRC Press, Boca Raton.
- Daniels, R., Knie, U., 2007, Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 5(1), 367-83.
- de Oliveira, S., Rosowski, E.E., Huttenlocher, A., 2016, Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse, *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 378-91.
- desJardins-Park, H.E., Foster, D.S., and Longaker, M.T., 2018, Fibroblasts and wound healing: an update, *Regenerative Medicine*, 13(5), 213-218.
- Draget, K. I., Smidsrød, O., and Skjåk-Bræk, G., 2005, *In Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production and Patents*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany.
- Dong, Z., Zhang, J. G., Tian, K. W., Pan, W. J., and Wei, Z. J., 2014, The fatty oil from okra seed: Supercritical carbon dioxide extraction, composition and antioxidant activity, *Current Topics Nutraceutical Research*, 12(3), 75-84.
- Draget, K.I., B. Strand, M., Hartmann, S., Valla, O., Smidsrod and Skjak-Braek, G., 2000, Ionic and acid gel formation of epimerised alginates: The effect of AlgE4, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(2), 117-122.
- Dyson, M., Young, S.R., Pendte, L., Webster, D.F., and Lang, S., 1991, Comparison of The Effects of Moist and Dry Conditions on Dermal Repair, *Journal Invest Dermatology*, 91(3), 434-439.
- Ellis, S., Lin, E.J., Tartar, D., 2018, Immunology of Wound Healing, *Current Dermatology Reports*, 7(1), 350-358.
- Eming, S. A., Martin, P., and Tomic-Canic, M., 2014, Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation, *Science Translational Medicine*, 6(5), 265-266.

- Fenoradosoa, T.A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., and Michaud, P., 2010, Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow, *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 131–137.
- Frank, R. N., 2004, Diabetic retinopathy, *New England Journal Medicine*, 350(1), 48-58.
- Frykberg, R.G., Armstrong, D.G., and Giurini, J., 2000, Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline, *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 39(5), 1–60.
- Ganapathi, K., Subramanian, V., and Mathan, S., 2013, Bioactive Potentials of Brown Seaweeds, *Sargassum myriocystum* J. Agardh, *S.Plagiophyllum* C.Agardh and *S.Ilicifolium* (Turner) J. Agardh, *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3(5), 105-111.
- Gemedede, H. F., Haki, G. D., Beyene, F., Woldegiorgis, A. Z., and Rakshit, S. K., 2015, Proximate, mineral, and antinutrient compositions of indigenous Okra (*Abelmoschus esculentus*) pod accessions: Implications for mineral bioavailability, *Food Science Nutrional*, 4(1), 223–233.
- Gordon, S., and Taylor, P.R., 2005, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953–64.
- Grasdalen, H., Larsen, B., Smidsrod, O., 1979, A P.M.R. study of the composition and sequence of urinate residues in alginates, *Carbohydrate Research*, 68(1), 23–31.
- Grasdalen, H., 1983, High-field, 'H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations, *Carbohydrate Research*, 118(3), 255-260.
- Grieb, G. and Bucala, R., 2012, Fibrocytes in Fibrotic Diseases and Wound Healing, *Advances In Wound Care*, 1(1), 11-17.
- Hamilton, R. and Julie, 2018, Diabetic Ulcers: Everything You Need to Know, *Healing Your Wound*, 6(3), 201-208.
- Hayat, N.Q., Nadir, S., and Rabia, A., 2015, Quantitative Comparison of Mast cells in Major Salivary Glands in Hypothyroid State, *Journal of Rawalpindi Medical College*, 19(3), 263-267.
- Hinz, B., Phan, S., and Thannickal, T., 2007, The myofibroblast one function, mutiple origins, *The American Journal of Pathology*, 170(6), 1807–1815.

- Hossain, M.K., Dayem, A.A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Saha, S.K., Yang, G., Choi, H.Y., and Cho, S., 2016, Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 569-573.
- Hu, L., Yu, W., Li, Y., Prasad, N., and Tang, Z., 2014, Antioxidant activity of extract and its major constituents from okra seed on rat hepatocytes injured by carbon tetrachloride. *Biomedical Research International*, 2(1), 341-291.
- Husni, A., Purwanti, D., and Ustadi, 2016, Blood Glucose Level and Lipid Profile of Streptozotocin-induced Diabetes Rats Treated with Sodium Alginate from *Sargassum crassifolium*, *Journal of Biological Sciences*, 16(3), 58-64.
- Idris, S., Yisa, J., and Itodo, A., 2009, Proximate and mineral composition of the leaves of *Abelmoschus esculentus*, *International Journal Tropical Agricultural Food System*, 3(1), 50037.
- Indrani, D.J., and Budianto, E., 2013, A study of extraction and characterization of alginates obtained from brown macroalgae *Sargassum duplicatum* and *Sargassum crassifolium* from Indonesia, *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 46(2), 65-70.
- Ip, M., 2011, *Antimicrobial dressings*, Woodhead Publishing Limited, Department of Microbiology, Chinese University of Hong Kong.
- Jain, N., 2012, A review on *Abelmoschus esculentus*, *Pharmacacia*, 1(2), 1-8.
- Jain, N., Jain, R., Jain, V., and Jain, S.A., 2012, Review on: *Abelmoschus esculentus*, *Pharmacacia*, 1(3), 84-89.
- James, W. D., Berger, T. G., and Elston, D. M., 2006, *Diseases of the skin: Clinical dermatology* (10th ed), Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Jarret, R. L., Wang, M. L., and Levy, I. J., 2011, Seed oil and fatty acid content in okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 59(1), 4019-4024.
- Joslin Diabetes Center, 2019, Goals for Blood Glucose Control, https://www.joslin.org/info/goals_for_blood_glucose_control.html
- Kang, J. Y., Khan, M. N., Park, N. H., Cho, J. Y., Lee, M. C., Fujii, H., and Hong, Y. K., 2008, Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice, *Journal Ethanopharmacol*, 116(5), 187-90.

- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, 16(3), 22-29.
- Larsen, B., Salem, D.M.S.A., Sallan, M.A.E., Mishrikey, M.M., Beltagy, A.I., 2003, Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Seacoast, *Carbohydrate Research*, 338(5), 2325–2336.
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., and Martino, M.M., 2018, Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets, *Advances In Wound Care*, 0(0), 00.
- Lengsfeld, C., Titgemeyer, F., Faller, G., and Hensel, A., 2004, Glycosylated Compounds From Okra Inhibit Adhesion of Helicobacter Pylori to Human Gastric Mucosa, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52(1), 1495-503.
- Liao, H., Liu, H., and Yuan, K., 2012, A New Flavonol Glycoside from The *Abelmoschus esculentus* Linn, *Pharmacognosy Magazine*, 8(3), 12-5.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., 2008, Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy, *Curr Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-46.
- Llanes, F., Sauriol, F., Morin, F.G., Perlin, A.S., 1997, An examination of sodium alginate from *Sargassum* by NMR spectroscopy, *Canadian Journal of Chemistry*, 75(6), 585-590.
- Lo, T.C.T., Chang, C.A., Chiu, K.H., Tsay, P.K., Jen, J.F., 2011, Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods, *Carbohydrate Polymers*, 86(8), 320–327.
- Majid, M., Das, S., and Baker, A.B., 2016, Syndecan-4 Enhances Pdgf-Bb Activity In Diabetic Wound Healing, *Acta Biomaterialia*, 42(1), 56-65.
- Martin, F., 1982, Okra, Potential Multiple-Purpose Crop for the Temperate Zones and Tropics, *Economic Botany*, 36(3), 340–345.
- Mathes, S.H., Ruffner, H., Graf-Hausner, U., 2014, The use of skin models in drug development, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69(7), 81-102.
- Mathlouthi, M., Koenig, J.L., 1986, Vibrational spectra of carbohydrates, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44(2), 87–89.
- Mushollaeni, W., Supartini, N., and Rusdiana, E., 2014, Toxicity Test of Alginate from *Sargassum* and *Padina* on the Liver of Mice, *Food and Public Health*, 4(4), 204-208.

- Mokabberi, R., and Ravakhah, K., 2007, Emphysematous urinary tract infections: diagnosis, treatment and survival (case review series), *American Journal Medical Science*, 333(2), 111-116.
- Montgomery, D.C., 2001, *Design and Analysis of Experiments*, 5th edition, New York: John Wiley & Sons.
- Natarajan, S., Shanmugiahthevar, K. P., and Kasi, P. D., 2009, Cholinesterase inhibitors from Sargassum and Gracilaria gracilis: Seaweeds inhibiting south Indian costal areas aslant, Gulf of Mannar, *Natural Product Research*, 23(2), 355-69.
- Novelli, M., Bonamasa, B., Masini, M., Funel, N., Canistro, D., Martano, M., Soleti, A., 2010, Persistent correction of hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice by a non-conventional radical scavenger, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 382(3), 127-137.
- Ode, I., 2014, Kandungan Alginat Rumput Laut *Sargassum crassifolium* Dari Perairan Pantai Desa Hutumuri Kota Ambon, *Jurnal Ilmiah Agribisnis dan Perikanan*, 6(3), 234-241.
- Parinet and Sharon, 2005, Diabetic Foot Ulcers, *The Journal of the American Medical Association*, 293(2), 260-265.
- Patzelt, A., Lademann, J., Richter, H., Darvin, M.E., Schanzer, S., Thiede, G., 2012, In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier, *Skin Research Technology*, 18(2), 364-369.
- Paul, M. A., Christopher, I. R., Ross, C., Ian, R. R., 2007, Nutritional value of edible seaweeds. *International Life Sciences Institute Special paper*, 1(1), 535-533.
- Pereira, L., 2016, *Edible seaweeds of the world*, science center/imar, institute of marine research, university Coimbra, crc press.
- Pereira, L., Gheda, S.F., Ribeiro-Claro, P.J.A., 2013, Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries, *International Journal Carbohydrate Chemistry*, 18(2), 364-369.
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Barros, L., and Ferreira, I., 2018, Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of Mediterranean okra genotypes in relation to harvest stage, *Food Chemistry*, 242(2), 466-474.

- Prieto, J. M., 2016, Procedure: Preparation of DPPH radical, and antioxidant scavenging assay.
- Prompers, L., Schaper, N., Apelqvist, J., Edmonds, M., Jude, E., and Mauricio, D., 2008, Prediction of Outcome in Individuals With Diabetic Foot Ulcers: Focus on The Differences Between Individuals With and Without Peripheral Arterial Disease, *The Eurodiale Study Diabetologia*, 51(5), 747-755.
- Qhureshi, Z., 2007, Breeding investigation in bhendi (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), Master Thesis, University of Agriculture Sciences, GKVK, Bangalore, India.
- Qin, Y., 2008, Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 57(4), 171–180.
- Rakieten, N., Gordon, B. S., Beaty, A., Cooney, D. A., Davis, R. D., and Schein, P. S., 1971, Pancreatic islet cell tumors produced by the combined action of streptozotocin and nicotinamide, *Proceedings Society Experimental Biology Meicine*, 73(7), 280-283.
- Raisi-Nafchi, M., Kavooosi, G., and Nasiri, S. M., 2016, Physico-mechanical and antioxidant properties of carboxymethylcellulose and alginate dispersions and essential oil based films for use as food packaging materials, *Academia Journal of Food Research*, 4(1), 001-010.
- Rastogi, V. and Yadav, P., 2012, Transdermal drug delivery system: An overview, *Asian Journal of Pharmaceutics*.
- Rasyid, A., 2003, Algae Coklat (*Phaeophyta*) Sebagai Sumber Alginat: oseanografi LIPI, *Oseana*, 28(1), 33–38.
- Rinaudo, M., 2008, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polymer International*, 57(1), 397–430.
- Roy, A., Shrivastava, S. L., and Mandal, S. M., 2014, Functional properties of Okra *Abelmoschus esculentus* L. (Moench): Traditional claims and scientific evidences, *Plant Science*, 1(3), 121–130.
- Rozario, T., DeSimone, D.W., 2010, The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view, *Developmental Biology*, 341(3), 126–140.

- Ruela, A.L.M., Perissinato, A.G., Lino, M.E.S., Mudrik, P.S., Pereira, G.R., 2016, Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(3), 56-54.
- Sabitha, V., Ramachandran, S., Naveen, K.R., and Panneerselvam, K., 2011, Antidiabetic and Antihyperlipidemic Activity of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Journal Pharmacy Bioallied Sciences*, 3(3), 397-402.
- Sandu, O., Song, K., Cai, W., Zheng, F., Uribarri, J., and Vlassara, H., 2005, Insulin resistance and type 2 diabetes in High-Fat-Fed mice are linked to high glycotoxin, *Diabetes*, 54(2), 65-69.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y., and Suzuki, T., 2004, Antioxidant Activity of Methanol Extracts from Indonesian Seaweeds in an Oil Emulsion Model, *Fisheries Science*, 70(2), 183-188.
- Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J., Jeftić, J., Benvegna, T., 2016, Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties, *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1915-29.
- Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H.B., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., Dahia, M., Mechichi, T., Hajji, M., and Nasri, M., 2015, Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed, *International Journal of Biological Macromolecul*, 72(1), 1358-1367.
- Sengkhampan, N., Verhoef, R., Schols, H.A., Sajjaanantakul, T., and Voragen, A.G., 2009, Characterisation of Cell Wall Polysaccharides from Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), *Carbohydrate Research*, 344(6), 1824-1832.
- Shui, G., Peng, L.L., 2004, An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn, *Journal of Chromatography*, 1048(2), 17-24.
- Sica, A. and Mantovani, A., 2012, Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas, *Journal Clinical Investigation*, 122(3), 787-95
- Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P., Ray, B., 2010, Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity, *Phytochemistry*, 71(1), 235-242.
- Sivagnanavelmurugan, M., Radhakrishnan, S., Palavesam, A., Arul, V., and Immanuel, G., 2018, Characterization of Alginic Acid Extracted From

- Sargassum wightii* and Determination of Its Antiviral Activity on Shrimp *Penaeus Monodon* Postlarvae Against White Spot Syndrome Virus, *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(4), 1863-1872.
- Smidsrød, O., Glover, R. M., and Whittington, S. G., 1973, The relative extension of alginates having different chemical composition, *Carbohydrate Research*, 27(1), 107–118.
- Steyn, N. P., McHiza, Z., Hill, J., Davids, Y. D., Venter, I., Hinrichsen, E., Opperman, M., Rumbelow, J., and Jacobs P., 2014, Nutritional contribution of street foods to the diet of people in developing countries: A systematic review, *Public Health Nutrition*, 17(1), 1363–1367.
- Sumithra, M., and Arunachalam, G., 2016, Acute and subacute oral toxicity study of *Sargassum ilicifolium* Turner C. Agardh in rodents, *International Journal PharmTech Research*, 6(2), 821-828.
- Sunilson, J. A., Jayaraj, P., Mohan, M. S., Kumari, A. A., and Varatharajan, R., 2008, Antioxidant and hepatoprotective effect of the roots of *Hibiscus esculentus* Linn. *International Journal Green Pharmacy*, 2(6), 200–203.
- Suyanto, Ain, K., Husen, S. A., and Zakki, F. M., 2017, 2,2-Dichloro Carboxymethyl Chitosan with Crosslinker Urea-Terephthalic acid as Wound Healing on Mice, *Der Pharma Chemica*, 9(9), 168-174.
- Suzuki, Y., Nishimura, Y., Tanihara, M., Suzuki, K., Kitahara, A.K., Yamawaki, Y., Nakamura, T., Shimizu, Y., and Kakimaru, Y., 1998, Development of Alginate Gel Dressing, *Journal Artif Organs*, 1(1), 28-32.
- Szkudelski, T., 2001, The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas, *Physiology Research*, 50(5), 536-546.
- Şen, M., 2011, Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation, *Applied Radiation and Isotopes*, 69(1), 125–129.
- Şen. M., Atik, H., 2012, The antioxidant properties of oligo sodium alginates prepared by radiation-induced degradation in aqueous and hydrogen peroxide solutions, *Radiation Physics and Chemistry*, 81(1), 816–822.
- Testa, R., Bonfigli, A.R., Genovese, S., Nigris, V.D., Ceriello, A., 2016, The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications, *Nutrients*, 8(1), 310.

- Turns, M., 2011, The diabetic foot: an overview of assessment and complications, *British Journal of Nursing*, 20(2), 19–25.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2010, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Uzun, M., 2018, A Review of wound management materials, *Journal of Textile Engineering & Fashion Technology*, 4(2), 121.
- Verma, A.K., Singh, H., Satyanarayana, M., 2012, Flavone-based novel antidiabetic and antidyslipidemic agents, *Journal Medical Chemistry*, 55(10), 4551–4567.
- Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D.G., and Sabolinski, M.L., 2001, Apligraf Diabetic Foot Ulcer S Graftskin: A Human Skin Equivalent is Effective in The Management of Noninfected Neuropathic Diabetic Foot Ulcers: A Prospective Randomized Multicenter Clinical Trial, *Diabetes Care*, 24(2), 290-295.
- Viuda-Martos, M., Opez-Marcos, M. C. L, Fernandez-L'opez, J., Sendra E., Lopez-Vargas J. H., and P'erez- Alvarez, J. A., 2010, Role of fiber in cardiovascular diseases: Comprehensive Review, *Food Science and Food Safety*, 9(2), 240-258.
- Walker, A., Nissen, E., and Geiger, A., 2018, Migratory, Metabolic and Functional Alterations of Fibrocytes in Type 2 Diabetes, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 0(0), 1-11.
- Wang, T., Li, Q., Bi, K., 2018, Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate, *Asian journal of pharmaceutical sciences* 13(2), 12–23.
- Wang, T., Gu, Q., Zhao, J., Mei, J., Shao, M., Pan, Y., Zhang, J., Wu, H., Zhang, Z., Liu, F., 2015, Calcium alginate enhances wound healing by up-regulating the ratio of collagen types I/III in diabetic rats, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6636-6645.
- Wei, C., Yang, X., Wang, D., Fang, F., Lai, J., Wang, F., and Wu, T., 2016, Fatty acid composition and evaluation on antioxidation activities of okra seed oil under ultrasonic wave extraction, *Cereals Oils Association*, 31(2), 89–93.
- Widowati, I., Susanto, A. B., Puspita, M., Stiger-Pouvreau, V., and Bourgougnon, N., 2013, Potentiality of Using Spreading Sargassum Species from Jepara, Indonesia as an Interesting Source of Antibacterial and Antioxidant

Compound : A Preliminary Study. *21st International Seaweed Symposium. International Seaweed Association Council*, 118(1), 21.

Winarno, F.G., 1996, *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*, Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.

Witte, M., Barbul, A., 1997, General principles of wound healing, *Surgical Clinics of North America*, 77(2), 509–528.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rendemen natrium alginat

Sargassum ilicifolium

Berat sampel mula-mula = 150 g

Berat natrium alginat yang diperoleh = 21,536 g

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen natrium alginat} &= \frac{\text{Berat yang diperoleh}}{\text{Berat sampel mula-mula}} \times 100\% \\ &= \frac{21,536 \text{ g}}{150 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 14,36 \% \end{aligned}$$

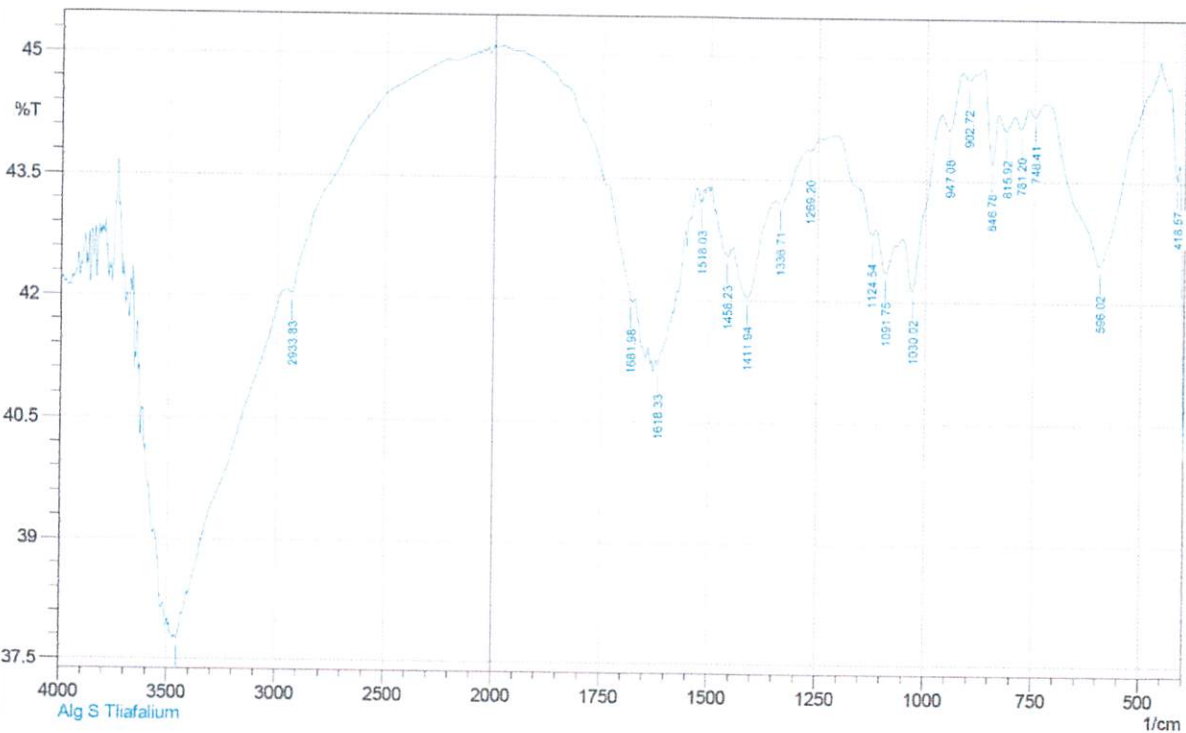
Sargassum duplicatum

Berat sampel mula-mula = 150 g

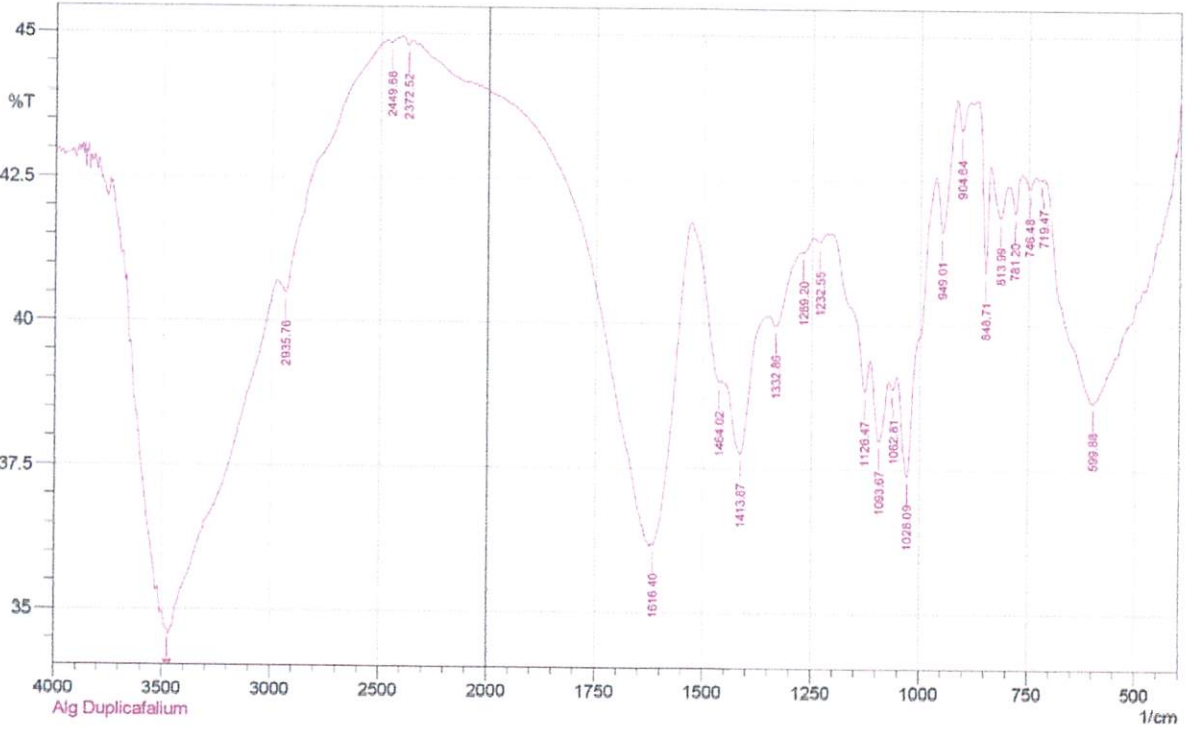
Berat natrium alginat yang diperoleh = 18,210 g

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen natrium alginat} &= \frac{\text{Berat yang diperoleh}}{\text{Berat sampel mula-mula}} \times 100\% \\ &= \frac{18,210 \text{ g}}{150 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 12,14 \% \end{aligned}$$

Lampiran 2. Spektrum FT-IR

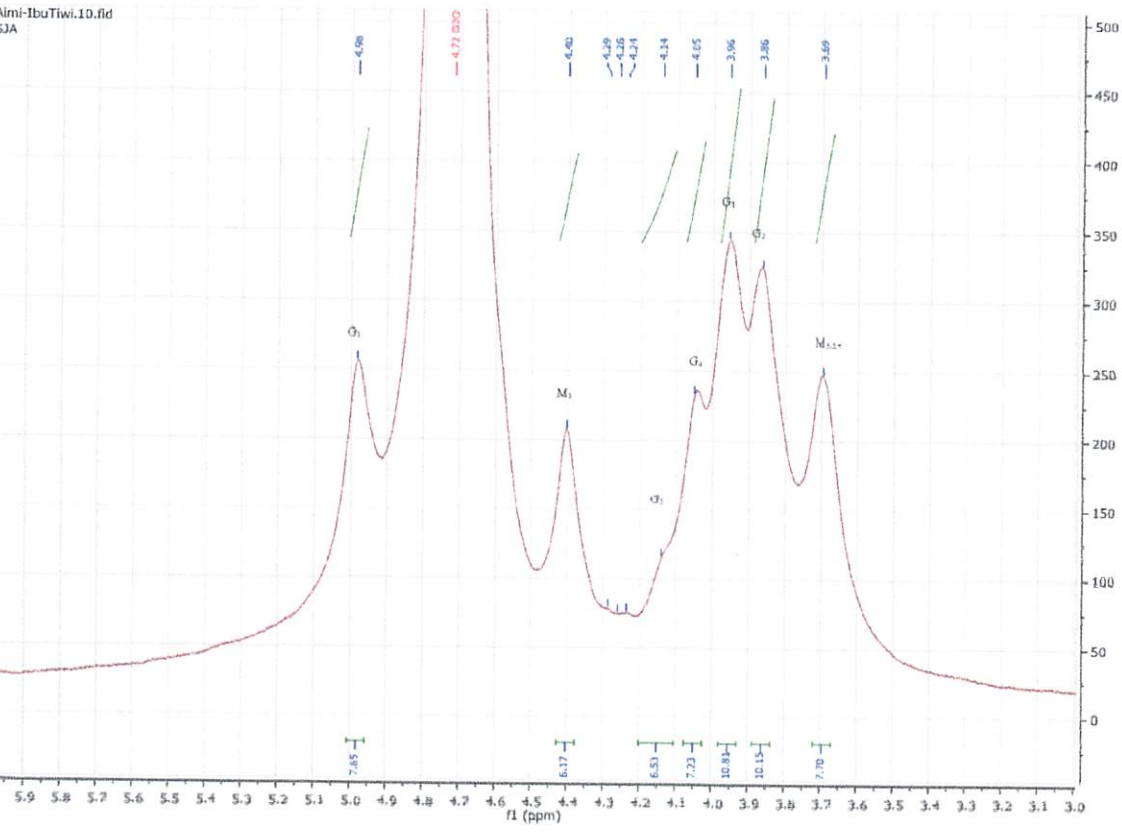
Sargassum ilicifolium

Sargassum duplicatum



Lampiran 3. Spektrum ¹H-NMR dan Perhitungan penentuan rasio M/G

Sargassum ilicifolium



δ (ppm)	Atom H	Integrasi
3,70	M _{2,-3,-4}	7,70
3,86	G ₂	10,15
3,96	G ₃	10,81
4,05	G ₄	7,23
4,14	G ₅	6,53
4,40	M ₁	6,17
4,98	G ₁	7,85

$$I_A = 7,85$$

$$I_B = 6,17$$

$$I_C = 6,53$$

$$F_{GG} = \frac{I_C}{(I_B + I_C)}$$

$$= \frac{6,53}{(6,17 + 6,53)}$$

$$= 0,514$$

$$F_{MG} = F_{GM}$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G$$

$$F_{GM} = F_{MG} = F_G - F_{GG}$$

$$= 0,62 - 0,514$$

$$= 0,106$$

$$\eta = \frac{F_{MG}}{F_G \times F_M}$$

$$= \frac{0,106}{0,62 \times 0,38}$$

$$= 0,45$$

$$\eta < 1$$

$$F_G = \frac{I_A}{(I_B + I_C)}$$

$$= \frac{7,85}{(6,17 + 6,53)}$$

$$= 0,62$$

$$F_M = 1 - F_G$$

$$= 1 - 0,62$$

$$= 0,38$$

$$M/G = \frac{F_M}{F_G}$$

$$= \frac{0,62}{0,38}$$

$$= 0,61$$

Sargassum duplicatum

δ (ppm)	Atom H	Integrasi
3,69	M _{2,-3,-4}	12,07
3,86	G ₂	14,00
3,96	G ₃	21,68
4,05	G ₄	9,31
4,13	G ₅	5,24
4,40	M ₁	9,02
4,98	G ₁	7,77

$$I_A = 7,77$$

$$I_B = 9,02$$

$$I_C = 5,24$$

$$F_G = \frac{I_A}{(I_B + I_C)}$$

$$= \frac{7,77}{(9,02 + 5,24)}$$

$$= 0,54$$

$$F_M = 1 - F_G$$

$$= 1 - 0,54 = 0,46$$

$$M/G = \frac{F_M}{F_G}$$

$$= \frac{0,46}{0,54}$$

$$= 0,85$$

$$F_{MG} = F_{GM}$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G$$

$$F_{GM} = F_{MG} = F_G - F_{GG}$$

$$= 0,54 - 0,37$$

$$= 0,17$$

$$F_{GG} = \frac{I_C}{(I_B + I_C)}$$

$$= \frac{5,24}{(9,02 + 5,24)}$$

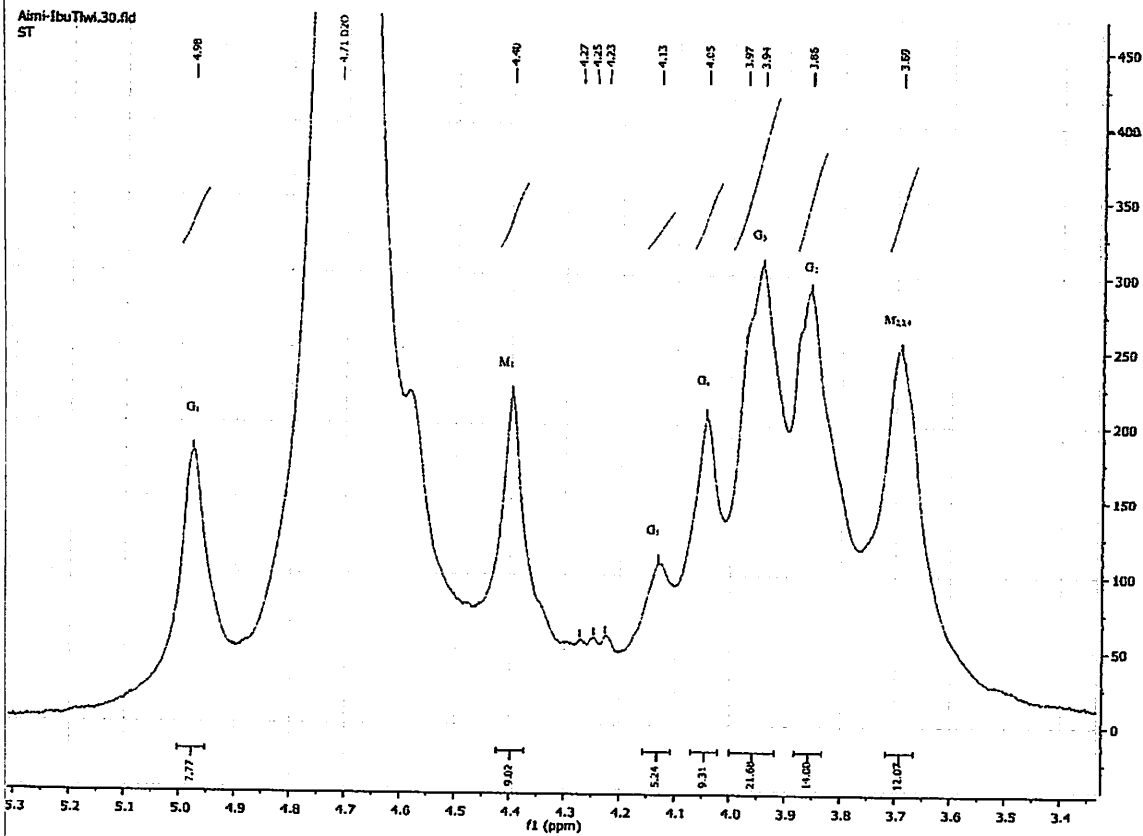
$$= 0,37$$

$$\eta = \frac{F_{MG}}{F_G \times F_M}$$

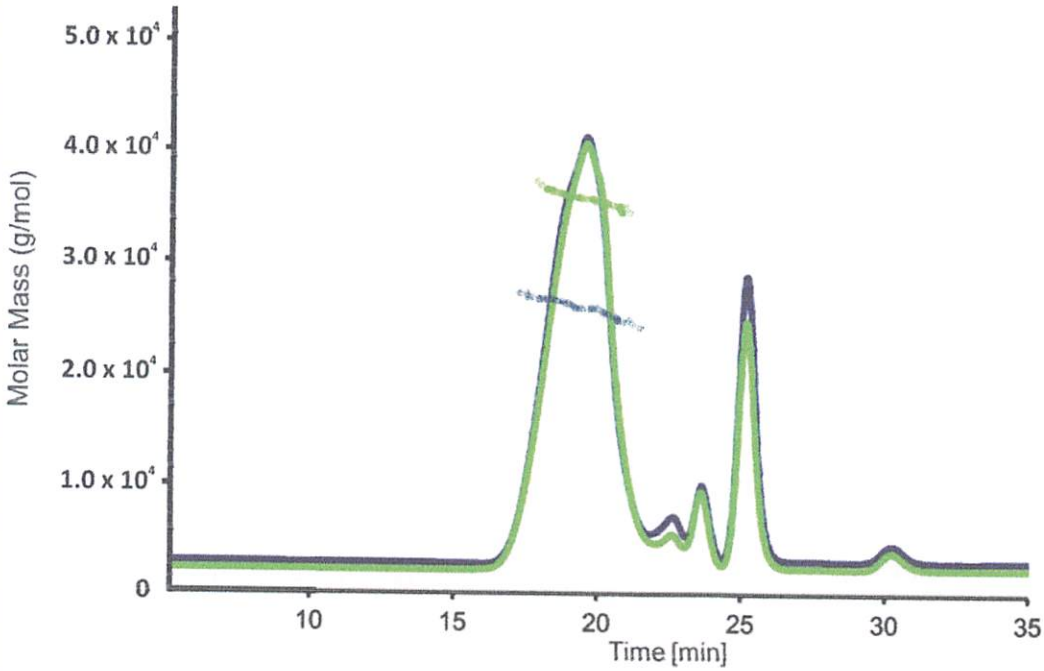
$$= \frac{0,17}{0,54 \times 0,46}$$

$$= 0,68$$

$$\eta < 1$$



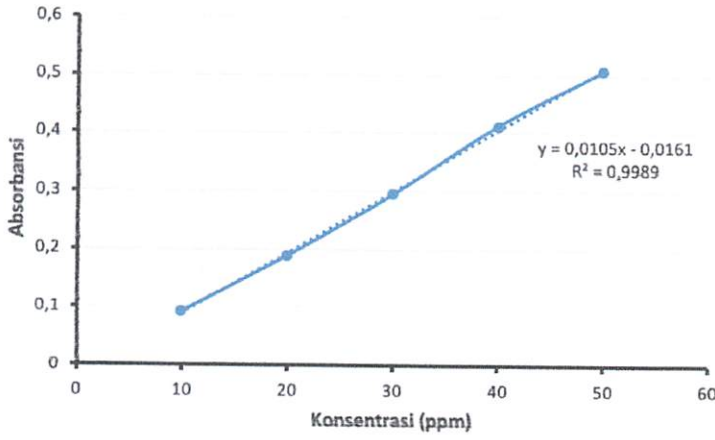
Lampiran 4. SEC-MALLS



No.	Sampel	M _w (kDa)	M _n (kDa)	Polydispersity Index (PDI)
1.	<i>S. ilicifolium</i> (1)	36,2	20,3	1,78
	<i>S. ilicifolium</i> (2)	34,5	20,0	1,73
	Rata-rata	35,3	20,1	1,76
2.	<i>S. duplicatum</i> (1)	26,5	15,6	1,70
	<i>S. duplicatum</i> (2)	28,9	14,2	2,03
	Rata-rata	27,7	14,9	1,86

Lampiran 5. Hasil Total Kandungan Flavonoid Ekstrak Buah Okra

Konsentrasi standar quersetin (C)	Absorbansi
10	0,093
20	0,189
30	0,295
40	0,412
50	0,507
Sampel	0,451



Persamaan regresi linear $y = 0,0105x - 0,0161$, sehingga nilai x

$$x (C_1) = \frac{0,451 + 0,0161}{0,0105} = 44,49$$

No	Sampel	Berat sampel yg digunakan (g)	Volume Total (L)	Absorbansi sampel	konsentrasi QE (ppm)	Total Flavonoid (mg QE/g ekstrak)	% (b/b)	FP
1	Buah Okra	0,1012	0,01	0,451	44,49	43,96	4,40	10x

$$C = \frac{C_1 \times V \times FP}{m}$$

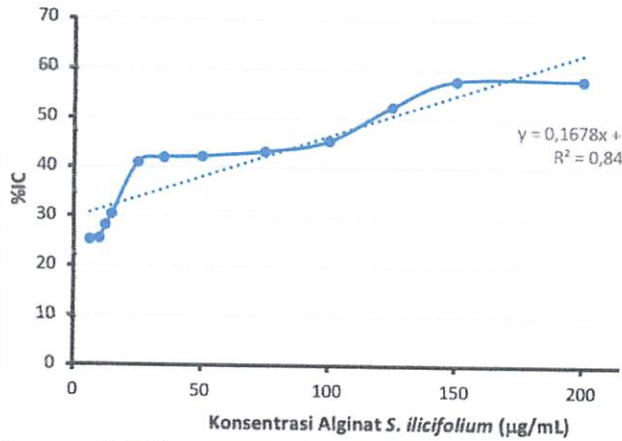
$$C = \frac{44,49 \times 0,01 \times 10}{0,1012}$$

$$C = 43,96 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Lampiran 6. Hasil Uji Antioksidan

Alginat *Sargassum ilicifolium*

Konsentrasi	Absorbansi (OD)	% IC
200	0,294	58
150	0,296	57,714
125	0,333	52,428
100	0,382	45,429
75	0,397	43,286
50	0,404	42,286
35	0,406	42
25	0,414	40,857
15	0,487	30,429
12,5	0,502	28,286
10	0,521	25,571
6,25	0,524	25,143



Jika $A_{sampel} = 0,294$, maka nilai %IC

$$\begin{aligned} \% IC &= \frac{A_{DPPH} - A_{sampel}}{A_{DPPH}} \times 100\% \\ &= \frac{0,700 - 0,294}{0,693} \times 100\% \\ &= 58\% \end{aligned}$$

Jika persamaan regresi linear $y = 0,1678x + 29,716$

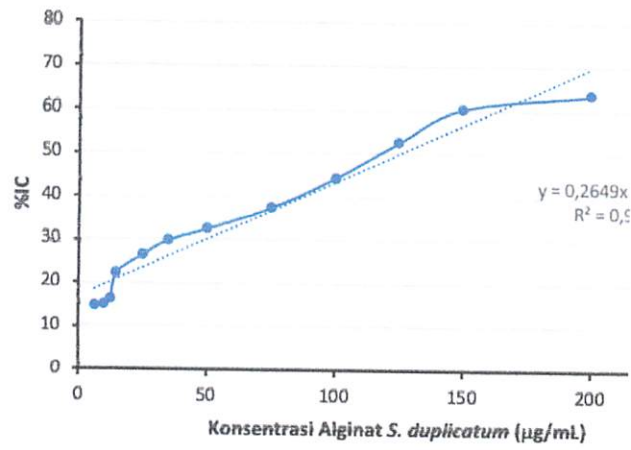
, maka nilai IC_{50}

$$IC_{50} = \frac{50 - 29,716}{0,1678} = 120,88 \mu\text{g/mL}$$

$A_{DPPH} = 0,700$

Alginat *Sargassum duplicatum*

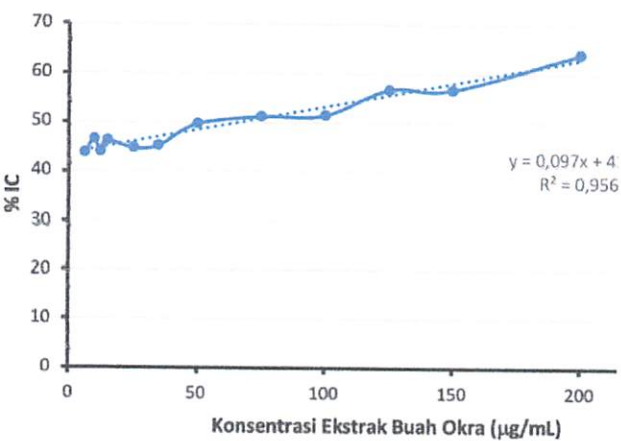
Konsentrasi	Absorbansi (OD)	% IC
200	0,256	63,428
150	0,278	60,286
125	0,332	52,571
100	0,39	44,286
75	0,438	37,429
50	0,473	32,429
35	0,492	29,714
25	0,516	26,286
15	0,545	22,143
12,5	0,587	16,143
10	0,595	15
6,25	0,596	14,857



$A_{DPPH} = 0,700$

Ekstrak Buah Okra

Konsentrasi	Absorbansi (OD)	% IC
200	0,252	64
150	0,302	56,857
125	0,302	56,857
100	0,339	51,571
75	0,341	51,286
50	0,352	49,714
35	0,383	45,286
25	0,386	44,857
15	0,376	46,286
12,5	0,391	44,143
10	0,374	46,571
6,25	0,393	43,857



$A_{DPPH} = 0,700$

Jika $A_{sampel} = 0,256$, maka

$$\begin{aligned} \% IC &= \frac{A_{DPPH} - A_{sampel}}{A_{DPPH}} \times 100\% \\ &= \frac{0,700 - 0,256}{0,700} \times 100\% \\ &= 63,428 \% \end{aligned}$$

Jika persamaan regresi linear $y = 0,2649x + 16,805$

, maka nilai IC_{50}

$$IC_{50} = \frac{50 - 16,805}{0,2649} = 125,31 \mu\text{g/mL}$$

Jika $A_{sampel} = 0,252$, maka

$$\begin{aligned} \% IC &= \frac{A_{DPPH} - A_{sampel}}{A_{DPPH}} \times 100\% \\ &= \frac{0,700 - 0,252}{0,700} \times 100\% \\ &= 64 \% \end{aligned}$$

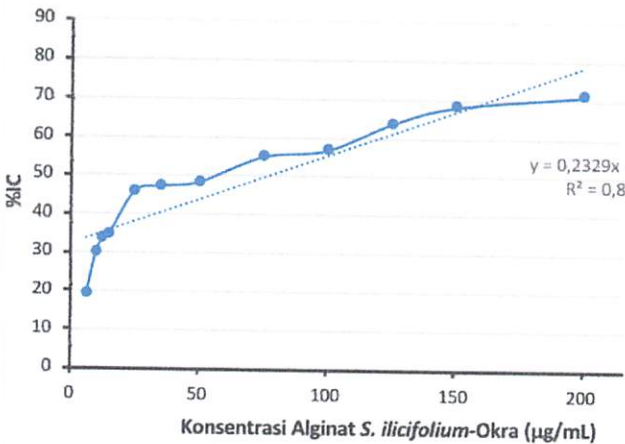
Jika persamaan regresi linear $y = 0,097x + 43,611$

, maka nilai IC_{50}

$$IC_{50} = \frac{50 - 43,611}{0,097} = 65,87 \mu\text{g/mL}$$

Kombinasi Alginat *S. ilicifolium*-Okra

Konsentrasi	Absorbansi (OD)	% IC
200	0,201	71,323
150	0,221	68,382
125	0,252	63,970
100	0,301	56,985
75	0,314	55,147
50	0,360	48,529
35	0,368	47,426
25	0,378	45,956
15	0,458	34,559
12,5	0,466	33,456
10	0,489	30,147
6,25	0,566	19,117



Jika $A_{s\text{ampel}} = 0,201$, maka

$$\begin{aligned} \% \text{ IC} &= \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100\% \\ &= \frac{0,700 - 0,201}{0,700} \times 100\% \\ &= 71,323 \% \end{aligned}$$

Jika persamaan regresi linear $y = 0,2329x + 32,314$

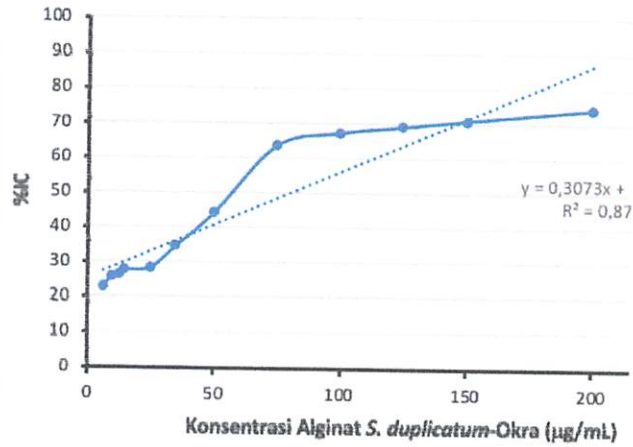
, maka nilai IC_{50}

$$IC_{50} = \frac{50 - 32,314}{0,2329} = 75,94 \mu\text{g/mL}$$

$A_{\text{DPPH}} = 0,700$

Kombinasi Alginat *S. duplicatum*-Okra

Konsentrasi	Absorbansi (OD)	% IC
200	0,180	74,265
150	0,203	70,956
125	0,216	69,118
100	0,229	67,279
75	0,255	63,603
50	0,391	44,118
35	0,458	34,559
25	0,502	28,309
15	0,507	27,574
12,5	0,517	26,103
10	0,520	25,735
6,25	0,540	22,794



Jika $A_{sampel} = 0,180$, maka

$$\begin{aligned} \% IC &= \frac{A_{DPPH} - A_{sampel}}{A_{DPPH}} \times 100\% \\ &= \frac{0,700 - 0,180}{0,700} \times 100\% \\ &= 74,265\% \end{aligned}$$

Jika persamaan regresi linear $y = 0,3073x + 25,618$

, maka nilai IC_{50}

$$IC_{50} = \frac{50 - 25,618}{0,3073} = 79,34 \mu\text{g/mL}$$

DPPH = 0,700

Lampiran 7. Data Kadar Glukosa Darah

Kelompok	Replikasi	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-14
KN	1	118	116	111	125
	2	104	105	104	115
Rata-rata		111	111	111	108
SD		9,90	9,90	7,78	4,95
KD	1	268	266	277	203
	2	271	239	298	237
Rata-rata		280	270	253	288
SD		16,26	2,12	19,09	14,85
KAI	1	267	236	214	224
	2	269	248	228	198
Rata-rata		230	268	242	221
SD		12,73	1,41	8,49	9,90
KAD	1	266	220	224	214
	2	268	259	235	202
Rata-rata		252	267	240	230
SD		7,78	1,41	27,58	7,78
P1	1	263	160	146	124
	2	271	150	175	111
Rata-rata		226	267	155	161
SD		20,51	5,66	7,07	20,51
P2	1	268	152	192	120
	2	270	187	173	150
Rata-rata		220	269	170	183
SD		28,99	1,41	24,75	13,44

Lampiran 8. Analisis Statistik Kadar Glukosa Darah**a. Deskripsi data****Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	40	10,5000	5,83974	1,00	20,00
GD	40	196,8250	49,17519	111,00	298,00

b. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Kelompok	GD
N		40	40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	10,5000	196,8250
	Std. Deviation	5,83974	49,17519
	Absolute	,080	,096
Most Extreme Differences	Positive	,080	,096
	Negative	-,080	-,093
Kolmogorov-Smirnov Z		,503	,610
Asymp. Sig. (2-tailed)		,962	,851

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Uji Homogenitas Lavene

GD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3506224969584141,500	19	20	,073

ANOVA

GD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87141,275	19	4586,383	12,796	,001
Within Groups	7168,500	20	358,425		
Total	94309,775	39			

d. Uji Duncan

GD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
PAIO14	2	117,5000							
PADO14	2	135,0000	135,0000						
KAI14	2	141,0000	141,0000	141,0000					
PAIO3	2	155,0000	155,0000	155,0000					
PAIO7	2	160,5000	160,5000	160,5000					
KAD14	2		166,0000	166,0000	166,0000				
PADO3	2		169,5000	169,5000	169,5000				
KAI3	2		174,0000	174,0000	174,0000				
KAD3	2		179,5000	179,5000	179,5000	179,5000			
KAI7	2			180,5000	180,5000	180,5000			
Duncan ^a PADO7	2			182,5000	182,5000	182,5000	182,5000		
KAD7	2				209,5000	209,5000	209,5000	209,5000	
PADO1	2					219,5000	219,5000	219,5000	
KD14	2					220,0000	220,0000	220,0000	
PAIO1	2						225,5000	225,5000	
KAI1	2							230,0000	
KAD1	2							251,5000	251,5000
KD3	2							252,5000	252,5000
KD1	2								279,5000
KD7	2								287,5000
Sig.		,053	,053	,071	,056	,071	,053	,059	,095

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 9. Data Lebar Luka

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3	
KN	1	2498	2921	2621	2680	741	876	879	832	0	0	0	
	2	2426	2741	2079	2415	868	1032	967	956	0	0	0	
	Rerata			2548	Rerata			894	Rerata				
	SD			187,21	SD			87,64	SD			0,0	
KD	1	4050	3906	4023	3993	3548	3436	3751	3579	420	405	435	42
	2	3831	3881	4045	3919	3913	3467	3673	3684	414	426	442	42
	Rerata			3956	Rerata			3631	Rerata			42	
	SD			52,22	SD			74,83	SD			5,1	
KAI	1	3052	3221	3090	3121	1060	1055	1034	1050	0	0	0	
	2	2980	3114	3098	3064	1097	1159	1195	1150	0	0	0	
	Rerata			3093	Rerata			1100	Rerata				
	SD			40,04	SD			71,09	SD			0,0	
KAD	1	3208	3434	3327	3323	1285	1251	1256	1264	0	0	0	
	2	3266	3197	3008	3157	1152	1253	1175	1194	0	0	0	
	Rerata			3240	Rerata			1229	Rerata				
	SD			117,50	SD			49,95	SD			0,0	
P1	1	2472	2622	2292	2462	881	961	873	905	0	0	0	
	2	2502	2876	2518	2632	845	792	852	830	0	0	0	
	Rerata			2547	Rerata			867	Rerata				
	SD			120,29	SD			53,31	SD			0,0	
P2	1	2634	2562	2621	2606	795	789	972	852	0	0	0	
	2	2916	2741	2683	2780	890	1150	903	981	0	0	0	
	Rerata			2693	Rerata			917	Rerata				
	SD			123,20	SD			91,28	SD			0,0	

Lampiran 10. Analisis Statistik Lebar Luka

a. Deskripsi Data

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
LEBARLUKA	36	1484,1389	1407,11637	,00	3993,00

b. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	LEBARLUKA
N		36	36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,5000	1484,1389
	Std. Deviation	5,26172	1407,11637
	Absolute	,082	,188
Most Extreme Differences	Positive	,082	,188
	Negative	-,082	-,146
Kolmogorov-Smirnov Z		,489	1,125
Asymp. Sig. (2-tailed)		,970	,159

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Uji Kruskal-Wallis

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	
LEBARLUKA	KN3	2	25,00	
	KN7	2	15,50	
	KN14	2	6,50	
	KD3	2	35,50	
	KD7	2	33,50	
	KD14	2	6,50	
	KAD3	2	31,50	
	KAD7	2	21,50	
	KAD14	2	6,50	
	KAI3	2	29,50	
	KAI7	2	19,50	
	KAI14	2	6,50	
	PADO3	2	26,50	
	PADO7	2	16,50	
	PADO14	2	6,50	
	PAIO3	2	25,00	
	PAIO7	2	14,50	
	PAIO14	2	6,50	
	Total		36	

Test Statistics^{a,b}

	LEBARLUKA
Chi-Square	34,710
df	17
Asymp. Sig.	,007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

d. Hasil uji Mann-Whitney antar kelompok

	KN	KN1	KD	KD	KDI	KAD	KAD	KADI	KAI	KAI	KAI	PADO	PADO	PADO1	PAIO	PAIO	PAIO1
	7	4	3	7	4	3	7	4	3	7	4	3	7	4	3	7	4
KN3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	TS	S	S	TS	S	S
KN7		S	S	S	S	S	S	S	TS	TS	S	S	TS	S	S	TS	S
KN14			S	S	TS	S	S	TS	S	S	TS	S	S	TS	S	S	TS
KD3				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KD7					S	TS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KD14						S	S	TS	S	S	TS	S	S	TS	S	S	TS
KAD3							S	S	TS	S	S	S	S	S	S	S	S
KAD7								S	S	TS	S	S	S	S	S	S	S
KAD14									S	TS	S	S	S	TS	S	S	TS
KAI3									S	S	TS	S	S	S	S	S	S
KAI7										S	S	S	TS	S	S	TS	S
KAI14												S	S	TS	S	S	TS
PADO3													S	S	TS	S	S
PADO7														S	S	TS	S
PADO14															S	S	TS
PAIO3																S	S
PAIO7																	S

Lampiran 11. Data Jumlah Neutrofil

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3	
KN	1	62	64	37	54	24	43	31	33	14	19	21	18
	2	66	41	79	62	26	39	29	31	11	9	15	12
	Rerata			58	Rerata			32	Rerata			15	
	SD			5,42	SD			0,94	SD			4,48	
KD	1	140	146	131	139	73	76	61	70	44	50	41	45
	2	125	124	133	127	53	52	73	59	37	48	30	38
	Rerata			133	Rerata			65	Rerata			42	
	SD			8,25	SD			7,54	SD			4,71	
KAI	1	68	79	87	78	51	64	49	55	29	26	23	26
	2	85	61	53	66	49	52	43	48	29	20	33	27
	Rerata			72	Rerata			51	Rerata			27	
	SD			8,25	SD			4,71	SD			0,94	
KAD	1	78	78	83	80	38	63	56	52	32	23	35	30
	2	62	69	72	68	42	51	62	52	26	28	27	27
	Rerata			74	Rerata			52	Rerata			29	
	SD			8,49	SD			0,47	SD			2,12	
P1	1	32	53	61	49	39	22	41	34	13	9	17	13
	2	60	57	64	60	29	31	35	32	10	13	11	11
	Rerata			55	Rerata			33	Rerata			12	
	SD			8,25	SD			1,65	SD			1,18	
P2	1	50	66	53	56	32	21	44	32	20	15	13	16
	2	49	67	61	59	43	30	29	34	11	19	7	12
	Rerata			58	Rerata			33	Rerata			14	
	SD			1,89	SD			1,18	SD			2,59	

Lampiran 12. Analisis Statistik Jumlah Neutrofil

a. Deskripsi data

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
NEUTROFIL	36	47,3611	28,65076	11,00	139,00

b. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	NEUTROFIL
N		36	36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,5000	47,3611
	Std. Deviation	5,26172	28,65076
	Absolute	,082	,124
Most Extreme Differences	Positive	,082	,124
	Negative	-,082	-,102
	Kolmogorov-Smirnov Z	,489	,744
Asymp. Sig. (2-tailed)	,970	,638	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

NEUTROFIL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
31429510726990 868,000	17	18	,137

ANOVA

NEUTROFIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28268,806	17	1662,871	64,857	,002
Within Groups	461,500	18	25,639		
Total	28730,306	35			

d. Hasil uji Duncan antar kelompok

NEUTROFIL

Duncan

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
PAIO14	2	12,0000							
PADO14	2	14,0000							
KN14	2	15,0000							
KAI14	2		26,5000						
KAD14	2		28,5000						
KN7	2		32,0000	32,0000					
PADO7	2		33,0000	33,0000					
PAIO7	2		33,0000	33,0000					
KD14	2			41,5000	41,5000				
KAI7	2				51,5000	51,5000			
KAD7	2				52,0000	52,0000			
PAIO3	2					54,5000	54,5000		
PADO3	2					57,5000	57,5000		
KN3	2					58,0000	58,0000		
KD7	2						64,5000	64,5000	
KAI3	2							72,0000	
KAD3	2							74,0000	
KD3	2								133,0000
Sig.		,583	,262	,101	,064	,262	,085	,091	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 13. Data Jumlah Makrofag

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3	
KN	1	16	14	13	14	21	23	22	22	5	7	6	6
	2	17	12	20	16	19	21	18	19	7	4	8	6
	Rerata				15	Rerata			21	Rerata			6
	SD				1,41	SD			1,89	SD			0,24
KD	1	39	41	36	39	45	56	41	47	25	17	20	21
	2	34	36	40	37	42	49	48	46	16	19	23	19
	Rerata				38	Rerata			47	Rerata			20
	SD				1,41	SD			0,71	SD			0,94
KAI	1	20	17	24	20	22	23	29	25	29	26	23	26
	2	23	18	15	19	27	29	35	30	29	20	33	27
	Rerata				20	Rerata			28	Rerata			27
	SD				1,18	SD			4,01	SD			0,94
KAD	1	20	23	21	21	27	25	26	26	7	12	11	10
	2	18	19	25	21	34	31	29	31	8	9	16	11
	Rerata				21	Rerata			29	Rerata			11
	SD				0,47	SD			3,77	SD			0,71
P1	1	10	17	12	13	23	20	18	20	3	7	5	5
	2	18	15	14	16	19	16	17	17	6	4	7	6
	Rerata				14	Rerata			19	Rerata			5
	SD				1,89	SD			2,12	SD			0,47
P2	1	17	12	16	15	19	20	26	22	9	5	6	7
	2	13	15	18	15	15	23	21	20	8	4	6	6
	Rerata				15	Rerata			21	Rerata			6
	SD				0,24	SD			1,41	SD			0,47

Lampiran 14. Analisis Statistik Jumlah Makrofag

a. Deskripsi data

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
MAKROFAG	36	19,0833	10,79252	5,00	47,00

b. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	MAKROFAG
N		36	36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,5000	19,0833
	Std. Deviation	5,26172	10,79252
	Absolute	,082	,171
Most Extreme Differences	Positive	,082	,171
	Negative	-,082	-,096
	Kolmogorov-Smirnov Z	,489	1,028
Asymp. Sig. (2-tailed)	,970	,242	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Uji Kruskal-Wallis

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	
MAKROFAG	KN3	2	13,75	
	KN7	2	23,25	
	KN14	2	3,50	
	KD3	2	33,50	
	KD7	2	35,50	
	KD14	2	22,00	
	KAD3	2	25,00	
	KAD7	2	31,00	
	KAD14	2	9,25	
	KAI3	2	20,50	
	KAI7	2	30,00	
	KAI14	2	7,75	
	PADO3	2	13,50	
	PADO7	2	24,75	
	PADO14	2	4,75	
	PAIO3	2	13,25	
	PAIO7	2	19,50	
	PAIO14	2	2,25	
	Total		36	

Test Statistics^{a,b}

	MAKROFAG
Chi-Square	33,951
df	17
Asymp. Sig.	,009

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Kelompok

d. Hasil uji Mann-Whitney antar kelompok

	KN7	KN14	KD3	KD7	KD14	KAD3	KAD7	KAD14	KAI3	KAI7	KAI14	PADO3	PADO7	PADO14	PAIO3	PAIO7	PAIO14
KN3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	TS	TS	S	TS	TS	S
KN7		S	S	S	S	TS	S	TS	TS	TS	S	S	TS	S	S	TS	S
KN14			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	TS	S	S	TS
KD3				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KD7					S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KD14						TS	S	S	TS	TS	S	S	TS	S	S	TS	S
KAD3							S	S	TS	TS	S	S	TS	S	S	TS	S
KAD7								S	TS	TS	S	S	S	S	S	S	S
KAD14								S	TS	TS	TS	S	S	S	S	S	S
KAI3										TS	S	S	TS	TS	S	TS	S
KAI7											S	S	TS	S	S	TS	S
KAI14												S	S	TS	S	S	S
PADO3													TS	S	TS	TS	S
PADO7														S	S	TS	S
PADO14															S	S	TS
PAIO3																S	S
PAIO7																	S

Lampiran 15. Data Jumlah Fibrosit

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3	
KN	1	18	19	24	20	26	29	31	29	22	17	20	20
	2	22	23	20	22	24	27	25	25	21	15	22	19
	Rerata				21	Rerata			27	Rerata			20
	SD				0,94	SD			2,36	SD			0,24
KD	1	8	10	7	8	11	13	15	13	9	10	11	10
	2	13	11	9	11	8	10	9	9	8	12	7	9
	Rerata				10	Rerata			11	Rerata			10
	SD				1,89	SD			2,83	SD			0,71
KAI	1	14	11	17	14	17	20	19	19	12	16	14	14
	2	12	15	19	15	19	15	18	17	13	11	13	12
	Rerata				15	Rerata			18	Rerata			13
	SD				0,94	SD			0,94	SD			1,18
KAD	1	12	10	18	13	15	18	16	16	14	12	14	13
	2	15	11	12	13	14	22	17	18	17	15	13	15
	Rerata				13	Rerata			17	Rerata			14
	SD				0,47	SD			0,94	SD			1,18
P1	1	20	21	18	20	24	27	30	27	18	20	16	18
	2	21	19	22	21	20	26	29	25	17	19	18	18
	Rerata				20	Rerata			26	Rerata			18
	SD				0,71	SD			1,41	SD			0,00
P2	1	18	19	24	20	21	31	20	24	16	21	17	18
	2	17	16	20	18	24	27	29	27	15	13	20	16
	Rerata				19	Rerata			25	Rerata			17
	SD				1,89	SD			1,89	SD			1,41

Lampiran 16. Analisis Statistik Jumlah Fibrosit

a. Deskripsi data

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
FIBROSIT	36	17,3889	5,38929	8,00	29,00

b. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	FIBROSIT
N		36	36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,5000	17,3889
	Std. Deviation	5,26172	5,38929
Most Extreme Differences	Absolute	,082	,092
	Positive	,082	,092
	Negative	-,082	-,073
Kolmogorov-Smirnov Z		,489	,551
Asymp. Sig. (2-tailed)		,970	,922

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

FIBROSIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
53512507081306 70,000	17	18	,062

ANOVA

FIBROSIT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	973,556	17	57,268	23,973	,007
Within Groups	43,000	18	2,389		
Total	1016,556	35			

d. Hasil uji Duncan antar kelompok

FIBROSIT

Duncan

Kelompok	N	Subset for alpha = 0,05						
		1	2	3	4	5	6	7
KD3	2	9,5000						
KD14	2	9,5000						
KD7	2	11,0000	11,0000					
KAD3	2	13,0000	13,0000					
KAI14	2	13,0000	13,0000					
KAD14	2		14,0000	14,0000				
KAI3	2		14,5000	14,5000	14,5000			
KAD7	2			17,0000	17,0000	17,0000		
PADO14	2			17,0000	17,0000	17,0000		
KAI7	2				18,0000	18,0000	18,0000	
PAIO14	2				18,0000	18,0000	18,0000	
PADO3	2					19,0000	19,0000	
KN14	2					19,5000	19,5000	
PAIO3	2					20,5000	20,5000	
KN3	2						21,0000	
PADO7	2							25,5000
PAIO7	2							26,0000
KN7	2							27,0000
Sig.		,055	,055	,090	,055	,060	,100	,371

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

1. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 17. Data Jumlah Fibroblas

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3		LP1	LP2	LP3	
KN	1	25	18	27	23	41	37	39	39	23	24	28	25
	2	21	23	19	21	46	38	43	42	21	34	26	27
	Rerata				22	Rerata			41	Rerata			26
	SD				1,65	SD			2,36	SD			1,41
KD	1	12	15	10	12	17	19	22	19	14	16	13	14
	2	11	9	6	9	18	23	21	21	11	15	12	13
	Rerata				11	Rerata			20	Rerata			14
	SD				2,59	SD			0,94	SD			1,18
KAI	1	17	15	11	14	28	30	32	30	18	22	17	19
	2	16	18	14	16	29	26	27	27	24	21	19	21
	Rerata				15	Rerata			29	Rerata			20
	SD				1,18	SD			1,89	SD			1,65
KAD	1	14	12	11	12	25	31	28	28	16	13	20	16
	2	10	18	15	14	22	24	33	26	15	18	17	17
	Rerata				13	Rerata			27	Rerata			17
	SD				1,41	SD			1,18	SD			0,24
P1	1	19	21	24	21	37	40	41	39	23	28	30	27
	2	17	23	20	20	39	42	38	40	25	27	21	24
	Rerata				21	Rerata			40	Rerata			26
	SD				0,94	SD			0,24	SD			1,89
P2	1	28	17	16	20	39	32	37	36	24	19	26	23
	2	18	25	15	19	33	41	48	41	21	23	22	22
	Rerata				20	Rerata			38	Rerata			23
	SD				0,71	SD			3,30	SD			0,71

Lampiran 18. Analisis Statistik Jumlah Fibroblas

a. Deskripsi data

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
FIBROBLAS	36	23,2500	8,92308	9,00	42,00

b. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	FIBROBLAS
N		36	36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,5000	23,2500
	Std. Deviation	5,26172	8,92308
Most Extreme Differences	Absolute	,082	,127
	Positive	,082	,127
	Negative	-,082	-,100
Kolmogorov-Smirnov Z		,489	,764
Asymp. Sig. (2-tailed)		,970	,604

a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.

c. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

FIBROBLAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
94489270701420 38,000	17	18	,380

ANOVA

FIBROBLAS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2739,250	17	161,132	61,061	,012
Within Groups	47,500	18	2,639		
Total	2786,750	35			

d. Hasil uji Duncan antar kelompok

FIBROBLAS

Duncan

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
KD3	2	10,5000							
KAD3	2	13,0000	13,0000						
KD14	2	13,5000	13,5000						
KAI3	2		15,0000						
KAD14	2		16,5000	16,5000					
PADO3	2			19,5000	19,5000				
KD7	2			20,0000	20,0000				
KAI14	2			20,0000	20,0000				
PAIO3	2				20,5000				
KN3	2				22,0000	22,0000			
PADO14	2				22,5000	22,5000	22,5000		
PAIO14	2					25,5000	25,5000	25,5000	
KN14	2						26,0000	26,0000	
KAD7	2							27,0000	
KAI7	2							28,5000	
PADO7	2								38,5000
PAIO7	2								39,5000
KN7	2								40,5000
Sig.		,096	,062	,062	,117	,055	,055	,106	,259

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 19. Data Densitas Kolagen

Kelompok	Replikasi	Hari Ke-3			Rata-rata	Hari Ke-7			Rata-rata	Hari Ke-14			Rata-rata
		LP 1	LP 2	LP 3		LP 1	LP 2	LP 3		LP 1	LP 2	LP 3	
KN	1	73	43	63	60	77	86	66	76	89	88	78	85
	2	54	53	53	53	74	85	96	85	77	87	98	88
	Rerata				56	Rerata			81	Rerata			86
	SD				4,35	SD			6,40	SD			1,86
KD	1	30	28	29	29	35	35	35	35	64	54	54	57
	2	30	29	30	30	36	35	35	35	65	64	64	64
	Rerata				30	Rerata			35	Rerata			61
	SD				0,60	SD			0,05	SD			4,96
KAI	1	39	5	41	46	71	59	55	62	69	78	78	75
	2	38	49	39	42	56	61	72	63	88	78	78	81
	Rerata				44	Rerata			62	Rerata			78
	SD				2,65	SD			0,76	SD			4,35
KAD	1	37	56	42	45	60	59	59	59	82	63	83	76
	2	46	40	33	40	57	58	59	58	83	63	83	76
	Rerata				42	Rerata			59	Rerata			76
	SD				3,79	SD			0,82	SD			0,33
P1	1	55	56	56	56	84	84	84	84	96	87	97	93
	2	67	56	66	63	84	74	84	81	77	97	77	84
	Rerata				59	Rerata			82	Rerata			89
	SD				5,05	SD			2,14	SD			7,01
P2	1	66	56	46	56	79	80	80	80	87	92	83	88
	2	46	50	46	47	80	80	80	80	94	73	93	87
	Rerata				52	Rerata			80	Rerata			87
	SD				6,36	SD			0,31	SD			0,60

Lampiran 20. Analisis Statistik Densitas Kolagen

a. Deskripsi data

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kelompok	36	9,5000	5,26172	1,00	18,00
KOLAGEN	36	64,4167	18,76071	29,00	93,00

Lampiran 21. Identifikasi Sargassum

Keterangan Identifikasi

No. : 1/3/18-12/2018

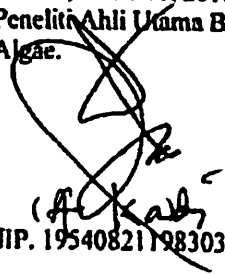
Kelompok Peneliti Algae Pusat Penelitian Oseanografi – LIPI Jakarta, menerangkan bahwa specimen rumput laut yang di kirim ke kantor kami oleh :

Nama : Dr. Pratiwi Darmono
 Alamat : Universitas Erlangga Surabaya

Telah diidentifikasi /dengan nama ilmiah Algae tersebut adalah :

1. Filum/Division : Phaeophyta
 Kelas/Class : Phaeophyceae
 Bangsa/Order : Fucales
 Suku/Famili : Sargassaceae
 Marga/Genus : Sargassum
 Jenis/Species : *Sargassum binderi* Sonder
 (Kode sampel : Sargassum sp. 1.)
2. Filum/Division : Phaeophyta
 Kelas/Class : Phaeophyceae
 Bangsa/Order : Fucales
 Suku/Famili : Sargassaceae
 Marga/Genus : Sargassum
 Jenis/Species : *Sargassum duplicatum* J.G. Agardh =
S. Cristaeifolium C.A. Agardh
 (Kode sampel: Sargassum sp. 2.)
3. Filum/Division : Phaeophyta
 Kelas/Class : Phaeophyceae
 Bangsa/Order : Fucales
 Suku/Famili : Sargassaceae
 Marga/Genus : Sargassu
 Jenis/Species : *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh
 (Kode sampel: Sargassum sp.3.)

Jakarta, 16 Maret 2018
 Peneliti Ahli Utama Bid.
 Algae.


 NIP. 195408211983031005

Lampiran 22. Identifikasi Buah Okra



UNIT LAYANAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus C Mulyorejo Surabaya (60115) Telephon 62 – 31 5936501, Faks 62 – 31 5926804, 5936502
 E-mail : unitlayanan.biologiua@gmail.com

Pengirim : Drs. Saikhu Akhmad Husen, M.Kes.

Jenis uji : Identifikasi tanaman

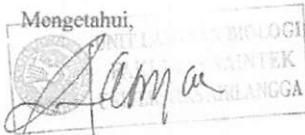
Berdasarkan sampel yang diterima, kemudian dideterminasi dengan hasil sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Divisio : Magnoliophyta
 Classis : Magnoliopsida
 Ordo : Malvales
 Familia : Malvaceae
 Genus : *Abelmoschus*
 Species : *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench

Deskripsi:

Buah okra seperti cabai hijau besar, berbentuk silindris, memanjang, berwarna hijau, panjang 10 cm – 15cm, permukaan buah berlekuk dan memiliki bulu-bulu halus. Jika buah dipotong terlihat berongga, di dalamnya terdapat biji berukuran kecil.

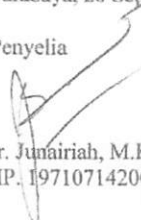
Mengetahui,



Dr. Sucipto Hariyanto, DEA
 NIP. 19560902198601 1002

Surabaya, 20 September 2019

Penyelia


 Dr. Junairiah, M.Kes
 NIP. 19710714200212 2002

Lampiran 23. Hasil Uji Laik Etik Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 " ETHICAL CLEARENCE "

No : 2.KE.049.04.2019

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
 TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
 DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

- PENELITIAN BERJUDUL : Budi Daya dan Ekstraksi Alginat dari *Sargassum sp.*
 Serta Uji Aktivitas Kombinasi Alginat Dengan Ekstrak
 Bahan Hayati Untuk Penyembuhan Luka Terbuka pada
 Mencit Diabetes
- PENELITI UTAMA : Pratiwi Pujiastuti
- UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi
 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 4 April 2019

Ketua

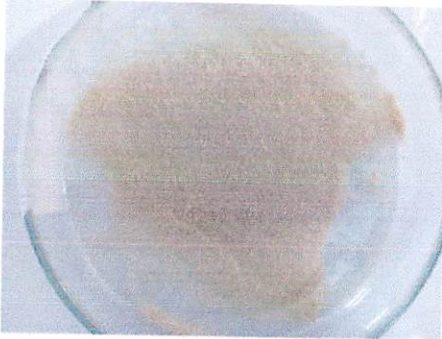
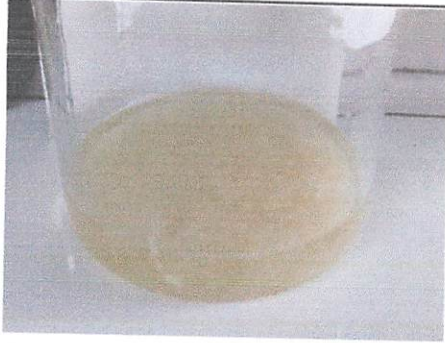
Dr. Nusdianto Triakoso, M.P.,Drh.
 NIP. 196805051997021001



Mengetahui,
 Dekan FKH-Unair,

Edi Sianto, M.Kes.,Drh.
 NIP. 195601051986011001

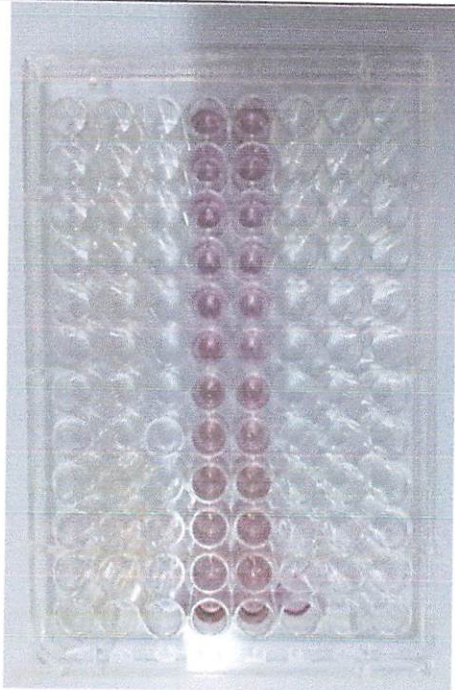
Lampiran 24. Dokumentasi Penelitian



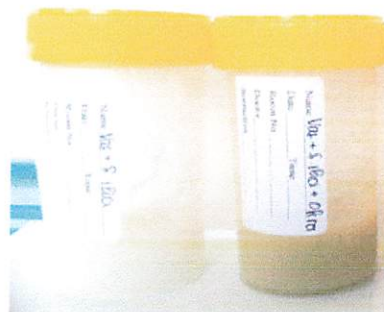
Ekstraksi natrium alginat dari Sargassum



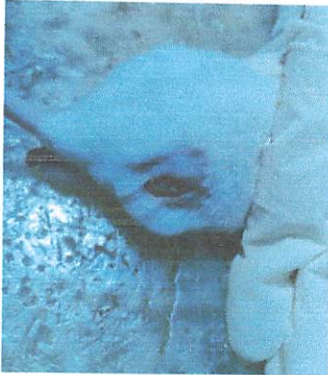
Ekstraksi buah okra



Pengujian antioksidan



Pembuatan sediaan salep dari ekstrak



Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba



Pengukuran kadar glukosa dan pengambilan jaringan kulit