



**EFEK EKSTRAK DAUN KITOLOD (*Isotoma longiflora*)  
TERHADAP NEOVASKULARISASI KORNEA TIKUS  
WISTAR MODEL TRAUMA KIMIA**

**SKRIPSI**

Oleh

**Hasbi Maulana Arsyad  
NIM 142010101033**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**EFEK EKSTRAK DAUN KITOLOD (*Isotoma longiflora*)  
TERHADAP NEOVASKULARISASI KORNEA TIKUS  
WISTAR MODEL TRAUMA KIMIA**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

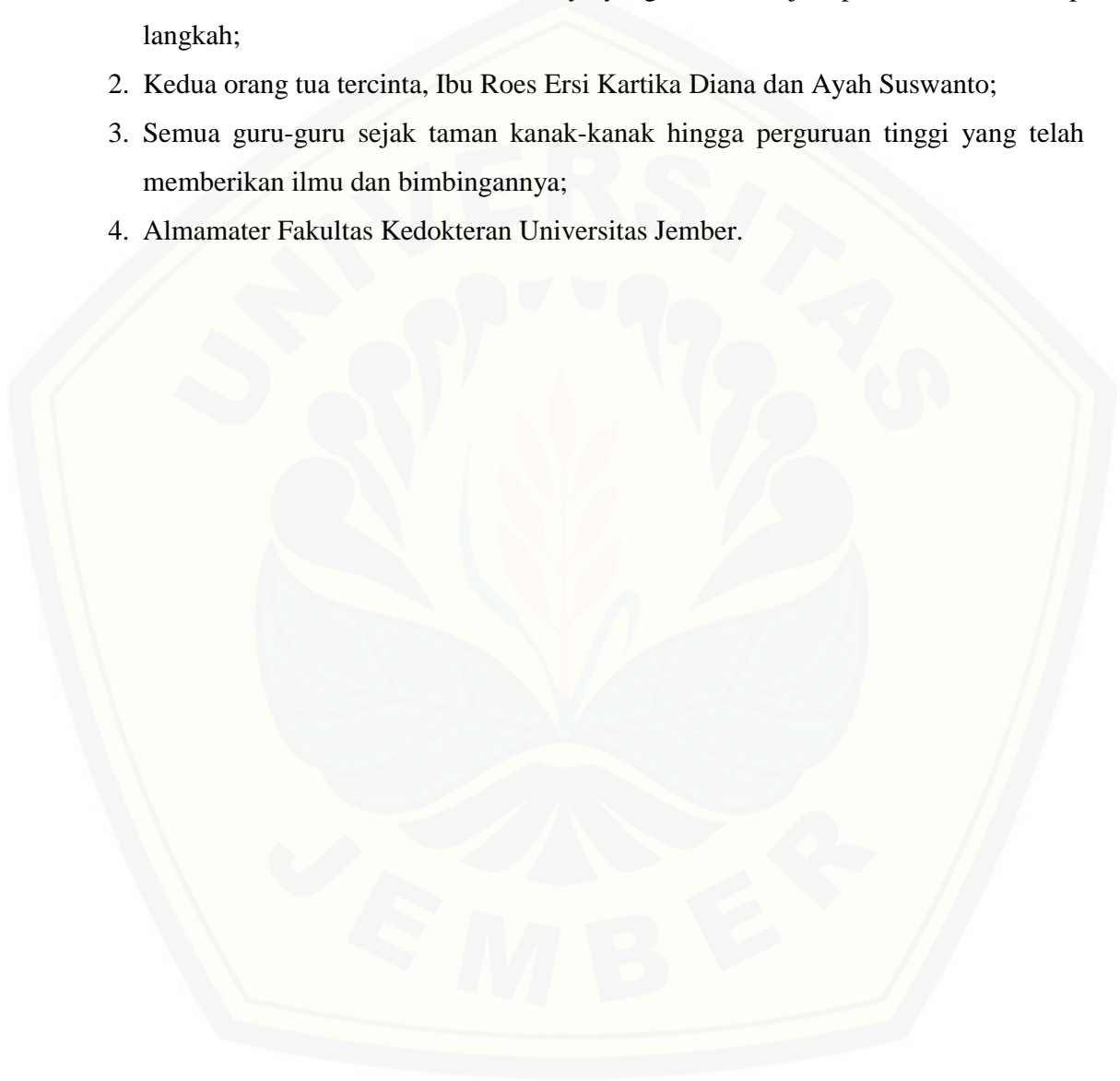
**Hasbi Maulana Arsyad  
NIM 142010101033**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

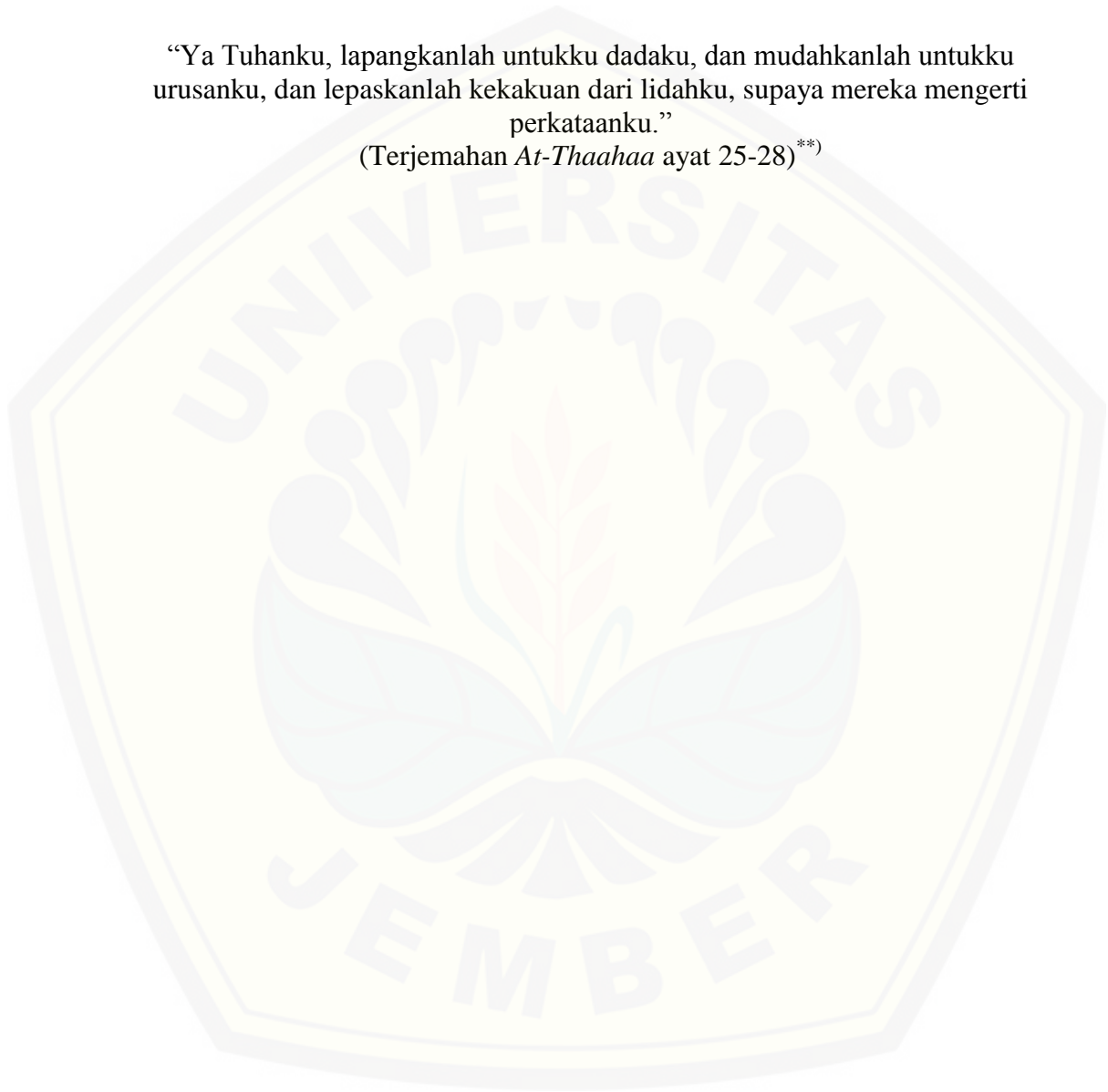
1. Allah SWT yang telah memberi segala limpahan rahmat serta hidayah-Nya, serta Nabi Muhammad SAW dan Rasul-Nya yang selalu menjadi panutan dalam setiap langkah;
2. Kedua orang tua tercinta, Ibu Roes Ersi Kartika Diana dan Ayah Suswanto;
3. Semua guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan bimbingannya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTTO**

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya  
sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”  
(Terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 5-6)<sup>\*)</sup>

“Ya Tuhanku, lapangkanlah untukku dadaku, dan mudahkanlah untukku  
urusanku, dan lepaskanlah kekakuan dari lidahku, supaya mereka mengerti  
perkataanku.”  
(Terjemahan *At-Thaahaa* ayat 25-28)<sup>\*\*) \*\*)</sup>



\*) \*\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2011. *Al Qur'an dan Terjemahannya*.  
Bandung : CV Diponegoro

**PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

nama : Hasbi Maulana Arsyad

NIM : 142010101033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Ekstrak Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) Terhadap Neovaskularisasi Kornea Tikus Wistar Model Trauma Kimia” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Januari 2018  
Yang menyatakan,

Hasbi Maulana Arsyad  
NIM 142010101033

**SKRIPSI**

**EFEK EKSTRAK DAUN KITOLOD (*Isotoma longiflora*)  
TERHADAP NEOVASKULARISASI KORNEA TIKUS  
WISTAR MODEL TRAUMA KIMIA**

Oleh

Hasbi Maulana Arsyad  
142010101033

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : dr. Cicih Komariah, Sp.M.

Dosen Pembimbing Anggota (DPA): dr. Muhamad Hasan, M.Kes., Sp.OT.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Ekstrak Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) Terhadap Neovaskularisasi Kornea Tikus Wistar Model Trauma Kimia” karya Hasbi Maulana Arsyad telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 22 Januari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked.  
NIP 197105211998031003

dr. Edy Junaidi, M.Sc., Sp.M.  
NIP 197508012003121003

Anggota II,

Anggota III,

dr. Cicih Komariah, Sp.M.  
NIP 197409282005012001

dr. Muhamad Hasan, M.Kes., Sp.OT.  
NIP 196904111999031001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Efek Ekstrak Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap Neovaskularisasi Kornea Tikus Wistar Model Trauma Kimia;** Hasbi Maulana Arsyad, 142010101033; 2018; 77 Halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Trauma kimia mata adalah trauma pada mata yang disebabkan oleh substansi dengan  $\text{pH} < 7$  (asam) dan  $\text{pH} > 7$  (basa). Trauma kimia dapat disebabkan oleh pestisida. Di Indonesia, 78,9% petani mengalami keluhan pada mata akibat paparan pestisida. Kejadian trauma kimia basa pada mata dapat menyebabkan *cornea neovascularization* (CNV). Trauma kimia basa menyebabkan inflamasi hebat sehingga terbentuk vaskularisasi pada kornea yang seharusnya dalam keadaan avaskular. CNV berhubungan dengan produksi faktor angiogenik lokal dan mediator inflamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia.

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental design* dengan rancangan *post-test only control group design*. Sampel penelitian ini ialah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Jumlah sampel penelitian ini sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing 4 tikus uji dan 1 tikus cadangan. Kelompok pertama merupakan kelompok positif yang diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan terapi *dexamethasone* 0,1%, kelompok kedua merupakan kontrol negatif diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan DMSO 0,1%, kelompok P1 sampai P4 diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan ekstrak daun kitolod dengan dosis berturut-turut 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml.

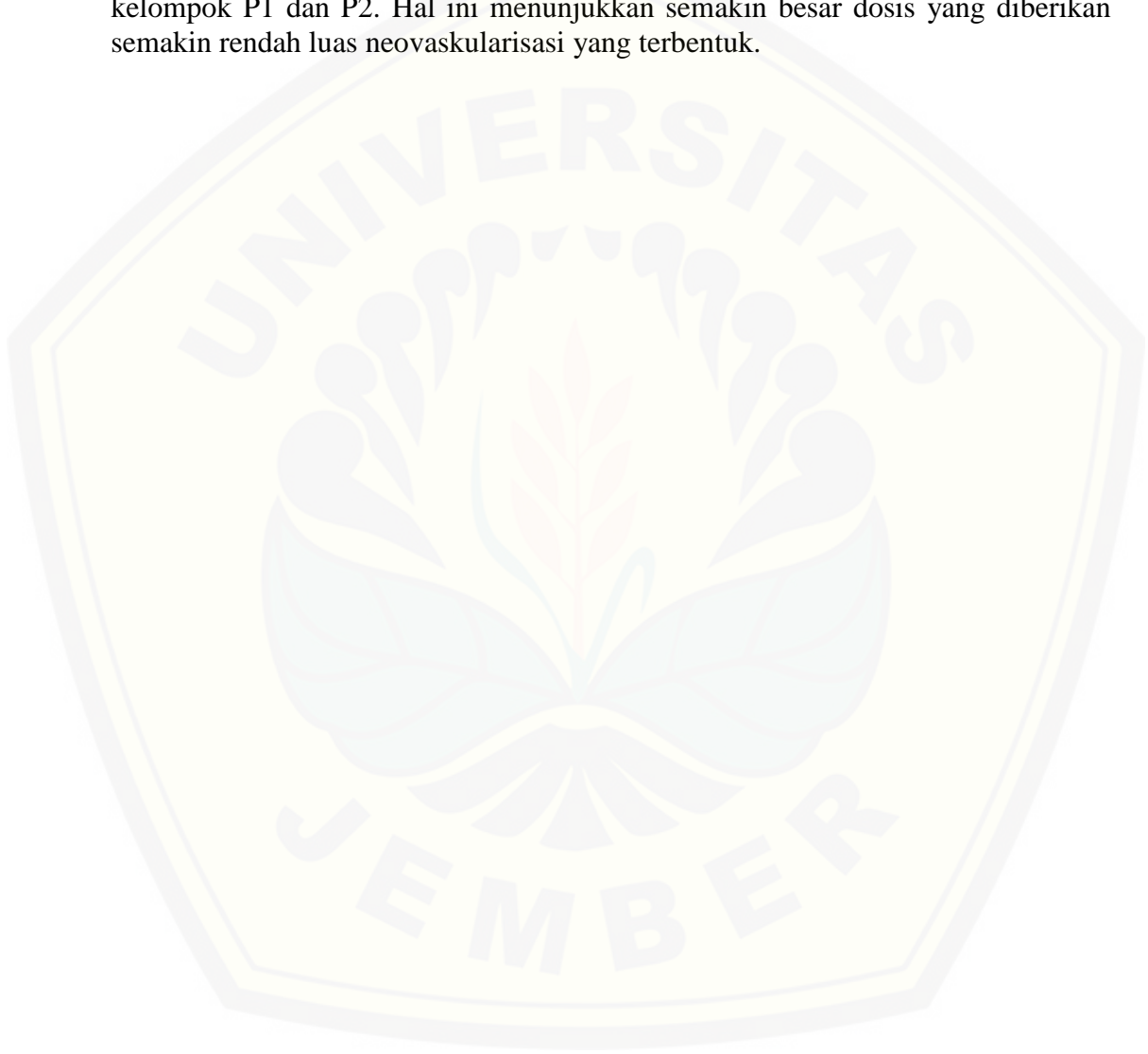
Data yang diambil berupa luas neovaskularisasi kornea. Hasil rata-rata luas neovaskularisasi pada hari ke 7 pascatrauma kimia didapatkan kontrol positif sebesar,  $17,61 \pm 1,15 \text{ mm}^2$  dan kontrol negatif sebesar  $20,66 \pm 1,18 \text{ mm}^2$ . Hasil rata-rata luas neovaskularisasi pada kelompok perlakuan dengan dosis 0,25 mg/ml sebesar  $20,59 \pm 2,05 \text{ mm}^2$ ; dosis 0,5 mg/ml sebesar  $20,66 \pm 1,08$ ; dosis 1 mg/ml sebesar  $16,50 \pm 1,80 \text{ mm}^2$ ; dosis 2 mg/ml sebesar  $16,43 \pm 1,40 \text{ mm}^2$ .

Hasil rata-rata luas neovaskularisasi kornea dianalisis persebaran data dan homogenitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's test*. Hasil dari kedua analisis tersebut menunjukkan nilai  $p > 0,05$  yang artinya data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil rata-rata luas neovaskularisasi kornea selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antarkelompok dan didapatkan nilai signifikansi ( $p = 0,001$ ). Uji lanjutan *Post hoc* LSD digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *Post hoc* LSD didapatkan kontrol positif, kelompok P3 dan P4 berbeda signifikan terhadap kontrol negatif, kelompok P1 dan P2.

Trauma kimia mata akibat pestisida Rotraz© 200EC menyebabkan terbentuknya neovaskularisasi. Kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan, hal ini menunjukkan *dexamethasone* mampu menghambat neovaskularisasi kornea. Kelompok P1 dan P2 tidak menunjukkan



perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan kelompok P1 dan P2 dengan dosis ekstrak daun kitolod 0,25 mg/ml dan 0,5 mg/ml tidak mampu menghambat neovaskularisasi kornea. Kelompok P3 dan P4 menunjukkan perbedaan signifikan dengan kontrol negatif, tetapi pada kelompok P3 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif dan kelompok P4. Hal itu menunjukkan bahwa kelompok P3 dan P4 dengan dosis ekstrak daun kitolod 1 mg/ml dan 2 mg/ml mampu menghambat neovaskularisasi kornea. Kelompok P3 dan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P1 dan P2. Hal ini menunjukkan semakin besar dosis yang diberikan semakin rendah luas neovaskularisasi yang terbentuk.



## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Efek Ekstrak Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) Terhadap Neovaskularisasi Kornea Tikus Wistar Model Trauma Kimia”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada pihak-pihak sebagai berikut:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Cicih Komariah, Sp.M. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Muhamad Hasan, M.Kes., Sp.OT. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked. selaku Dosen Penguji I dan dr. Edy Junaidi, M.Sc., Sp.M. selaku Dosen Penguji II atas segala saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuannya selama menjadi mahasiswa;
5. Orangtua tercinta, Ibu Roes Ersi Kartika Diana dan Ayah Suswanto yang tidak pernah lelah memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang, serta pengorbanan selama ini;
6. Kedua saudaraku, Kakak Airlangga Febianto Ersyan dan Kakak Faizal Fatahillah yang selalu memberikan doa, dukungan, kasih sayang dan berbagai pembelajaran;
7. Sahabat tercinta Nurlaila Ayu Purwaningsih, Moh. Lutfi Hasbullah, Prayoga Triyadi Putra, Ainindya Pasca Rachmadiani, Afifatun Hasanah dan keluarga

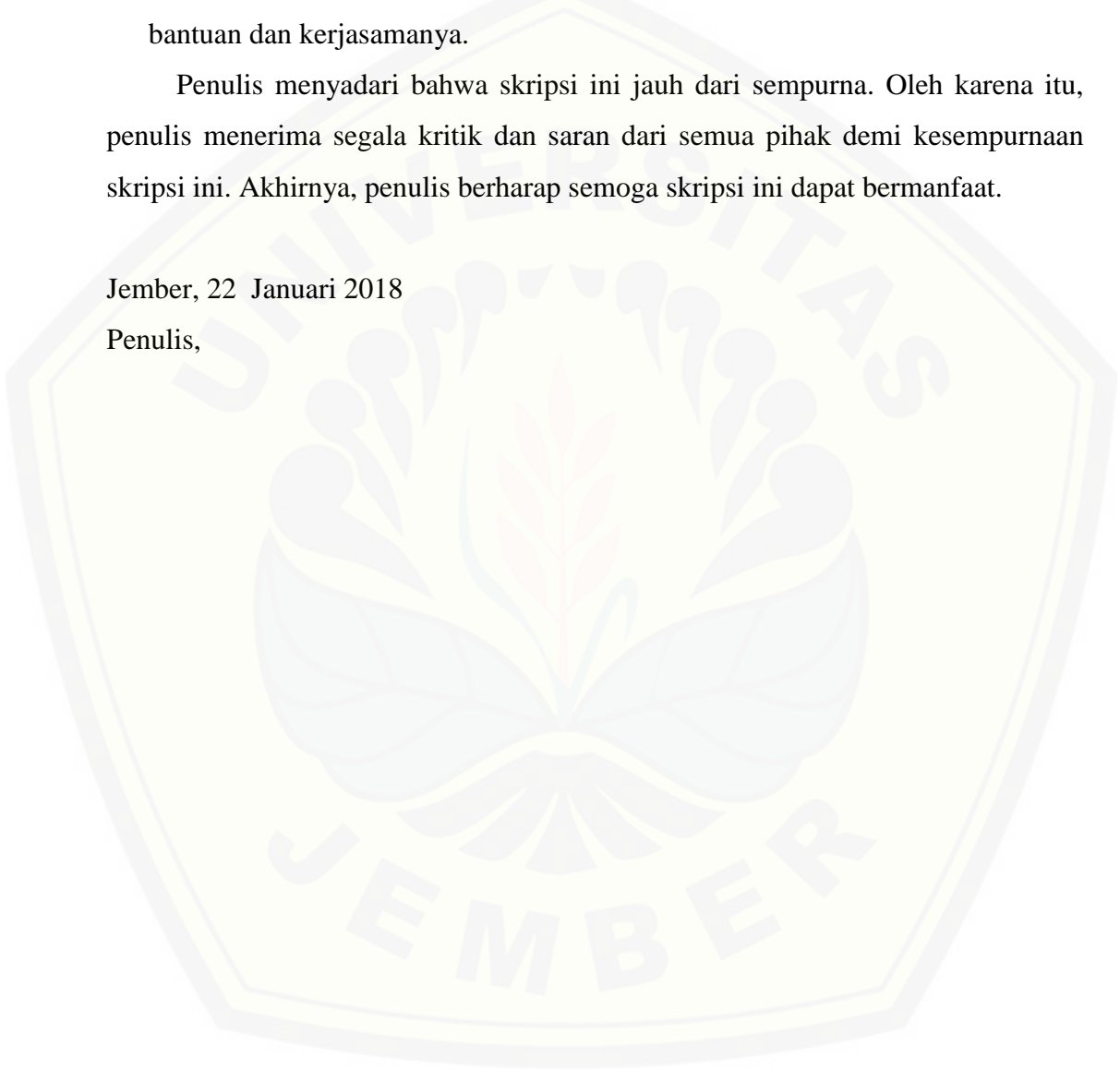
besar Elixir 2014 atas segala semangat, dukungan, dan bantuan selama menempuh pendidikan;

8. Sahabat sedari dulu Agung Herlambang dan Laksamana Yudhistira atas segala semangat, dukungan, dan bantuan selama menempuh pendidikan;
9. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 22 Januari 2018

Penulis,



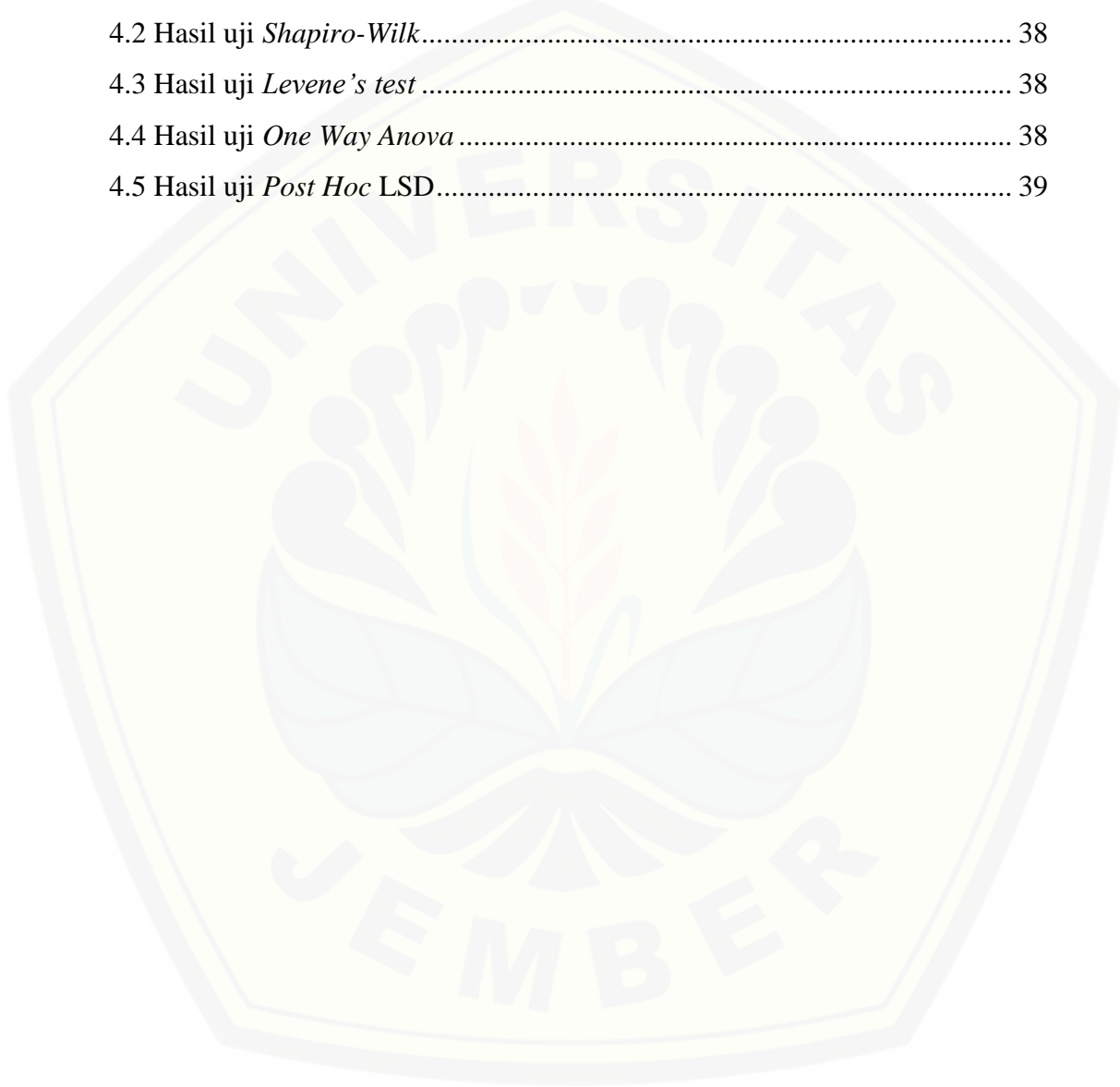
DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Anatomi Mata</b> .....	4
<b>2.2 Anatomi Mata Tikus</b> .....	6
<b>2.3 Kornea Mata</b> .....	6
2.3.1 Histologi Kornea Mata .....	6
2.3.2 Fisiologi Kornea Mata.....	7
<b>2.4 Trauma Kimia Mata</b> .....	9
2.4.1 Definisi .....	9
2.4.2 Etiologi .....	10
<b>2.5 Trauma Kimia Mata Basa</b> .....	10
2.5.1 Definisi .....	10
2.5.2 Patofisiologi.....	10
2.5.3 Tatalaksana .....	12
<b>2.6 Corneal Neovascularization (CNV)</b> .....	13
<b>2.7 Pestisida</b> .....	18
2.7.1 Definisi .....	18
2.7.2 Penggolongan Pestisida .....	18
2.7.3 Rotraz 200 EC .....	19
<b>2.8 Trauma Mata Akibat Insektisida</b> .....	19
<b>2.9 Kitolod(<i>Isotoma longiflora</i>)</b> .....	20
2.9.1 Definisi .....	20
2.9.2 Klasifikasi Tanaman .....	20
2.9.3 Kandungan Kimia Tanaman .....	21
<b>2.10 Kerangka Konseptual</b> .....	23

<b>2.11 Hipotesis Penelitian</b> .....	24
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	25
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	25
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	25
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	26
<b>3.4 Populasi dan Sampel</b> .....	26
3.4.1 Populasi .....	26
3.4.2 Sampel .....	26
<b>3.5 Variabel Penelitian</b> .....	27
3.5.1 Variabel Bebas.....	27
3.5.2 Variabel Terikat.....	27
3.5.3 Variabel Terkendali .....	27
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	28
3.6.1 Ekstrak Daun Kitolod .....	28
3.6.2 Luas Area Neovaskularisasi .....	28
<b>3.7 Bahan dan Alat</b> .....	28
3.7.1 Bahan .....	28
3.7.2 Alat .....	29
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	29
3.8.1 Uji Kelayakan Etik .....	29
3.8.2 Pemilihan Hewan Uji, Pembagian Kelompok Perlakuan ....	29
3.8.3 Aklimatisasi Hewan Uji.....	30
3.8.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kitolod .....	30
3.8.5 Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kitolod.....	31
3.8.6 Uji Pendahuluan .....	31
3.8.7 Induksi Trauma Kimia Mata pada Tikus.....	32
3.8.8 Perlakuan dengan Ekstrak Daun Kitolod.....	32
3.8.9 Perhitungan Luas Area Neovaskularisasi .....	33
<b>3.9 Alur Penelitian</b> .....	34
<b>3.10 Analisis Data</b> .....	35
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	36
<b>4.1 Hasil</b> .....	36
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	39
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	42
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	42
<b>5.2 Saran</b> .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
<b>LAMPIRAN</b> .....	50

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Pembagian kelompok perlakuan .....	30
4.1 Hasil rata-rata luas dan standar deviasi neovaskularisasi .....	37
4.2 Hasil uji <i>Shapiro-Wilk</i> .....	38
4.3 Hasil uji <i>Levene's test</i> .....	38
4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i> .....	38
4.5 Hasil uji <i>Post Hoc LSD</i> .....	39



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Anatomi mata .....	4
2.2 Anatomi mata tikus .....	6
2.3 Lapisan kornea .....	6
2.4 Trauma kimia mata basa .....	12
2.5 Proses <i>corneal neovascularization</i> (CNV).....	14
2.6 <i>Corneal neovascularization</i> pada kornea tikus .....	16
2.7 Tanaman Kitolod.....	21
2.8 Kerangka Konseptual .....	23
3.1 Rancangan Penelitian .....	25
3.2 Alur Penelitian .....	34
4.1 Neovaskularisasi pada kornea .....	36

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Trauma kimia mata adalah trauma pada mata yang disebabkan oleh substansi atau zat kimia dengan pH rendah (asam) atau pH tinggi (basa). Umumnya, trauma kimia pada mata disebabkan oleh bahan-bahan kimia yang tersemprot atau terpercik pada wajah yang tidak menggunakan alat perlindungan diri (APD) ketika berkerja. Di Amerika Serikat, didapatkan sekitar 2,4 juta trauma okuler setiap tahunnya, dimana sebanyak 20.000-68.000 orang mengalami trauma yang mengancam penglihatan dan 40.000 orang mengalami kehilangan penglihatan yang signifikan. Trauma kimia pada mata meliputi hampir 26,5% dari seluruh trauma pada mata dan lebih dari 23% pasien mengalami kecacatan pada penglihatan secara permanen (Randleman, 2010). Berdasarkan jenis zat kimia yang mengakibatkan trauma, trauma kimia pada mata dibedakan menjadi 2, yaitu trauma kimia asam dan trauma kimia basa. Trauma kimia basa merupakan trauma pada mata yang diakibatkan oleh bahan kimia yang memiliki pH >7. Insidensi kejadian trauma kimia basa akibat kecelakaan kerja sebesar 1,6%. Angka kejadian trauma kimia basa tersebut lebih tinggi daripada angka kejadian trauma kimia asam akibat kecelakaan kerja (Schrage *et al*, 2011).

Trauma kimia mata dapat disebabkan oleh pestisida. Pestisida merupakan substansi kimia yang sering digunakan untuk membasmi serta mengendalikan berbagai hama dalam bidang pertanian. Pestisida yang digunakan untuk membasmi hama serangga dikenal dengan sebutan insektisida. Salah satu insektisida yang umum digunakan oleh petani di Indonesia adalah pestisida golongan acarisida dengan bahan aktif amitraz untuk membasmi semua stadium tungau dan serangga tanaman pertanian yang bersifat basa. Prevalensi angka keracunan tingkat sedang pada petani Indonesia dimusim penyemprotan dapat mencapai angka puluhan juta petani (Achmadi, 2008). Di Indonesia, 78,9% petani mengalami keluhan mata akibat paparan pestisida (Maranata, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa trauma kimia mata akibat pestisida sangat tinggi karena penggunaan APD petani yang masih rendah.



Kejadian trauma kimia basa pada mata dapat menyebabkan suatu kondisi yang disebut *cornea neovascularization* (CNV). Di Amerika Serikat, sekitar 4% populasi mengalami CNV dan sekitar 1,4 juta pasien beresiko mengalami CNV setiap tahunnya (Lee *et al*, 1998). Trauma kimia basa menyebabkan inflamasi hebat sehingga terbentuk vaskularisasi (pembuluh darah) pada kornea yang seharusnya dalam keadaan avaskular (Shakiba *et al*, 2009). Kondisi avaskular pada kornea mata tersebut disebabkan oleh adanya keseimbangan antara angiogenik dan antiangiogenik. CNV berhubungan dengan produksi faktor anigogenik lokal dan mediator inflamasi seperti *epidermal and endothelial growth factor*, *fibroblast growth factor*, PGE1, PGE2, aktivator plasminogen tipe urokinase dan interleukin 2 (BenEzra, 1978; Amano *et al*, 1998; Lipman *et al*, 1992). Invasi dari polimorfonuklear leukosit pada kornea juga diketahui memiliki peran definitif dalam CNV (Ebstein *et al*, 1987). Trauma kimia basa akan menyebabkan saponifikasi pada membran sel asam lemak kornea, edema kornea, serta respon inflamasi hebat sehingga memperberat kerusakan jaringan. Respon inflamasi tersebut akan menstimulasi *ecosanoid* tertentu seperti PGE yang merupakan stimulator kuat terjadinya CNV dan leukotrien merangsang kemotaksis dari leukosit (BenEzra, 1978; Smith *et al*, 1983). Akibat yang ditimbulkan dari CNV, yaitu penurunan kejernihan pada kornea mata dan meningkatnya kegagalan pada transplantasi kornea atau keratoplasti hingga 30% karena hilangnya *immune privilege* kornea sehingga memperburuk prognosis (Cursiefen *et al*, 1998).

Saat ini, banyak dilakukan pemanfaatan tanaman sebagai upaya rehabilitasi penyakit. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan yaitu tanaman kitolod yang terbukti dapat digunakan sebagai obat tradisional, antara lain untuk penyakit asma, bronkhitis, radang tenggorokan, luka, obat anti kanker, obat mata, anti-neoplastik, anti-inflamasi, hemostasis, serta sebagai analgesik (Hariana, 2013). Tanaman kitolod mengandung beberapa senyawa kimia alkaloid, yaitu isotomin, lobelin, dan lobelamin (Hariana, 2013). Daun kitolod memiliki kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1994). Kandungan flavonoida dan polifenol yang terdapat pada

tanaman kitolod tersebut dapat berperan sebagai anti-inflamasi sehingga dapat menurunkan neovaskularisasi pada kornea yang terbentuk akibat paparan zat kimia basa pada mata. Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimanakah efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia.

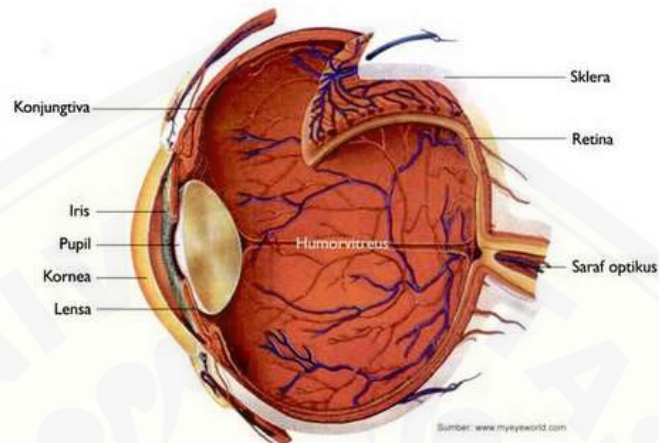
### **1.4 Manfaat Penelitian**

Berdasarkan uraian tersebut, manfaat penelitian yang diharapkan adalah sebagai berikut.

- a. Memberikan informasi bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) sebagai obat alternatif untuk mengurangi kerusakan pada kornea mata yang mengalami trauma kimia dengan mengukur luas area neovaskularisasi.
- b. Memberikan informasi untuk masyarakat dan juga peneliti mengenai efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) sebagai terapi alternatif trauma kimia mata secara *in vivo*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Anatomi Mata



Gambar 2.1 Anatomi mata (Djing, 2006)

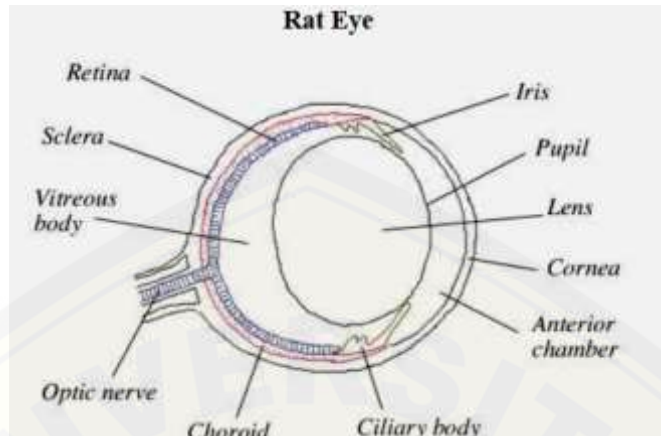
Mata memiliki struktur dan fungsi sebagai berikut (Djing, 2006).

- a. Sklera adalah lapisan terluar pada mata yang berwarna putih dan relatif kuat. Berfungsi sebagai pelindung bagian mata yang berada dibawahnya.
- b. Konjungtiva adalah selaput tipis yang terdapat pada bagian dalam kelopak mata (konjungtiva palpebra) dan juga melapisi bagian bagian luar dari sklera (konjungtiva bulbar).
- c. Kornea adalah struktur transparan, jernih dan avaskular dengan bentuk menyerupai bentuk kubah. Kornea berfungsi sebagai pelindung dari iris, pupil, dan bilik anterior. Kornea berperan dalam membantu proses masuknya cahaya. Cahaya yang masuk melalui kornea selanjutnya akan diteruskan menuju pupil.
- d. Pupil adalah daerah berwarna hitam yang terletak diantara iris. Besar kecilnya pupil dikontrol oleh otot sfingter pupil dengan cara membuka dan menutup iris sehingga ukuran pupil berubah.
- e. Iris adalah jaringan berwarna pada mata yang berbentuk cincin yang mengelilingi pupil, terdapat di antara lensa dan kornea. Iris berfungsi untuk mengatur jumlah cahaya yang masuk dengan cara kerja membuka dan

menutup (untuk merubah ukuran pupil), cara kerja ini mirip seperti celah pada lensa kamera.

- f. Lensa adalah bentukan cembung ganda yang terdapat diantara humor aqueous dan vitreus atau terdapat di belakang iris. Lensa berfungsi dalam memfokuskan cahaya yang masuk dari pupil agar jatuh tepat di retina.
- g. Retina merupakan lapisan-lapisan jaringan yang peka terhadap cahaya yang terletak di bagian belakang bola mata. Makula merupakan bagian kornea yang memiliki banyak ujung saraf dan sensitif terhadap cahaya. Cahaya yang ditangkap pada retina akan diubah menjadi gelombang listrik yang akan disalurkan melalui saraf optikus menuju otak.
- h. Saraf optikus adalah kumpulan dari serat saraf yang jumlahnya jutaan dimana akan membawa pesan visual yang ditangkap retina agar bisa diterima oleh otak.
- i. *Humor aqueous*, adalah cairan encer dan jernih yang dihasilkan oleh prosesus siliaris yang mengisi bagian bilik depan mata. Cairan tersebut berguna sebagai sumber nutrisi untuk lensa dan kornea.
- j. *Humor vitreus* adalah gel transparan yang mengisi ruangan diantara lensa dan retina (*posterior chamber*).
- k. Limbus adalah bagian yang merupakan pertemuan antara kornea dan sclera atau merupakan suatu area peralihan dengan stroma yang transparan dan bersatu dengan sklera opak. Regio ini memiliki mikrovaskular, beserta humor aquosa pada bilik anterior, berfungsi menyediakan metabolitnya untuk sel kornea melalui difusi.

## 2.2 Anatomi Mata Tikus

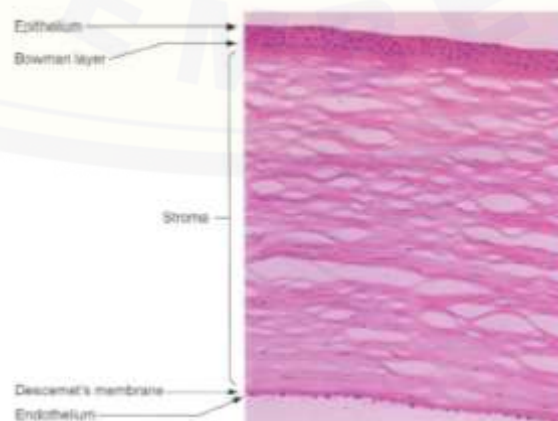


Gambar 2.2 Anatomi mata tikus (Hanson, 2004)

Mata pada tikus tidak memiliki perbedaan dengan mata pada hewan mamalia lainnya. Tikus yang sehat akan memiliki mata berwarna merah dan cerah. Kornea terdiri dari 5 lapisan, diameter kornea pada tikus jantan yang sudah dewasa berkisar  $6,8 \pm 0,2$  mm, sedangkan pada tikus betina dewasa ukuran diameter kornea lebih kecil dibandingkan dengan jantan, yaitu berkisar  $6,4 \pm 0,1$  mm (Suckow *et al*, 2006). Pupil tikus memiliki ukuran yang sangat bervariasi. Ukuran pupil pada tikus pada tempat yang redup dapat mencapai ukuran 1,2 mm dan di bawah sinar akan menyusut menjadi 0,2 mm (Hanson, 2004).

## 2.3 Kornea Mata

### 2.3.1 Histologi Kornea Mata



Gambar 2.3 Lapisan Kornea (America Academy of Ophthalmology, 2011-2012b)

Kornea meliputi seperenam anterior mata, dimana tidak berwarna dan transparan serta sepenuhnya avaskular. Potongan melintang dari kornea memperlihatkan bahwa struktur ini terdiri atas lima lapisan yaitu epitel skuamosa eksternal berlapis, membran limitans anterior, stroma, membran limitans posterior, dan endotel. Epitel permukaan berlapis tidak bertanduk, dengan lima sampai enam lapisan sel yang membentuk sekitar 10% ketebalan dari kornea. Sejumlah besar gambaran dari mitosis terdapat di lapisan basal, terutama didekat tepi kornea, yang menggambarkan pembaruan dan perbaikan sel. Sebagai upaya perlindungan lain, epitel kornea memiliki salah satu persarafan sensoris terbanyak dari jaringan lain. Membran basal epitel ini sangat tebal dan berperan dalam stabilitas serta kekuatan kornea, yang membantu melindungi infeksi pada stroma yang berada di bawahnya (Mescher, 2011).

Stroma tebal, atau substansia propia, dibentuk oleh sekitar 60 lapisan berkas kolagen parallel yang tersusun saling menyilang tegak lurus dan membentangi keseluruhan dari diameter kornea. Susunan orthogonal serabut kolagen yang seragam ini memiliki peran pada kejernihan jaringan avaskular. Permukaan posterior stroma terhubung dengan suatu struktur yang tebal yang terdiri atas jaringan jalinan serat kolagen halus yang di atasnya terdapat endotel kapiler. Sel epitel skuamosa selapis ini berperan aktif dalam sintesis protein dan pemompaan ion natrium ke dalam bilik anterior yang berdekatan. Dengan demikian, endotel sangat berperan dalam memelihara keadaan hidrasi pada kornea dengan membantu memberikan kejernihan maksimal dan pembiasan cahaya yang optimal (Mescher, 2011).

### 2.3.2 Fisiologi Kornea Mata

Kornea merupakan membran pelindung bagi iris, lensa dan bagian mata lainnya yang berada di bawahnya. Kornea terdiri dari 5 lapisan yaitu lapisan epithelium, *Bowman layer*, stroma, *Descement membrane*, dan endothelium. Lapisan epithelium dilapisi oleh *tear film* yang berperan dalam mengeluarkan mikroirregularitas dari permukaan epithelial anterior. *Air-tear film* dipermukaan bersamaan dengan kornea yang berada dibawahnya, membentuk 2/3 dari semua

total kekuatan pembiasan pada mata. Lapisan *mucinous* yang terdapat pada *tear film* yang dihasilkan oleh sel goblet konjungtiva dan berinteraksi dengan epithelial kornea sel glycocalyx. Kerusakan pada sel glycocalyx akibat luka atau penyakit menyebabkan kerusakan dari keseimbangan *tear film* dan akan berakibat rusaknya sistem okular optikal. *Tear film* berfungsi untuk melindungi dari invasi mikroba, zat kimia, zat toksik, dan benda asing yang menyebabkan kerusakan. *Tear film* juga berperan sebagai pemasok imunologi dan *growth factory* yang sangat berperan pada kesehatan epithelial, proses proliferasi, dan perbaikan sel. Kerusakan pada epithel akan mengakibatkan edema kornea yang bersifat lokal dan sesaat, dimana akan menghilang apabila sel-sel epitel telah selesai beregenerasi (DelMonte & Kim, 2011).

Stroma kornea berbeda dengan struktur kolagen lainnya dikarenakan sifat transparannya, dikarenakan susunan dari serat-serat stroma dan matriks ekstraseluler (ECM). Keratosit merupakan tipe sel kornea terbesar dan berperan dalam susunan lingkungan ECM. Kerasit berperan dalam sintesis matriks metalloprotease (MMPs) yang sangat berperan dalam menjaga homeostatis stroma (DelMonte & Kim, 2011).

Lapisan endothelial memegang peranan penting dalam kejernihan kornea dengan menjaga keadaan deturgensi relatif. Pada bagian lateral terdapat mengandung banyak pompa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPase. Keadaan dehidrasi diperantarai oleh adanya pompa sebagai jalan keluarnya cairan dari stroma kornea dibawahnya melewati gradien osmotik dari relatif hiposmotik stroma melewati relatif hipertonic aqueous humor. Kerusakan pada lapisan endothelial akan menyebabkan kerusakan yang lebih berat dibandingkan kerusakan yang terjadi di lapisan epithelial. Pada endothel, kerusakan sel-sel akan mengakibatkan terjadinya edema kornea dan dapat mengakibatkan hilangnya sifat transparan pada kornea. (DelMonte & Kim, 2011).

Penetrasi obat tetes mata dapat melalui kornea secara utuh apabila bersifat bifasik. Obat harus bersifat larut air dan larut lemak, sehingga dapat melalui kornea. Substansi larut lemak dapat melalui lapisan epitel secara utuh, tapi tidak

dapat melalui lapisan stroma sedangkan substansi larut air dapat melalui hingga lapisan stroma secara utuh (DelMonte & Kim, 2011).

Beberapa kondisi yang dapat menyebabkan terjadinya kelainan pada kornea yaitu *dry eye*, defisiensi vitamin A, distrofi kornea, dan kelainan bawaan seperti megalokornea dan mikrokornea, trauma kornea. *Dry eye* dikarenakan terjadinya defisiensi *tear film* sehingga dapat menyebabkan terjadinya suatu infeksi mikroba pada mata. Defisiensi vitamin A menyebabkan kekeringan pada kornea mata dan terdapat bercak *bitot* seperti mutiara berbentuk segitiga dengan pangkal yang terdapat di daerah limbus. Bercak bitot tersebut dihasilkan karena adanya infeksi kuman *Corynebacterium xerosis*. Defisiensi kornea juga dapat menyebabkan terjadinya keratomalasia dan tukak pada kornea yang akan mengalami nekrosis dengan vaskularisasi yang ada di dalamnya. Megalokornea diakibatkan oleh adanya pembesaran dari bagian segmen anterior bola mata, sedangkan pada mikrokornea diakibatkan oleh beberapa faktor penyebab. Salah satu penyebab terjadinya mikrokornea adalah pertumbuhan berlebih pada *anterior optic cup* yang mengakibatkan sempitnya ruang kornea untuk berkembang. Distrofi kornea diakibatkan oleh adanya deposit abnormal yang diikuti dengan perubahan struktur kornea, bersifat hereditas dan biasanya bilateral simetris. Trauma pada kornea dapat diakibatkan oleh bahan kimia, trauma tumpul, trauma thermal dan perforasi akibat benda asing (Ilyas, 2009).

## 2.4 Trauma Kimia Mata

### 2.4.1 Definisi

Trauma kimia mata adalah trauma yang terjadi pada mata oleh akibat masuknya zat kimia atau substansi dengan pH yang tinggi (basa) atau rendah (asam). Zat kimia bersifat asam jika memiliki pH <7 dan dikatakan basa jika memiliki pH >7. Trauma kimia mata biasanya disebabkan bahan-bahan kimia yang tersemprot atau terpercik pada wajah (American Academy of Ophthalmology, 2012).



### 2.4.2 Etiologi

Berdasarkan sifat dari substansi atau zat kimia yang menyebabkan terjadinya trauma kimia pada mata, dapat digolongkan menjadi 2 kelompok yaitu (American Academy of Ophthalmology, 2012):

#### a. *Alkali/basa*

Bahan alkali yang banyak menyebabkan trauma kimia adalah:

1. NaOH, merupakan zat kimia basa kuat untuk membersihkan pipa.
2. NH<sub>3</sub>, merupakan zat yang umum ditemukan sebagai bahan untuk pupuk, zat pembersih rumah tangga, serta zat untuk pendingin.
3. KOH, contohnya seperti *caustic potash*.
4. Ca(OH)<sub>2</sub>, dapat ditemukan seperti pada perekat, mortar, semen dan kapur.
5. Mg(OH)<sub>2</sub>, dapat ditemukan pada kembang api.

#### b. *Acid/asam*

Bahan asam yang banyak menyebabkan trauma adalah:

1. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, contohnya pada aki mobil dan bahan pembersih pada industri.
2. H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, ditemukan pada pengawet sayur dan buah.
3. HF, memiliki efeknya sama beratnya dengan trauma yang disebabkan oleh basa. Dapat ditemukan pada pembersih karat, pengilat aluminium, dan penggosok kaca.
4. CH<sub>3</sub>COOH, contohnya seperti cuka makanan.
5. HCl dimana hampir ditemukan pada 31-38% kasus, biasanya digunakan sebagai zat pembersih.

## 2.5 Trauma Kimia Mata Basa

### 2.5.1 Definisi

Merupakan trauma pada mata yang diakibatkan oleh bahan kimia yang memiliki pH >7 (American Academy of Ophthalmology, 2012).

### 2.5.2 Patofisiologi

Trauma kimia basa hanya akan menunjukkan gejala iritasi pada mata apabila dilihat secara langsung, akan tetapi jika dilihat pada bagian dalam pada

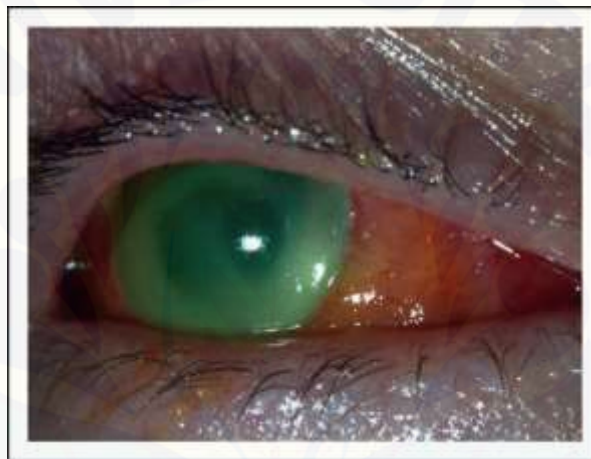
mata, zat basa akan mengakibatkan suatu kegawatdaruratan jika sudah mengenai bagian retina. Substansi basa bersifat lipofilik dan penetrasi pada mata lebih cepat dibandingkan dengan zat asam. Bahan dasar substansi basa akan secara cepat bereaksi dengan jaringan-jaringan yang terdapat pada permukaan mata yang akan menyebabkan reaksi saponifikasi dengan dengan sel-sel tersebut. Jaringan yang mengalami kerusakan akan mensekresi enzim proteolitik sebagai suatu respon inflamasi, yang mana akan menyebabkan kerusakan lebih berat yang dikenal dengan proses *liquefactive necrosis* (Fish & Davidson, 2010).

Ion hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) akan mensaponifikasi komponen asam lemak dari membran sel dengan dengan disertai kerusakan sel dan kematian sel, sedangkan ion kation bertanggung jawab dalam proses penetrasi dari substansi basa yang spesifik (McCulley, 1987). Kekuatan penetrasi meningkat dari yang paling lambat yaitu kalsium hidroksida, sodium hidroksida dan yang paling cepat adalah amonium hidroksida (Grant, 1974).

Berdasarkan derajat dari kekuatan penetrasi zat kimia, terdapat kehilangan dari endothelium korneal dan konjungtiva, keratosis stroma dan endothelium. Hidrasi dari glikosaminoglikan menyebabkan berkurangnya kejernihan dari stroma. Kerusakan yang terjadi pada endothelium vaskular dari konjungtiva dan pembuluh episcleral akan memicu trombosis pada pembuluh-pembuluh episcleral. Semakin tinggi dari pH zat basa, semakin cepat penetrasi pada mata yang terjadi. Kerusakan yang bersifat irreversibel apabila zat basa memiliki pH diatas 11,5 (Friedenwald *et al*, 1946). pH akan meningkat dalam aqueous humor dalam beberapa detik dari kontak dengan amonium hidroksida. Struktur-struktur intraokular seperti iris, lensa dan badan siliaris akan secara cepat mengalami kerusakan (Kuckelkorn *et al*, 2002).

Substansi toksik seperti prostaglandin, radikal superoksida, histamin, angiotensin, leukotrien dan lainnya akan dilepaskan dari jaringan yang mengalami nekrosis akibat sel yang terbakar (Rochels *et al*, 1982). Sebuah respon inflamasi dipicu ketika zat-zat tersebut dapat berdifusi melalui jaringan yang sehat.

Trauma kimia basa dapat menyebabkan terjadinya hidrasi kolagen yang mengakibatkan terjadinya pemendekan dan distorsi pada fibril. Pemendekan pada fibril mengakibatkan terjadinya jalinan trabekulum yang akan memicu terjadinya peningkatan tekanan intraokular. Peningkatan tekanan intraokular disebabkan karena mediator inflamasi yang akan merangsang pelepasan prostaglandin. Zat kimia basa yang berhasil mencapai bagian retina akan menyebabkan terjadinya kebutaan pada penderitanya (American Academy of Ophthalmology, 2012). Penetrasi bahan akustik soda api dapat menembus bilik depan mata hanya dalam waktu 7 detik (Palao *et al*, 2009).



Gambar 2.4 Trauma Kimia Mata Basa (Fish & Davidson, 2010)

Terjadinya trauma kimia mata basa dapat menimbulkan beberapa penyulit yaitu terjadinya edema disertai dengan neovaskularisasi kornea, simblefaron, kekeruhan pada kornea, katarak traumatik serta dapat menimbulkan ftisis pada bola mata (Fish & Davidson, 2010). Penyulit jangka panjang yang ditimbulkan dari penetrasi bahan kimia basa yaitu terjadinya pembentukan jaringan parut kornea, glaukoma sudut tertutup, entropion, simblefaron, dan keratitis sika (Palao *et al*, 2009).

### 2.5.3 Tatalaksana

Tatalaksana terpenting dalam kejadian trauma kimia mata yaitu mengirigasi mata secepat mungkin dengan jumlah yang banyak menggunakan air yang bersih. Sangat penting untuk mengirigasi dibagian atas dan bawah kelopak mata untuk

menghilangkan partikel-partikel padat, seperti *lime*. Ukur pH mata menggunakan kertas lakmus dan lakukan anamnesis dengan cepat. Pemberian vitamin C secara oral maupun topikal akan membantu dalam proses penyembuhan. Pemberian antikoagenase secara sistemik dan topikal mungkin dibutuhkan untuk mencegah kerusakan kolagen pada kornea seperti *Tetracycline* (James *et al*, 2003).

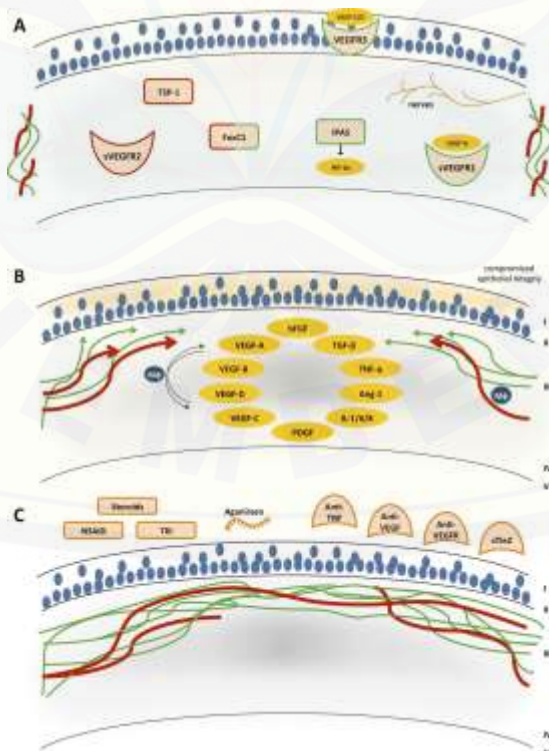
Setelah dilakukan irigasi terus-menerus dan pH sudah didapatkan dalam keadaan normal, harus dilakukan pemeriksaan mata yaitu *visual acuity*, tekanan intraokular, iskemia perilimbal. Pada iskemia perilimbal perlu diperhatikan bagian yang sudah mengalami iskemia dibandingkan dengan bagian yang belum mengalami iskemia dan bentukan dari korneal epithelium. Pengecekan pH segera harus dilakukan pada kedua mata dan meskipun penderita mengatakan hanya merasakan iritasi atau sakit pada salah satu matanya (Fish & Davidson, 2010).

Pada trauma kimia derajat sedang hingga berat, pemberian analgesik oral seperti *acetaminofen* dapat diberikan untuk mengurangi nyeri yang dirasakan. Pemberian antibiotik topikal spektrum sebagai profilaksis dapat diberikan untuk mencegah terjadinya infeksi bakteri. Untuk mencegah terjadinya spasme dari siliar, pemberian sikloplegik seperti atropin 1% dapat diberikan serta mempunyai efek untuk menstabilisasi permeabilitas pembuluh darah. Pemberian antiglaukoma dapat diberikan apabila didapatkan peningkatan TIO > 30 mmHg. Steroid seperti dexamethasone 0,1%, dapat diberikan untuk mengurangi inflamasi dan infiltrasi netrofil yang menghambat dari proses re-epitelisasi. Penggunaan steroid hanya boleh digunakan selama 7-10 hari pertama dikarenakan efek samping yang diberikan oleh steroid yaitu menghambat sintesis kolagen dan menghambat migrasi fibroblast sehingga proses penyembuhan terhambat (Fish & Davidson, 2010).

## **2.6 Corneal Neovascularization (CNV)**

*Corneal Neovascularization* (CNV) merupakan terbentuknya pembuluh darah pada kornea yang seharusnya avaskular. Suplai darah menuju kornea berasal dari arteri-arteri siliaris, yang mana merupakan cabang dari arteri *ophthalmic* yang terbagi dan berakhir di pleksus perikorneal di area limbus. CNV melibatkan dari pertumbuhan pembuluh darah baru terutama berasal dari kapiler-

kapiler dan venul-venul dari pleksus perikorneal (Yaylali *et al*, 1998). Meskipun CNV mungkin akan melibatkan beberapa lapisan kornea, studi terbaru menunjukkan bahwa lokasi utama dari pembentukan awal pembuluh darah pada kornea adalah di lapisan teratas dan area lapisan tengah ketiga dari anterior stroma (Cursiefen *et al*, 1998). Kondisi avaskular dari kornea disebabkan adanya keseimbangan antara mediator angiogenik dan anti-angiogenik. Avaskularisasi dari kornea membutuhkan kadar yang rendah dari angiogenik faktor dan kadar yang tinggi dari anti-angiogenik faktor dibawah kondisi basal. Terjadinya vaskularisasi pada kornea tidak hanya diakibatkan karena peningkatan regulasi dari angiogenik faktor, tapi juga penurunan regulasi dari anti-angiogenik faktor (Folkman & Shing, 1992). Mediator angiogenik yang terdapat pada kornea adalah *angiostatin*, *restin*, *endostatin*, dan *pigmen epithelium derived factor*. Mediator angiogenik terdiri dari *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs) (Oh *et al*, 2009).



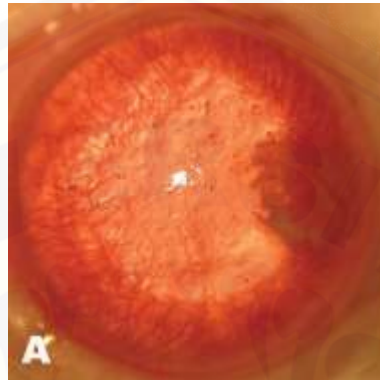
Gambar 2.5 Proses *Corneal Neovascularization* (CNV) (Kather & Kroll, 2014)

VEGF mengalami peningkatan dalam proses inflamasi dan pembentukan pembuluh darah kornea pada manusia maupun hewan coba (Philipp *et al*, 2000). Utamanya diproduksi oleh makrofag-*T-cells*, sel epitelial pigmen retina, astrosit, dan sel otot halus. VEGF memicu beberapa proses dari angiogenesis, termasuk aktivitas proteolitik, proliferasi sel endothelial, migrasi dan pembentukan pembuluh kapiler. Aktivitas VEGF bisa dihambat dengan implantasi stromal dari sebuah anti-VEGF yang menghambat antibodi pada percobaan tikus (Amano, 1998).

bFGF secara ekstensif digunakan pada saat proses CNV. FGF-1 terdapat pada epitelium kornea normal, dan FGF-2 akan meningkat kadarnya setelah trauma dan terdapat pada *keratocyte-vascular endothelial cell coculture* (Hayasi, *et al*, 1996). bFGF berikatan dengan Bowman dan Descemet membran pada CNV. Berdasarkan derajat dari maturasi pembuluh darah baru, ditemukan juga intensitas dari ikatan yang terdapat pada normal limbus dan baru terbentuknya vaskular di kornea (Soubrane *et al*, 1990). Ikatan ini mungkin dengan *heparan sulfate proteoglycans*, menekankan peranan dari *extracellular matrix* (ECM) dalam peranannya dari CNV.

Pergantian dari *extracellular matrix* berhubungan dengan proses penyembuhan luka biasanya bersamaan dengan angiogenesis di jaringan granulasi. Salah satu tanda dari penyembuhan luka pada kornea adalah berkurangnya reaksi vaskular ini. MMPs adalah kelompok dari *zinc-binding proteolytic enzymes* yang berperan dalam ECM remodeling dan dalam angiogenesis (Woessner, 1998). Terdapat 8 jenis MMPs yang diidentifikasi terdapat pada kornea, termasuk *collagenase I and III* (MMP-1 dan -13), *gelatinases A and B* (MMP-2 dan -9), *stromelysin* (MMP-3), *matrilysin* (MMP-7), dan *membrane type-MMP* (MMP-14) (Lu *et al*, 1999). Meskipun semua jenis MMP terjadi peningkatan selama CNV telah terbukti, peranan MMP dalam angiogenesis mungkin bisa mengakibatkan keambiguan, sama seperti molekul dapat berperan sebagai sebagai pro-angiogenik atau sebuah anti-angiogenik faktor. Aktivasi dari *gelatinase A* (MMP-2) dapat melepas fragmen anti-angiogenik, mungkin juga akan memproduksi angiogenik faktor yang potent, atau

mungkin memfasilitasi angiogenik (Itoh *et al*, 1998). MMPs memiliki dua fungsi selama angiogenik berlangsung, hal ini dapat dijelaskan dengan kemampuannya untuk menurunkan ECM, memicu invasi jaringan dengan sel *MMP-bearing endothelial* dan kemampuannya untuk menghasilkan atau melepaskan fragmen anti-angiogenik dari perkusornya yang menurunkan komponen angiogenik.



Gambar 2.6 *Cornea Neovascularization* pada kornea tikus (Oh *et al*, 2009)

Beberapa molekul anti-angiogenik terdeteksi atau terbukti terdapat pada kornea. Anti-angiogenik faktor ini mungkin bisa terbagi dari perkusor yang lebih besar oleh *proteolytic cleavage* atau langsung dihasilkan dalam bentuk aktifnya. Pada mata, implantasi dari angiostatin dan *angiostatin-like fragment* menghambat CNV yang dipicu oleh bFGF atau angiogenik (Shin *et al*, 2000) . Beberapa penelitian membuktikan bahwa kornea memproduksi angiostatin yaitu sintesis *extra-hepatic* dari plasminogen dapat ditemukan di epitelial kornea, angiostatin terpisah dalam lapisan air mata dari lensa kontak, dan semua MMPs bertanggung jawab untuk produksi angiostatin dan sudah terdeteksi di kornea.

Endostatin merupakan fragmen proteolitik dari kolagen XVIII yang telah terpisahkan dari medium yang kondisional yaitu baris sel *murine hemangioendothelioma* dan telah terbukti menghambat FGF-2 dan VEGF yang memicu migrasi dan proliferasi sel endotelial secara *in vitro* dan mengurangi perkembangan tumor pada tikus. Pada mata, kolagen XVIII telah terlokalisir pada retina, kapsul lensa, dan kornea. Pembelahan pada kolagen XVIII oleh protease memicu *endostatin-like fragments* yang mana mungkin akan menampilkan

komponen anti-angiogenik. Endostatin pada kornea menunjukkan penghambatan dari bFGF yang memicu CNV (Vazquez *et al*, 1999).

*Pigmen epithelium derived factor* (PEDF) adalah anti-angiogenik kuat dan faktor neutrophic yang pertama kali ditemukan di sel retinoblastoma dan digambarkan dalam epitelial berpigmen dari retina, iris dan kornea. Menghambat antibodi yang melawan produksi PEDF pada CNV ketika terdapat di stroma kornea tikus (Chang *et al*, 2001).

Pada kasus trauma kimia basa, zat kimia basa nantinya akan terdisosiasi menjadi ion hidroksil dan kation pada permukaan bola mata. Ion hidroksil akan merangsang reaksi saponifikasi pada membran sel asam lemak dan kation akan berinteraksi dengan kolagen stroma dan glikosaminoglikan. Jaringan yang rusak nantinya akan menstimulasi respon inflamasi, yang akan memerangsang pelepasan suatu enzim proteolitik, sehingga akan memperberat terjadinya kerusakan pada jaringan. Jaringan mukopolisakarida akan menghilang dan terjadi penggumpalan sel kornea atau keratosis. Serat kolagen kornea akan membengkak dan stroma kornea akan mengalami nekrosis (Drake *et al*, 2012). Edema kornea akan mengakibatkan terdapatnya serbuk sel polimorfonuklear ke dalam stroma kornea. Edema kornea merupakan awal dari terbentuknya neovaskularisasi kornea yang dapat dijelaskan oleh aktivitas dari PGE (vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, pembebasan histamin) (Rochels, 1984). Metabolisme asam arachidonat (eicosanoids) seperti prostaglandin (PGs) dan leukotrien memegang peranan penting dalam respon CNV (Haynes *et al*, 1989). PGs merupakan produk dari jalur siklooksigenase (COX), dan tipe E dari PGs merupakan stimulator potent dari respon CNV (Rochels, 1984). Leukotrien merupakan produk dari jalur lipooksigenase, juga dapat memegang peranan dalam CNV dengan mestimulasi kemotaksis dari leukosit (Smith *et al*, 1983). Kortikosteroid dan NSAID dapat menghambat inflamasi dan CNV dalam beberapa studi (Heynes *et al*, 1989).



## 2.7 Pestisida

### 2.7.1 Definisi Pestisida

Pestisida merupakan substansi yang umum digunakan untuk membunuh atau mengendalikan berbagai macam hama. Kata pestisida berasal dari kata *pest* yang berarti hama dan *cida* yang berarti pembunuh. Pestisida adalah semua zat kimia atau bahan lain dapat juga berupa jasad renik dan virus yang dapat digunakan untuk membrantas atau mencegah hama-hama dan penyakit yang dapat merusak tanaman baik itu pada bagian-bagian tanaman ataupun dari hasil pertanian. Pestisida dapat juga untuk memberantas gulma, mengatur pertumbuhan pada tanaman, dapat juga untuk mematikan dan mencegah hama-hama liar pada hewan peliharaan, ternak, air, rumah tangga, bangunan serta alat-alat angkutan, dimana juga dapat menyebabkan penyakit pada manusia atau binatang yang perlu dilindungi penggunaannya pada tanaman, tanah dan air (Djojosemarto, 2008).

### 2.7.2 Penggolongan Pestisida

Pestisida yang kita temui saat ini, sebagian besar merupakan bahan kimia sintetik yang berdasarkan bahan aktif dapat digolongkan menjadi golongan chlorinated hydrocarbon (DDT), golongan organofosfat, dan golongan karbamat.

Dalam bidang pertanian, terdapat banyak jenis pestisida yang umum digunakan oleh petani untuk melindungi tanamannya. Beberapa jenis pestisida yang banyak digunakan Penggunaan dalam bidang pertanian sangat banyak digunakan adalah sebagai berikut (Kegley *et al*, 2008) :

- a. Insektisida (*Insecticides*)
- b. Fungisida (*Fungicides*)
- c. Acarisida (*Acaricides*)
- d. Larvasida (*Larvacides*)
- e. Pembunuh kutu (*Pediculicides*)
- f. Mitisida (*Miticides*)
- g. Herbisida (*Herbicides*)
- h. *Attractans* (*Pheromons*)
- i. Molusida (*Molluscides*)

- j. Scabisida (*Scabicides*)
- k. Pengatur pertumbuhan tanaman (*Plant Grow Regulator*)
- l. Pengusir serangga (*Repellants*)
- m. *Defoliant*.

### 2.7.3 Rotraz© 200 EC

Insektisida golongan acrasida yang mengandung bahan aktif amitraz 200 gr/l merupakan insektisida racun kontak dan racun pernafasan yang poten. Tungau dan serangga hama sasaran yang terkena maupun yang tidak terkena semprotan akan ikut terbasmi. Memiliki cara kerja ganda yang berguna untuk memberantas banyak jenis hama serangga dan tungau pada semua stadium pertumbuhan baik itu telur, nimfa dan larva sampai serangga atau tungau dewasa. Bahan aktif amitraz berdaya racun relatif rendah terhadap manusia dan hewan menyusui, unggas, ikan serta organisme lain yang bukan menjadi sasarannya. Dalam klasifikasi WHO, amitraz termasuk dalam kelas terendah III (MKDGroup, 2011).

Insektisida Rotraz 200 EC merupakan insektisida dengan pH 9-10, termasuk insektisida yang bersifat basa. Apabila terkena mata maka dapat menyebabkan keluhan iritasi pada mata dan menyebabkan trauma kima mata. Efek yang ditimbulkan ketika manusia terpapar bahan aktif amitraz adalah depresi sistem saraf pusat (mengantuk, koma dan kejang), miosis atau midriasis, depresi pernafasan, depresi kardiovaskular (bradikardia, hipotensi), hipotermia atau hipertermia, hiperglikemia, poliuria, mual dan penurunan motilitas gastrointestinal. Efek tersebut dikarenakan pengaruh alfa-adrenergik agonist, yang mana pada sistem saraf pusat reseptor alfa-2 adrenergik sama seperti pada sistem saraf tepi reseptor  $\alpha_2$  dan  $\alpha_1$  (Herath *et al*, 2017).

## 2.8 Trauma Mata Akibat Insektisida

Trauma mata akibat insektisida sering disebabkan karena dampak penggunaan pestisida dan rendahnya penggunaan alat perlindungan diri (APD). Salah satu APD yang wajib digunakan tetapi sering kali dilalaikan oleh petani adalah penggunaan kacamata (20,7%) pada saat menggunakan pestisida (Minaka

*et al*, 2016). Keluhan kesehatan yang sering dijumpai pada petani salah satunya yaitu terjadinya iritasi mata (11,36%) pada studi kasus di Philipina (Perez *et al*, 2015). Keluhan lain pada mata akibat paparan pestisidayaitu mata tersasa terbakar (15,2%), mata merah (7,3%), mata gatal (3,7%) *eye discharge* (0,7%) (Kishi *et al*, 1995). Kebiasaan tidak mencuci tangan (96,5%) setelah penggunaan pestisida (Minaka *et al*, 2016) dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kontak pestisida dengan mata. Kebiasaan lain yang dapat mengakibatkan terpercikny pestisida ke mata adalah tidak menggunakan corong saat memindahkan pestisida ke dalam tangki semprot (Minaka *et al*, 2016).

## **2.9 Kitolod (*Isotoma longiflora*)**

### **2.9.1 Definisi**

Tanaman kitolod merupakan tanaman yang memiliki tinggi mencapai 60 cm dan bercabang dari pangkalnya. Getah kitolod berwarna putih dengan rasanya yang tajam dan mengandung racun. Daunnya tunggal berbentuk lanset, permukaannya kasar, ujung daun runcing, pangkal menyempit, tepi melekok ke dalam, bergerigi sampai melekok menyirip, panjang 5-17 cm, lebar 2-3 cm, dan berwarna hijau. Memiliki bunga dengan mahkota berbentuk bintang, dan berwarna putih yang muncul tegak dari ketiak daun serta bertangkai panjang. Buahnya berbentuk kotak mirip seperti lonceng, merunduk, merekah menjadi dua ruang, dan berbiji banyak (Agromedia Redaksi, 2008). Masyarakat pada umumnya menganggap kitolod sebagai tanaman gulma karena habitat tumbuhnya berada di tempat yang biasanya kurang kita sadari, salah satunya sering kita jumpai di pinggir selokan.

### **2.9.2 Klasifikasi Tanaman**

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Campanulales

Famili : Campanulaceae

Genus : *Laurentia*

Spesies : *Laurentia longiflora* (L). *Peterm*



Gambar 2.7 Tanaman Kitolod (Ali, 2005)

### 2.9.3 Kandungan Daun Kitolod

Kitolod sangat kaya akan kandungan kimia. Kandungan kimia yang sudah banyak dikenal antara lain senyawa alkaloid, yakni isotomin, lobelin, lobelamin (Hariana, 2013). Daun kitolod mengandung senyawa berupa flavonoid, alkaloid, saponin, dan polifenol (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1994). Kandungan dalam daun kitolod, yaitu sebagai berikut.

#### a. Flavonoid

Dapat menghambat enzim-enzim oksidatif seperti *aldose reductase*, *alfa glukosidase*, *xanthine oxidase*, *monooxygenase*, *hypoxigenase* dan *cyclooxygenase* (Reynertson, 2007). Flavonoid dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) yang mengkatalis pembentukan prostaglandin (Hidayati *et al*, 2008). Merupakan bahan aktif yang mempunyai efek anti-inflamasi dan anti-mikroba (Robinson, 1995). Flavonoid terutama berkerja pada endothelium mikrovaskular untuk mengurangi terjadinya hiperpermeabilitas dan radang. Beberapa senyawa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan jalan memblok jalur siklooksigenase. Flavonoid mempunyai kemampuan antibakteri karena mempunyai kemampuan berinteraksi dengan DNA bakteri. Hasil interaksi tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Sabir, 2003). *Caffeic*

*acid phenethyl ester* (CAPE) dan flavanoid sudah dibuktikan memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat siklooksigenase dan lipooksigenase (Sud'ina, 1996).

a. Alkaloid

Bekerja sebagai antikanker dengan cara menginduksi apoptosis, menurunkan adhesi sel dan menghambat angiogenesis secara selektif. (Yanti, 2016). Kegunaan senyawa alkaloid dalam farmakologi adalah untuk memacu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, dan melawan infeksi mikrobial (Pasaribu, 2009).

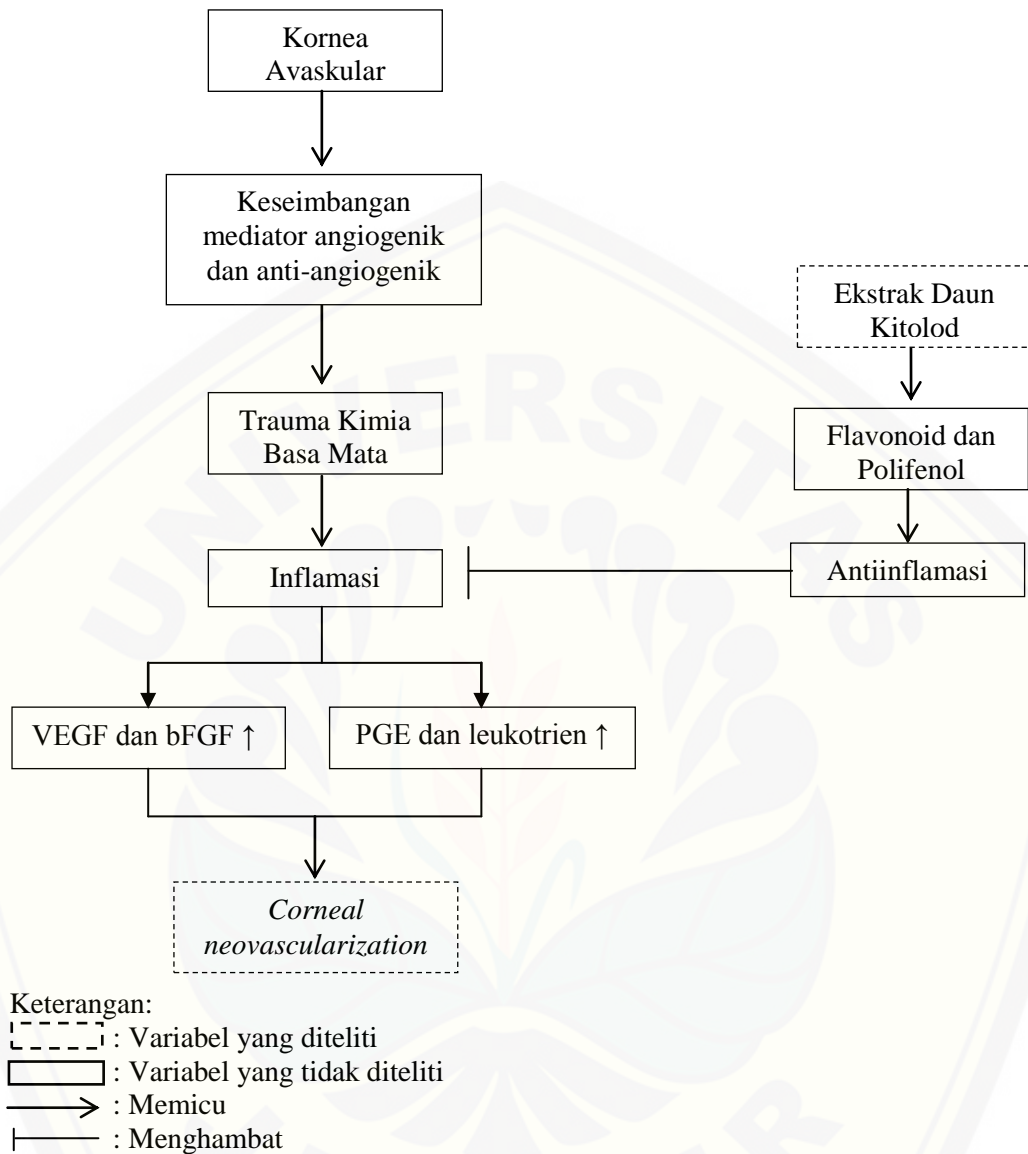
b. Saponin

Efek saponin pada pemberian konsentrasi yang rendah sering menyebabkan terjadinya hemolisis pada sel darah merah. Pada beberapa tahun terakhir saponin tmenjadi penting, karena dapat diperoleh dari beberapa tumbuhan dengan hasil yang baik dan dapat digunakan sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid yang digunakan dalam bidang kesehatan (Robinson, 1995). Beberapa saponin memiliki efek sebagai antimikroba. Kegunaan lain dari saponin yaitu dapat menurunkan kolesterol, sebagai antioksidan, antivirus dan antikarsinogenik, sebagai manipulator fermentasi rumen, dan dapat menghambat jalur steroid ke anak ginjal, serta dapat menghambat juga jalur dehidrogenase prostaglandin (Robinson, 1995). Saponin juga dapat menghambat angiogenesis dan menghambat reseptor tirosin kinase (Yanti, 2016).

c. Polifenol

Polifenol termasuk dalam komponen bioaktif yang biasa disebut katekin. Katekin merupakan senyawa multifungsi yang dapat berguna sebagai antiinflamasi, antimutagenik, antioksidan, antipenggumpalan, antivirus, dan antibakteri. Polifenol juga dapat menurunkan kadar *Low Density Lipid* (LDL) di dalam darah, dan mampu mencegah terjadinya oksidasi dalam pembuluh darah yang akan menyebabkan pembekuan trombosit. Manfaat polifenol lainnya yaitu sebagai suatu antioksidan dari golongan bioflavonol yang memiliki kekuatan jauh lebih efektif dari vitamin C dan vitamin E (Kusmana, 2006).

### 2.10 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.8 Kerangka konseptual

Kornea mata seharusnya dalam keadaan avaskular (Shakiba *et al*, 2009). Kondisi avaskular pada kornea mata disebabkan oleh adanya keseimbangan antara angiogenik dan antiangiogenik. Trauma kimia basa menyebabkan inflamasi hebat. Respon inflamasi tersebut akan menstimulasi peningkatan VEGF, bFGF, PGE, dan leukotrien sehingga terbentuk vaskularisasi (pembuluh darah) pada kornea mata. Inflamasi mata akibat trauma kimia dihambat dengan pemberian ekstrak daun kitolod yang memiliki efek antiinflamasi.

### 2.11 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan landasan teori di atas, hipotesis pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora*) dapat menghambat pertumbuhan neovaskularisasi kornea pada tikus wistar model trauma kimia mata.



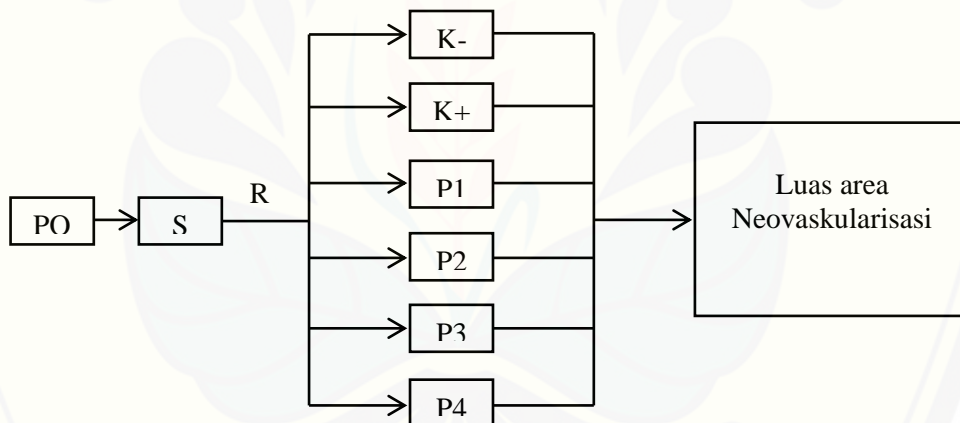
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental design*, dimana peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Sampel yang digunakan untuk eksperimen maupun kelompok kontrol diambil secara random dari populasi tertentu (Sugiyono, 2009).

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*. Dalam penelitian ini, terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara acak, dimana grup pertama diberi perlakuan dan grup yang lain tidak (Sugiyono, 2009). Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

Po :Populasi

R : Randomisasi sampel

S : Sampel

K-: Kelompok kontrol negatif model trauma kimia diberi DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes/hari

P1: Kelompok perlakuan model trauma kimia diberi ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 0,25 mg/ml 4 kali 1 tetes/hari

P2: Kelompok perlakuan model trauma kimia diberi ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 0,5 mg/ml dengan 4 kali 1 tetes/hari

P3: Kelompok perlakuan model trauma kimia diberi ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 1 mg/ml dengan 4 kali 1 tetes/hari

P4: Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia diberi ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 2 mg/ml dengan 4 kali 1 tetes/hari

K+: Kelompok kontrol positif model trauma kimia diberi *Dexamethasone* 0,1%, 4 kali 1 tetes/hari



### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Alokasi waktu penelitian selama dua bulan, yaitu bulan November-Desember 2017.

### 3.4 Populasi dan Sampel

#### 3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus *Rattus novergicus* strain wistar jantan yang diperoleh dari peternak tikus di Malang.

#### 3.4.2 Sampel

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan untuk membuat homogen sampel yang akan digunakan.

##### a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Tikus novergicus strain wistar jenis kelamin jantan.
- 2) Sehat (bergerak aktif, berbulu putih, tidak cacat).
- 3) Mata sehat.
- 4) Tikus dewasa dengan umur antara 10-12 minggu.
- 5) Berat badan 150-200 gram.

##### b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Tikus yang mati selama perlakuan.
- 2) Kornea tikus yang mengalami perforasi dalam waktu 7 hari perlakuan.
- 3) Tikus yang terluka pada bola mata oleh karena trauma lain.

Sampel dipilih menggunakan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok. Pengulangan atau besar sampel dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus *Federer* (1977) sebagai berikut.

$$(T-1)(N-1) \geq 15$$

$$(6-1)(N-1) \geq 15$$

$$5N-5 \geq 15$$

$$N \geq 4$$

Keterangan :

T : jumlah kelompok perlakuan

N : jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus *Federer* di atas, dibutuhkan sebanyak 4 tikus pada masing-masing kelompok. Pada penelitian ini menggunakan 30 tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok dengan rincian 4 tikus ditambah 1 cadangan pada masing-masing kelompok. Tikus cadangan diberi perlakuan yang sama di masing-masing kelompok dan diberi tanda. Tikus cadangan digunakan untuk menggantikan tikus yang mati atau memenuhi kriteria eksklusi.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kitolod yang diberikan dalam dosis yang telah ditentukan. Dosis yang digunakan adalah 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2mg/ml.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah luas area neovaskularisasi yang terbentuk pada kornea setelah mengalami trauma kimia.

#### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah :

- a. Tikus dewasa dengan usia antara 10-12 minggu.
- b. Jenis kelamin jantan, strain wistar.
- c. Berat badan 150-200 gram.

- d. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
- e. Lama perlakuan hewan coba.
- f. Frekuensi pemberian ekstrak daun kitolod.

### 3.6 Definisi Operasional

#### 3.6.1 Ekstrak Daun Kitolod

Daun kitolod yang didapat kemudian dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk daun kitolod dimaserasi dengan etanol 70%, kemudian dilarutkan dengan DMSO 0,1%, sehingga menjadi sediaan tetes mata dengan 4 dosis berbeda, yaitu 0,25mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml (Inakawati, 2016; Zulkarnain *et al*, 2013).

#### 3.6.2 Luas Area Neovaskularisasi

Luas area neovaskularisasi merupakan luas area kornea mata yang mengalami neovaskularisasi akibat trauma kimia diukur berdasarkan area di limbus yang terdapat pertumbuhan pembuluh darah. Kemudian luas area neovaskularisasi dihitung menggunakan rumus  $C/12 \times \pi \times [r^2 - (r-L)^2]$  dimana  $C$  merupakan bagian kornea yang terdapat neovaskularisasi dengan membagi kornea menjadi 12 bagian yang sama besar,  $r$  merupakan jari-jari kornea yang diukur sepanjang limbus kornea ke pusat kornea dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm),  $L$  merupakan panjang pembuluh darah yang terbentuk diukur dari limbus kornea dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Luas neovaskularisasi dinyatakan dalam satuan  $\text{mm}^2$ . Pengukuran dilakukan dengan menggunakan *castroviejo caliper* dan *loop* (D'Amato *et al*, 1994).

### 3.7 Bahan dan Alat

#### 3.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu sebagai berikut.

- a. Bahan untuk maserasi ekstrak adalah etanol 70% serta daun kitolod yang telah dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk.
- b. Bahan untuk pemeliharaan tikus adalah pellet standar, air minum dan sekam.

- c. Bahan untuk trauma kimia mata adalah insektisida Rotraz© 200EC dengan bahan aktif *amitraz* 200 g/l.
- d. Bahan untuk pelarut adalah DMSO 0,1%.
- e. Pantocain 0,5% dan midazolam.

### 3.7.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu sebagai berikut.

- a. Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan mencit adalah kandang dengan ukuran 50x30x50 cm, penutup kawat, botol air, tempat makanan, label, spuit 1 cc, beaker glass dan pengaduk.
- b. Jarum suntik 30-gauge, gunting, pinset, sarung tangan steril, jas laboratorium.
- c. Alat untuk trauma kimia adalah kertas filter, *cotton bud*, dan kapas.
- d. Alat untuk pengukuran luas area neovaskularisasi adalah *castroviejo caliper* dan *loop*.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus, dimana dalam pelaksanaan penelitian ini telah melalui uji kelayakan etik oleh komisi etik kedokteran. Prosedur ini diharapkan dapat menjamin keamanan bagi peneliti maupun hewan coba, melindungi hewan coba, serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti. Penelitian ini sudah dilakukan sesuai dengan etik nomor: 1218/H25.1.11/KE/2017.

### 3.8.2 Pemilihan Hewan Uji dan Pembagian Kelompok Perlakuan

Jumlah hewan uji adalah 30 ekor tikus *strain wistar (Rattus norvegicus)* yang dibagi menjadi 6 kelompok secara randomisasi, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor hewan uji dan 1 hewan uji cadangan dengan kriteria sebagai berikut.

- a. Tikus *novergicus strain wistar* jenis kelamin jantan.

- b. Sehat (bergerak aktif, berbulu putih, tidak cacat).
- c. Mata sehat.
- d. Tikus dewasa dengan umur antara 10-12 minggu.
- e. Berat badan 150-200 gram.

Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dibagi sesuai kelompok perlakuan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kelompok Kontrol (-)	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes perhari
Kelompok Kontrol (+)	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan dexamethasone, 4 kali 1 tetes perhari
Kelompok P1	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 0,25mg/ml dengan DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes perhari
Kelompok P2	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 0,5mg/ml dengan DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes perhari
Kelompok P3	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan ekstrak etanol 70% daun kitolod dosis 1mg/ml dengan DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes perhari
Kelompok P4	Kelompok perlakuan yang diberi trauma kimia kemudian diberikan ekstrak daun kitolod dosis 2mg/ml dengan DMSO 0,1%, 4 kali 1 tetes perhari

### 3.8.3 Aklimatisasi Hewan Uji

Sebelum hewan uji diberikan perlakuan, hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan, berat badan, serta makanannya. Hewan uji diberikan makanan pellet standar dan air minum.

### 3.8.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kitolod

Pembuatan ekstrak daun kitolod dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember. Sebelumnya daun kitolod dikeringkan selama kurang lebih 3 hari dan dihaluskan menjadi serbuk. Ekstrak daun kitolod dibuat dengan metode maserasi. Sebanyak 250 gram serbuk daun kitolod dimasukkan dalam botol dan diberi etanol 70% sebanyak 1.875 ml lalu direndam selama 24 jam. Setelah itu

hasil rendaman serbuk disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C (Pakpahan, 2016). Hasil filtrat yang dihasilkan sebanyak 35 mg kemudian dibuat dalam sediaan tetes mata dengan dosis 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml dan 2 mg/ml dengan pelarut DMSO 0,1%. Kemudian tetes mata daun kitolod diteteskan pada mata hewan uji sesuai perlakuan yang sudah ditetapkan.

### 3.8.5 Perhitungan Dosis dan Pembuatan Tetes Mata

Penentuan dosis ekstrak berdasarkan pada penelitian sebelumnya dimana tetes mata ekstrak etanol 70% daun kitolod dibuat dalam dosis 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml menggunakan pelarut DMSO 0,1% dalam bentuk sediaan tetes mata. Pembuatan sediaan tetes mata dilakukan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Sebelum dilakukan proses pembuatan tetes mata, seluruh alat-alat yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Semua proses pembuatan sediaan tetes mata dilakukan di dalam ruang laminar. Ekstrak dibuat dengan perhitungan yang terdapat pada Lampiran 3.3. Selanjutnya dilakukan uji pH untuk mengetahui pH larutan. Kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring 0,2 µm untuk menyaring partikel dan sterilisasi larutan sebelum dimasukkan ke dalam botol tetes mata.

### 3.8.6 Uji Pendahuluan

#### a. Uji Induksi Trauma Kimia Mata dengan Insektisida

Tujuan uji pendahuluan ini adalah untuk mengetahui pada detik seberapa defek CNV pada kornea terbentuk. Uji pendahuluan ini menggunakan 3 hewan uji untuk membandingkan hasil antara hewan uji satu dengan lainnya. Uji ini dilakukan dengan menempelkan kertas filter berdiameter 1 mm yang sudah direndam dalam pestisida Rotraz 200EC pada sentral kornea mata tikus selama 60 detik, 75 detik, 90 detik, 105 detik, dan 120 detik, diulangi sebanyak 3 kali percobaan. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pembentukan pembuluh darah pada kornea.

#### b. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% Daun Kitolod

Tujuan uji pendahuluan ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol 70% daun kitolod dapat menimbulkan efek toksik pada kornea mata tikus dengan menggunakan dosis pada penelitian genistain sebelumnya. Uji pendahuluan ini menggunakan 1 hewan uji dengan dosis awal pada uji pendahuluan dapat dipilih dari tingkatan *fixed dose*, yaitu 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml (Zulkarnain *et al*, 2013). Pada penelitian sebelumnya tidak terdapat informasi mengenai data toksisitas dari zat-zat yang mempunyai kesamaan secara kimiawi dan struktur dengan zat pada daun kitolod. Selain itu, tidak ada informasi mengenai dosis aman untuk ekstrak etanol 70% daun kitolod sebagai tetes mata pada model trauma kimia, sehingga dosis awal ditentukan sebesar 0,5 mg/ml. Interval waktu pengamatan sekurang-kurangnya 24 jam dan semua hewan harus diamati sekurang-kurangnya selama 7 hari. Bila mata tikus mengalami perforasi pada dosis 0,5 mg/ml, maka dilakukan uji pada dosis 0,25 mg/ml dan seterusnya. Bila pada dosis 0,5 mg/ml mata tikus tidak mengalami perforasi, maka uji dapat diteruskan pada dosis 2 mg/ml untuk mengetahui apakah dosis tersebut aman pada mata.

#### 3.8.7 Induksi Trauma Kimia Mata Pada Tikus

Tikus dilakukan anestesi intraperitoneal dengan Midazolam dan Pantocain 0,5% topikal. Permukaan kornea dikeringkan terlebih dahulu menggunakan *cotton bud*. Pada sentral kornea mata kanan tikus ditempel dengan kertas filter dengan diameter 1 mm yang telah direndam dalam larutan insektisida Rotraz 200EC sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Tepi kornea dan area limbus dihindari dari trauma kimia dengan menggunakan kapas. Kornea tikus kemudian dibilas dengan aquadest selama 2 menit hingga pH netral (Hepsen *et al*, 1998).

#### 3.8.8 Perlakuan dengan Ekstrak Daun Kitolod

Tikus model trauma kimia diberi perlakuan dengan ekstrak daun kitolod dosis 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; kontrol positif dengan *dexamethasone* 0,1% topikal; dan kontrol negatif dengan DMSO 0,1%. Perlakuan

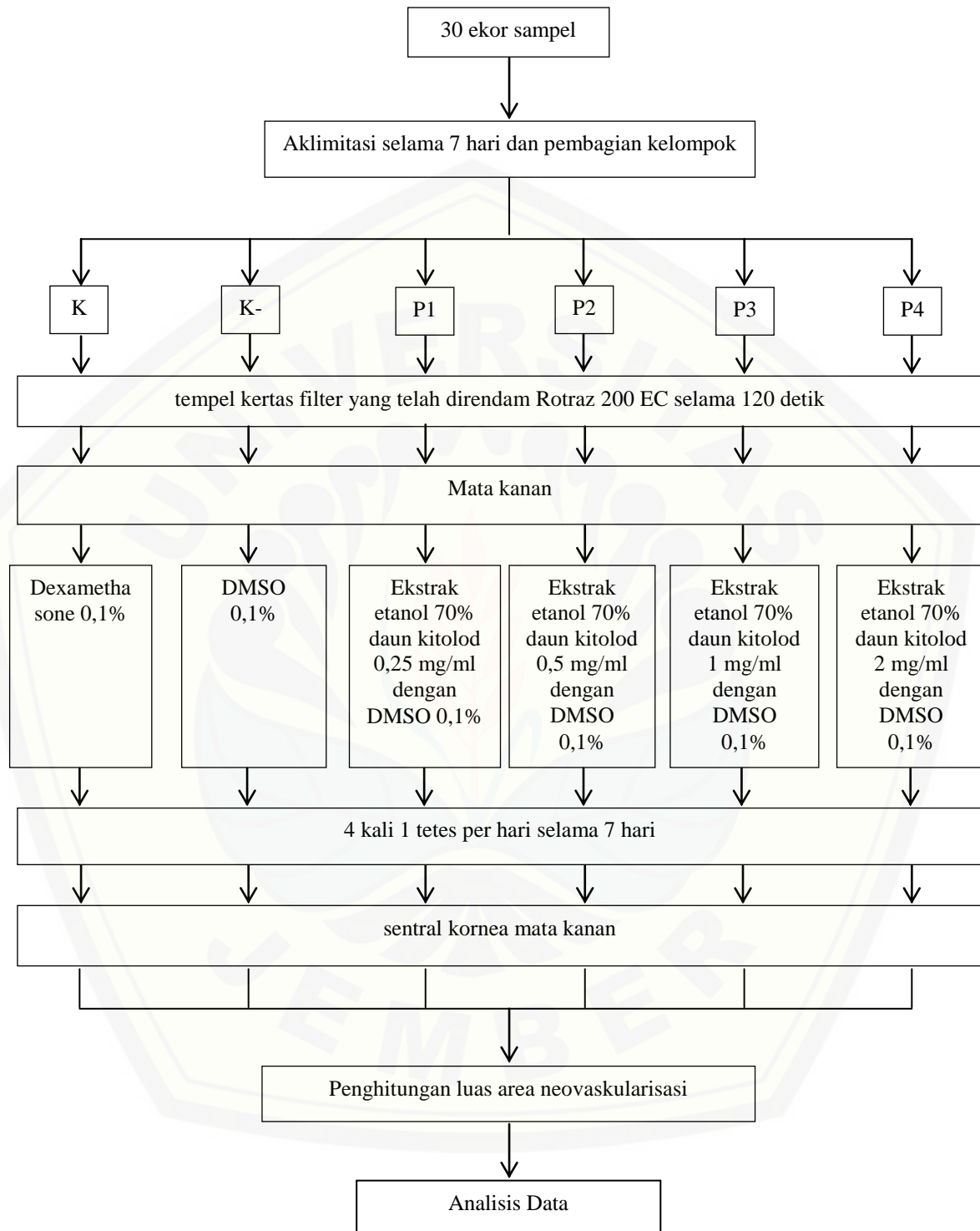
diberikan segera setelah tikus diinduksi trauma kimia yaitu 1 tetes dan diberikan kembali dalam 1 jam kemudian. Setelah itu, perlakuan dilakukan secara rutin dengan frekuensi 4 kali 1 tetes per hari selama 7 hari menggunakan botol tetes mata komersial. Rincian waktu pemberian perlakuan setiap harinya, yaitu pada pukul 08.00; 11.30; 15.00; dan 18.30 pada sentral mata kanan tikus.

### 3.8.9 Perhitungan Luas Area Neovaskularisasi

Pengukuran luas area neovaskularisasi dilakukan pada mata tikus dihari terakhir perlakuan atau hari ke 7 pascatrauma. Tikus dianestesi dengan metode yang sama saat dilakukan induksi trauma kimia. Jari-jari kornea dan panjang neovaskularisasi diukur menggunakan *Castroviejo caliper* dalam satuan milimeter dengan bantuan *loop*. Luas area neovaskularisasi dihitung menggunakan rumus  $C/12 \times \pi \times [r^2 - (r-L)^2]$  dan dinyatakan dalam satuan  $\text{mm}^2$ .



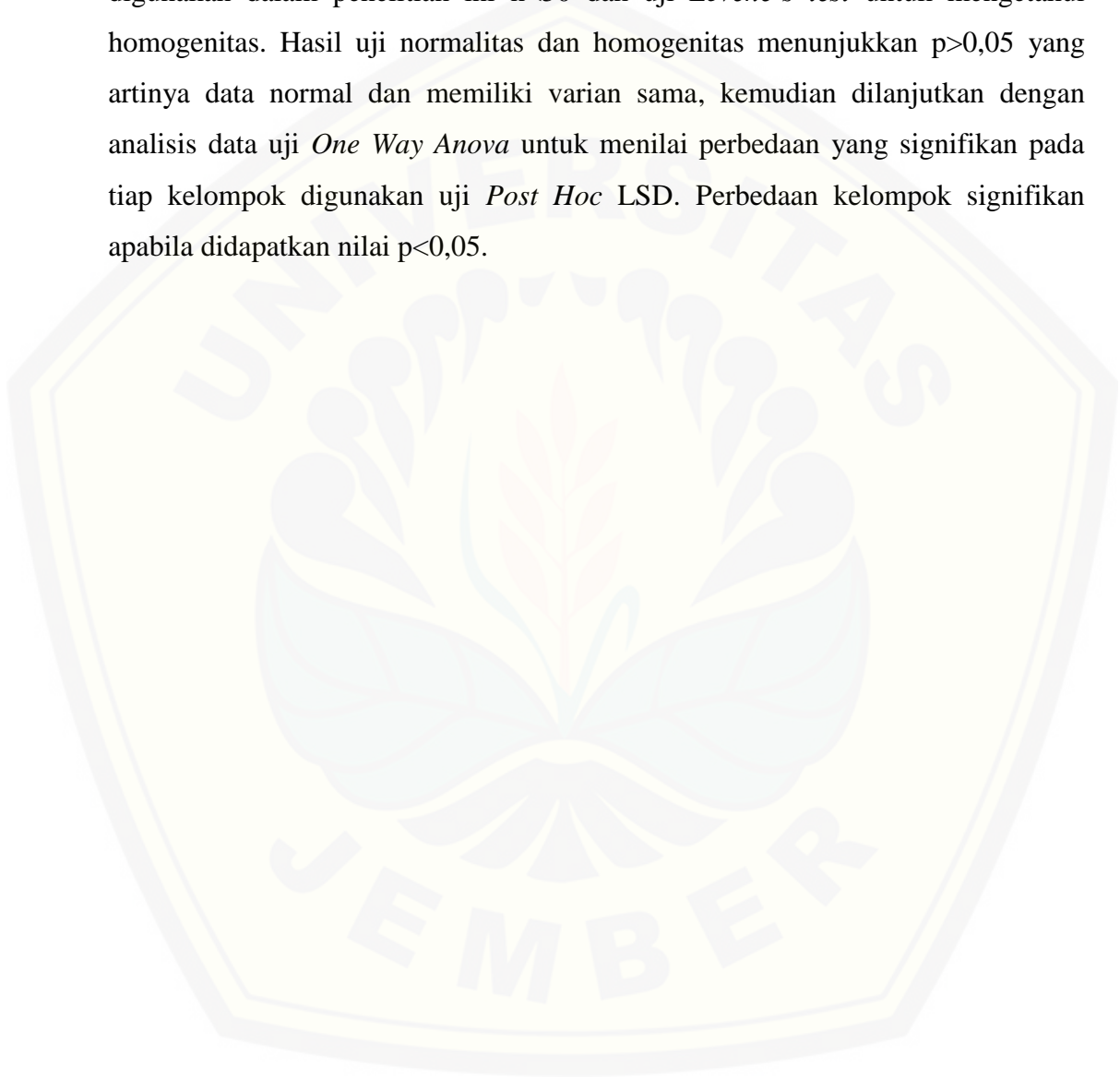
### 3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

### 3.10 Analisis Data

Seluruh data dianalisis dengan uji statistik secara komputerisasi dan dibantu menggunakan *software* berupa program statistik. Pertama, dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini  $n < 50$  dan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan  $p > 0,05$  yang artinya data normal dan memiliki varian sama, kemudian dilanjutkan dengan analisis data uji *One Way Anova* untuk menilai perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc LSD*. Perbedaan kelompok signifikan apabila didapatkan nilai  $p < 0,05$ .



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora*) memiliki efek menghambat neovaskularisasi kornea setelah pemberian selama 7 hari pada mata yang mengalami trauma kimia akibat pestisida Rotraz© 200EC.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka saran untuk penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai penghitungan kadar prostaglandin (PG), faktor-faktor angiogenik dan anti angiogenik yang berperan dalam neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia serta penggunaan alat-alat pendukung seperti slit lamp sehingga penelitian ini menjadi lebih baik.
2. Pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat menggunakan dosis yang lebih bervariasi dan menentukan dosis efektif untuk tetes mata menggunakan ekstrak daun kitolod pada trauma kimia mata.
3. Pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat dilakukan pada hewan coba lainnya, seperti kelinci, yang memiliki ukuran kornea lebih luas dibandingkan tikus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, U.F. 2008. *Manajemen Penyakit Berbasis Wilayah*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Agromedia Redaksi. 2008. *Buku pintar tanaman obat: 431 jenis tanaman pengempur aneka penyakit*. Jakarta: AgroMedia.
- Ali, I. 2005. *Menggempur Gangguan pada Mata dengan Tanaman Obat*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Amaliah, A. R. 2014. Pengaruh infus daun Kitolod (*Laurentia longiflora*) terhadap histopatologi mata Tikus Wistar katarak yang diinduksi *methyl nitroso urea*. *Skripsi*. Surabaya: Sarjana Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala.
- Amano, S., M. Kuroki, M. Tolentino, dan A. P. Adamis. 1998. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39:18–22.
- American Academy of Ophthalmology. 2011-2012. *Retina and Vitreus*. United State of America: American Academy of Ophthalmology.
- American Academy of Ophthalmology. 2012. *Clinical Aspect of Toxic and Traumatic Injuries of The Anterior Segment : External Disease and Cornea*. United State of America: American Academy of Ophthalmology.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- BenEzra, D. 1978. Neovascuogenic ability of prostaglandins, growth factors, and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol*. 86:455–461.
- Brooks, P. C., S. Silletti, T. L. von Schalscha, M. Friedlander, dan D. A. Cheresch. 1998. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*. 92:391–400.
- Cao, R., H. L. Wu, N. Veitonmaki, L. Philip, J. Farnebo, G. Y. Shi, dan Y. Cao. 1999. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1–5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6:5728–5733.
- Chang, J. H., E. E. Gabison, T. Kato, dan D. T. Azar. 2001. Corneal neovascularization. *Current Opinion in Ophthalmology* 12:242-249.

- Cursiefen, C., M. Kuchle, dan G. O. Naumann. 1998. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea*.17:611–613.
- D'Amato, R. J., M. S. Loughnan, E. Flynn, dan J. Folkman. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Medical Sciences*. 91:4082-4085.
- DelMonte, D. W., dan T. Kim. 2011. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 37:588-598.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta.
- Djing, O. G. 2006. *Terapi Mata dengan Pijat dan Ramuan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Djojosumarto, P. 2008. *Pestisida dan Aplikasinya*. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.
- Drake, B., R. Paterson, G. Tabin, F. Butler, dan T. Cushing. 2012. Treatment of eye injuries and illnesses in the wilderness. *Wilderness and environmental medicine* 23, 325–336.
- Ebstein, R. J., R. D. Stulting, R. L. Hendricks, dan D. M. Harris. 1987. Corneal neovascularization: pathogenesis and inhibition. *Cornea*. 6:250–257.
- Eroschenko, V. P. 2010. *Atlas Histologi diFiore dengan Korelasi Fungsional Ed. 11 Terjemahan Bahasa Indonesia*. Jakarta: EGC.
- Fish, R., dan R. S. Davidson. 2010. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Current Opinion in Ophthalmology* 21:317-321.
- Folkman, J., dan Y. Shing. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 267:10931–10934.
- Friedenwald, J. S., W. F. Hughes, dan H. Hermann. 1946. Acid burns of the eye. *Arch Ophthalmol*. 35:98-108.
- Grant, W. M. 1974. *Toxicology of the eye*. Dalam *Drugs, Chemicals, Plants, Venoms*. Editor C. C. Thomas. Springfield: Illions.
- Guo, Y. L., B. J. Wang, C. C. Lee, dan J. D. Wang. 1996. Prevalance of dermatoses and skin sensitization associated with use of pesticides in fruit farmers od southern Taiwan. *Occupational and Environmental Medicine* 53:427-431.

- Hariana, A. 2013. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Depok: Penerbit Swadaya.
- Hanson, A. F. 2004. Rat behavior and biology. <http://www.ratbehavior.org/Eyes.htm#anatomy>. [Diakses pada 19 Oktober 2017].
- Hayashi, N., K. Nakayasu, dan S. Okisaka. 1996. Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization *in vivo* and *in vitro*. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 100:587–591.
- Haynes, W. L., A. D. Proia, dan G. K. Klintworth. 1989. Effect of inhibitor of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 30(7):1588-1593.
- Herath, H. M. M. T. B., S. P. Pahalagamage, N. Yogendranathan, M. D. M. S. Wijayabandara, dan A. Kulatunga. 2017. Amitraz poisoning: A case report of an unusual pesticide poisoning in Sri Lanka and literature review. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 18:6
- Heynes, W. L., A. D. Proia, dan G. K. Klintworth. 1989. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 30:1588–1593.
- Hepsen, I. F., E. Hamdi, dan O. Cekic. 1998. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res* 31:426-431.
- Hidayati, N. A., L. Shanti, dan D. S. Ahmad. 2008. Kandungan kimia dan uji antiinflamasi ekstrak etanol *Lantana camara* L. pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan. *Bioteknologi* 5(1):10-17
- Ilyas, S. 2009. *Ilmu Penyakit Mata*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Inakawati, S. 2016. The effect of bevacizumab and curcumin towards the process of corneal epithelization after alkalin trauma on wistar rat's cornea. *Ophthalmol Ina*. 42(1):97-103.
- Itoh, T., M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto, dan S. Itohara. 1998. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*. 58:1048–1051.
- James, B., C. Chew, dan A. Bron. 2003. *Lecture Notes on Ophthalmology*. 9<sup>th</sup> edition. UK : Blackwell publishing Ltd.

- Kather, J. N. dan J. Kroll. 2014. Transgenic mouse models of corneal neovascularization: new perspectives for angiogenesis research. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:7637–7651.
- Kegley, S. E., B. R. Hill, S. Orme, dan A. H. Choi. 2008. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America San Francisco. <http://www.pesticideinfo.org>. [Diakses 01 Oktober 2017]
- Kishi, M., N. Hirschhom, M. Djajadisastra, L. N. Satterfee, S. Strowman, dan R. Ditts. 1995. Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers. *Scand J Work Environ Health* 21:1 24-3.
- Krol, W., Z. Czuba, S. Scheller, J. Gabrys, S. Grabiec, dan J. Shani. 1990. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem Int.* 21:593–597.
- Kuckelkorn, R., N. Schrage, G. Keller, dan C. Redbrake. 2002. Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmol Scand.* 80:4-10.
- Kusmana, D. 2006. *Mengikis kolesterol dengan teh*. Majalah Tempo. Edisi khusus Desember. 178.
- Lee, P., C. C. Wang, dan A. P. Adamis. 1998. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol.* 43:245-269.
- Lipman, R. M., R. J. Epstein, R. L. Hendricks. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 110:405-7.
- Maranata, R., I. Chahaya, dan D.N. Santi. 2014. Perilaku petani dalam penggunaan pestisida dan alat pelindung diri (APD) serta keluhan kesehatan petani di Desa Suka Julu Kecamatan Barus Jahe Kabupaten Karo tahun 2014. *Naskah Publikasi USU*.
- McCulley, J. P. 1990. Ocular hydrofluoric acid burns: animal model, mechanism of injury and therapy. *Transactions of the American Ophthalmological Society.* 88:649-684.
- Mescher, A. L. 2011. *Teks dan Atlas Histologi Dasar Junqueira Ed. 12 Terjemahan Bahasa Indonesia*. Jakarta: EGC.
- Minaka, I. A. D. A., A. A. S. Sawitri, D. N. Wirawan. Hubungan penggunaan pestisida dan alat pelindung diri dengan keluhan kesehatan pada petani hortikultura di Buleleng, Bali. *Public. Health and Preventive Medicine Archive.* 4(1).

- Mirzoeva, O. K., dan P. C. Calder. 1996. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 55:441–449.
- MKDGGroup. 2011. Rotraz 200 EC. <http://mkdgroup.com/mkd/insektisida.produk-rotraz-200-ec-99.html>. [Diakses pada tanggal 15 Desember 2017].
- Oh, J. Y., M. K. Kim, M. S. Shin, H. J. Lee, J. H. Lee, dan W. R. Wee. 2009. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Current Eye Research*. 34:85-91.
- Pakpahan, J. F. 2016. Uji Aktivitas Analgetik Ekstrak Etanol 70% Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Nyeri dengan Asam Asetat. *KTI*. Bandung: Poltekkes Kemenkes Bandung.
- Palao, R., I. Monge, M. Ruiz, dan J. P. Barret. 2009. Chemical Burns: Pathophysiology and Treatment Burn. *Burns* 36(3):295-304.
- Pasaribu, S. 2009. Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Daun Tumbuhan Bandotan. *Jurnal Kimia Mulawarman*.
- Perez, I. C. J., C. M. Gooch, J. R. Cabili, M. J. P. Rico, M. S. Ebasan, M. J. G. Zaragoza, A. F. S. Redondo, R. R. Orbita, dan M. L. D. G. Lacuna. 2015. Advances in environmental sciences. *International Journal of the Bioflux Society*. 7(1):90–108.
- Philipp, W., L. Speicher, dan C. Humpel. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41:2514–2522.
- Rakhmasari, A. Y., S. Inakawati, S. Sundari, Winarto, dan E. Sasmito. 2015. Comparison of topical and subconjunctival curcumin injection on corneal neovascularization on alkali injuries of wistar's cornea. *Ophthalmol Ina* 41:1.
- Randleman, J. B. 2010. Chemical eye burn overview. <http://www.emedicine.com>. [Diakses tanggal 28 Agustus 2017].
- Reynertson, K. A. 2007. Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents From Edible Myrtaceae Fruit. *Dissertation*. New York: The City University of New York.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke 6. Dalam The Organic Constituents of Higher Plants. 6th Ed (1991). Koasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.



- Rochels, R. 1984. Animal experiment studies on the role of inflammation mediators in corneal neovascularization. *Doc Ophthalmol.* 57:215–262.
- Sabir, A. 2003. *Pemanfaatan Flovanoid di Bidang Kedokteran Gigi*. Dalam Majalah Kedokteran Gigi. Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III. Surabaya: FKG Unair.
- Schrage, N., F. Burgher, J. Blomet, L. Bodson, M. Gerard, A. Hall, P. Josset, L. Mathieu, dan H. Merle. 2011. *Chemical Ocular Burns: New Understanding and Treatment*. London: Springer.
- Shakiba, Y., K. Mansouri, D. Arshadi, dan N. Rezaeni. 2009. Corneal Neovascularization: Molecular Event and Therapeutic Option. *Inflammation & Allergy Drug Discovery* 3(3):221.
- Sherwood, L. 2014. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem Ed. 8 Terjemahan Bahasa Indonesia*. Jakarta: EGC.
- Shin, S. H., J.C. Kim, S. I. Chang, H. Lee, dan S. I. Chung. 2000. Recombinant kringle 1–3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea.* 19:212–217.
- Smith, E. L., R. L. Hill, I. R. Lehman, R. J. Lefkowitz, P. Handler, dan A. White. 1983. *Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry*. Tokyo: McGraw-Hill.
- Suckow, M., S. Weisbroth, dan C. Franklin. 2006. *The Laboratory Rat Ed. 2<sup>th</sup>*. United Kingdom: Elsevier.
- Sud'ina, G. F., O. K. Mirzoeva, M. A. Pushkareva, G. A. Korshunova, N. V. Sumbatyan, dan S. D. Varfolomeev. 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 23:21– 24.
- Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung : Alfabeta.
- Tsai, J. C., Denniston, A. K. Murray, dan Philip I. 2011. *Oxford American Handbook of Ophthalmology*. USA: Oxford University Press Inc.
- Universitas Jember. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Woessner, J. 1998. *The matrix metalloproteinase family*. Dalam Matrix Metalloproteinases. W. Park dan R. P. Mecham. San Diego: CA Academic Press. 261–290.

- Yanti, A. R. 2016. Uji sitotoksik ekstrak etanol 50% daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presi.) terhadap sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) secara *in-vitro*. *Farmasains*. 3(1).
- Yaylali, V., T. Ohta, S.C. Kaufman, D. Y. Maitchouk, dan R. W. Beuerman. 1998. *In vivo* confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea*. 17:646–653.
- Ye, H. Q., M. Maeda, F. S. Yu, dan D. T. Azar. 2000. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41:2894–2899.
- Zulkarnain, Z. A., A. Sylvestris, dan R. Ruby. 2013. Efek Genistein Topikal Terhadap Ekspresi IL-8 pada Kornea Tikus (*Rattus Novergicus Strain Wistar*) Model Inflamasi (Trauma Kimia Basa). 9(2).

## LAMPIRAN

## Lampiran 3.1 Ethical Clearence



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
KOMISI ETIK PENELITIAN  
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net

---

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*  
Nomor : 4218 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**EFEK EKSTRAK DAUN KITOLOD (*Isotoma longifora*) TERHADAP NEOVASKULARISASI KORNEA TIKUS WISTAR MODEL TRAUMA KIMIA.**

Nama Peneliti Utama : Hasbi Maulana Arsyad.  
*Name of the principal investigator*

NIM : 142010101033

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 29 November 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

- Pemilihan, perawatan, perlakuan dan pemunahan hewan coba mengacu pada pedoman etik penelitian kesehatan I prinsip 3R )
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak daun kutulis agar didapatkan kadar yang sesuai.
- Hewan coba harus bebas nyeri selama perlakuan.
- Mohon diperhatikan perubahan limbah penelitian agar tidak menimbulkan lingkungan.

Mengetahui  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
  
Rizanti, Sp.PK



## Lampiran 3.2 Hasil Determinasi Tanaman

	<b>KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI</b> <b>UNIVERSITAS JEMBER</b> <b>FAKULTAS PERTANIAN</b> Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Bumi Tegalboto, Telp (0331) 334054, 339596 Jember 68121 Fax.: (0331) 338422, e-mail: <a href="mailto:admin.faperta@unej.ac.id">admin.faperta@unej.ac.id</a>													
Nomor	: 6694/UN25.1.3/PS.8/2017	28 Desember 2017												
Lampiran	: 2 (lembar) lembar													
Hal	: Hasil Identifikasi Tanaman													
Yth.	: Wakil DEKAN I Fakultas Kedokteran Universitas Jember													
<p>Menindaklanjuti surat saudara Nomor: 1796, 1829, dan 2444/UN25.1.11/LT/2017, tentang Permohonan Ijin Penelitian untuk identifikasi tanaman, maka bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi morfologis 3 (tiga) set contoh tanaman yang terdiri dari organ akar, batang, daun, bunga dan/atau buah dan/atau biji (terlampir) dalam rangka penyusunan skripsi, atas nama 3 (tiga) orang :</p>														
<table border="1"><thead><tr><th>No.</th><th>NAMA MAHASISWA</th><th>N.I.M.</th></tr></thead><tbody><tr><td>1.</td><td>Moh. Lutfi Hasbullah</td><td>142010101099</td></tr><tr><td>2.</td><td>Hasbi Maulana Arsyad</td><td>142010101033</td></tr><tr><td>3.</td><td>Ferdian Nugroho</td><td>142010101001</td></tr></tbody></table>	No.	NAMA MAHASISWA	N.I.M.	1.	Moh. Lutfi Hasbullah	142010101099	2.	Hasbi Maulana Arsyad	142010101033	3.	Ferdian Nugroho	142010101001		
No.	NAMA MAHASISWA	N.I.M.												
1.	Moh. Lutfi Hasbullah	142010101099												
2.	Hasbi Maulana Arsyad	142010101033												
3.	Ferdian Nugroho	142010101001												
Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.														
														
	Ir. Haden Soedradjad, M.T. NIP. 195707181984031001													
Tembusan:														
1. Mahasiswa yang bersangkutan														

## HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

<b>1. MORFOLOGI DAUN</b>	
a. Bangun Daun	Lanset ( <i>lanceolatus</i> ) dengan panjang 9 cm
b. Tepi Daun	Bergigi ( <i>dentatus</i> ) dan melekuk ke dalam
c. Pangkal Daun	Meruncing ( <i>acuminatus</i> )
d. Ujung Daun	Runcing ( <i>acutus</i> )
e. Tulang Daun	Menyirip ( <i>Penninervis</i> )
f. Warna Ibu Tulang Daun	Hijau terang
g. Permukaan Atas	Mengkilat sedikit berambut
h. Permukaan Bawah	Kasar berbulu halus ( <i>Villosus</i> )
i. Warna Daun	Hijau Tua
j. Duduk Daun	Berhadapan
k. Jenis Daun	Tunggal ( <i>Folium Simplex</i> )
<b>2. MORFOLOGI BATANG</b>	
a. Bentuk Batang	Silindris
b. Permukaan Batang	Berambut
c. Arah Tumbuh	Ke atas agak menyerong
d. Warna	Hijau sedikit keunguan
<b>3. MORFOLOGI AKAR</b>	
Sistem perakaran	Tunggang
<b>4. MORFOLOGI BUNGA</b>	
a. Jenis Bunga	Tunggal
b. Tangkai Bunga	Pendek
c. Bentuk Mahkota	Lancet ( <i>lanceolatus</i> )
d. Warna bunga	Putih
e. Warna kepala putik	Hijau muda
<b>5. MORFOLOGI BUAH</b>	Terletak di dasar bunga beruang dua dan berbiji banyak
<b>6. MORFOLOGI BIJI</b>	Berukuran kecil berwarna putih
<b>7. MODIFIKASI ORGAN</b>	
a. Jenis Modifikasi	Tidak ada
b. Lain-Lain	Tidak ada

Pemohon Identifikasi : Hasbi Maulana Arsyad (NIM. 142010101033), FK UNEJ

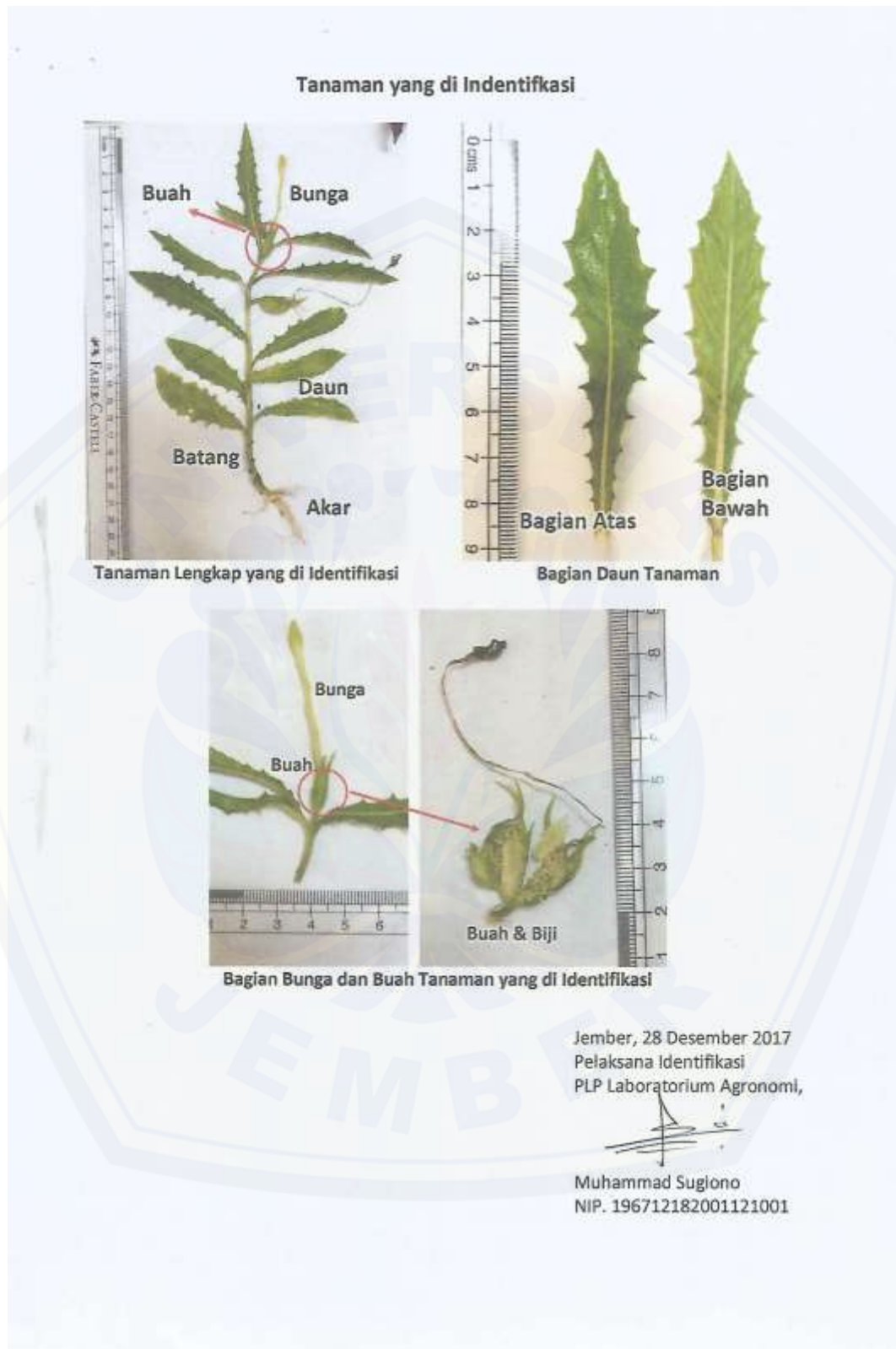
**Kesimpulan:**

Berdasar ciri morfologis organ tanaman (akar, batang, daun, bunga, buah dan biji) dapat disimpulkan bahwa tumbuhan yang diidentifikasi adalah tumbuhan Daun Tolod/Kitolod (Sunda) atau Sangkobak (*Isotoma longiflora* Presl.).

Jember, 28 Desember 2017  
Pelaksana Identifikasi  
PLP Laboratorium Agronomi,



Muhammad Sugiono  
NIP. 196712182001121001



**Lampiran 3.3 Perhitungan Dosis Hewan Coba**

## 1. Pemberian dosis midazolam

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus} &= 5 \text{ mg/KgBB} \\ \text{Konversi dosis tikus BB 150} &= 5 \text{ mg}/150 \text{ g} \times 1000 \\ &= 0,75 \text{ mg} \end{aligned}$$

## 2. Pembuatan tetes mata

$$1 \text{ kelompok membutuhkan} = 5 \text{ tikus} \times 4 \text{ tetes} \times 7 \text{ hari} = 112 \text{ tetes}$$

$$1 \text{ tetes (0,05 ml)} = 112 \times 0,05 \text{ ml} = 5,6 \text{ ml}$$

$$1 \text{ botol tetes mata komersial} = 10 \text{ ml} + 10 \text{ ml (cadangan)}$$

## a. Dosis 2 mg/ml

$$\begin{aligned} 200 \text{ mg}/100\text{ml} \rightarrow \text{DMSO } 0,1\% &= 100 \text{ ml} \times 0,1\% \\ &= 0,1 \text{ ml} = 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

$$200 \text{ mg ekstrak daun kitolod} + 100 \mu\text{l DMSO} + \text{aquadest sampai } 100 \text{ ml}$$

$$100 \text{ ml [2mg/ml]} \rightarrow \text{disimpan } 20 \text{ ml}$$

## b. Dosis 1 mg/ml

$$50 \text{ ml [2 mg/ml]} + 50 \text{ ml aquadest} = 100 \text{ ml [1 mg/ml]} \rightarrow \text{disimpan } 20 \text{ ml}$$

## c. Dosis 0,5 mg/ml

$$50 \text{ ml [1 mg/ml]} + 50 \text{ ml aquadest} = 100 \text{ ml [0,5 mg/ml]} \rightarrow \text{disimpan } 20 \text{ ml}$$

## d. Dosis 0,25 mg/ml

$$50 \text{ ml [0,5 mg/ml]} + 50 \text{ ml aquadest} = 100 \text{ ml [0,25 mg/ml]} \rightarrow \text{disimpan } 20 \text{ ml}$$

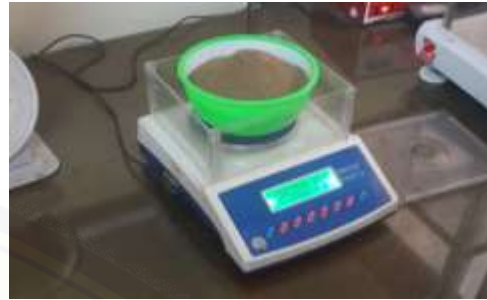
## e. DMSO 0,1%

$$100 \mu\text{l DMSO} + \text{aquadest hingga } 100 \text{ ml} \rightarrow \text{disimpan } 20 \text{ ml}$$



**Lampiran 3.4 Dokumentasi Penelitian**

C.1 Pengeringan daun kitolod



C.2 Penimbangan serbuk daun kitolod



C.3 Proses Maserasi



C.4 Penyaringan



C.5 Proses evaporasi



C.6 Hasil Ekstraksi



C.7 Pembuatan Tetes Mata



C.8 Sediaan tetes mata



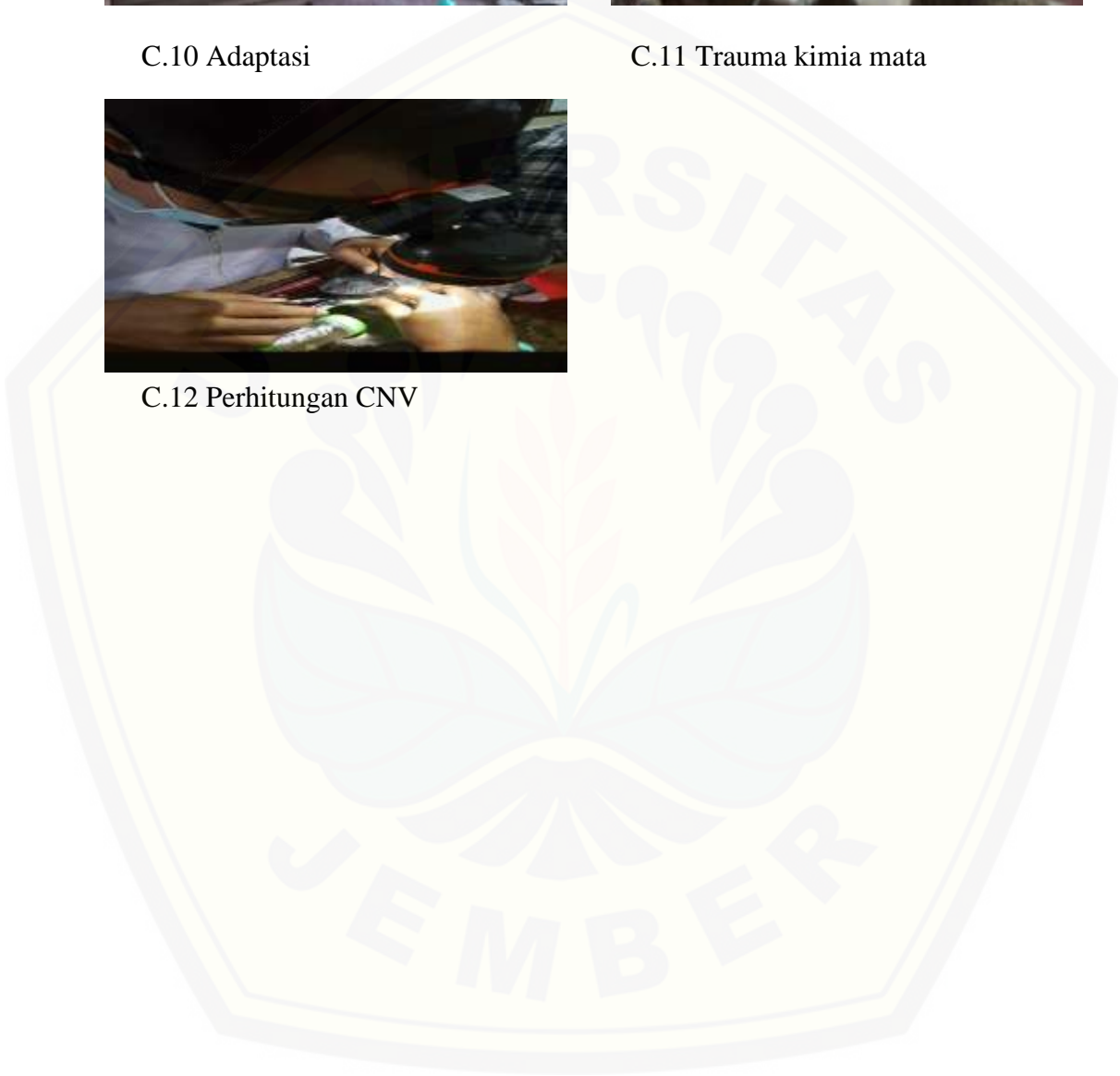
C.10 Adaptasi



C.11 Trauma kimia mata



C.12 Perhitungan CNV



**Lampiran 3.5 Data Penelitian**

No	Kelompok	r(mm)	Hari ke 7												Luas CNV
			L (mm)												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Positif	2,7	1,8	1,5	2,2	2,8	1,8	1,5	1,6	1,3	2,4	1,5	1,3	0,5	18,64
2	Positif	2,8	2,0	2,1	2,7	2	1,6	1,4	1,5	1,6	1,2	1,2	0,6	0,6	18,57
3	Positif	2,8	2,1	2,3	1,8	1,4	1,8	1,5	0,5	1,2	0,5	1,3	0,5	0,7	16,39
4	Positif	2,7	1,9	1,8	1,7	1,9	1,4	1,2	0,5	1,9	1,5	1,2	0,8	0,9	16,86
5	Negatif	2,8	2,7	2,3	2,1	2,2	1,8	0,5	2	1,2	1,7	1,7	1,2	1	19,16
6	Negatif	2,9	2,9	2,4	2,4	2,1	2	1,4	1,7	1,9	1,6	1,1	0,7	0,9	20,52
7	Negatif	2,8	2,8	2,7	2,6	2,4	2,4	2,1	2	2,3	2,1	2	1,9	0	20,94
8	Negatif	2,9	2,7	2,5	2,6	2,4	2,3	2	2,4	2	2,1	1,7	1,9	0	22,03
9	P1(0,25)	2,8	1,9	2	1,5	2	1,9	2	1,2	1,5	1,1	0,6	1,2	0,5	17,62
10	P1(0,25)	3,0	2,4	2	2,5	2,1	1,8	2,6	1,1	1,1	1,3	1,6	1,5	1,5	22,32
11	P1(0,25)	3,0	2,3	2,4	2,6	2	1,9	1,8	1,5	2	1,1	1,4	1,1	0	21,29
12	P1(0,25)	2,8	1,3	2	2,1	2,3	1,6	1,5	2,1	1,6	2,5	1,8	2	2,1	21,16
13	P2(0,5)	2,9	2,0	2,1	2,3	1,4	1,6	1,4	2,1	1,9	2	2,3	1,8	1,6	22,24
14	P2(0,5)	2,9	1,9	2,3	2	1,9	2,5	1,7	0,5	1,6	1,3	2	0,5	1,1	19,98
15	P2(0,5)	2,9	1,7	1,3	1,5	2	2,4	2,1	1,4	2	1,9	1,9	0,6	0,7	19,94
16	P2(0,5)	2,7	2,4	2,2	2,1	1,8	2	1,7	1,5	1,9	2,1	2	2,1	1	20,49
17	P3(1)	2,9	2,2	2,3	2,1	1,7	2,2	2,4	2	1	0	0	0	0	15,08
18	P3(1)	3,0	2,4	3	2,6	2,1	2,4	2	1,5	1	1	0,7	0	0	18,30
19	P3(1)	2,9	2,5	3	2,8	2,9	2,7	3	2,7	0	0	0	0	0	14,83
20	P3(1)	2,8	1,8	2,1	2,7	2,4	2,2	2,1	2,3	2,2	1,4	1	0	0	17,81
21	P4(2)	2,8	2,2	2,7	3	2,8	2	2,5	2,4	1,3	1,4	0,5	0,6	0	17,91
22	P4(2)	2,8	1,6	2,2	2,4	2,1	2,5	2,2	2,5	1,1	1	0,7	0	0	17,00
23	P4(2)	2,9	2,3	2,3	2,2	2,6	2,3	2,1	2	0	0	0	0	0	14,60
24	P4(2)	2,8	1,7	2	2,6	2,7	2,4	2,3	2,1	1,3	1,5	0	0	0	16,21

### Lampiran 3.6 Analisis Data

#### a. Rata-rata dan Standar Deviasi

Descriptives					
	Kelompok		Statistic	Std. Error	
Luas_CNV	Kontrol +	Mean	17,6150	,57975	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 15,7700	Upper Bound 19,4600	
		5% Trimmed Mean	17,6261		
		Median	17,7150		
		Variance	1,344		
		Std. Deviation	1,15950		
		Minimum	16,39		
		Maximum	18,64		
		Range	2,25		
		Interquartile Range	2,12		
	Skewness	-,137	1,014		
	Kurtosis	-5,178	2,619		
	Kontrol -	Mean	20,6625	,59336	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 18,7742	Upper Bound 22,5508	
		5% Trimmed Mean	20,6700		
		Median	20,7300		
		Variance	1,408		
		Std. Deviation	1,18671		
		Minimum	19,16		
		Maximum	22,03		
Range		2,87			
Interquartile Range		2,26			
Skewness	-,326	1,014			
Kurtosis	,954	2,619			
P1	Mean	20,5975	1,02585		
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 17,3328	Upper Bound 23,8622		
	5% Trimmed Mean	20,6672			
	Median	21,2250			

	Variance		4,209	
	Std. Deviation		2,05170	
	Minimum		17,62	
	Maximum		22,32	
	Range		4,70	
	Interquartile Range		3,56	
	Skewness		-1,604	1,014
	Kurtosis		3,003	2,619
P2	Mean		20,6625	,54053
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	18,9423	
		Upper Bound	22,3827	
	5% Trimmed Mean		20,6150	
	Median		20,2350	
	Variance		1,169	
	Std. Deviation		1,08106	
	Minimum		19,94	
	Maximum		22,24	
	Range		2,30	
	Interquartile Range		1,85	
	Skewness		1,702	1,014
	Kurtosis		2,810	2,619
P3	Mean		16,5050	,90191
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13,6347	
		Upper Bound	19,3753	
	5% Trimmed Mean		16,4983	
	Median		16,4450	
	Variance		3,254	
	Std. Deviation		1,80382	
	Minimum		14,83	
	Maximum		18,30	
	Range		3,47	
	Interquartile Range		3,29	
	Skewness		,047	1,014
	Kurtosis		-5,542	2,619
P4	Mean		16,4300	,70194

95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	14,1961	
	Upper Bound	18,6639	
5% Trimmed Mean		16,4494	
Median		16,6050	
Variance		1,971	
Std. Deviation		1,40388	
Minimum		14,60	
Maximum		17,91	
Range		3,31	
Interquartile Range		2,68	
Skewness		-,653	1,014
Kurtosis		,334	2,619

b. Uji Normalitas dan Homogenitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Luas_CNV	Kontrol +	,295	4	.	,831	4	,170
	Kontrol -	,202	4	.	,987	4	,943
	P1	,358	4	.	,837	4	,188
	P2	,313	4	.	,791	4	,087
	P3	,285	4	.	,826	4	,157
	P4	,188	4	.	,979	4	,898

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Luas\_CNV

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,948	5	18	,475

c. Uji *One Way Anova*

## ANOVA

Luas\_CNV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	89,756	5	17,951	8,065	,000
Within Groups	40,067	18	2,226		
Total	129,823	23			

d. Uji *Post Hoc* LSD

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas\_CNV

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol +	Kontrol -	-3,04750*	1,05497	,010	-5,2639	-,8311
	P1	-2,98250*	1,05497	,011	-5,1989	-,7661
	P2	-3,04750*	1,05497	,010	-5,2639	-,8311
	P3	1,11000	1,05497	,307	-1,1064	3,3264
	P4	1,18500	1,05497	,276	-1,0314	3,4014
Kontrol -	Kontrol +	3,04750*	1,05497	,010	,8311	5,2639
	P1	,06500	1,05497	,952	-2,1514	2,2814
	P2	,00000	1,05497	1,000	-2,2164	2,2164
	P3	4,15750*	1,05497	,001	1,9411	6,3739
	P4	4,23250*	1,05497	,001	2,0161	6,4489
P1	Kontrol +	2,98250*	1,05497	,011	,7661	5,1989
	Kontrol -	-,06500	1,05497	,952	-2,2814	2,1514
	P2	-,06500	1,05497	,952	-2,2814	2,1514
	P3	4,09250*	1,05497	,001	1,8761	6,3089

	P4	4,16750*	1,05497	,001	1,9511	6,3839
P2	Kontrol +	3,04750*	1,05497	,010	,8311	5,2639
	Kontrol -	,00000	1,05497	1,000	-2,2164	2,2164
	P1	,06500	1,05497	,952	-2,1514	2,2814
	P3	4,15750*	1,05497	,001	1,9411	6,3739
	P4	4,23250*	1,05497	,001	2,0161	6,4489
P3	Kontrol +	-1,11000	1,05497	,307	-3,3264	1,1064
	Kontrol -	-4,15750*	1,05497	,001	-6,3739	-1,9411
	P1	-4,09250*	1,05497	,001	-6,3089	-1,8761
	P2	-4,15750*	1,05497	,001	-6,3739	-1,9411
	P4	,07500	1,05497	,944	-2,1414	2,2914
P4	Kontrol +	-1,18500	1,05497	,276	-3,4014	1,0314
	Kontrol -	-4,23250*	1,05497	,001	-6,4489	-2,0161
	P1	-4,16750*	1,05497	,001	-6,3839	-1,9511
	P2	-4,23250*	1,05497	,001	-6,4489	-2,0161
	P3	-,07500	1,05497	,944	-2,2914	2,1414