



**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* (Lour.)) TERHADAP KEPADATAN
KOLAGEN PADA LUKA TIKUS DIABETES**

SKRIPSI

Oleh
Gusfita Trisna Ayu Putri
NIM 152010101038

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* (Lour.)) TERHADAP KEPADATAN
KOLAGEN PADA LUKA TIKUS DIABETES**

SKRIPSI

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

Oleh
Gusfita Trisna Ayu Putri
NIM 152010101038

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala nikmat, karunia, dan kesempatan yang membuat saya tidak berhenti bersyukur;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan dan tauladan bagi saya;
3. Orang tua saya tercinta, Bunda Wiwin dan Ayah Sutrisno yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan do'a tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
4. Para guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan manusia yang berilmu dan bertakwa;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

Apabila apa yang didepan membuatmu takut dan apa yang dibelakang membuatmu luka, lihatlah keatas. Allah tidak pernah gagal menolongmu.*)



*) Aisyah, D. 2018. *Awe-Inspiring Me*. Jakarta: Serambi.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

nama : Gusfita Trisna Ayu Putri

NIM : 152010101

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa (Lour.)*) Terhadap Kepadatan Kolagen Pada Luka Tikus Diabetes” 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, 27 Desember 2018

Yang menyatakan,



Gusfita Trisna Ayu Putri

NIM 152010101038

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* (Lour.)) TERHADAP KEPADATAN
KOLAGEN PADA LUKA TIKUS DIABETES**

Oleh
Gusfita Trisna Ayu Putri
NIM 152010101038

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Erfan Efendi, Sp.An

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektivitas Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa (Lour.)*) Terhadap Kepadatan Kolagen Pada Luka Tikus Diabetes”

karya Gusfita Trisna Ayu Putri telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 27 Desember 2018;

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,



dr. Nindya Shinta R, M.Ked.,Sp.T.H.T-KL
NIP. 197808312005012001

Anggota I,



dr. Heni Fatmawati, M.Kes., Sp. Rad
NIP. 19760212200512001

Anggota II,



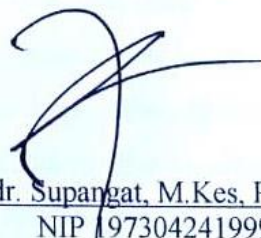
dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP. 198409162008012003

Anggota III,



dr. Erfan Efendi, Sp.An
NIP. 196803281999031001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,



dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP. 197304241999031002

RINGKASAN

Efektivitas Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) Terhadap Kepadatan Kolagen pada Luka Tikus Diabetes; Gusfita Trisna Ayu Putri, 152010101038; 2018; 85 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Komplikasi diabetes mellitus yang paling sering yaitu luka diabetik, 25% pasien diabetes mengalami luka diabetik dan 85% diantaranya mengalami amputasi. Sulitnya penanganan luka, tingginya risiko reamputasi dan beban ekonomi yang menyertai permasalahan luka diabetik memunculkan sebuah urgensi inovasi terapi farmakologis yang mudah dan murah dalam penggunaannya. Bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) merupakan tanaman obat yang memiliki kandungan flavonoid yang paling tinggi diantara 6 tanaman obat lain yang diteliti di Taman Nasional Meru Betiri. Senyawa-senyawa lain yang ditemukan dalam umbi bidara upas yaitu resin-glikosida, alkaloid dan tannin. Senyawa-senyawa ini berpotensi dalam mempercepat penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi air ekstrak umbi bidara upas terhadap progresivitas penyembuhan luka berdasarkan gambaran histopatologi kepadatan kolagen kulit.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental semu dengan *post test only randomized control group*. Sampel yang digunakan yaitu 24 ekor *Rattus norvegicus* galur wistar jantan yang telah diinduksi diabetes dan diberi luka insisi 2x2 cm dengan metode Morton. Sampel dibagi 5 kelompok yaitu kontrol negatif (C-) dengan aquades, kontrol positif (C+) dengan gentamicin topikal, kelompok perlakuan 1 (T1) dengan dosis pemberian fraksi air ekstrak umbi bidara upas sebesar 12,5 mg, kelompok perlakuan 2 (T2) dengan dosis 25 mg, kelompok perlakuan 3 (T3) dengan dosis 50 mg dan kelompok perlakuan 4 (T4) dengan dosis 100 mg. Pengamatan hari ke-10 penyembuhan luka (fase proliferasi) dilakukan secara histopatologis dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang untuk melihat kepadatan kolagen luka lalu gambar diolah dengan *software* ImageJ. Analisis homogenitas dan normalitas data menggunakan

lavene's test dan uji *Saphiro Wilk*. Analisis data selanjutnya uji perbedaan dengan menggunakan uji *One Way Anova* dan uji *Post Hoc LSD*.

Proses ekstraksi 1 kg simplisia umbi bidara upas menghasilkan 148 g ekstrak kental, dari 120 g ekstrak tersebut dihasilkan 74 gram fraksi air ekstrak umbi bidara upas. Kadar gula darah acak (GDA) hewan coba mengalami peningkatan setelah hari ke-6 induksi STZ dan kadar gula darah berhasil dipertahankan dalam keadaan hiperglikemi sampai akhir penelitian. Hasil penelitian didapatkan rata-rata persentase kepadatan kolagen masing-masing kelompok yaitu untuk kelompok C- sebesar 15,26%, kelompok C+ sebesar 37,89%, kelompok T1 sebesar 44,58%, kelompok T2 sebesar 41,44%, kelompok T3 sebesar 56,60% dan kelompok T4 sebesar 61,83%. Kelompok T4 memiliki kepadatan kolagen yang paling rapat, disusul oleh kelompok perlakuan T3, T1, T2 dan C+. Kelompok C- memiliki kepadatan kolagen yang paling rendah.

Hasil analisis data secara statistik menunjukkan bahwa data keenam kelompok terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama atau homogen ($p > 0,05$). Hasil uji *One Way Anova* didapatkan $p < 0,001$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase kepadatan kolagen yang bermakna pada tiap kelompok. Hasil analisis *Post Hoc LSD* menunjukkan semua kelompok menunjukkan perbedaan kepadatan kolagen yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif (C-) yaitu $p < 0,001$. Kelompok C+ memiliki perbedaan kepadatan kolagen yang signifikan dengan kelompok T3 dan T4 ($p < 0,01$) namun kelompok C+ tidak memiliki perbedaan kepadatan kolagen terhadap kelompok T1 dan T2. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) secara topikal efektif dalam mempercepat penyembuhan luka diabetik berdasarkan gambaran histopatologi kepadatan kolagen kulit.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan yang skripsi berjudul “Efektivitas Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) Terhadap Kepadatan Kolagen Pada Luka Tikus Diabetes”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Erfan Effendi, Sp. An selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Nindya Shinta Rumastika, M.Ked., Sp.T.H.T-KL selaku Dosen Penguji I dan dr. Heni Fatmawati, M.Kes., Sp. Rad selaku Dosen Penguji II atas segala saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D dan Bu Evi Umayah U., S.Si., M.Si., Apt atas bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung;
5. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuannya selama menjadi mahasiswa;
6. Orangtua tercinta, Bunda Wiwin dan Ayah Sutrisno yang tidak pernah lelah memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang, serta pengorbanan selama ini;
7. Kakak Shinta Setya Ningrum dan Adik Rizky Setya Febrianto tersayang yang selalu memberikan semangat dan kasih sayang selama ini;

8. Rekan kerja seperjuangan dalam penelitian Haqiqotul Fikriyah, Mega Citra Prameswari dan Annisa Dewi, terimakasih atas kerja sama dan bantuan yang diberikan selama penelitian;
9. Sahabat-sahabat tercinta Khanif Muflikhatun, Toyyibatul Hidayati, Haqiqotul Fikriyah, Deuxy Ilma Wahyuliswari, Mutiara Aprilina Muttaqien, Ian Putra Romanda, Cagar Irwin Taufan Pamungkas, Nadia Jean Romadhon, Adinningtyas Intansari dan keluarga besar Coccyx 2015 lain yang selalu memberikan semangat, dukungan, dan bantuan selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
10. Sahabat-sahabat Banyuwangi tersayang Muthia Khonsa Putri Sukmawati, Rezi Berliana Yashinta, Dwi Indrawati, Herlin Karismaningtyas, Fajariana Fitriani, Fiqri Yusril Rizal, Ivan Aditama dan Vhalin Tara Girinda atas semangat dan dukungan yang diberikan selama menempuh pendidikan sejak SMP sampai sekarang;
11. 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, 24 Desember 2018

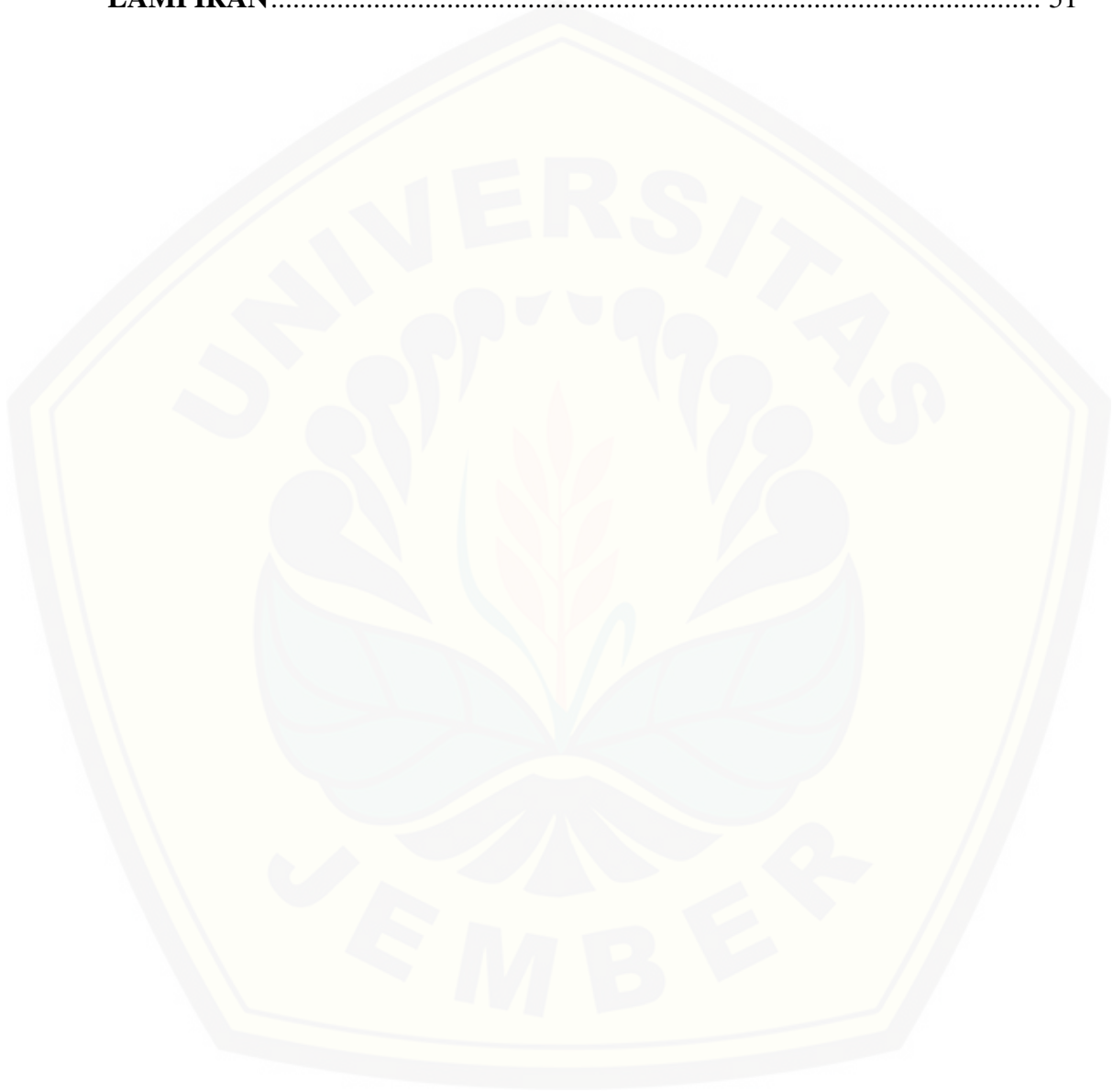
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Teoritis	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.))	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Efek Farmakologi Umbi Bidara Upas.....	5
2.2 Luka Diabetik	7
2.2.1 Diabetes Mellitus	7
2.2.2 Patofisiologi Luka diabetik	9
2.2.3 Penanganan Luka Diabetik	12
2.2.4 Model Hewan Coba Diabetes.....	12
2.3 Penyembuhan Luka	13
2.3.1 Faktor – Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka.....	13
2.3.2 Fase Penyembuhan Luka.....	14
2.4 Kolagen	17
2.5 Kerangka Konsep Penelitian	20
2.6 Hipotesis	21

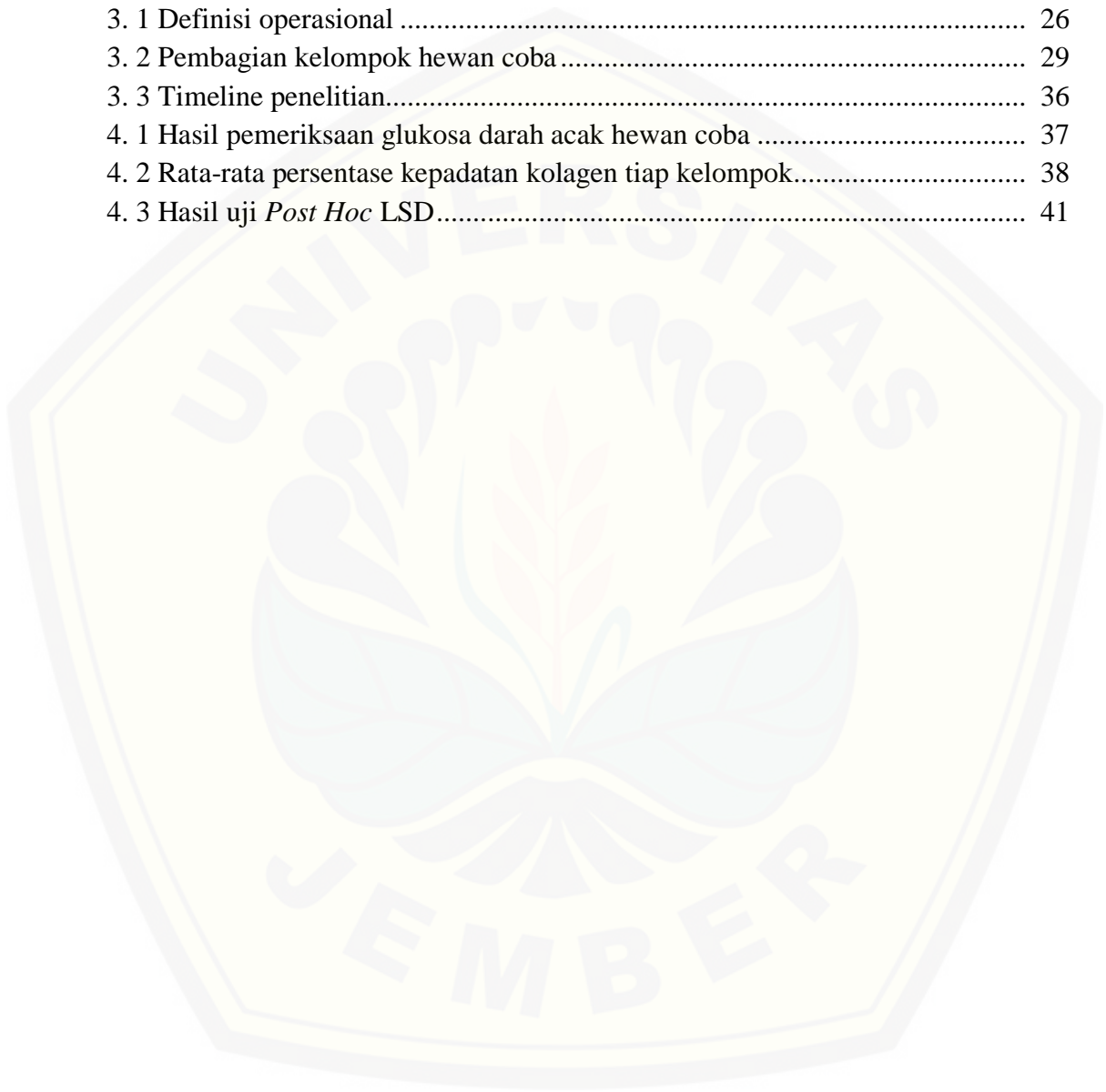
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Rancangan Penelitian	22
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	23
3.3.1 Populasi	23
3.3.2 Sampel.....	23
3.3.3 Besar Sampel Penelitian.....	24
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.5 Variabel Penelitian	25
3.5.1 Variabel Bebas	25
3.5.2 Variabel Terikat	25
3.5.3 Variabel Luar	25
3.6 Definisi Operasional	26
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.7.1 Alat Penelitian.....	27
3.7.2 Bahan Penelitian.....	27
3.8 Prosedur Penelitian	28
3.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas	28
3.8.2 Pembuatan Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas	28
3.8.3 Adaptasi Hewan Coba.....	29
3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan	29
3.8.5 Penginduksian Streptozotocin.....	30
3.8.6 Pemeriksaan Kadar Gula Darah	30
3.8.7 Pembuatan Luka Eksisi	30
3.8.8 Pemberian Fraksi Ekstrak Bidara Upas.....	31
3.8.9 Pengambilan Jaringan Kulit	31
3.8.10 Pembuatan Preparat Histopatologi	31
3.8.11 Pengamatan Kepadatan Kolagen.....	32
3.9 Analisis Data	32
3.10 Alur Penelitian	34
3.10.1 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas.....	34
3.10.2 Perlakuan pada Hewan Coba	35
3.10.3 <i>Timeline</i> Penelitian.....	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 Hasil Fraksinasi Umbi Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.)) ...	37
4.1.2 Glukosa Darah Hewan Coba.....	37
4.1.3 Hasil Pengamatan Kepadatan Kolagen.....	38
4.1.4 Analisis Statistik	40
4.2 Pembahasan	41

BAB 5. PENUTUP	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

	Halaman
2. 1 Klasifikasi etiologi diabetes mellitus	7
2. 2 Klasifikasi luka diabetik berdasarkan klasifikasi Texas	10
2. 3 Faktor – faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka.....	13
3. 1 Definisi operasional	26
3. 2 Pembagian kelompok hewan coba	29
3. 3 Timeline penelitian.....	36
4. 1 Hasil pemeriksaan glukosa darah acak hewan coba	37
4. 2 Rata-rata persentase kepadatan kolagen tiap kelompok.....	38
4. 3 Hasil uji <i>Post Hoc</i> LSD.....	41

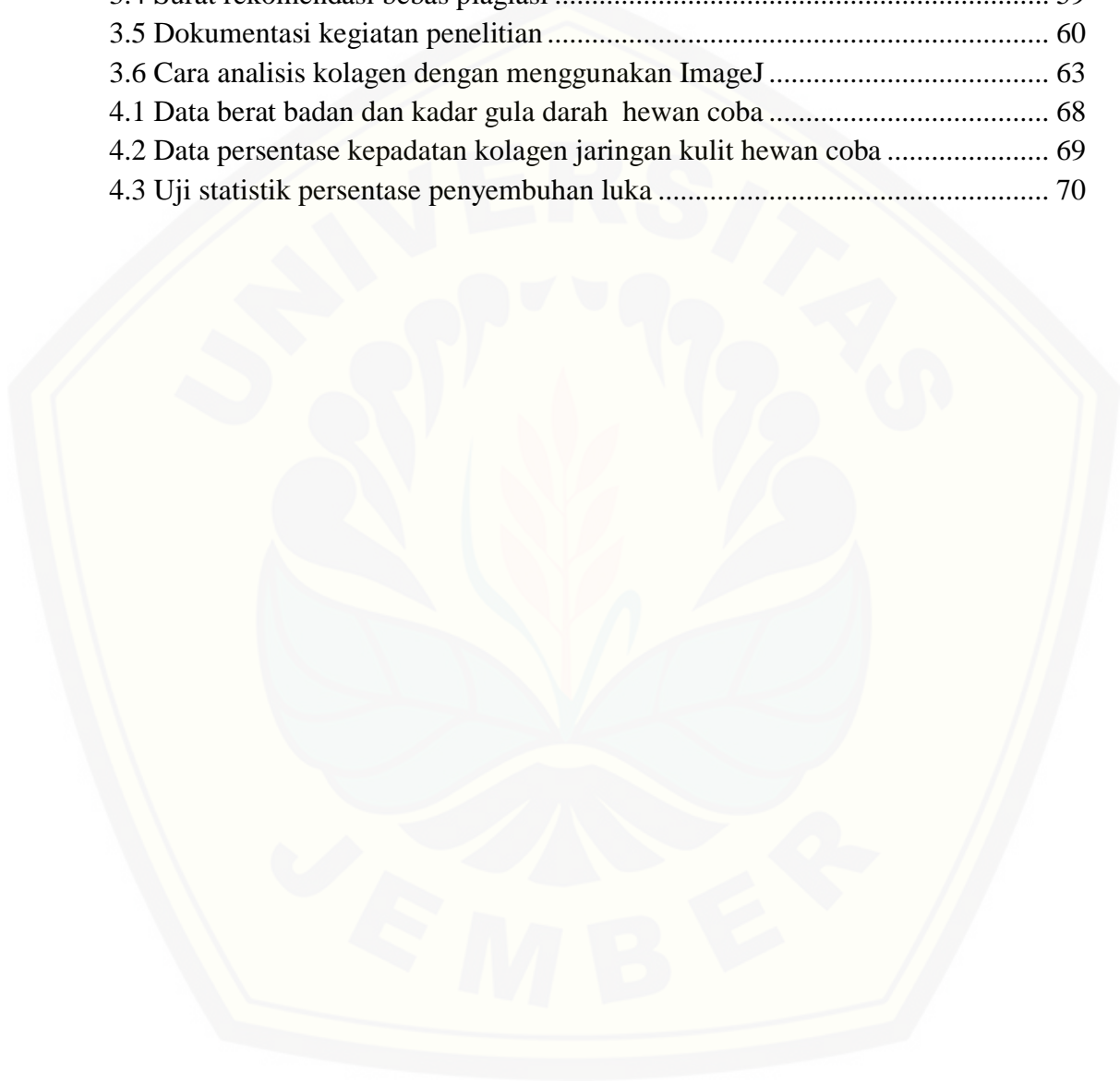


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2. 1 Tanaman bidara upas.....	4
2. 2 Mekanisme antiinflamasi flavonoid dan resin glikosida.....	6
2. 3 Patofisiologi gangguan penyembuhan luka diabetik	10
2. 4 Urutan waktu terjadinya penyembuhan luka.....	14
2. 5 Fase penyembuhan luka	14
2. 6 Peningkatan kolagen	17
2. 7 Gambaran matriks ekstraseluler.....	18
2. 8 Proses sintesis kolagen.....	19
2. 9 Gambaran kolagen dengan Masson's Trichrome.....	19
2. 10 Kerangka konsep.....	20
3. 1 Skema rancangan penelitian.....	22
3. 2 Skema pembuatan fraksi air ekstrak umbi bidara upas.....	34
3. 3 Skema perlakuan pada hewan coba.....	35
4. 1 Grafik rata-rata persentase kepadatan kolagen	38
4. 2 Gambaran kepadatan kolagen jaringan kulit hewan	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Protap ekstraksi dan fraksinasi umbi bidara upas	51
3.2 Protap pembuatan preparat histopatologi	54
3.3 Surat keterangan persetujuan etik	56
3.4 Surat rekomendasi bebas plagiasi	59
3.5 Dokumentasi kegiatan penelitian	60
3.6 Cara analisis kolagen dengan menggunakan ImageJ	63
4.1 Data berat badan dan kadar gula darah hewan coba	68
4.2 Data persentase kepadatan kolagen jaringan kulit hewan coba	69
4.3 Uji statistik persentase penyembuhan luka	70



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Komplikasi penyakit diabetes melitus (DM) yang paling sering terjadi adalah luka diabetik. Prevalensi luka diabetik lebih sering dialami oleh pasien DM tipe 2 daripada DM tipe 1 (IDF, 2017). Sebanyak 25% pasien DM mengalami luka diabetik dan 85% diantaranya mengalami amputasi (Lefrancois *et al.*, 2017). Menurut data *International Diabetic Federation* (2017), setiap 30 detik terdapat 1 ekstremitas bawah yang diamputasi akibat DM. Tingginya prevalensi luka diabetik ini diakibatkan oleh adanya kenaikan prevalensi DM di dunia dan semakin tingginya angka harapan hidup pasien DM (WHO, 2016). Risiko luka diabetik yang mengarah pada amputasi meningkat pada pasien DM dengan kadar gula darah yang tidak terkontrol, neuropati perifer disertai LOPS (*Loss of Protective Sensation*), merokok, gangguan penglihatan, deformitas kaki, riwayat ulkus kaki dan riwayat amputasi (*American Diabetic Association*, 2018; Lefrancois *et al.*, 2016). Tingginya prevalensi dan morbiditas akibat luka diabetik menimbulkan masalah dibidang ekonomi. Berdasarkan data WHO (2016), sekitar 1,5-2,5% dari anggaran tahunan kesehatan dihabiskan untuk penanganan medis terkait dengan penyakit DM dan komplikasinya.

Terapi luka diabetik saat ini membutuhkan penanganan yang komprehensif dan melibatkan multidisiplin ilmu (IDF, 2017). Intervensi farmakologis dilakukan dengan terapi antibiotik. Penggunaan antibiotik dapat menghambat progresivitas luka diabetik namun memiliki beberapa kelemahan yakni dapat menimbulkan iritasi kulit dan perlu adanya tes sensitivitas bakteri (Prameswari, 2017). Penggunaan antibiotik terlalu lama juga dapat menyebabkan kemungkinan terjadinya resistensi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Agis *et al.* (2017), antibiotik tidak efektif terhadap 21,05% pasien luka diabetik di sebuah rumah sakit di kota Padang dengan bakteri resisten terhadap semua jenis antibiotik.

Sulitnya penanganan luka, tingginya risiko reamputasi dan beban ekonomi yang menyertai permasalahan luka diabetik memunculkan sebuah

urgensi inovasi terapi farmakologis yang mudah dan murah dalam penggunaannya. Indonesia memiliki kekayaan sumber daya alam yang melimpah, 266 tanaman obat dapat ditemukan di Taman Nasional Meru Betiri Jawa Timur. Bidara upas merupakan tanaman obat yang memiliki kandungan flavonoid yang paling tinggi diantara 6 tanaman obat lain yang diteliti oleh Ratnadewi (2018) yaitu sejumlah $449,46 \pm 4,30$ mg QE/g. Selain flavonoid, umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) diketahui mengandung senyawa resin glikosida, alkaloid dan tannin. Resin-glikosida dan flavonoid mempunyai fungsi sebagai antiinflamasi dengan menghambat siklus siklooksigenase dan lipooksigenase pada proses inflamasi (Sakinah *et al.*, 2018; Rathee *et al.*, 2009). Efek antioksidan yang dimiliki oleh flavonoid dalam umbi bidara upas bekerja melalui mekanisme peningkatan aktivasi enzim SOD (*Superoxide Dismutase*) dan *glutathion transferase* sehingga dapat menurunkan jumlah ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat merusak sel (Hidayat *et al.*, 2015). *Growth factor* yang dihasilkan oleh umbi bidara upas selanjutnya dapat menginduksi fibroblas untuk mensintesis kolagen sehingga berperan dalam penyembuhan luka (Prameswari, 2018). Alkaloid, flavonoid dan tannin dalam umbi bidara upas berfungsi sebagai antibakteri dengan menghambat kemampuan replikasi dan merusak dinding sel bakteri (Hidayat *et al.*, 2015; Farizal, 2012).

Parameter penyembuhan luka dapat dilihat melalui pengamatan angiogenesis, makrofag, fibroblas dan kolagen. Pemeriksaan kepadatan kolagen dipilih karena kolagen memiliki peran penting dalam penyembuhan luka diantaranya yaitu berinteraksi dengan trombosit dan fibronektin, meningkatkan komponen seluler, faktor pertumbuhan dan proliferasi epidermis. Kolagen diproduksi oleh sel fibroblas. Sel ini terdiri dari banyak serabut yang dapat meningkat kepadatannya seiring dengan kesembuhan luka (Novriansyah, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Prameswari (2017) terbatas pada pemilihan fraksinasi terbaik yang digunakan pada ekstrak etanol umbi bidara upas. Fraksinasi tersebut menggunakan 3 jenis pelarut yang berbeda berdasarkan polaritasnya yaitu air, etil asetat dan n-heksana. Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi air merupakan jenis fraksi ekstrak umbi bidara upas

yang paling berpengaruh pada penyembuhan luka diabetik. Peneliti ingin melanjutkan penelitian tersebut untuk mengetahui efektivitas dosis fraksi air ekstrak umbi bidara upas dalam penyembuhan luka tikus diabetes berdasarkan kepadatan kolagen.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) topikal terhadap progresivitas penyembuhan luka berdasarkan gambaran histopatologi kepadatan kolagen kulit?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap progresivitas penyembuhan luka diabetik berdasarkan gambaran histopatologi kepadatan kolagen kulit.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- a. Penelitian ini dapat menambah pengetahuan dan wawasan mengenai pemberian umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) secara topikal dalam penyembuhan luka diabetik.
- b. Penelitian ini diharapkan dapat membantu meningkatkan mutu pendidikan terutama di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk terapi tambahan mencegah amputasi pada pasien luka diabetik dan dapat digunakan sebagai pengembangan penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.))

2.1.1 Klasifikasi

Dalam dunia tumbuhan, klasifikasi tanaman umbi bidara upas dapat dilihat pada sistematika sebagai berikut (Farizal, 2012).

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Divisi : Spermatophyta (Tumbuhan berbiji)

Kelas : Dicotyledonae (Berkeping dua)

Ordo : Solanales

Familia : Convolvulaceae (Suku kangkung-kangkungan)

Genus : *Merremia*

Spesies : *Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.

Merremia mammosa (Lour.) Hallier f. atau tanaman bidara upas memiliki beberapa sinonim yaitu *Ipomoea mammosa* Choisy, *Batatta mammosa* Rumph dan *Convolvulus mammosa* Hall (Kurniasih, 2014). Tanaman ini memiliki sebutan yang berbeda-beda diberbagai daerah di Indonesia seperti widoro upas atau blantar (Jawa) dan hailale (Maluku/Ambon) (Agoes, 2010). Tanaman bidara upas ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Tanaman bidara upas (Prameswari, 2017)

2.1.2 Morfologi

Bidara upas termasuk tanaman menjalar yang panjangnya dapat mencapai 3-6 m. Tanaman ini dikenal sebagai tanaman obat dan bahan makanan karena umbinya dapat dimakan (Agoes, 2010). Batang tanaman ini berukuran kecil dengan permukaan licin berwarna coklat gelap. Daun bidara upas berwarna hijau tua berbentuk jantung dengan tepi yang rata, ujungnya meruncing dan berukuran panjang 5-12 cm dan lebar 4-15 cm (Kurniasih, 2014).

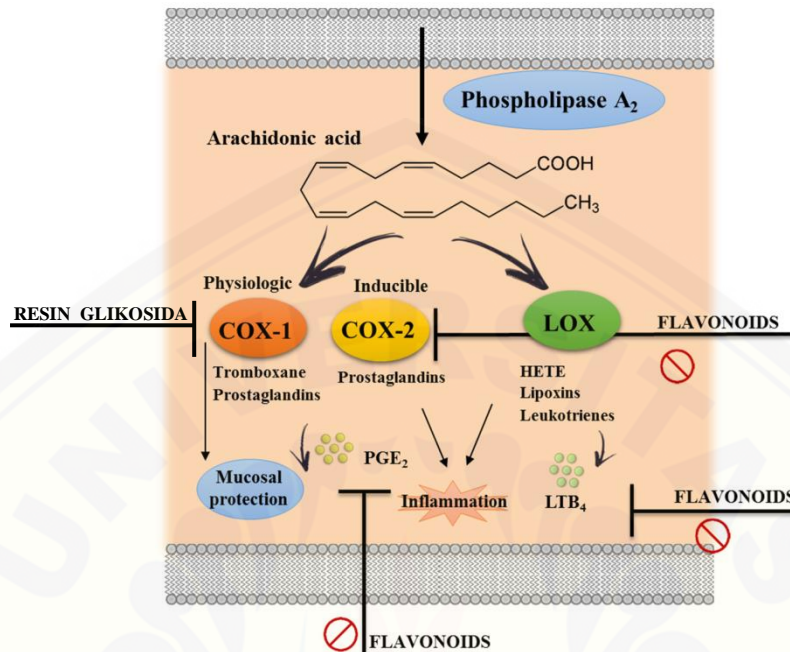
Umbi bidara upas terkumpul didalam tanah mirip seperti ubi jalar dan beratnya dapat mencapai lebih dari 5 kg bila tanah tempat tanaman ini tumbuh tidak kering dan tidak tergenang air. Umbinya berwarna kuning kecoklatan, kulitnya tebal dan bergetah putih bila kering berwarna coklat. Tanaman ini dapat diperbanyak melalui stek batang atau dengan menanam bagian umbinya (Hidayat, 2015).

2.1.3 Efek Farmakologi Umbi Bidara Upas

Senyawa-senyawa yang terdapat dalam umbi bidara upas yaitu resin glikosida, flavonoid, tannin, alkaloid dan polifenol (Kitagawa *et al.*, 1996; Julianto, 2015). Senyawa-senyawa ini berfungsi sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antibakteri sehingga memiliki potensi dalam mempercepat penyembuhan luka (Sakinah *et al.*, 2018; Marchianti *et al.*, 2018). Secara rinci efek farmakologi senyawa-senyawa tersebut sebagai berikut.

- a. Senyawa resin glikosida dan flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi. Terdapat 13 jenis senyawa resin glikosida yang dapat diidentifikasi dalam umbi bidara upas yaitu merremosida a, b, c, d, e, f, g, h1, h2 dan mammosida A, B, H1 dan H2 (Kitagawa, 1996; Kitagawa, 1997). Senyawa-senyawa ini mempunyai efek antiinflamasi dengan menghambat siklooksigenase (Sakinah *et al.*, 2018). Sementara efek antiinflamasi yang dimiliki oleh senyawa lain dalam umbi bidara upas yaitu flavonoid, juga sama-sama bekerja dengan menghambat fase penting dalam mekanisme inflamasi yaitu pada lintasan siklooksigenase dan

lipooksigenase (Rathee *et al.*, 2009). Mekanisme antiinflamasi flavonoid dan resin glikosida dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Mekanisme antiinflamasi flavonoid dan resin glikosida (Sumber: Vezza *et al.*, 2016)

- b. Senyawa flavonoid selain digunakan sebagai antiinflamasi juga mempunyai manfaat sebagai antioksidan dapat meningkatkan *growth factor*. Flavonoid memiliki efek antioksidan yang dapat mempercepat fase inflamasi dengan menangkap radikal bebas dan mencegah reaksi oksidasi dengan meningkatkan aktivitas enzim SOD (*Superoxide Dismutase*) dan GST (*Glutation S Transferase*) (Hidayat *et al.*, 2015). Sedangkan pada proses penyembuhan luka, flavonoid dengan aktivitas antiinflamasinya juga dapat merangsang sel-sel makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin seperti *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor-β* (TGF-β) dan *interleukin* (IL) yaitu IL-1, IL-4, IL-8 sehingga mempercepat memasuki fase proliferasi dalam penyembuhan luka (Tanggo, 2013; Mazni, 2008). Pada fase proliferasi, fibroblas akan mengalami peningkatan sintesis kolagen. Kolagen tersusun atas serabut-serabut yang meningkat kepadatannya sehingga luka dapat menutup dan sembuh (Prameswari, 2017).

c. Senyawa flavonoid, tannin dan alkaloid diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Dalam perannya sebagai antibakteri, flavonoid merusak DNA girase sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri terhambat (Kurniawan, 2015). Selain flavonoid, senyawa dalam umbi bidara upas yang berfungsi sebagai antibakteri yaitu tannin dan alkaloid. Tannin akan menginaktifkan adhesin sel bakteri, menginaktifkan enzim dan merusak protein pada lapisan sel bakteri sehingga pembentukan sel bakteri kurang sempurna. Akhirnya sel bakteri akan lisis dan mati (Farizal, 2012; Hidayat *et al.*, 2015). Sementara mekanisme kerja alkaloid yaitu merusak *Z-ring* bakteri sehingga pembelahan sel bakteri dapat dihambat (Cushnie *et al.*, 2014). Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan, dapat dibuktikan bahwa bidara upas mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri patogen seperti *Microbacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus* (Sugijanto, *et al.*, 2012; Agil *et al.*, 2011; Mazni, 2008). Penelitian lain yang dilakukan oleh Farizal tahun 2012 menyebutkan bahwa pemberian ekstrak umbi bidara upas dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan ROI (*Reactive Oxygen Intermediet*) makrofag pada tikus yang terinfeksi *Salmonella thypurium*. ROI berperan dalam kematian sel dalam mekanisme imunitas bawaan.

2.2 Luka Diabetik

2.2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit metabolik kronis akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin secara efektif yang ditandai oleh adanya peningkatan kadar gula darah (hiperglikemi). Insulin adalah hormon yang berperan dalam pengaturan keseimbangan kadar gula darah (Kemenkes RI, 2014). Klasifikasi diabetes mellitus berdasarkan etiologinya dapat dilihat pada Tabel 2.1 berikut.

Tabel 2. 1 Klasifikasi etiologi diabetes mellitus

No.	Jenis Diabetes	Etiologi
1	DM tipe 1	Destruksi sel beta pankreas yang diakibatkan oleh autoimun dan idiopatik, seringkali menyebabkan defisiensi insulin yang absolut.
2	DM tipe 2	Disebabkan oleh adanya resistensi insulin yang bervariasi mulai dari yang relatif sampai yang dominan sehingga mengakibatkan rusaknya sel beta pankreas secara progresif.
3	Diabetes gestasional	Diabetes yang terjadi pada masa kehamilan hingga proses melahirkan. Diabetes ini terdiagnosis pada trimester kedua dan ketiga kehamilan.
4	Diabetes tipe lain	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Drug-induced diabetes</i> (penggunaan glukokortikoid, pengobatan HIV/AIDS atau setelah transplantasi organ) • <i>Monogenic diabetes syndrome</i> (diabetes pada neonatus dan MODY (<i>maturity-onset diabetes of the young</i>)) • Penyakit eksokrin pankreas (kistik fibrosis dan pankreatitis).

(Sumber : *American Diabetes Association*, 2018)

Jumlah penderita diabetes terus meningkat beberapa dekade terakhir. Prevalensi penderita diabetes yang berumur 20-64 tahun pada 2017 sebanyak 327 juta jiwa dan terus mengalami peningkatan hingga pada tahun 2045 diperkirakan mencapai 438 juta jiwa (IDF, 2017). Peningkatan prevalensi diabetes lebih banyak terjadi di negara yang mempunyai pendapatan rendah hingga menengah dibandingkan dengan negara berpendapatan tinggi. Hal ini dipengaruhi oleh tingginya urbanisasi dan meningkatnya *sedentary lifestyle* dikalangan masyarakat (WHO, 2016). Di Indonesia, berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan bahwa 12.191.564 penduduk menderita diabetes melitus (Kemenkes RI, 2014).

Kecurigaan diabetes ditandai dengan adanya keluhan klasik diabetes seperti poliuria, polidipsia, polifagia dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya. Keluhan lain dapat berupa badan yang lemah, kesemutan, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria dan pruritus vulvae pada wanita (PERKENI, 2015).

Kriteria diagnosis diabetes diantaranya sebagai berikut.

- a. Gejala klasik diabetes + kadar glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Glukosa plasma sewaktu merupakan hasil pemeriksaan sesaat pada suatu hari tanpa memperhatikan waktu makan terakhir.
- b. Gejala klasik diabetes + kadar glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Puasa diartikan pasien tidak mendapatkan asupan kalori selama 8 jam atau lebih.
- c. Kadar glukosa plasma jam pada tes toleransi glukosa oral (TTGO) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). TTGO dilakukan dengan standar WHO, menggunakan beban glukosa yang setara dengan 75 g glukosa anhidrus yang dilarutkan ke dalam air (ADA, 2018).

Komplikasi diabetes yang dapat terjadi yaitu hipoglikemi, hiperglikemi, gangguan makrovaskular dan mikrovaskular. Komplikasi penyakit DM yang paling sering terjadi adalah luka diabetik. Prevalensi luka diabetik lebih sering dialami oleh pasien DM tipe 2 daripada DM tipe 1 (IDF, 2017). Sebanyak 25% pasien DM mengalami luka diabetik dan 85% diantaranya mengalami amputasi (Lefrancois *et al.*, 2017).

2.2.2 Patofisiologi Luka diabetik

Luka adalah diskontinuitas jaringan yang disebabkan oleh trauma dari luar (Tanggo, 2013). Pengertian luka diabetik mencakup ulkus dan gangrene diabetik. Ulkus adalah rusaknya *barrier* kulit sampai seluruh bagian dermis hingga mengenai jaringan subkutan (Okonkwo dan DiPietro, 2017). Gangren diabetik adalah kematian jaringan (kulit, tendon, fascia dan otot) yang disebabkan oleh penyumbatan pembuluh darah perifer yang sering menjadi komplikasi pada penderita diabetes (IWDF, 2015). Setiap tahun insidensi penderita luka diabetik diperkirakan sebanyak 6,3% di dunia (Cho *et al.*, 2018).

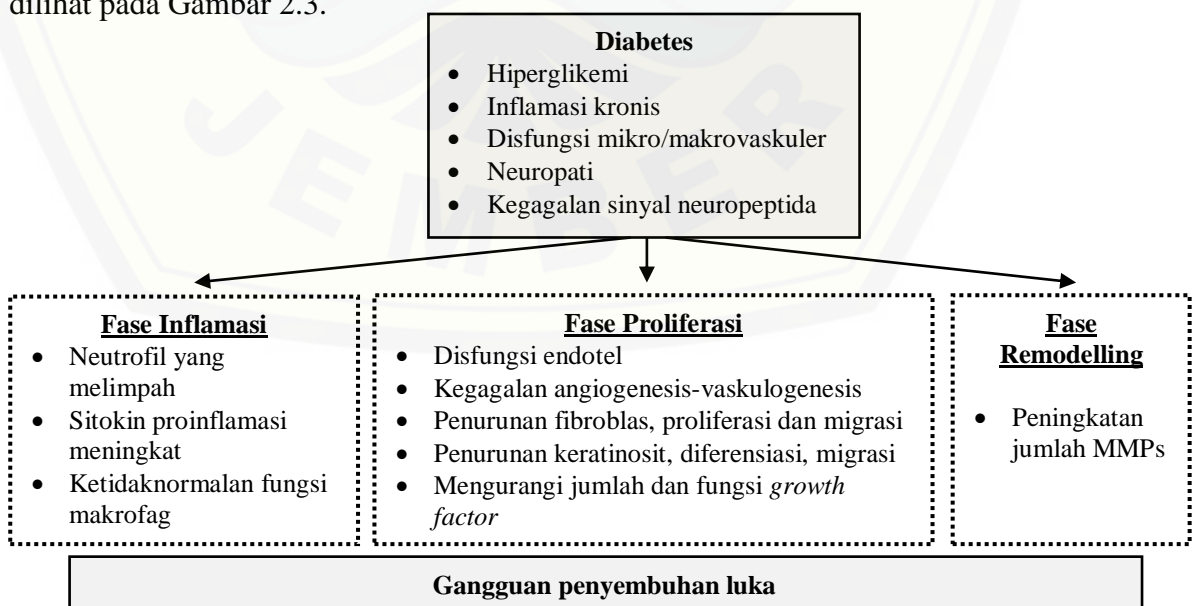
Klasifikasi luka pada penderita DM ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Klasifikasi luka diabetik berdasarkan klasifikasi Texas

Stadium	Tingkat			
	0	1	2	3
A	Luka epitelisasi sebelum / sesudah terjadi ulseratif pada luka yang berisiko	Luka superficial tidak sampai tendon, kapsula, tulang	Luka mengenai tendon/kapsula	Luka mengenai tulang
B	Terdapat infeksi	Terdapat infeksi	Terdapat infeksi	Terdapat infeksi
C	Terdapat iskemi	Terdapat iskemi	Terdapat iskemi	Terdapat iskemi
D	Terdapat infeksi & iskemi	Terdapat infeksi & iskemi	Terdapat infeksi & iskemi	Terdapat infeksi & iskemi

(Sumber: Prameswari, 2017)

Pada pasien luka diabetik, gangguan penyembuhan disebabkan oleh beberapa faktor intrinsik (hiperglikemi, neuropati, gangguan pembuluh darah, dan komplikasi sistemik akibat penyakit diabetes) dan faktor ekstrinsik (luka infeksi, pembentukan kalus dan tekanan berlebih pada luka) (Falanga, 2005). Penurunan kewaspadaan terhadap benda-benda yang dapat menimbulkan luka pada penderita diabetes terjadi akibat komplikasi neuropati yang menyebabkan pasien kehilangan sensasi nyeri. Hal ini diperparah dengan adanya gangguan penyembuhan luka pada pasien diabetes mellitus. Patofisiologi luka diabetik secara singkat dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2. 3 Patofisiologi gangguan penyembuhan luka diabetik (Sumber: Baltzis, 2014)

Jalur pembentukan AGEs (*advanced glycosylation end products*) non enzimatis adalah proses perlekatan glukosa secara kimiawi ke gugus amino bebas pada protein tanpa bantuan enzim. Pengikatan tersebut mengakibatkan menurunnya matriks ekstraseluler (ECM) dan inflamasi berkepanjangan. Tingginya kadar gula darah (hiperglikemia) menahun dapat menyebabkan pembentukan AGEs pada kolagen dan protein-protein lain (Baltzis, 2014).

Selain mekanisme AGEs, inflamasi yang lama ini dikarenakan adanya kenaikan jumlah sel-sel inflamasi disekitar kulit dan pembuluh darah yang mengalami kerusakan serta ditemukan kenaikan rasio sitokin proinflamasi terhadap antiinflamasi. Sitokin proinflamasi yang mengalami kenaikan yaitu IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6) dan TNF- α (*tumor necrosis factor- α*). Pada luka diabetik ditemukan kadar neutrofil dan makrofag yang meningkat. Kemampuan neutrofil memproduksi ROS (*reactive oxygen species*) dan protease dalam jumlah banyak menyebabkan kerusakan jaringan dan terhambatnya proses penyembuhan luka. Fibroblas pada luka diabetik ditemukan mengalami gangguan dalam proliferasi, peningkatan apoptosis dan penurunan migrasi sel. Keratinosit juga mengalami abnormalitas yaitu mengalami peningkatan proliferasi namun tidak mampu bermigrasi sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk luka diabetik dapat sembuh. MMPs (*matriks metaloproteinase*) pada luka diabetik mengalami peningkatan. Peningkatan ini diakibatkan oleh adanya degradasi ECM seperti fibronectin, *growth factor*, sitokin yang membantu proses penyembuhan luka (Baltzis, 2014).

EPC (*endothelial progenitor cell*) pada pasien diabetes mengalami penurunan sehingga menyebabkan gangguan pada proses angiogenesis. Hal ini diakibatkan adanya hiperglikemi, inflamasi kronis dan proses AGEs non enzimatis. Suplai oksigen yang penting dalam metabolisme sel akhirnya juga terganggu. Buruknya perfusi jaringan dan suplai oksigen mengakibatkan kerusakan mikrovaskular dan makrovaskular, luka mengalami hipoksia dan sulit untuk sembuh (Baltzis, 2014; Okonkwo dan diPietro, 2017).

2.2.3 Penanganan Luka Diabetik

Penanganan luka pada pasien DM dilakukan dengan tujuan untuk mencegah terjadinya infeksi, mempercepat penyembuhan luka dan menurunkan resiko amputasi. Manajemen luka diabetik meliputi *debridement*, *dressing* luka, mempertahankan sirkulasi adekuat, *off-loading* tekanan, manajemen infeksi luka dengan menggunakan antibiotik dan mengatasi keadaan hiperglikemi serta penyakit komorbidnya. Penanganan luka dengan intervensi farmakologis dapat dilakukan melalui terapi antibiotik (Lefrancois *et al.*, 2016).

2.2.4 Model Hewan Coba Diabetes

Streptozotocin (STZ) merupakan bahan kimia alami yang diperoleh dari biosintesis mikroba tanah *Streptomyces achromogenes* (Lenzen, 2008). STZ dapat digunakan sebagai antibiotik, obat kemoterapi dan induksi diabetes tipe 1 dan tipe 2 pada hewan coba. Penelitian Rakietyen *et al.* pada tahun 1963 mengatakan bahwa STZ bersifat diabetogenik dan menyebabkan sindrom insulinopenia. Sejak saat itu, STZ dipilih sebagai agen penginduksi diabetes pada hewan coba (Tripathi *et al.*, 2014).

Hewan pengerat (tikus, mencit, hamster) dan beberapa mamalia lain seperti monyet dan kelinci rentan mengalami diabetes yang diinduksi oleh STZ. STZ paling sering diberikan secara intraperitoneal dan intravena. Pemberian secara intraperitoneal lebih dipilih karena cepat dan lebih mudah diterapkan dibanding pemberian intravena. Dosis STZ yang digunakan pada tikus dewasa untuk menginduksi DM yaitu 40-60 mg/kgBB. Dosis tunggal dibawah 40 mg/kgBB kemungkinan tidak efektif dalam menginduksi diabetes. LD₅₀ dari STZ yang diberikan pada mencit yaitu 240 mg/kgBB (Goud, 2015).

Sifat hidrofilik STZ membatasi difusi bebasnya melewati membran sel plasma bilayer. Secara khusus, toksisitas STZ selektif terhadap sel beta pankreas (Lenzen, 2008). STZ memiliki gugus 2-deoxy-d-glukosa memungkinkan secara selektif masuk ke sel beta pankreas melalui GLUT2 karena struktur glukosa yang dimilikinya. Hepatosit dan sel tubular ginjal juga mengekspresikan GLUT2 sehingga rentan terhadap efek toksisitas STZ (Tripathi *et al.*, 2014; Goud *et al.*,

2015). Setelah berhasil memasuki sel beta pankreas, STZ menyebabkan terjadinya alkilasi DNA. Kerusakan DNA selanjutnya meningkatkan PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) menyebabkan terjadinya deplesi NAD⁺ dan ATP pada sel beta pankreas. Peningkatan defosforilasi ATP akibat induksi STZ menghasilkan substrat bagi reaksi katalis xantin oksidase yang menghasilkan radikal superoksida seperti hidrogen peroksida (H₂O₂) yang merusak sel beta pankreas (Lenzen, 2008). Selanjutnya, STZ membebaskan banyak zat toksik dari nitrit oksida yang menghambat aktivitas aconitase dan berperan dalam kerusakan DNA pada mitokondria lalu menyebabkan adanya penurunan ATP pada sel beta pankreas. Penghambatan O-GlcNAcase menyebabkan pembentukan protein glikosilasi yang ireversibel yang dapat merusak sel beta pankreas (Goud, 2015).

2.3 Penyembuhan Luka

2.3.1 Faktor – Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Banyak faktor yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka sehingga membutuhkan waktu penyembuhan yang lebih lama atau luka yang sembuh tidak sempurna. Faktor – faktor tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.3.

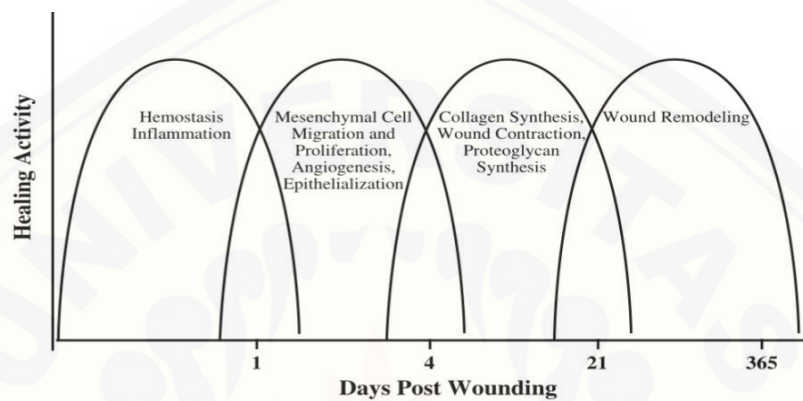
Tabel 2. 3 Faktor – faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka

Faktor Lokal	Faktor Sistemik
Oksigenasi	Umur dan jenis kelamin
Infeksi	Hormon seksual
Benda asing	Stres
<i>Venous sufficiency</i>	Iskemi
	Penyakit: diabetes, keloid, fibrosis, <i>hereditary healing disorders</i> (gangguan penyembuhan luka genetik), jaundice, uremia
	Kondisi imunokompromais: kanker, terapi radiasi, AIDS
	Obat-obatan: steroid (glukokortikoid), NSAIDs, kemoterapi
	Obesitas
	Alkohol dan rokok
	Nutrisi

(Sumber: Guo *et al.*, 2010)

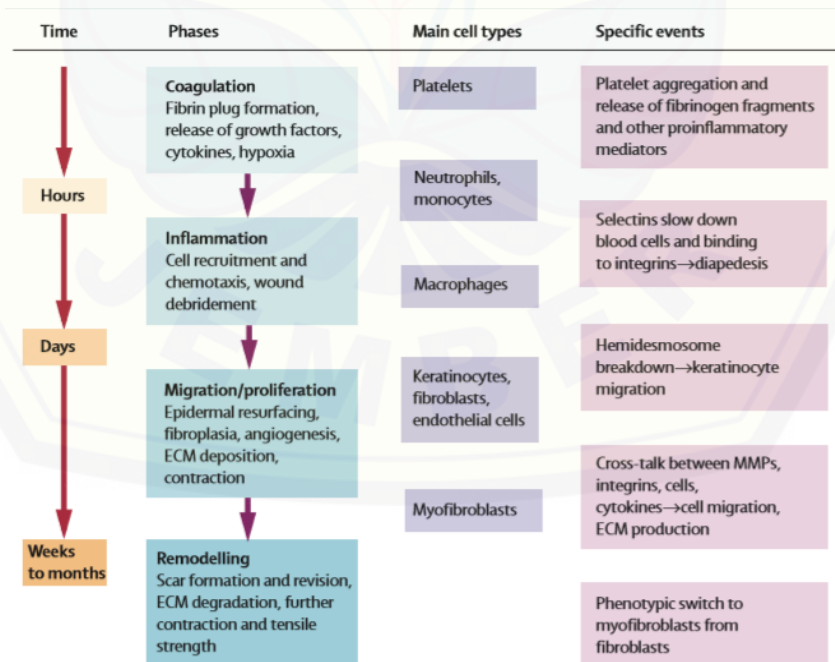
2.3.2 Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka dapat tercapai melalui 4 fase yang bertahap yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Agar luka tersebut berhasil sembuh, keempat fase harus terjadi dengan urut dan pada jangka waktu yang tepat (Child, 2017; Guo *et al.*, 2010). Waktu terjadinya penyembuhan luka pada setiap fase dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2. 4 Urutan waktu terjadinya penyembuhan luka (Sumber: Ramasastry, 2005)

Fase penyembuhan luka, sel-sel yang terlibat dalam setiap fase dan proses fisiologi penyembuhan luka yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2. 5 Fase penyembuhan luka (Sumber: Falanga, 2005)

Uraian keempat fase penyembuhan luka adalah sebagai berikut.

a. Fase Hemostasis

Pada tahap awal, darah akan mengisi jaringan yang cedera dan terpaparnya darah terhadap kolagen berakibat terjadinya degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor hageman. Hal ini akan memicu pengaktifan komplemen kinin, kaskade pembekuan dan pembentukan plasmin (Child, 2017; Novriansyah, 2008). Setelah terjadinya cedera, pembuluh darah akan langsung mengalami vasokonstriksi dan periode ini akan bertahan selama 5-10 menit. Vasokonstriksi pada awal onset diperantarai oleh katekolamin dan prostaglandin (Ramasastry, 2005). Platelet berperan penting pada fase hemostasis penyembuhan luka (Baltzis, 2018). Platelet tidak hanya berfungsi membentuk bekuan darah tetapi juga menghasilkan beberapa *growth factor* seperti PDGF (*platelet-derived growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), dan TGF- β (*transforming growth factor- β*). *Growth factor* tersebut berfungsi untuk merangsang pertumbuhan dan proliferasi dari sel luka seperti keratinosit dan fibroblas untuk bermigrasi kedalam ruang luka (Tanggo, 2013). Fase hemostasis berakhir selama beberapa menit lalu dilanjutkan dengan fase inflamasi yang ditandai oleh adanya proses vasodilatasi. Vasodilatasi menyebabkan pembuluh darah lebih permeabel sehingga sel leukosit dapat menembusnya (Astuti, 2010).

b. Fase Inflamasi

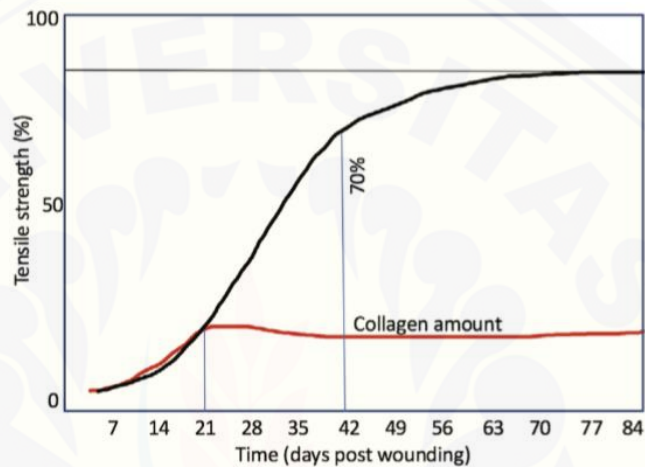
PDGF dan TGF- β yang dihasilkan oleh platelet menarik neutrofil ke dalam pembuluh darah. Migrasi netrofil ke luka dikarenakan adanya peningkatan permeabilitas kapiler akibat lepasnya serotonin dan histamin oleh sel mast dan jaringan ikat. Neutrofil pada umumnya akan ditemukan pada 2 hari pertama terjadinya luka. Neutrofil berperan penting untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah infeksi. Makrofag akan mengikuti neutrofil menuju luka setelah 48-72 jam dan menjadi sel dominan setelah hari ketiga pasca trauma. Debris dan bakteri akan difagositosis oleh makrofag. Keberadaan makrofag sangat penting dalam fase penyembuhan ini. Selain

melalui proses fagositosis, netrofil dan makrofag juga berperan dalam eliminasi bakteri dengan cara memproduksi dan melepaskan beberapa proteinase dan ROS (*reactive oxygen species*). ROS melalui sifat radikal bebasnya penting dalam mencegah infeksi bakterial, namun tingginya kadar ROS secara berkepanjangan juga akan menginduksi kerusakan sel tubuh lainnya. ROS juga mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakhidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator inflamasi lagi seperti prostaglandin dan leukotrien, sehingga proses inflamasi akan menjadi berkepanjangan (Tanggo, 2013; Novriansyah 2008). Makrofag juga berperan utama memproduksi berbagai *growth factor* yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstraseluler oleh fibroblas dan pembentukan neovaskularisasi. Setelah makrofag, limfosit T akan muncul pada hari ke-5 sampai hari ke-7 mekanisme sel ini dalam penyembuhan luka belum sepenuhnya diketahui (Chlids dan Murthy, 2017; Guo *et al.*, 2010).

c. Fase Proliferasi

Fase ini terjadi pada hari ke-3 sampai hari ke-21 pasca trauma. Bila tidak ada kontaminasi / infeksi yang bermakna, fase inflamasi akan berlangsung pendek. Pada fase ini matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara gradual digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskular (Chlids dan Murthy, 2017). Proses revaskularisasi terjadi secara bersamaan dengan fibroplasia (pembentukan kolagen) karena pembentukan pembuluh darah baru menyediakan oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan untuk proliferasi fibroblas. Pembentukan matriks ekstraseluler dimulai dengan degranulasi platelet karena PDGF merupakan promotor dari pembentukan *proteoglycan* dan kolagen. Fibroblas muncul pertama kali secara bermakna pada hari ke 3 dan mencapai puncaknya pada hari ke-7 (Novriansyah, 2008). Fibroblas berasal dari sel mesenkim yang belum terdiferensiasi, menghasilkan mukopolisakarida, asam aminoglisin, dan prolin yang merupakan bahan

dasar kolagen serat yang akan mempertautkan tepi luka (Tanggo, 2013). Fibroblas memproduksi kolagen dalam jumlah yang besar, kolagen ini berupa glikoprotein berantai tripel, unsur utama matriks ekstraseluler yang berguna untuk membentuk kekuatan pada jaringan parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke-3 dan akan meningkat terus hingga mencapai maksimal sampai minggu ke-3 (hari ke-21) seperti yang terlihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2. 6 Peningkatan kolagen (Sumber: Chlids dan Murthy, 2017)

d. Fase Maturasi / *Remodelling*

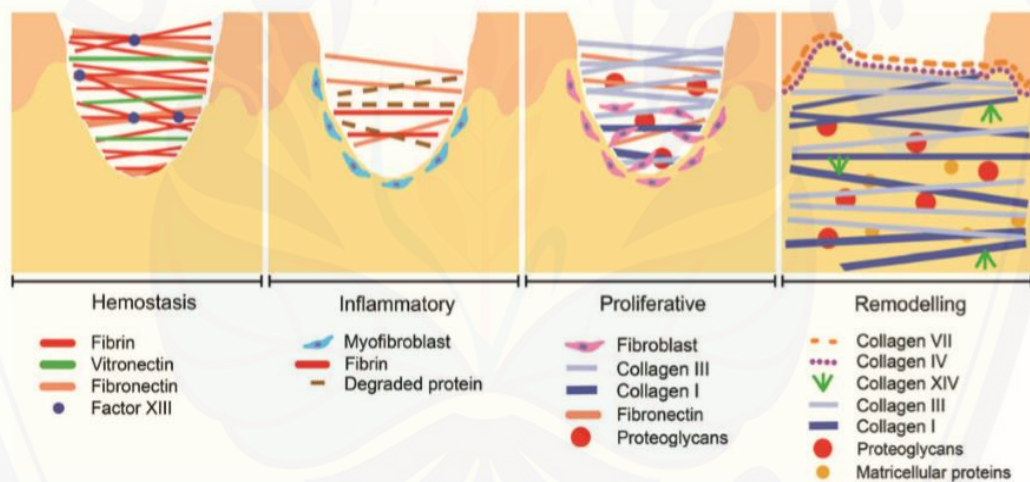
Fase maturasi merupakan fase penyudahan dari penyembuhan luka dan merupakan fase terlama yang berlangsung dari hari ke-21 dan bisa sampai 1 tahun (Tanggo, 2013). Tujuan dari fase ini adalah untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktur kulit. Proses utama dari fase ini adalah pengubahan kolagen tipe III ke kolagen tipe I. Kesuksesan kesembuhan luka tergantung pada kecukupan oksigenasi jaringan tepi luka (Childs dan Murthy, 2017).

2.4 Kolagen

Kolagen adalah protein utama yang menyusun komponen matriks ekstraseluler dan merupakan protein terbanyak yang ditemukan dalam tubuh manusia sekitar 25% - 35% dari seluruh protein tubuh (Prameswari, 2017). Kolagen termasuk salah satu parameter penyembuhan luka yang penting karena kolagen berperan pada setiap fase penyembuhan luka. Kolagen memiliki peran

pada fase hemostasis dengan berinteraksi dengan trombosit, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, berinteraksi dengan fibronectin, meningkatkan faktor pertumbuhan dan memacu proses fibroplasia dan proliferasi epidermis (Childs dan Murthy, 2017).

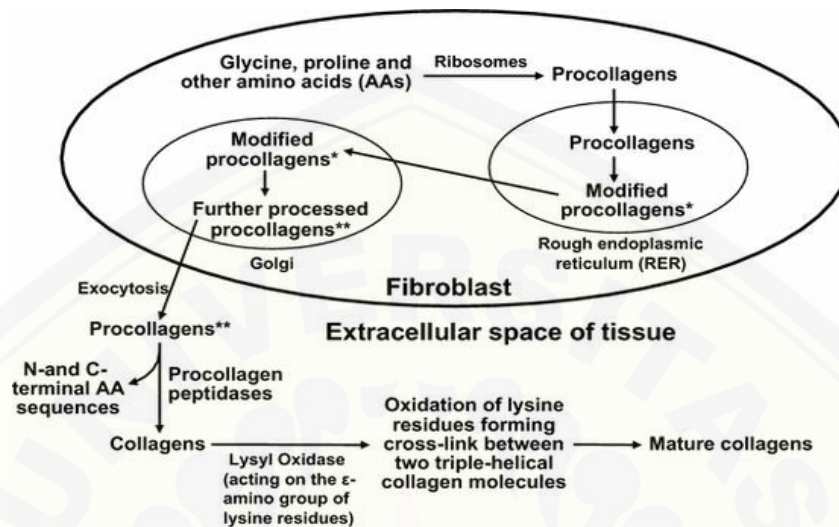
Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai alfa polipeptida (Novriansyah, 2008). Hingga saat ini, ada 28 tipe kolagen yang telah diidentifikasi. Kolagen tipe I, II dan III merupakan kolagen interstisial atau kolagen fibriler yang mempunyai jumlah paling banyak. Tipe IV, V dan VI merupakan bentuk non fibriler dan terdapat di jaringan interstisial dan membran basalis. Kolagen tipe I dan III masing-masing membentuk sekitar 90% dan 10% dari total kolagen di kulit. (Tracy *et al.*, 2016). Jenis-jenis kolagen dan gambaran matriks ekstraseluler dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2. 7 Gambaran matriks ekstraseluler pada kulit normal pada proses penyembuhan luka (Sumber: Tracy et al., 2016)

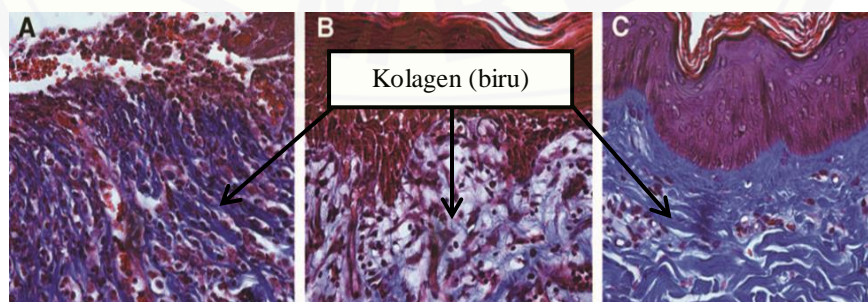
Kolagen disintesis di retikulum endoplasma sel fibroblas pada fase proliferasi dimulai pada hari ke-3 penyembuhan luka. Sintesisnya membutuhkan oksigen sebagai kofaktor penting selama hidroksilasi prolin dan lysine dalam proses pembentukan protokolagen. Sintesis kolagen memerlukan prolyl-hidroksilase dan lysyl-hidroksilase, enzim tersebut bergantung pada oksigen. Proses sintesis 1 atom kolagen membutuhkan 1 atom oksigen setiap 3 urutan asam amino. Kemudian prokolagen akan membelah diri pada segmen terminal dan disebut tropokolagen. Tropokolagen bergabung dengan tropokolagen lain

membentuk filamen kolagen. Filamen ini akan bergabung membentuk serat-serat kolagen (Li dan Wu, 2018; Novriansyah, 2008). Proses sintesis kolagen dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2. 8 Proses sintesis kolagen (Sumber: Li dan Wu, 2018)

Pemeriksaan kepadatan kolagen kulit dapat dilakukan dengan melihat persentase serabut berwarna biru pada pengecatan histopatologi Masson's Trichrome. Masson Trichrome merupakan metode pewarnaan yang dapat mengidentifikasi serabut-serabut kolagen dan tidak spesifik pada jenis kolagen tertentu. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan 6 lapang pandang dan perbesaran 400 kali. Pengamatan kuantitatif kepadatan kolagen didapatkan melalui pengolahan gambar dengan menggunakan *software* ImageJ (Chen *et al.*, 2017). Gambaran histopatologi kulit dengan pewarnaan Masson's Trichrome dapat dilihat pada Gambar 2.9.

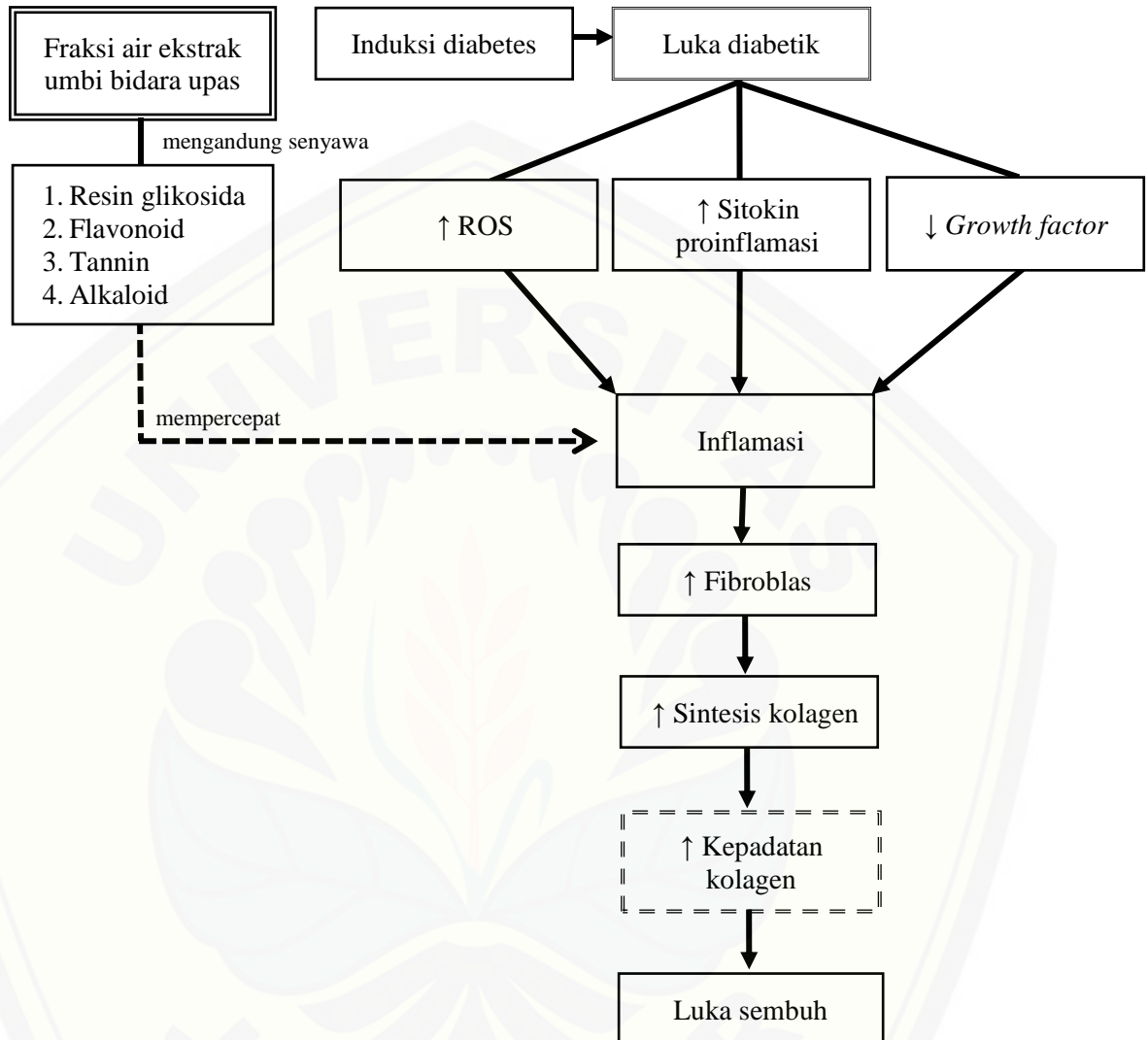


(a) Hari ke 7 penyembuhan luka; (b) Hari ke 14 penyembuhan luka; (c) Kulit intak pada fase akhir penyembuhan luka

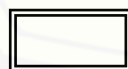
Gambar 2. 9 Gambaran kolagen dengan pewarnaan histopatologi Masson's Trichrome (Sumber: Tracy *et al.*, 2016)

2.5 Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep pada penelitian inidapat dilihat pada Gambar 2.10.



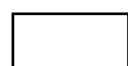
Keterangan :



: variabel bebas



: variabel terikat



: yang tidak diteliti

Gambar 2. 10 Kerangka konsep

Kondisi hiperglikemi pada pasien DM dengan luka diabetik menyebabkan adanya kenaikan ROS, kenaikan sitokin proinflamasi dan penurunan *growth factor* sehingga fase inflamasi menjadi lebih panjang dari luka normal. Fraksi umbi bidara upas mengandung senyawa resin glikosida, flavonoid, tannin dan alkaloid yang bekerja sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antibakteri. Efek antiinflamasi umbi bidara upas dapat mempercepat fase inflamasi luka diabetik melalui hambatan pada jalur siklooksigenase dan lipooksigenase serta menurunkan kadar ROS. Senyawa flavonoid juga dapat merangsang makrofag untuk menghasilkan *growth factor* (EGF, TGF- β , IL-1, IL-4 dan IL-8). Senyawa flavonoid, alkaloid dan tannin mempunyai efek antibakteri yang dapat menekan infeksi yang terjadi melalui hambatan pada DNA girase bakteri, perusakan *Z ring* dan dinding sel bakteri, mekanisme inaktivasi adhesin dan enzim bakteri. Ketiga efek farmakologis umbi bidara upas dapat mempercepat waktu inflamasi sehingga fase proliferasi dapat segera berlangsung. Fibroblas akan mengalami peningkatan karena waktu inflamasi kembali normal dan adanya induksi dari *growth factor* sehingga sintesis kolagen juga meningkat. Kolagen tersusun atas serabut-serabut yang meningkat kepadatannya sehingga luka dapat cepat menutup dan sembuh.

2.6 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu terdapat pengaruh pemberian topikal fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap progresivitas penyembuhan luka berdasarkan gambaran histopatologi kepadatan kolagen kulit tikus diabetes dibandingkan dengan kelompok kontrol.

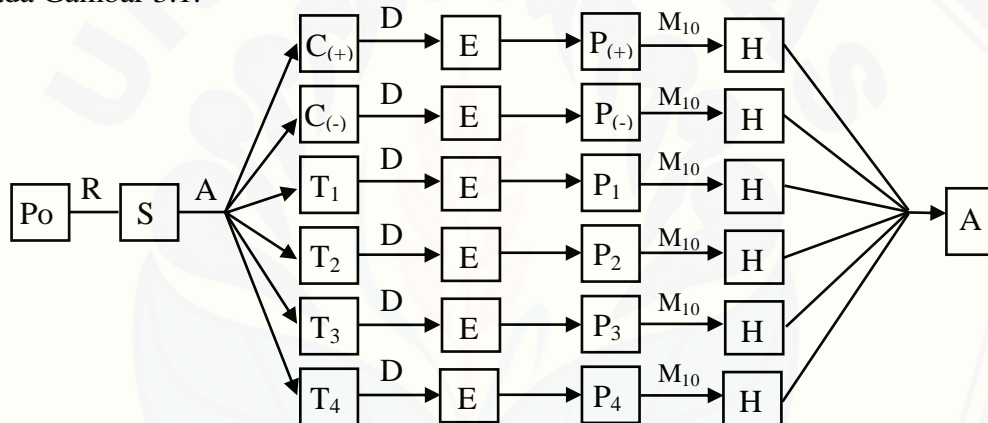
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental sebenarnya (*true experimental laboratories*) secara *in vivo*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *post test only randomized control group design* dengan dua kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan. Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

Po : Populasi tikus

R : Randomisasi

S : Sampel

A : Adaptasi selama 7 hari

C₍₋₎ : Kelompok kontrol negatif

C₍₊₎ : Kelompok kontrol positif

T₁ : Kelompok perlakuan 1

T₂ : Kelompok perlakuan 2

T₃ : Kelompok perlakuan 3

T₄ : Kelompok perlakuan 4

- D : Induksi diabetes dengan menggunakan STZ
- E : Pembuatan luka secara eksisi jaringan kulit seluas 2 x 2 cm
- P₍₋₎ : Pemberian *aquadest* secara topikal
- P₍₊₎ : Pemberian gentamicin secara topikal
- P₁ : Pemberian fraksi air ekstrak bidara upas 12,5 mg secara topikal
- P₂ : Pemberian fraksi air ekstrak bidara upas 25 mg secara topikal
- P₃ : Pemberian fraksi air ekstrak bidara upas 50 mg secara topikal
- P₄ : Pemberian fraksi air ekstrak bidara upas 100 mg secara topikal
- M₁₀ : Terminasi hewan coba dan pengambilan jaringan pada hari ke-10
- H : Pengamatan histopatologis untuk mengetahui kepadatan kolagen hewan coba pada hari ke-10
- A : Analisis data

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

3.3.2 Sampel

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi untuk mendapatkan sampel yang homogen. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih yang diperoleh dari perternakan di Malang dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus* strain Wistar)
2. Jenis kelamin jantan
3. Sehat dan dapat bergerak aktif selama masa adaptasi
4. Usia 2-3 bulan
5. Berat badan 150-200 gram
6. Kadar gula darah *post* induksi streptozotocin ≥ 200 mg/dL

b. Kriteria Eksklusi

1. Sakit selama masa adaptasi yang ditandai oleh pergerakan tidak aktif dan tidak mau makan
2. Terdapat infeksi pada luka yang ditandai dengan terbentuknya pus
3. Tikus mati saat perlakuan

3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik random sederhana (*simple random sampling*). Jumlah perlakuan pada penelitian ini sebanyak dua kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan berdasarkan dosis pemberian fraksi air ekstrak umbi bidara upas. Pengulangan dilakukan pada setiap kelompok untuk menghindari adanya bias dengan menggunakan Rumus Federer sebagai berikut.

$$(p-1)(n-1) \geq 15 \quad (p : \text{jumlah perlakuan, } n : \text{jumlah ulangan})$$

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

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

$$\begin{aligned} \text{Besar sampel} &= p \times n \\ &= 6 \times 4 \\ &= 24 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Berdasarkan hasil penghitungan diatas, penelitian ini menggunakan jumlah sampel dalam setiap kelompok sebanyak 4. Seluruh sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 24 ekor.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pemeliharaan, perlakuan penelitian, dan pengambilan jaringan kulit hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pembuatan sediaan histopatologi dilakukan di

Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pengamatan kepadatan kolagen dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2017 sampai Desember 2018.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)). Pemberian dosis dibedakan menjadi empat dosis yaitu 12,5 mg, 25 mg, 50 mg dan 100 mg.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah tingkat kesembuhan luka. Tingkat kesembuhan luka diperoleh melalui penilaian profil histopatologis kepadatan kolagen kulit hewan coba.

3.5.3 Variabel Luar

Variabel luar dibedakan menjadi dua yaitu variabel yang dapat dikendalikan dan variabel yang tidak dapat dikendalikan. Variabel luar dalam penelitian ini sebagai berikut.

a. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah galur, jenis kelamin, berat badan hewan coba, umur hewan coba, pemeliharaan hewan coba, asupan makanan hewan coba, cara pembuatan fraksi air umbi bidara upas, tingkat stress hewan coba akibat perlakuan yang diberikan, dosis pemberian streptozotocin, dan dosis pemberian dextrose.

b. Variabel Tak Terkendali

Variabel tak terkendali dalam penelitian ini adalah imunitas hewan coba.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Pengukuran	Hasil Ukur	Skala Data
1.	Fraksi umbi bidara upas	Sediaan pekat yang diperoleh dari fraksinasi air dari ekstrak etanol umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.)). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi yang dimodifikasi dengan metode <i>ultrasound-assisted solvent extraction</i> dengan pelarut etanol 70% dilanjutkan dengan proses fraksinasi dengan pelarut air menggunakan metode fraksinasi cair – cair (Prameswari, 2017). Fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas diadministrasikan secara topikal setiap 2 hari sekali dengan 4 dosis yang berbeda yaitu 12,5 mg, 25 mg, 50 mg dan 100 mg.	Neraca analitik	1. Dosis 1 (12,5 mg) 2. Dosis 2 (25 mg) 3. Dosis 3 (50 mg) 4. Dosis 4 (100 mg)	Nominal
2.	Kepadatan kolagen	Kepadatan kolagen adalah persentase serabut kolagen yang berwarna biru pada pengecatan spesifik kolagen yaitu pengecatan <i>Masson's Trichome</i> (Chen <i>et al.</i> , 2017). Pengamatan kepadatan kolagen dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang dan pengambilan gambar dilakukan dengan bantuan alat optilab yang telah dihubungkan pada komputer. Data kuantitatif kepadatan kolagen didapatkan dengan mengolah gambar menggunakan <i>software</i> ImageJ untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen.	<i>Software</i> ImageJ	Persentase kepadatan kolagen	Rasio

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat untuk ekstraksi dan fraksinasi yaitu *blender*, *maserator*, *rotavapor*, *freeze dryer*, timbangan gram kasar, timbangan analitik, pengaduk, corong buchner, *beaker glass*, tabung mikrosentrifuga, *centrifuge* dan lemari es untuk penyimpanan fraksi.
- b. Alat untuk pemeliharaan tikus yaitu kandang bak plastik, tempat minum, tempat makan, penutup kandang yang terbuat dari kawat dan kasa.
- c. Alat untuk pembuatan tikus diabetik yaitu spuit injeksi 1 cc, pengaduk, dan *beaker glass*.
- d. Alat untuk pemeriksaan glukosa darah tikus (*glucocheck*).
- e. Alat untuk pembuatan luka eksisi tikus diabetik yaitu alat-alat bedah (*minor set*) dan stempel luka 2 x 2 cm.
- f. Alat untuk pengambilan jaringan kulit yaitu alat-alat bedah (*minor set*) dan wadah jaringan.
- g. Alat untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan Masson's Trichrom rak pengecatan, pipet pastour, tissue, kassa, *cover glass*, *object glass*, *staining jar*.
- h. Alat untuk pengamatan preparat histopatologi kulit yaitu mikroskop, kamera / optilab dan laptop.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

- a. Bahan untuk pemeliharaan tikus adalah pakan turbo dan sekam kering.
- b. Bahan untuk pembuatan fraksi air umbi bidara upas adalah simplisia umbi bidara upas, etanol 70% dan *aquadest*.
- c. Bahan untuk pembuatan tikus diabetik adalah streptozotocin (STZ), buffer sitrat dan dextrose 10%.

- d. Bahan untuk pemeriksaan glukosa darah tikus adalah strip reagen *fluidtest* glukosa darah.
- e. Bahan untuk anestesi tikus adalah xyla dan ketamine.
- f. Bahan untuk terminasi tikus dan pengambilan jaringan adalah eter dan formalin 10%.
- g. Bahan pembuatan preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan Masson Trichrome adalah xylol, alcohol, *aquadest*, *methyl blue*, *acetic acid 1%*, *acid fuchsin*, *phosphomolybdic acid*.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas

Pembuatan ekstrak etanol umbi bidara upas menggunakan teknik *ultrasound assisted solvent extraction*. Umbi bidara upas sebanyak 10 kg dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dioven pada suhu 60° C. Kemudian dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak sehingga diperoleh serbuk simplisia. Simplisia bidara upas sebanyak 1 kg diekstraksi dengan *ultrasonic* menggunakan etanol 70% sebanyak 5 L (perbandingan 1:5) selama 1 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 1 jam, filtrat hasil diambil dengan penyaringan menggunakan corong buchner. Residu diekstraksi ulang dengan menggunakan *ultrasonic* sebanyak satu kali dengan cara yang sama lalu disaring. Pemekatan filtrat dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikentalkan dengan penguapan diatas *water bath* sehingga didapatkan ekstrak etanol umbi bidara upas kental (Lampiran 3.1).

3.8.2 Pembuatan Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas

Sebanyak 120 gr ekstrak kental etanol umbi bidara upas ditambah dengan 240 ml akuades dan diaduk hingga homogen lalu dimasukkan ke dalam corong pisah. Pada campuran ekstrak dan air ini ditambahkan n-heksana 360 mL (perbandingan 1:3) dan dikocok kuat selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan n-heksana terpisah sempurna (lapisan n-heksana pada bagian atas dan

lapisan air dibagian bawah). Lapisan air dikeluarkan melalui kran bawah. Tahap ini diulang 2 kali.

Pada lapisan air ditambahkan 360 mL etil asetat kemudian dimasukkan ke corong pisah dan dikocok 2-5 menit lalu didiamkan. Lapisan etil asetat berada dibagian atas, sedangkan lapisan air dibagian bawah dikeluarkan melalui kran bawah. Tahapan ini diulang 2 kali. Lapisan air dipekatkan dengan menggunakan *freeze dryer* lalu dipisahkan dari residu ekstrak etanol yang tidak larut air. Hasil *freeze drying* inilah yang dinamakan fraksi air ekstrak umbi bidara upas (Lampiran 3.1).

3.8.3 Adaptasi Hewan Coba

Hewan coba (*Rattus norvegicus* galur wistar) sebanyak 24 ekor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasikan dalam kandang terpisah selama satu minggu untuk menghindari stres. Alas kandang, tempat pakan, tempat minum, sisa pakan, dan kotoran tikus dibersihkan setiap dua hari sekali untuk menghindari timbulnya penyakit.

3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba sejumlah 24 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 4 tikus. Pembagian kelompok tikus dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Pembagian kelompok hewan coba

Nama Kelompok	Jenis Perlakuan
Kelompok kontrol negatif ($C_{(-)}$)	Pemberian <i>aquadest</i> secara topikal pada luka
Kelompok kontrol positif ($C_{(+)}$)	Pemberian gentamicin 0,1% secara topikal pada luka
Kelompok perlakuan 1 (T_1)	Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 12,5 mg secara topikal pada luka
Kelompok perlakuan 2 (T_2)	Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 25 mg secara topikal pada luka
Kelompok perlakuan 3 (T_3)	Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 50 mg secara topikal pada luka
Kelompok perlakuan 4 (T_4)	Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 100 mg secara topikal pada luka

3.8.5 Penginduksian Streptozotocin

Hewan coba yang telah diadaptasi dan dibagi menjadi 6 kelompok diinduksi streptozotocin secara intraperitoneal dengan dosis 40 mg/kgBB dalam 0,05 M buffer sitrat. Pasca induksi streptozotocin, sebanyak 50 ml dextrose 10% diberikan pada masing-masing hewan coba selama 24 jam.

3.8.6 Pemeriksaan Kadar Gula Darah

Kadar gula darah diperiksa dengan menggunakan darah hewan coba yang diperoleh melalui pemotongan ujung ekor hewan coba sepanjang $\pm 0,5$ cm lalu diperiksa dengan menggunakan alat *glucocheck*. Dikatakan DM bila kadar gula darah tikus ≥ 200 mg/dl. Pemeriksaan gula darah dilakukan untuk mengetahui hewan coba masih dalam kondisi diabetes sampai penelitian ini selesai. Pemeriksaan kadar gula darah acak (GDA) hewan coba dilakukan setiap seminggu sekali selama penelitian. Pemeriksaan pertama dilakukan pada hari ke 7 penelitian atau sehari sebelum induksi streptozotocin (STZ), selanjutnya pemeriksaan dilakukan pada minggu pertama sampai dengan minggu ke 3 pasca induksi STZ.

3.8.7 Pembuatan Luka Eksisi

Hewan coba selanjutnya dibuat luka menggunakan metode Morton dan Malon yang telah dimodifikasi. Tikus dibius dengan ketamin dosis 80 mg/kgBB dan xylazine 10 ml/kgBB secara intramuskular, kemudian diletakkan di atas papan bedah dengan posisi telungkup dan keempat kaki diikat. Rambut di sekitar punggung kiri tikus dicukur, kemudian dibersihkan dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%. Diberi stempel 2 x 2 cm agar luka yang dihasilkan seragam ukurannya. Kulit dieksisi *fullthickness* dengan pinset dan digunting di daerah tersebut sampai bagian subkutan beserta jaringan ikat di bawahnya.

3.8.8 Pemberian Fraksi Ekstrak Bidara Upas

Hewan coba diberi perlakuan setelah satu hari pemberian luka (jika terdapat infeksi berupa munculnya pus atau luka basah maka hewan coba tidak bisa digunakan dalam penelitian ini). Setelah diberikan perlakuan, kandang ditutup dengan kasa menggunakan kasa untuk menghindari lalat yang hinggap pada luka. Luka tidak ditutup dengan kasa dan plester untuk mencegah terjadinya luka baru bila kasa diangkat. Perlakuan diberikan tiap 2 hari sekali selama 10 hari.

3.8.9 Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan luka dilakukan pada hari ke 10. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba dibius hingga mati dengan menggunakan kloroform. Kemudian dieksisi untuk diambil jaringan kulit yang luka dan disimpan dalam botol jaringan berisi buffer formalin.

3.8.10 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dengan menggunakan pewarnaan Masson's Trichrome. Pewarnaan ini spesifik untuk kolagen yang akan memberikan warna biru pada serabut kolagen. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Teknik pembuatan preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan Masson's Trichrome adalah sebagai berikut:

a. Fiksasi

Jaringan kulit dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam phospat buffer salin pada pH 7,0) selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai jaringan dimasukkan dalam larutan akuades selama 1 jam agar larutan fiksasi hilang.

b. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan akan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan kedalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam, kemudia larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

c. Impregnasi

Pemotongan jaringan lalu dimasukkan dalam paraffin cair selama 2 x 24 jam, setelah itu masuk pada tahap pengeringan. Preparat yang telah disimpan dalam bentuk parafin tahan hingga 5 tahun dengan penyimpanan yang benar yakni disimpan ditempat yang kering atau dalam lemari es.

d. Deparafinisasi

Panaskan preparat pada oven selama 10 menit, sebelum deparafinisasi. Lalu setelah itu dilakukan proses deparafinisasi.

e. Pewarnaan dengan Masson's Trichrome

Jaringan ditetesi larutan neutral red 0,5% selama 5 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dibilas dengan aquadest. Selanjutnya, jaringan ditetesi larutan acid fuchsin selama 5 menit dan dicuci dengan aquadest selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan ditetesi larutan phosphomolybdic acid selama 5 menit, kelebihan larutannya dibuang. Selanjutnya, jaringan ditetesi larutan methyl blue selama 2-5 menit dan dicuci dengan menggunakan aquadest selama 5 menit. Larutan terakhir yang diberikan pada jaringan ini yaitu tetesan acetic acid 1% selama 2 menit dilanjutkan dengan dehidrasi dengan alkohol. Selanjutnya dilakukan *clearing* dan *mounting* dengan kanada balsam (Lampiran 3.2).

3.8.11 Pengamatan Kepadatan Kolagen

Pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *camera / optilab* dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen (Chen *et al.*, 2017).

3.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS. Analisis yang digunakan adalah uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *lavene's test*. Apabila diperoleh sebaran data normal

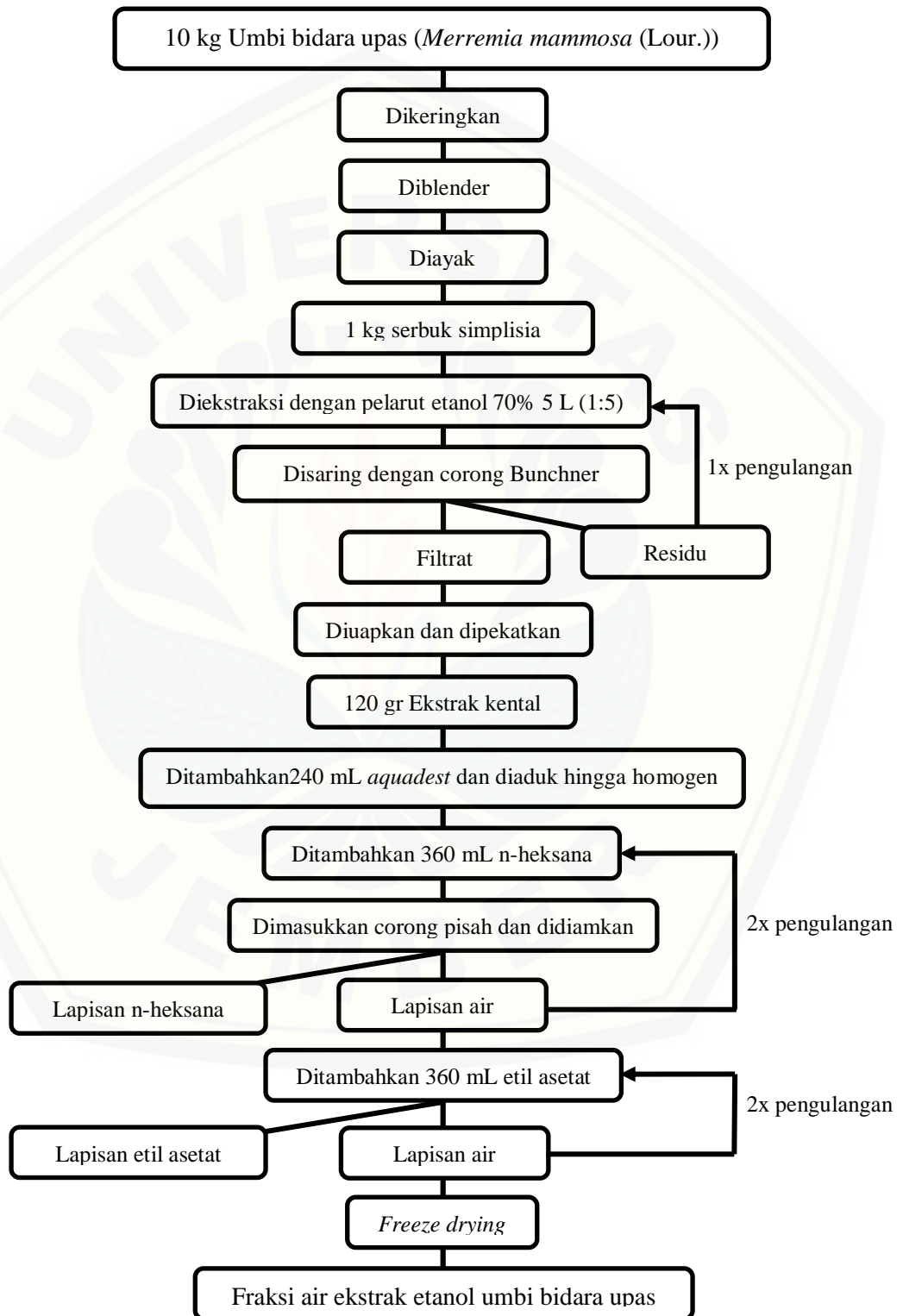
($p > 0,05$) digunakan analisis data *One Way Anova* kemudian untuk menilai perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc LSD*. Jika sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) digunakan analisis data menggunakan *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan bermakna pada tiap kelompok. Perbedaan kelompok bermakna jika nilai $p < 0,05$.



3.10 Alur Penelitian

3.10.1 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas

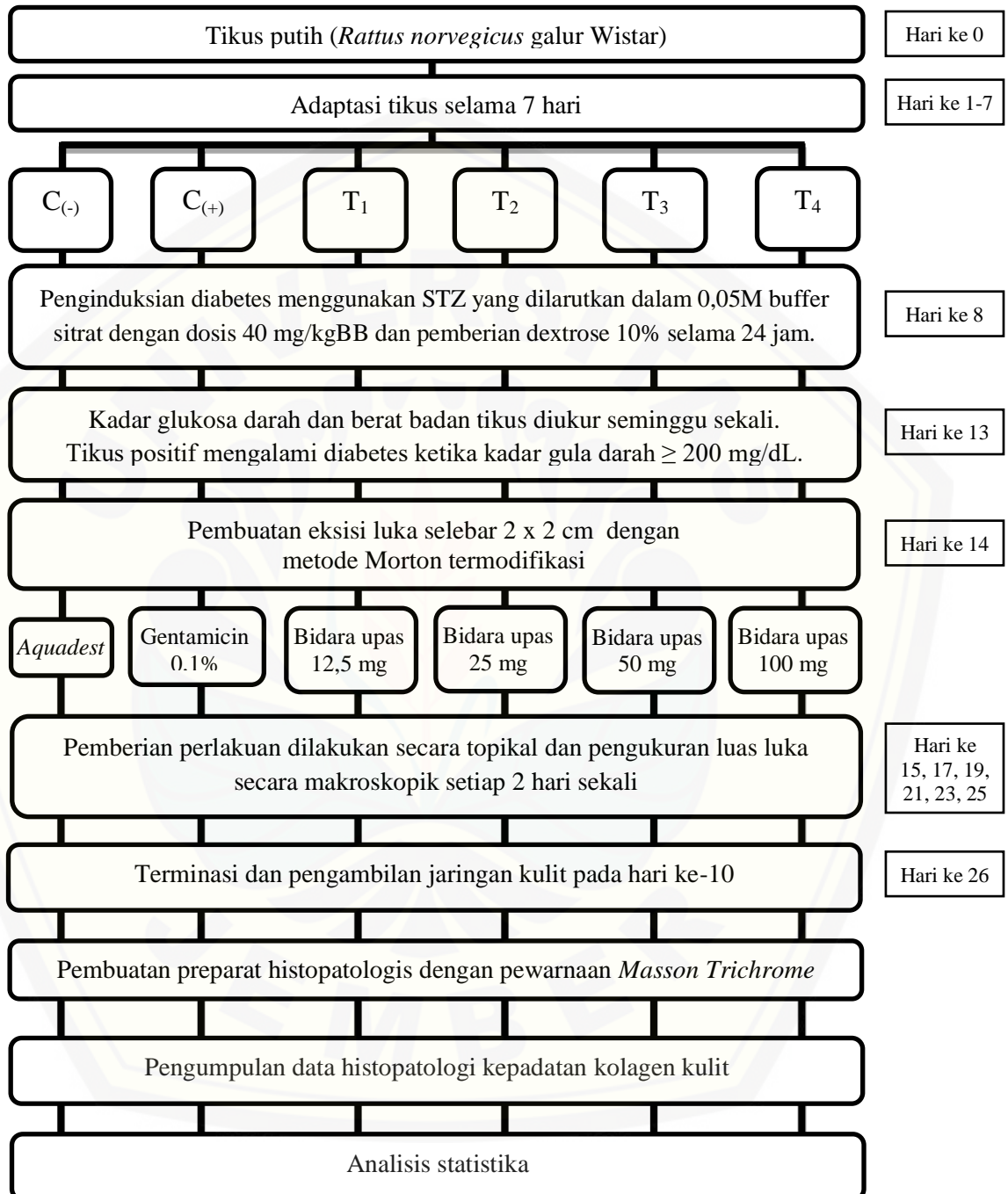
Skema pembuatan fraksi air bidara upas dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3. 2 Skema pembuatan fraksi air ekstrak umbi bidara upas

3.10.2 Perlakuan pada Hewan Coba

Skema perlakuan pada hewan coba dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3. 3 Skema perlakuan pada hewan coba

3.10.3 *Timeline* Penelitian

Timeline kegiatan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.3 berikut.

Tabel 3. 3 *Timeline* penelitian

No.	Bulan	Agenda Kegiatan
1.	Maret – April 2017	Proses ekstraksi dan fraksinasi umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.)).
2.	Juli – Agustus 2017	Perlakuan pada hewan coba dan terminasi.
3.	September 2017	Pembuatan preparat histopatologi sampai dengan tahap parafinisasi.
4.	Oktober 2018	Proses deparafinisasi dan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan Masson's Trichrome.
5.	November – Desember 2018	Pengumpulan data histopatologi kepadatan kolagen dan analisis statistika.

DAFTAR PUSTAKA

- Agil, M, Purwitasai, N, Sugianto, N.E dan Widyowati, R. 2010. Uji Daya Hambat *Mycobacterium tuberculosis* dari Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall). Laporan penelitian Universitas Airlangga. Tersedia di <http://elib.pdii.lipi.go.id>
- Agoes, A. 2010. Tanaman Obat Indonesia Edisi 2. Jakarta: Salemba Medika.
- American Diabetes Association. 2018. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes - 2018. Amerika. Tersedia di <https://doi.org/10.2337/dc18-S010>
- Asdar, A. 2016. Pengaruh Propolis terhadap Kolagenisasi pada Proses Penyembuhan Luka Subkutan Punggung Mencit yang Diinduksi Bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Dentomaxillofacial Science 1(1): 11-19.
- Astuti, Y. 2010. Efek Pemberian Per Oral Infusa Daun Sirih Merah (*Piper cf. fragile*, Beth.) Terhadap Penyembuhan Luka Tikus Putih Jantan yang Dibuat Diabetes. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I. and Veves, A., 2014. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Advances in therapy*, 31(8), pp.817-836.
- Chen, Y., Yu, Q. and Xu, C.B., 2017. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int J Clin Exp Med*, 10(10), pp.14904-14910.
- Childs, D dan Murthy, A. 2017. Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America* 97(1): 189-207.
- Cho, H., Blatchley, M.R., Duh, E.J dan Gerecht, S., 2018. Acellular and cellular approaches to improve diabetic wound healing. *Advanced drug delivery reviews*.
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., dan Lamb, A. J. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.
- Damasceno, D., Netto, A., Iessi, I., Gallego, F., Corvino, S., Dallaqua, B., Sinzato, Y., Bueno, A., Calderon, I dan Rudge, M. 2014. STZ-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. *BioMed Research International* (2014): 1-11.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), pp.1736-1743.

- Farizal, J. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) Terhadap Proliferasi Limfosit Dan Produksi Roi Makrofag Studi Eksperimental Infeksi Salmonella Typhimurium pada Mencit Balb. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Goud, B.J., Dwarakanath, V dan Chikka, B.K., 2015. STZ-a diabetogenic agent in animal models. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research* 3(1): 253-269.
- Goyal, S., Reddy, N., Patil, K., Nakathe, K., Ojha, S., Patil, C dan Agrawal, Y. 2016. Challenges And Issues With STZ-Induced Diabetes A Clinically Relevant Animal Model To Understand The Diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions* 244: 49-63.
- Guo, S dan DiPietro, L.A. 2010. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of dental research* 89(3): 219-229.
- Hidayat, F., Elfiah, U dan Sofiana, K. 2015. Perbandingan Jumlah Makrofag pada Luka Eksisi *Full Thickness* antara Pemberian Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour)) dengan NaCl pada Tikus Wistar Jantan. *Artikel Ilmiah Penelitian Mahasiswa*: 1-4.
- International Diabetes Federation. 2017. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition 2017. Tersedia di www.diabetesatlas.org
- Julianto, I., U. Elfiah dan K.D Sofiana. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour)) terhadap Proses Penyembuhan Luka dan Kadar Gula Darah pada Tikus Wistar Jantan Hiperglikemi. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*: 1-4.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Pusat Data dan Informasi Kesehatan Republik Indonesia. Tersedia di www.depkes.go.id
- Kitagawa, I., Baek, N.I., Kawashima, K., Yokokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K. dan Shibuya, H., 1996. Indonesian medicinal plants. XV. Chemical structures of five new resin-glycosides, merremosides a, b, c, d, and e, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 44(9), pp.1680-1692.
- Kitagawa, I., Ohashi, K., Baek, N.I., Sakagami, M., Yoshikawa, M. dan Shibuya, H., 1997. Indonesian medicinal plants. XIX. Chemical structures of four additional resin-glycosides, mammosides A, B, H1, and H2, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 45(5), pp.786-794.
- Kurniasih, T. 2014. Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall.f) secara Topikal pada Mencit Betina Galur Swiss Terinduksi Karagenin. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.

- Lefrancois, T., Mehta, K., Sullivan, V., Lin, S, dan Glazebrook, M. 2017. Evidence Based Review of literature on Detriments to Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Foot and Ankle Surgery* 23(4): 215-224.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and STZ-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2): 216-226.
- Li, P. and Wu, G., 2018. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino acids*, 50(1), pp.29-38.
- Madiseh, M.R., Tehrani, A.M., Bahmani, M, dan Kopaei, M.R. 2016. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016: 1-7.
- Marchianti, A., Ulfa, E dan Sakinah, E. 2018. The Dose Dependence Analysis of the Water Fraction of *Merremia mammosa* (lour.) Extract on Diabetic wound Healing Enhancement. *Hiroshima J. Med. Sci* (67): 29-34.
- Mazni, R. 2008. Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Chois) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Echerichia coli* serta BSLT. Skripsi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Murti, D., Salim, N dan Sabri, M. 2017. Efektifitas Salep Getah Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L) Pada Fase Epitelisasi Penyembuhan Luka Sayat Kulit Mencit (*Mus Musculus*) Dengan Pewarnaan Masson Trichrome. *JIMVET* 01(3): 465-472.
- Novriansyah, R. 2008. Perbedaan Kepadatan Kolagen Disekitar Luka Insisi Tikus Wistar yang Dibalut dengan Kasa Konvensional dan Penutup Oklusif Hidrokolloid Selama 2 dan 14 Hari. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Nurlitasari. 2011. Efek Pemberian secara Oral Kombinasi Infusa Daun Sirih Merah (*Piper Cf. Fragile*, Benth.) Dan Herba Pegagan (*Centella Asiatica*, (L.) Urb) terhadap Penyembuhan Luka Tikus Putih Jantan yang Dibuat Diabetes. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Okonkwo, U dan DiPietro, L. 2017. Diabetes and Wound Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), p.1419.
- Paiva, L., de Alencar Cunha, K., Santos, F., Gramosa, N., Silveira, E. dan Rao, V. 2002. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. *Phytotherapy Research* 16(8): 737-739.
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia. 2015. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. Jakarta: PB PERKENI.

- Prameswari, M. 2017. Pengaruh Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa Lour*) Terhadap Penyembuhan Luka Pada Penderita Diabetes. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Ramasastry, S. 2005. Acute Wounds. *Clinics in Plastic Surgery* 32(2): 195-208.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. (2009). Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8(3), 229–235.
- Ratnadewi, A., Lilik, D., Jainur, R., Susilowati., Ari, S dan Tri, A. 2018. Revealing anti-diabetic potency of medicinal plants of Meru Betiri National Park, Jember – Indonesia. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Rizka, A., Budipramana, V dan Fauziah, D. 2012. Kepadatan Kolagen Tipe I pada Luka Operasi Tikus Wistar yang Mengalami Anemia Karena Perdarahan Akut. *Journal of Emergency* 1(1).
- Sakinah, E., Ulfa, E dan Marchianti, A. 2018. The Effectiveness of *Merremia mammosa* (Lour.) Extract Fractions as Diabetic Wound Healers on Diabetic Rat Model. *Hiroshima J. Med. Sci* (67): 70-77.
- Sugijanto, NE, Widyowati, R dan Agil, M. 2012. Fraksinasi dan Uji daya hambat Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari Ekstrak n-heksana dan methanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall). Laporan penelitian Universitas Airlangga. Tersedia di <http://elib.pdii.lipi.go.id>.
- Tango, V. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Kulit Delima pada Penyembuhan Luka Split Thickness Kulit Tikus. *Tesis*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Tracy, L.E., Minasian, R.A. and Caterson, E.J., 2016. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in wound care*, 5(3), pp.119-136.
- Tripathi, V dan J, Verma. 2014. Different Models Used To Induce Diabetes: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(6).
- Veza, T., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M., Rodríguez-Cabezas, M. and Galvez, J., 2016. Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. *Nutrients*, 8(4), p.211
- Wijaya, M. C., G. M. Sari, dan D. Tinduh. 2017. Hyperglycemia Caused Reduction Of Cortical Bone Thickness In Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Bali Medical Journal* 6 (1): 161-163.
- World Health Organization. 2016. Global Reports in Diabetes. Tersedia di www.who.int.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Protap ekstraksi dan fraksinasi umbi bidara upas

TEKNOLOGI TEPAT GUNA

Teknologi tepat guna yang dapat dihasilkan dari penelitian ini yaitu tentang cara pembuatan ekstrak dan fraksi air bidara upas (*M. mammosa*)

1. Teknologi Pembuatan Ekstrak *M. mammosa*

Pembuatan ekstrak dapat dilakukan melalui berbagai metode diantaranya maserasi atau perendaman dan perkolasi atau pengaliran larutan pengektak secara kontinyu dan ultrasonikasi. Untuk mendapatkan ekstrak bidara upas berkualitas dengan kandungan berberin tinggi perlu mempertimbangkan bahan (simplisia), metode ekstraksi dan pelarut pengektaksi. Prosedur pembuatan ekstrak dan fraksi air bidara upas sebagai berikut :

PROSEDUR TETAP	
PEMBUATAN EKSTRAK ETANOL <i>M. mammosa</i>	
1. PERSIAPAN	
1.1.	Dipersiapkan bahan yang diperlukan yaitu : <ul style="list-style-type: none"> a. Simplisia Umbi bidara upas 1 kg (Umbi bidara upas basah 5-10 kg) b. Etanol 70% 10 L (7,292 L Etanol 96% + 2,708 L akuades)
1.2.	Alat – alat yang diperlukan : <ul style="list-style-type: none"> a. Alat penggiling b. Tangki perendaman c. Ultrasonic bath d. Rotary evaporator e. Waterbath
2. PEMBUATAN EKSTRAK <i>Merremia mammosa</i>	
2.1.	Umbi bidara upas segar yang telah tua dipotong potong dan dikeringkan dengan diangin-anginakan atau dioven suhu 60 °C
2.2.	Umbi bidara upas yang telah kering dihaluskan dengan blender
2.3.	Serbuk bidara upas sebanyak 1 kg diekstraksi dengan ultasonic menggunakan etanol 70% 5 L. (perbandingan 1: 5) selama 1 jam dengan sesekali diaduk
2.4.	Setelah 1 jam, filtrat hasil diambil dengan penyaringan menggunakan corong

- buchner. Hati-hati jangan sampai ada serbuk bidara upas yang lolos.
- 2.5. Residu di ekstraksi kembali dengan ultasonik menggunakan etanol 70% sebanyak 5 l. selama 1 jam dengan sesekali diaduk.
 - 2.6. Filtrat diambil dengan penyaringan menggunakan buchner dan digabungkan dengan filtrat sebelumnya.
 - 2.7. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan rotaryevaporator sehingga didapatkan ekstrak etanol. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan penguapan diatas water bath sehingga didapat ekstrak etanol kental
 - 2.8. Ekstrak ditimbang dan difraksinasi
- 3. PASCA PELAKSANAAN**
- 3.1. Setelah selesai, semua alat dicuci dan ditiriskan hingga kering.
 - 3.2. Alat selanjutnya disimpan pada rak penyimpanan.

2. Tenologi Pembuatan Fraksi Air Bidara Upas

PROSEDUR TETAP

PEMBUATAN FRAKSI AIR *M. mammosa*

4. PERSIAPAN

4.1. Dipersiapkan bahan yang diperlukan yaitu :

- c. Ekstrak Etanol Kental Bidara Upas
- d. N heksana
- e. Akuades
- f. Etil asetat

4.2. Alat –alat yang diperlukan :

- a. Corong pisah
- b. Erlenmeyer
- c. Rotary evaporator
- d. Waterbath

5. PEMBUATAN FRAKSI AIR BIDARA UPAS


- 5.1. Ekstrak etanol kental sebanyak 120 g ditambah dengan 240 mL akuades dan diaduk hingga tercampur, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah


- 5.2. Ke dalam campuran ekstrak dan air ditambahkan n-heksana 360 ml. (perbandingan 1 : 3) dan dikocok kuat selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan n heksana dan air terpisah sempurna. Lapisan n heksana (bagian atas diambil) melalui lubang atas setelah lapisan air dikeluarkan melalui kran bawah. Tahap ini diulang dua kali.
- 5.3. Lapisan n heksana dikumpulkan dan disimpan jika diperlukan (fraksi n heksana)
- 5.4. Sisa lapisan air diukur volumenya dan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambah dengan etil asetat perbandingan 1:3.
- 5.5. Campuran dikocok kuat selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan etil asetat dan air terpisah sempurna. Lapisan etil asetat (bagian atas diambil) melalui lubang atas setelah lapisan air dikeluarkan melalui kran bawah. Tahap ini diulang dua kali.
- 5.6. Lapisan etil asetat dikumpulkan dan disimpan jika diperlukan (fraksi etil asetat), sedangkan lapisan air di pekatkan dengan freeze drying setelah dipisahkan dari residu ekstrak etanol yang tidak larut air.
- 5.7. Hasil freeze drying (fraksi air bidara upas) ditimbang dan digunakan untuk formulasi dan uji lainnya. Ekstrak etanol yang tidak larut dalam n heksana, etil asetat dan air disebut fraksi tidak larut dan tidak digunakan untuk penelitian ini.

6. PASCA PELAKSANAAN

- 3.3. Setelah selesai, semua alat dicuci dan ditiriskan hingga kering.
- 3.4. Alat selanjutnya disimpan pada rak penyimpanan.

Lampiran 3.2 Protap pembuatan preparat histopatologi

	<p style="text-align: center;">PROSEDUR TETAP PEWARNAAN MASSON TRICHROME DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMI FK UNAIR</p>
<p style="text-align: center;">PENGERTIAN</p>	<p>Suatu teknik pewarnaan dengan acid fuchsin dan methyl blue, otot bergaris berwarna merah dan Collagen biru.</p>
<p style="text-align: center;">TUJUAN</p>	<p>Sebagai acuan penerapan langkah-langkah untuk melakukan pewarnaan Masson Trichrome.</p>
<p style="text-align: center;">PROSEDUR</p>	<p>A. TATA LAKSANA Persiapan :</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Panaskan preparat pada oven selama 10 menit, sebelum deparafinisasi. b. Lakukan persiapan alat-alat dan bahan yang akan digunakan. c. Lakukan deparafinisasi. <p>Prosedur :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Teteskan larutan Nuetral Red 0,5% selama 5 menit. 2. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit. 3. Bilas dengan aquadest. 4. Teteskan dengan larutan Acid Fuchsin selama 5 menit. 5. Cuci dengan aquadest selama 5 menit. 6. Teteskan larutan Phosphomolybdic acid selama 5 menit. 7. Buang kelebihan larutan tersebut. 8. Teteskan larutan Methyl blue selama 2-5 menit. 9. Cuci dengan aquadest selama 5 menit. 10. Teteskan larutan Acetic acid 1% selama 2 menit. 11. Lakukan dehidrasi dengan alkohol. 12. Clearing. 13. Mounting.

	PROSEDUR TETAP PEWARNAAN MASSON TRICHROME DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMI FK UNAIR
	<p>B. ALAT DAN BAHAN</p> <p>Alat :</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Rak pengecatan▪ Pipet pastour▪ Tissue▪ Kassa▪ Cover glass▪ Obyek glass <p>Staining jar</p> <p>Bahan :</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Xylol▪ Alkohol▪ Aquadest▪ Methyl blue▪ Acetic acid 1%▪ Acid fuchsin▪ Phosphomolybdic acid <p>C. FAKTOR PENYULIT</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Bahan untuk pengecatan jelek/kadaluarsa <p>D. TENAGA</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Petugas patologi anatomi▪ Teknisi patologi anatomi

Lampiran 3.3 Surat keterangan persetujuan etik

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 APPROVAL
Nomor : 1.134 /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 :

PENGEMBANGAN FRAKSI EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa Lour*) SEBAGAI SEDIAAN GEL PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK

Nama Peneliti Utama : dr. Ancah Caesarina Novi M,Ph.D
Name of the principal investigator

NIDN : 0009038206

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 12 Juni 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK



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 : (255/H25.1.11/KE/2018

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 :

EFEKTIVITAS FRAKSI AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa (Lour.)*) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN PADA LUKA TIKUS DIABETES

Nama Peneliti Utama : Gusfita Trisna Ayu Putri
Name of the principal investigator

NIM : 152010101038

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 30 - 11 - 2018
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)

Review Proposal :

1. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
2. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan fraksi air ekstrak umbi bidaran upas agar didapatkan kadar yang diinginkan.
3. Penginduksian STZ secara intraperitoneal dilakukan oleh orang yang terampil.
4. Perlakuan pembuatan luka pada tikus diabetes dilakukan oleh orang yang terampil (dilakukan secara cepat dan tepat agar tidak melukai hewan coba)
5. Mohon diperhatikan oleh peneliti kemungkinan infeksi yang terjadi, selama pembuatan luka dan selama perlakuan, hewan coba harus bebas dari nyeri (nyeri karena perlakuan, nyeri karena infeksi) yang dapat menjadi bias pada penelitian ini.
6. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan preparat histo PA Jaringan kulit agar didapatkan sediaan yang memenuhi syarat pembacaan
7. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.



Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian


dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 23 November 2018

Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

Lampiran 3.4 Surat rekomendasi bebas plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Kalimantan 1/37 Kampus Tegal Boto, Telp. (0331) 337877, Fax (0331) 324446
Jember 68121.

REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 10 /H25.1.11/KBSI/2018

Komisi bimbingan Skripsi dan Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi yang berjudul :

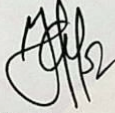
EFEKTIVITAS FRAKSI AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.)) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN PADA LUKA TIKUS DIABETES

Nama Penulis : Gusfita Trisna Ayu Putri
NIM. : 152010101038
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan “**BEBAS PLAGIASI**”

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 26 Desember 2018
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah
Ketua,



Dr., dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

Lampiran 3.5 Dokumentasi kegiatan penelitian

a) Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Umbi Bidara Upas

1. Penimbangan simplisia umbi bidara upas



2. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70%



3. Ekstraksi dengan metode *ultrasound*



4. Penyaringan dengan corong Bunchner



5. Pemekatan fraksi dengan *rotary evaporator*



6. Hasil ekstraksi dan fraksinasi umbi bidara upas



b) Perlakuan pada Hewan Coba

1. Perisapan kandang hewan coba



2. Penutup kandang dengan kasa



3. Pemeriksaan berat badan hewan coba



4. Pemeriksaan gula darah hewan coba



5. Induksi diabetes dengan STZ



6. Pemberian dextrose 10%



7. Obat anestesi hewan coba



8. Persiapan pembuatan luka



9. Proses pembatan eksisi luka 2 x 2 cm



10. Luka eksisi *fullthickness* 2 x 2 cm



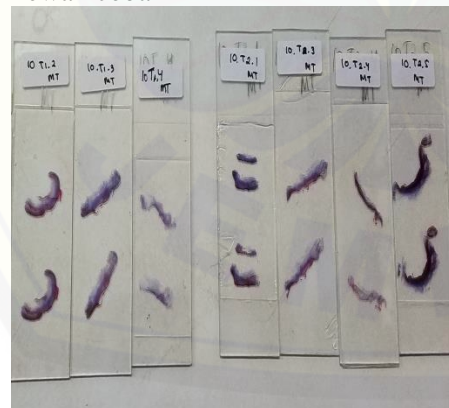
11. Terminasi dan pengambilan jaringan kulit



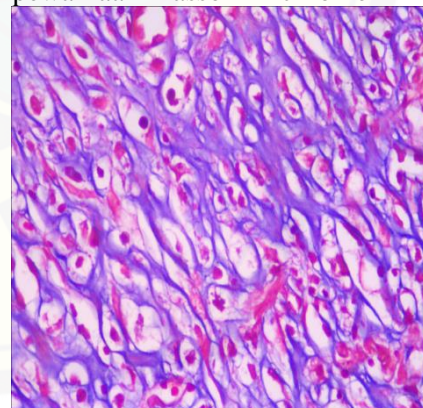
12. Penyimpanan jaringan dalam buffer formalin



13. Preparat histopatologi jaringan kulit hewan coba

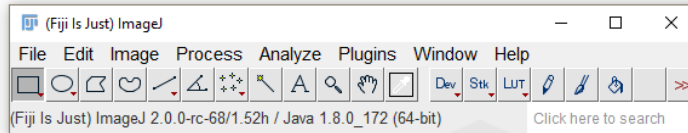
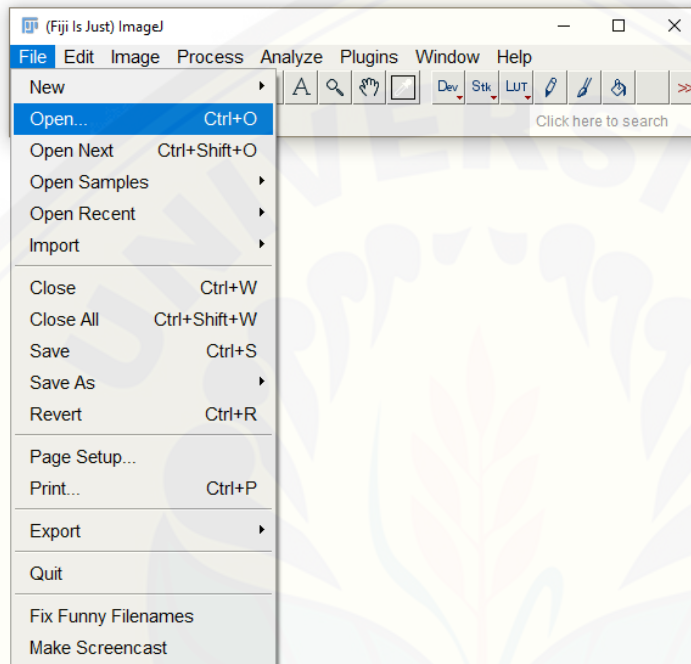


14. Gambaran kolagen dengan pewarnaan Masson Trichrome

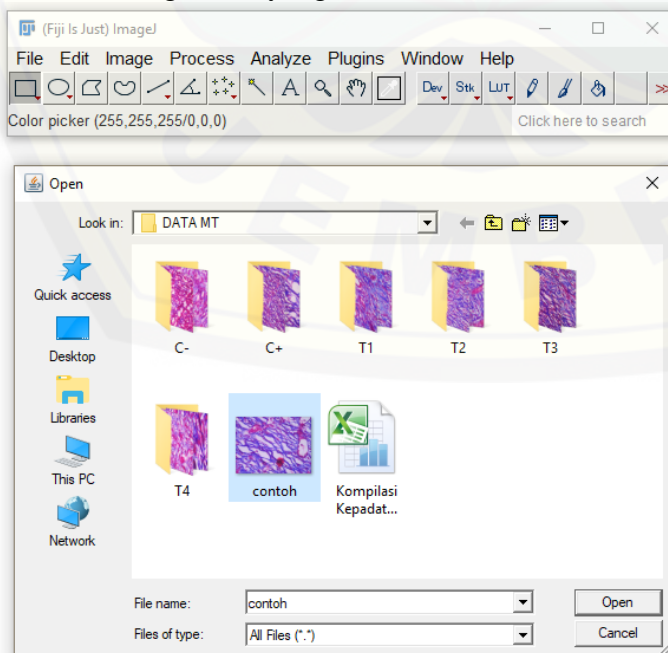


Lampiran 3.6 Cara analisis kolagen dengan menggunakan ImageJ

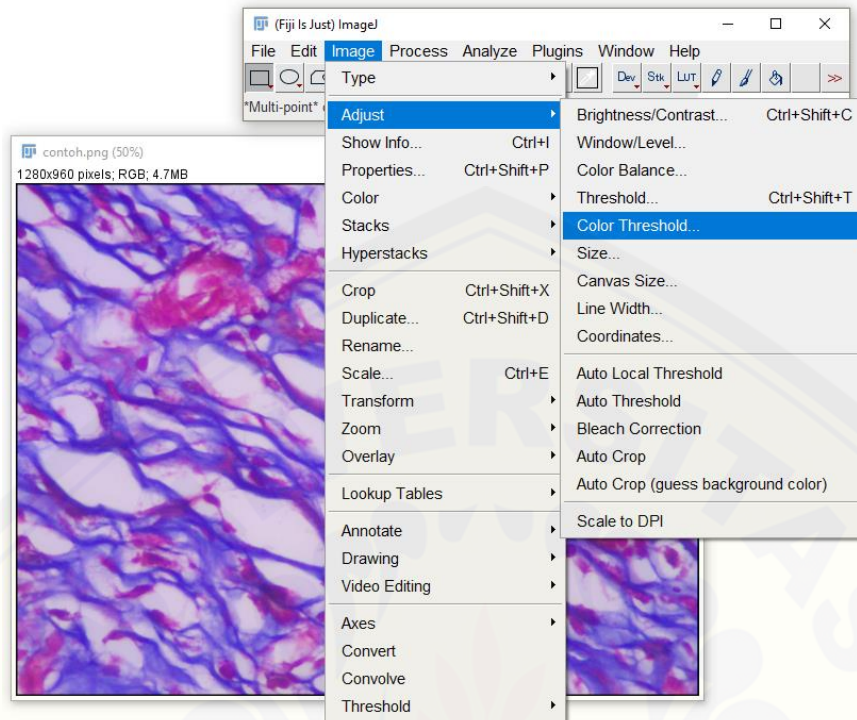
1. Buka aplikasi ImageJ

2. Pilih menu *File* > *Open*

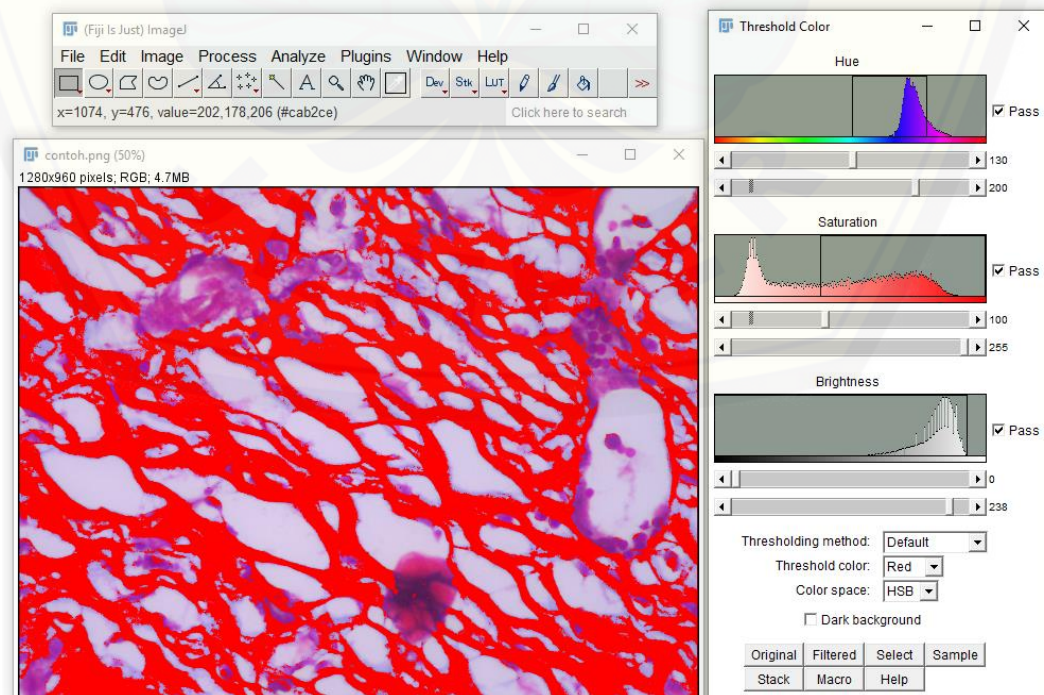
3. Pilih file gambar yang akan dianalisis



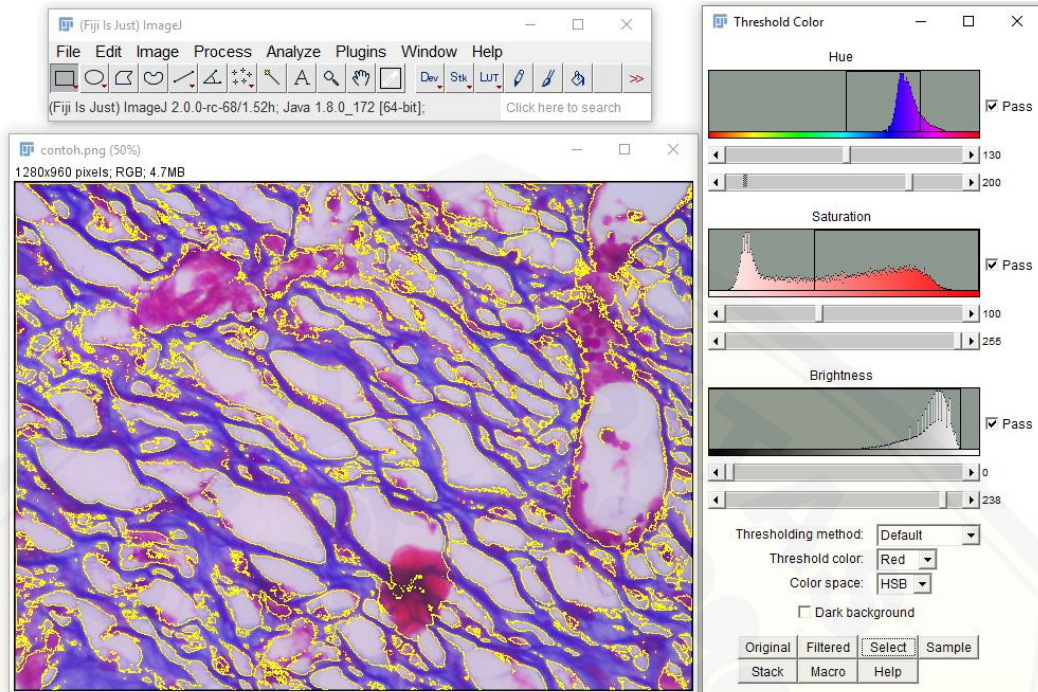
4. Pilih menu *Image > Adjust > Color threshold*



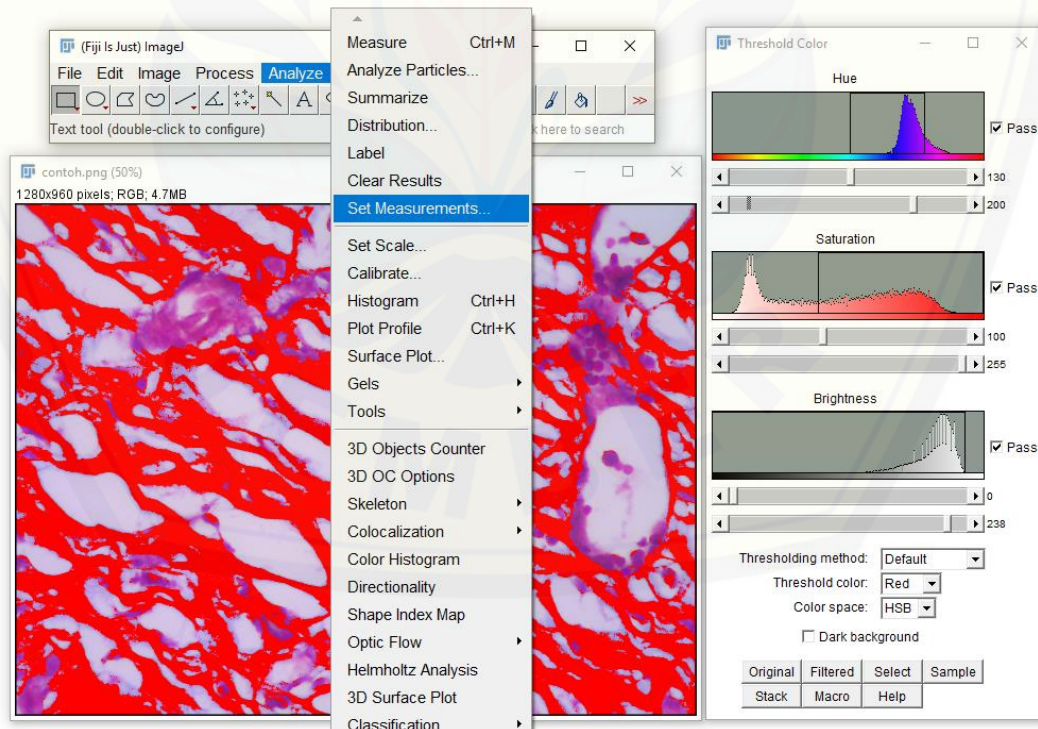
5. Pilih *thresholding method: default, thresholding color: red* dan *color space: HSB (Hue, Saturation, Brightness)* > batasi spectrum warna yang akan ditandai dengan memilih warna biru (serabut kolagen terpulus warna biru pada pengecatan Masson's Trichrome) pada kolom *Hue* (antara 130-200) > atur *Brightness* hingga maksimal (238) > fokuskan pemilihan warna biru dengan mengatur *Saturation* (100-255)



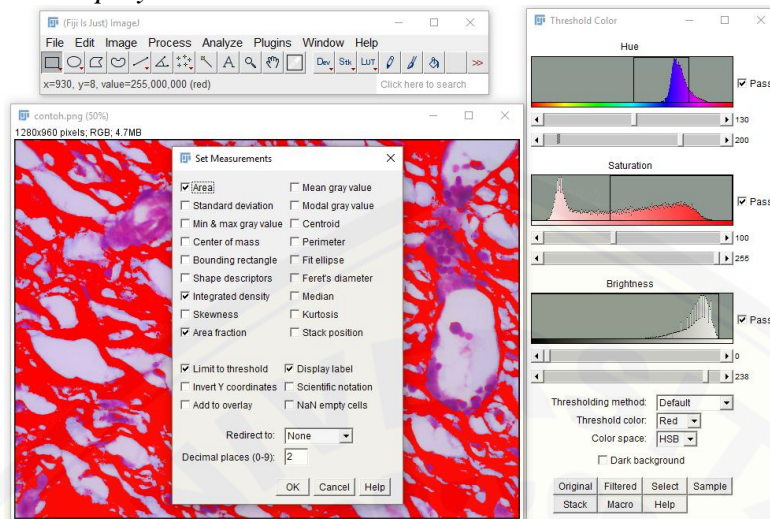
6. *Preview* gambar untuk memastikan semua warna biru telah ditandai dengan klik *select* pada kolom *threshold color*



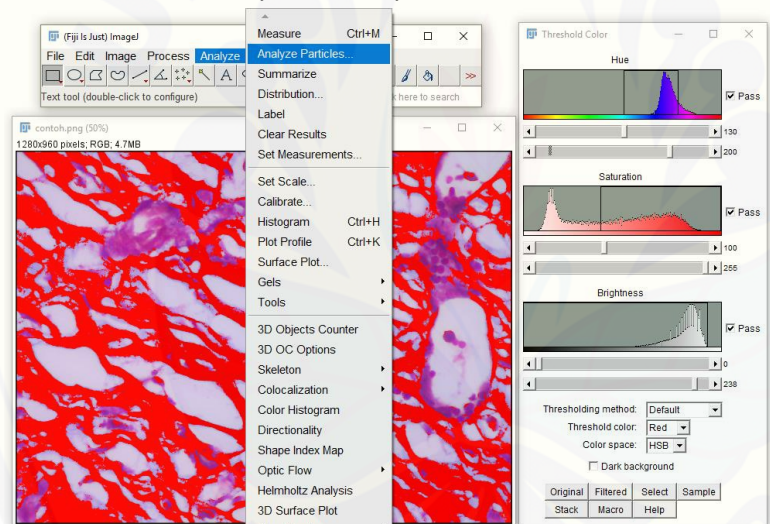
7. Pilih menu *Analyze > Set Measurement*



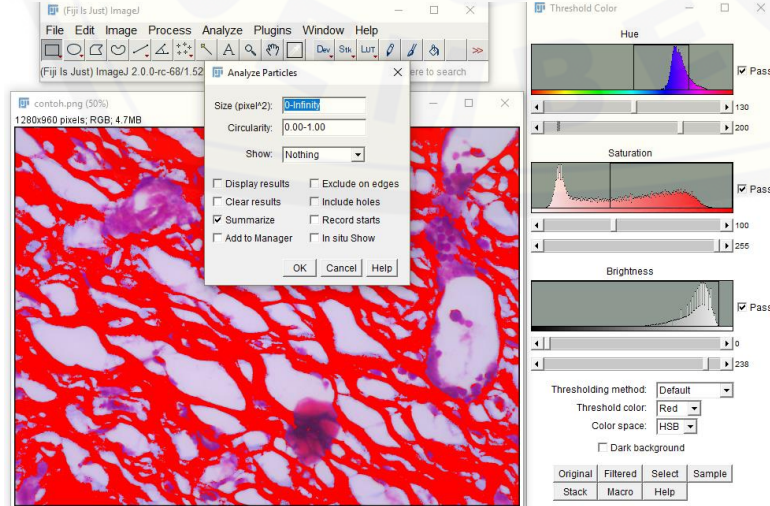
8. Tandai *Area*, *Integrated Density*, *Area Fraction*, *Limit to Threshold* dan *Display Label*



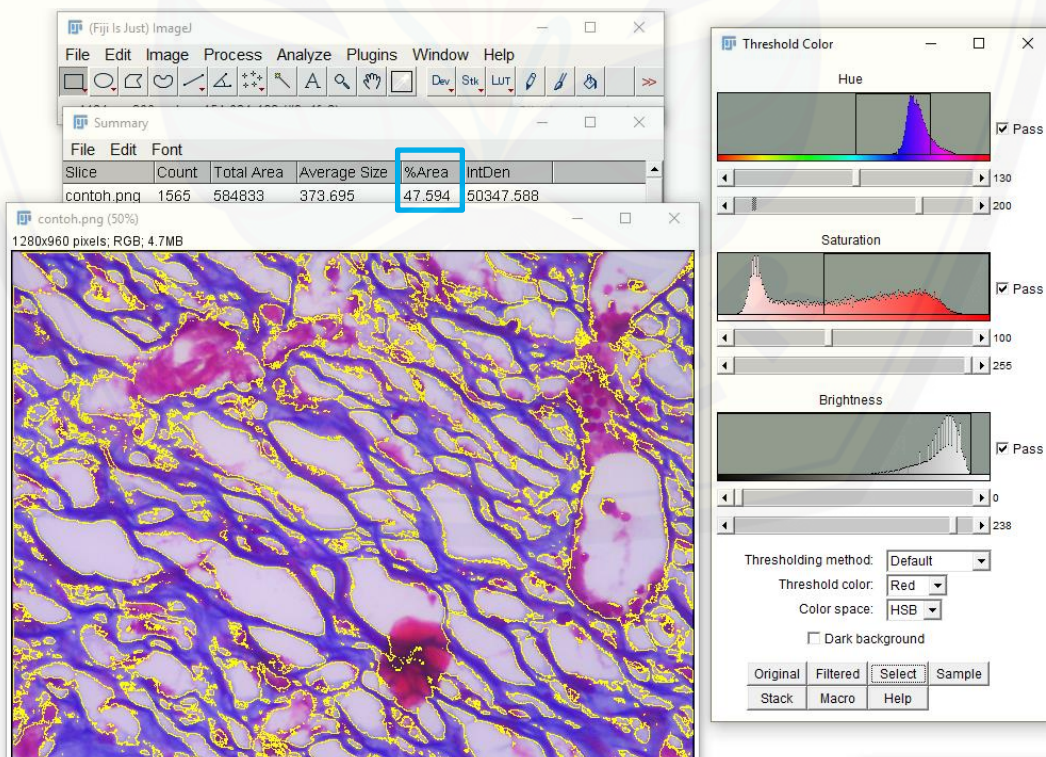
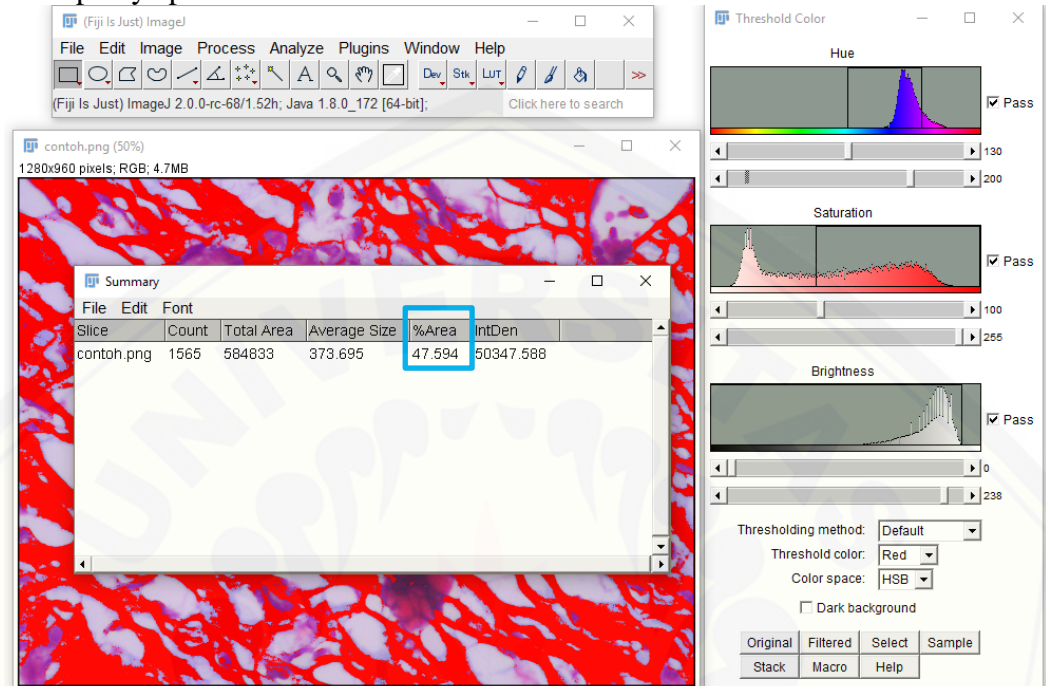
9. Pilih menu *Analyze > Analyze Particles*



10. Tandai *Summarize* > OK



11. Persentase kepadatan kolagen diketahui dengan menghitung *area* yang terpulas warna biru pada gambar histopatologi dengan pengecatan Masson's Trichrome. Persentase kepadatan kolagen ditunjukkan pada tabel *Summary* tepatnya pada kolom *%Area*.



Lampiran 4.1 Data berat badan dan kadar gula darah hewan coba

No.	Hewan Coba	Berat Badan (gram)	Kadar Gula Darah Acak (mg/dL)			
			Pre-induksi STZ (Hari ke 7)	Post-induksi STZ (Hari ke 13)	Post-induksi STZ (Hari ke 20)	Post-induksi STZ (Hari ke 26)
1	C-1	178	116	288	207	204
2	C-2	154	119	414	481	530
3	C-4	199	108	570	514	496
4	C-5	172	135	221	211	203
5	C+1	152	158	476	306	208
6	C+2	150	180	517	467	575
7	C+3	171	158	200	211	203
8	C+4	176	162	230	220	202
9	T1.1	191	110	202	200	200
10	T1.2	153	129	235	233	210
11	T1.3	186	158	216	209	208
12	T1.4	177	111	521	433	570
13	T2.1	171	162	204	201	200
14	T2.3	152	153	370	403	514
15	T2.4	158	125	567	599	419
16	T2.5	181	139	323	323	567
17	T3.1	175	115	369	266	218
18	T3.2	190	110	364	359	254
19	T3.3	162	104	319	346	482
20	T3.4	150	91	570	541	504
21	T4.1	167	71	227	216	204
22	T4.2	191	59	213	203	201
23	T4.3	160	55	203	201	200
24	T4.4	169	91	421	381	498
Rata-Rata GDA			121,625	343,333	321,708	336,25

Lampiran 4.3 Uji statistik persentase penyembuhan luka

Test of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kepadatan Kolagen	.143	24	.200*	.958	24	.406

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kepadatan Kolagen	Based on Mean	.512	5	18	.763
	Based on Median	.328	5	18	.890
	Based on Median and with adjusted df	.328	5	12.833	.887
	Based on trimmed mean	.488	5	18	.781

ANOVA

Kepadatan_Kolagen

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5327.542	5	1069.508	22.187	.000
Within Groups	867.678	18	48.204		
Total	621.221	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kepadatan_Kolagen

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif (C-)	Kontrol Positif (C+)	-22.6273500*	4.9093969	.000	-32.941610	-12.313090
	Perlakuan 1 (T1)	-29.3178500*	4.9093969	.000	-39.632110	-19.003590
	Perlakuan 2 (T2)	-26.1766000*	4.9093969	.000	-36.490860	-15.862340
	Perlakuan 3 (T3)	-41.2348500*	4.9093969	.000	-51.549110	-30.920590
	Perlakuan 4 (T4)	-46.5612500*	4.9093969	.000	-56.875510	-36.246990
Kontrol Positif (C+)	Kontrol Negatif (C-)	22.6273500*	4.9093969	.000	12.313090	32.941610
	Perlakuan 1 (T1)	-6.6905000	4.9093969	.190	-17.004760	3.623760
	Perlakuan 2 (T2)	-3.5492500	4.9093969	.479	-13.863510	6.765010
	Perlakuan 3 (T3)	-18.6075000*	4.9093969	.001	-28.921760	-8.293240
	Perlakuan 4 (T4)	-23.9339000*	4.9093969	.000	-34.248160	-13.619640
Perlakuan 1 (T1)	Kontrol Negatif (C-)	29.3178500*	4.9093969	.000	19.003590	39.632110
	Kontrol Positif (C+)	6.6905000	4.9093969	.190	-3.623760	17.004760
	Perlakuan 2 (T2)	3.1412500	4.9093969	.530	-7.173010	13.455510
	Perlakuan 3 (T3)	-11.9170000*	4.9093969	.026	-22.231260	-1.602740
	Perlakuan 4 (T4)	-17.2434000*	4.9093969	.002	-27.557660	-6.929140

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Perlakuan 2 (T2)	Kontrol Negatif (C-)	26.1766000*	4.9093969	.000	15.862340	36.490860
	Kontrol Positif (C+)	3.5492500	4.9093969	.479	-6.765010	13.863510
	Perlakuan 1 (T1)	-3.1412500	4.9093969	.530	-13.455510	7.173010
	Perlakuan 3 (T3)	-15.0582500*	4.9093969	.007	-25.372510	-4.743990
	Perlakuan 4 (T4)	-20.3846500*	4.9093969	.001	-30.698910	-10.070390
Perlakuan 3 (T3)	Kontrol Negatif (C-)	41.2348500*	4.9093969	.000	30.920590	51.549110
	Kontrol Positif (C+)	18.6075000*	4.9093969	.001	8.293240	28.921760
	Perlakuan 1 (T1)	11.9170000*	4.9093969	.026	1.602740	22.231260
	Perlakuan 2 (T2)	15.0582500*	4.9093969	.007	4.743990	25.372510
	Perlakuan 4 (T4)	-5.3264000	4.9093969	.292	-15.640660	4.987860
Perlakuan 4 (T4)	Kontrol Negatif (C-)	46.5612500*	4.9093969	.000	36.246990	56.875510
	Kontrol Positif (C+)	23.9339000*	4.9093969	.000	13.619640	34.248160
	Perlakuan 1 (T1)	17.2434000*	4.9093969	.002	6.929140	27.557660
	Perlakuan 2 (T2)	20.3846500*	4.9093969	.001	10.070390	30.698910
	Perlakuan 3 (T3)	5.3264000	4.9093969	.292	-4.987860	15.640660

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