



**EFEKTIVITAS GEL FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa (Lour.)*) TERHADAP EKSPRESI
VEGF PADA PENYEMBUHAN LUKA
DIABETIK DERAJAT 2**

SKRIPSI

Oleh

**Nurin Kamila S.P.
NIM 152010101056**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**EFEKTIVITAS GEL FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa (Lour.)*) TERHADAP EKSPRESI
VEGF PADA PENYEMBUHAN LUKA
DIABETIK DERAJAT 2**

SKRIPSI

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

Oleh:

**Nurin Kamila S.P.
NIM 152010101056**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya serta Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi panutan bagi saya;
2. Mama Susilowati, papa Suwandi, dan kakakku Fikroturrofiah tercinta yang selama ini senantiasa memberikan motivasi dan doa agar menjadi pribadi yang baik di dunia dan di akhirat;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertaqwa;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

“dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?”

(Terjemahan Q.S. Asy-Syuara' ayat 7) *)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: CV Penerbit Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurin Kamila S.P.

NIM : 152010101056

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: “Efektivitas Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) terhadap Ekspresi VEGF pada Penyembuhan Luka Diabetik Derajat 2” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi lain, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 16 Januari 2019

Yang menyatakan,

Nurin Kamila S.P.
NIM 152010101056

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS GEL FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa (Lour.)*) TERHADAP EKSPRESI
VEGF PADA PENYEMBUHAN LUKA
DIABETIK DERAJAT 2**

Oleh

Nurin Kamila S.P.
NIM 152010101056

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektivitas Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas *Merremia mammosa* (Lour.) terhadap Ekspresi VEGF pada Penyembuhan Luka Diabetik Derajat 2” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 16 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

dr. Hairrudin, M.Kes
NIP. 19751011 200312 1 008

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP. 19700214 199903 2 001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D
NIP. 19820309 200812 2 002

dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A
NIP. 19770625 200501 1 002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

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

RINGKASAN

Efektivitas Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) terhadap Ekspresi VEGF pada Penyembuhan Luka Diabetik Derajat 2; Nurin Kamila Suwandi Putri, 152010101056; 2019; 79 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Kondisi hiperglikemi pada penderita DM yang tidak terkontrol dalam waktu lama menyebabkan pembuluh darah mengalami gangguan fungsi dan perubahan struktur sehingga suplai darah ke jaringan tidak tercukupi. Kondisi ini meningkatkan risiko terjadinya komplikasi, salah satunya luka diabetik. Perawatan luka diabetik yang selama ini diberikan yaitu pemberian obat topikal neomisin. Obat topikal tersebut memiliki efek samping dan penggunaan antibiotik topikal dalam waktu lama menyebabkan reksi alergi berat. Obat topikal luka diabetik juga belum komprehensif mengandung aktivitas antiinflamasi, antioksidan, dan antibakteri. Obat alternatif lain dibutuhkan dalam perawatan luka diabetik yaitu gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*).

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok yang diberi gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dengan *gelling agent* HPMC, karbopol, dan Na-CMC. Jenis penelitian ini yaitu *true experimental laboratories* dengan rancangan *post test only control group design*. Populasi yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* dan sampel dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah sampel dihitung menggunakan *resource equation* yaitu 20 ekor tikus dibagi menjadi dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Variabel bebas penelitian ini yaitu jenis *gelling agent* dalam gel fraksi air umbi bidara upas yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC sedangkan variabel terikat yaitu ekspresi VEGF pada luka diabetik kulit tikus sediaan histopatologi dengan pewarnaan imunohistokimia.

Penelitian ini dilakukan selama 24 hari yang diawali dengan adaptasi tikus selama 7 hari, induksi DM, pemeriksaan gula darah acak (GDA), pemberian luka eksisi, pemberian perlakuan masing-masing kelompok yaitu K- menggunakan

aquades, K+ menggunakan neomisin dan ekstrak placenta, dan tiga kelompok perlakuan, T1, T2, T3, dengan gel fraksi air umbi bidara upas menggunakan *gelling agent* HPMC, karbopol, dan Na-CMC. Terminasi tikus dilakukan pada hari ke 24, kulit tikus diambil dan dilakukan pembuatan preparat histopatologi dengan pengecatan imunohistokimia (IHK).

Ekspresi VEGF terpulas warna coklat pada lapang pandang. Penghitungan ekspresi VEGF menggunakan metode kuantitatif. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Olympus CX21LED perbesaran 400x pada lima lapang pandang kemudian diolah menggunakan *software imageJ*. Ekspresi VEGF dihitung menggunakan skor histologi dengan mengalikan persentase area dengan intensitas warna yang terpulas coklat pada lapang pandang.

Hasil pengamatan ekspresi VEGF didapatkan nilai rata-rata pada K- 29,91%, K+ 48,19%, T1 55,52%, T2 53,97%, dan T3 56,81%. Hasil analisis statistik data didapatkan $p < 0,05$ yang berarti memiliki perbedaan yang bermakna. Hasil uji *post hoc LSD* menunjukkan nilai $p < 0,05$ pada K- terhadap K+, T1, T2, dan T3 yang berarti berbeda signifikan antar kelompok. K+ tidak berbeda signifikan terhadap T1, T2, dan T3 dengan nilai $p > 0,05$. T1 terhadap K+, T2, dan T3 dengan nilai $p > 0,05$ yang berarti tidak berbeda signifikan antar kelompok. T2 tidak berbeda signifikan terhadap K+, T1, dan T3 dengan nilai $p > 0,05$. T3 dengan nilai $p > 0,05$ terhadap K+, T1, dan T2 yang berarti tidak berbeda signifikan antar kelompok.

Kesimpulan dari hasil penelitian yaitu tidak terdapat perbedaan signifikan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok yang diberi gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dengan *gelling agent* HPMC, karbopol, dan Na-CMC. Kelompok Na-CMC memiliki ekspresi VEGF yang lebih tinggi dari HPMC dan karbopol. Perbedaan ekspresi VEGF tetapi tidak signifikan juga didapatkan pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok HPMC, karbopol, Na-CMC dan K+. Kelompok K+ memiliki ekspresi VEGF yang lebih rendah dari kelompok gel fraksi air umbi bidara upas.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas *Merremia mammosa* (Lour.) terhadap Ekspresi VEGF pada Penyembuhan Luka Diabetik Derajat 2”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A selaku Pembimbing Utama dan Pembimbing Anggota yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam membimbing penulisan skripsi ini;
2. dr. Hairrudin, M.Kes dan dr. Enny Suswati, M.Kes sebagai dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si dan Bu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt terimakasih atas bantuan yang diberikan selama penelitian;
4. Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuan yang diberikan selama ini;
6. Orang tua tercinta; papa Suwandi dan mama Susilowati, kakak Fikroturrofiah yang selalu mendoakan, mendukung, dan memberikan kasih sayang tak terhingga kepada penulis;
7. Mbak Lilik selaku analis Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Bu Wahyu selaku analis Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi yang telah membantu dalam penelitian ini;

8. Rekan kerja saya, Mizan Maulana, Deuxy Wahyuliswari, Haqiqotul Fikriyah, dan Gusfita Trisna yang telah membantu dan selalu memberikan bantuan, dorongan, serta semangat selama penelitian;
9. Teman-teman angkatan 2015, *coccyx* tercinta yang telah berjuang bersama-sama dalam meraih gelar Sarjana Kedokteran;
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan, dukungan, dan kebersamaan selama ini;

Besar harapan penulis bila segenap pembaca memberikan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat. Amin.

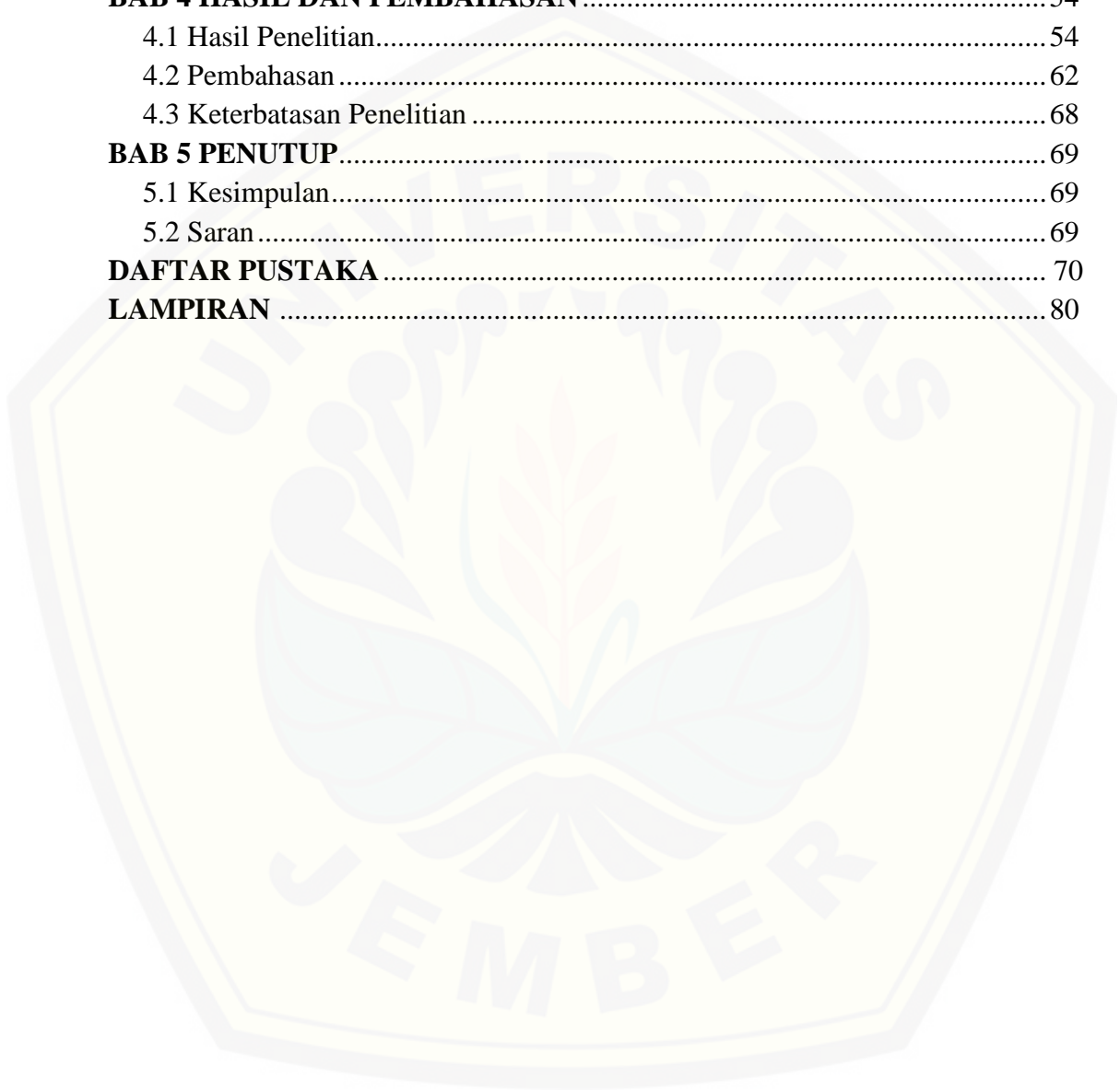
Jember, Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PEREMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Diabetes Melitus.....	7
2.2 Luka Diabetik	10
2.3 Proses Penyembuhan Luka.....	13
2.4 Model Tikus Diabetes Melitus	16
2.5 Umbi Bidara Upas	19
2.6 Ekstraksi dan Fraksinasi.....	20
2.7 Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas.....	24
2.8 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	27
2.9 Imunohistokimia (IHK).....	30
2.10 Kerangka Teori Penelitian.....	34
2.11 Kerangka Konsep Penelitian	35
2.12 Hipotesis	36
BAB 3 METODE PENELITIAN	37
3.1 Jenis Penelitian	37
3.2 Rancangan Penelitian	37
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	39
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	40
3.5 Variabel Penelitian	40

3.6 Definisi Operasional.....	41
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	42
3.8 Prosedur Penelitian.....	43
3.9 Analisis Data	47
3.10 Alur Penelitian.....	48
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	54
4.1 Hasil Penelitian.....	54
4.2 Pembahasan	62
4.3 Keterbatasan Penelitian	68
BAB 5 PENUTUP.....	69
5.1 Kesimpulan.....	69
5.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	80



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Luka Diabetik UT	11
Tabel 2.2 Klasifikasi Luka Diabetik Wagner-Meggitt.....	11
Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian	41
Tabel 3.2 Formula Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas	45
Tabel 4.1 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i> Glukosa Darah	56
Tabel 4.2 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Glukosa Darah hari ke-13.....	56
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Glukosa Darah hari ke-24.....	56
Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Ekspresi VEGF	57
Tabel 4.5 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i> dan Uji Homogenitas <i>Lavene</i> Ekspresi VEGF	60
Tabel 4.6 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Ekspresi VEGF.....	60
Tabel 4.7 Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> Ekspresi VEGF	61

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman Bidara Upas	19
Gambar 2.2 Kerangka Teori Penelitian.....	34
Gambar 2.3 Kerangka Konsep Penelitian	35
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian	37
Gambar 3.2 Skema Proses Ekstraksi Umbi Bidara Upas.....	48
Gambar 3.3 Skema Prosedur Fraksinasi Umbi Bidara Upas	49
Gambar 3.4 Skema Prosedur Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas.....	50
Gambar 3.5 Skema Prosedur Penelitian	51
Gambar 3.6 Skema Prosedur Pembuatan Preparat IHK.....	52
Gambar 3.7 Skema Prosedur Perhitungan Ekspresi VEGF dengan <i>Software ImageJ</i>	53
Gambar 4.1 Grafik Hasil Pengukuran Glukosa Darah.....	55
Gambar 4.2 Grafik Hasil Pengamatan Ekspresi VEGF	58
Gambar 4.3 Pengamatan Imunohistokimia Kulit Tikus.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Lembar Persetujuan Etik	80
B. Dokumentasi Penelitian	82
C. Data Penelitian	85
D. Analisis Data	89
E. Gambaran Makroskopis Luka, Imunohistokimia, dan Ekspresi VEGF Melalui <i>Software ImageJ</i>	92
F. Langkah Penghitungan Ekspresi VEGF dengan <i>Software ImageJ</i>	93
G. Rekomendasi Bebas Plagiasi	96

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik dengan karakteristik kenaikan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemi) akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak mampu menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif (World Health Organization, 2016). DM memiliki dua kategori utama yaitu tipe 1 dan tipe 2. Diabetes melitus tipe 1 ditandai oleh kurangnya produksi insulin akibat faktor herediter, infeksi virus, atau kelainan autoimun yang menyebabkan kerusakan sel beta pankreas. Diabetes melitus tipe 2 disebabkan penggunaan insulin oleh tubuh yang kurang efektif atau disebut resistensi insulin, salah satunya akibat obesitas/*overweight* (Kemenkes RI, 2014).

Menurut International Diabetes Federation (IDF) 2017, terdapat 425 juta orang yang menderita DM di dunia pada tahun 2017 dan diperkirakan akan meningkat menjadi 629 juta orang di tahun 2045. IDF juga memperkirakan 4 juta orang usia 20-79 tahun meninggal akibat DM di tahun 2017, yang setara dengan satu orang meninggal setiap delapan detik. Penyakit metabolik ini menyumbang 10,7% antara penyebab kematian lain pada rentang usia tersebut. Indonesia menempati peringkat ke-enam dengan jumlah penderita diabetes sebanyak 10,3 juta dan diperkirakan mengalami peningkatan menjadi 16,7 juta di tahun 2045. Penderita DM di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,1% di tahun 2007 menjadi 2,1% di tahun 2013 (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013).

Diabetes dikenal dengan *silent killer* karena penyakit ini berdampak pada semua organ tubuh dan penderita sering tidak menyadari penyakitnya hingga telah terjadi komplikasi. Hiperglikemi pada penderita DM yang tidak terkontrol dengan baik dalam waktu lama akan menyebabkan pembuluh darah mengalami gangguan fungsi dan perubahan struktur sehingga suplai darah ke jaringan tidak tercukupi. Kondisi ini yang meningkatkan risiko terjadinya komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular. Komplikasi yang terjadi pada 54% penderita DM yaitu neuropati (Kemenkes RI, 2014). Neuropati mengawali terjadinya luka diabetik pada

penderita DM, neuropati menyebabkan sensasi proteksi menghilang sehingga rentan terhadap trauma fisik dan termal yang tidak diketahui secara dini. Iskemi akibat penurunan sirkulasi jaringan pada kaki menghambat proses penyembuhan luka hal ini membuat kuman dapat masuk ke luka dan terjadi infeksi. Infeksi tersebut tidak teratasi dengan baik akibat penurunan infiltrasi leukosit sehingga berkembang menjadi ulkus berlanjut menjadi gangren dan risiko amputasi menjadi lebih besar (Nurlitasari, 2011; Waspadji, 2015). Perawatan penderita DM menyangkut luka diabetik sebanyak 111 pasien di RSCM pada tahun 2010-2011. Angka kematian sebesar 16% dan angka amputasi 25% (Sitompul *et al.*, 2015). Penderita DM pasca amputasi sebanyak 14,3% meninggal dalam setahun dan sebanyak 37% meninggal 3 tahun pasca amputasi (Waspadji, 2015).

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks dan dinamis, terjadi melalui beberapa fase yaitu fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Penyembuhan luka pada penderita DM lebih lama dibandingkan penderita bukan diabetes karena fase inflamasi yang memanjang. Perawatan luka dilakukan untuk mengurangi terjadinya infeksi dan amputasi, memperbaiki fungsi dan kualitas hidup, dan mengurangi biaya pemeliharaan kesehatan. Prinsip perawatan luka modern yaitu mempertahankan lingkungan luka tetap lembab. Kondisi lembab pada lingkungan luka diperlukan untuk memfasilitasi proses penyembuhan luka yaitu mempertahankan kehilangan cairan jaringan, mendukung pergerakan epitel, mempercepat pembentukan *growth factor*, mempercepat invasi neutrofil, makrofag, monosit dan limfosit ke arah luka, dan menurunkan risiko infeksi (Sinno dan Prakash, 2013; Handayani, 2016). Perawatan luka diabetik yang selama ini diberikan yaitu obat topikal antibiotik neomisin (Mahtas, 2018). Katzung *et al.* (2012) menyebutkan penggunaan topikal neomisin dalam jangka waktu yang lama menimbulkan reaksi alergi berat dan Shahbazian *et al.* (2011) juga menyebutkan penggunaan antibiotik topikal dalam waktu lama menimbulkan dermatitis alergi. Obat topikal luka diabetik saat ini belum mengandung bahan komprehensif antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, dan pro-angiogenesis yang dibutuhkan dalam penyembuhan luka diabetik.

Indonesia memiliki 30.000-50.000 spesies tanaman yang 9.606 diantaranya digunakan sebagai tanaman obat dan dewasa ini penelitian mengenai tumbuhan obat tersebut telah banyak dikembangkan sesuai khasiat kandungannya (Bioteknologi LIPI, 2018). Tanaman obat yang terdapat di Taman Nasional Merubetiri Jember yaitu bidara upas. Bagian tanaman obat ini yang dikembangkan untuk perawatan luka diabetik yaitu umbi bidara upas. Pengembangan tanaman umbi bidara upas dibutuhkan dalam penyembuhan luka diabetik. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa Lour.*) mengandung senyawa flavonoid dan glikosida resin. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antiinflamasi dan pro-angiogenesis dengan mengaktifasi makrofag khususnya M2 yang menyekresi sitokin antiinflamasi dan *growth factor* pro-angiogenesis. Flavonoid juga berfungsi sebagai antioksidan dengan mengikat radikal bebas (*reactive oxygen species*) yang berlebihan. Glikosida resin berperan sebagai antibakteri dengan membuat lubang pada membran bakteri (Nafsiah *et al.*, 2015; Julianto *et al.*, 2015; Sakinah *et al.*, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Sakinah *et al.* (2018) menggunakan ekstrak etanol umbi bidara upas yang dilanjutkan dengan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan untuk menghilangkan kontaminan non aktif yang akan mempengaruhi efektifitas dari ekstrak sehingga hanya tersisa bahan aktif saja. Pada penelitian tersebut didapatkan fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa Lour.*) paling berpengaruh terhadap penyembuhan luka diabetik. Penelitian Marchianti *et al.* (2018) memperoleh hasil dosis fraksi air umbi bidara upas yang paling efektif yaitu 100 mg. Prinsip perawatan modern luka diabetik untuk mempertahankan kondisi lingkungan luka tetap lembab belum teraplikasi apabila dalam bentuk fraksi. Umbi bidara upas mengandung bahan yang komprehensif terdapat antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, dan pro-angiogenesis sehingga dibutuhkan sediaan topikal dari fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa Lour.*). Sediaan gel dipilih karena memberikan lingkungan lembab pada luka, tidak lengket, mudah dioleskan, mudah dicuci, pelepasan dan penyebaran obat lebih efektif serta tidak meninggalkan lapisan berminyak pada kulit sehingga

mengurangi risiko peradangan lebih lanjut akibat menumpuknya minyak pada pori-pori kulit (Rismana *et al.*, 2013; Maulina dan Sugihartini, 2015).

Peneliti ingin melanjutkan penelitian tersebut dengan menggunakan beberapa basis gel (*gelling agent*) yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC. *Gelling agent* tersebut digunakan karena memiliki stabilitas dan kompaktilitas yang tinggi, toksisitas rendah, dan meningkatkan waktu kontak dengan kulit sehingga meningkatkan efektifitas penggunaan gel. HPMC, karbopol, dan Na-CMC memiliki sifat yang berbeda sehingga memberikan hasil difusi obat yang berbeda dan memengaruhi penyembuhan luka diabetik (Astuti *et al.*, 2015). Gel fraksi air umbi bidara upas memiliki aktivitas antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, dan pro-angiogenesis, sehingga peneliti menggunakan obat topikal dalam bentuk sediaan gel yang mengandung neomisin dan ekstrak placenta untuk kelompok kontrol. Obat topikal gel dengan kandungan neomisin dan ekstrak placenta tersebut terbukti memiliki efek regenerasi dengan aktivitas antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, dan pro-angiogenesis sehingga dapat menjadi pembanding gel fraksi air umbi bidara upas dengan aktivitas yang sama.

Salah satu parameter untuk mengetahui penyembuhan luka diabetik adalah pengamatan secara mikroskopis terhadap jaringan kulit yaitu ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). VEGF berperan sebagai mitogen poten dari sel endotel yang menginduksi migrasi dan pertunasan sel endotel untuk pembentukan pembuluh darah baru melalui pengaturan beberapa reseptor integrin pada sel endotel. Peran VEGF dalam penyembuhan luka adalah stimulator terjadinya angiogenesis. Angiogenesis pada proses penyembuhan luka meliputi beberapa tahapan yaitu vasodilatasi, degradasi basemen membran, migrasi, proliferasi, dan maturasi sel endotel. Pertumbuhan pembuluh darah kapiler berfungsi untuk menyalurkan nutrisi dan berbagai mediator penyembuhan. Proses penyembuhan luka akan melemah bila terjadi inhibisi pada angiogenesis (Bao *et al.*, 2009). Latar belakang tersebut maka mendasari peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui efektivitas gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok yang diberi gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dengan *gelling agent* HPMC, karbopol, dan Na-CMC?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini yaitu untuk mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok yang diberi gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dengan *gelling agent* HPMC, karbopol, dan Na-CMC.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok: 1) HPMC dan karbopol; 2) karbopol dan Na-CMC; 3) Na-CMC dan HPMC
- b. mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol positif dengan: 1) HPMC; 2) Karbopol; 3) Na-CMC
- c. mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol negatif dengan: 1) HPMC; 2) Karbopol; 3) Na-CMC

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Sebagai informasi ilmiah mengenai pemberian sediaan gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dalam penyembuhan luka diabetik derajat 2.

1.4.2 Manfaat Praktis

Salah satu dasar pengembangan penelitian umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) sebagai terapi dalam penyembuhan luka diabetik derajat 2.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

2.1.1 Definisi Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemi yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Insulin merupakan hormon penting yang dihasilkan oleh sel β pankreas dan berfungsi untuk memfasilitasi ambilan glukosa ke dalam sel. Mekanisme insulin dalam pengaturan glukosa darah sangatlah penting, bila konsentrasi glukosa darah meningkat sangat tinggi, terjadi peningkatan sekresi insulin yang menyebabkan konsentrasi glukosa darah kembali menurun ke nilai normalnya. Konsentrasi glukosa darah perlu dijaga agar tidak terlalu tinggi karena alasan berikut. (1) glukosa menyebabkan sejumlah besar tekanan osmotik dalam cairan ekstrasel dan bila konsentrasi glukosa sangat meningkat mengakibatkan dehidrasi sel. (2) konsentrasi glukosa darah yang tinggi menyebabkan keluarnya glukosa dalam urin. (3) hilangnya glukosa melalui urin menimbulkan diuresis osmotik oleh ginjal sehingga mengurangi jumlah cairan tubuh dan elektrolit. (4) peningkatan kadar glukosa darah dalam jangka panjang menyebabkan kerusakan pada banyak jaringan terutama pembuluh darah (Purnamasari, 2014; Guyton dan Hall, 2014).

2.1.2 Prevalensi Diabetes Melitus

International Diabetes Federation (IDF) 2017 menyebutkan terdapat 425 juta orang yang menderita DM di dunia pada tahun 2017 dan diperkirakan akan meningkat menjadi 629 juta orang di tahun 2045. IDF juga memperkirakan 4 juta orang usia 20-79 tahun meninggal akibat DM di tahun 2017, yang setara dengan satu orang meninggal setiap delapan detik. Penyakit metabolik ini menyumbang 10,7% diantara penyebab kematian lain pada rentang usia tersebut. Indonesia menempati peringkat ke-enam dengan jumlah penderita diabetes sebanyak 10,3 juta dan diperkirakan mengalami peningkatan menjadi 16,7 juta di tahun 2045.

Penderita DM di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,1% di tahun 2007 menjadi 2,1% di tahun 2013 (Kemenkes RI.2014).

2.1.3 Klasifikasi Diabetes Melitus

Klasifikasi menurut *American Diabetes Association* (ADA) sebagai berikut.

1. DM tipe I atau disebut diabetes melitus bergantung insulin (IDDM), disebabkan destruksi sel β pankreas akibat autoimun yang mengarah pada defisiensi insulin absolut. Kerusakan sel β pankreas menurunkan produksi insulin sehingga kadar glukosa darah dalam tubuh meningkat.
2. DM tipe II atau disebut diabetes melitus tidak bergantung insulin (NIDDM), disebabkan oleh penurunan sensitivitas jaringan target terhadap insulin atau disebut resistensi insulin. Peningkatan prevalensi diabetes tipe II berkaitan terutama dengan peningkatan prevalensi obesitas yang merupakan faktor risiko terpenting pada anak dan dewasa.
3. DM Gestasional terjadi karena tubuh memproduksi hormon untuk meningkatkan nutrisi dan gula dalam peredaran darah yang membantu pertumbuhan janin, memiliki efek resistensi insulin. Tubuh mengkompensasi dengan memproduksi lebih banyak insulin. Diabetes gestasional timbul apabila ibu hamil tidak mampu memproduksi cukup insulin atau sel tubuh lebih resisten terhadap insulin.
4. DM tipe lain disebabkan karena adanya malnutrisi disertai kekurangan protein yang nyata. Jenis ini sering ditemukan di daerah tropis dan negara berkembang. Zat sianida diduga terdapat dalam singkong yang menjadi sumber karbohidrat di beberapa kawasan Asia dan Afrika berperan dalam patogenesisnya (Suyono, 2015).

2.1.4 Diagnosis

Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI) membagi alur diagnosis menjadi dua bagian besar didasarkan pada ada tidaknya gejala khas DM. Gejala khas DM yaitu poliuria, polidipsia, polifagia, dan berat badan turun tanpa sebab yang jelas. Gejala tidak khas DM yaitu lemas, kesemutan, luka yang

sulit sembuh, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi (laki-laki), dan pruritus vulva (perempuan). Pemeriksaan glukosa darah dilakukan satu kali apabila terdapat gejala khas DM untuk menegakkan diagnosis, namun apabila tidak terdapat gejala khas DM dibutuhkan dua kali pemeriksaan glukosa darah abnormal untuk menegakkan diagnosis.

Diagnosis DM juga dapat ditegakkan melalui kriteria sebagai berikut.

- a. Gejala klasik DM + glukosa plasma sewaktu >200 mg/dL
Glukosa plasma sewaktu yaitu hasil pemeriksaan sesaat pada suatu hari tanpa memperhatikan waktu makan terakhir
- b. Gejala klasik DM + glukosa plasma puasa >126 mg/dL
Puasa diartikan pasien tidak mendapat kalori tambahan minimal 8 jam
- c. Glukosa plasma 2 jam pada Toleransi Glukosa Oral/TTGO >200 mg/dL
TTGO dilakukan dengan standar WHO, menggunakan beban glukosa yang setara dengan 75 gram glukosa anhidrus yang dilarutkan ke dalam air

2.1.5 Komplikasi

Kondisi hiperglikemi pada penderita DM yang tidak terkontrol dengan baik akan menimbulkan komplikasi. PERKENI membagi komplikasi DM menjadi komplikasi akut dan kronis sebagai berikut:

a. Komplikasi akut

Komplikasi akut yang terjadi yaitu hipoglikemi dan hiperglikemi. Hipoglikemi merupakan kondisi yang ditandai kadar glukosa darah <70 mg/dL sedangkan hiperglikemi ditandai dengan kadar glukosa darah 300-600 mg/dL yang disertai gejala asidosis dan plasma keton (+) kuat disebut Ketoasidosis Diabetik (KAD), 600-1200 mg/dL dengan tanpa gejala asidosis disebut Status Hiperglikemi Hiperosmolar (SHH).

b. Komplikasi kronis

Komplikasi kronis yang dapat terjadi meliputi makrovaskular dan mikrovaskular. Komplikasi makrovaskular yaitu penyakit jantung koroner, penyakit arteri perifer, dan stroke iskemik atau stroke hemoragik.

Komplikasi mikrovaskular yaitu retinopati diabetik, nefropati diabetik, dan neuropati.

2.2 Luka Diabetik

2.2.1 Definisi dan Patofisiologi Luka Diabetik

Penderita diabetes sebesar 25% mengalami luka diabetik dan 85% diantaranya mengalami amputasi. Pada penderita diabetes luka dapat terjadi dibagian tubuh mana saja, kaki merupakan bagian utama terjadinya luka dan sulit sembuh. Kondisi ini akibat salah satu komplikasi mikrovaskular yang terjadi karena kondisi hiperglikemi yaitu neuropati. Neuropati terjadi pada sensorik, motorik, dan autonom. Neuropati sensorik menyebabkan sensasi proteksi menghilang sehingga rentan terhadap trauma fisik dan termal terutama pada ekstremitas. Luka yang terjadi sering kali tidak diketahui secara dini sehingga luka tidak ditangani dan menjadi infeksi. Neuropati motorik mempengaruhi semua otot mengakibatkan penonjolan abnormal tulang. Deformitas kaki membuat mobilitas terbatas sehingga meningkatkan tekanan plantar kaki dan mudah terjadi ulkus. Neuropati autonom ditandai kulit kering dan tidak berkeringat sehingga kaki rentan terhadap trauma minimal. Penderita DM juga menderita kelainan vaskular berupa iskemi akibat proses makroangiopati dan menurunnya sirkulasi jaringan yang kemudian berlanjut menjadi nekrosis jaringan sehingga timbul ulkus. Angiopati tersebut membuat aliran darah berkurang sehingga sering terjadi infeksi. (Chin dan Boulton, 2009; Clayton dan Elasy, 2009; Kartika, 2017).

2.2.2 Klasifikasi Luka Diabetik

Terdapat banyak klasifikasi yang digunakan untuk menggambarkan luka diabetik. Sistem klasifikasi ini didasarkan pada variasi temuan fisik. Klasifikasi *University of Texas (UT)* terkait dengan pengelolaan luka diabetik yang kompleks dan lebih mengacu pada pengelolaan luka diabetik Klasifikasi Wagner-Meggitt yang dianjurkan oleh *International Working Group on Diabetic Foot (IWGDF)* dan dapat diterima semua pihak untuk memudahkan perbandingan hasil

penelitian. Klasifikasi *University of Texas* (UT) dapat dilihat pada Tabel 2.1, klasifikasi Wagner-Meggitt dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Klasifikasi luka diabetik UT

Stadium	Keterangan
A	Tanpa infeksi atau iskemi
B	Infeksi
C	Iskemi
D	Infeksi dan iskemi

Derajat	Keterangan
0	Epitelisasi luka
1	Luka superfisial
2	Luka mencapai tendon atau kapsul
3	Luka mencapai tulang atau sendi

(Sumber: Clayton dan Elasy, 2009)

Tabel 2.2 Klasifikasi luka diabetik Wagner-Meggitt

Derajat 0	Symptom pada kaki seperti kaki
Derajat 1	Ulkus superfisial
Derajat 2	Ulkus dalam
Derajat 3	Ulkus sampai mengenai tulang
Derajat 4	Gangren telapak kaki
Derajat 5	Gangren seluruh kaki

(Sumber : Kartika, 2017)

2.2.3 Tata Laksana Luka Diabetik

Tata laksana luka diabetik membutuhkan pengelolaan holistik. Berbagai hal harus ditangani dengan baik untuk mendapat hasil maksimal, meliputi:

a. Kontrol metabolik

Pengaturan konsentrasi glukosa darah perlu dilakukan untuk memperbaiki faktor-faktor yang mampu menghambat penyembuhan luka. Status nutrisi perlu diperhatikan dan diperbaiki untuk membantu kesembuhan luka. Konsentrasi, albumin serum, konsentrasi Hb, derajat oksigenasi jaringan, dan fungsi ginjal juga diperhatikan (Waspadji, 2015).

b. Kontrol vaskular

Aliran vaskular yang baik sangat mendukung penyembuhan luka karena asupan nutrisi pada luka bergantung pada aliran vaskular perifer. Kelainan aliran vaskular perifer dikenali melalui: warna dan suhu kulit,

perabaan arteri dorsalis pedis, arteri tibialis posterior, dan pengukuran tekanan darah (Waspadji, 2015).

c. *Wound control*

Perawatan luka diabetik perlu dilakukan debridemen. Debridemen merupakan tindakan untuk membersihkan luka dari jaringan nekrotik agar tidak terdapat koloni bakteri, debris, fistula, dan jaringan *nonviable* yang dapat menghambat penyembuhan luka. Debridemen dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu mekanikal, surgikal, autolisis, enzimatik, dan biomekanis. Metode debridemen autolisis merupakan metode yang paling efektif yaitu peluruhan jaringan nekrotik oleh tubuh dengan syarat kondisi lingkungan luka lembab. Prinsip perawatan luka modern yaitu mempertahankan dan menjaga lingkungan luka dalam kondisi lembab untuk mempertahankan kehilangan cairan jaringan dan kematian sel, mempercepat invasi neutrofil, makrofag, monosit, dan limfosit ke daerah luka, mendukung pergerakan epitel, dan memfasilitasi penutupan luka (Langi, 2011; Handayani, 2016; Kartika, 2017).

d. *Microbiological control*

Infeksi merupakan faktor pemberat dalam pengelolaan luka diabetik sehingga dibutuhkan pemberian antibiotik. Pemilihan antibiotik didasarkan pada hasil biakan kuman dan resistensinya. Antibiotik secara empiris diberikan terlebih dahulu hingga menunggu hasil biakan (Langi, 2011; Kartika, 2017).

e. *Pressure control* atau *off-loading*

Tindakan ini dilakukan untuk mengurangi tekanan pada telapak kaki sehingga dapat mengurangi trauma dan mempercepat penyembuhan luka. *Off loading* dapat dilakukan secara parsial atau total (Langi, 2011).

f. *Education control*

Penyuluhan yang baik diharapkan mampu membuat penderita luka diabetik dan keluarganya mendukung tindakan yang diperlukan untuk kesembuhan luka yang maksimal (Waspadji, 2015).

2.3 Proses Penyembuhan Luka

Regenerasi dan perbaikan jaringan terdiri dari rangkaian proses molekuler dan seluler yang terjadi setelah onset lesi untuk memperbaiki jaringan rusak. Penyembuhan luka melibatkan interaksi sel darah, protein, protease, *growth factor*, dan komponen matriks ekstraseluler. Proses penyembuhan luka terbagi menjadi tiga tahapan yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling (Sinno dan Prakash, 2013; Gonzales dan Costa, 2016).

a. Fase Inflamasi

Fase ini merupakan fase pertama dalam penyembuhan luka yang ditandai dengan hemostasis dan inflamasi. Hemostasis merupakan proses untuk mencegah kehilangan darah, trombosit memiliki peran penting dalam proses ini dengan adanya luka membuat trombosit melepaskan substansi vasokonstriktor yaitu tromboksan A_2 sehingga terjadi konstriksi pembuluh darah. Trombosit juga berperan dalam pembentukan sumbat trombosit saat trombosit bersinggungan dengan kolagen jaringan trauma, trombosit akan melekat pada kolagen jaringan dan pada protein *faktor von willebrand*. Trombosit menyekresi *adenosine difosfat* (ADP) dan tromboksan A_2 sehingga mengaktifkan trombosit yang berdekatan untuk saling menempel yang disebut agregasi trombosit yang akhirnya membentuk sumbat trombosit. Trombosit yang teraktivasi juga melepaskan beberapa kemokin yaitu PDGF, EGF, serotonin, fibrinogen, fibronektin, dan histamin yang membantu dalam menstabilkan luka dan mengaktifasi makrofag dan fibroblas. (Sinno dan Prakash, 2013; Guyton dan Hall, 2014).

Kaskade komplemen teraktivasi setelah hemostasis tercapai dan trombosit melepaskan histamin yang menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas membran kapiler sehingga terjadi migrasi sel-sel inflamasi menuju luka. Sel-sel inflamasi berperan dalam penyembuhan luka dengan melepaskan enzim lisosom dan *reactive oxygen species* (ROS) untuk membersihkan luka dari debris. Neutrofil, salah satu sel inflamasi, melepaskan sitokin pro-inflamasi dan substansi antimikroba seperti ROS, antimicrobial peptides (AMPs), dan protease pada luka yang berperan membunuh mikroorganisme asing (Sinno dan Prakash, 2013; Gonzalez dan Costa, 2016).

ROS berperan penting dalam penyembuhan luka sebagai *secondary messenger* untuk sel imunosit dan sel non-limfoid, regulasi angiogenesis, dan perfusi pada area luka. ROS bertindak sebagai pertahanan awal sel inang dari tubuh dalam melawan infeksi dengan cara fagositosis. ROS dalam jumlah yang cukup dapat membantu dalam penyembuhan luka, tetapi dalam jumlah yang berlebihan menyebabkan stress oksidatif yang memperburuk penyembuhan luka. ROS yang berlebihan secara langsung dan tidak langsung (melalui proteolisis) mengakibatkan degradasi protein *extracellular matrix* (ECM) dan menyebabkan gangguan fungsi fibroblas dan keratinosit kulit.

Makrofag dibedakan berdasarkan ekspresi genetiknya yaitu M1 yang bersifat proinflamasi terhadap luka dan patogen sedangkan M2 bersifat antiinflamasi dan pro-angiogenesis. M1 menyekresi zat sitotoksik dan faktor proinflamasi seperti IL-1 β , TNF- α , dan IL-6. Zat sitotoksik dan faktor proinflamasi tersebut berperan dalam penghancuran sel asing dengan memproduksi intermediet nitrogen sitotoksik. M2 berfungsi dalam mendukung remodeling jaringan, fibrosis, dan penyembuhan luka melalui sekresi TGF- β , IL-10, dan sitokin antiinflamasi lain yang penting untuk transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi dan remodeling. M2 berperan penting dalam menghasilkan *growth factor*, mediator antiinflamasi, pengembangan jaringan granulasi, memfasilitasi angiogenesis dengan sekresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), dan neovaskularisasi (Boniakowski *et al.*, 2017).

b. Fase Proliferasi

Fase proliferasi ditandai dengan terjadinya tahap epitelisasi, pembentukan jaringan granulasi, angiogenesis, dan deposisi kolagen. Epitelisasi merupakan pembentukan epitel di atas permukaan luka untuk menggantikan jaringan yang rusak atau hilang. Regenerasi epitel ini terjadi dari tepi menuju bagian tengah luka dan pada bagian luka yang telah tertutup oleh bekuan darah (*blood clot*) (Bigliardi *et al.*, 2015; Sinno dan Prakash, 2013). Jaringan granulasi merupakan jaringan fibrosa yang terbentuk dari pembuluh darah kapiler dan limfatik ke dalam luka dan kolagen. Tanda terbentuknya jaringan granulasi yaitu adanya pembuluh darah baru, fibroblas, dan makrofag (Purnama *et al.*, 2017; Budi *et al.*, 2017). Kolagen

dihasilkan oleh fibroblas yang mengalami proliferasi untuk membentuk matriks baru. Kolagen tersebut disekresikan pada ruang ekstraseluler. Fibroblas berperan penting untuk sintesis, deposisi, dan remodeling matriks ekstraseluler yang memberikan kekuatan pada luka (Sinno dan Prakash, 2013; Simon *et al*, 2018).

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru berupa tunas yang berkembang menjadi percabangan pembuluh darah. Pembuluh darah baru saling beranastomosis membentuk sirkulasi darah yang padat pada luka. Proses ini penting dalam penyembuhan luka dan dalam pengembangan sirkulasi kolateral pada area iskemi. Tahapan umum angiogenesis meliputi vasodilatasi, degradasi proteolitik pembuluh darah membran basal untuk pembentukan tunas kapiler, migrasi sel endotel dari kapiler asal menuju area luka, proliferasi sel endotel, dan maturasi sel endotel dengan proliferasi perisit (untuk kapiler), sel otot polos (untuk pembuluh darah besar), berfungsi menyokong pembuluh endotel. Faktor penginduksi angiogenesis terpenting yaitu bFGF dan VEGF. Faktor tersebut juga menginduksi sel endotel menyekresi proteinase yang berfungsi mendegradasi membran basalis, meningkatkan migrasi sel endotel, dan mengarahkan pembentukan pembuluh darah. Angiogenesis pada luka mencapai puncaknya pada hari ke 7-10 setelah terjadinya luka. Angiogenesis penting dalam memberikan nutrisi pada luka dan membantu mempertahankan dasar jaringan granulasi (Sinno dan Prakash, 2013; Kumar *et al*, 2014; Budi *et al*, 2017; Okonkwo dan Dipietro, 2017).

c. Fase Remodeling

Fase remodeling bertujuan untuk mencapai kekuatan regang maksimum pada luka melalui degradasi dan resintesis matriks ekstraseluler. Fase ini mengupayakan pemulihan luka menjadi jaringan normal melalui remodeling jaringan granulasi secara bertahap, pembentukan jaringan parut, dan peningkatan serat kolagen. Sebagian besar pembuluh darah, fibroblas, dan sel inflamasi menghilang dari area luka selama proses maturasi dan remodeling, karena mengalami proses emigrasi, apoptosis, dan mekanisme kematian sel lain yang tidak diketahui. Fibroblas jaringan granulasi kemudian merubah fenotipnya dan mulai mengekspresikan aktin otot polos, disebut myofibroblas yang berkontraksi

untuk menyatukan batas luka dan merupakan penghasil utama matriks ekstraseluler dalam proses fibrosis (Gonzalez dan Costa, 2016).

2.3.2 Proses Penyembuhan Luka Diabetik

Proses penyembuhan luka dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya oksigenasi. Hipoksia dan hiperoksia jaringan meningkatkan produksi ROS (*reactive oxygen species*). Pada luka normal, ROS seperti hidrogen peroksida dan superoksida bertindak sebagai *cellular messenger* yang menstimulasi motilitas sel, sitokin, dan angiogenesis, tetapi apabila produksi ROS terlalu meningkat menyebabkan kerusakan oksidatif komponen sel. Pada penderita DM, kondisi hiperglikemi menambah stress oksidatif saat produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan tubuh (Guo, 2010).

Fungsi imunitas sel-T terganggu mengakibatkan gangguan kemotaksis, fagositosis, dan kapasitas bakterisidal dari leukosit serta terjadi disfungsi fibroblas dan sel epidermal (Guo dan DiPietro, 2010). Makrofag pada luka diabetik mengalami disfungsi sehingga makrofag yang seharusnya beralih dari fenotip pro-inflamasi ke pro-reparatif untuk mendukung perbaikan jaringan menjadi gagal untuk menstimulasi perbaikan jaringan (Okonkwo dan DiPietro, 2017). Makrofag pada luka diabetik tipe M1 yang berfungsi sebagai respon proinflamasi meningkat sedangkan M2 yang berfungsi sebagai respon antiinflamasi dan proangiogenesis menurun sehingga memperlama fase inflamasi penyembuhan luka (Finley *et al.*, 2015). Kondisi neuropati pada DM juga berpengaruh pada penyembuhan luka diabetik. Saraf sensoris berperan penting dalam mengatur mekanisme pertahanan imun sehingga terjadi penurunan infiltrasi leukosit. Hal-hal ini yang menyebabkan pertahanan terhadap bakteri tidak maksimal dan berpengaruh pada lama penyembuhan luka diabetik (Guo dan DiPietro, 2010).

2.4 Model Tikus Diabetes Melitus

Model hewan diabetes dibedakan menjadi dua berdasarkan cara pembuatannya yaitu: 1) terinduksi dengan pankreatomi, senyawa kimia, atau virus

2) spontan menggunakan tikus BB (*bio breeding*) atau mencit NOD (*non-obese diabetic*) (Nugroho, 2006).

2.4.1 Model Tikus DM Tipe 1

Model tikus DM tipe 1 dapat dirancang dengan pankreatomi total atau secara genetik seperti pada tikus LETL (*Long Evans Tokushima Lean*), tikus wistar tipe *bio breeding* (BB), dan tikus diabetes *non-obese* (NOD) sehingga mengalami disfungsi pankreas dan penurunan sekresi insulin. DM tipe 1 terjadi akibat destruksi atau kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi penurunan sekresi insulin. Senyawa kimia toksin yang sering digunakan untuk membuat kerusakan sel β pankreas yaitu streptozotosin (STZ) dan aloksan. Model tikus DM tipe 1 diinduksi 5 hari sebelum eksperimen dilakukan (Nugroho, 2006; Chatzigeorgou, 2009; King, 2012).

STZ bersifat diabetogenik karena menghambat produksi insulin dan secara selektif merusak sel β pankreas penghasil insulin dengan menginduksi terjadinya nekrosis. STZ secara langsung merusak atau menimbulkan proses autoimun terhadap sel β pankreas, memasuki sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 dan menghancurkan sel β pankreas melalui tiga mekanisme yaitu sebagai agen alkilasi DNA, melepaskan *Nitric Oxide* (NO), dan radikal bebas. STZ sebagai agen alkilasi, menyebabkan kerusakan seluler termasuk merusak untai DNA yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. STZ berperan sebagai pendonor NO yang meningkatkan aktivitas guanil siklase dan pembentukan cGMP sehingga berkontribusi terhadap kerusakan sel β . Produksi radikal bebas oleh STZ meliputi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) menyebabkan stres oksidatif yang memicu kerusakan oksidatif komponen sel seperti DNA, protein, dan lipid (Goud, 2015).

Aloksan memiliki kemiripan dengan glukosa diserap dan terakumulasi pada sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2. Aloksan bekerja dengan membentuk ROS yang menyebabkan fragmentasi dan kerusakan DNA sel. Aloksan juga menginduksi pengeluaran kalsium dari mitokondria sehingga konsentrasi kalsium meningkat dan memicu destruksi tepat pada sel β pankreas.

Agan diabetogenik ini menyebabkan depolarisasi membran sel β pankreas memicu kerusakan membran sel sehingga mempermudah kerusakan sel β pankreas (Rohilla dan Ali, 2012).

STZ memiliki kelebihan dibandingkan aloksan yaitu insidensi komplikasi ketosis dan mortalitas yang rendah, stabilitas tinggi, toksisitas rendah, dan dosis diabetogenik tidak sempit sehingga persentase keberhasilan dalam menginduksi kondisi diabetes mencapai 95% sedangkan aloksan 75% (Chatzigeorgou, 2009; Goud, 2015).

2.4.2 Model Tikus DM Tipe 2

DM tipe 2 ditandai dengan resistensi insulin dan ketidakmampuan sel β untuk mengkompensasi. Model tikus DM tipe 2 dapat dibuat melalui pemberian nutrisi yang menstimulasi resistensi insulin, pankreotomi parsial, atau secara genetik. Kondisi obesitas dan resistensi insulin sebagai kompensasi merupakan tanda yang mengarah pada DM tipe 2 sehingga beberapa model tikus yang digunakan dengan kondisi obesitas seperti tikus dengan obesitas monogenik maupun poligenik, tikus yang diinduksi obesitas, atau secara genetik dengan disfungsi sel β (Nugroho, 2006; King, 2012).

2.5 Umbi Bidara Upas

Tanaman bidara upas tumbuh dengan baik di dataran rendah hingga ketinggian 200 meter di atas permukaan laut dengan iklim tropis. Tanaman ini memiliki panjang batang 3-6 meter dan memiliki panjang mencapai 25 cm, lihat Gambar 2.1(b). Daun bidara upas memiliki bentuk seperti jantung dengan ujung runcing dan berwarna hijau tua, lihat Gambar 2.1(a).



(a)



(b)

(a) Daun umbi bidara upas, (b) Umbi bidara upas

Gambar 2.1 Tanaman bidara upas (Sumber: <https://www.google.co.id/>)

2.5.1 Taksonomi

Taksonomi bidara upas menurut Plantamor (2012) sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae (tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (berpembuluh)
- Superdivisi : Spermatophyta (menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (tumbuhan berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (dikotil)
- Subkelas : Asteridae
- Ordo : Solanales
- Famili : Convolvulaceae (suku kangkung-kangkungan)
- Genus : *Merremia*
- Spesies : *Merremia mammosa* Lour.

2.5.1 Kandungan dan Kegunaan Umbi Bidara Upas

Umbi bidara upas mengandung senyawa yang diperlukan untuk penyembuhan luka diabetik yaitu flavonoid dan glikosida resin. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antiinflamasi dengan mengaktifasi makrofag (M2) berfungsi sebagai respon antiinflamasi menyekresi IL-10, TGF- β , dan sitokin antiinflamasi lain yang penting untuk transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi dan remodeling. M2 juga berfungsi sebagai respon pro-angiogenesis yang akan menyekresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) menginduksi angiogenesis. Flavonoid sebagai antioksidan berperan dengan menangkap radikal bebas ROS (*reactive oxygen species*) dan mencegah reaksi oksidasi dengan meningkatkan aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD) dan *glutation peroksidase*. Glikosida resin berperan sebagai antibakteri dengan membuat lubang pada membran bakteri sehingga bakteri mati dan dapat mencegah terjadinya infeksi. (Bao *et al*, 2009; Farizal, 2012; Hidayat, 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Julianto (2015) dan Sofiana, *et al* (2015) mengenai umbi bidara upas menunjukkan ekstrak etanol umbi bidara upas dapat mempercepat proses penyembuhan luka diabetik dan berpengaruh pada fibroblas. Beberapa penelitian lain yaitu Farizal (2012) mengenai ekstrak etanol umbi bidara upas dapat meningkatkan produksi limfosit dan produksi ROI makrofag secara bermakna pada infeksi *Salmonella typhimurium*, Ukhrowi (2011) menunjukkan ekstrak etanol umbi bidara upas mampu meningkatkan fagositosis makrofag dan produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dan pada penelitian Mazni (2008) membuktikan ekstrak etanol umbi bidara upas dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Aktivitas antibakteri umbi bidara upas ini dengan cara membuat lubang pada membran bakteri patogen.

2.6 Ekstraksi dan Fraksinasi

Hasil metabolisme suatu organisme (tumbuhan, hewan, mikroorganisme) meliputi metabolit primer dan sekunder. Setiap organisme pada umumnya memiliki metabolit primer yang sama terdiri dari molekul-molekul besar seperti

polisakarida, protein, dan asam nukleat, berfungsi sebagai energi atau cadangan energi untuk kelangsungan hidup organisme. Metabolit sekunder terdiri dari molekul-molekul kecil, bersifat spesifik, dan setiap senyawa memiliki fungsi yang berbeda. Metabolit sekunder merupakan biomolekul yang dapat digunakan sebagai *lead compounds* dalam penemuan dan pengembangan obat-obat baru sehingga dibutuhkan metode untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder (Atun, 2014).

2.6.1 Ekstraksi

Langkah pertama dalam isolasi senyawa yaitu ekstraksi sampel. Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat aktif dari penyusun-penyusun lain dalam suatu campuran berdasarkan kelarutan komponen terhadap pelarut yang digunakan. Jenis-jenis metode ekstraksi sebagai berikut.

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana dari sampel padat melalui proses perendaman sampel pada pelarut organik dalam suhu ruangan. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk sampel dan pelarut organik yang sesuai dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar, terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan konsentrasi antara intrasel dan ekstrasel. Larutan berkonsentrasi tinggi terdesak keluar dan digantikan oleh larutan berkonsentrasi rendah, berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi intrasel dan ekstrasel. Proses ini membuat metabolit sekunder dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik. Residu yang diperoleh dipisahkan dari pelarut dengan penyaringan. Kelebihan menggunakan metode ini yaitu membutuhkan peralatan yang sederhana dan dapat menghindari rusaknya senyawa termolabil sedangkan kekurangan dari metode ini yaitu membutuhkan waktu yang lama, kemungkinan besar beberapa senyawa hilang dan sulit diekstraksi pada suhu ruangan (Miryanti *et al*, 2011; Atun, 2014; Mukhriani, 2014).

b. Perkolasi

Metode ini dilakukan dengan serbuk sampel dibasahi dengan pelarut secara perlahan dalam percolator. Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan. Pelarut akan melarutkan zat aktif dalam sel-sel yang dilalui sampai keadaan menjadi jenuh. Parameter penambahan pelarut dihentikan yaitu saat tetesan perkolat sudah tidak berwarna. Kelebihan menggunakan metode ini sampel senantiasa dialiri oleh pelarut sedangkan kekurangan metode ini membutuhkan waktu yang lama, pelarut yang banyak, dan apabila sampel tidak homogen, pelarut sulit menjangkau seluruh area (Atun, 2014; Mukhriani, 2014).

c. Soxhletasi

Metode ini dilakukan dengan cara serbuk sampel ditempatkan pada kertas saring atau sarung selulosa dan diletakkan dalam soxhlet dengan labu dibawahnya. Pelarut organik dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas air diatur dibawah suhu refluks. Kelebihan menggunakan metode ini yaitu proses ekstraksi kontinyu, pelarut yang dibutuhkan tidak banyak, dan tidak membutuhkan waktu lama sedangkan kerugian menggunakan metode ini yaitu terus menerus berada pada titik didih sehingga senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Atun, 2014; Mukhriani, 2014).

d. *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE)

Metode ini merupakan metode maserasi modifikasi menggunakan *ultrasound*, sinyal dengan frekuensi tinggi 20 kHz. Prinsip metode UAE dengan frekuensi tinggi digunakan untuk merusak dinding sel sehingga membantu meningkatkan pelarut menembus sel dan memperoleh hasil ekstraksi yang lebih tinggi. Sampel dihancurkan direndam dalam pelarut dan diletakkan dalam *ultrasonic bath*, sementara temperature dan waktu ekstraksi dikontrol (Mukhriani, 2014; Altemimi *et al.*, 2017).

UAE merupakan salah satu teknik ekstraksi yang mudah karena menggunakan peralatan laboratorium pada umumnya seperti *ultrasonic bath*. Tabarki *et al.* (2011) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa

ekstraksi fenolik menggunakan metode UAE mengurangi jumlah pelarut dan energi yang digunakan. Corrales *et al.* (2008) juga menyebutkan UAE dapat memecah dinding jaringan, bekerja dengan baik selama proses produksi, dan menghasilkan senyawa aktif dalam pelarut dengan efisiensi tinggi. Beberapa penelitian lain juga menyebutkan bahwa UAE efektif dalam mengekstrak kapsaisin dari cabai, senyawa antioksidan, dan mengurangi degradasi senyawa fenolik (Barbero *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2008; Albu *et al.*, 2004). Mulinacci *et al.* (2004) membandingkan waktu ekstraksi senyawa fenolik dari strawberi menggunakan metode UAE dan metode lain, hasilnya menyebutkan bahwa metode UAE lebih efektif dibandingkan metode lain.

2.6.2 Fraksinasi

Ekstrak awal mengandung campuran berbagai senyawa sehingga perlu dipisahkan melalui fraksinasi. Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak menggunakan pelarut dengan polaritas yang berbeda sehingga senyawa akan terpisah berdasarkan kepolarannya. Metode yang digunakan untuk fraksinasi adalah sebagai berikut (Atun, 2014; Mukhriani, 2014).

a. Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran berdasarkan komponen diantara dua fase, fase diam dan fase bergerak. Fase diam menahan komponen campuran sehingga komponen yang mudah tertahan pada fase ini akan tertinggal sedangkan fase gerak melarutkan komponen campuran yang larut dalam fase ini sehingga komponen yang larut bergerak lebih cepat. Pemisahan ini berdasarkan sifat molekul yaitu kecenderungan molekul larut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul melekat pada serbuk halus (absorpsi), dan kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian). Teknik kromatografi yang banyak digunakan antara lain kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom

vakum (KCV), kromatografi gravitasi, dan komatotron (Atun, 2014; Mukhriani, 2014).

b. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang dilakukan pada sampel cairan atau sampel pada larutan menggunakan media ekstraksi cair. Metode ini menggunakan pelarut ekstraksi dan larutan yang mengandung analit yang keduanya tidak dapat larut. Ekstraksi jenis ini menggunakan alat berupa corong pisah dan dilakukan dengan cara mengocok larutan dalam corong pisah kemudian terbentuk dua lapisan yang terpisah, hal ini memanfaatkan perbedaan kelarutan zat terlarut yang akan dipisahkan antara pelarut asal dan pelarut pengeksrak. Pelarut yang digunakan untuk memperoleh hasil ekstraksi yang baik memiliki sifat tidak eksplosif, tidak toksik, dan mudah melarutkan. (Moldoveanu dan David, 2015; Handayani *et al.*, 2015).

2.7 Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Gel merupakan sediaan semisolid terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel besar organik dan partikel kecil anorganik yang terpenetrasi dalam suatu cairan. Sediaan gel terutama hidrogel memiliki kelebihan yaitu mudah dioleskan, tidak lengket, memiliki efek dingin pada kulit saat digunakan karena lambatnya penguapan air pada kulit, pelepasan obat dan kemampuan penyebaran pada kulit yang baik. Hidrogel mudah dicuci dengan air sehingga tidak meninggalkan lapisan berminyak pada kulit dan tidak menyumbat pori kulit sehingga pernapasan pori kulit tidak terganggu dan tidak menimbulkan efek peradangan lebih lanjut (Amin, 2014; Maulina dan Sugihartini, 2015; Wardiyah, 2015). Formulasi sediaan gel terdiri dari komponen sebagai berikut.

a. *Gelling agent*

Gelling agent atau basis gel merupakan bahan utama dalam formulasi sediaan gel. Bahan ini digunakan untuk mendapatkan karakteristik sediaan sesuai dengan spesifikasi atau parameter kriteria yang diharapkan, meningkatkan konsistensi sediaan, dan berfungsi sebagai

thickening agent. Konsentrasi *gelling agent* yang umum digunakan berkisar 0,5%-10%, membatasi pergerakan pelarut sehingga dapat meningkatkan viskositas. *Gelling agent* yang sering digunakan yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC karena memiliki stabilitas dan kompatibilitas yang tinggi, toksisitas rendah, dan meningkatkan waktu kontak dengan kulit sehingga meningkatkan efektivitas penggunaan gel (Sayuti, 2015; Khasanah, 2016; Astuti *et al.*, 2017).

1.) *Hydroxy Propyl Methyl Mellulose* (HPMC)

HPMC sebagian besar digunakan untuk formulasi oral, mata, nasal, dan topikal. *Gelling agent* ini dalam sediaan topikal digunakan sebagai agen *suspending* dan *thickening*. HPMC juga digunakan sebagai emulsifier, zat pensuspensi, dan zat penstabil, serta dapat mencegah partikel dari penggabungan atau penggumpalan sehingga menghambat pembentukan sedimen (Rowe *et al.*, 2009). HPMC menghasilkan gel yang bening, mudah larut dalam air, dan toksisitas rendah. HPMC stabil pada pH 3-11, memiliki resistensi yang baik terhadap serangan mikroba, dan memberikan adhesi yang baik pada kulit (Ibrahim, 2015). HPMC dengan konsentrasi 1-10% digunakan sebagai *gelling agent* (Mahalingam *et al.*, 2008).

2.) Karbopol

Karbopol atau *carbomer* digunakan dalam sediaan gel untuk topikal, rektum, vagina, dan mata. *Gelling agent* ini menghasilkan residu yang rendah, mudah terdispersi, dan dalam konsentrasi kecil berfungsi sebagai *gelling agent* dengan viskositas yang cukup tinggi. Karbopol berbentuk serbuk halus, putih, bersifat asam, dan higroskopik dengan bau khas. Konsentrasi 0,5-2% digunakan sebagai *gelling agent*. Karbopol bersifat stabil, higroskopis dan dipanaskan pada suhu dibawah 104°C hingga 2 jam tanpa memengaruhi efisiensi pengentalan tetapi paparan suhu yang berlebihan menyebabkan perubahan warna dan mengurangi stabilitas (Rowe *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2016).

3.) *Carboxymethylcellulose Sodium* (Na-CMC)

Na-CMC merupakan senyawa turunan selulosa yang larut dalam air. sering digunakan dalam formulasi farmasi oral dan topikal terutama karena sifatnya yang meningkatkan viskositas. Konsentrasi 3-6% digunakan sebagai *gelling agent*. Na-CMC juga digunakan dalam *self-adhesif* ostomy, perawatan luka, dan bercak kulit untuk menyerap luka eksudat atau transepidermal keringat dan air. *Gelling agent* ini bersifat *biodegradable*, tidak berbau, tidak berwarna, dan tidak toksik. Bentuk Na-CMC berupa bubuk atau butiran yang larut dalam air dan memiliki pH dalam rentang 6,5-8. Selulosa sebagai bahan baku Na-CMC diperoleh dari kayu. Karakteristik fungsional penting dari Na-CMC yaitu sebagai zat penstabil, emulsifier, dan *gelling agent* (Rowe *et al.*, 2009; Musfiroh *et al.*, 2013; Coniwanti *et al.*, 2015). Na-CMC juga resisten terhadap serangan mikroba (Mahalingam *et al.*, 2008).

b. Humektan

Bahan ini digunakan untuk mengurangi penguapan air dan meysisakan lapisan film yang tidak membentuk kerak sehingga berperan sebagai pelembab pada kulit. Humektan memberikan konsistensi dan viskositas produk akhir serta meningkatkan daya sebar sediaan. Contoh humektan yang dipakai meliputi gliserol, sorbitol, propilen glikol, dan etilen glikol (Amin, 2014; Wardiyah, 2015).

c. *Alkalizing agent*

Trietanolamin (TEA) merupakan salah satu *alkalizing agent*, cairan kental yang berwarna kuning pucat. Gel umumnya merupakan sediaan semipadat sedangkan karbopol (*gelling agent*) akan mengembang jika didispersikan dalam air sehingga dengan adanya *alkalizing agent* akan membentuk sediaan semipadat. Warna TEA berubah menjadi coklat apabila terkena cahaya sehingga penyimpanan TEA harus disimpan dalam wadah kedap udara yang terlindung dari cahaya di tempat kering dan sejuk (Rowe *et al.*, 2009; Amin, 2014).

2.8 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

2.8.1 Peranan VEGF dalam Penyembuhan Luka

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) adalah *growth factor* yang berfungsi sebagai mitogen sel endotel, agen kemotaktik, penginduksi permeabilitas vaskular, dan angiogenesis. *Growth factor* lain yang dapat menginduksi angiogenesis seperti basic fibroblast growth factor (bFGF) dan transforming growth factor β (TGF- β) tetapi VEGF faktor yang paling penting dalam menginduksi angiogenesis (Okonkwo dan DiPietro, 2017). VEGF berperan pada pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), kaskade penyembuhan luka, epitelisasi, dan deposisi kolagen. *Growth factor* ini dihasilkan oleh fibroblas, sel otot polos, trombosit, neutofil, monosit, dan makrofag. Monosit dan makrofag merupakan sumber utama VEGF. (Bao *et al*, 2010; Johnson dan Wilgus, 2013; Kumar *et al.*, 2014).

Kerusakan jaringan atau terjadinya luka ditandai iskemi dan hipoksia. Kondisi hipoksia, melalui *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 α menginduksi ekspresi VEGF yang meningkat pada monosit, fibroblas, keratinosit, miosit, dan sel endotel. VEGF menginduksi angiogenesis pada penyembuhan luka melalui beberapa tahapan yang meliputi vasodilatasi, degradasi basemen membran, migrasi sel endotel, proliferasi sel endotel, dan maturasi sel endotel (Bao *et al*, 2010; Kumar *et al.*, 2014).

Angiogenesis pada luka diabetik mengalami defisit, tetapi DM dapat menyebabkan peningkatan atau penurunan angiogenesis bergantung pada proses patologis yang terjadi. Pada retinopati diabetik ditandai oleh terjadinya mikroaneurisma, perdarahan, dan edema vaskular. Seiring dengan peningkatan pertumbuhan pembuluh darah kapiler, tanda kelainan vaskular pada retinopati diabetik yaitu hilangnya perisit dalam jaringan kapiler retina. Hilangnya perisit ini menyebabkan terjadinya edema dan kebocoran pembuluh darah. Kapiler yang rusak mengalami hipoksia yang mengakibatkan peningkatan ekspresi abnormal faktor transkripsi HIF-1 dan peningkatan regulasi VEGF, faktor yang diketahui meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Kondisi ini selanjutnya

menyebabkan pembentukan neovaskularisasi berlebih yang bocor dan tidak matur. Nefropati diabetik juga ditandai dengan angiogenesis yang berlebih dan menyebabkan kerusakan dalam sistem filtrasi glomerulus. Pada tahap awal nefropati diabetik, ginjal menyekresi VEGF yang berlebihan sehingga menyebabkan hipermeabilitas pembuluh darah, peningkatan proliferasi sel endotel dan penghambatan apoptosis. Peningkatan VEGF membuat kekacauan dalam aktivasi reseptor VEGF sehingga VEGF dalam sirkulasi meningkat yang mengakibatkan destabilisasi plak seperti pada kondisi aterosklerosis (Okonkwo dan Dipietro, 2017).

2.8.2 Peranan VEGF dalam Angiogenesis

VEGF berikatan dengan reseptor Flt-1 (VEGFR-1) dan KDR (VEGFR-2) terdapat pada sel endotel yang disertai aktivitas kinase intrinsik. Aktivasi reseptor dengan aktivitas kinase intrinsik tersebut memicu terjadinya tahapan pembentukan pembuluh darah baru (Kumar *et al.*, 2014), yaitu:

1. Vasodilatasi

Ikatan VEGF pada reseptornya memicu aktivasi NOS (*Nitric Oxide Synthase*) dan siklooksigenase. NO dan prostasiklin memicu vasodilatasi dan permeabilitas vaskular. Vasodilatasi yang terjadi membuat sensitivitas endotel terhadap *growth factor* meningkat.

2. Degradasi Basemen Membran

VEGF meningkatkan sekresi *interstitial collagenase* (MMP-1), *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP-1), dan *gelatinase A* (MMP-2) oleh sel endotel. VEGF juga memicu sel otot polos vaskular mengekspresikan MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. MMP-2 dapat mendegradasi kolagen tipe IV, konstituen dari membran dasar vaskular. MMP-1 memecah kolagen tipe I-III. Degradasi proteolitik pada pembuluh darah induk ini membuat terjadinya pembentukan tunas kapiler baru.

3. Migrasi Sel Endotel

VEGF menginduksi migrasi sel endotel melalui dua mekanisme primer yaitu kemotaksis dan vasodilatasi. Mekanisme kemotaksis dalam

migrasi sel endotel yaitu VEGF menginduksi osteopontin (OPN) dan *thrombin-cleaved* OPN yang keduanya bersifat kemotaktik terhadap sel endotel. Mekanisme vasodilatasi melalui peningkatan permeabilitas vaskular yang dimediasi oleh NO dan prostasiklin. Proses selanjutnya terjadi kebocoran fibrinogen protein plasma dalam ruang ekstraseluler kemudian fibrinogen menjadi fibrin sehingga merangsang migrasi sel endotel. Migrasi sel endotel ini terjadi dari kapiler asal menuju lokasi rangsang angiogenik.

4. Proliferasi Sel Endotel

VEGF menginduksi sel endotel yang tumbuh pada matriks kolagen untuk menginvasi matriks yang mendasarinya dan merangsang untuk berproliferasi. Proliferasi terjadi pada sel endotel di belakang ujung terdepan dari sel yang bermigrasi. VEGF juga menghambat apoptosis dengan menginduksi transien ekspresi dari protein *anti-apoptotic* pada sel endotel sehingga memperpanjang masa hidup sel endotel.

5. Maturasi Sel Endotel

Maturasi sel endotel melalui penghambatan pertumbuhan menjadi pembuluh kapiler. Maturasi ini mencakup rekrutmen dan proliferasi perisit untuk stabilisasi dan menyokong pembuluh darah baru.

2.8.3 VEGF pada Luka Diabetik

VEGF dihasilkan terutama oleh makrofag sedangkan makrofag pada luka diabetik mengalami defisit sehingga angiogenesis pada luka diabetik rendah (Guo dan DiPietro, 2010). Luka pada mencit diabetes yang diinduksi STZ menunjukkan berkurangnya sintesis *growth factor* termasuk VEGF. Penelitian Seitz *et al.* (2010) menunjukkan protein VEGF-A pada luka diabetik secara signifikan menurun dibandingkan dengan luka normal. Penggunaan VEGF pada luka diabetik meningkatkan angiogenesis, deposisi kolagen, dan mengembalikan fungsi endotel untuk meningkatkan oksigenasi jaringan (Bao *et al.*, 2010). Penelitian Lin *et al.* (2017) menyebutkan bahwa HIF-1 α dan VEGF berperan penting dalam penyembuhan luka diabetik dan penurunan dari kedua faktor

tersebut menyebabkan kurangnya angiogenesis yang pada akhirnya memperlambat penyembuhan luka diabetik.

2.9 Imunohistokimia (IHK)

Imunohistokimia (IHK) merupakan metode mengidentifikasi protein/ antigen dan lokasinya pada suatu jaringan menggunakan reaksi antigen antibodi spesifik. Reaksi antigen antibodi divisualisasikan dengan kromogen atau fluoresen. Visualisasi menggunakan kromogen yaitu antibodi dikonjugasikan dengan enzim yang memecah substrat sehingga menghasilkan endapan berwarna pada lokasi protein spesifik sedangkan visualisasi menggunakan fluoresen, antibodi dikonjugasi dengan fluofoor yang kemudian divisualisasi pada mikroskop fluoresen. Pembuatan IHK tidak merusak struktur histologis jaringan dan menunjukkan lokasi protein spesifik diekspresikan.

2.9.1 Prosedur IHK

Tahapan prosedur imunohistokimia meliputi preparasi sampel, immunostaining, dan mounting media (Kim *et al*, 2016; abcam, t, th.).

a. Preparasi Sampel

Preparasi sampel terdiri dari fiksasi, *embedding*, *sectioning*, antigen retrieval, bloking.

1.) Fiksasi, *Embedding*, dan *Sectioning*

Proses ini mencegah autolisis, nekrosis, mengawetkan jaringan dan morfologi sel, mempertahankan antigenisitas dan elemen seluler selama pemrosesan sampel jaringan. Sampel jaringan difiksasi pada 10% *neutral buffered formalin* (NBF), selanjutnya dilakukan dehidrasi yang berfungsi menarik air dalam jaringan menggunakan alkohol untuk meminimalkan kerusakan jaringan. Agen dehidrasi atau alkohol dibersihkan dengan inkubasi dalam xylene kemudian dilakukan *embedding* pada parafin. *Embedding* berfungsi mencegah hilangnya antigen, mempertahankan morfologi jaringan, dan menunjang jaringan selama *sectioning/cutting* menggunakan mikrotom. Pemotongan

jaringan dilakukan setelah embedding sebesar 5-10 μ m tergantung pada tujuan penggunaan. Hasil *sectioning* dapat dikeringkan pada slide mikroskop dan disimpan (Kim *et al*, 2016; abcam, t, th.).

2.) Antigen retrieval

Antigen retrieval berfungsi membuka *mask* epitop karena fiksasi menyebabkan *cross-linking* protein yang menutupi epitop dan membatasi ikatan antigen-antibodi. Metode untuk antigen retrieval yaitu *Heat Induce Epitope Retrieval* (HIER) dan *Proteolytic-Induced Epitope Retrieval* (PIER). HIER, metode yang paling sering digunakan, dengan cara membuka *mask* epitop sedangkan PIER menggunakan enzim atau reagen PIER dengan memperbaiki akses antibodi menuju antigen. Metode HIER dapat dilakukan menggunakan *microwave*, *heating plate*, autoklaf, atau *water bath* (abcam, t, th.).

3.) Permeabilisasi

Tahap ini dilakukan agar antibodi dapat menuju antigen intraseluler seperti epitop sitoplasma dari protein transmembran. Permeabilisasi dilakukan menggunakan solvent dan detergen.

4.) Bloking

Proses ini berfungsi untuk mencegah ikatan antibodi non spesifik sehingga mengurangi pewarnaan *background* yang tidak diinginkan akibat ikatan non spesifik pada daerah konstan reseptor antibodi (Kim *at al*, 2016). Protein BSA atau kasein dapat digunakan untuk bloking ikatan antibodi non spesifik (abcam, t, th.).

b. Immunostaining

Imunostaining atau imunodeteksi adalah proses mendeteksi interaksi antigen-antibodi spesifik. Antibodi yang digunakan dapat berupa antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal. Interaksi antigen-antibodi dapat dideteksi menggunakan salah satu metode yaitu metode langsung (*direct method*) atau tidak langsung (*indirect method*). Metode langsung menggunakan antibodi primer yang langsung terkonjugasi pada label. Metode tidak langsung menggunakan antibodi primer tidak berlabel yang

mengenali antigen dan antibodi sekunder berlabel yang mengenali antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan pemberian kromogen (Kim *et al.*, 2016; abcam, t, th.).

Deteksi kromogenik lebih sering digunakan daripada fluoresen karena tidak membutuhkan sumber cahaya khusus dan slide dapat disimpan selama beberapa tahun. Deteksi kromogenik menggunakan enzim seperti *Horse Radish Peroxidase* (HRP) dan *Alkaline Phosphatase* (AP). Enzim HRP mengubah substrat kromogen 3,3' diaminobenzidine (DAB) menjadi coklat sedangkan AP mengubah substrat kromogen 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) menjadi merah (abcam, t, th.).

c. Mounting Media

Proses ini penting untuk mengawetkan specimen selama penyimpanan dan meningkatkan kualitas pencitraan/*imaging* meliputi dan kontras selama pengamatan mikroskop. Terdapat dua kategori mounting media yaitu organik dan aqueous (abcam, t, th.).

2.9.2 Analisis Ekspresi VEGF pada IHK

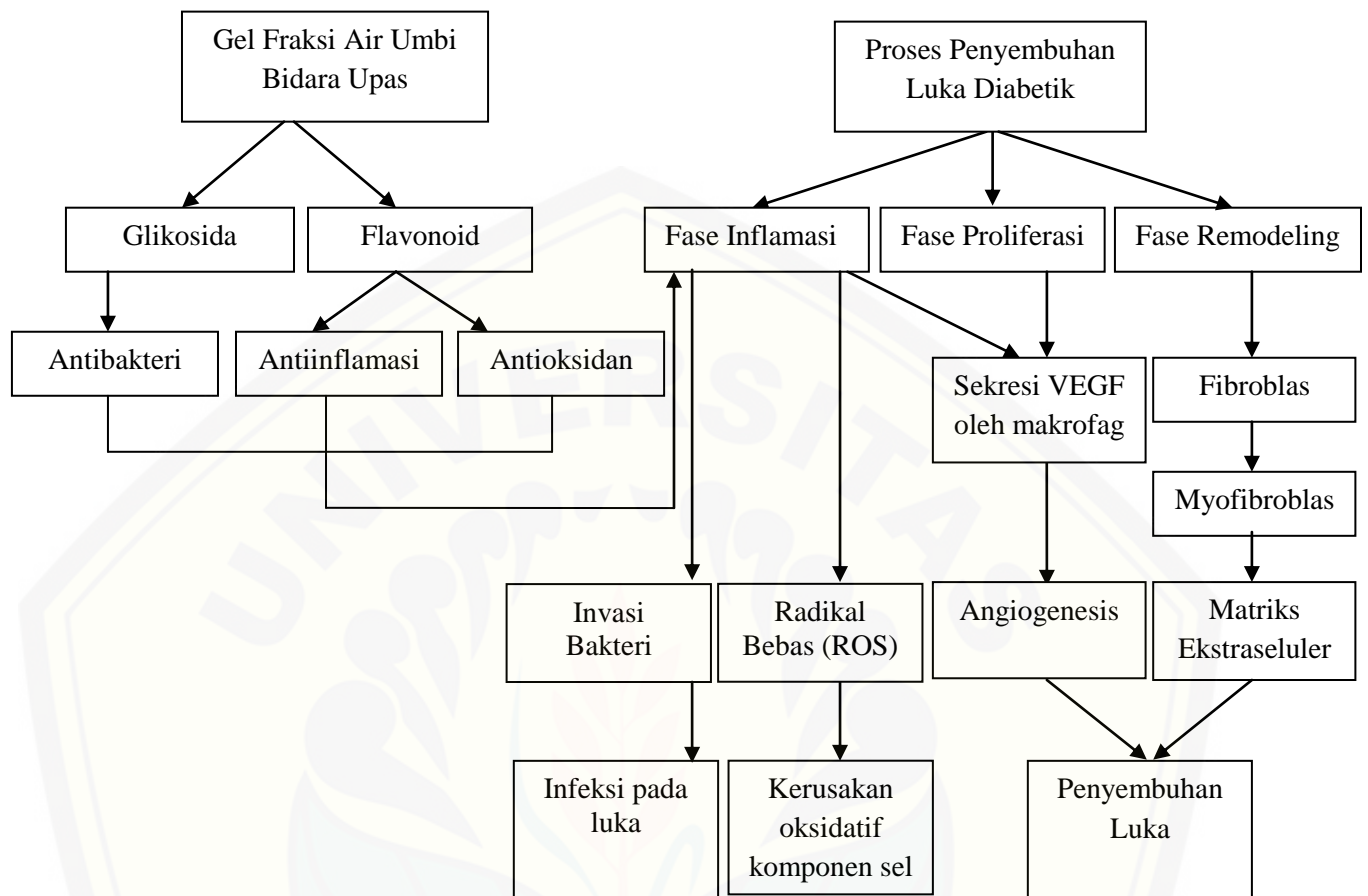
Ekspresi VEGF dilihat dengan mikroskop pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400×. Imunohistokimia memberikan pewarnaan coklat pada sel endotel dengan ekspresi VEGF yang disebut sel imunopositif. Hasil imunohistokimia harus diubah menjadi nilai numerik agar dapat dilakukan analisis statistik sehingga diketahui interpretasi dari hasil imunohistokimia (Kim *et al.*, 2016). Perhitungan ekspresi VEGF menggunakan dengan mengalikan persentase area yang terpulas coklat dengan intensitas warna coklat pada lapang pandang (Maae *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2014). Beberapa analisis yang digunakan dalam pengamatan sel imunopositif adalah sebagai berikut:

- a. Metode kuantitatif menggunakan skoring tiap 10% jumlah sel imunopositif yaitu 0 (0%-9%), 1 (10%-19%), 2 (20%-29%), 3 (30%-39%), 4 (40%-49%), 5 (50%-59%), 6 (60%-69%), 7 (70%-79%), 8 (80%-89%), 9 (90%-100%).

- b. Metode kualitatif menggunakan intensitas warna yang tampak pada sel imunopositif dengan skoring 0-3 (0, negatif; 1+, positif lemah; 2+, positif sedang; 3+, positif kuat).
- c. Metode semikuantitatif dengan menggabungkan metode kualitatif dan kuantitatif.



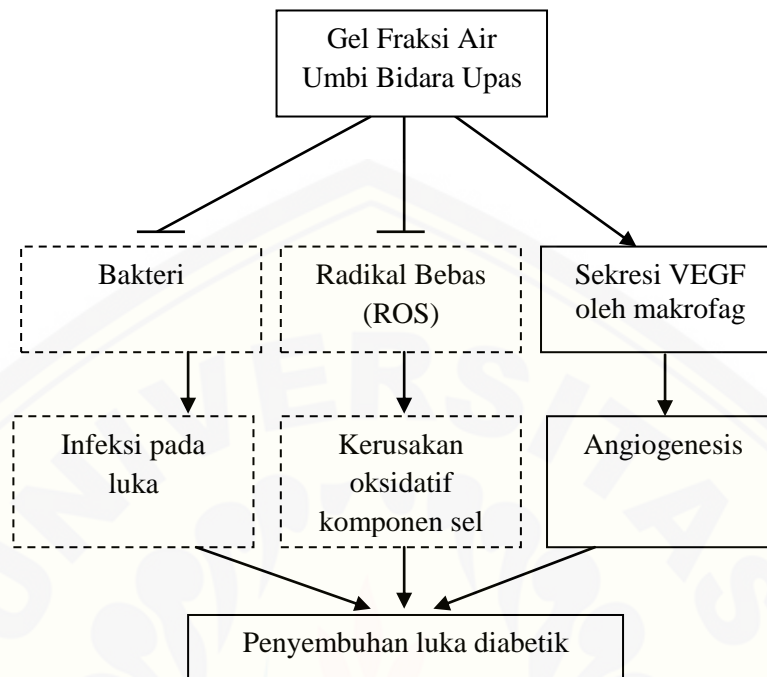
2.10 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2.2 Kerangka teori penelitian (Sumber: Yoshikawa *et al.*, 2010; Sinno dan Prakash, 2013; Bao *et al.*, 2015)

Gel fraksi air umbi bidara upas mengandung glikosida resin dan flavonoid. Glikosida resin berperan sebagai antibakteri sedangkan flavonoid berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Peranan kedua senyawa tersebut berpengaruh pada fase inflamasi penyembuhan luka diabetik berupa peningkatan mediator antiinflamasi sehingga akan mempengaruhi fase inflamasi dengan menurunkan radikal bebas (ROS) dan membantu dalam membunuh bakteri. Pengaruh lain yaitu makrofag yang dihasilkan pada fase inflamasi dan fase proliferasi juga akan meningkat, khususnya M2 yang menyekresi VEGF. VEGF menginduksi angiogenesis yang berperan pada penyembuhan luka diabetik.

2.11 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

- : memicu
- | : menghambat
- : diteliti
- - - □ : tidak diteliti

Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian (Sumber: Cherigo et al., 2008; Yoshikawa et al., 2010; Sinno dan Prakash, 2013; Bao et al, 2015; Hidayat, 2015)

Gel fraksi air umbi bidara upas membunuh bakteri melalui pembuatan lubang pada membran bakteri sehingga bakteri mati yang kemudian dapat mencegah terjadinya infeksi. Gel fraksi air umbi bidara upas juga menurunkan radikal bebas (ROS) sehingga kerusakan oksidatif komponen sel menjadi terhambat. Gel fraksi air umbi bidara upas meningkatkan aktivasi makrofag yang dihasilkan pada fase inflamasi dan proliferasi terutama M2. M2 yang meningkat akan menyekresi mediator antiinflamasi berupa IL-10, TGF- β , dan sitokin antiinflamasi lain yang penting untuk transisi dari fase inflamasi ke fase

proliferasi. M2 juga menyekresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang menginduksi angiogenesis. Ketiga aktivitas tersebut dapat mempercepat penyembuhan luka diabetik.

2.12 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok: 1) HPMC dan karbopol; 2) Karbopol dan Na-CMC; 3) Na-CMC dan HPMC
- b. terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol positif dengan: 1) HPMC; 2) Karbopol; 3) Na-CMC
- c. terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol negatif dengan: 1) HPMC; 2) Karbopol; 3) Na-CMC

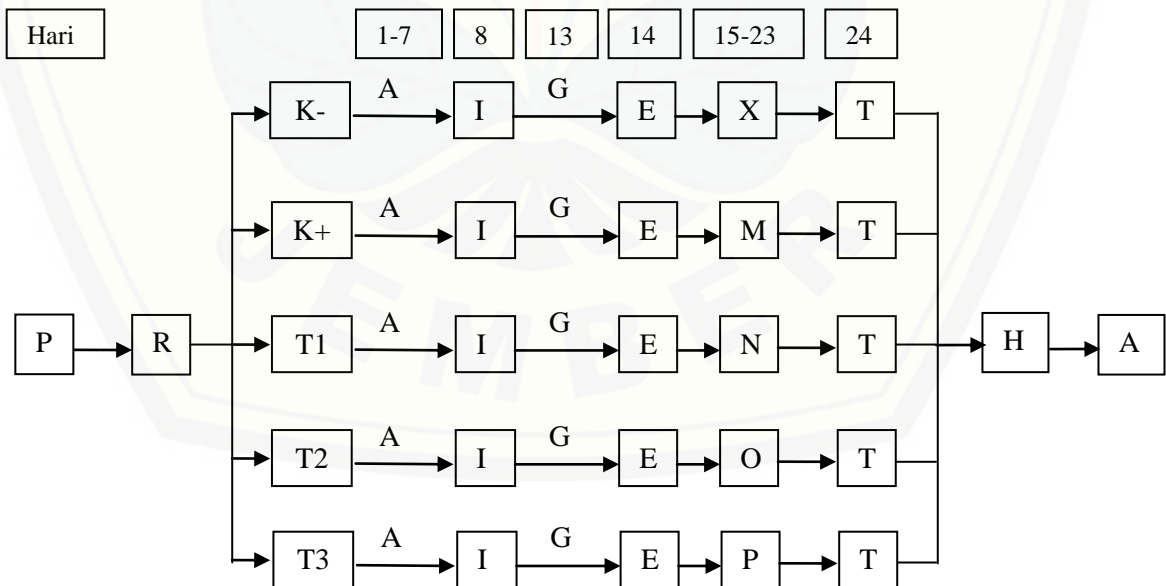
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratories*. Penelitian ini menggunakan desain *post test only control group design*. Dalam desain ini terdapat lima kelompok yang dipilih secara random. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif, kelompok kedua sebagai kontrol positif. Kelompok lainnya sebagai kelompok perlakuan yang diberi gel fraksi umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *post test only control grup design*. Pengukuran hanya dilakukan pada post test yaitu setelah mendapat perlakuan berupa pemberian gel fraksi umbi bidara upas (*Merremia mammosa Lour*). Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

- P : Populasi tikus jantan galur *Wistar*
- R : Randomisasi
- K- : Kontrol negatif (aquades)
- K+ : Kontrol positif satu (gel mengandung neomisin dan ekstrak placenta)
- T1 : Kelompok perlakuan 1 (gel dengan *gelling agent* HPMC)
- T2 : Kelompok perlakuan 2 (gel dengan *gelling agent* karbopol)
- T3 : Kelompok perlakuan 3 (gel dengan *gelling agent* Na-CMC)
- A : Adaptasi selama 7 hari, di hari ke-7 dilakukan pemeriksaan BB dan GDA
- I : Pemberian STZ dengan dosis 40 mg/kgBB kemudian diberikan *dextrose* 10% 50 ml per tikus semalaman pada hari ke-8
- G : Pengukuran GDA tikus pada ke-13
- E : Pemberian luka sebesar 2 x 2 cm pada hari ke-14
- X : Pemberian aquades setiap 2 hari sekali dimulai pada hari ke-15 hingga hari ke-23
- M : Pemberian salep biplacenton setiap 2 hari sekali dimulai pada hari ke-15 hingga hari ke-23
- N : Pemberian gel fraksi dengan *gelling agent* HPMC 1,5% setiap 2 hari sekali dimulai pada hari ke-15 hingga hari ke-23
- O : Pemberian gel fraksi dengan *gelling agent* karbopol 1,5% setiap 2 hari sekali dimulai pada hari ke-15 hingga hari ke-23
- P : Pemberian gel fraksi dengan *gelling agent* Na-CMC 5% setiap 2 hari sekali dimulai pada hari ke-15 hingga hari ke-23
- T : Terminasi hewan coba dan pengambilan jaringan kulit luka pada hari ke-24
- H : Pengamatan profil imunohistokimia
- A : Analisis data

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* yang didapat dari peternakan Surabaya.

3.3.2 Sampel

Pada penelitian ini sampel dipilih dengan kriteria inklusi dan eksklusi untuk membuat homogen sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

a. kriteria inklusi:

1. tikus putih galur *wistar*
2. jenis kelamin jantan
3. usia dua sampai tiga bulan
4. berat badan 150-220 gram
5. sehat dan aktif selama masa adaptasi
6. tidak terdapat kelainan anatomis
7. kadar gula darah post induksi ≥ 200 mg/dL

b. kriteria eksklusi:

1. tikus mati saat perlakuan
2. terdapat infeksi pada luka yang ditandai adanya pus
3. sakit selama masa adaptasi (gerakan tidak aktif)

3.3.3 Besar Sampel

Besar sampel yang diambil pada penelitian ini menggunakan rumus *resource equation* (Arifin dan Zahiruddin, 2017). Sampel diambil dengan teknik *simple random allocation* dari populasi tikus dan dibagi menjadi lima kelompok. Penghitungan rumus *resource equation* sebagai berikut.

Jumlah replikasi minimal (n) yaitu $n = 10/k + 1$

$$n_{\min} = 10/5 + 1 = 3$$

Jumlah replikasi maksimal (n) yaitu $n = 20/t + 1$

$$n_{\max} = 20/5 + 1 = 5$$

$$\begin{aligned}\text{Sampel} &= p \times n \\ &= 5 \times 4 \\ &= 20\end{aligned}$$

Keterangan: p = jumlah perlakuan; n = jumlah replikasi

Penghitungan rumus *resource equation* mendapatkan hasil minimal jumlah replikasi 3 dan maksimal replikasi 5. Peneliti memilih jumlah replikasi 4 dengan 5 kelompok perlakuan sehingga total sampel yaitu 20 ekor tikus.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi air umbi bidara upas di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi. Pembuatan gel fraksi umbi bidara upas di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi. Pembuatan sediaan histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan dalam kurung waktu enam minggu mulai masa adaptasi hingga pengamatan sediaan imunohistokimia.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu jenis *gelling agent* dalam gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa Lour.*). Terdapat tiga jenis *gelling agent* yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu ekspresi VEGF pada luka diabetik kulit tikus sediaan histopatologi dengan pewarnaan imunohistokimia.

3.5.3 Variabel Terkendali

1. Pemeliharaan dan perlakuan
2. Waktu dan lama perlakuan
3. Dosis pemberian streptozotosin (STZ) 40 mg/kgBB
4. Dosis dextrose 10% 50 mL

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional penelitian

No.	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Gel fraksi air umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa Lour.</i>)	Gel fraksi air umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa Lour.</i>) menggunakan bahan aktif dari fraksi air hasil fraksinasi ekstrak etanol umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa Lour.</i>). Pada penelitian ini menggunakan tiga jenis <i>gelling agent</i> yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC serta bahan lain berupa trietanolamin sebagai <i>alkalizing agent</i> , dan propilen glikol sebagai kosolven. Gel diberikan sesuai dengan kelompok perlakuan setiap dua hari sekali dari hari ke-15 sampai hari ke-23 (Maulina, L. dan Sugihartini, N., 2015).		Nominal
2.	Ekspresi <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	Penilaian ekspresi VEGF melalui persentase area dan intensitas warna yang terpulas coklat pada pembuluh darah dengan pewarnaan imunohistokimia. Penilaian dilakukan secara mikroskopis menggunakan perbesaran 400x pada lima lapang pandang dengan bantuan <i>software ImageJ</i> (Destri <i>et al.</i> , 2017; Samiasih, A., 2010).	Persentase ekspresi VEGF	Rasio
3.	Luka Diabetik Derajat 2	Luka diabetik derajat 2 pada penelitian ini yaitu luka dalam atau <i>fullthickness</i> berdasarkan klasifikasi Wagner-Meggitt yang dibuat dari lapisan epidermis sampai lapisan subkutan beserta jaringan ikat dibawahnya. Pembuatan luka diabetik dilakukan setelah kadar glukosa tikus post induksi STZ ≥ 200 mg/dL. (Julianto <i>et al.</i> , 2015; Kartika, 2017; Sakinah, E.N. <i>et al.</i> , 2018).		

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut

- a. Alat untuk pembuatan gel fraksi air umbi bidara upas adalah blender, ayakan, *beaker glass*, timbangan, corong *Buchner*, *rotary evaporator*, maserator, *freeze dryer*, handscoon, mortar, dan pengaduk
- b. Alat untuk pemeliharaan tikus adalah bak plastik, alas jaring-jaring kawat, penutup kawat dengan kassa sebagai penutup, tempat makan, botol minum, dan label.
- c. Alat untuk induksi DM adalah *beaker glass*, pengaduk, spuit 0,1 ml, neraca ohaus, dan handscoon.
- d. Alat untuk pemeriksaan kadar glukosa darah tikus adalah gunting bedah dan *glucotest*.
- e. Alat untuk pembuatan luka eksisi pada tikus adalah silet, spuit 0,1 ml, stempel cetakan luka 2 x 2 cm, pinset, gunting bedah, dan handscoon.
- f. Alat untuk pengambilan jaringan kulit adalah pinset, gunting bedah, *handscoon*, dan tempat fiksasi.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah

- a. Bahan untuk pembuatan gel fraksi air umbi bidara upas adalah umbi bidara upas, etanol 70%, aquades, etil asetat, n-heksana, HPMC, karbopol, Na-CMC, trietanolamin, propilen glikol, dan aquades.
- b. Bahan untuk pemeliharaan tikus adalah sekam dan pakan turbo.
- c. Bahan untuk induksi DM adalah STZ dan buffer sitrat.
- d. Bahan untuk pemeriksaan kadar glukosa darah tikus adalah stik glukosa dan darah ekor tikus yang digunting 0,25 cm.
- e. Bahan untuk pembuatan luka eksisi pada tikus adalah ketamin dan xylazin.
- f. Bahan untuk pengambilan jaringan kulit adalah kloroform dan formalin 10%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subyek yang digunakan dalam penelitian harus mendapat sertifikat kelayakan etik sehingga perlu diajukan pada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini diharapkan dapat menjamin keamanan bagi peneliti dan hewan coba, melindungi hewan coba, memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti.

3.8.2 Pemilihan Sampel Tikus

Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan yang sehat berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-220 gram sebanyak 20 ekor yang terbagi menjadi lima kelompok.

3.8.3 Adaptasi Tikus

Tikus dipelihara dalam kandang berukuran 45 x 30 x 20 cm dan beralaskan jaring-jaring yang dibawahnya diberi sekam untuk mencegah tikus kontak dengan ekskresinya. Selama pemeliharaan tikus diberi pakan turbo dan diberi air *ad libitum*. Tikus diadaptasikan dalam kondisi tersebut selama 7 hari.

3.8.4 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak umbi bidara upas dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember. Umbi bidara upas sebanyak 10 kg dipotong-potong kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan untuk mendapatkan simplisia. Simplisia diblender dan diayak sehingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk diekstraksi dengan metode *ultrasound* menggunakan pelarut etanol 70% selama satu jam kemudian disaring dengan corong *buchner* sehingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi ulang satu kali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan penguapan di atas *water bath* sehingga didapatkan ekstrak etanol kental.

3.8.5 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Pembuatan fraksi air dari ekstrak etanol umbi bidara upas dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember. Ekstrak etanol kental yang diperoleh pada tahapan sebelumnya difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan tahapan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol kental sebanyak 120 gram ditambahkan dengan 240 mL aquades (perbandingan 1:2) kemudian diaduk hingga homogen
2. Ditambahkan 360 mL n-heksana ke dalam corong pisah lalu dikocok selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan n-heksana dan air terpisah sempurna. Seluruh lapisan n-heksana (lapisan atas) diambil. Tahap ini diulang dua kali
3. Sisa lapisan air ditambahkan 360 mL etil asetat dalam corong pisah kemudian dikocok 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan etil asetat dan air terpisah sempurna. Seluruh lapisan etil asetat (lapisan atas) diambil. Tahapan ini diulang dua kali.
4. Lapisan air (lapisan bawah) dipisahkan dengan freeze drying untuk mendapatkan fraksi air

3.8.6 Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Fraksi yang digunakan sebagai gel yaitu fraksi air umbi bidara upas karena pada penelitian Sakinah *et al.*(2018) didapatkan hasil fraksi air umbi bidara upas memiliki aktivitas tertinggi dalam mempercepat penyembuhan luka diabetik. Gel dibuat dengan mencampurkan basis gel dengan fraksi. *Gelling agent* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu HPMC, karbopol, dan Na-CMC.

Proses pembuatan basis gel dimulai dengan mengembangkan *gelling agent* dalam air panas pada mortar kemudian diaduk sampai homogen, selanjutnya ditambahkan trietanolamin (TEA) sedikit-sedikit hingga terbentuk massa gel. Fraksi air dicampurkan dengan propilen glikol sampai homogen kemudian dicampurkan ke dalam basis gel dan diaduk sampai homogen. Sisa aquades ditambahkan sedikit-sedikit sampai homogen. Formula pembuatan gel dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Formula pembuatan gel fraksi air umbi bidara upas

Bahan	Fungsi	Formula I	Formula II	Formula III
HPMC		1,5 g	-	-
Karbopol	<i>Gelling agent</i>	-	1,5 g	-
Na-CMC		-	-	5 g
Trietanolamin	<i>Alkalizing agent</i>	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Propilen glikol	Kosolven	20 g	20 g	20 g
Fraksi air	Bahan aktif	10 g	10 g	10 g
Aquades	Pembawa	68 g	68 g	64,5 g

3.8.7 Penginduksian Diabetes Melitus (DM) pada Tikus

Tikus dipuasakan lima jam sebelum induksi. Tikus diinduksi secara intraperitoneal dengan larutan STZ yang dilarutkan dalam 0,05 M (pH 4,5) buffer sitrat dengan dosis 40 mg/kgBB. Tikus dikatakan mengalami diabetes jika kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL pada hari kelima setelah injeksi STZ. Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan mengambil darah pada ekor tikus yang dipotong 0,25 cm kemudian diperiksa menggunakan *glucotest* merk *easy touch*. Pemeriksaan kadar glukosa dilakukan pada hari ke-7, 13, dan 24.

3.8.8 Pembuatan Luka Eksisi

Pembuatan luka eksisi pada tikus dilakukan pada hari ke-14. Tikus dipuasakan lima jam sebelum pembiusan. pembiusan menggunakan ketamin dosis 80 mg/kgBB dan xylazin 10 mL/kgBB secara intramuskular. Rambut disekitar punggung tikus satu cm dari kolum vertebra dicukur setelah mencapai keadaan hipostesia, kemudian diberi stempel cetakan luka 2 x 2 cm. Kulit diangkat

menggunakan pinset dan digunting pada daerah tersebut dari lapisan epidermis sampai lapisan subkutan beserta jaringan ikat dibawahnya.

3.8.9 Pengambilan Jaringan Kulit Luka

Pengambilan jaringan kulit luka dilakukan pada hari ke 24. Tikus diterminasi menggunakan eter. Jaringan kulit luka diambil dan difiksasi dalam buffer formalin 10% untuk membuat preparat imunohistokimia.

3.8.10 Pengamatan Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF menggunakan pewarnaan imunohistokimia dilakukan menggunakan kit imunohistokimia (*Biossusa*) dengan antibodi *rabbit polyclonal* pengenceran 1:100. Antibodi poliklonal tersebut spesifik terhadap VEGF. Antibodi VEGF yang digunakan diperoleh dengan menyuntikkan antigen VEGF pada kelinci. Dalam beberapa minggu, kelinci akan menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap VEGF. Respon antibodi poliklonal ini secara tipikal sama dengan respon antibodi manusia terhadap antigen. Antiserum yang diambil dari kelinci mengandung antibodi dari banyak klon sel B, dengan setiap sel B merespon epitop spesifik pada antigen VEGF (LibreTexts, 2018).

Ekspresi VEGF dilihat menggunakan mikroskop Olympus CX21LED perbesaran 400x pada lima lapang pandang dengan bantuan *software ImageJ*. Perhitungan ekspresi VEGF menggunakan metode kuantitatif. Skor histologi digunakan dalam perhitungan ekspresi VEGF ini dengan mengalikan persentase area yang terpulas coklat dengan intensitas warna coklat pada lapang pandang (Setiabudi, 2005; Chung *et al.*, 2014).

$$\text{Skor} = (\text{IK} \times \text{PK}) + (\text{IS} \times \text{PS}) + (\text{IL} \times \text{PL})$$

Keterangan :

IK	= Intensitas Kuat
PK	= Persentase Kuat
IS	= Intensitas Sedang
PS	= Persentase Sedang
IL	= Intensitas Lemah
PL	= Persentase Lemah

Intensitas warna dapat diketahui sebagai nilai kuantitatif dan dapat dinilai sebagai berikut (Maae *et al.*, 2011).

- 1 = intensitas lemah/normal
- 2 = intensitas sedang
- 3 = intensitas kuat

3.9 Analisis Data

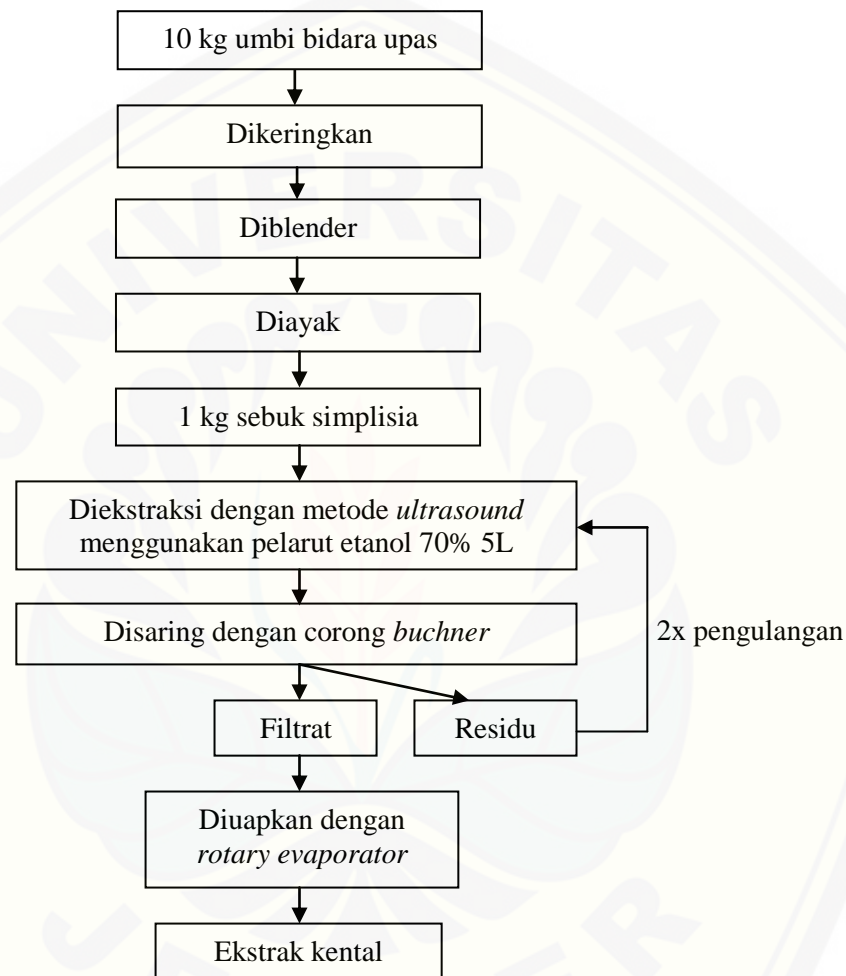
Analisis data penelitian ini menggunakan program SPSS versi 21.0. Data hasil pengukuran ekspresi VEGF diuji secara statistik menggunakan *Shapiro Wilk* untuk menguji normalitas data karena sampel <50 dan uji *Lavene* untuk mengetahui varian/homogenitas. Apabila data terdistribusi normal dan varian sama maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ($p < 0,05$) dan dilanjutkan uji *Post Hoc LSD* ($p < 0,05$). Apabila data terdistribusi normal dan varian berbeda maka dilanjutkan uji *One Way Anova* ($p < 0,05$) dan dilanjutkan uji *Post Hoc Tamhane's* ($p < 0,05$). Apabila data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) dan dilanjutkan uji *Post Hoc Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

3.10 Alur Penelitian

Tahapan penelitian sebagai berikut:

a. Skema Proses Ekstraksi Umbi Bidara Upas

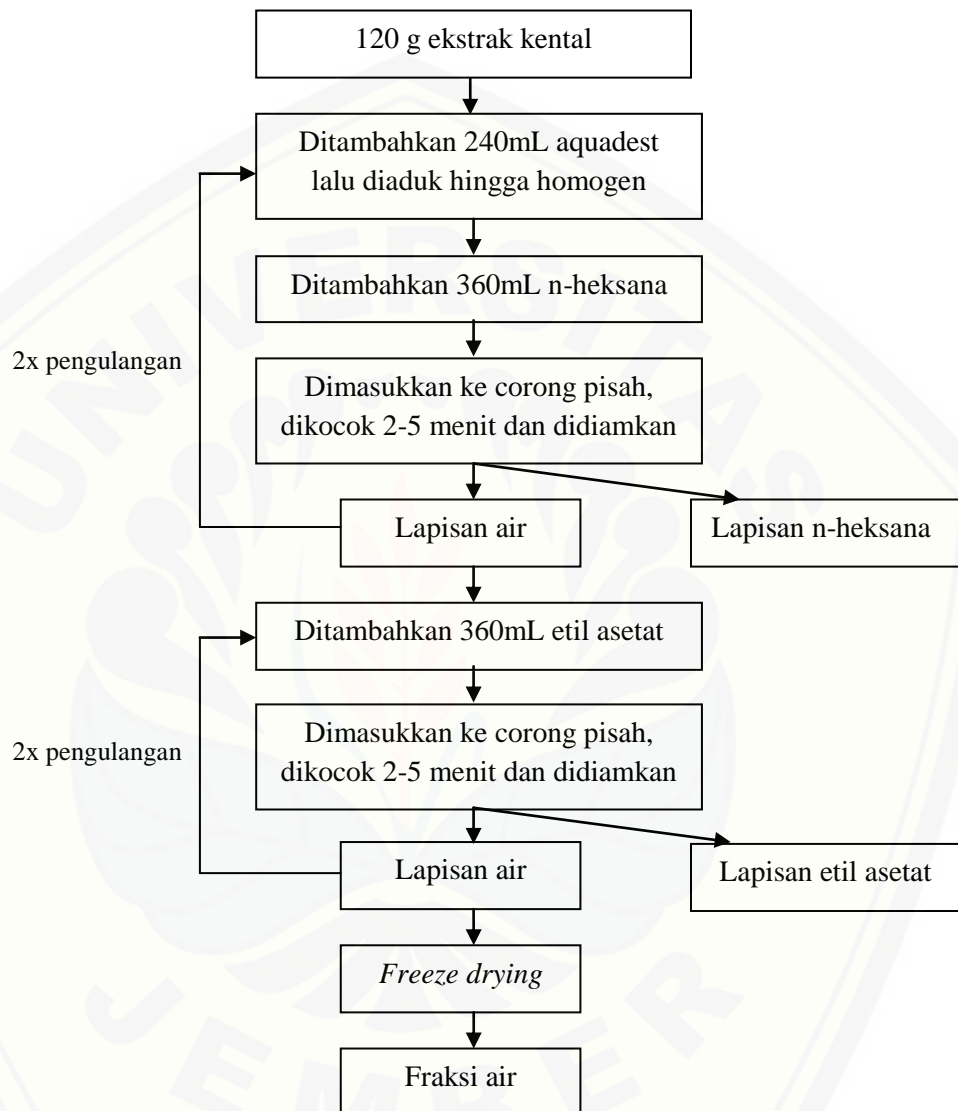
Skema proses ekstraksi umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Skema proses ekstraksi umbi bidara upas

b. Skema Prosedur Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas

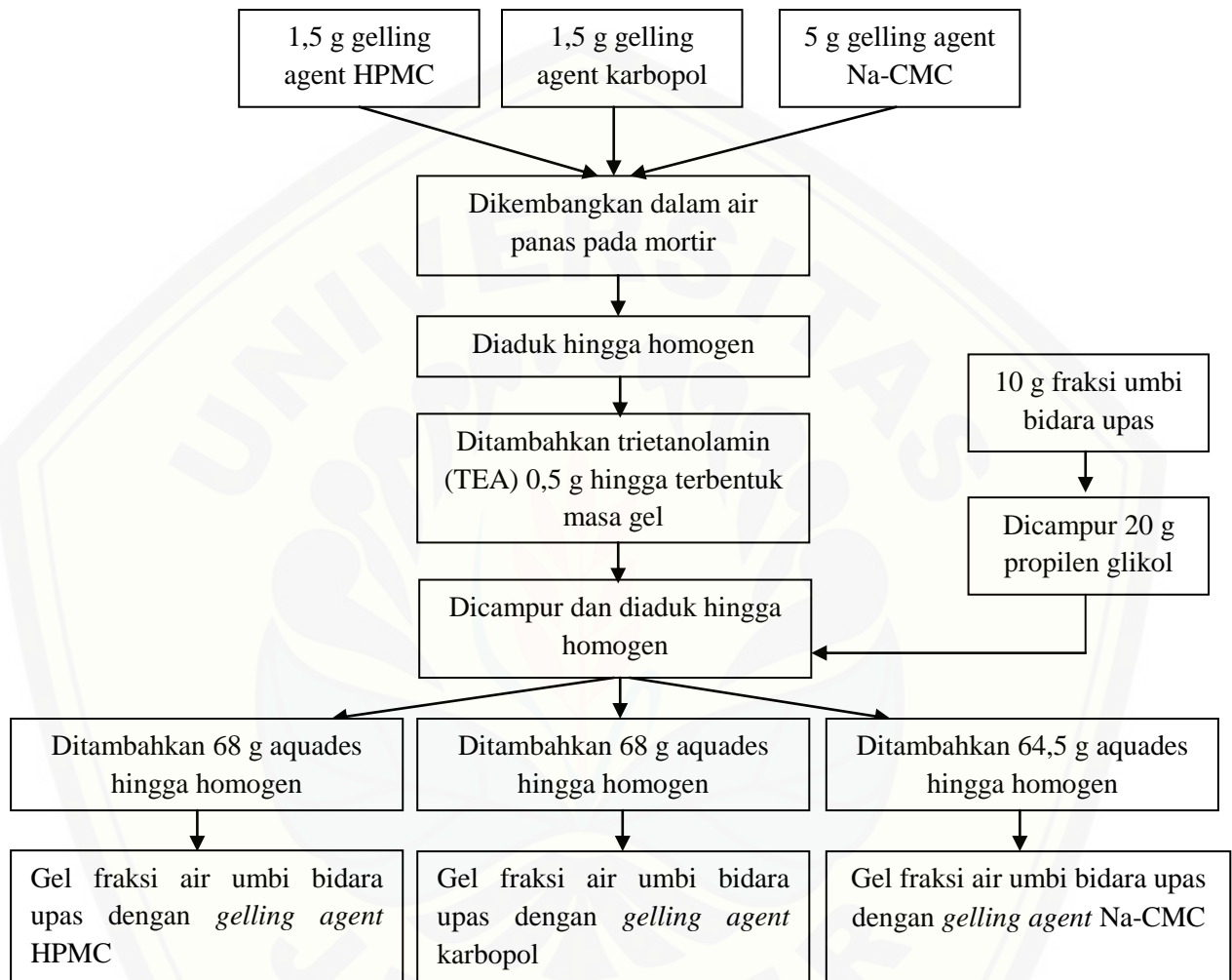
Skema prosedur fraksinasi ekstrak umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Skema prosedur fraksinasi umbi bidara upas

c. Skema Prosedur Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas

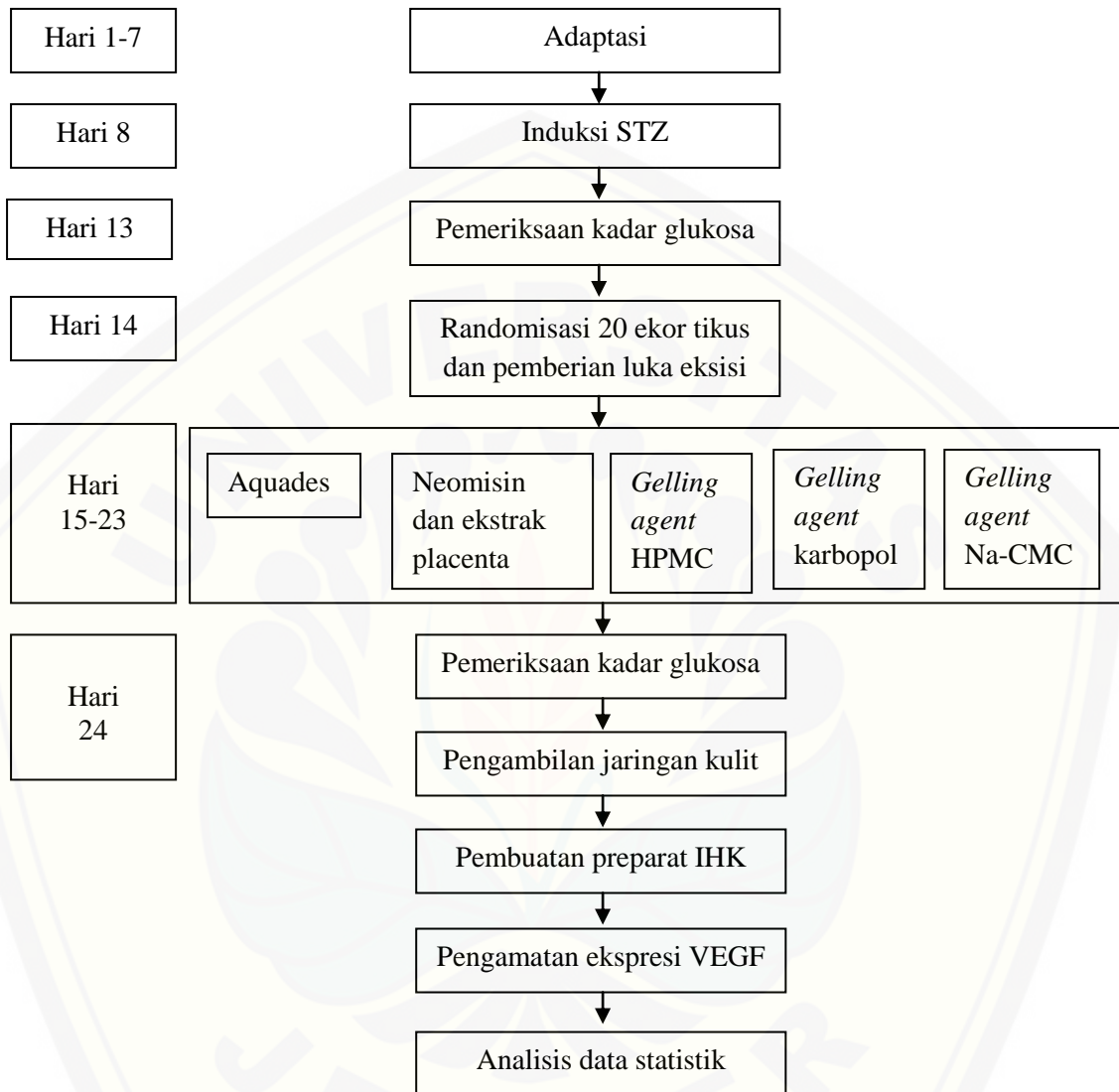
Skema prosedur pembuatan gel fraksi air umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Skema prosedur pembuatan gel fraksi air umbi bidara upas

d. Skema Prosedur Penelitian

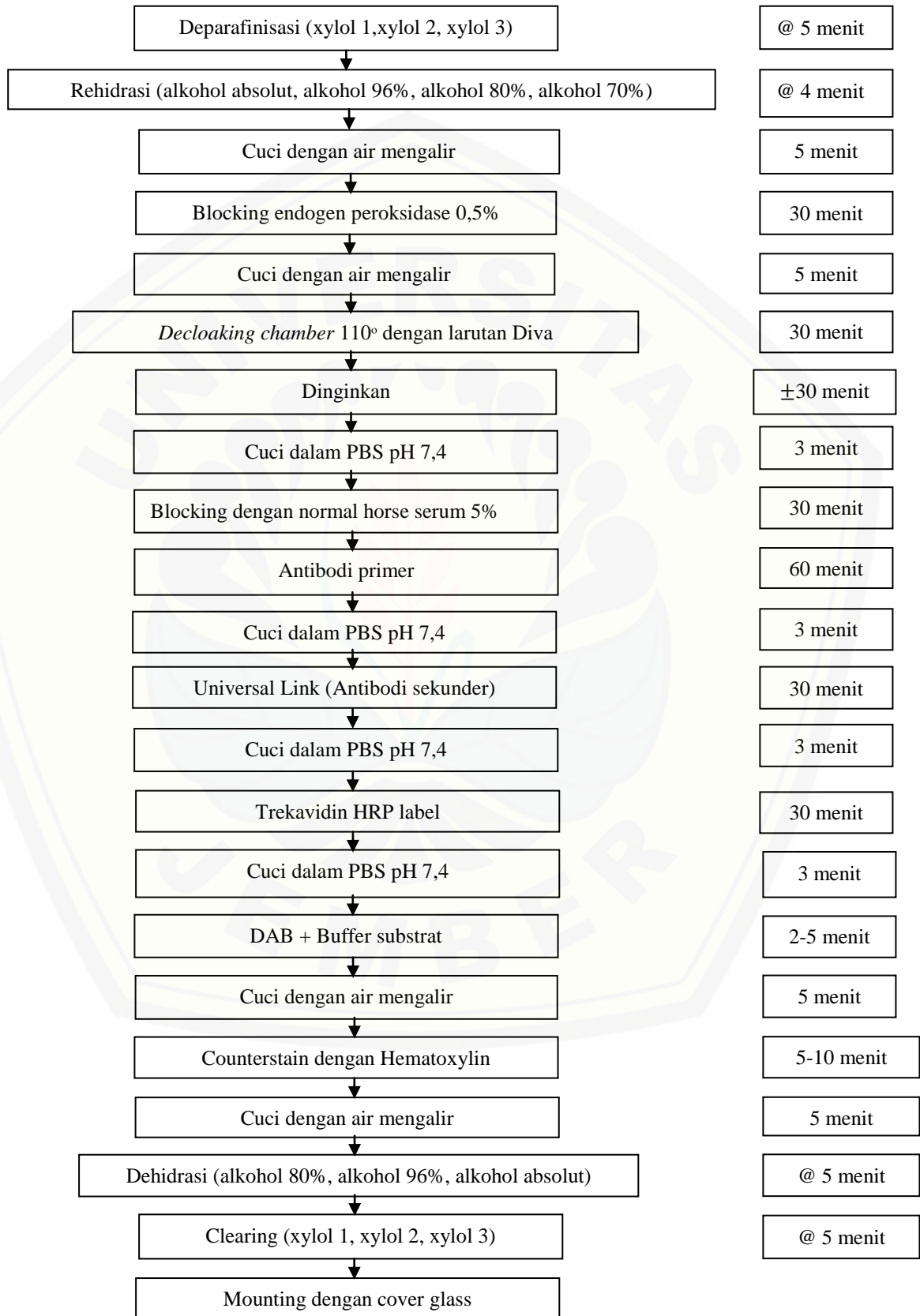
Skema Prosedur prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Skema prosedur penelitian

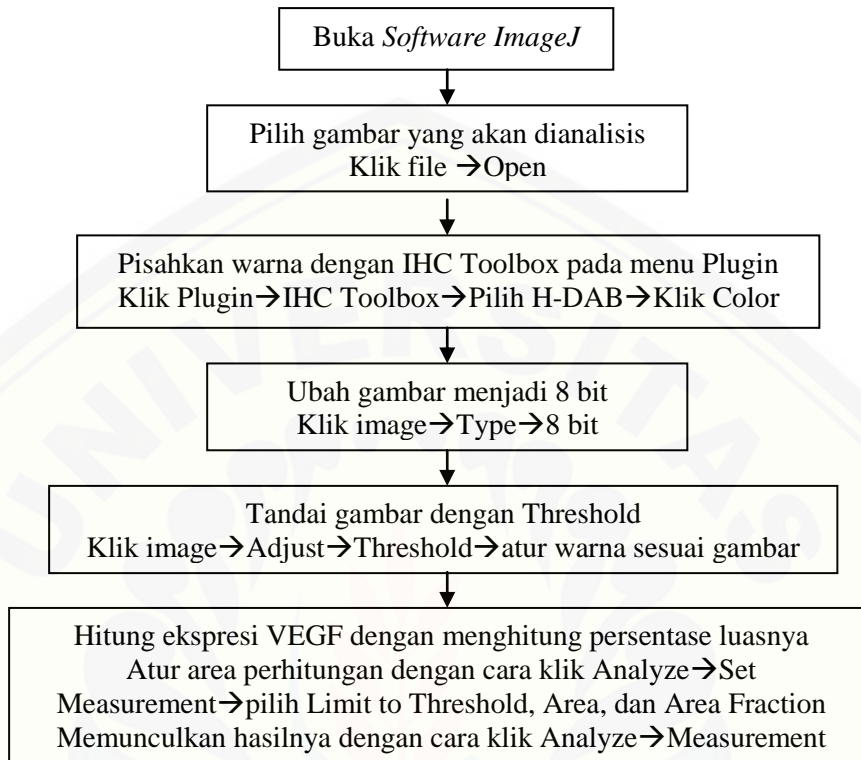
e. Skema Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHK)

Skema prosedur pembuatan preparat IHK dapat dilihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Skema prosedur pembuatan preparat IHK

- f. Skema Prosedur Perhitungan Ekspresi VEGF dengan *Software ImageJ*
Skema prosedur perhitungan ekspresi VEGF dengan *software imageJ* dapat dilihat pada Gambar 3.7.



Gambar 3.7 Skema prosedur perhitungan ekspresi VEGF dengan *software imageJ*

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok: 1) HPMC dan karbopol; 2) karbopol dan Na-CMC; 3) Na-CMC dan HPMC
2. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol positif dengan: 1) HPMC; 2) karbopol; 3) Na-CMC
3. Terdapat perbedaan yang signifikan pada penyembuhan luka diabetik derajat 2 antara kelompok kontrol negatif dengan: 1) HPMC; 2) karbopol; 3) Na-CMC

5.2 Saran

5.2.1 Saran Teoritis

1. Pemilihan *gelling agent* HPMC, karbopol, atau Na-CMC untuk gel fraksi air umbi bidara upas dapat dipertimbangkan dengan melihat faktor lain seperti efek samping dan harga *gelling agent*.
2. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan uji stabilitas fisik, uji toksisitas, dan standarisasi dari gel fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)).

5.2.2 Saran Praktis

Penderita luka diabetik derajat 2 dapat mempertimbangkan pemilihan obat topikal yang memiliki aktivitas komprehensif dan sesuai dengan kondisi luka diabetik seperti gel fraksi air umbi bidara upas. Obat topikal yang digunakan selama ini kurang sesuai dengan kondisi luka diabetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. t, th. Immunohistochemistry Application Guide. Biotechnology Company. <https://www.abcam.com/protocols/immunohistochemistry-ihc-application-guide>.
- Akhsanita, M. 2012. Uji Sitotoksik Ekstrak, Fraksi, dan Sub-Fraksi Daun Jati (*Tectona grandis Linn. F.*) dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Bioassay*. Skripsi. Padang: Universitas Andalas.
- Albu, S., E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, dan T J. Mason. 2004. Potential for The Use of Ultrasound in The Extraction of Antioxidants from *Rosmarinus Officinalis* for The Food and Pharmaceutical Industry. *Ultrason. Sonochem*, 11, 261–265.
- Altemimi, A., N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D. Watson, dan D. Lightfoot. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.5912/jcb722>.
- Amaliya, S., B. Soemantri, dan Y. W. Utami. 2013. Efek ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dalam mempercepat penyembuhan luka terkontaminasi pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar. *Jurnal Ilmu Keperawatan* 1 (1):19-25
- American Diabetes Association. 2018. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes; 41(Suppl. 1):S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.
- Amin, J. E. 2014. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Basis Sediaan Gel Ekstrak Daun Botto'-Botto' (*Chromolaena Odorata (L.)*) sebagai Obat Luka terhadap Stabilitas Fisik Sediaan. Skripsi. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin.
- Ardana, M., V. Aeyni, dan A. Ibrahim. 2015. Formulasi dan Optimasi Basis Gel HPMC (Hidroxy Propyl Methyl Cellulose) dengan Berbagai Variasi Konsentrasi. *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*, 3(2), 101–108. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v3i2.95>.
- Astuti, D. P. 2017. Formulasi dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Antiseptik Tangan Minyak Atsiri Bunga Lavender (*Lavandula angustifolia Miller*). *Jurnal Farmaka*, 15(1), 176–184.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2), 53–61.

- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. *Laporan Nasional 2013*, 1–384. <https://doi.org/10.24063/j.kesdas.v1i1.1> Desember 2013.
- Barbero, G.F., A. Liazid, M. Palma, dan C. G. Barroso. 2008. Ultrasound-Assisted Extraction of Capsaicinoids from Peppers. *Talanta*, 75, 1332–1337.
- Bao, P., A. Kodra, M. Tomic-canic, M. S. Golinko, P. Ehrlich, H. Brem, dan U. States. 2009. Research Review The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 358(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>.The.
- Bioteknologi LIPI. 2018. 9.606 Spesies Tanaman Obat Ada di Indonesia. <http://www.biotek.lipi.go.id/index.php/umum/561-9606-spesies-tanaman-obat-ada-di-indonesia>.
- Boniakowski, A. E., A. S. Kimball, A. D. Joshi, M. Schaller, J. Chung, R. Allen, dan K. A. Gallagher. 2017. Macrophage-Mediated Inflammation in Diabetic Wound Healing. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00635>.
- Budi, H. S., P. Soesilowati, dan Z. Imanina. 2017. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi pada Makrofag dan Neovaskular dengan Pemberian Getah Batang Pisang Ambon. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 3(3), 121–127. <https://doi.org/http://doi.org/10.22146/majkedgiind.17454>.
- Chakraborty, P. D. dan D. Bhattacharyya. 2012. Aqueous Extract of Human Placenta as a Therapeutic Agent.
- Chatzigeorgiou, A., A. Halapas, K. Kalafatakis, dan E. F. Kamper. 2009. The Use of Animal Models in The Study of Diabetes Mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245–258. <https://doi.org/23/2/245> [pii] ET - 2009/05/06.
- Cherigo, L., R. Pereda-miranda, M. Frago-so-serrano, N. Jacobo-herrera, dan G. W. Kaatz. 2008. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.*, 71(6). 1037–1045.
- Chin, L. C. H. dan A. J. M. Boulton. 2009. The Diabetic Foot: Epidemiology, Risk Factors, and Standards of Care.
- Chung, J. Y., T. Braunschweig, S. M. Hong, D. S. Kwon, S. H. Eo, H. J. Cho, dan S. M. Hewitt. 2014. Assessment of Vascular Endothelial Growth Factor in Formalin Fixed, Paraffin Embedded Colon Cancer Specimens by Means of A Well-Based Reverse Phase Protein Array. *Proteome Science*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-27>.

- Cho, W.I., J. B. Choi, K. Lee, M. S. Chung, dan Y. R. Pyun. 2008 Antimicrobial Activity of Torilin Isolated from Torilis Japonica Fruit Against Bacillus Subtilis. *J. Food Sci*, 73, 37–46.
- Clayton, W. dan T. A. Elasy. 2009. A Review of the Pathophysiology, Classification, and Treatment of Foot Ulcers in Diabetic Patients, 27(2), 52–58. <https://doi.org/10.2337/diaclin.27.2.52>.
- Corrales, M., S. Toepfl, P. Butz, D. Knorr, dan B. Tauscher. 2008. Extraction of Anthocyanins from Grape by-Products assisted by Ultrasonics, High Hydrostatic Pressure or Pulsed Electric Fields: A Comparison. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 85–91.
- Destri, Ch., I. K. Suidiana, dan J. Nugraha. 2017. Potensi Ekstrak *Jatropha multifida* terhadap Ekspresi VEGF Aphthous Ulcer Rat Norvegicus. *Jurnal SainHealth*, 1(2), 5-12. ISSN : 2549-2586.
- Djawa, F. M. dan I. Susilo. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal Low Molecular Weight Hyaluronate pada Ekspresi VEGF Luka Superfisial yang Dirawat dengan Membran Amnion Freeze-Dried. *Majalah Patologi Indonesia*, 22(1), 37–42.
- 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. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Finley, P. J., C. E. DeClue, S. A. Sell, J. M. DeBartolo, dan L. P. Shornick. 2015. Diabetic Wounds Exhibit Decreased Ym1 and Arginase Expression with Increased Expression of IL-17 and IL-20. *Advances in Wound Care*, 5(11), 486–494. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0676>.
- Fujiastuti, T., dan Sugihartini, S. 2015. Sifat fisik dan daya iritasi gel ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica L.*) dengan variasi jenis gelling agent. *Pharmacy*, 12(01), 11–20. ISSN 1693-3591.
- Gonzalez, A. C. de O., T. F. Costa, Z. de A. Andrade, dan A. R. A. P. Medrado. 2016. Wound Healing-A Literature Review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- Goud, B. J., V. Dwarakanath, dan B. K. Chikka-swamy. 2015. Streptozotocin - A Diabetogenic Agent in Animal Models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 3(1), 253–269. <https://doi.org/23497203>.

- Guo, S. dan L. A. DiPietro 2010. Critical Review in Oral Biology & Medicine: Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 2014. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 12. Singapore: Elsevier.
- Handayani, D., V. Paramita, dan L. Faizah. 2015. Peningkatan Kadar Zingiberen dalam Minyak Jahe dengan Ekstraksi Cair-Cair, 44–50. ISBN 978-602-99334-4-4.
- Handayani, L. T. 2016. Studi Meta Analisis Perawatan Luka Kaki Diabetes dengan Modern Dressing. *The Indonesian Journal of Health Science*, 6(2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.07.029>.
- Hidayah, U. N. W. 2013. Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica L. urban*) dengan HPMC Sh 60 sebagai Gelling Agent dan Uji Penyembuhan Luka Bakar pada Kulit Punggung Kelinci Jantan. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Hidayat, K., U. Elfiah, dan K. Sofiana. 2015. Jumlah Makrofag pada Luka Insisi Full Thickness yang diberi Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) pada Tikus Wistar Jantan. 3(3), 1–5.
- Husnani dan Muazham, M. F. A. Optimasi Parameter Fisik Viskositas, Daya Sebar dan Daya Lekat pada Basis Natrium CMC dan Carbopol 940 pada Gel Madu dengan Metode Simplex Lattice Design, 11–18.
- Ibrahim, A. 2015. Formulasi dan Optimasi Basis Gel HPMC (Hidroxy Propyl Methyl Cellulose) dengan Berbagai Variasi Konsentrasi. doi: 10.25026/jtpc.v3i2.95.
- IDF. 2017. IDF Diabetes Atlas *Eighth edition*. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).
- Johnson, K. E. dan T. A. Wilgus,. 2013. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Wound Healing Society*,3(10). 647-661. doi : 10.1089/wound.2013.0517.
- Julianto, I. G. P., 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, 5–8.
- Kartika, R. W. 2017. Pengelolaan Gangren Kaki Diabetik. *Countinuing Medical Education*, 44(1), 18–22.

- Kartikaningtyas, A. T. dan Lastianny, P. 2015. Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit Citrus Sinensis terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus Sprague Dawley, *1*(1), 86–93.
- Katzung, Bertram G., S. B. Masters, dan A. J. Trevor. 2012. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Vol.2 Edisi 12. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kemendes RI. 2014. Situasi dan Analisis Diabetes. *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. <https://doi.org/24427659>.
- Kermany, B. P. 2010. Carbopol Hydrogels for Topical Administration: Treatment of Wounds. *Thesis*. Faculty of Health Sciences University of Tromsø.
- Khasanah, N. 2016. Pengaruh Konsentrasi Polimer Karbopol 940 sebagai *Gelling Agent* terhadap Sifat Fisik Emulgel Gamma-Oryzanol. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Kim, S.-W., J. Roh, dan C.-S. Park. 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, *50*(6), 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>.
- King, A. J. F. 2012. The Use of Animal Models in Diabetes Research. *British Journal of Pharmacology*, *166*(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>.
- Kirsch, M., dan H. D. E. Groot. 2001. NAD (P) H, a directly operating antioxidant?.1569–1574.
- Kolluru, G. K., S. C. Bir, dan C. G. Kevil. 2012. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*, 2012. doi: 10.1155/2012/918267.
- Kumar, V., A. K. Abbas, dan J. C. Aster. 2014. *Buku Ajar Patologi Robbins*. Edisi 9. Singapura: Elsevier.
- Langi, Y. A. 2011. Penatalaksanaan Ulkus Kaki Diabetes Secara Terpadu. *Jurnal Biomedik*, *3*(Dm), 95–101.
- LibreText. 2018. Practical Application of Monoclonal and Polyclonal Antibodies. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(OpenStax\)/20%3A_Laboratory_Analysis_of_the_Immune_Response/20.1%3A_Practical_Applications_of_Monoclonal_and_Polyclonal_Antibodies](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(OpenStax)/20%3A_Laboratory_Analysis_of_the_Immune_Response/20.1%3A_Practical_Applications_of_Monoclonal_and_Polyclonal_Antibodies). [diakses pada 18 Januari 2019].

- Lin, C., G. Yin, M. Ou, dan S. Zheng. 2017. The effects of HIF-1 α and VEGF on Wound Healing in Diabetic Mice. *Biomedical Research (India)*, 28(18), 8121–8124.
- Lubrizol. 2011. *Polymers for Pharmaceutical Applications*. Ohio: Pharmaceutical Bulletin 1.
- Maae, E., M. Nielsen, K. D. Steffensen, E. H. Jakobsen, A. Jakobsen, dan F. B. Sørensen. 2011. Estimation of Immunohistochemical Expression of VEGF in Ductal Carcinomas of The Breast. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(8), 750–760. <https://doi.org/10.1369/0022155411412599>.
- MaHTAS. 2018. Management of Diabetic Foot. Malaysian Health Technology Assessment Section (MaHTAS).
- Mahalingam, R., X. Li, dan B. R. Jasti. 2008. *Semisolid Dosages: Ointments, Creams and Gel*. Dalam *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Marchianti, A. C. N., E. U. Ulfa, dan E. N. Sakinah. 2018. The Dose Dependence Analysis of The Water Fraction of *Merremia Mammosa (Lour.)* Extract on Diabetic Wound Healing Enhancement. *Hiroshima journal Medical Science*. 67:29-34.
- Maulina, L. dan N. Sugihartini. 2015. Formulasi Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan Variasi Gelling Agent sebagai Sediaan Luka Bakar. *Pharmacia*, 5, 43–52. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v5i1.2285>.
- Mazni, R. 2008. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa Chois*) terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia Coli* serta *Brine Shrimp Lethality Test*. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Miryanti, A., L. Sapei, K. Budiono, dan S. Indra. 2011. Ekstraksi Antioksidan dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*).
- Moldoveanu, S. dan V. David. 2015. *Solvent Extraction. Modern Sample Preparation for Chromatography*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54319-6.00006-2>.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Journal Kesehatan*, VII(2), 361–367. <https://doi.org/10.24817/jkk.v3i2.2728>.

- Mulinacci, N., D. Prucher, M. Peruzzi, A. Romani, P. Pinelli, C. Giaccherini, dan F. F. Vincieri. 2004. Commercial and Laboratory Extracts from Artichoke Leaves: Estimation of Caffeoyl Esters and Flavonoidic Compounds Content. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 349–357.
- Musfiroh, I., A. N. Hasanah, dan I. Budiman. 2013 The Optimization of Sodium Carboxymethyl Cellulose (Na-CMC) Synthesized from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes (Mart.) Solm*) Cellulose. *RJPBCS*. 4: 1092- 1099.
- Nafsiah, L. 2015. Pengaruh Ekstrak Batang Karamunting (*Melastoma malabathricum Linn.*) terhadap Proses Penyembuhan Luka pada Kulit Mencit (*Mus musculus L.*), 1(1).
- Nugroho, A. M., U. Elfiah, dan R. Normasari. 2016. Pengaruh Gel Ekstrak dan Serbuk Mentimun (*Cucumis sativus*) terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat IIB pada Tikus Wistar, 4(3), 443–448.
- Nur, N. N. 2017. Perbedaan Penyembuhan Luka Sayat Secara Makroskopis antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia dengan Gel Bioplacenton pada Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*) Galur *Sprague Dawley*. *Skripsi*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- 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. A. dan L. A. Dipietro. 2017. Diabetes and Wound Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18071419>.
- Perkeni. 2015. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia 2015. ISBN: 978-979-19388-6-0.
- Plantamour. 2012. Bidara Upas (*Merremia mammosa*). <http://plantamor.com/species/info/merremia/mammosa>.
- Purnama, H., Sriwidodo, dan S. Ratnawulan. 2017. Review Sistematis: Proses Penyembuhan dan Perawatan Luka. *Farmaka*, 4, 1–15.
- Purnamasari, D. 2014. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi VI. Jakarta: InternaPublishing.
- Ratnasari, P. 2016. Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien Diabetik *Foot Ulcer*. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.

- Rismana, E., I. Rosidah, Y. Prasetyawan, O. Bunga, dan Y. Erna. 2013. Efektivitas khasiat pengobatan luka bakar sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pagagan berdasarkan analisis hidroksiprolin dan histopatologi pada kulit kelinci. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 41(1), 45–60.
- Rohilla, A. dan S. Ali. 2012. Alloxan Induced Diabetes : Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*, 3(2), 819–823.
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, dan M. E. Quinn. 2009. Handbook of Pharmaceutical Sixth Edition. London: Pharmaceutical Press Excipients.
- Sakinah, E. N., E. U. Ulfa, dan A. C. N. Marchianti. 2018. The Effectiveness of *Merremia mammosa (Lour.)* Extract Fraction as Diabetic Wound Healers on Diabetic Rat Model. *Hiroshima J. Med. Sci*, 67, 70-77.
- Samiasih, A. 2010. Perbedaan Ekspresi VEGF Sel Adenokarsinoma Kolorektal Tikus *Sprague Dawley* dengan dan Tanpa Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri*. *Universitas Stuttgart*.
- Sari, R., S. N. Nurbaeti, dan L. Pratiwi. 2016. Optimasi Kombinasi Karbopol 940 dan HPMC terhadap Sifat Fisik Gel Ekstrak dan Fraksi Metanol Daun Kesum (*Polygonum minus Huds.*) dengan Metode *Simplex Lattice Design*. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(2), 72–79. <https://doi.org/10.7454/psr.v3i2.3288>.
- Sayuti, N. A. 2015. Formulasi dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata L.*). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 5(2), 74–82.
- Seitz, O., C. Schürmann, N. Hermes, E. Müller, J. Pfeilschifter, S. Frank, dan I. Goren. 2010. Wound Healing in Mice with High-Fat Diet- or Ob Gene-Induced Diabetes-Obesity Syndromes: A Comparative Study. *Exp. Diabetes Res*.
- Setiabudi, A. 2005. Perbandingan Ekspresi Sel T CD4+ di Jaringan Sekitar Luka dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain pada Nyeri Pasca Insisi. *Tesis*. Semarang: Program Magister Ilmu Biomedik dan PPDS I Universitas Diponegoro.
- Simon, P. E. 2016. Skin Wound Healing. *Medscape*, 1–12. Retrieved from <https://emedicine.medscape.com/article/884594>.
- Shahbazian, J. H., T.L. Hartzell, dan A. K. Pandey. 2012. Allergic Dermatitis Due to Topical Antibiotics, *XIII*, 380–382. <https://doi.org/10.5811/westjem.2011.9.6851>.

- Shokri, J. dan K. Adibkia. 2013. Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. *Intech*, 47-66.
- Shukla, V. K., M. A. Rasheed, M. Kumar, S. K. Kumar, dan S. S. Pandey. 2004. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. *Journal of Wound Care*, 5(13): 177-179.
- Sinno H, dan S. Prakash. 2013. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast Surg Int 2013 (Article):146764*.
- Sitompul, Y., B. Budiman, S. Soebardi, dan M. Abdullah. 2014. Profil Pasien Kaki Diabetes yang Menjalani Reamputasi di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo Tahun 2008 -2012. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, 2(1), 9-14. Retrieved from <http://www.jurnalpenyakitdalam.com/index.php/jpdi/article/view/75>.
- Soelistijo, S. A., H. Novida, A. Rudijanto, P. Soewondo, K. Suastika, A. Manaf, dan H. Zufry. 2015. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia 2015*.
- Suyono, S. 2015. Diabetes Melitus di Indonesia. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi VI. Jakarta: Interna Publishing.
- Tabaraki, R. dan A. Nateghi. 2011. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from Rice Bran Using Response Surface Methodology. *Ultrason. Sonochem*, 18, 1279-1286.
- Ukhrowi, U. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) terhadap Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag Studi pada mencit Balb/c yang Diinfeksi Salmonella typhimurium. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Wardiyah, S. 2015. Perbandingan Sifat Fisik Sediaan Krim, Gel, dan Salep yang Mengandung Etil P-Metoksisinamat dari Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia galangan Linn*).
- Waspadji, S. 2015. Kaki Diabetes. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi VI. Jakarta: InternaPublishing.
- Wijaya, H. dan L. Junaidi. 2011. Antioksidan: Mekanisme Kerja dan Fungsinya dalam Tubuh Manusia. *Journal of Agro-based Industry*, 28(2), 44-45.
- World Health Organization. 2016. Global Report on Diabetes. ISBN, 978, 88. <https://doi.org/ISBN 978 92 4 156525 7>.

Wulandini, P., R. Saputra, dan H. Basri. 2016. Hubungan Pengetahuan Penderita Diabetes Melitus terhadap Kejadian Luka Diabetes Melitus di Ruang Penyakit Dalam RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.

Yoshikawa, K., C. Yagi, H. Hama, M. Tanaka, S. Arihara, dan T. Hashimoto. 2010. Ipomotaosides A - D , Resin Glycosides from the Aerial Parts of *Ipomoea batatas* and Their Inhibitory Activity against COX-1 and COX-2, 70, 1763–1766.



Lampiran A. Lembar 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 : 1.233/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 GEL FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa (Lour)*)
TERHADAP EKSPRESI VEGF PADA PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK DERAJAT
2**

Nama Peneliti Utama : Nurin Kamila S.P.
Name of the principal investigator

NIM : 152010101128

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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



Jember, 13.01.2019
Ketua Komisi Etik Penelitian

Dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran B. Dokumentasi Penelitian

a. Proses Ekstraksi



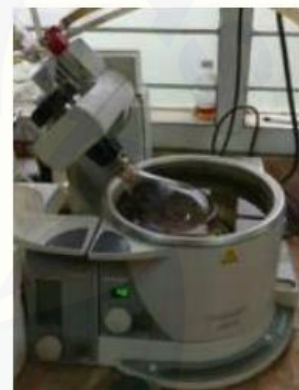
Penimbangan serbuk
simplisia umbi bidara upas



Penyaringan hasil ekstraksi
dengan corong Buchner



Penambahan etanol 70%



Penguapan dengan *rotary
evaporator*



Proses ekstraksi dengan
ultrasound

b. Fraksinasi Umbi Bidara Upas



Penambahan aquades dalam corong pisah yang berisi ekstrak umbi bidara



Proses pemisahan lapisan ke dalam gelas beker



Proses pengocokan pada corong pisah



Penguapan dengan *rotary evaporator*



Hasil *freeze drying* fraksi air umbi bidara upas

c. Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas



Fraksi air umbi bidara upas



Gelling agent

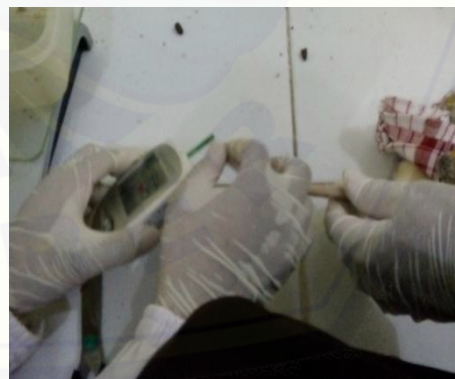


Pengadukan campuran bahan

d. Perlakuan pada Tikus



Pengukuran BB tikus



Pengukuran GDA tikus



Tempat pemeliharaan tikus



Induksi ketamin dan xylazin



Pencukuran rambut tikus



Pencetakan luka eksisi dengan stempel



Eksisi luka punggung tikus



Pengolesan gel pada luka



Pengambilan kulit setelah terminasi

Lampiran C. Data Penelitian

a. Data Ekspresi VEGF

Kelompok	Lapang Pandang	Kuat	Lemah	Sedang	Skor Histologi
C(-)1	1	1.731	26.695	5.159	42.206
	2	2.703	19.392	3.827	35.155
	3	3.511	15.355	7.339	40.566
	4	1.806	10.704	7.603	31.328
	5	1.779	11.517	6.144	29.142
C(-)2	1	2.43	6.288	6.085	25.748
	2	1.018	11.612	2.364	19.394
	3	2.536	11.538	5.575	30.296
	4	0.805	7.24	8.146	25.947
	5	0.284	7.619	5.248	18.967
C(-)3	1	7.211	10.752	4.365	41.115
	2	5.946	4.574	3.25	28.912
	3	2.976	7.658	3.277	23.14
	4	7.33	4.524	3.409	33.332
	5	4.07	7.505	4.399	28.513
C(-)4	1	6.921	6.475	6.794	40.826
	2	5.111	5.918	0.204	21.659
	3	3.8	13.789	4.739	34.667
	4	3.749	8.27	4.19	27.897
	5	2.512	5.713	3.03	19.309
C(+1)	1	5.195	13.354	14.61	58.159
	2	7.208	10.546	12.391	56.952
	3	4.57	14.835	18.171	64.887
	4	7.296	5.587	12.642	52.759
	5	8.06	10.731	8.173	51.257
C(+2)	1	2.616	9.379	11.684	40.595
	2	5.893	11.49	9.18	47.529
	3	7.864	10.783	15.255	64.885
	4	3.141	9.026	15.807	50.063
	5	3.465	8.698	9.019	37.131
C(+3)	1	3.415	8.597	9.006	36.854
	2	2.423	9.811	18.003	53.086
	3	2.516	5.777	16.556	46.437
	4	4.159	8.303	13.14	47.06
	5	3.831	5.368	20.482	57.825
C(+4)	1	1.247	8.989	11.98	36.69
	2	1.303	7.423	16.696	44.724

	3	1.474	8.189	12.713	38.037
	4	2.307	6.31	9.311	31.853
	5	5.55	8.33	11.109	47.198
T1.1	1	5.255	13.085	18.037	64.924
	2	2.546	11.635	21.861	62.995
	3	3.674	8.625	15.863	51.373
	4	4.019	10.378	24.385	71.205
	5	5.342	14.296	24.205	78.732
T1.2	1	3.218	10.432	20.3	60.686
	2	5.411	15.84	16.118	64.309
	3	4.055	10.453	13.45	49.518
	4	5.179	11.038	17.593	61.761
	5	3.849	13.285	15.103	55.038
T1.3	1	3.286	15.984	17.278	60.398
	2	2.058	8.278	2.212	18.876
	3	3.067	9.432	8.375	35.383
	4	1.447	8.249	8.039	28.668
	5	2.079	7.409	5.265	24.176
T1.4	1	3.955	10.256	14.35	50.821
	2	2.621	11.766	10.319	40.267
	3	4.336	10.528	20.221	63.978
	4	4.581	12.844	19.415	65.417
	5	3.578	14.798	22.624	70.78
T2.1	1	4.255	13.395	10.755	47.67
	2	5.897	13.29	21.068	73.117
	3	5.165	17.539	16.364	65.762
	4	2.512	7.317	10.287	35.427
	5	4.116	15.438	14.063	55.912
T2.2	1	5.324	12.211	10.782	49.747
	2	2.987	16.066	7.558	40.143
	3	9.34	2.035	4.101	38.257
	4	1.898	10.784	8.955	34.388
	5	2.966	10.528	8.102	35.63
T2.3	1	3.071	5.288	11.527	37.555
	2	7.705	12.286	14.358	64.117
	3	5.573	11.815	12.736	54.006
	4	5.23	8.823	10.523	45.559
	5	11.444	14.199	13.026	74.583
T2.4	1	4.035	7.524	16.873	53.375
	2	2.422	9.665	12.948	42.827
	3	2.447	8.77	13.306	42.723

	4	2.951	9.867	10.13	38.98
	5	7.844	8.969	11.157	54.815
T3.1	1	1.662	14.281	7.95	35.167
	2	4.009	16.817	12.771	54.386
	3	5.009	13.533	9.865	48.29
	4	5.457	24.504	12.257	65.389
	5	2.864	16.44	10.029	45.09
T3.2	1	1.869	4.621	0.799	11.826
	2	1.241	4.756	6.448	21.375
	3	5.426	13.971	22.579	75.407
	4	2.813	18.279	11.237	49.192
	5	2.853	14.912	11.456	46.383
T3.3	1	1.031	8.65	11.4	34.543
	2	7.029	15.583	20.93	78.53
	3	6.508	18.387	20.281	78.473
	4	6.971	17.487	18.788	75.976
	5	6.132	19.022	16.996	71.41
T3.4	1	15.439	15.902	10.026	82.271
	2	8.485	13.298	16.094	70.941
	3	15.297	16.708	13.533	89.665
	4	7.162	10.295	10.792	53.365
	5	7.21	12.829	7.053	48.565

b. Data Berat Badan (BB) Tikus

Kelompok	BB (gram)
C(-)	
1	224
2	164
3	204
4	210
C(+)	
1	206
2	167
3	180
4	205
T1	
1	217
2	229
3	212
4	206

T2	
1	219
2	232
3	205
4	173
T3	
1	189
2	156
3	218
4	178

c. Data Glukosa Darah Acak (GDA) Tikus

hari ke-7		hari ke-13		hari ke-24	
Kelompok	GDA (mg/dL)	Kelompok	GDA (mg/dL)	Kelompok	GDA (mg/dL)
C(-)		C(-)		C(-)	
1	112	1	244	1	459
2	108	2	345	2	284
3	103	3	435	3	363
4	83	4	600	4	420
C(+)		C(+)		C(+)	
1	90	1	331	1	420
2	115	2	375	2	521
3	72	3	454	3	429
4	83	4	545	4	459
T1		T1		T1	
1	103	1	324	1	458
2	147	2	345	2	381
3	88	3	498	3	332
4	76	4	555	4	347
T2		T2		T2	
1	98	1	273	1	270
2	78	2	342	2	221
3	80	3	505	3	420
4	60	4	600	4	564
T3		T3		T3	
1	90	1	331	1	372
2	92	2	409	2	574
3	106	3	439	3	387
4	95	4	527	4	528

Lampiran D. Analisis Data

1.) Analisis Data Ekspresi VEGF

a. Uji normalitas data

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
skor_histologi	Kontrol Negatif	.165	4	.	.997	4	.989
	Kontrol Positif	.247	4	.	.950	4	.717
	HPMC	.369	4	.	.828	4	.163
	Karbopol	.282	4	.	.878	4	.332
	Na-CMC	.286	4	.	.869	4	.295

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances

skor_histologi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.314	4	15	.105

c. Uji *One Way Annona*

ANOVA

skor_histologi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1765.890	4	441.473	4.240	.017
Within Groups	1561.919	15	104.128		
Total	3327.809	19			

d. Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: skor_histologi

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-18.29310*	7.21554	.023	-33.6727	-2.9135
	HPMC	-24.05930*	7.21554	.005	-39.4389	-8.6797
	Karbopol	-19.32370*	7.21554	.017	-34.7033	-3.9441
	Na-CMC	-26.90625*	7.21554	.002	-42.2858	-11.5267
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	18.29310*	7.21554	.023	2.9135	33.6727
	HPMC	-5.76620	7.21554	.437	-21.1458	9.6134
	Karbopol	-1.03060	7.21554	.888	-16.4102	14.3490
	Na-CMC	-8.61315	7.21554	.251	-23.9927	6.7664
HPMC	Kontrol Negatif	24.05930*	7.21554	.005	8.6797	39.4389
	Kontrol Positif	5.76620	7.21554	.437	-9.6134	21.1458
	Karbopol	4.73560	7.21554	.522	-10.6440	20.1152
	Na-CMC	-2.84695	7.21554	.699	-18.2265	12.5326
Karbopol	Kontrol Negatif	19.32370*	7.21554	.017	3.9441	34.7033
	Kontrol Positif	1.03060	7.21554	.888	-14.3490	16.4102
	HPMC	-4.73560	7.21554	.522	-20.1152	10.6440
	Na-CMC	-7.58255	7.21554	.310	-22.9621	7.7970
Na-CMC	Kontrol Negatif	26.90625*	7.21554	.002	11.5267	42.2858
	Kontrol Positif	8.61315	7.21554	.251	-6.7664	23.9927
	HPMC	2.84695	7.21554	.699	-12.5326	18.2265
	Karbopol	7.58255	7.21554	.310	-7.7970	22.9621

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

2.) Analisis Data Kadar Glukosa Darah

a. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hari_ke_13	Kontrol Negatif	.174	4	.	.985	4	.930
	Kontrol Positif	.207	4	.	.966	4	.817
	HPMC	.274	4	.	.877	4	.324
	Karbopol	.222	4	.	.948	4	.703

	Na-CMC	.189	4	.	.991	4	.965
	Kontrol Negatif	.194	4	.	.971	4	.848
	Kontrol Positif	.235	4	.	.885	4	.362
Hari_ke_24	HPMC	.239	4	.	.898	4	.421
	Karbopol	.238	4	.	.940	4	.651
	Na-CMC	.281	4	.	.861	4	.264

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji *One Way Anova* hari ke-13

ANOVA

Hari_ke_13

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1653.800	4	413.450	.028	.998
Within Groups	220322.750	15	14688.183		
Total	221976.550	19			


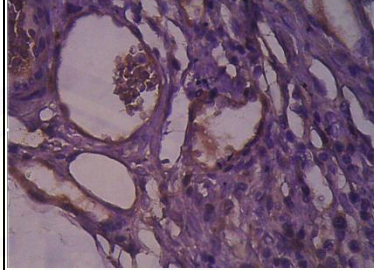
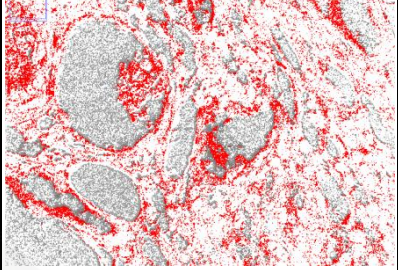

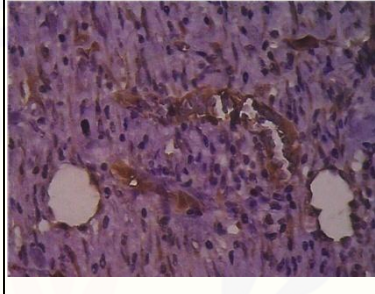
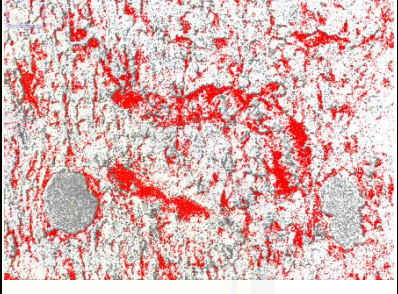

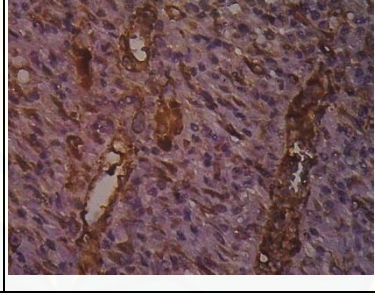
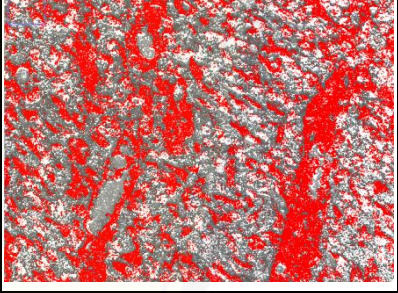

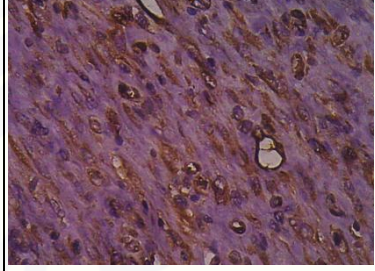
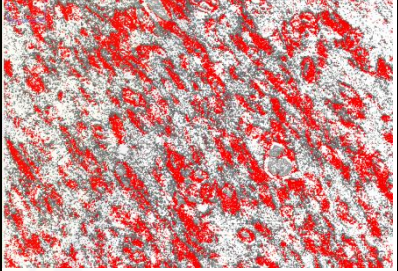

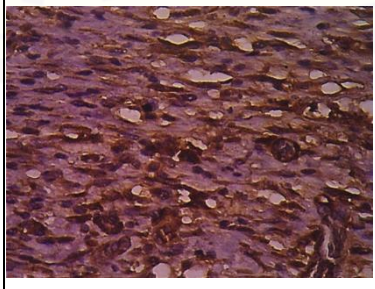

c. Uji *One Way Anova* hari ke-24

ANOVA

Hari_ke_24

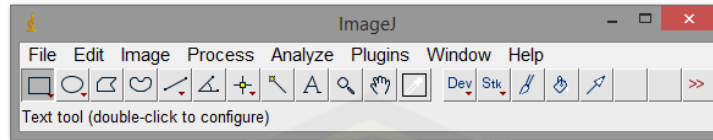
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34912.700	4	8728.175	.963	.456
Within Groups	135980.250	15	9065.350		
Total	170892.950	19			

Lampiran E. Gambaran Makroskopis Luka, Imunohistokimia, dan Ekspresi VEGF Melalui *Software Imagej*

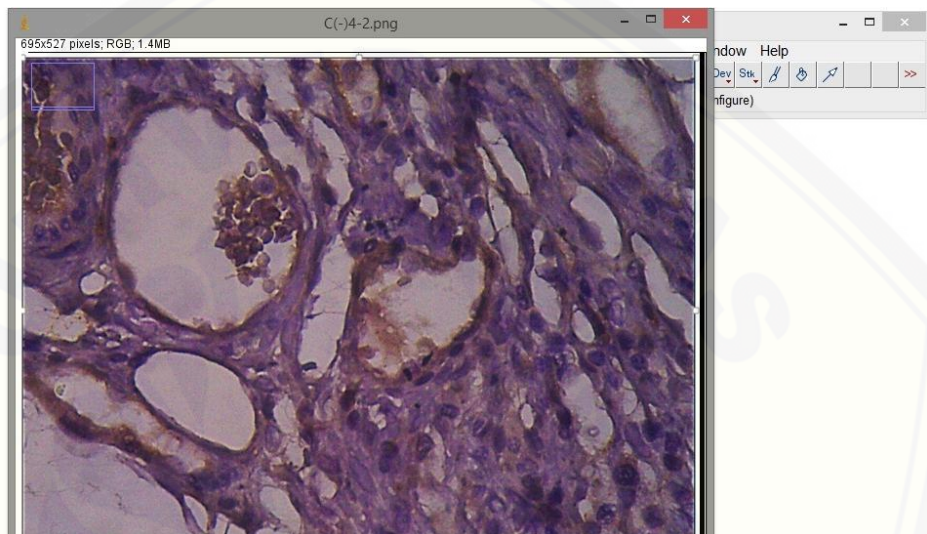
Kelompok	Makroskopis	Imunohistokimia	Ekspresi VEGF
K-			
K+			
T1			
T2			
T3			

Lampiran F. Langkah Penghitungan Ekspresi VEGF dengan *Software ImageJ*

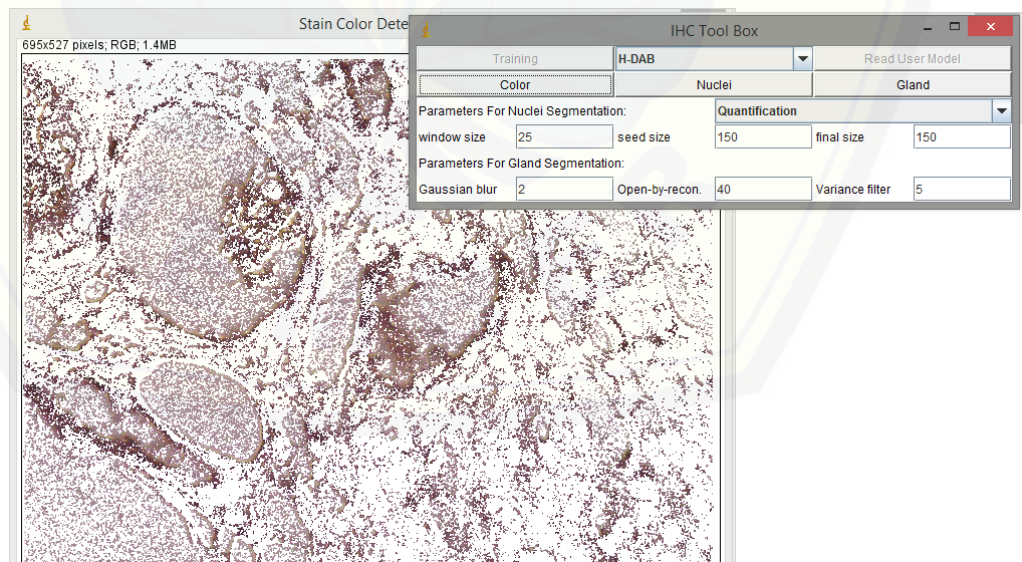
1. Buka *software imageJ*



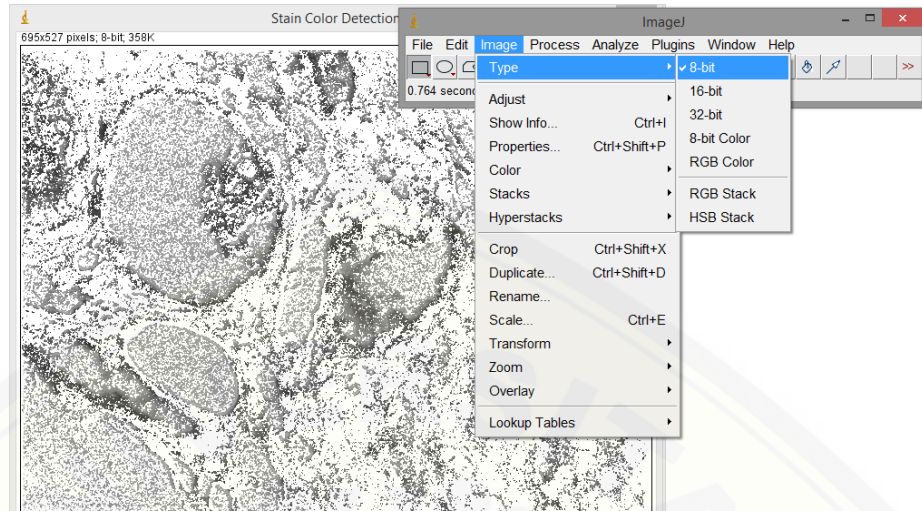
2. Klik menu File→Open→pilih gambar yang akan dianalisis



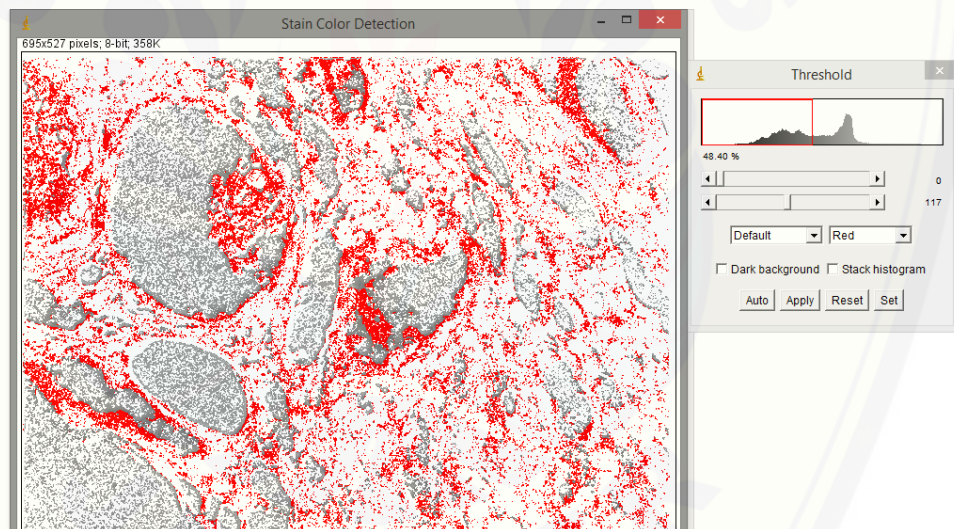
3. Klik plugins→IHC toolbox→pilih H-DAB→klik Color



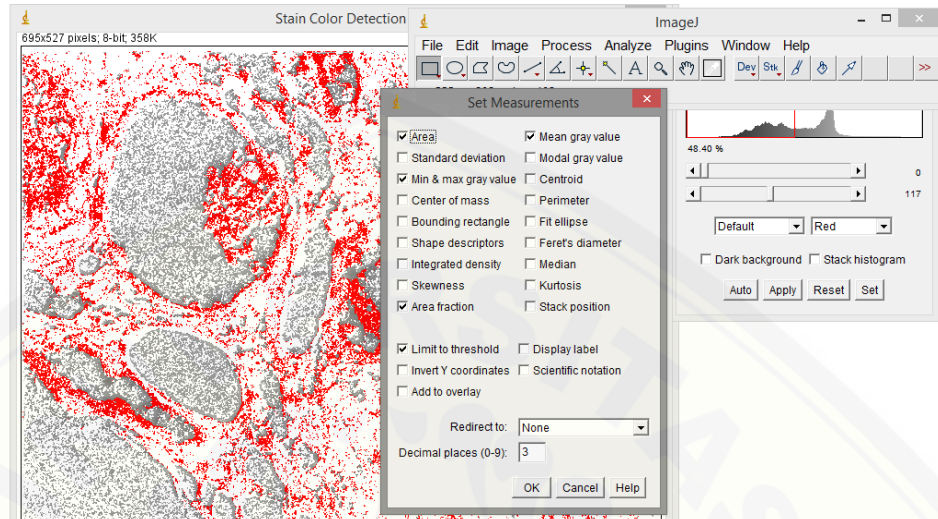
4. Klik menu Image → pilih 8 bit



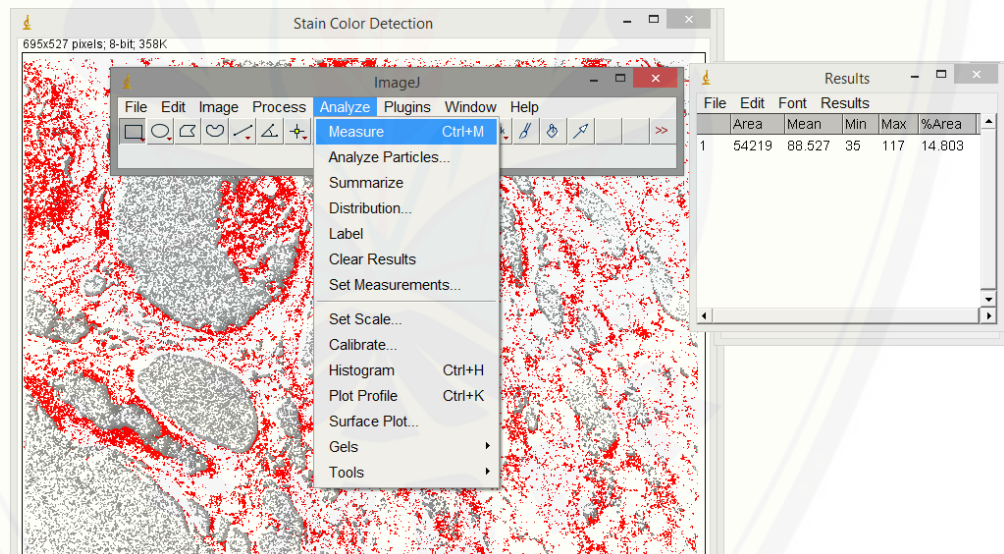
5. Tandai intensitas warna dengan klik menu Image → Threshold → atur threshold sesuai intensitas warna pada gambar




- Atur penghitungan dengan klik Analyze→Set Measurement→pilih limit to threshold dan pilih area fraction untuk memunculkan persen area yang terpulas



- Munculkan hasil penghitungan dengan klik Analyze→Measure→catat hasil %area



Lampiran G. Rekomendasi Bebas Plagiasi

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

REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 24 /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 :

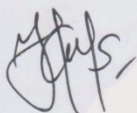
EFEKTIVITAS GEL FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa (Lour.)*) TERHADAP EKSPRESI VEGF PADA PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK DERAJAT 2

Nama Penulis : Nurin Kamila
NIM. : 152010101056
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 8 Januari 2019
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah
Ketua,



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