



**AKTIVITAS MEMBRAN BAKIKO (BAYAM-KITOSAN-
KOLAGEN) TERHADAP EKSPRESI MATRIKS
METALOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
LUKA BAKAR DERAJAT II DENGAN
METODE IMUNOHISTOKIMIA**

SKRIPSI

Oleh
Hazmi Dwinanda Nurqistan
NIM 142010101032

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**AKTIVITAS MEMBRAN BAKIKO (BAYAM-KITOSAN-
KOLAGEN) TERHADAP EKSPRESI MATRIKS
METALOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
LUKA BAKAR DERAJAT II DENGAN
METODE IMUNOHISTOKIMIA**

SKRIPSI

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

Oleh
Hazmi Dwinanda Nurqistan
NIM 142010101032

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan seluruh rahmat serta kasih sayang-Nya yang membuat saya tidak bisa berhenti mengucapkan syukur, atas ridho dan amanah-Nya sehingga saya berkesempatan untuk belajar ilmu yang luar biasa ini;
2. Kedua orang tuaku tercinta, Ayahanda Bangun Ari Susetyo dan Ibunda Parawita Dewanti, serta kakak tercinta yang tak pernah lelah memberikan doa, bimbingan, dukungan, kasih sayang, serta pengorbanan yang tiada terhingga sehingga saya bisa mencapai tahap ini;
3. Guru-guruku yang telah memberikan ilmu dan mendidikku dengan penuh kesabaran untuk menjadikanku sebagai manusia yang berilmu, bertakwa, dan bermanfaat;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini.

MOTO



Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan¹

¹ QS. Al Insyirah : 6

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hazmi Dwinanda Nurqistan

NIM : 142010101032

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Aktivitas Membran Bakiko (Bayam-Kitosan-Kolagen) terhadap Ekspresi Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) pada Luka Bakar Derajat II dengan Metode Imunohistokimia” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 14 Desember 2017

Yang menyatakan,

Hazmi Dwinanda Nurqistan

NIM 142010101032

SKRIPSI

**AKTIVITAS MEMBRAN BAKIKO (BAYAM-KITOSAN-
KOLAGEN) TERHADAP EKSPRESI MATRIKS
METALOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
LUKA BAKAR DERAJAT II DENGAN
METODE IMUNOHISTOKIMIA**

Oleh

Hazmi Dwinanda Nurqistan

NIM 142010101032

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M. Kes, Ph D

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Membran Bakiko (Bayam-Kitosan-Kolagen) terhadap Ekspresi Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) pada Luka Bakar Derajat II dengan Metode Imunohistokimia” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 14 Desember 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Ulfa Elfiah, M. Kes., Sp. BP-RE

NIP 19780922 200112 2 001

Anggota II,

dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed

NIP 19830405 200812 1 001

Anggota III,

dr. Al Munawir, M. Kes, Ph D

NIP 19690901 199903 1 003

dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech

NIP 19840819 200912 2 003

Mengesahkan

Dekan,

Enny Suswati, M. Kes

NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Aktivitas Membran Bakiko (Bayam-Kitosan-Kolagen) terhadap Ekspresi Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) pada Luka Bakar Derajat II dengan Metode Imunohistokimia; Hazmi Dwinanda Nurqistan; 142010101032; 2017; 45 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Luka bakar merupakan masalah kesehatan global dengan estimasi perhitungan sebesar 265.000 kematian setiap tahunnya. Luka bakar membutuhkan perawatan luka yang kompleks karena merupakan luka terbuka yang merusak epidermis dan jaringan-jaringan di bawahnya. Pada luka bakar dapat terjadi proses inflamasi, infeksi, dan pada keadaan yang parah, penguapan cairan tubuh diikuti dengan hilangnya panas dan energi tubuh. Oleh karena itu pada luka bakar, dibutuhkan obat-obatan yang dapat mempercepat epitelisasi kulit, memiliki sifat antimikroba, mampu memodulasi inflamasi, dan mencegah penguapan cairan melalui kulit.

Matriks metaloproteinase (MMP) dapat ditemukan pada luka bakar. Mereka memainkan peran penting dalam mengatur degradasi dan deposisi ECM yang penting untuk reepitelisasi luka. Salah satu MMP yang paling berperan dalam penyembuhan luka adalah MMP-9. Namun, aktivitas protease yang berlebih dapat menyebabkan penyembuhan luka terhambat. Bayam merupakan tanaman yang kaya vitamin dan mineral. Bayam mengandung kaempferol yang merupakan salah satu antioksidan yang dapat mensupresi aktivitas MMP-9. Kitosan merupakan polisakarida kationik alami yang berasal dari exoskeleton kerang, kepiting, udang, serangga, jamur, dan ganggang laut memiliki peran dalam penyembuhan luka. Kitosan menyerupai komponen *extracellular matrix* (ECM) sehingga dapat membantu pertumbuhan jaringan, menginisiasi proliferasi sel fibroblas, dan menstimulasi sintesis kolagen. Kolagen merupakan unsur penting ECM yang menguntungkan karena memiliki efek homeostasis, antigenitas rendah, biokompatibilitas yang baik, dan kekuatan mekanik yang tinggi untuk

diterapkan dalam *soft tissue engineering*. Proses morfogenesis, remodeling jaringan, dan perbaikan jaringan memerlukan kolagen untuk memungkinkan pertumbuhan organ dan migrasi sel. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk membuktikan adanya penurunan aktivitas matriks metaloproteinase-9 oleh membran bakiko pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia.

Penelitian ini dilakukan secara *true-experimental laboratories design* dengan rancangan *post test only control group*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan sebanyak 36 ekor, dibagi menjadi 4 kelompok yakni kelompok kontrol, kontrol negatif, kontrol positif yang diberikan *bioplacenton*, dan perlakuan yang diberikan membran bakiko. Kelompok dibagi menjadi tiga sub kelompok berdasarkan lama pemberian membran bakiko dan hari pengamatan yakni hari ke-3, 7, dan 21 setelah pemberian luka bakar. Luka bakar dibuat sebagai luka bakar kontak dengan putaran diameter pelat logam 2 cm (105°C , 5 detik) pada sisi kanan dan kiri punggung tikus. Membran bakiko dibuat dengan cara mencampurkan larutan kolagen dengan konsentrasi 0,41 mg/mL dengan kitosan dalam 0,5 M asam asetat 1:1. Setelah itu, ditambahkan ekstrak bayam kedalamnya. Data diperoleh melalui penghitungan MMP-9 menggunakan software *ImageJ* pada sediaan imunohistokimia.

Pada penelitian ini didapatkan rerata ekspresi MMP-9 per lapang pandang pada hari ke-3 pada kontrol normal; kontrol negatif; kontrol positif; dan perlakuan berturut-turut; 130972,75; 362417,50; 243015,25; 697051,50. Pada hari ke-7 yakni 130972,75; 739531,75; 202665,25; 597887,50 dan pada hari ke-21 130972,75; 167439,00; 67094,50; 36457,75. Hasil uji normalitas menunjukkan data terdistribusi normal ($p>0,05$) dan homogen. Data tersebut selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji anova dan didapatkan nilai p kurang dari 0,05 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan aktivitas MMP-9 oleh membran bakiko pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia pada tikus wistar dengan perbedaan bermakna pada hari ke-3, 7, dan 21 ($p<0,05$).

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Membran Bakiko (Bayam-Kitosan-Kolagen) terhadap Ekspresi Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) pada Luka Bakar Derajat II dengan Metode Imunohistokimia”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

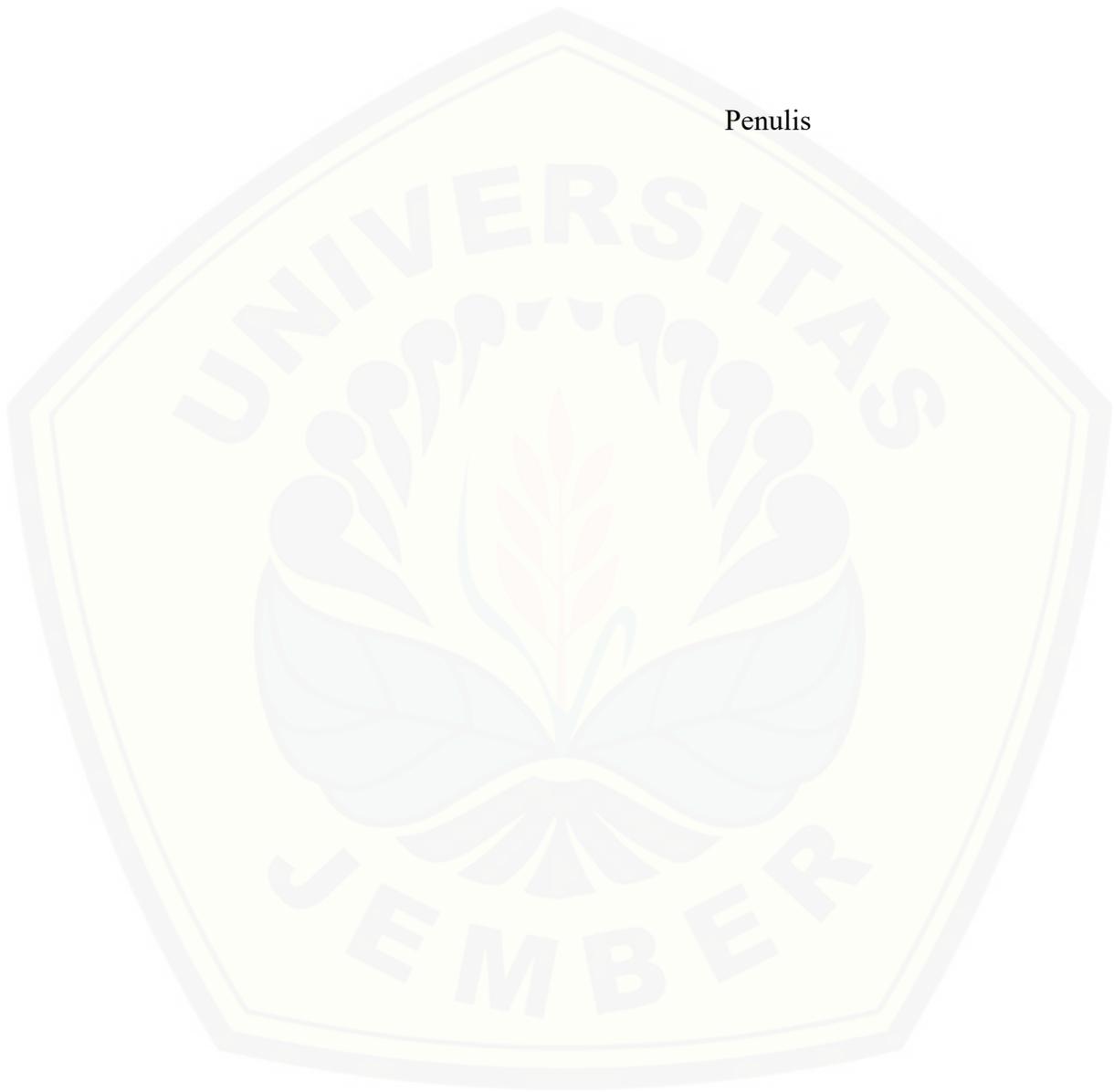
Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M. Kes., Ph. D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech. Selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membantu membimbing pengerjaan dan penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
3. dr. Ulfa Elfiah, M. Kes, Sp. BP-RE selaku dosen penguji I dan dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed selaku dosen penguji II;
4. Ayahanda Bangun Ari Susetyo dan Ibunda Parawita Dewanti terimakasih atas segala kasih sayang, pengorbanan, semangat, nasehat, dan doa restu yang selalu diberikan;
5. Kakakku Zahrina Amalia Eka Nurfadilah, terimakasih atas semangat dan doa untukku;
6. Teman-teman seperjuangan skripsi (Dita Puspita Damayanti dan Shofi Iqda Islami), terimakasih atas bantuan, semangat, doa, dan kerjasamanya dari awal hingga akhir;
7. Teman-teman seangkatan *Elixir*, terima kasih atas segala bantuannya;
8. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 14 Desember 2017

Penulis



DAFTAR ISI

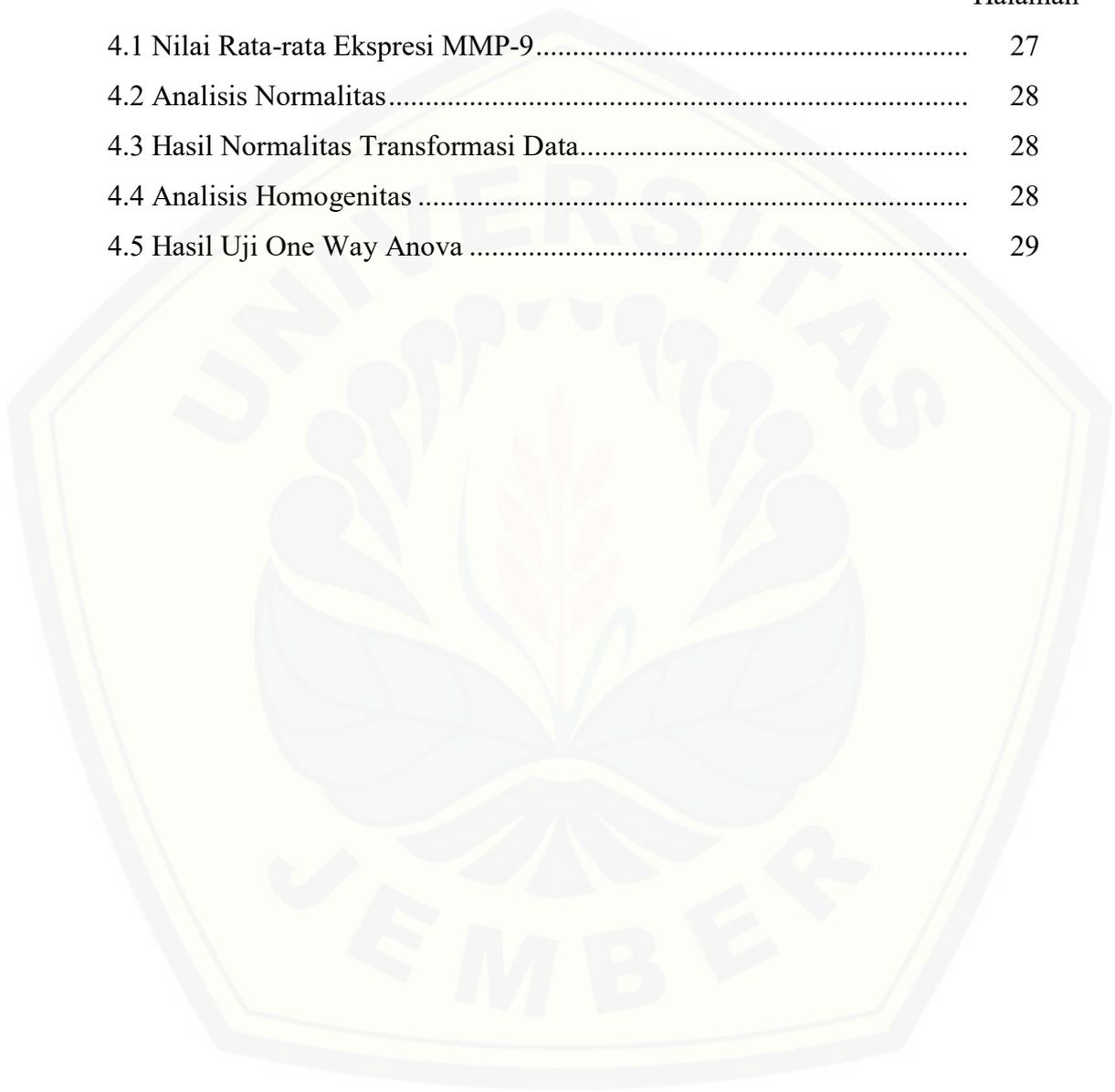
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Luka Bakar	4
2.1.1 Prevalensi	4
2.1.2 Patofisiologi	4
2.1.3 Klasifikasi Derajat.....	5
2.1.4 Fase Penyembuhan.....	6
2.1.5 Terapi Luka Bakar.....	8

2.2 Bayam	9
2.2.1 Taksonomi	9
2.2.2 Morfologi.....	9
2.2.3 Manfaat Bayam pada Penyembuhan Luka	10
2.3 Kitosan dan Kolagen	10
2.4 Matriks Metaloproteinase (MMP)	11
2.5 Metode Deteksi MMP-9	11
2.6 Kerangka Konseptual	14
2.7 Hipotesis	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Jenis Penelitian	16
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.3 Populasi dan Sampel	16
3.3.1 Populasi	16
3.3.2 Sampel.....	16
3.3.3 Besar Sampel.....	17
3.4 Definisi Operasional	17
3.5 Rancangan Penelitian	18
3.6 Variabel Penelitian	19
3.6.1 Variabel Bebas	19
3.6.2 Variabel Terikat	19
3.6.3 Variabel Terkendali.....	19
3.7 Bahan dan Alat Uji yang Digunakan	20
3.7.1 Bahan.....	20
3.7.2 Alat.....	20
3.8 Prosedur Penelitian	20
3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus	20
3.8.2 Proses Adaptasi Tikus.....	20
3.8.3 Ekstraksi Bayam.....	21
3.8.4 Pembuatan Membran Bakiko.....	21
3.8.5 Tahap Perlakuan.....	21

3.8.6 Pengambilan Jaringan Kulit	22
3.8.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia	22
3.9 Analisis Data	23
3.10 Alur Penelitian	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Hasil Penelitian	25
4.2 Analisis Data	28
4.3 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Nilai Rata-rata Ekspresi MMP-9.....	27
4.2 Analisis Normalitas.....	28
4.3 Hasil Normalitas Transformasi Data.....	28
4.4 Analisis Homogenitas	28
4.5 Hasil Uji One Way Anova	29

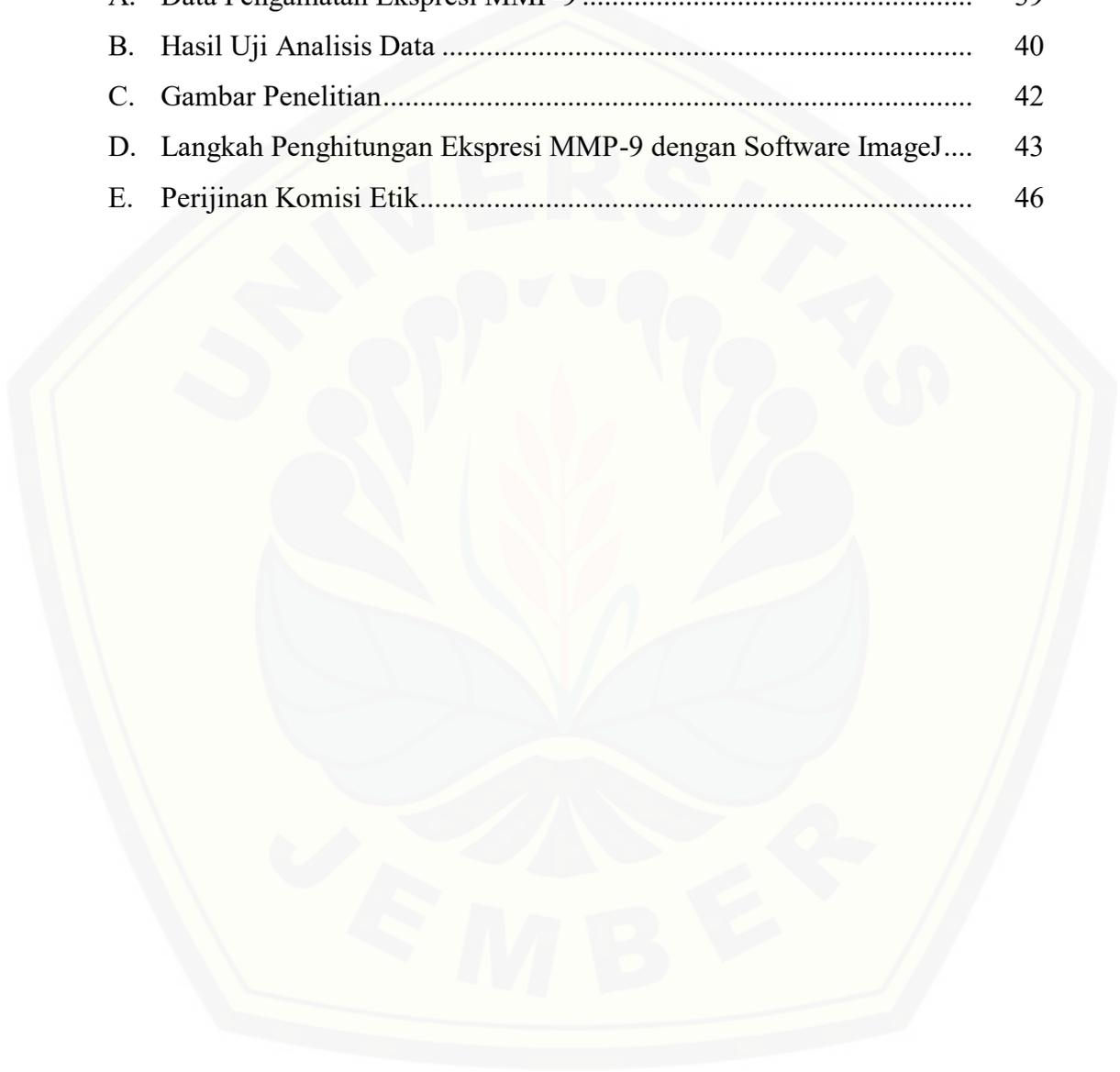


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Macam Zona pada Luka Bakar	5
2.2 Fase Penyembuhan Luka	8
2.3 Ekspresi MMP-9	11
2.4 Kerangka Konseptual Penelitian	14
3.1 Skema Rancangan Penelitian	18
3.2 Lapang Pandang yang Digunakan untuk Menghitung	22
3.3 Skema Alur Penelitian	24
4.1 Pengamatan imunohistokimia kulit tikus hari ke-3 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x, kontrol (a), kontrol negatif (b), kontrol positif (c), dan perlakuan (d)	25
4.2 Pengamatan imunohistokimia kulit tikus hari ke-7 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x, kontrol (a), kontrol negatif (b), kontrol positif (c), dan perlakuan (d)	26
4.3 Pengamatan imunohistokimia kulit tikus hari ke-21 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x, kontrol (a), kontrol negatif (b), kontrol positif (c), dan perlakuan (d)	26
4.4 Grafik Perubahan Rata-rata MMP-9	27
4.5 Analisis Uji LSD Pengamatan Hari ke-3	29
4.6 Analisis Uji LSD Pengamatan Hari ke-7	30
4.7 Analisis Uji LSD Pengamatan Hari ke-21	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Pengamatan Ekspresi MMP-9	39
B. Hasil Uji Analisis Data	40
C. Gambar Penelitian.....	42
D. Langkah Penghitungan Ekspresi MMP-9 dengan Software ImageJ....	43
E. Perijinan Komisi Etik.....	46



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar merupakan masalah kesehatan global dengan estimasi perhitungan sebesar 265.000 kematian setiap tahunnya. Lebih dari 500.000 luka bakar luka terjadi setiap tahun di Amerika Serikat. Meskipun sebagian besar luka bakar ini ringan, kira-kira 40.000 sampai 60.000 pasien luka bakar memerlukan pertolongan di rumah sakit untuk perawatan yang tepat (Townsend *et al.*, 2012). Prevalensi cedera di Indonesia adalah 8,2% dan 0,7% dari keseluruhan cedera disebabkan karena terbakar. Penyebab cedera karena terbakar ditemukan proporsi tertinggi di Papua (2%) dan terendah (tanpa kasus) di Kalimantan Timur (Trihono, 2013).

Luka bakar adalah cedera pada kulit dan jaringan sekitarnya akibat suhu, bahan kimia, listrik, atau radiasi. Menurut Clouatre *et al.* (2013) di daerah Ontario, Canada, sebesar 32,7% luka bakar disebabkan karena api, 27% karena listrik, dan 19,7% disebabkan oleh air mendidih. Luka bakar membutuhkan perawatan luka yang kompleks karena merupakan luka terbuka yang merusak epidermis dan jaringan-jaringan di bawahnya. Pada luka bakar dapat terjadi proses inflamasi, infeksi, dan pada keadaan yang parah, penguapan cairan tubuh diikuti dengan hilangnya panas dan energi tubuh (Rowan *et al.*, 2015). Oleh karena itu pada luka bakar, dibutuhkan obat-obatan yang dapat mempercepat epitelisasi kulit, memiliki sifat antimikroba, mampu memodulasi inflamasi, dan mencegah penguapan cairan melalui kulit.

Matriks metaloproteinase (MMP) dapat ditemukan pada luka bakar. MMP tersebut memainkan peran penting dalam mengatur degradasi dan deposisi ECM yang penting untuk reepitelisasi luka. Salah satu MMP yang paling berperan dalam penyembuhan luka adalah MMP-9. Namun, aktivitas protease yang berlebih dapat menyebabkan penyembuhan luka terhambat. Penyembuhan luka membutuhkan aktivitas MMP yang terkontrol pada semua tahap proses penyembuhan luka (Caley *et al.*, 2015).

Bayam merupakan tanaman yang kaya vitamin dan mineral. Senyawa efektif dalam bayam termasuk zink, glutamin, arginin, dan antioksidan seperti kaemferol. Glutamin berperan dalam proses penyembuhan luka dan mengurangi inflamasi (Rahati *et al.*, 2016). Arginin dapat meningkatkan proliferasi fibroblast (Fujiwara *et al.*, 2014). Fibroblas merupakan salah satu sel yang mampu memproduksi MMP saat terjadinya luka. Aktivitas MMP yang meningkat dapat menyebabkan penyembuhan luka terhambat. Kaemferol merupakan salah satu antioksidan yang dapat mensupresi aktivitas MMP-9 (Choi *et al.*, 2015). Oleh karena itu, adanya kandungan kaemferol dalam bayam diharapkan dapat mengendalikan aktivitas enzim-enzim protease dalam proses penyembuhan luka.

Kitosan merupakan polisakarida kationik alami yang berasal dari exoskeleton kerang, kepiting, udang, serangga, jamur, dan ganggang laut memiliki peran dalam penyembuhan luka. Kitosan menyerupai komponen *extracellular matrix* (ECM) sehingga dapat membantu pertumbuhan jaringan, menginisiasi proliferasi sel fibroblas, dan menstimulasi sintesis kolagen. Kitosan juga bersifat antimikroba terhadap berbagai bakteri, jamur, dan alga (Mc Bane *et al.*, 2013).

Kolagen merupakan unsur penting ECM yang menguntungkan karena memiliki efek homeostasis, antigenitas rendah, biokompatibilitas yang baik, dan kekuatan mekanik yang tinggi untuk diterapkan dalam *soft tissue engineering*. Proses morfogenesis, remodeling jaringan, dan perbaikan jaringan memerlukan kolagen untuk memungkinkan pertumbuhan organ dan migrasi sel (Mc Bane *et al.*, 2013).

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan, bayam, kitosan, dan kolagen dapat bermanfaat dalam proses penyembuhan luka. Membran kitosan-kolagen telah banyak dimanfaatkan untuk penyembuhan luka namun, hasilnya kurang memuaskan (Wang *et al.*, 2008). Adanya penambahan bayam pada membran kitosan-kolagen diharapkan dapat menguatkan efek terapinya. Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui aktivitas membran bakiko terhadap ekspresi MMP-9 pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan permasalahan yakni apakah membran bakiko dapat menurunkan aktivitas matriks metaloproteinase-9 pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia?

1.3 Tujuan Masalah

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini ialah untuk membuktikan adanya penurunan aktivitas matriks metaloproteinase-9 oleh membran bakiko pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini ialah melihat gambaran MMP-9 pada hari ke-3, 7, dan 21. Selain itu, juga membuktikan perbedaan pada masing-masing hari.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Menambah pengetahuan peneliti mengenai efek membran bakiko terhadap proses penyembuhan luka bakar derajat II.
- b. Memberikan sumbangan terhadap ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran bahwa membran bakiko dapat digunakan sebagai salah satu bahan yang dapat dikembangkan untuk pengobatan luka bakar derajat II.
- c. Dapat memberikan sumbangan pengetahuan bagi perkembangan penelitian dalam bidang penyembuhan luka.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

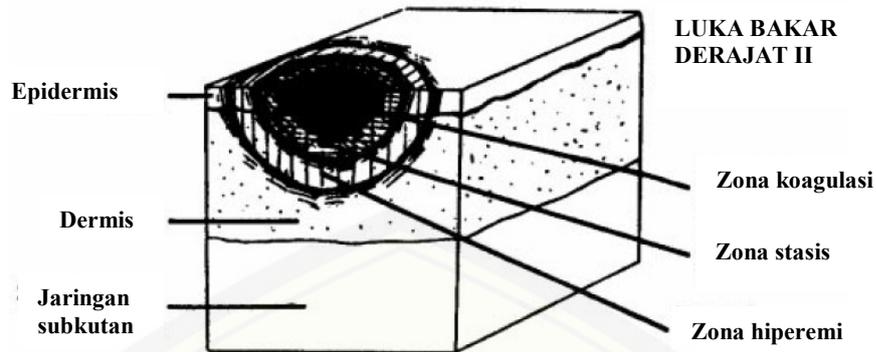
2.1 Luka Bakar

2.1.1 Prevalensi

Luka bakar adalah salah satu bentuk luka yang paling umum. Pasien dengan luka bakar serius memerlukan segera perawatan khusus untuk meminimalkan morbiditas dan mortalitas (Church *et al.*, 2006). Hampir setengah juta orang Amerika yang terkena luka bakar membutuhkan pertolongan medis setiap tahunnya (40.000 rawat inap dan 3.400 kematian) (Rowan *et al.*, 2015). Prevalensi cedera di Indonesia adalah 8,2% dan 0,7% dari keseluruhan cedera disebabkan karena terbakar. Penyebab cedera karena terbakar ditemukan proporsi tertinggi di Papua (2%) dan terendah (tanpa kasus) di Kalimantan Timur (Trihono, 2013).

2.1.2 Patofisiologi

Kerusakan epitel kulit merupakan ciri khas cedera termal. Tubuh mencoba mempertahankan homeostasis dengan proses konstriksi pembuluh darah dan pembekuan darah segera setelah terjadi luka bakar. Pada luka tersebut akan terbentuk tiga zona yang berbeda dari lapisan dalam hingga terluar yaitu: (i) zona koagulasi, terdiri dari jaringan mati yang membentuk *eschar* di bagian tengah luka dan paling dekat dengan sumber panas; (ii) zona stasis, terdiri dari jaringan yang masih baik, tetapi beresiko mengalami iskemik akibat perfusi yang menurun; dan (iii) Zona hiperemia, yang terdiri dari kulit normal dengan cedera sel ringan yang memiliki vasodilatasi dominan dan terjadi peningkatan aliran darah sebagai respon terhadap luka (Gambar 2.1) (Church *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Macam Zona pada Luka Bakar (Sumber: Church *et al.*, 2006)

Luka bakar yang parah dapat menyebabkan hilangnya permukaan kulit secara total. Akibatnya risiko infeksi baik lokal ataupun sistemik dapat meningkat, karena kulit merupakan penghalang invasi mikroba. Risiko infeksi berkorelasi dengan ukuran luka bakar. Kontak langsung dengan api, permukaan yang panas, cairan panas, atau sumber konduksi panas, konveksi, atau radiasi dapat menyebabkan kerusakan sel pada kulit. Tingkat kerusakan yang terjadi dapat bervariasi sesuai dengan suhu dan durasi paparan. Ketika suhu naik, terjadi peningkatan tumbukan molekuler sehingga mengakibatkan terganggunya ikatan antarmolekul. Proses ini menyebabkan disfungsi membran sel sebagai saluran ion. Ketika suhu meningkat lebih jauh, denaturasi protein terjadi. Oksigen radikal terbebaskan dan akhirnya sel mati dengan membentuk eschar. Interaksi zat kimia dengan kulit juga bisa merusak struktur protein dan menghasilkan luka bakar (Church *et al.*, 2006).

2.1.3 Klasifikasi Derajat

Luka bakar dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori yaitu luka *superficial* (derajat pertama), *partial thickness* (derajat kedua), *full thickness* (derajat ketiga), dan luka bakar derajat keempat, yang mempengaruhi jaringan lunak yang mendasarinya. Luka bakar *partial thickness* kemudian dibagi menjadi dua yaitu luka bakar yang merusak sebagian dermis dan seluruh dermis. Secara klinis, luka bakar derajat pertama terasa sakit dan tidak melepuh. Luka bakar derajat dua membakar bagian dermis, sangat menyakitkan dan terdapat kulit yang

melepuh. Luka bakar derajat tiga, tidak menimbulkan rasa sakit. Jackson menggambarkan tiga zona cedera jaringan setelah luka bakar. Zona koagulasi adalah bagian yang paling parah terbakar dan biasanya berada di tengah luka. Sesuai dengan namanya, jaringan yang terbakar digumpalkan dan terkadang terjadi nekrotik. Pada zona ini terkadang dibutuhkan eksisi dan *grafting* untuk penanganannya. Berikutnya adalah zona stasis, yang memiliki respon lokal vasokonstriksi dan iskemia. Resusitasi dan perawatan luka yang tepat dapat membantu mencegah timbulnya luka yang lebih dalam, namun perawatan yang kurang maksimal dapat menyebabkan peningkatan kedalaman luka bakar. Area terakhir dari luka bakar disebut zona hiperemia, yang akan sembuh dengan jaringan parut minimal (Brunicardi *et al.*, 2010).

Dokter ahli penanganan luka bakar memiliki kemampuan terbatas untuk memprediksi potensi penyembuhan luka bakar derajat dua; Salah satu alasannya adalah luka bakar dapat berubah setelah lebih dari 48-72 jam. Berbagai teknik telah dikembangkan dengan gagasan bahwa prediksi awal yang lebih baik tentang kedalaman luka bakar akan mempercepat pengambilan keputusan bedah yang tepat. Salah satu cara yang paling efektif untuk menentukan kedalaman bakar adalah biopsi, namun hal ini memiliki beberapa keterbatasan. Tidak hanya prosedur yang menyakitkan dan berpotensi parut, namun interpretasi akurat tentang histopatologi memerlukan ahli patologi khusus dan mungkin memiliki waktu penyelesaian yang lambat. *Doppler laser* dapat mengukur perfusi kulit dan menggunakan pengukuran tersebut untuk memprediksi kedalaman luka bakar, dengan nilai prediksi positif sampai 80% dalam beberapa penelitian. USG merupakan sebuah modalitas diagnosis yang tidak menyakitkan untuk memprediksi luka yang tidak sembuh dan memiliki keuntungan dari pengukuran serial yang mudah dilakukan (Brunicardi *et al.*, 2010).

2.1.4 Fase Penyembuhan

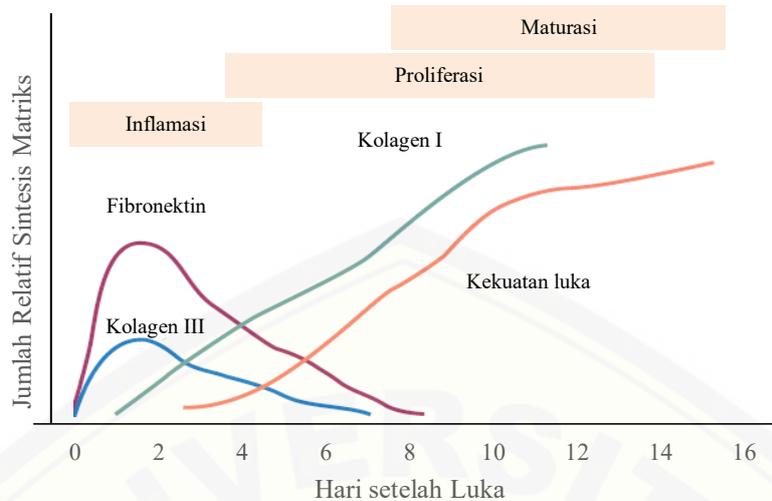
Fase penyembuhan luka terbagi menjadi tiga yaitu inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Timbulnya rasa sakit, eschar atau eksudat cair mencerminkan fase inflamasi. Munculnya jaringan granulasi merupakan bagian dari fase proliferasi

dan kontraktilitas adalah bagian dari fase maturasi. Ketiga fase tersebut dapat terjadi secara simultan dan memungkinkan terjadinya tumpang tindih (Gambar 2.2) (Townsend *et al.*, 2012).

Pada fase inflamasi terjadi proses hemostasis dan peradangan. Fase ini berguna untuk membatasi kerusakan jaringan dengan menghentikan pendarahan, menutup permukaan luka, mengeluarkan jaringan nekrotik, kotoran asing, dan bakteri. Fase inflamasi ditandai oleh peningkatan permeabilitas vaskular, migrasi sel, sekresi sitokin dan faktor pertumbuhan (Townsend *et al.*, 2012).

Pada fase proliferasi terjadi respon akut hemostasis dan pembengkakan. Tahap ini ditandai dengan terbentuknya jaringan granulasi yang terdiri dari *capillary bed*, fibroblas, makrofag, dan jaringan ikat longgar seperti kolagen, fibronektin, dan asam hialuronat. Sejumlah penelitian telah menggunakan faktor pertumbuhan untuk memodifikasi jaringan granulasi, terutama fibroplasia. Transfer adenoviral, aplikasi topikal, dan injeksi subkutan dari PDGF, TGF- β , faktor pertumbuhan keratinosit (KGF), faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), dan faktor pertumbuhan epidermal (EGF) telah diuji untuk meningkatkan proliferasi jaringan granulasi (Townsend *et al.*, 2012).

Pada fase maturasi terjadi kontraksi luka karena gerakan sentripetal kulit di sekitarnya dan pengurangan jumlah *scar* yang tidak teratur dari bekas luka. Pada fase ini dapat terjadi cacat fungsional apabila terjadi kontraksi berlebihan pada bekas luka. Kontraksi berlebihan pada kelopak mata dapat menyebabkan ektropion (Townsend *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Fase Penyembuhan Luka (Sumber: Townsend *et al.*, 2012)

2.1.5 Terapi Luka Bakar

Terdapat berbagai macam terapi topikal untuk pengobatan luka bakar. *Silver sulfadiazin* adalah yang paling banyak digunakan dalam praktik klinis. *Silver sulfadiazin* memiliki berbagai aktivitas antimikroba. Selain itu, *silver sulfadiazin* memiliki manfaat tambahan yaitu murah dan mudah diterapkan. *Silver sulfadiazine* dapat menyebabkan neutropenia, namun hubungan ini merupakan hasil dari margase neutrofil karena respon inflamasi terhadap luka bakar. Reaksi alergi terhadap komponen sulfa pada *silver sulfadiazin* jarang terjadi. *Silver sulfadiazin* dikontraindikasikan pada daerah *grafting* (Brunicardi *et al.*, 2010)

Bioplacenton merupakan salah satu obat yang sering digunakan untuk mengobati luka bakar pada masyarakat. Obat ini mengandung *placenta extract* 10% dan *neomycin sulfate* 0,5%. Bentuknya berupa gel sehingga mudah digunakan. Ekstrak plasenta bekerja memicu pembentukan jaringan baru untuk penyembuhan luka, sedangkan *neomycin* dapat mencegah atau mengatasi infeksi bakteri khususnya gram negatif pada area luka. Pada sedikit orang, penggunaan *bioplacenton* dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas (Burhanudin, 2014).

Fase inflamasi merupakan fase yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka bakar. Inflamasi yang menyimpang dapat menyebabkan pembentukan jaringan parut dan pemberian anti-inflamasi yang berlebihan dapat menyebabkan proses penyembuhan luka memanjang. Pada fase proliferasi terjadi

migrasi keratinosit untuk membantu penutupan dan pemulihan dari jaringan vaskular, yang merupakan langkah penting dalam proses penyembuhan luka (Rowan *et. al.*, 2015). Kedua fase tersebut merupakan fase yang dapat dimanipulasi untuk mempercepat penyembuhan luka bakar.

2.2 Bayam

2.2.1 Taksonomi

Bayam (*Amaranthus sp.*) merupakan tanaman yang berasal dari Amerika. Tanaman ini merupakan salah satu tanaman pangan tertua di dunia. Genus *amaranthus* terdiri dari hampir 60 spesies, beberapa diantaranya dibudidayakan sebagai sayuran daun, biji-bijian atau tanaman hias, sementara yang lainnya gulma. Adapun taksonomi bayam adalah sebagai berikut: Kingdom (*Plantae*), Subkingdom (*Tracheobionta*), Superdivisi (*Spermatophyta*), Divisi (*Magnoliophyta*), Kelas (*Magnoliopsida*), Subkelas (*Caryophyllidae*), Ordo (*Caryophyllales*), Famili (*Amaranthaceae*), Genus (*Amaranthus L.*), Spesies (*Amaranthus tricolor L.*).

Di Asia Timur dan Asia Tenggara, bayam sayur biasa disebut *chinese amaranth*. Ditingkat konsumen, dikenal dua macam bayam sayur, yaitu bayam petik dan bayam cabut. Bayam petik berdaun lebar dan tumbuh tegak dengan batang yang besar (hingga dua meter). Daun mudanya dimakan untuk dilalap atau digoreng dengan dibaluri tepung. Daun bayam cabut berukuran lebih kecil dan di tanam untuk waktu singkat (paling lama 25 hari), lebih cocok untuk dibuat sup encer seperti sayur bayam dan sayur bobor (Saparinto, 2013).

2.2.2 Morfologi

Tanaman bayam merah memiliki ciri berdaun tunggal, ujungnya meruncing, lunak, dan lebar. Batangnya lunak dan berwarna putih kemerah-merahan. Bunga bayam merah ukurannya kecil mungil dari ketiak daun dan ujung batang pada rangkaian tandan. Buahnya tidak berdaging, tetapi bijinya banyak, sangat kecil, bulat, dan mudah pecah. Tanaman ini memiliki akar tunggang dan berakar samping. Akar sampingnya kuat dan agak dalam. Tanaman ini berbentuk

perdu atau semak. Bayam merah memiliki banyak manfaat karena mengandung vitamin A dan C, sedikit vitamin B, kalsium, fosfor, dan besi (Sunarjono, 2014).

2.2.3 Manfaat Bayam pada Penyembuhan Luka

Bayam adalah salah satu sayuran yang dapat hidup dimana saja. Tanaman ini kaya akan vitamin dan mineral. Selain itu, bayam juga mengandung kalsium, sodium, potasium, tembaga, arsen, seng, magnesium, besi, vitamin A, B, C, D, E dan K, lesitin, sekretin, saponin, kuersetin, asam folat, polifenol, asam lemak tak jenuh ganda yang berlimpah, heksadekatrienoik asam (HTA), klorofil II, β -karoten, lycopene, lutein, turunan flavonoid, turunan asam coumarat, nukleosida purin, glutamin, arginin, kaempferol, dan peptida (Rahati *et al.*, 2016).

Glutamin berperan penting dalam penyembuhan luka dan pengurangan pembengkakan. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa glutamin secara tidak langsung meningkatkan sintesis kolagen dengan meningkatkan proses transkripsinya. Studi lain menunjukkan bahwa flavonoid, dan terutama kaempferol, memiliki efek penghambatan yang kuat pada glikasi protein tubuh dan kolagen pada khususnya. Likopen adalah antioksidan kuat pada bayam yang dapat mengurangi oksidatif stres. Beberapa penelitian menunjukkan suplementasi arginin meningkat penyembuhan luka (Rahati *et al.*, 2016). Arginin dapat meningkatkan proliferasi fibroblast (Fujiwara *et al.*, 2014). Fibroblas merupakan salah satu sel yang mampu memproduksi MMP saat terjadinya luka. Aktivitas MMP yang meningkat dapat menyebabkan penyembuhan luka terhambat. Kaemferol merupakan salah satu antioksidan yang dapat mensupresi aktivitas MMP-9 (Choi *et al.*, 2015).

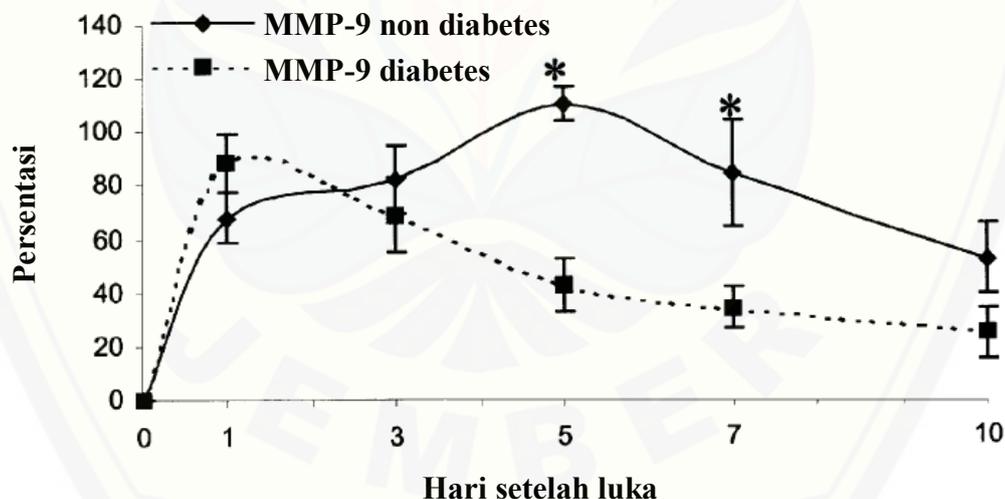
2.3 Kitosan dan Kolagen

Kolagen merupakan konstituen mayor dari ECM. Kolagen dapat berperan dalam peningkatan migrasi makrofag ke bagian yang mengalami luka dan dapat mengurangi inflamasi berkepanjangan. *Signaling* antara *endothelial cell-surface receptors* dan kolagen menstimulasi migrasi dan stimulasi sel endotel, sehingga gangguan vaskularisasi pada luka dapat diatasi (Elgharably *et al.*, 2013 & 2014).

Kitosan dan derivatnya telah lama digunakan sebagai obat topikal untuk perawatan luka karena memiliki peran hemostatik, antimikroba, dan mampu menstimulasi penyembuhan luka. Kitosan merupakan material yang bersifat nontoksik, biokompatibel, dan biodegradabel (Tianhong *et al.*, 2011). Oleh karena itu, penggabungan antara kitosan dan kolagen sebagai membran penyembuh luka pada luka bakar merupakan hal yang menguntungkan.

2.4 Matriks Metaloproteinase

Matriks metaloproteinase (MMP) dapat ditemukan pada luka akut dan kronis. Mereka memainkan peran penting dalam mengatur degradasi dan deposisi ECM yang penting untuk reepitelisasi luka. Salah satu MMP yang paling berperan dalam penyembuhan luka adalah MMP-9. Namun, aktivitas protease yang berlebih dapat menyebabkan penyembuhan luka terhambat. Penyembuhan luka membutuhkan aktivitas MMP yang terkontrol pada semua tahap proses penyembuhan luka (Gambar 2.3) (Caley *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Ekspresi MMP-9 (Sumber: Wall *et al.*, 2002)

2.5 Metode Deteksi MMP-9

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi MMP-9. Metode tersebut terdiri atas metode gelatin zimografi, *immunoblotting*, dan ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Ketiga metode yang telah

disebutkan tersebut memiliki prinsip kerja, kelebihan dan kekurangan masing-masing.

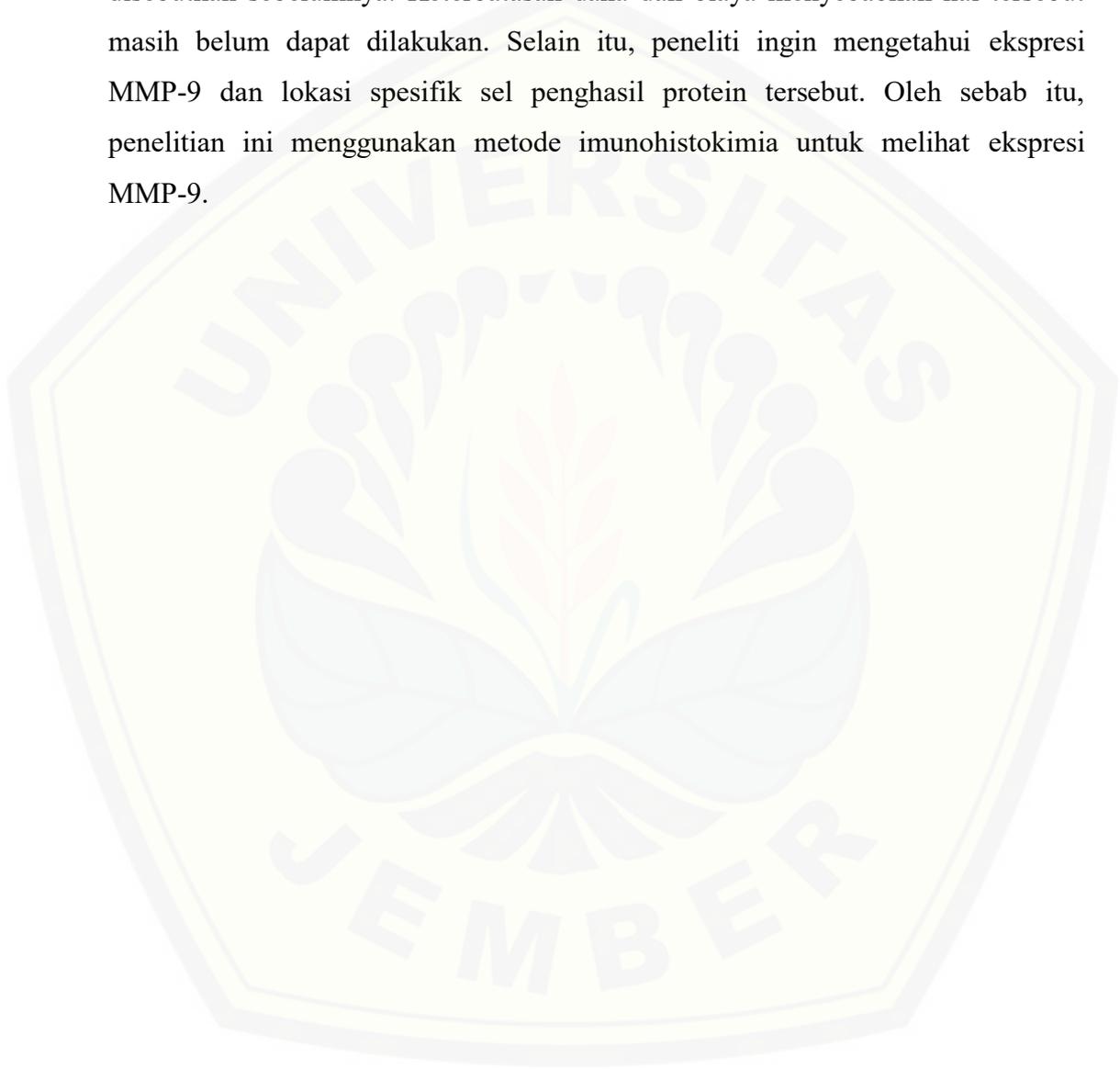
Gelatin zimografi merupakan metode yang biasa digunakan dalam mendeteksi gelatinase (MMP-9). Metode ini tergolong sederhana, cukup sensitif dan bersifat semi kuantitatif dalam mendeteksi MMP-9. Bahan yang diuji dapat berasal dari supernatan hasil kultur sel, urin, serum dan bahan uji lain yang dipercaya mengandung MMP-9. Bahan tersebut kemudian di *running* pada gel SDS-PAGE (*Sodium Dodesil Sulfat Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yang mengandung gelatin sebagai substrat MMP-9. Enzim MMP-9 akan mencerna substrat gelatin tersebut sehingga menghasilkan pita berwarna putih yang memperlihatkan kemampuan enzim dalam mencerna substratnya (Hu dan Beeton, 2010).

Metode yang selanjutnya yaitu ELISA. Metode yang menggunakan prinsip interaksi antara antigen dan antibodi untuk deteksinya. Berbeda dengan gelatin zimografi, deteksi MMP-9 menggunakan ELISA menghasilkan data kuantitatif jumlah MMP-9 (Tutton *et al.*, 2003). Alat ukur yang digunakan ialah spektrofotometer yang memiliki prinsip pengukuran berdasarkan perhitungan absorbansi zat akibat adanya perbedaan warna dengan panjang gelombang tertentu.

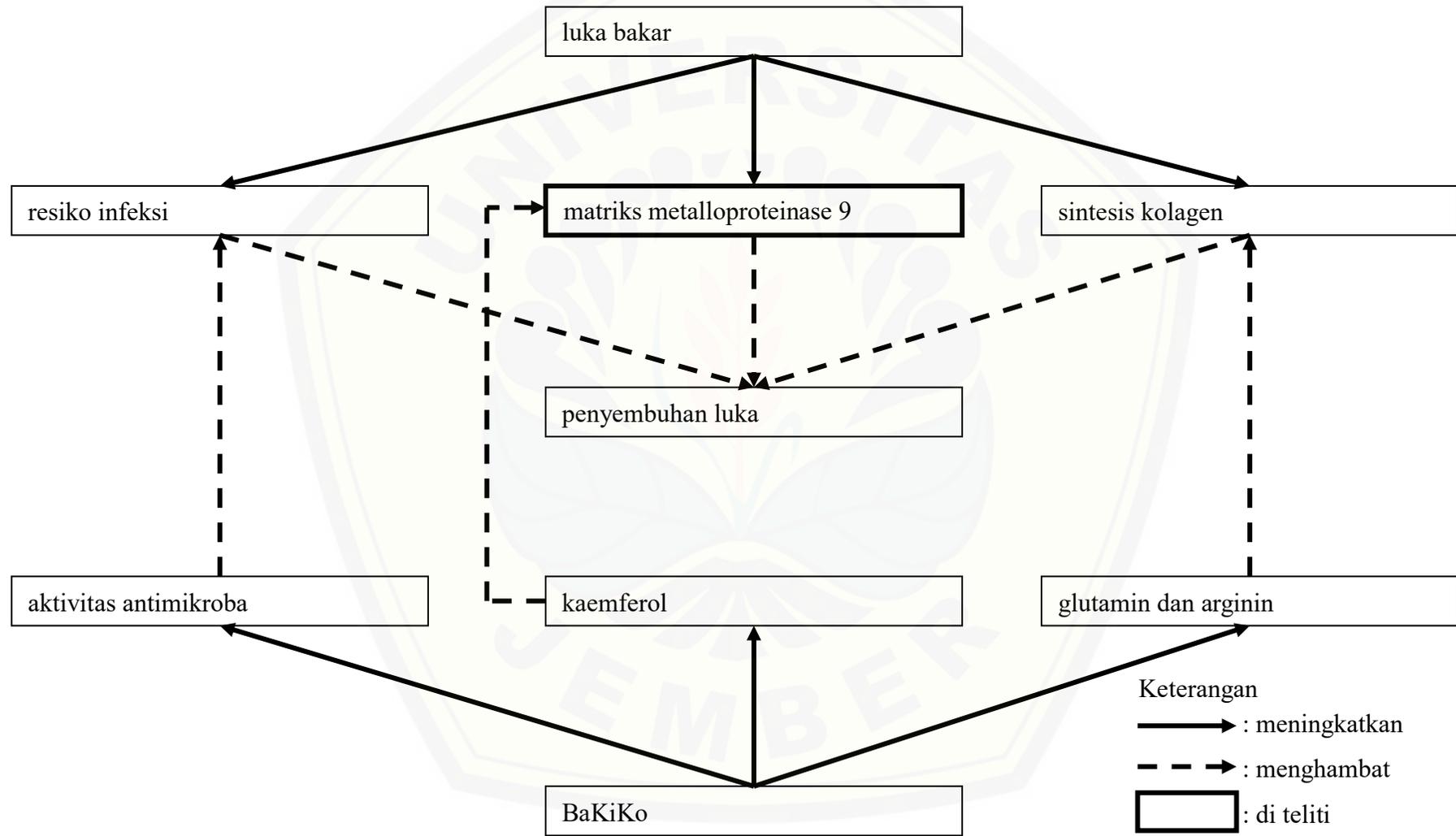
Metode lain adalah teknik *immunoblotting* khususnya imunohistokimia. Prinsip kerja metode ini hampir sama dengan metode ELISA. Protein yang akan dideteksi seperti MMP-9 dianggap sebagai antigen yang akan dikenali oleh antibodi yang spesifik terhadap protein tersebut. Antibodi yang digunakan dapat bersifat monoklonal ataupun poliklonal. Antibodi monoklonal lebih dianjurkan karena memiliki spesifitas yang lebih tinggi karena hanya mampu mengikat satu protein spesifik. Namun, dengan alasan yang sama, hal tersebut menjadi kekurangan antibodi monoklonal akibat sensitifitas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan antibodi poliklonal. Selain itu, antibodi poliklonal lebih dianjurkan untuk penelitian baru yang belum diketahui ada tidaknya antigen target di dalam bahan uji. Metode imunohistokimia merupakan metode pengecatan jaringan histologis menggunakan prinsip *immunoblotting*, sehingga metode ini

memungkinkan peneliti mengetahui ekspresi MMP-9 dan lokasi MMP-9 itu berada. Metode ini dapat menghasilkan data semi kuantitatif, jika diolah dengan menggunakan software *ImageJ* (Lin dan Prichard, 2011).

Deteksi MMP-9 secara ideal dilakukan dengan seluruh metode yang disebutkan sebelumnya. Keterbatasan dana dan biaya menyebabkan hal tersebut masih belum dapat dilakukan. Selain itu, peneliti ingin mengetahui ekspresi MMP-9 dan lokasi spesifik sel penghasil protein tersebut. Oleh sebab itu, penelitian ini menggunakan metode imunohistokimia untuk melihat ekspresi MMP-9.



2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.4 Kerangka Konseptual Penelitian

Pada luka bakar terjadi peningkatan MMP-9, penurunan sintesis kolagen, dan peningkatan resiko infeksi. Peningkatan MMP-9 dapat menghambat proses penyembuhan luka karena MMP-9 dapat mendegradasi ECM. Kolagen yang merupakan salah satu komponen ECM juga dapat terdegradasi. Sintesis kolagen dalam proses penyembuhan luka sangatlah penting. Selain itu, adanya infeksi pada luka juga dapat menghambat proses penyembuhan. Membran bakiko merupakan membran yang mampu menghambat ekspresi MMP-9. Kaemferol merupakan senyawa aktif yang berperan dalam proses penghambatan tersebut. Glutamin dan arginin dapat meningkatkan sintesis kolagen. Kitosan yang memiliki aktifitas antimikroba dapat mengurangi resiko terjadinya infeksi pada luka bakar.

2.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini ialah membran bakiko dapat menurunkan aktivitas MMP 9 pada terapi luka bakar derajat II dengan metode immunohistokimia.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true-experimental design* dengan rancangan *post test only control group*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat. Pembuatan ekstrak bayam (*Amaranthus sp.*) dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember. Pembuatan sediaan membran dan pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Tempat perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pembedahan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan April hingga bulan Oktober 2017.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

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

3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram yang sehat dan memiliki kulit yang normal.

3.3.3 Besar sampel

Besar sampel hewan coba untuk masing-masing sampel (n) diperoleh dari rumus Federer sebagai berikut:

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

Dimana r adalah replikasi dan t adalah jumlah intervensi, sehingga:

$$(r-1)(12-1) \geq 15$$

$$(r-1)11 \geq 15$$

$$r-1 \geq 1,36$$

$$r \geq 2,36$$

Dari perhitungan tersebut, penulis mengambil jumlah replikasi sebanyak tiga ekor per kelompok per hari pengamatan. Nilai 12 diambil dari 4 kelompok pada pengamatan hari ke-3, 4 kelompok pengamatan hari ke-7, dan 4 kelompok pengamatan hari ke-21. Jadi, terdapat 12 ekor tikus yang diterminasi per hari pengamatan sehingga total tikus yang digunakan adalah 36 ekor.

3.4 Definisi Operasional

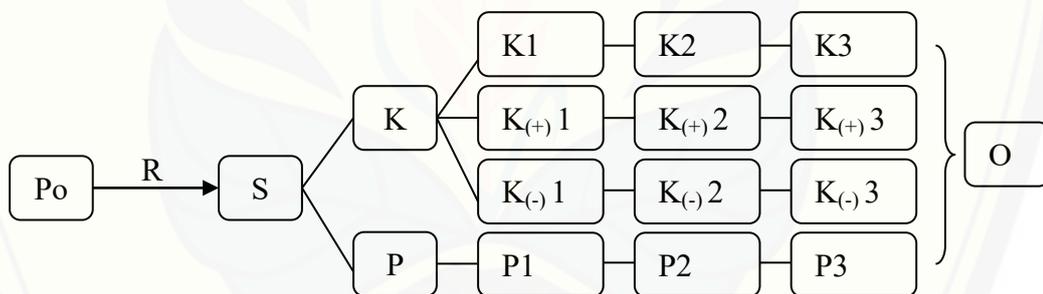
- a. Ekstraksi bayam adalah proses untuk mendapatkan zat-zat yang terkandung di dalam bayam segar dengan pelarut aquades yang dilakukan dengan blender, disaring menggunakan kain saringan tahu, dan diuapkan dengan metode *freeze drying*.
- b. Membran bakiko adalah sediaan hidrokoloid atau hidrofilik berupa suspensi yang dibuat dengan ekstrak bayam, kitosan dan kolagen sebagai basis gel. Membran tersebut mengandung bayam 9 mg, kitosan 0,25 mg, dan kolagen 0,25 mg per 2,5 x 2,5 cm.
- c. Luka bakar adalah luka bakar derajat II yang disebabkan adanya kontak kulit dengan pelat logam panas berdiameter 2 cm dengan suhu 105 °C selama 5 detik dengan tanda adanya peninggian epitel berwarna putih jika dibandingkan dengan daerah sekitarnya.
- d. Sediaan histopatologi yang diamati diambil dari jaringan kulit yang terkena luka bakar hingga lapisan subkutan. Cara ini digunakan untuk

memudahkan pengambilan kulit dan untuk memudahkan peneliti dalam menentukan lapisan-lapisan yang terdapat pada kulit. Bagian luka yang diambil terutama adalah bagian tengah luka.

- e. Matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) adalah protein yang terwarna dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi primer *rats anti MMP-9*, antibodi sekunder *goat anti polyvalent*, dan pewarna *DAB chromogen*. MMP-9 dilihat dengan bantuan mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang pengamat dengan metode *blinding* pada enam lapang pandang dengan bantuan *graticulae*. Hasil dari perhitungan ini kemudian akan dirata-rata.

3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design* (Pratiknyo, 2000). Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

Po : Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan

R : Randomisasi sampel

S : Sampel

K1 : Kelompok kontrol terminasi hari ke-3

K2 : Kelompok kontrol terminasi hari ke-7

K3 : Kelompok kontrol terminasi hari ke-21

K(+)-1 : Kelompok kontrol positif dengan pemberian luka bakar dan *Bioplacenton* 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-3

- K₍₊₎2 : Kelompok kontrol positif dengan pemberian luka bakar dan *Bioplacenton* 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-7
- K₍₊₎3 : Kelompok kontrol positif dengan pemberian luka bakar dan *Bioplacenton* 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-21
- K₍₋₎1 : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian luka bakar terminasi hari ke-3
- K₍₋₎2 : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian luka bakar terminasi hari ke-7
- K₍₋₎3 : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian luka bakar terminasi hari ke-21
- P1 : Kelompok perlakuan dengan pemberian luka bakar dan membran bakiko 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-3
- P2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian luka bakar dan membran bakiko 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-7
- P3 : Kelompok perlakuan dengan pemberian luka bakar dan membran bakiko 1 jam setelah pembuatan luka terminasi hari ke-21
- O : Observasi MMP-9 kulit tikus

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah membran bakiko.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah MMP-9 per lapang pandang pada sediaan imunohistokimia kulit yang diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan setelah pembedahan pada hari ke-3, 7, dan 21.

3.6.3 Variabel Terkendali

- a. Jenis dan pemeliharaan binatang coba.
- b. Induksi luka bakar pada kulit punggung binatang coba.

- c. Lama perlakuan.
- d. Cara pengamatan.

3.7 Bahan dan Alat Uji yang Digunakan

3.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi bayam adalah bayam dan aquades. Untuk membuat membran, diperlukan ekstrak bayam, kitosan, kolagen, asam asetat dan aquades. Untuk uji *in vivo*, dibutuhkan membran bakiko. Pembuatan sampel kulit pemeriksaan imunohistokimia dibutuhkan aquades, formalin 10%, xylene, etanol 100%, PBST 10X, 10 mM Tris 1 mM EDTA, 10 mM sodium sitrat buffer, dan kit imunohistokimia dari *Scytech laboratories*.

3.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari blender, kain saringan tahu, *freeze drying machine* untuk proses ekstraksi. Dibutuhkan pisau cukur, logam, spirtus, dan penggaris untuk induksi luka bakar. Pembuatan membran membutuhkan alat beaker glass 50 mL, gelas ukur 10 mL, neraca ohaus dan lemari pendingin untuk menyimpan gel. Pemberian membran bakiko membutuhkan *hand scoon*. Proses imunohistokimia memerlukan slide preparat, wadah kaca, dan *water bath*.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus

Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, sebanyak 36 ekor yang terbagi dalam empat kelompok. Tikus yang dipilih harus mempunyai kulit yang sehat dan normal.

3.8.2 Proses Adaptasi Tikus

Tikus diadaptasikan selama empat minggu sebelum diberi perlakuan. Satu kandang diberi sekat pembatas dan berisi dua tikus dengan ukuran kandang 38 x

30 x 12 cm. Suhu ruangan pemeliharaan sebesar 27°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Siklus pencahayaan ruangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Tikus diberi pakan standar dan diberikan air minum secara *ad libitum*.

3.8.3 Ekstraksi Bayam

Bayam segar diekstraksi menggunakan blender dengan pelarut aquades perbandingan 1:1. Kemudian disaring menggunakan saringan tahu dan diambil hasil ekstraksinya. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan metode *freeze drying* untuk mendapatkan ekstrak bayam kering.

3.8.4 Pembuatan Membran Bakiko

Larutan kolagen dengan konsentrasi 0,41 mg/mL dicampur dengan kitosan dalam 0,5 M asam asetat 1:1. Setelah itu, ditambahkan ekstrak bayam. Membran dicetak dengan menuangkan komposit kolagen-kitosan ke dalam plat kaca yang didalamnya telah terdapat kasa steril dengan ukuran 2,5 cm x 2,5 cm dan meratakan permukaannya dengan ketebalan ± 1 mm. Kemudian kita diamkan selama 24 jam pada suhu 4°C .

Formula membran bakiko yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

R/	Asam asetat 0,5 M	20 mL
	Ekstrak bayam	288 mg
	Larutan kitosan 16 mg/mL	1 mL
	Kolagen	16 mg
	Gelatin	1 g

3.8.5 Tahap perlakuan

a. Induksi Luka Bakar

Hewan coba dibius dengan ketamin 0,1 cc intramuskular. Kulit punggung dicukur dan menyeluruh. Luka bakar dibuat sebagai luka bakar kontak dengan

putaran diameter pelat logam 2 cm (105°C , 5 detik) pada sisi kanan dan kiri punggung tikus.

b. Perawatan Luka

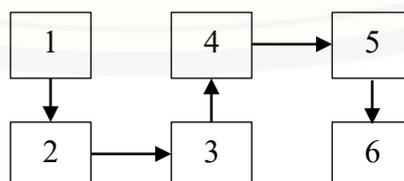
Setelah tikus di induksi luka bakar, tikus diperlakukan sesuai kelompok perlakuannya. Kelompok $K_{(+)}$ diberi *Bioplacenton* 1 jam setelah induksi dan kelompok P diberikan membran bakiko pada waktu yang sama dengan kelompok $K_{(+)}$. *Bioplacenton* dioleskan setiap hari dan membran bakiko ditempelkan pada luka bakar diganti setiap 3 hari sekali.

3.8.6 Pengambilan Jaringan Kulit

Hewan coba diterminasi pada hari ke-3, 7, dan 21 dengan jumlah tiga ekor tikus per kelompok tiap kali terminasi. Setelah itu, jaringan kulit yang diberi perlakuan kemudian diambil dan dibuat sediaan histopatologi. Jaringan kulit yang telah diambil kemudian disimpan dalam formalin 10%.

3.8.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

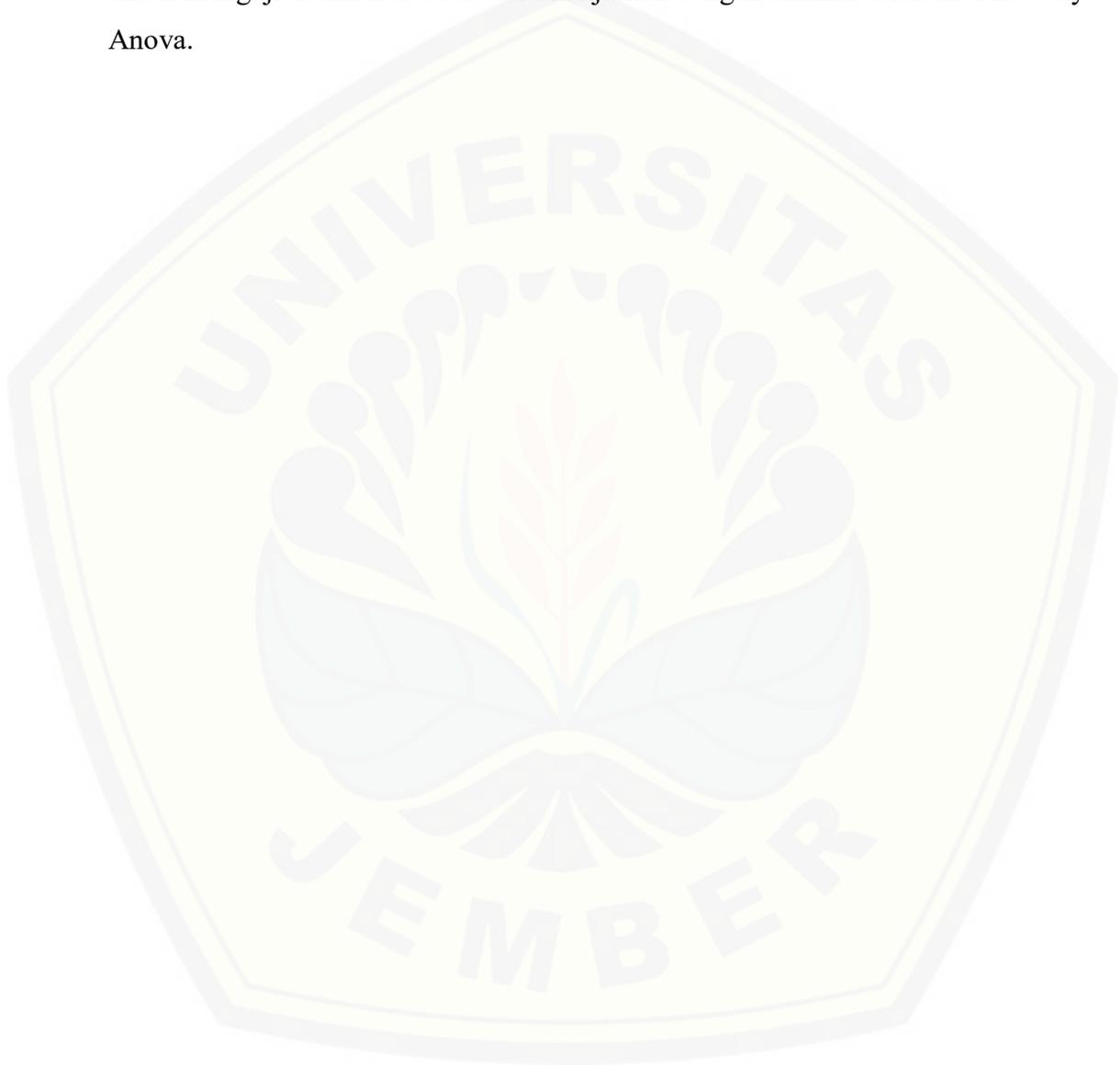
Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pewarnaan menggunakan kit imunohistokimia (*Scytech Laboratories*). MMP-9 dilihat dengan bantuan mikroskop perbesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang pengamat dengan metode *blinding* pada enam lapang pandang dengan bantuan graticulae (Gambar 3.2). Hasil dari perhitungan ini kemudian akan dirata-rata (Saputra, 2012).



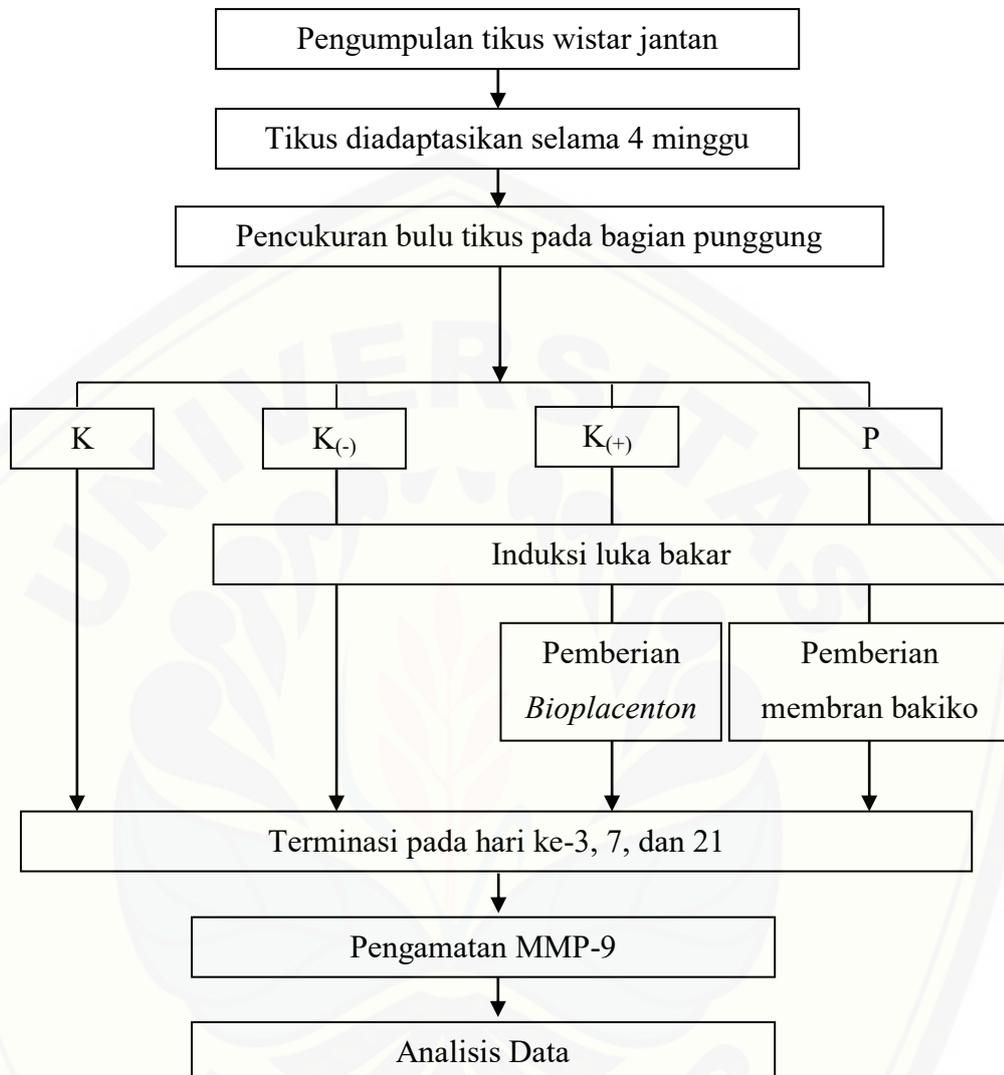
Gambar 3.2 Lapang Pandang yang Digunakan untuk Menghitung

3.9 Analisis Data

Dari hasil pengamatan yang diperoleh, data rata-rata jumlah MMP-9 per lapang pandang dianalisis secara statistik dengan menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk menguji normalitas data dan dilanjutkan dengan analisis statistik One Way Anova.



3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan aktivitas MMP-9 oleh membran bakiko pada luka bakar derajat II dengan metode imunohistokimia secara *in vivo* dengan perbedaan bermakna pada hari ke-3, 7, dan 21 ($p < 0,05$).

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang:

- a. Dosis efektif membran bakiko pada proses penyembuhan luka bakar dengan sampel yang lebih besar.
- b. Uji ekspresi MMP-9 menggunakan metode selain imunohistokimia
- c. Efek samping dan efek toksik membran bakiko pada proses penyembuhan luka bakar.

DAFTAR PUSTAKA

- Brunnicardi, F. C., D. K. Andersen, T. R. Biliar, D. L. Dunn, J. G. Hunter, J. B. Matthews, dan R. E. Pollock. 2010. *Schwartz's Principles of Surgery*. 9th ed. The McGraw-Hill Companies.
- Burhanudin, F. N., 2014, 'Uji Efektifitas Formulasi Gel Ekstrak Daun Cermat (Phyllanthus acidus L.) Terhadap Lama Kesembuhan Luka Bakar Pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Jantan', Skripsi, Sarjana Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Ngudi Waluyo, Semarang.
- Caley, M. P., V. L. C. Martins, dan E. A. O'Toole. 2015 Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care* 4(4): 225-234.
- Choi, Y. J., Y. H. Lee, dan S. T. Lee. 2015. Galangin and Kaempferol Suppress Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Fibrosarcoma HT-1080 Cells. *Mol Cells* 38(2):151-155.
- Church, D., S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, dan R. Lindsay. 2006. Burn Wound Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 19(2): 403-434.
- Clouatre, E., M. Gomez, J. Banfield, dan M. G. Jeschke. 2013. Work-related Burn Injuries in Ontario, Canada: a Follow Up 10-year Retrospective Study. *Burns* 39(6): 1091-1095.
- Dasu, M. R., M. Spies, R. E. Barrow, dan D. N. Herndon. 2003. Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Severely Burned Children. *Wound Repair Regen* 11:177-180.
- Elgharably, H., S. Roy, S. Khanna, M. Abas, P. D. Ghatak, A. Das, K. Mohammed, dan C. K. Sen. 2013. A Modified Collagen Gel Enhances Healing Outcome in a Pre- Clinical Swine Model of Excisional Wounds. *Wound Repair Regen* 21(3): 473-481.
- Elgharably, H., K. Ganesh, J. Dickerson, S. Khanna, M. Abas, P. D. Ghatak, S. Dixit, V. Bergdall, S. Roy, dan C. K. Sen. 2014. A Modified Collagen Gel Dressing Promotes Angiogenesis in a Pre-Clinical Swine Model of Chronic Ischemic Wounds. *Wound Repair Regen* 22(6): 720-729.
- Fujiwara, T., S. Kanazawa, R. Ichibori, T. Tanigawa, T. Magome, K. Shingaki, S. Miyata, M. Tohyama, dan K. Hosokawa. 2014. L-Arginine Stimulates Fibroblast Proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt Pathway. *Plos One* 9(3).

- Hu, X. dan C. Beeton. 2010. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of Visualized Experiments* 45: 1-5.
- Kirichenko, A. K., I .N. Bolshakov, A. E. Ali-Riza, dan A. A. Vlasov. 2013. Morphological Study of Burn Wound Healing with the Use of Collagen-Chitosan Wound Dressing. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 154(11): 652-656.
- Landen, N. X., D. Li, dan M. Stahle. 2016. Transition from Inflammation to Proliferation: a Critical Step During Wound Healing. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:3861–3885.
- Lin, F. dan J. Prichard. 2011. *Handbook of Practical Immunohistochemistry*. Springer.
- Lipsky, B. A. dan C. Hoey. 2009. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds. *Clinical Infectious Diseases* 49:1541–9.
- Mc Bane, J.E., B. Vulesevic, D. T. Padavan, K. A. Mc Ewan, dan G. S. Korbitt. 2013. Evaluation of a Collagen-Chitosan Hydrogel for Potential Use as a Pro-Angiogenic Site for Islet Transplantation. *Plos One* 8(10): e77538.
- Rahati, S., M. R. Eshraghian, A. Ebrahimi, dan H. Piswa. 2016. Effect of Spinach Aqueous Extract on Wound Healing in Experimental Model Diabetic Rats with Streptozotocin. *J Sci Food Agri* 96: 2337-2343.
- Ramasamy, P. dan A. Shanmugam. 2014. Characterization and Wound Healing Property of Collagen–chitosan Film from *Sepia kabiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Rosique, R. G., M. J. Rosique, dan J. A. F. Junior. 2015. Curbing Inflammation in Skin Wound Healing: A Review. *International Journal of Inflammation* 1-9.
- Rowan, M. P., L. C. Cancio, E. A. Elster, D. M. Burmeister, L. F. Rose, S. Natesan, R. K. Chan, R. J. Christy dan Kevin K. Chung. 2015. Burn Wound Healing and Treatment: Review and Advancements. *Critical Care* 1-12.
- Saparinto, C. 2013. *Grow Your Own Vegetables-Panduan Praktis Menanam 14 Sayuran Konsumsi Populer di Pekarangan*. Penebar Swadaya. Yogyakarta. 180 hlm.
- Sunarjono, H. 2014. *Bertanam 36 Jenis Sayuran*. Penebar Swadaya. Jakarta. 204 hlm.
- Tianhong, D., T. Masamitsu, H. Ying-Ying, dan M. R Hamblin. 2011. Chitosan Preparations for Wounds and Burns: Antimicrobial and Wound Healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9(7): 857–879.

- Townsend, C. M., R. D. Beauchamp, B. M. Evers, dan K. L. Mattox. 2012. *Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 19th ed. Elsevier Saunders.
- Trihono. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Tutton, M.G., M. L. George, S. A. Eccles, S. Burton, R. I. Swift, A. M. Abulafi. 2003. Use of Plasma MMP-2 and MMP-9 Levels as A Surrogate For Tumour Expression In Colorectal Cancer Patients. *Int J Cancer* 107: 541-550.
- Wall, S. J., D. Bevan, D. W. Thomas, K. G. Harding, D. R. Edwards, dan G. Murphy. 2002. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases During Impaired Wound Healing of the Diabetes Mouse. *The Journal Of Investigative Dermatology* 91-98.
- Wang, W., S. Lin, Y. Xiao, Y. Huang, Y. Tan, L. Cai, dan X. Li. 2008. Acceleration of Diabetic Wound Healing with Chitosan-crosslinked Collagen Sponge Containing Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in Healing-impaired STZ Diabetic Rats. *Elsevier* 82: 190-204.
- Wibowo, R., Zulfikar, H. Paramu, D. Rato, H. S. Addy, E. Sulistyarningsih, S. Bukhori, A. Tallapessy, N. D. Gianawati, Siswoyo, A. Rijadi, dan Nawiyanto. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: UPT Penerbitan Universitas Jember.

LAMPIRAN A. DATA PENGAMATAN EKSPRESI MMP-9**A.1 Data pengamatan hari ke-3**

Kode Tikus	Ekspresi MMP-9 per Lapang Pandang (pixel)				Rata-rata
	A	B	C	D	
K	132500,00	76364,00	85161,00	229866,00	130972,75
K-	766122,00	396030,00	249758,00	37760,00	362417,50
K+	554596,00	67646,00	261786,00	88033,00	243015,25
P	683002,00	979365,00	564818,00	561021,00	697051,50

A.2 Data pengamatan hari ke-7

Kode Tikus	Ekspresi MMP-9 per Lapang Pandang (pixel)				Rata-rata
	A	B	C	D	
K	132500,00	76364,00	85161,00	229866,00	130972,75
K-	582772,00	787775,00	956551,00	631029,00	739531,75
K+	171208,00	138363,00	345779,00	155311,00	202665,25
P	668319,00	741621,00	387467,00	594143,00	597887,50

A.3 Data pengamatan hari ke-21

Kode Tikus	Ekspresi MMP-9 per Lapang Pandang (pixel)				Rata-rata
	A	B	C	D	
K	132500,00	76364,00	85161,00	229866,00	130972,75
K-	115601,00	129134,00	281608,00	143413,00	167439,00
K+	114797,00	24174,00	70605,00	58802,00	67094,50
P	12259,00	13491,00	71055,00	49026,00	36457,75

LAMPIRAN B. HASIL UJI ANALISIS DATA**B1. Uji LSD pengamatan hari ke-3****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Luas_area

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Kontrolneg	-231444.750	153454.9188	.157	-565794.2959	102904.7959
	Kontrolpos	-112042.500	153454.9188	.479	-446392.0459	222307.0459
	Perlakuan	-566078.750*	153454.9188	.003	-900428.2959	-231729.2041
Kontrolneg	Kontrol	231444.7500	153454.9188	.157	-102904.7959	565794.2959
	Kontrolpos	119402.2500	153454.9188	.452	-214947.2959	453751.7959
	Perlakuan	-334634.000*	153454.9188	.050	-668983.5459	-284.4541
Kontrolpos	Kontrol	112042.5000	153454.9188	.479	-222307.0459	446392.0459
	Kontrolneg	-119402.250	153454.9188	.452	-453751.7959	214947.2959
	Perlakuan	-454036.250*	153454.9188	.012	-788385.7959	-119686.7041
Perlakuan	Kontrol	566078.750*	153454.9188	.003	231729.2041	900428.2959
	Kontrolneg	334634.000*	153454.9188	.050	284.4541	668983.5459
	Kontrolpos	454036.250*	153454.9188	.012	119686.7041	788385.7959

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

B2. Uji LSD pengamatan hari ke-7**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: trf7

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Kontrolneg	-502.93917*	69.41138	.000	-654.1736	-351.7048
	Kontrolpos	-89.06418	69.41138	.224	-240.2986	62.1702
	Perlakuan	-415.08608*	69.41138	.000	-566.3205	-263.8517
Kontrolneg	Kontrol	502.93917*	69.41138	.000	351.7048	654.1736
	Kontrolpos	413.87499*	69.41138	.000	262.6406	565.1094
	Perlakuan	87.85309	69.41138	.230	-63.3813	239.0875
Kontrolpos	Kontrol	89.06418	69.41138	.224	-62.1702	240.2986
	Kontrolneg	-413.87499*	69.41138	.000	-565.1094	-262.6406
	Perlakuan	-326.02190*	69.41138	.001	-477.2563	-174.7875
Perlakuan	Kontrol	415.08608*	69.41138	.000	263.8517	566.3205
	Kontrolneg	-87.85309	69.41138	.230	-239.0875	63.3813
	Kontrolpos	326.02190*	69.41138	.001	174.7875	477.2563

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

B3. Uji LSD pengamatan hari ke-21

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas_area21

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Kontrolneg	-36466.25000	40464.01108	.385	-124629.7565	51697.2565
	Kontrolpos	63878.25000	40464.01108	.140	-24285.2565	152041.7565
	Perlakuan	94515.00000*	40464.01108	.038	6351.4935	182678.5065
Kontrolneg	Kontrol	36466.25000	40464.01108	.385	-51697.2565	124629.7565
	Kontrolpos	100344.500*	40464.01108	.029	12180.9935	188508.0065
	Perlakuan	130981.250*	40464.01108	.007	42817.7435	219144.7565
Kontrolpos	Kontrol	-63878.25000	40464.01108	.140	-152041.7565	24285.2565
	Kontrolneg	-100344.500*	40464.01108	.029	-188508.0065	-12180.9935
	Perlakuan	30636.75000	40464.01108	.464	-57526.7565	118800.2565
Perlakuan	Kontrol	-94515.00000*	40464.01108	.038	-182678.5065	-6351.4935
	Kontrolneg	-130981.250*	40464.01108	.007	-219144.7565	-42817.7435
	Kontrolpos	-30636.75000	40464.01108	.464	-118800.2565	57526.7565

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

LAMPIRAN C. GAMBAR PENELITIAN



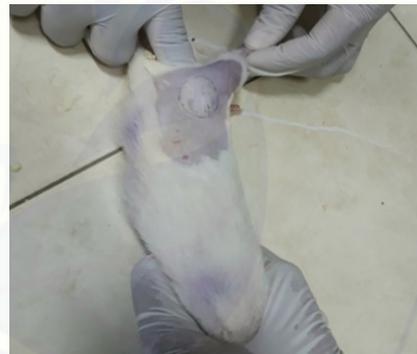
Gambar C1. Bayam Siap Ekstrak



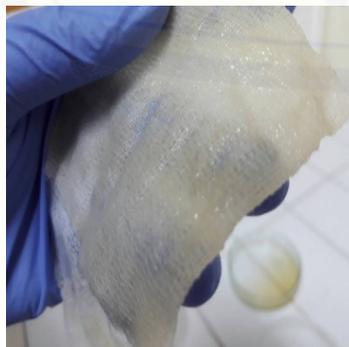
Gambar C2. Esktraksi Bayam Menggunakan *Freeze Dryer*



Gambar C3. Pemberian Luka Bakar



Gambar C4. Hasil Luka Bakar dan Pemberian *Bioplacenton*



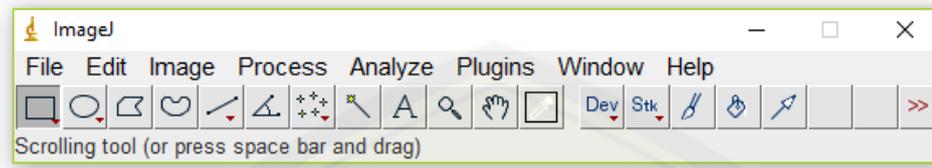
Gambar C5. Membran Bakiko



Gambar C6. Terminasi Hewan Coba

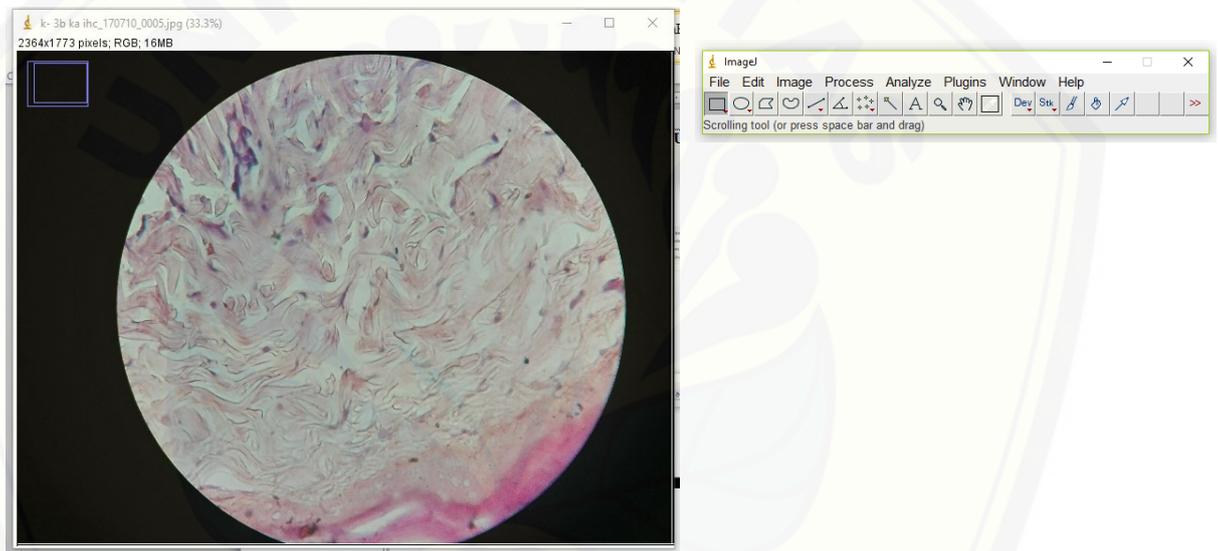
LAMPIRAN D. LANGKAH PENGHITUNGAN EKSPRESI MMP-9 DENGAN SOFTWARE *IMAGEJ*

1. Buka software *ImageJ*



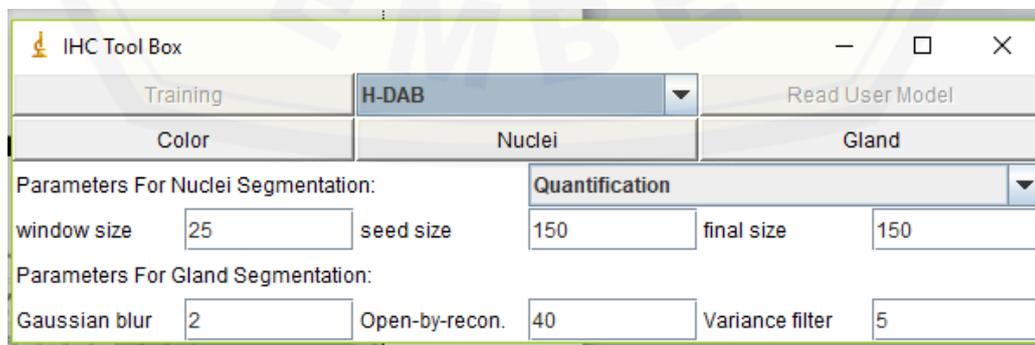
2. Pilih gambar yang akan dianalisis

Klik File → Open...



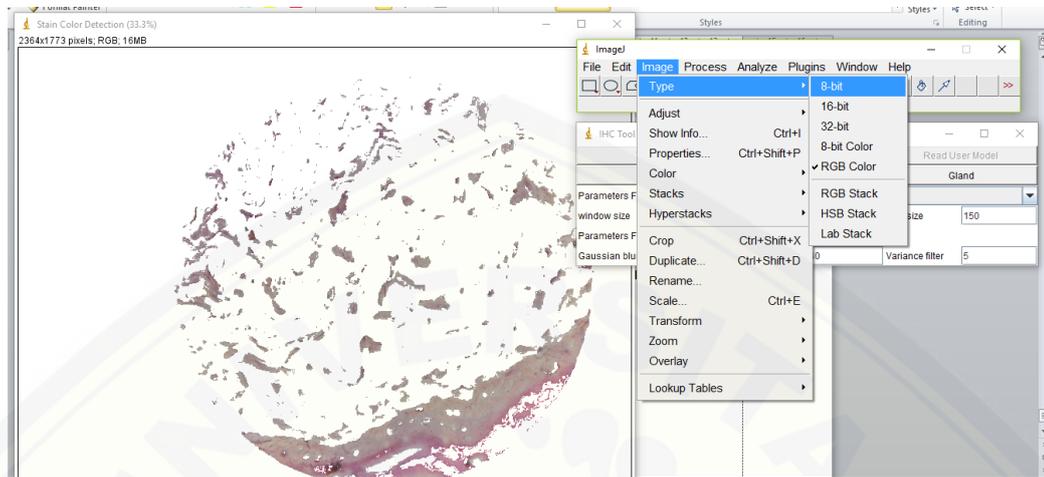
3. Pisahkan warna dengan IHC Tool Box pada menu Plugin

Klik Plugin → IHC Tool Box → Pilih H-DAB → Klik Color



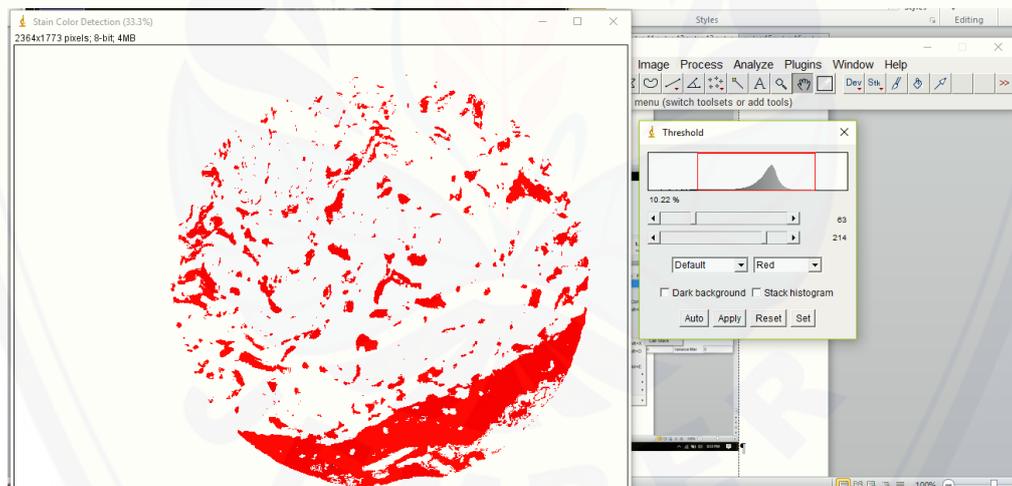
4. Ubah gambar menjadi 8-bit

Klik image → Type → 8-bit



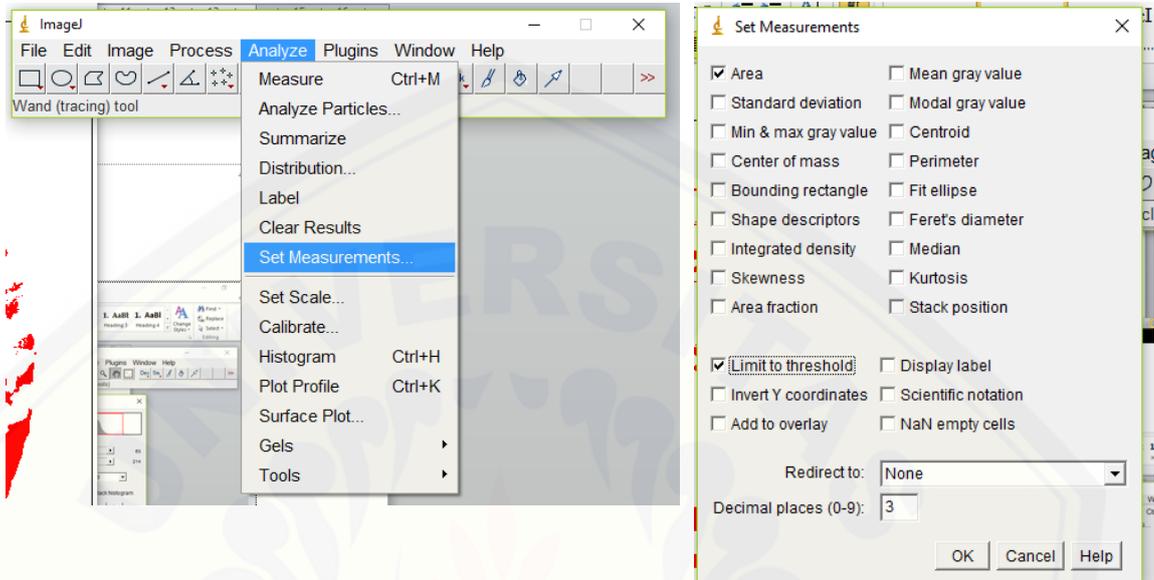
5. Tandai gambar dengan Threshold

Klik Image → Adjust → Threshold → atur warna sesuai gambar

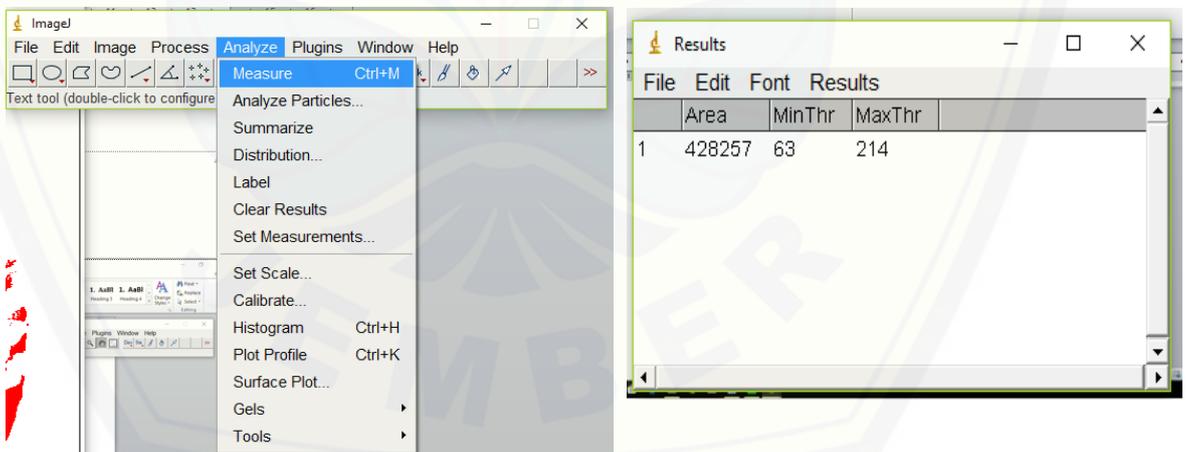


6. Hitung ekspresi MMP-9 dengan menghitung luasnya

Atur area penghitungan terlebih dahulu dengan klik Analyze → Set Measurement → pilih Limit to Threshold → klik OK



Klik Measure → catat hasilnya



LAMPIRAN E. PERIJINAN KOMISI 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 :
 lk_uncj@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA

Nomor : 731 /125.1.11/KE/2016

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 :

AKTIVITAS MEMBRAN BAKIKO (BAYAM-KITOSAN-KOLAGEN) TERHADAP EKSPRESI Matriks METALOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA LUKA BAKAR DERAJAT II DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA

Nama Peneliti Utama : Hazmi Dwinanda N (NIM.142010101032)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 5 April 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK