



**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.)) PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS DIABETES MELALUI EKSPRESI VEGF**

**SKRIPSI**

Oleh

**Haqiqotul Fikriyah  
NIM 152010101082**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia  
mammosa* (Lour.)) PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS  
DIABETES MELALUI EKSPRESI VEGF**

**SKRIPSI**

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

Oleh

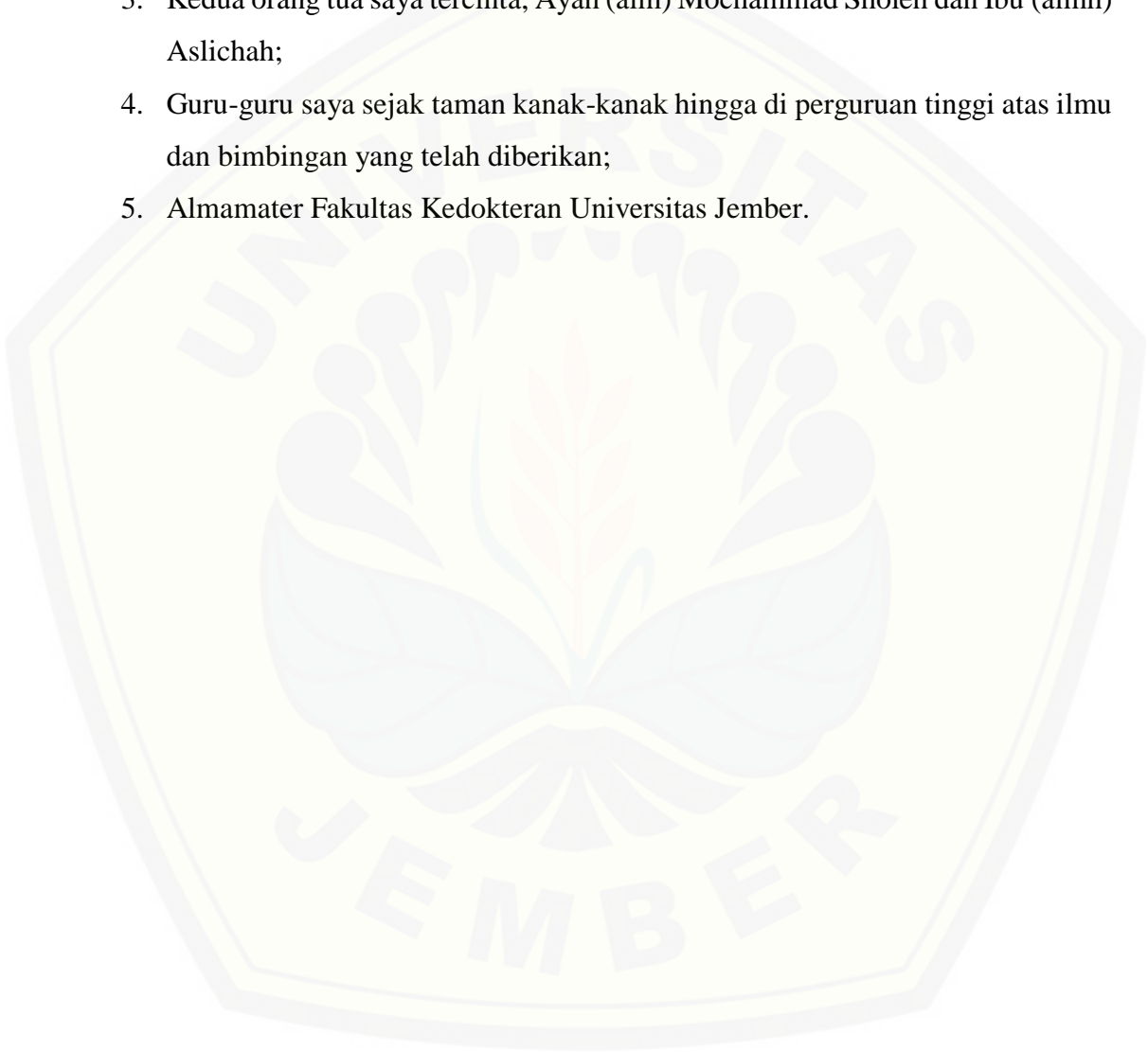
**Haqiqotul Fikriyah  
NIM 152010101082**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberi segala nikmat, karunia dan hidayah-Nya;
2. Nabi Muhammad SAW yang menjadi teladan untuk seluruh alam;
3. Kedua orang tua saya tercinta, Ayah (alm) Mochammad Sholeh dan Ibu (almh) Aslichah;
4. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak hingga di perguruan tinggi atas ilmu dan bimbingan yang telah diberikan;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTO**

Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum, sebelum mereka mengubah keadaan mereka sendiri<sup>\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2014. Syaamil Quran Al-Qur'an dan Terjemah. Bandung: Sygma creative media corp.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Haqiqotul Fikriyah

NIM : 152010101082

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada Penyembuhan Luka Tikus Diabetes melalui Ekspresi VEGF” adalah benari-benar hasil karya sendiri kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun. Saya bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Januari 2019

Yang menyatakan,

Haqiqotul Fikriyah  
NIM 152010101082

**SKRIPSI**

**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.)) PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS DIABETES MELALUI EKSPRESI VEGF**

Oleh

**Haqiqotul Fikriyah**  
**NIM 1520101082**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : dr. Ancah Caesarina Novi Marchianti, Ph. D

Dosen Pembimbing Anggota (DPA) : dr. Edy Junaidi, M. Sc, Sp. M

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efektivitas Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada Penyembuhan Luka Tikus Diabetes melalui Ekspresi VEGF” telah disetujui pada:

hari, tanggal : 11 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Rena Normasari, M. Biomed  
NIP 198305122008122002

dr. Ulfa Elfiah, M. Kes., Sp. BP-RE (K)  
NIP 197607192001122001

Anggota II,

Anggota III,

dr. Acah Caesarina Novi M., Ph. D  
NIP 198203092008122002

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

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

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

## RINGKASAN

**Efektivitas Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada Penyembuhan Luka Tikus Diabetes melalui Ekspresi VEGF;** Haqiqotul Fikriyah, 152010101082; 2019; 125 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Kadar gula darah yang tinggi pada pasien diabetes melitus mengakibatkan beberapa komplikasi, salah satunya yaitu luka diabetes. Luka tersebut dapat menyebabkan amputasi jika tidak ditangani. Terapi medikamentosa yang ada untuk menangani luka diabetes ialah berupa antibiotik topikal gentamicin. Namun, obat ini memiliki beberapa efek samping sehingga dibutuhkan obat alternatif lain untuk luka diabetes. Pada luka diabetes proses penyembuhan lebih lama dikarenakan adanya faktor-faktor yang disebabkan oleh tingginya kadar gula darah tersebut. Fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) mempunyai kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, alkaloid, dan resin glikosida yang bermanfaat pada penyembuhan luka. Angiogenesis adalah sebuah proses pembentukan kembali kapiler-kapiler darah yang rusak yang penting dalam proses penyembuhan luka. Proses ini penting untuk oksigenasi dan suplai nutrisi pada jaringan yang baru terbentuk. VEGF merupakan salah satu *growth factor* proangiogenik yang penting pada proses angiogenesis. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui efektivitas fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada penyembuhan luka tikus diabetes dalam berbagai dosis dilihat dari ekspresi VEGF. Efektivitas dilihat dari adanya perbedaan ekspresi VEGF pada pemberian dosis fraksi air umbi bidara upas pada luka tikus diabetes.

Pada penelitian ini digunakan jenis dan rancangan penelitian *true experimental laboratories* dan *post test only control group design*. Terdapat beberapa kelompok dengan pemberian perlakuan secara topikal yaitu kontrol negatif (*aquadest*), positif (gentamicin 0,1%), kelompok dengan pemberian 12,5 mg, 25 mg, 50 mg, dan 100 mg fraksi air umbi bidara upas. Perlakuan diberikan pada total 24 luka tikus diabetes 2 hari sekali pada hari ke-1 hingga ke-10 setelah



pemberian eksisi berukuran 2x2 cm<sup>2</sup>. Setelah hari ke-10, dilakukan pengambilan jaringan kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi VEGF. Hasil dari perhitungan ekspresi VEGF dihitung pada *software* ImageJ, dimasukkan pada sistem skoring histologi (lemah 1; sedang 2; kuat 3) dan hasil skoring dianalisis melalui *software* statistik dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc* LSD.

Hasil yang didapatkan yaitu bahwa ekspresi VEGF terendah hingga tertinggi yaitu T1 (42,38), K(-) (42,84), K(+) (62,08), T2 (66,97), dan T4 (111,61). Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan  $p < 0,001$ , kemudian dilakukan uji *Post Hoc* LSD dan didapatkan kelompok K(-) berbeda signifikan dengan T2, T3 dan T4. Kelompok T1 berbeda signifikan dengan T2, T3, dan T4. Kelompok T2 memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok K(-), T1, dan T4. Kelompok T3 berbeda signifikan dengan kelompok K(-), T1, dan T4. Kelompok T4 berbeda signifikan dengan seluruh kelompok lain. Kelompok kontrol positif mempunyai perbedaan signifikan dengan kelompok T4 ( $p \leq 0,001$ ).

Berdasarkan hasil pengamatan di atas maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada pemberian fraksi air umbi bidara upas dalam berbagai dosis. Hal ini dikarenakan terdapat senyawa-senyawa aktif yang memungkinkan terjadinya penyembuhan luka diabetes yang ditandai dengan peningkatan ekspresi VEGF, seperti flavonoid, tanin, alkaloid, dan resin glikosida. Peningkatan ekspresi VEGF dapat mempercepat penyembuhan pada luka tikus diabetes.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala nikmat dan anugerah yang telah diberikan sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi berjudul “Efektivitas Fraksi Air Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) pada Penyembuhan Luka Tikus Diabetes melalui Ekspresi VEGF”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan di Fakultas Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

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

1. dr. Supangat, M. Kes, Ph. D, Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan selama menempuh studi pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Ancah Caesarina Novi Marchianti, Ph. D selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Edy Junaidi, M. Sc, Sp.M selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga dan perhatiannya dalam penyusunan skripsi ini;
3. dr. Rena Normasari, M. Biomed selaku Dosen Penguji I dan dr. Ulfa Elfiah, M. Kes, Sp.BP-RE selaku Dosen Penguji II atas semua masukan dan saran yang membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. dr. Elly Nurus Sakinah, M. Si dan Bu Evi Umayah Ulfa, S. Si, M. Si., Apt terimakasih atas kesempatan dan bantuannya yang telah diberikan dalam penelitian ini;
5. seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bantuan dan bimbingannya selama menjadi mahasiswa;
6. orangtua tercinta, Ayah (alm) Mochammad Sholeh dan Ibu (almh) Aslichah atas doa-doa, dukungan, bimbingan, dan kasih sayangnya selama ini;

7. saudara-saudara tercinta, kakak Lilik Koernia Wahidah, Husin Effendi, Nur Mufidah SA., Khusnul Abidin, (almh) Anissatul Fauziyah dan adik Achmad Daynamus Sholih atas doa, dukungan dan semangat yang selalu diberikan;
8. rekan kerja seperjuangan dalam penelitian Gusfita Trisna Ayu Putri, Nurin Kamila S.P., Deuxy Ilma W., Mizan Maulana, Mega Citra Prameswari dan Annisa Dewi yang telah memberikan semangat, tenaga, waktu, dan pikirannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
9. sahabat-sahabat tercinta saya Mutiara Aprilina Muttaqien, Khanif Muflikhatun, Gusfita Trisna Ayu Putri, Cagar Irwin Taufan Pamungkas, dan Ian Putra Romanda atas dukungan moral sejak semester awal hingga sekarang;
10. teman terdekat saya Abdul Nafi' Husna yang telah memberikan dukungan dan semangatnya;
11. orang-orang terdekat saya Yoshe Gassarine Ainun Nisaa, Firman Herdiana dan Fatimatuzzahra Al Haddar, terimakasih untuk semangat yang telah diberikan;
12. sahabat-sahabat lama saya Arifatul Hamila, Devi Yulia Kusuma Cahyani, Septi Zulfa Nabilla, Yovi Ocktaviani, Septa Zufar Muzakki, Rana Hardin P.A., dan Latif Annasrullah untuk semangat dan pertemanan yang selalu terjalin semenjak kali pertama kenal;
13. keluarga besar Coccoyx 2015 atas semangat dan dukungannya selama menempuh pendidikan;
14. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari seluruh pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap agar kelak skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 11 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Manfaat Bagi Ilmu Kedokteran.....	5
1.4.2 Manfaat Bagi Pelayanan Kesehatan.....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Umbi Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.)).....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi.....	6
2.1.2 Kandungan dan Kegunaan .....	7
<b>2.2 Diabetes Mellitus.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Definisi.....	8
2.2.2 Klasifikasi .....	8
2.2.3 Diagnosis.....	9

<b>2.3 Penyembuhan Luka Normal dan Diabetes</b> .....	10
2.3.1 Fase Penyembuhan Luka Normal .....	10
2.3.2 Gangguan Penyembuhan Luka Diabetes.....	14
2.3.3 Proses Angiogenesis pada Luka Diabetes.....	16
2.3.4 Klasifikasi Luka Diabetes .....	17
<b>2.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</b> .....	19
<b>2.5 Model Hewan Coba Diabetes</b> .....	19
2.4.1 Model Tikus Diabetes Tipe 1 .....	19
2.4.2 Model Hewan Coba Diabetes Tipe 2 .....	22
<b>2.6 Metode Ekstraksi dan Fraksinasi</b> .....	23
2.6.1 Metode Ekstraksi.....	23
2.6.2 Metode Fraksinasi .....	25
<b>2.7 Kerangka Teori</b> .....	28
<b>2.8 Kerangka Konsep</b> .....	29
<b>2.10 Hipotesis</b> .....	30
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	31
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	31
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	31
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	32
<b>3.4 Populasi dan Sampel Penelitian</b> .....	33
3.4.1 Populasi .....	33
3.4.2 Sampel.....	33
3.4.3 Besar Sampel Penelitian.....	33
<b>3.5 Variabel Penelitian</b> .....	34
3.5.1 Variabel Bebas .....	34
3.5.2 Variabel Terikat .....	35
3.5.3 Variabel Kontrol.....	35
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	35
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	36
3.7.1 Alat.....	36
3.7.2 Bahan Penelitian.....	37

<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	37
3.8.1 Pemilihan Hewan Coba.....	37
3.8.2 Adaptasi Hewan Coba.....	38
3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan .....	38
3.8.4 Pembuatan Ekstrak.....	38
3.8.5 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas.....	39
3.8.6 Penginduksian Streptozotocin (STZ) .....	40
3.8.7 Pemeriksaan Kadar Glukosa .....	40
3.8.8 Pemberian Luka Eksisi.....	40
3.8.9 Pemberian Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas .....	40
3.8.10 Pengambilan Jaringan Kulit .....	40
3.8.11 Pembuatan Preparat Imunohistokimia .....	41
3.8.12 Pengamatan Ekspresi VEGF .....	42
<b>3.9 Analisis Data Penelitian</b> .....	43
<b>3.10 Alur Penelitian</b> .....	43
3.10.1 Tahapan Pembuatan Ekstrak Umbi Bidara Upas .....	43
3.10.2 Tahapan Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas.....	44
3.10.3 Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia .....	44
3.10.4 Langkah Penggunaan <i>Software</i> ImageJ dalam Perhitungan Ekspresi VEGF .....	45
3.10.5 Tahapan Perlakuan pada Hewan Coba.....	46
<b>3.11 Uji Kelayakan Etik</b> .....	47
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	48
<b>4.1 Hasil dan Analisis Data</b> .....	48
4.1.1 Hasil Fraksinasi .....	48
4.1.2 Hasil Kadar Glukosa Darah .....	48
4.1.3 Hasil dan Gambaran Ekspresi VEGF.....	49
4.1.3 Analisis Perbedaan Ekspresi VEGF.....	51
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	53
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	60
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	60

<b>5.2 Saran</b> .....	60
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	61
<b>LAMPIRAN</b> .....	72



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Kadar tes laboratorium darah untuk diagnosis diabetes dan prediabetes .....	10
2.2 Klasifikasi luka diabetes kaki wagner .....	18
3.1 Definisi operasional .....	35
3.2 Pembagian kelompok perlakuan .....	38
4.1 Hasil pemeriksaan GDA .....	49
4.2 Nilai rata-rata ekspresi VEGF .....	51
4.3 Hasil uji <i>One Way</i> ANOVA .....	52
4.4 Hasil uji <i>post hoc multiple comparisons</i> LSD .....	52



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Bidara upas .....	7
2.2 Fase-fase penyembuhan luka normal .....	14
2.3 Pengaruh diabetes pada penyembuhan luka.....	15
2.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka diabetes .....	16
2.5 Skema prinsip ekstraksi cair-cari (LLE) .....	26
2.6 Kerangka teori.....	28
2.7 Kerangka konsep penelitian .....	29
3.1 Skema rancangan penelitian.....	31
3.2 Komponen statistik penelitian.....	34
3.3 Skema pembuatan ekstrak umbi bidara upas .....	43
3.4 Skema pembuatan fraksi air umbi bidara upas .....	44
3.5 Skema perhitungan ekspresi VEGF dengan software ImageJ .....	45
3.6 Gambar tahapan perlakuan dan prosedur lain.....	46
4.1. Pengamatan ekspresi VEGF.....	50
4.2 Grafik hasil ekspresi VEGF.....	51

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi .....	72
3.2 Prosedur Pengecatan Imunohistokimia .....	75
3.3 Langkah Perhitungan Ekspresi VEGF .....	78
3.4 Surat Keterangan Persetujuan Etik.....	83
4.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi .....	85
4.2 Dokumentasi Luka secara Makroskopis .....	87
4.3 Data Perhitungan Ekspresi VEGF.....	90
4.4 Uji Analisis Statistik .....	97
4.5 Dokumentasi Penelitian .....	103
4.6 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi .....	107

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan pada sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya (Purnamasari, 2014). Pada 2014 diperkirakan terdapat 422 juta orang dewasa hidup dengan DM, jumlah tersebut lebih besar jika dibandingkan dengan penderita pada tahun 1980 yaitu sebesar 108 juta (WHO, 2016). Menurut *International Diabetes Federation* (IDF) (2017), Indonesia menempati peringkat ke-6 penderita DM tertinggi di dunia yang penderitanya mencapai 10,3 juta orang dengan rentang umur 20-79 tahun dan diperkirakan akan mencapai jumlah 16,7 juta pada tahun 2045. Selain itu DM menjadi penyebab kematian dari 1,6 juta orang di dunia pada tahun 2015 dan diprediksi akan menjadi penyebab kematian utama ketujuh pada 2030 (WHO, 2017).

Kadar gula darah yang tinggi pada pasien DM mengakibatkan beberapa komplikasi, salah satunya yaitu luka diabetes. Adanya perubahan metabolik pada penderita DM secara langsung menyebabkan efek pada jaringan neural, sedangkan perubahan neurodegeneratif menyebabkan berkurangnya suplai vaskular pada saraf (Dam *et al.*, 2013). Kerusakan pada sistem saraf perifer ini yang menjadi pencetus luka diabetes karena menyebabkan sensasi nyeri pada kaki berkurang. Faktor lain berupa melemahnya respon imun yang ditandai dengan ketidakadekuatan respon inflamasi dan suplai darah yang berkurang juga memperburuk penyembuhan luka diabetes (Waspadji, 2014). Selain itu, proses penyembuhan luka diabetes lebih lama daripada luka pada orang normal dikarenakan terganggunya proses penyembuhan luka, yang meliputi penurunan pada beberapa hal seperti produksi *growth factor*, respon angiogenik, fungsi makrofag, akumulasi kolagen, fungsi barrier epidermal, granulasi jaringan, migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas, jumlah saraf-saraf epidermal, *bone healing*, dan keseimbangan akumulasi komponen ECM (*extracellular matrix*) dan *remodeling* MMP (*matrix methalloproteinase*) (Brem *et al.*, 2007).

Walaupun luka diabetes terlihat seperti luka yang sedang mengalami proses penyembuhan, tetapi luka tersebut menjadi tempat berkembangnya infeksi yang bisa menyebabkan amputasi jika tidak ditangani (Brem *et al*, 2007). Populasi yang terdiagnosis diabetes mempunyai resiko 10-20 kali lebih besar mengalami amputasi daripada populasi yang nondiabetik (WHO, 2017). Menurut IDF (2017), setiap 30 detik di dunia terdapat satu kaki atau bagiannya hilang diamputasi akibat diabetes. Di Indonesia, khususnya di RS Ciptomangunkusumo, Jakarta, pada tahun 2008-2012 terdapat 80 pasien kaki diabetes dengan proporsi reamputasi sebesar 58,7% (Sitompul, 2015). Sedangkan dari data Rumah Sakit Luka Nirmala, Jember, pada Agustus 2015 hingga Januari 2016 terdapat 34 pasien ulkus diabetes (Restuningtyas, 2016). Penanganan bekas luka yang komprehensif diperlukan agar luka diabetes tidak semakin buruk menjadi ulser maupun gangren atau hingga bisa menyebabkan amputasi (Agustina, 2011; Badr, 2013).

Penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks karena meliputi beberapa fase yang terjadi secara simultan. Fase penyembuhan luka dibagi menjadi 4, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling* jaringan. Hemostasis terjadi ketika terdapat kerusakan pada pembuluh darah, otot polos sirkuler dari dinding pembuluh darah akan berkontraksi untuk menghindari lebih banyak darah yang keluar, dibantu dengan adanya kaskade pembekuan darah jalur intrinsik, ekstrinsik, dan aktivasi platelet. Dilanjutkan dengan fase inflamasi yang terdiri dari beberapa mekanisme dengan banyak neutrofil, makrofag, dan limfosit untuk mencegah terjadinya infeksi. Kemudian fase proliferasi yang terdiri dari beberapa tahap, yakni angiogenesis, migrasi fibroblas, epitelisasi dan retraksi. Fase proliferasi ini ditandai dengan adanya sel-sel epitel yang bermigrasi untuk menutup luka. Yang terakhir yaitu *remodeling* jaringan, ditandai dengan tumbuhnya epitel-epitel normal dan maturasi jaringan parut (Martin, 1997; Harper *et al.*, 2014; Okonkwo & DiPietro, 2017).

Angiogenesis merupakan salah satu tahapan pada fase proliferasi jaringan penyembuhan luka. Angiogenesis adalah sebuah proses pembentukan kembali kapiler-kapiler darah yang rusak. Proses ini penting untuk oksigenasi dan suplai nutrisi pada jaringan yang baru terbentuk (Theoret *et al.*, 2017). Proses awal

terjadinya angiogenesis ialah respon adanya hipoksia pada proses hemostasis sehingga faktor-faktor proangiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dikeluarkan bersama sitokin-sitokin lain untuk menginduksi migrasi sel-sel endotel sehingga terjadi pembentukan kapiler-kapiler baru (Harper *et al.*, 2014; Okonkwo & DiPietro, 2017). Setelah mencapai puncaknya pada hari ketujuh hingga sepuluh, faktor proangiogenik digantikan oleh faktor anti-angiogenik yang salah satunya berupa *pigment epithelium growth factor* (PEGF), sehingga tidak terjadi proses angiogenesis yang berlebih (Okonkwo & DiPietro, 2017). Namun, pada penyembuhan luka diabetes proses angiogenesis tidak berjalan sempurna. Tidak seperti pada nefropati ataupun retinopati diabetik yang mengalami proses angiogenesis berlebih, pada penyembuhan luka diabetes proses angiogenesis mengalami penurunan. Pada retinopati diabetik angiogenesis meningkat karena *pericyte* yang seharusnya menempel pada kapiler-kapiler pembuluh darah baru menghilang, sehingga menyebabkan edema vaskular dan terjadi kebocoran, yang menghasilkan neovaskularisasi dan peningkatan VEGF. Di sisi lain, peningkatan VEGF terjadi pada diabetik nefropati sehingga menyebabkan peningkatan angiogenesis (Okonkwo & DiPietro, 2017). Sedangkan pada luka diabetes, penetrasi pembuluh darah baru kurang adekuat sehingga mengakibatkan menurunnya sel-sel inflamasi yang masuk ke bagian luka dan menurunkan faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel-sel inflamasi tersebut (Berdal, 2017). Selain itu pada orang normal, makrofag beralih fungsi dari fenotip proinflamasi menjadi antiinflamasi/proreparasi. Namun pada orang diabetes makrofag gagal menstimulasi perbaikan jaringan. Karena makrofag sendiri sebagai pencetus utama munculnya VEGF dan beberapa mediator proangiogenik lain mengalami defisit, maka menyebabkan jumlah VEGF-pun juga berkurang dan angiogenesis pada luka diabetes mengalami penurunan (Okonkwo & DiPietro, 2017).

Terapi medikamentosa yang ada untuk menangani luka diabetes yaitu antibiotik topikal gentamisin. Namun, obat ini memiliki beberapa efek samping berupa iritasi kulit, alergi, kemerahan, hingga bengkak (Prameswari, 2017). Maka dari itu, dibutuhkan alternatif lain dalam menangani penyakit ini, salah satunya dengan menggunakan umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)). Terdapat

beberapa kandungan kimia zat aktif dari umbi bidara upas yakni flavonoid, tanin, alkaloid, dan resin glikosida (Farizal, 2012; Sofiana *et al.*, 2015). Flavonoid mempunyai kegunaan sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Hidayat *et al.*, 2015). Flavonoid dapat merangsang sel-sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin yang berfungsi untuk proliferasi dan migrasi fibroblas sehingga terjadi sintesis kolagen dan keratinosit yang berperan dalam penyembuhan luka (Julianto *et al.*, 2015). Selain itu, flavonoid juga bisa sebagai antibakteri karena dapat menghambat fungsi DNA girase (Hidayat, 2013). Zat aktif alkaloid juga bisa sebagai antibakteri dengan membentuk hambatan kompetitif adhesi protein mikroba ke reseptor polisakarida pada inang (Ukhrowi, 2011). Antibakteri lain yaitu zat aktif tanin dapat menginaktivasi adhesi sel bakteri, menginaktivkan enzim, dan mengganggu protein pada lapisan sel dinding bakteri (Prameswari, 2017). Selain itu, terdapat glikosida resin yang mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan selektif COX-1 dan COX-2 (Yoshikawa *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian oleh Marchianti *et al.* (2018), dari beberapa fraksi umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dengan pelarut yang berbeda yaitu etil asetat, n-heksana, dan air didapatkan bahwa fraksi air mempunyai hasil penyembuhan luka pada tikus diabetes yang paling signifikan. Sehubungan dengan hal di atas, maka peneliti ingin mengetahui efektivitas fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dalam penyembuhan luka diabetes dengan berdasarkan angiogenesis yang dilihat melalui ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini ialah sebagai apakah terdapat perbedaan ekspresi VEGF dari pemberian fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dalam berbagai dosis pada penyembuhan luka tikus diabetes.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini ialah menjelaskan perbedaan ekspresi VEGF dari pemberian fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dalam berbagai dosis pada penyembuhan luka tikus diabetes.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini ialah sebagai berikut.

#### 1.4.1 Manfaat Bagi Ilmu Kedokteran

- a. Sebagai informasi ilmiah efek fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada penyembuhan luka tikus diabetes dilihat melalui ekspresi VEGF.
- b. Penambahan ilmu pengetahuan di bidang farmakologi dan histoPA.
- c. Dapat dijadikan sebagai sumber pengembangan penelitian khususnya dalam bidang kedokteran.

#### 1.4.2 Manfaat Bagi Pelayanan Kesehatan

Dapat dijadikan dasar pengembangan tanaman obat di Indonesia baik dalam bidang farmasi maupun riset kesehatan untuk menciptakan alternatif baru dalam terapi penyembuhan luka diabetes.

#### 1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

Masyarakat diharapkan mengetahui manfaat kandungan umbi bidara upas terhadap proses penyembuhan luka diabetes.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

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

#### 2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dalam klasifikasinya masuk dalam taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom : *Tracheobionta*

Superdivisio : *Spermatophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Sub-kelas : *Asteridae*

Ordo : *Soloniales*

Familia : *Convolvulaceae*

Genus : *Merremia*

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

Sinonim : *Battata mammosa* Tumph

*Conculculus mammosa* Hall

*Ipomoea mammosa* Chois

Nama dagang : Umbi bidara upas

Nama daerah : Blanar, widoro upas (Jawa), hailale (Maluku/Ambon), bidara upas (Sumatera) (Farizal, 2012)

Tanaman umbi bidara upas mempunyai ciri-ciri batang melilit, bengkok, runcing, bulat dan ramping dengan panjang 3-6 cm. Daunnya tunggal, berseling, helai daun tidak berbentuk perisai, pangkal daun berbentuk jantung atau bundar, ujung daun runcing, panjang daun berkisar 5-12 cm dan lebar 4-15 cm. Bunganya berbentuk lonceng atau payung menggarpu, kelopak bunga 4 helai dan berbentuk lonjong, jumlah bunga bisa sampai empat buah, mahkota berwarna putih, dengan panjang 7-8 cm. Umbi menyerupai bentuk bulat, lonjong, atau kadang tidak beraturan, mirip ubi jalar atau kentang, jika tanah subur bisa menjadi besar hingga sebesar buah kelapa atau diameter sekitar 10-30 cm. Umbi bidara upas sering dipalsukan dengan umbi *Ipomoea digitata*, namun bisa dibedakan hanya



berdasarkan warna umbi setelah kering yaitu umbi bidara upas kehitaman, sedangkan *Ipomoea digitata* putih. Akarnya bergelantungan dan letak paling atas setengah di atas tanah (Kemenkes, 2011; Agil *et al.*, 2013). Morfologi tanaman umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 2.1.



(a)

(b)

(a) Tanaman bidara upas; (b) Umbi bidara upas

Gambar 2. 1 Bidara upas (Sumber:Kemenkes, 2011; Tokopedia, 2015)

### 2.1.2 Kandungan dan Kegunaan

Kandungan kimia zat aktif dari umbi bidara upas yakni flavonoid, tanin, alkaloid, dan resin glikosida (Farizal, 2012; Sofiana *et al.*, 2015). Flavonoid mempunyai kegunaan sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Hidayat *et al.*, 2015). Flavonoid dapat merangsang sel-sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin yang berfungsi untuk proliferasi dan migrasi fibroblas sehingga terjadi sintesis kolagen dan keratinosit yang berperan dalam penyembuhan luka (Julianto *et al.*, 2015). Selain itu, flavonoid juga bisa sebagai antibakteri karena dapat menghambat fungsi DNA girase (Hidayat, 2013). Zat aktif alkaloid juga bisa sebagai antibakteri dengan membentuk hambatan kompetitif adhesi protein mikroba ke reseptor polisakarida pada inang (Ukhrowi, 2011). Antibakteri lain yaitu zat aktif tanin dapat menginaktivasi adhesi sel bakteri dan enzim, serta dapat mengganggu protein pada lapisan sel dinding bakteri (Prameswari, 2017). Selain itu, terdapat glikosida resin yang mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan selektif COX-1 dan COX-2 (Yoshikawa *et al.*, 2010).

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk membuktikan kegunaan zat aktif dari umbi bidara upas. Menurut Lubis *et al.*, (2013), ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) juga bisa menurunkan pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi* secara *in vitro*. Ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dengan dosis bertingkat bisa meningkatkan proliferasi limfosit, *reaction oxygen intermediate* (ROI) dan fagositosis makrofag, serta produksi nitrit oksida pada tikus dengan infeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)), hal ini berkaitan dengan adanya adanya respon dari senyawa flavonoid di dalamnya (Ukhrowi, 2011; Farizal, 2012). Pada fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) didapatkan adanya senyawa polifenol dan memiliki daya hambat terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Olevianingrum, 2010). Fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) paling efektif dalam penyembuhan luka diabetes daripada fraksi n-heksana, dan etil asetat (Sakinah *et al.*, 2017). Pada fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) diindikasikan terdapat flavonoid berupa quercetin (Sakinah, 2018). Tanaman umbi bidara upas juga disebutkan dapat mengobati demam, serak, difteri, batuk, radang tenggorokan, radang paru, radang usus buntu, muntah darah, kencing manis, sembelit, tifoid, keracunan, gigitan ular, sifilis dan kusta (Setyowati, 2003).

## 2.2 Diabetes Mellitus

### 2.2.1 Definisi

Diabetes mellitus merupakan suatu penyakit kronik yang diturunkan dan/atau diperoleh karena defisiensi produksi insulin oleh pankreas, atau karena ketidakefektifan dari produksi insulin (WHO, 2018). Menurut Perkeni (2015), DM merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia dikarenakan kelainan sekresi, kerja insulin, atau keduanya.

### 2.2.2 Klasifikasi

Menurut American Diabetes Assosiation (ADA) 2018, diabetes bisa diklasifikasikan menjadi empat kategori umum, yaitu:

- a. Diabetes tipe 1 yaitu karena adanya autoimun yang menyebabkan destruksi sel beta, biasanya mengarah pada defisiensi insulin absolut.
- b. Diabetes tipe 2 yaitu karena kehilangan/kerusakan sekresi sel beta secara progresif karena adanya resistensi insulin. Selain otot, liver, dan sel beta, organ lain seperti jaringan lemak (peningkatan lipolisis), gastrointestinal (defisiensi inkretin), sel alfa pankreas (hiperglukagonemia), otak (resistensi insulin), dan ginjal (peningkatan absorpsi glukosa) berperan dalam menimbulkan adanya gangguan toleransi glukosa pada DM tipe 2 (PERKENI, 2015).
- c. DM gestasional yaitu diabetes yang terdiagnosis pada trimester kedua atau ketiga kehamilan dan tidak ada riwayat diabetes sebelum kehamilan.
- d. Diabetes tipe lain karena penyebab lainnya, seperti sindrom monogenic diabetes seperti neonatal diabetes, penyakit pada eksokrin pankreas misalnya kistik fibrosis dan pankreatitis, serta diabetes yang disebabkan oleh obat atau bahan kimia, contohnya karena penggunaan glukokortikosteroid karena HIV/AIDS atau setelah transplantasi organ.

### 2.2.3 Diagnosis

Diagnosis DM ditegakkan melalui kriteria glukosa plasma darah, bisa dari gula darah plasma saat puasa/*fasting plasma glucose* (FPG) atau glukosa plasma 2 jam setelah pemberian 75 gram glukosa oral atau disebut tes toleransi glukosa oral (TTGO). Selain itu juga bisa menggunakan kriteria HbA1C (ADA, 2018). Di sisi lain terdapat beberapa gejala yang biasa terjadi pada orang DM seperti keluhan klasik berupa polyuria, polydipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak jelas sebabnya. Keluhan lain seperti lemah badan, kesemutan, gatal, mata kabur juga bisa terjadi, serta disfungsi ereksi pada pria dan pruritus vulva pada wanita (PERKENI, 2015).

Berikut merupakan kriteria diagnosis DM menurut PERKENI (2015):

- a. pemeriksaan glukosa plasma puasa  $\geq 126$  mg/dl. Puasa yang dimaksud ialah kondisi tidak ada asupan kalori minimal 8 jam; atau
- b. pemeriksaan glukosa plasma  $\geq 200$  mg/dl pada 2 jam setelah TTGO 75 gram; atau

- c. pemeriksaan glukosa plasma sewaktu  $\geq 200$  mg/dl dengan keluhan klasik; atau
- d. pemeriksaan HbA1c  $\geq 6,5\%$  dengan menggunakan metode terstandarisasi oleh *National Glycohaemoglobin Standarization Program* (NGSP).

Kadar tes untuk diagnosis diabetes dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kadar tes laboratorium darah untuk diagnosis diabetes dan prediabetes

	HbA1c (%)	Glukosa darah puasa (mg/dl)	Glukosa plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dl)
<b>Diabetes</b>	$\geq 6,5$	$\geq 126$	$\geq 200$
<b>Prediabetes</b>	5,7-6,4	100-125	140-199
<b>Normal</b>	$< 5,7$	$< 100$	$< 140$

Sumber: PERKENI, 2015

## 2.3 Penyembuhan Luka Normal dan Diabetes

### 2.3.1 Fase Penyembuhan Luka Normal

Gangguan pada integritas kulit, permukaan mukosa atau jaringan organ akan menghasilkan pembentukan luka (Harper *et al.*, 2014). Luka pada kulit menginisiasi sebuah kaskade penyembuhan luka yang nantinya akan merekonstruksi area yang terluka. Proses perbaikan luka diawali dengan keluarnya beberapa faktor pertumbuhan, sitokin, senyawa molekul-molekul kecil dari bagian pembuluh darah yang terluka dan dari platelet yang terdegranulasi (Werner *et al.*, 2003). Penyembuhan luka merupakan sebuah proses kompleks dari beberapa tahapan yang saling tumpang tindih meliputi inflamasi, pembentukan jaringan granulasi, reepitalisasi, pembentukan matriks dan *remodeling* (Barrientos *et al.*, 2008). Untuk lebih jelasnya, berikut merupakan penjelasan pada masing-masing fase penyembuhan luka yang dibagi menjadi fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling* jaringan (Werner, 2003).

#### a. Fase Hemostasis/Koagulasi

Fase pertama penyembuhan dimulai segera ketika terjadi luka, dan selesai dalam beberapa jam sampai terbentuklah hemostasis dan matriks luka sementara. Luka pada pembuluh darah dapat menyebabkan hemoragik. Membran sel endotel mengeluarkan fosfolipid yang berubah menjadi asam

arakidonat dan metabolitnya yang memediasi tonus dan permeabilitas pembuluh darah. Kemudian terjadi vasokonstriksi perifer selama 5-10 menit untuk membatasi aliran darah yang secara simultan mengurangi suplai oksigen dan nutrisi sekitar yang normalnya dibawa oleh darah. Hal ini menyebabkan hipoksia sementara dan meningkatkan adanya glikolisis, sehingga pH berubah. Perubahan pH berperan dalam menimbulkan aktivasi, adhesi, dan agregasi platelet, dengan demikian menginisiasi kaskade koagulasi yang akan menghasilkan bekuan darah. Bekuan darah ini membentuk matriks sementara yang kaya akan fibrin, fibronektin, vitronektin dan trombospondin, yang memenuhi ruang dan sebagai jalan untuk migrasi sel-sel. Selain itu, bekuan darah juga berperan sebagai reservoir untuk sitokin dan faktor pertumbuhan seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor* (TGF) $\beta$ 1 yang dikeluarkan akibat degranulasi platelet (Martin, 1997; Falanga, 2005; Theoret *et al.*, 2017).

b. Fase Inflamasi

Neutrofil dan monosit tertarik ke arah luka karena adanya sinyal kemotaktik. Neutrofil sebagai “responden pertama” merupakan sel yang motil yang menginfiltrasi dan bermigrasi pada luka dalam 48 jam. Neutrofil dimediasi oleh kaskade komplemen, aktivasi interleukin, dan sinyal TGF- $\beta$ . Neutrofil dengan tiga tugas utamanya yaitu fagositosis partikel-partikel asing, degranulasi dan mengeluarkan bahan-bahan toksik, serta memproduksi kromatin dan protease yang akan membunuh bakteri di ekstraselular. Sedangkan adanya makrofrag pada awal fase inflamasi akan memfagositosis sisa-sisa organisme patogen, sel-sel lain dan debris matriks, serta memperbanyak hormon pertumbuhan dan sitokin ke arah luka, mengamplifikasi sinyal luka awal oleh degranulasi platelet dan neutrophil. Makrofrag pada fase awal inflamasi ini disebut dengan fenotip M1. Kemudian, pada akhir fase inflamasi dan memasuki fase proliferasi, makrofrag (fenotip M2) menstimulasi proliferasi jaringan dermal, endotel, dan epitel untuk menyempurnakan pembentukan ECM, angiogenesis dan epitelisasi (Martin, 1997; Harper *et al.*, 2014; Theoret *at al.*, 2017).

c. Fase Proliferasi

Ketika stimulus telah dikeluarkan, hemostasis sudah tercapai, dan respon inflamasi seimbang serta luka telah bebas dari debris, maka fase proliferasi mulai untuk memperbaiki defek (Harper *et al.*, 2014). Tujuan dari fase ini yaitu memperoleh proteksi pada permukaan luka melalui pembentukan granulasi jaringan dan sel-sel epitel baru, serta kembalinya vaskularisasi untuk menutrisi jaringan baru (Theoret *et al.*, 2017). Fase ini terdiri dari proses-proses kompleks seperti fibroplasia, angiogenesis, epitelisasi dan retraksi luka yang terjadi secara simultan (Harper *et al.*, 2014; Theoret *et al.*, 2017)

1) Fibroplasia

Selama hari ke-3 hingga ke-5 penyembuhan luka, fibroblas, endotel, dan epitel secara cepat membentuk matriks atau pelapis luka. Jaringan granulasi terbentuk dari tiga elemen yang secara simultan menuju ke defek yaitu makrofag (menghilangkan debris dan memproduksi mediator seperti sitokin dan faktor pertumbuhan yang menstimulasi angiogenesis dan fibroplasia), fibroblas (proliferasi dan sintesis komponen baru dari ECM), dan pembuluh darah baru (pembawa oksigen dan nutrisi). Hal ini menyebabkan luka berwarna merah dan tampak gambaran granular (Theoret *et al.*, 2017). Molekul-molekul matriks seperti sitokin dan faktor pertumbuhan menstimulasi fibroblas untuk berproliferasi. Setelah mencapai defek luka, fibroblas berproliferasi dan mengubah fungsinya untuk mensintesis protein dengan mengubah matriks sementara menjadi matriks yang kaya akan kolagen (Theoret *et al.*, 2017).

2) Angiogenesis

Angiogenesis penting untuk mengembalikan oksigenasi dan menyediakan nutrisi untuk jaringan granulasi yang baru terbentuk. Proses awal terjadinya angiogenesis ialah respon adanya hipoksia pada proses hemostasis sehingga faktor-faktor proangiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dikeluarkan bersama sitokin-sitokin lain untuk menginduksi migrasi sel-sel endotel sehingga terjadi pembentukan kapiler-kapiler baru (Harper *et al.*, 2014; Okonkwo & DiPietro, 2017).

Untuk stabilisasi pembuluh darah yang baru terbentuk, dibentuklah sel-sel otot polos (*pericyte*) yang diaktifkan oleh adanya *platelet derived growth factor* (PDGF). Setelah mencapai puncaknya pada hari ketujuh hingga sepuluh, faktor proangiogenik digantikan oleh faktor anti-angiogenik salah satunya berupa *pigment epithelium derived factor* (PEDF) yang diinduksi oleh *pericyte* sehingga tidak terjadi proses angiogenesis yang berlebih (Okonkwo & DiPietro, 2017).

### 3) Epitelisasi

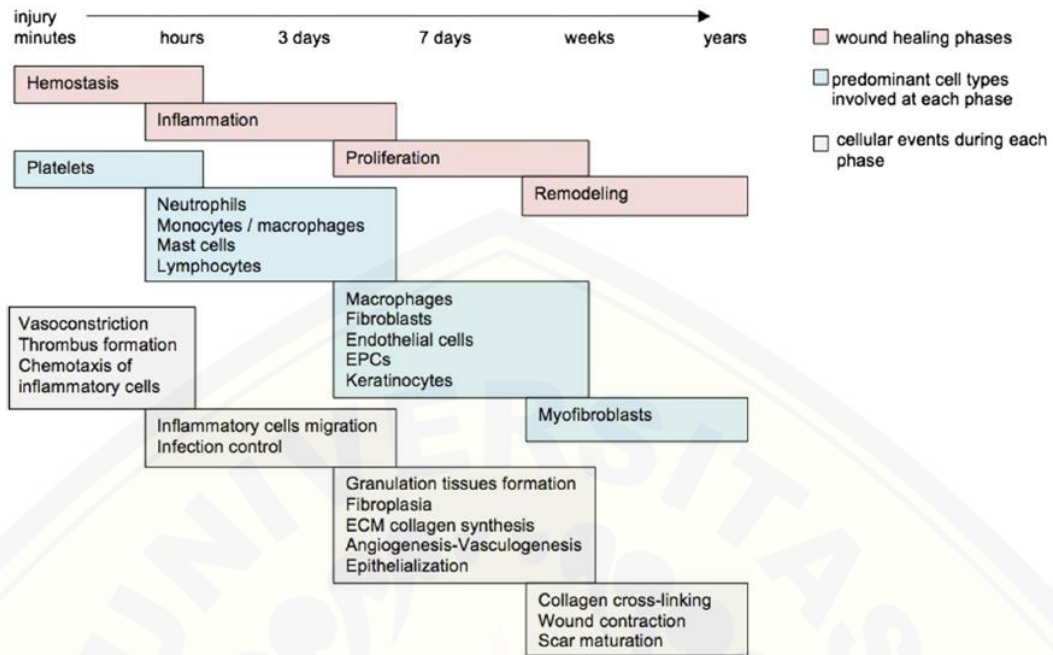
Epitelisasi merupakan proses penutupan luka oleh sel-sel epitel sehingga luka bisa menutup dengan sempurna. Sel-sel epitel bermigrasi dari perifer luka sampai seluruh luka tertutupi. Adanya *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) membuat epitel bisa motil/bergerak. Perubahan konsentrasi sitokin membuat sel-sel epitel yang motil berubah menjadi bersifat proliferasif sehingga bisa menutupi seluruh luka (Theoret *et al.*, 2017).

### 4) Retraksi luka

Luka mulai berretraksi sekitar tujuh hari setelah terjadinya luka terutama oleh miofibroblas. Interaksi antara aksin dan myosin menghasilkan penyempitan dari luas luka.

### d. Fase *Remodelling*

Fase ini bisa mencapai 2 tahun dan menghasilkan epitel normal dan maturasi jaringan parut. Protein dan kolagen yang terdeposit pada luka menjadi semakin teratur dan terjadi penggantian kolagen tipe 1 menjadi tipe 3, sehingga jaringan bisa terlihat seperti jaringan tanpa luka (Theoret *et al.*, 2017). Fase-fase penyembuhan luka normal ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Fase-fase penyembuhan luka normal (Sumber: Baltzis *et al.*, 2014)

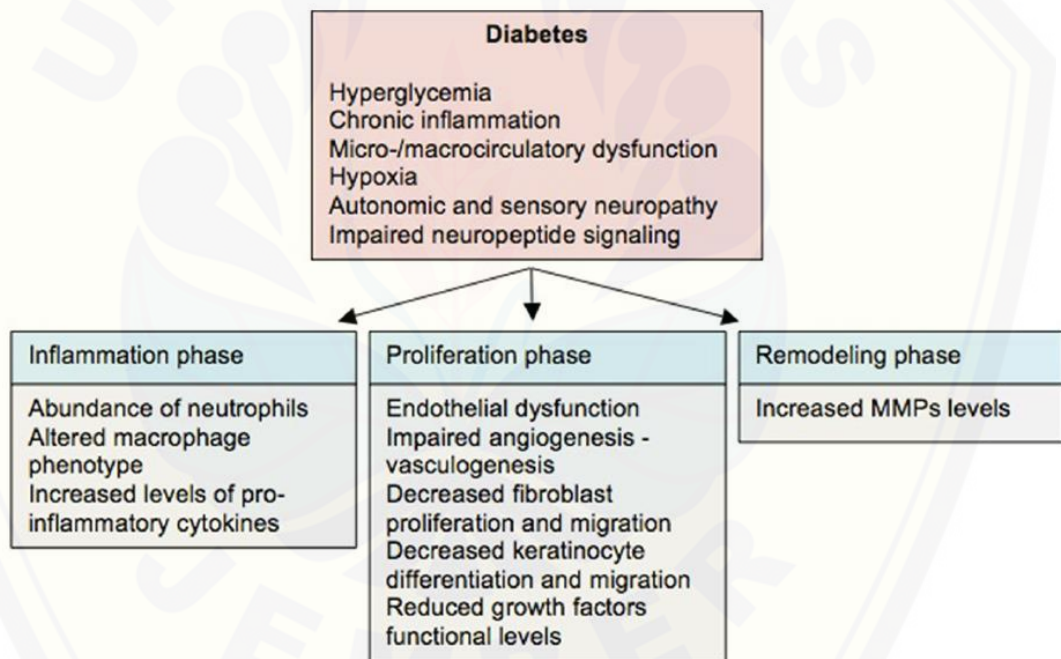
### 2.3.2 Gangguan Penyembuhan Luka Diabetes

Pada penyembuhan luka normal, proses-proses hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling* jaringan terjadi secara simultan dan *overlap*. Namun perbedaannya, pada penderita diabetes proses-proses ini mengalami penundaan atau terhenti di fase yang berbeda. Pada pasien diabetes, proses penyembuhan luka dipengaruhi oleh hiperglikemia, inflamasi kronis, disfungsi mikro dan makrosirkulasi, hipoksia, neuropati dan gangguan pada sinyal neuropeptida (Baltzis *et al.*, 2014). Ringkasan mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka pada pasien diabetes dapat dilihat pada Gambar 2.3.

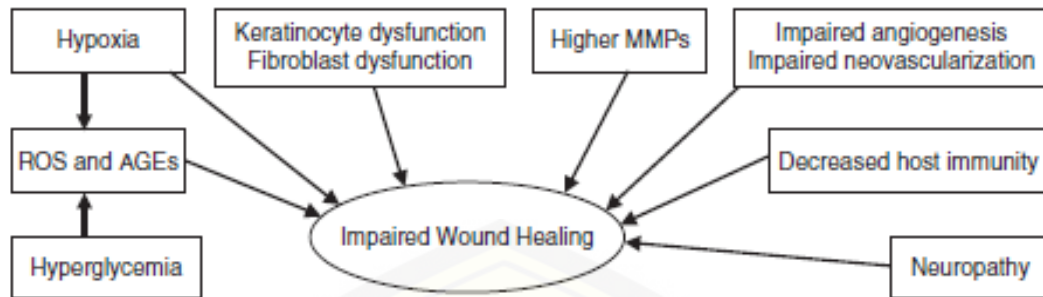
Hipoksia dapat memperkuat respon awal inflamasi awal dengan demikian dapat memperlama injuri dengan meningkatkan level dari radikal oksigen. Hiperglikemia dapat menambah stress oksidatif dengan memproduksi *reactive oxygen species* (ROS). Pembentukan dari advanced *glycation-end product* (AGEs) karena hiperglikemia dan juga interaksi dengan reseptornya mengakibatkan terganggunya penyembuhan luka diabetes. Tingginya MMP juga meningkatkan aktivitas protease yang menghambat pembentukan penyembuhan luka normal.



Beberapa fungsi sel yang terganggu seperti defek pada imunitas sel T (kemotaksis leukosit, fagositosis dan kapasitas bakterisidal) serta disfungsi fibroblas dan epidermal sel menyebabkan pembersihan bakteri yang inadkuat. Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa pada penyembuhan luka diabetes terdapat jumlah VEGF sebagai faktor proangiogenik yang menurun dan vaskularisasi/angiogenesis juga menurun. Selain itu, neuropati yang terdapat pada individu diabetes memperburuk proses penyembuhan luka karena penurunan neuropeptida (Guo & DiPietro, 2010). Keseluruhan faktor yang dapat mempengaruhi luka diabetes disebutkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.3 Pengaruh diabetes pada penyembuhan luka (Sumber: Baltzis et al., 2014)



Gambar 2. 4 Faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka diabetes  
(Sumber: Guo & DiPietro, 2010)

### 2.3.3 Proses Angiogenesis pada Luka Diabetes

Angiogenesis dan vaskulogenesis pada luka diabetes mengalami beberapa perubahan dari luka nondiabetes. Sel progenitor endotel menurun pada luka orang diabetes dan beresiko mengalami ulser pada kaki. Hiperglikemia dan inflamasi kronis merupakan penyebab utama disfungsi dari sel progenitor endotel. Selain itu juga disebutkan bahwa terdapat proses glikasi non-enzimatik pada membran dasar vaskular, sehingga terjadi gangguan regenerasi pembuluh darah (Baltzis *et al.*, 2014).

Angiogenesis mempunyai peran penting dalam patogenesis penyembuhan luka diabetes dan penyakit makro dan mikrovaskuler. Angiogenesis bisa meningkat maupun menurun tergantung pada proses patogenesis yang terjadi. Tidak seperti pada nefropati ataupun retinopati diabetik yang mengalami proses angiogenesis berlebih, pada penyembuhan luka diabetes proses angiogenesis mengalami penurunan. Pada retinopati diabetik angiogenesis meningkat karena *pericyte* yang seharusnya menempel pada kapiler-kapiler pembuluh darah baru menghilang, sehingga menyebabkan edema vaskular dan terjadi kebocoran, sehingga menghasilkan neovaskularisasi dan peningkatan VEGF. Di sisi lain, peningkatan VEGF terjadi pada diabetik nefropati sehingga menyebabkan peningkatan angiogenesis (Okonkwo & DiPietro, 2017). Sedangkan pada luka diabetes sendiri penetrasi pembuluh darah baru kurang adekuat yang menyebabkan menurunnya sel-sel inflamasi yang masuk ke bagian luka, sehingga menurunkan faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel-sel inflamasi tersebut (Berdal, 2017). Selain itu pada orang normal, makrofag beralih fungsi dari fenotip proinflamasi menjadi

antiinflamasi/proreparasi. Namun pada orang diabetes, makrofag gagal menstimulasi perbaikan jaringan. Sedangkan makrofag sendiri sebagai pencetus munculnya VEGF dan beberapa mediator proangiogenik lain mengalami defisit, sehingga jumlah VEGF-pun juga berkurang dan angiogenesis pada luka diabetes mengalami penurunan (Okonkwo & DiPietro, 2017).

#### 2.3.4 Klasifikasi Luka Diabetes

Ada banyak klasifikasi luka diabetes yang telah diajukan oleh beberapa peneliti, namun klasifikasi yang dijabarkan oleh Wagner Meggit (1970an) ialah yang paling lama dan sering dipakai. Klasifikasi ini sering disebut dengan klasifikasi Wagner, dengan menggunakan 6 tingkatan luka diabetes pada kaki berdasarkan kedalaman dan iskemia (Bowker & Pfeifer, 2007; Jaen & Joshi, 2013).

##### a. Klasifikasi kedalaman luka

- 1) Tingkat 0: pada kaki yang berisiko, terdapat ulser atau neuropati sebelumnya dengan deformitas yang dapat menyebabkan ulserasi baru
- 2) Tingkat 1: ulserasi superfisial, tidak terinfeksi
- 3) Tingkat 2: ulserasi dalam hingga ke tendon atau sendi (dengan/tanpa infeksi superfisial)
- 4) Tingkat 3: ulserasi luas hingga ke tulang dan/atau infeksi dalam (seperti osteomielitis atau abses)

##### b. Klasifikasi iskemia

- 1) Tingkat A: tidak iskemia
- 2) Tingkat B: iskemia tanpa gangrene
- 3) Tingkat C: parsial (kaki bagian depan atau tumit)
- 4) Tingkat D: gangren kaki menyeluruh

Jika disederhanakan, klasifikasi Wagner dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Klasifikasi luka diabetes kaki wagner

Tingkatan	Lesi
Tingkat 0	Tidak ada lesi terbuka; mungkin terdapat deformitas atau selulitis
Tingkat 1	Ulser superfisial (parsial maupun <i>full thickness</i> )
Tingkat 2	Ulser dalam hingga ke ligament, tendon, sendi, atau fascia dalam tanpa abses atau osteomielitis
Tingkat 3	Ulser dengan abses, osteomielitis dan sepsis sendi
Tingkat 4	Gangren kaki depan atau tumit kaki kaki
Tingkat 5	Gangren seluruh kaki

(Sumber:Wagner, 1987)

### 2.3.5 Tatalaksana Luka Diabetes

Pentalaksanaan dari ulkus diabetes ialah penutupan luka. Dasar perawatan ulkus diabetes yaitu *debridement*, *offloading* dan kontrol infeksi (Kruse & Edelman, 2006). Berikut merupakan penjelasan dari masing-masing tatalaksana.

#### a. *Debridement*

*Debridement* merupakan tindakan untuk membuang jaringan nekrosis, kalus dan jaringan fibrotik. Metode yang sering digunakan yaitu surgical, autolitik, enzimatik, kimia, mekanis dan biologis (Jones, 2007).

#### b. *Offloading*

*Offloading* merupakan pengurangan tekanan pada ulkus. Salah satu metode yang digunakan yaitu dengan *total contact casting* (TCC). TCC dibuat dari gips yang dibentuk secara khusus untuk menyebarkan beban pasien keluar dari area ulkus (Hariani & Perdanakusuma, 2008).

#### c. Kontrol infeksi

Adanya ulkus memungkinkan masuknya bakteri serta menimbulkan infeksi pada luka. Diagnosis infeksi terutama berdasarkan keadaan klinis seperti eritem, edema, nyeri, lunak, hangat dan keluar nanah dari luka (Doupis & Veves, 2008). Pada infeksi yang tidak membahayakan biasanya disebabkan oleh stafilokokus dan streptokokus, sedangkan pada infeksi berat biasanya karena infeksi polimikrobia, seperti streptokokus, stafilokokus, pseudomonas,

Enterobacteriaceae dan bakteri anaerob (Stillman, 2008). Dasar utama pemilihan antibiotik yaitu berdasarkan kultur sekret dan sensitivitas sel (Langi, 2011).

#### **2.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Tanda paling terlihat dalam proses proliferasi yaitu adanya angiogenesis. Faktor proangiogenik kemudian diproduksi karena adanya kondisi hipoksia pada injuri luka diabetes. Faktor-faktor yang paling penting yaitu *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF menstimulasi lekukan dan cabang-cabang immatur pembuluh darah baru. Awalnya, hipoksia karena injuri mengaktifasi faktor lain berupa *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) yaitu sebuah aktivator transkripsional yang akan meningkatkan regulasi dari VEGF-A. VEGF-A, isoform utama pada luka, berikatan dengan reseptornya pada sel endotel menyebabkan pertumbuhan pembuluh darah. VEGF bersama dengan faktor proangiogenik lain memandu pertumbuhan pembuluh darah dari area yang rendah oksigen di daerah perifer hingga ke *bed* luka (Okonkwo & DiPietro, 2017). VEGF tidak hanya diproduksi oleh sel-sel endotel, namun juga sel-sel lain seperti fibroblas, sel otot polos, platelet, neutrofil, dan makrofag. VEGF mampu menstimulasi komponen pada kaskade angiogenik berupa vasodilatasi, degradasi membran dasar, migrasi sel endotel, dan proliferasi sel endotel (Bao *et al.*, 2009)

#### **2.5 Model Hewan Coba Diabetes**

Pada awalnya, pembuatan model tikus diabetes yaitu dengan mengambil pankreas (pankreatektomi) dari hewan coba anjing. Namun seiring berjalannya waktu, model tikus diabetes semakin berkembang.

##### **2.4.1 Model Tikus Diabetes Tipe 1**

DM tipe 1 merupakan penyakit autoimun dengan multifaktorial berupa genetik dan lingkungan yang ditandai dengan destruksi sel beta pankreas oleh sel-T dan makrofag yang menghasilkan defisiensi insulin yang irreversibel. Model DM

tipe 1 dibagi menjadi dua, yaitu tikus spontan diabetes tipe 1 dan dengan pemberian agen diabetogenik (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

a. Model tikus autoimun spontan DM tipe 1

Ada beberapa tikus autoimun DM tipe 1, yaitu sebagai berikut.

1) Tikus *Non-obese Diabetic* (NOD)

Insulinitis pada tikus NOD diinisiasi pada umur 4-5 minggu, diawali dengan limfosit mengelilingi perimeter pulau hingga menginfiltrasi keseluruhan pulau pankreas dengan banyak leukosit (terutama CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>). Setelah periode subklinis dekstruksi  $\beta$ -sel, ketika diabetes sudah jelas terlihat, ketika 90% dari  $\beta$ -sel pankreas sudah rusak (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

2) Tikus *diabetes-prone BioBreeding* (DPBB)

Tikus DPBB mempunyai karakteristik yang sama dengan tikus NOD, namun insulinitis terjadi mulai 2-3 minggu sebelum terjadi keadaan klinis dan tidak diawali dengan peri-insulinitis, selain itu limfosit Th1 predominan pada prosedur ini (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

3) Tikus *Long Evans Tokushima Lean* (LETL)

Tikus model pertama yang secara spontan mengembangkan dekstruksi autoimun pada  $\beta$ -sel tanpa mengalami kondisis limfopenia. Tikus *Komeda Diabetes-prone* (KDP) merupakan bentuk model dengan 70-80% bisa menyebabkan diabetes pada jantan maupun betina (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

4) Tikus LEW.1AR1/Ztm-iddm

Model tikus baru dengan mekanisme sama dengan tikus BB dan KDP, dengan angka diabetes sebesar 70% pada kedua jenis kelamin dan tidak mati tanpa pemberian insulin (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

b. Tikus dengan pemberian bahan kimia

Ada beberapa bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi DM, yakni sebagai berikut.

1) Streptozotolin (STZ)

STZ merupakan derivat sintetis nitrosuria glukopiranosida dari fermentasi *Streptomyces achromogenes* (Nugroho, 2006; Etuk, 2010). Bahan ini paling sering dipakai sebagai agen diabetogenik. Jenis kelamin yang lebih

cenderung bisa mengalami diabetes dengan induksi STZ yaitu tikus jantan, karena pada tikus betina lebih resisten terhadap pemberian STZ dosis rendah (Wu & Huan, 2008). STZ mencegah reproduksi seluler dengan dosis yang jauh lebih kecil daripada dosis yang dibutuhkan untuk menginhibisi koneksi subtrat pada DNA atau inhibisi enzim-enzim yang dibutuhkan pada sintesis DNA (Holemans & van Anssche, 2003). Administrasi dosis rendah STZ (40 mg/kgBB) pada tikus membutuhkan waktu 5 hari untuk bisa mencapai diabetes yaitu ketika kadar glukosa 180-500 mg/dL (Wu & Huan, 2008; Etuk, 2010).

Efek toksik STZ pada beta sel pankreas bergantung pada alkilasi DNA dari bagian metilnitrosourea. Transfer grup metal dari STZ ke molekul DNA menyebabkan kerusakan sehingga menyebabkan fragmentasi DNA. Glikosilasi protein juga sebagai faktor tambahan pada kerusakan. Untuk memperbaiki DNA tersebut, poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) ditingkatkan stimulasinya. Hal ini menyebabkan deplesi  $\text{NAD}^+$  dan menurunkan penyimpanan ATP. Penurunan simpanan energi selular menyebabkan nekrosis beta sel (Lenzen, 2008).

## 2) Alloksan

Alloksan merupakan bahan kedua terbanyak yang dipakai untuk menginduksi DM. Alloksan yaitu derivat urea yang urea yang menyebabkan nekrosis selektif pada  $\beta$ -sel pulau pankreas. Alloksan bisa menghasilkan tingkat keparahan yang berbeda dengan variasi dosisnya (Etuk, 2010). Toksik alloksan pada  $\beta$ -sel menyebabkan oksidasi sulfidril esensial (-SH grup), inhibisi enzim glukokinase, meningkatkan radikal bebas dan mengganggu homeostasis dari kalsium intraselluler (Rohilla & Ali, 2012).

## 3) Ferri nitriloatrisetat

Bahan ini jarang dipakai karena membutuhkan dosis besar harian dan gejala diabetes baru muncul setelah 60 hari.

### c. *Genetically induced insulin-dependent diabetes*

Berupa tikus AKITA dengan mutasi spontan pada gen insulin 2 yang mencegah proses pro-insulin (King, 2012).

### d. Tikus yang diinjeksi virus

Virus yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 yaitu *coxsackie B virus*, virus ensefalomiokarditis, dan *Kilham rat virus* (King, 2012).

e. Model hewan coba non-rodent

Model hewan coba ini menggunakan cara pankreatomi dan induksi STZ. Pankreatomi pada babi dan pemberian STZ pada monyet dan babi juga (King, 2012).

#### 2.4.2 Model Hewan Coba Diabetes Tipe 2

Model hewan coba DM tipe 2 ditandai dengan adanya resistensi insulin dan tidak adekuatnya beta sel dalam mengkompensasi glukosa. Hewan coba DM tipe 2 sebagian besar merupakan model hewan coba obesitas, karena DM tipe 2 banyak dihubungkan dengan kondisi obesitas.

a. Hewan coba tikus tipe obesitas

Obesitas bisa secara natural menyebabkan mutasi atau manipulasi genetik. Ada beberapa contoh model hewan coba ini, yaitu hewan coba monogenik dan poligenik (King, 2012).

b. Model tikus *high fat feeding*

Pemberian makanan lemak bisa menyebabkan obesitas, hiperinsulinemia dan terganggunya homeostasis glukosa karena insufisiensi dari kompensasi pulau langerhans (Winzell *et al.*, 2004). Banyaknya lemak yang dikonsumsi harus dimonitor agar tikus tidak mengkompensasi dengan makan lebih sedikit.

c. Model tikus *non-obese*

Tidak semua model hewan coba DM tipe 2 ialah obesitas. Model ini mempunyai beta sel yang tidak adekuat, sehingga menyebabkan DM tipe 2 (Weir *et al.*, 2009).

d. Model hewan coba non-rodent

Hewan coba yang lebih besar juga digunakan dalam penelitian DM. Kucing pernah dijadikan sebagai model DM tipe 2 karena ada beberapa hal yang menyerupai DM pada manusia, yaitu terjadi pada umur pertengahan, adanya obesitas, resistensi insulin, dan beberapa bagian beta sel telah rusak (King, 2012).



## 2.6 Metode Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraks zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarutnya diuapkan dan massa/serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Ningsih *et al.*, 2016). Sedangkan fraksi merupakan pemisahan senyawa lanjutan setelah diekstraksi dengan berdasarkan sifat kepolaran pelarut yang dipakai.

### 2.6.1 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan dari bagian aktif tanaman menggunakan pelarut dan standar tertentu. Tujuan dari ekstraksi yaitu memisahkan metabolit-metabolit tanaman yang terlarut dari residu yang tidak terlarut. Terdapat beberapa metode ekstraksi, yaitu maserasi, infusi, perkolasi, dan dekoksi, *soxhlet*, *microwave assisted extraction* (MAE), *ultrasound-assisted extraction* (UAE), *accelerated solvent extraction* (ASE), dan *supercritical fluid extraction* (SFE) (Handa *et al.*, 2008; Azwanida, 2015).

#### a. Ekstraksi Maserasi, Infusi, Dekoksi dan Perkolasi

Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut, kemudian didiamkan selama tiga hari pada suhu ruangan. Proses ini bertujuan agar cairan pelarut bisa menembus dinding sel tumbuhan, sehingga bisa mengeluarkan zat-zat aktif. Infusi dan dekoksi menggunakan prinsip yang sama dengan maserasi, namun dengan menggunakan air dingin atau panas. Infusi membutuhkan waktu lebih singkat daripada dekoksi, sedangkan dekoksi sesuai untuk senyawa yang stabil pada suhu tinggi, larut minyak, atau bahan tanaman yang kuat (akar atau kulit). Pada perkolasi, simplisia dimasukan pada alat perkolator dengan ditambahkan air mendidih dan dimaserasi selama dua jam (Ningsih *et al.*, 2015; Azwanida, 2015)

#### b. Ekstraksi Soxhlet

Ekstraksi ini menggunakan pelarut yang selalu baru dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi berkelanjutan dengan jumlah pelarut yang konstan dengan adanya pendingin balik (Ningsih *et al.*, 2016). Nama lain dari ekstraksi ini yaitu *hot-continuous extraction* karena pelarut ekstraksi dipanaskan pada dasar

botol labu (*flask*), kemudian dievaporasi pada *thimble*, dikondensasi pada kondenser, lalu diteteskan kembali. Ketika liquid mencapai *siphon arm*, kemudian dikembalikan lagi pada botol labu (*flask*) (Azwanida, 2015).

c. *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Radiasi dari *microwave* pada frekuensi 300 MHz sampai 300GHz dan panjang gelombang antara 1 cm dan 1 meter berinteraksi dengan dipol polar dan material yang terpolarisasi. Radiasi ini menyebabkan adanya konduksi panas. Rotasi dipol pada molekul mengganggu ikatan hidrogen, meningkatkan migrasi dari ion yang tidak terlarut dan mendorong adanya penetrasi pada matriks (Azwanida, 2015; Altemimi *et al.*, 2017)

d. *Ultrasound-assisted Extraction* (UAE)

UAE menggunakan *ultrasound* dengan frekuensi 20 kHz hingga 2000 kHz. Adanya efek mekanik dari *ultrasound* menghasilkan peningkatan tumbukan dari pelarut dan sampel, sehingga bisa meningkatkan permeabilitas dinding sel sampel dan bisa mengeluarkan zat aktif dari sampel. UAE merupakan teknik paling mudah dalam pengekstraksian, karena hanya membutuhkan *ultrasonic bath* dan bisa dilakukan pada suhu yang rendah (Handa *et al.*, 2008; Azwanida, 2015; Altemimi *et al.*, 2017).

e. *Accelerated Solvent Extraction* (ASE)

ASE merupakan ekstraksi solid-liquid yang dilakukan pada suhu yang mengalami peningkatan, biasanya antara 50-200°C dan tekanan 10-15 MPa. Peningkatan suhu mempercepat ekstraksi kinetik dan peningkatan tekanan bisa menjaga pelarut dalam bentuk liquid (Handa *et al.*, 2008).

f. *Supercritical Fluid Extraction* (SFE)

*Supercritical fluid* (SF) atau juga bisa disebut sebagai *dense-gas* adalah zat yang memiliki sifat fisik dari gas dan cairan pada titik kritisnya. Faktor seperti suhu dan tekanan merupakan faktor penentu dalam titik kritis ini. Penggunaan CO<sub>2</sub> sebagai pelarut banyak digunakan pada SFE, dengan titik SF di atas suhu 31,1 °C dan 7380 kPa. Namun kelemahan dari metode ialah biaya yang sangat mahal (Azwanida, 2015).

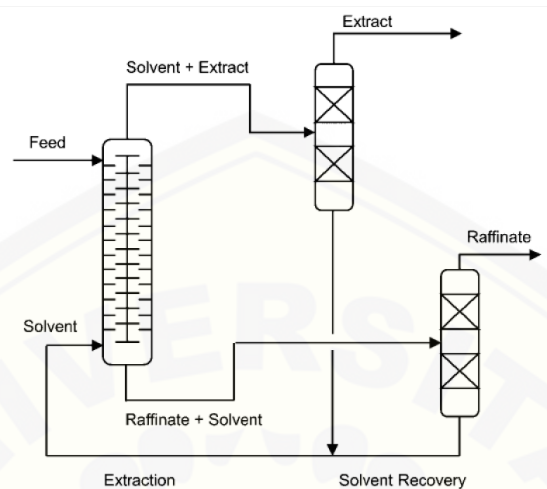
### 2.6.2 Metode Fraksinasi

Fraksinasi merupakan metode pemisahan senyawa lanjutan setelah ekstraksi, sehingga terisolasi senyawa berdasarkan kepolaran maupun ukuran molekul tertentu. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), dan *solid-phase extraction* (SPE). (Sarker *et al.*, 2006; Mukhriani, 2014; Prameswari, 2017). Berikut merupakan macam-macam metode dari fraksinasi.

#### a. Ekstraksi Cair-cair (Kromatografi Cair Vakum (KCV))

Ekstraksi cair-cair/*liquid-liquid extraction* (LLE) adalah teknik memisahkan dua liquid/cairan yang bercampur yang digunakan untuk mengisolasi komponen-komponen di dalamnya berdasarkan perbedaan permeabilitas (Ahokas *et al.*, 2017). Prinsipnya yaitu dengan memisahkan komponen yang tidak larut dalam pelarut dengan memindahkan pada pelarut yang lain. Pemindahan/*transferring* ini disebabkan karena adanya perbedaan solubilitas, dan ketika semakin besar perbedaannya, semakin besar pula komponen tersebut terekstraksi (De Haan & Bosch, 2013). Pelarut yang bertindak sebagai tempat pemindahan disebut “ekstrak dan pelarut”, sedangkan pelarut yang bertindak sebagai yang memindahkan disebut *raffinate* (Ahokas *et al.*, 2017).

LLE merupakan metode penting dalam pemisahan konstituen/komponen pada larutan yang homogen. Pada proses separasi, cairan/liquid kedua yang bersifat tidak/sedikit dapat tercampur dengan bahan ekstrak awal (*feed material*) menyebabkan zat terlarut menyebar/terdistribusi. Kemudian ditambahkan pelarut lagi yang bersifat tidak larut/*insoluble* pada campuran awal, sehingga didapatkan ekstrak dan pelarut yang terpisah dari *raffinate* (Dahal *et al.*, 2016; Ahokas *et al.*, 2017). Prinsip kerja pada LLE dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Skema prinsip ekstraksi cair-cari (LLE) (Sumber: De Haan & Bosch, 2013)

#### b. Kromatografi Kolom (KK)

KK ialah metode yang paling sering digunakan dibandingkan metode kromatografi yang lain. Teknik ini digunakan untuk purifikasi biomolekul. Pada KK, fase diam yang digunakan berupa adsorben solid yang diletakkan secara vertika; dan fase geraknya berupa liquid (buffer) ditambahkan dari atas kolom. Ekstrak kasar yang akan dipurifikasi dimasukkan dari atas kolom. Liquid ini kemudian turun karena gravitasi maupun tekanan udara. Adanya perbedaan interaksi komponen-komponen dari ekstrak kasar menyebabkan komponen tersebut berhenti pada titik-titik dan waktu tertentu, dengan begitu bisa didapatkan senyawa-senyawa yang telah terpisah.. Senyawa yang terpisah tersebut kemudian disebut dengan fraksi (Barbara, 2014; Coskun, 2016; Bajpai *et al.*, 2016).

#### c. *Size-Exclusion Chromatography* (SEC)

SEC adalah metode separasi yang berdasarkan ukuran molekul (lebih tepatnya, volume hidrodinamik) dari komponen yang dihitung dari seberapa efisien molekul tersebut berpenetrasi pada fase diam. SEC dibagi dua macam, yaitu yang menggunakan pelarut organik disebut *gel permeation chromatography* (GPC) dan pelarut aquos disebut *gel filtration*. Molekul dengan berbagai ukuran

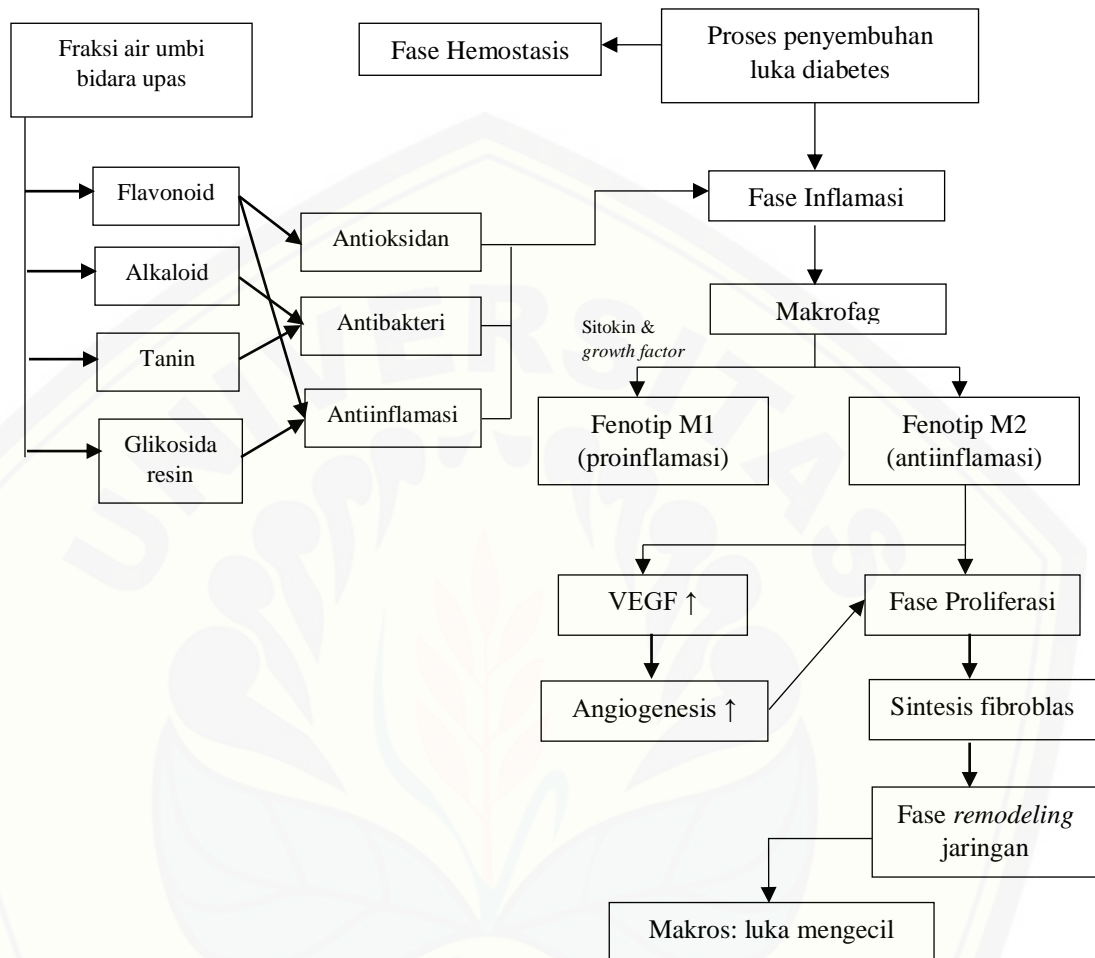
akan melewati sebuah fase diam yang mempunyai pori-pori dengan ukuran yang berbeda-beda. Molekul dengan ukuran lebih besar akan melewati begitu saja pori-pori dan akan sampai lebih dahulu pada efluen, sedangkan molekul dengan ukuran sama atau lebih kecil dari pori-pori akan terdistribusi, dengan sebagian akan masuk dalam pori tersebut dan sebagian akan berada di luar pori mengikuti fase gerak, sehingga ada sebagian yang sampai efluen namun lebih lambat (Werner *et al.*, 1994; Vekey *et al.*, 2008; Ismail, 2010)

d. *Solid-Phase Extraction (SPE)*

SPE merupakan metode ekstraksi yang menggunakan fase solid dan liquid untuk mengisolasi satu atau lebih analit dari larutan. Biasanya digunakan untuk membersihkan sampel sebelum dilakukan kromatografi atau metode analisis lain untuk menghitung jumlah analit pada sampel. Prosedur umum dari SPE ialah dengan memasukkan larutan pada fase SPE, mencuci komponen yang tidak diperlukan dan mengumpulkan analit yang dibutuhkan dengan pelarut lain pada sebuah tabung. Fase diam terdapat pada kolom kaca atau plastik di atas *frit* atau benang halus dari kaca (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006).

## 2.7 Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.6 di bawah ini.



Gambar 2.6 Kerangka teori

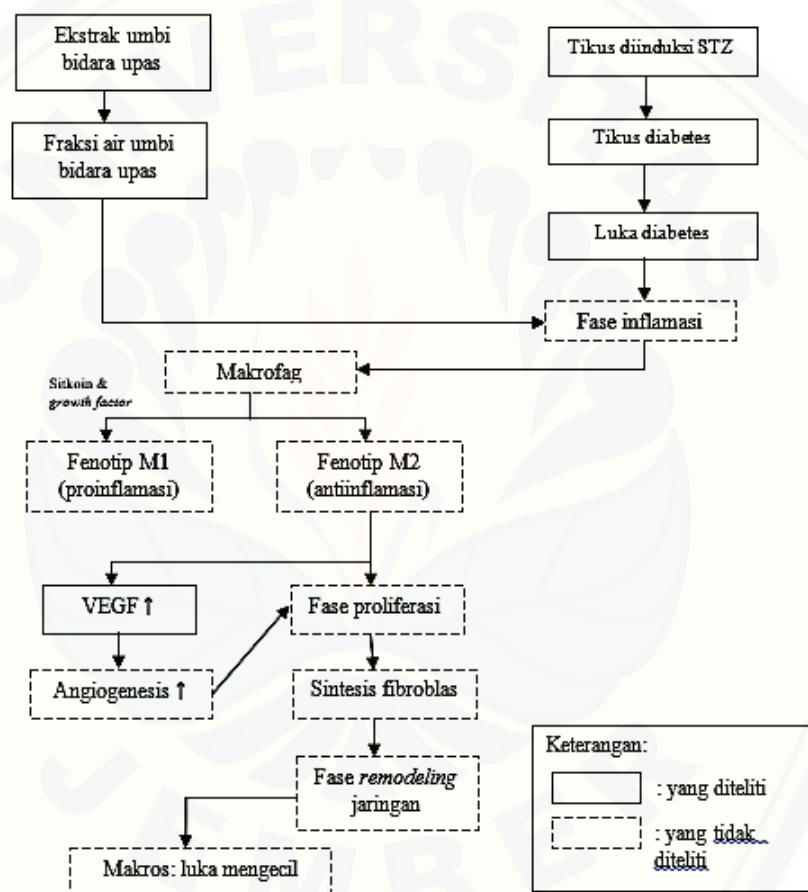
(Yoshikawa *et al.*, 2010; Ukhrowi, 2011; Baltzis *et al.*, 2014; Hidayat *et al.*, 2015; Julianto *et al.*, 2015; Prameswari, 2017; Okonkwo & DIPietro, 2017).

Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) mempunyai beberapa kandungan zat aktif yang berfungsi pada penyembuhan luka, yaitu flavonoid (sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri), tanin (sebagai antibakteri), alkaloid (sebagai antibakteri) dan resin glikosida (sebagai antiinflamasi). Zat aktif ini yang kemudian berperan pada peningkatan penyembuhan luka diabetes khususnya pada fase inflamasi. Fase inflamasi yang cepat juga berpengaruh pada fase proliferasi, dimana makrofag bisa meningkatkan produksi *growth factor* sebagai faktor angiogenesis yaitu VEGF. VEGF yang meningkat dapat

mempercepat proses angiogenesis, sehingga proliferasi jaringan juga semakin meningkat dan pada akhirnya dapat mempercepat proses penutupan luka (Yoshikawa *et al.*, 2010; Ukhrowi, 2011; Baltzis *et al.*, 2014; Hidayat *et al.*, 2015; Julianto *et al.*, 2015; Prameswari, 2017; Okonkwo & DIPietro, 2017).

## 2.8 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.7 sebagai berikut.



Gambar 2.7 Kerangka konsep penelitian

Tikus diinduksi dengan STZ agar didapatkan kondisi hiperglikemia. Kemudian, dilakukan eksisi luka pada punggung tikus yang kemudian akan diamati perubahan luas lukanya. Fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) merupakan hasil fraksinasi dari ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)). Terdapat beberapa zat aktif pada fraksi air umbi bidara upas

yang dapat mempengaruhi penyembuhan luka diabetes, khususnya pada fase inflamasi dan proliferasi. Zat aktif tersebut meningkatkan peran dari makrofag untuk meningkatkan produksi *growth factor*, salah satunya berupa faktor angiogenesis yaitu VEGF. VEGF yang meningkat dapat mempercepat proses angiogenesis, sehingga proliferasi jaringan juga semakin meningkat dan pada akhirnya dapat mempercepat proses penutupan luka.

### **2.10 Hipotesis**

Hipotesis dalam penelitian ini ialah terdapat perbedaan ekspresi VEGF pada pemberian fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dalam berbagai dosis pada penyembuhan luka tikus diabetes.



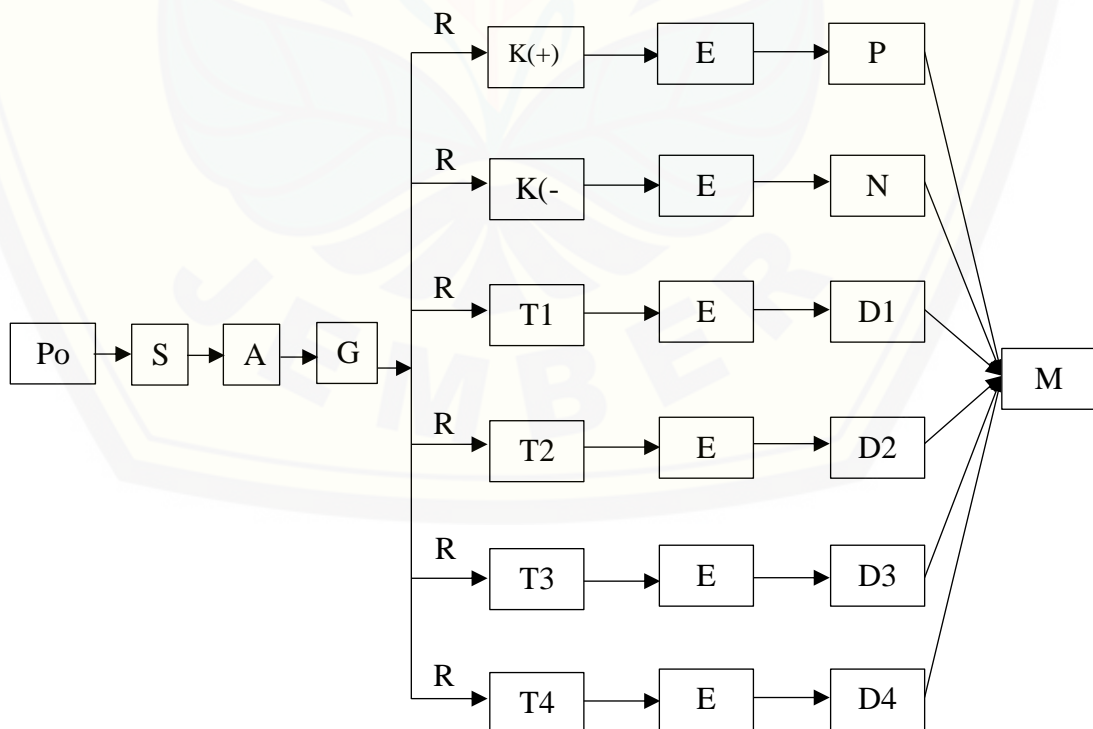
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan ialah *true experimental laboratories* karena peneliti dengan sengaja memberikan perlakuan kepada subjek penelitian dengan tujuan untuk mempelajari efek dari perlakuan tersebut dengan memenuhi persyaratan beberapa subjek pada kelompok perlakuan yang sama, adanya randomisasi dan kontrol (Irmawati & Nurhaedah, 2017). Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan sesuai sebagai sampel dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini ialah *posttest only control group design* yaitu dengan membandingkan hasil kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol di akhir penelitian (Irmawati & Nurhaedah, 2017). Secara sistematis dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

**Keterangan:**

- Po : Populasi tikus wistar jantan di peternakan Malang
- S : Sampel tikus jantan wistar sesuai kriteria inklusi
- A : Adaptasi selama 7 hari
- G : Pemberian STZ untuk induksi diabetes
- R : Randomisasi kelompok dengan *proportional stratified random sampling* menurut BB dan GDA
- K (+) : Kelompok kontrol positif
- K (-) : Kelompok kontrol negatif
- T1 : Kelompok perlakuan 1 (dosis 12,5 mg)
- T2 : Kelompok perlakuan 2 (dosis 25 mg)
- T3 : Kelompok perlakuan 3 (dosis 50 mg)
- T4 : Kelompok perlakuan 4 (dosis 100 mg)
- E : Pemberian luka eksisi ukuran 2x2 cm<sup>2</sup>
- P : Pemberian salep gentamisin 0,1 % setiap dua hari
- N : Pemberian aquades setiap dua hari sekali
- D1 : Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 12,5 mg setiap dua hari sekali
- D2 : Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 25 mg setiap dua hari sekali
- D3 : Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 50 mg setiap dua hari sekali
- D4 : Pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 100 mg setiap dua hari sekali
- M : Pengambilan jaringan kulit luka untuk dilihat ekspresi VEGF melalui pengecatan imunohistokimia

**3.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di beberapa tempat yakni:

- a. Pembuatan fraksi air ekstrak umbi bidara upas di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember
- b. Pemberian perlakuan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember
- c. Pembuatan preparat imunohistokimia di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

- d. Pengamatan preparat imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Waktu pembuatan fraksi dan pemberian perlakuan yaitu pada Juli hingga Agustus 2017, dilanjutkan pembuatan dan pengamatan preparat pada September hingga Desember 2018.

### 3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.4.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini ialah tikus putih jantan galur Wistar yang didapatkan dari peternakan di Malang.

#### 3.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-220 gram dengan kriteria eksklusi dan inklusi.

#### 3.4.3 Besar Sampel Penelitian

Penentuan besar sampel pada penelitian yaitu dengan menggunakan *software* Gpower 3.1. Gpower merupakan sebuah *software* yang digunakan untuk menentukan besar jumlah sampel dengan memperhatikan aspek-aspek statistik, seperti *type I error* ( $\alpha$ ), *type II error* ( $\beta$ ), *power of analysis* ( $1-\beta$ ) dan *effect size*. Jumlah kelompok pada penelitian ini terdiri dari 6 dengan jumlah sampel perkelompoknya ialah 4, sehingga total jumlah tikus yang digunakan yaitu 24 ekor. Sampel dipilih dengan menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- 1) Tikus jenis wistar
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Usia 2-3 bulan
- 4) Berat badan 150-220 gram
- 5) Tidak ada kelainan anatomis

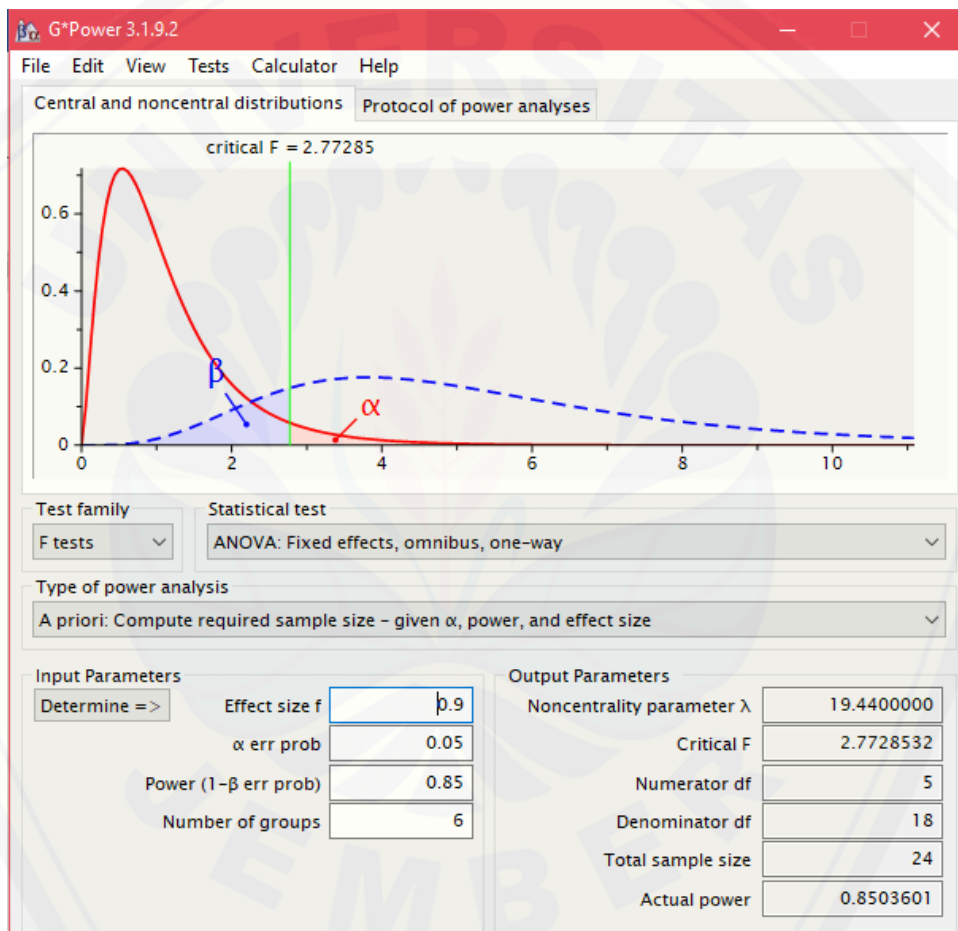
Kriteria eksklusi:

- 1) Mati
- 2) Sakit selama masa adaptasi ditandai dengan tidak bergerak aktif
- 3) Terdapat tanda-tanda infeksi pada luka yaitu berupa pus pada luka

6) Sehat dan aktif selama masa adaptasi

7) Kadar glukosa  $\geq 200$  mg/dL

Jumlah kelompok sebanyak 6 dan besar sampel 24 memungkinkan menghasilkan komponen statistiknya yaitu *effect size* 0,9 dengan  $\alpha=0,05$  dan *power of analysis* 0,85. Hasil perhitungan besar jumlah sampel dengan menggunakan *software* Gpower terlampir pada Gambar 3.2 sebagai berikut.



Gambar 3.2 Komponen statistik penelitian

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini ialah pemberian jumlah dosis fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)).

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini ialah ekspresi VEGF yang terlihat dengan pewarnaan imunohistokimia pada luka tikus diabetes.

### 3.5.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini ialah kadar glukosa darah dan berat badan tikus.

## 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dijelaskan melalui Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Data
1. Fraksi air umbi bidara upas	Hasil fraksinasi berupa lapisan air dari ekstrak etanol umbi bidara upas ( <i>Merremia mammosa</i> (Lour.)) yang dibuat di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dan diberikan secara topikal pada luka tikus diabetes. Dosis yang digunakan pada penelitian ini ialah 12,5 mg, 25 mg, 50 mg, dan 100 mg mengacu pada penelitian Marchianti (2018) yang diberikan pada kelompok perlakuan secara topikal setiap dua hari sekali, yaitu pada hari ke-15, 17, 19, 21, dan 23 atau dalam kurun waktu 10 hari post-eksisi (Prameswari, 2017; Marchianti <i>et al.</i> , 2018).	-	-	-
2. Luka tikus diabetes	Luka eksisi hingga ke lapisan subkutan pada tikus yang telah diinduksi STZ dengan ukuran 2x2 cm <sup>2</sup> . Pemberian luka yaitu dengan mencukur bulu tikus bagian punggung kiri tikus, kemudian ditandai dengan stempel ukuran 2x2 cm <sup>2</sup> , selanjutnya dilakukan eksisi sesuai garis dari stempel tersebut (Prameswari, 2017).	-	-	-

3. Ekspresi VEGF	Presentasae dan intensitas area pembuluh darah yang terpulas coklat dari luka tikus diabetes pada pengecatan spesifik imunohistokimia dengan antibodi VEGF yang kemudian diukur dengan skor histologi untuk imunohistokimia (Setiabudi, 2005; Maae <i>et al.</i> , 2011; Chung <i>et al.</i> , 2014).	Skor angka tanpa satuan	Mikroskop, <i>optilab</i> , dan <i>software</i> ImageJ	Rasio
4. Kadar glukosa darah	Kadar glukosa darah hiperglikemia jika melebihi 200 mg/dL pada hari kelima setelah pemberian STZ. Kadar gula darah diukur pada hari ke-13 dan 24 (Marchianti <i>et al.</i> , 2018; Sakinah <i>et al.</i> , 2018).	Kadar glukosa darah (mg/dL) a) Positif DM ( $\geq 200$ mg/dL) b) Negatif DM ( $< 200$ mg/dL)	<i>Glucotest</i>	Interval

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini ialah sebagai berikut:

- Alat untuk pembuatan fraksi air umbi bidara upas, yaitu ayakan, blender, beker glass, timbangan, corong Buncher, rotator, evaporator, maserator, *freeze dryer*, *handscoon* dan pengaduk
- Alat untuk pemeliharaan, yaitu bak plastik, alas jaring-jaring dari kawat, penutup kawat dan berlapis kasa, tempat makan, tempat minum, label, dan sekop kecil
- Alat untuk menginduksi STZ, yaitu pengaduk, *beaker glass*, spuit, neraca ohaus, dan *handscoon*
- Alat untuk pembuatan dan pemberian dektrosa 10%, yaitu erlenmeyer/tabung dan tempat minum
- Alat untuk pemberian fraksi, yaitu aluminium foil, neraca ohaus, spatula, dan *handscoon*

- f. Alat untuk mengukur berat badan, yaitu timbangan kasar dan wadah untuk meletakkan tikus
- g. Alat untuk mengukur kadar glukosa darah, yaitu stik glukosa, *glucotest* dan gunting bedah
- h. Alat untuk membuat luka, yaitu pisau bedah, stempel cetakan luka 2x2 cm<sup>2</sup>, spuit dan *handscoon*
- i. Alat untuk mengukur luka, yaitu kertas kalkir/transparan, spidol, dan gunting
- j. Alat untuk pengambilan jaringan kulit, yaitu alat bedah, tempat fiksasi, *handscoon* dan *tube*
- k. Alat untuk pembacaan pewarnaan imunohistokimia, yaitu kamera, mikroskop, laptop/computer, dan *software* ImageJ.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian ini ialah sebagai berikut.

- a. Bahan untuk pembuatan fraksi air umbi bidara upas, yaitu simplisia umbi bidara upas
- b. Bahan untuk pemeriksaan glukosa darah, darah yang diambil dari ekor mencit
- c. Bahan untuk pemeliharaan tikus, yaitu pakan tikus, air, dan sekam kering
- d. Bahan untuk pemberian STZ, yaitu buffer sitrat dan STZ
- e. Bahan untuk pembuatan dekstrosa 10%, bubuk dekstrosa 10 gram dan air 100 ml untuk masing-masing tikus
- f. Bahan untuk pembuatan luka eksisi, yaitu ketamin dan xylazine
- g. Bahan untuk pengambilan jaringan kulit, yaitu formalin
- h. Bahan untuk pembuatan preparat imunohistokimia, yaitu IHC kit dan antibodi VEGF.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Pemilihan Hewan Coba

Hewan coba dipilih sesuai kriteria inklusi dan eksklusi yang tertera pada subbab 3.3.

### 3.8.2 Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi hewan coba dilakukan dengan menempatkan tikus pada bak plastik, dengan ditambahkan sekam yang di atasnya terdapat jaring-jaring kawat dan bagian atas bak digunakan penutup berupa jaring-jaring kawat dan dilapisi kasa.

### 3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 6, yaitu sebagai berikut.

Tabel 3. 2 Pembagian kelompok perlakuan

Nama Kelompok	Pemberian Perlakuan
Kontrol positif (K(+))	pemberian salep gentamicin 0,1%
Kontrol positif (K(-))	pemberian <i>aquadest</i> secara topikal
Kelompok 1 (T1)	pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 12,5 mg secara topikal
Kelompok 2 (T2)	pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 25 mg secara topikal
Kelompok 3 (T3)	pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 50 mg secara topikal
Kelompok 4 (T4)	pemberian fraksi air umbi bidara upas dosis 100 mg secara topikal

### 3.8.4 Pembuatan Ekstrak

Berikut ini merupakan proses pembuatan ekstrak umbi bidara upas.

- Umbi bidara upas yang telah tua dipotong-potong, kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan atau dioven pada suhu 60°C.
- Umbi bidara upas yang telah kering dihaluskan dengan blender.
- Serbuk umbi bidara upas sebanyak 1 kg diekstraksi dengan *ultrasonic* menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 5 liter selama satu jam dengan sesekali diaduk.
- Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong buchner sehingga diperoleh filtrat. Residu yang tersisa dimaserasi ulang dengan *ultrasonic* hingga tiga kali.



- e. Filtrat yang sudah terkumpul dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak etanol. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan penguapan di atas *waterbath* sehingga didapatkan ekstrak etanol kental.

Prosedur tetap ekstraksi dari Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dapat dilihat pada Lampiran 3.1.

### 3.8.5 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Proses pembuatan fraksi air umbi bidara upas diuraikan sebagai berikut.

- a. Ekstrak etanol kental yang sudah didapatkan kemudian dilakukan fraksinasi. Sebanyak 120 gram ekstrak ditambah dengan 240 mL akuades dan diaduk hingga tercampur, kemudian dimasukkan ke corong pisah.
- b. Ditambahkan n-heksana sebanyak 360 mL pada campuran ekstrak dan air, kemudian dikocok kuat selama 2-5 menit dan didiamkan hingga didapatkan lapisan n-heksana dan air. Lapisan n-heksana (bagian atas) diambil melalui lubang atas, sedangkan lapisan air dikeluarkan melalui kran bawah. Tahapan ini diulang hingga 2 kali.
- c. Sisa lapisan air diukur volumenya, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan etil asetat dengan perbandingan 1:3.
- d. Campuran dikocok selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan etil asetat dan air terpisah sempurna. Lapisan etil asetat di bagian atas diambil melalui lubang atas setelah lapisan air dikleurkan melalui kran bawah. Tahapan ini diulang 2 kali.
- e. Lapisan air dipekatkan dengan *freeze drying* setelah dipisahkan dari residu ekstrak etanol yang tidak larut air.
- f. Hasil fraksi air umbi bidara upas dari proses *freeze drying* dikumpulkan untuk penelitian.

Prosedur tetap fraksinasi dari Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dapat dilihat pada Lampiran 3.1.

### 3.8.6 Penginduksian Streptozotocin (STZ)

Induksi STZ dilakukan intraperitoneal dengan dosis STZ 40 mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,05 mol/L pada hari ke-8 (Marchianti *et al.*, 2018; Sakinah *et al.*, 2018; Damasceno *et al.*, 2014; Badr, 2013)

### 3.8.7 Pemeriksaan Kadar Glukosa

Pemeriksaan kadar glukosa dilakukan dengan memotong  $\pm 0,5$  cm ujung ekor tikus dengan gunting, kemudian darah dimasukkan pada stik glukosa, dan dicek pada *glucose meter (Easytouch)*. Dikatakan hiperglikemia apabila kadar glukosa darah melebihi 200 mg/dL. Pemeriksaan dilakukan pada hari ke 13 dan 24 (Mustaghfiroh & Probosari., 2014; Marchianti *et al.*, 2018).

### 3.8.8 Pemberian Luka Eksisi

Pemberian luka eksisi dilakukan pada hari ke-14 didahului dengan pemberian xylazine 10 ml/kgBB dan ketamin 80 mg/kgBB secara intramuskular (Yudaniayanti *et al.*, 2010). Ketika anastesinya bekerja, kulit tikus dicukur, kemudian daerah dorsal sinistra tubuh tikus yang akan dieksisi distempel dengan ukuran 2x2 cm<sup>2</sup> untuk memfiksasi bagian yang akan dieksisi. Kemudian, dilakukan eksisi menggunakan pisau bedah sesuai garis bekas stempel yaitu berukuran 2x2 cm<sup>2</sup> (Montandon *et al.*, 1977; Dorsett-Martin, 2004; Prameswari, 2017; Sakinah *et al.*, 2018).

### 3.8.9 Pemberian Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas

Fraksi air dengan dosis 12,5 mg pada kelompok T1, 25 mg pada T2, 50 mg pada T3, dan 100 mg pada T4 diberikan setiap 2 hari sekali, yaitu pada hari ke-15, 17, 19, 21, dan 23 terhitung dari awal adaptasi (Marchianti *et al.*, 2018).

### 3.8.10 Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke-24. Sebelum diambil jaringannya, tikus diterminasi dengan anastesi perinhalasi menggunakan kloroform. Kemudian diambil jaringan kulit yang luka dan disimpan dalam botol

jaringan yang sudah berisi formalin 10% dan kemudian dilakukan dislokasi servikal (Prameswari, 2017).

### 3.8.11 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Pembuatan preparat imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pewarnaan menggunakan kit imunohistokimia dengan antibodi poliklonal VEGFB167 bs-10071R dari BIOSSUSA. Prosedur pembuatan preparat imunohistokimia ialah sebagai berikut.

- a. Deparafinisasi dengan menggunakan Xylol 1, Xylol 2, dan Xylol 3 masing-masing 5 menit
- b. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat dari alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, dan alkohol 70%, masing-masing 4 menit
- c. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
- d. *Blocking* dengan menggunakan endogen peroksidase 0,5% selama 30 menit
- e. Cuci kembali dengan air mengalir selama 5 menit
- f. *Decloaking Chamber* 110°C selama 30 menit dengan larutan Diva
- g. Kemudian didinginkan  $\pm$ 30 menit
- h. Cuci dalam PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7,4 selama 3 menit
- i. *Blocking* dengan *Normal Horse Serum* 5% selama 30 menit
- j. Pemberian antibodi primer poliklonal VEGFB167 bs-10071R dari BIOSSUSA selama 60 menit
- k. Cuci dalam PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7,4 selama 3 menit
- l. Universal link selama 30 menit
- m. Cuci dalam PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7,4 selama 3 menit
- n. *Labelling* dengan menggunakan trekavidin HRP selama 30 menit
- o. Cuci dalam PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7,4 selama 3 menit
- p. Pemberian DAB dan substrat buffer selama 2-5 menit
- q. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
- r. Lakukan *counterstaining* dengan pewarnaan Haematoxylin (HE) selama 5-10 menit

- s. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat yaitu alkohol 80%, 90%, dan absolut, masing-masing selama 5 menit
- t. *Clearing* dengan menggunakan Xylol 1, Xylol 2, dan Xylol 3, masing-masing selama 5 menit
- u. Mounting dengan *cover glass*

Prosedur tetap pengecatan imunohistokimia Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dapat dilihat pada Lampiran 3.2.

### 3.8.12 Pengamatan Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF dihitung dari persentase dan intensitas warna pembuluh darah yang terpulas coklat pada 5 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop Olympus CX21 LED perbesaran 400 kali, kemudian gambar dianalisis menggunakan *software* ImageJ yang langkah-langkahnya dapat dilihat pada Lampiran 3.3 (Setiabudi, 2005; Destri *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2014; Rosyidah *et al.*, 2018). Perhitungan ekspresi VEGF menggunakan skor histologi yaitu sebagai berikut (Setiabudi, 2005; Chung *et al.*, 2014):

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

Keterangan:

- P : persentase
- I : intensitas
- K : kuat
- S : sedang
- L : lemah

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

- 1 : intensitas lemah
- 2 : intensitas sedang
- 3 : intensitas kuat

Hasil skoring dari perhitungan 5 lapang pandang kemudian dirata-rata

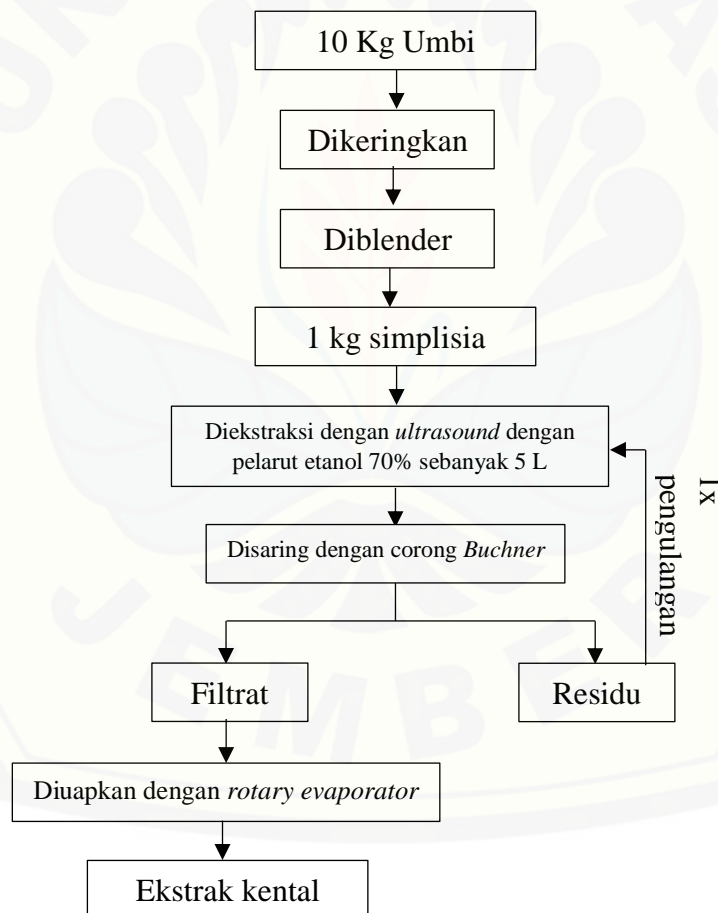
### 3.9 Analisis Data Penelitian

Analisis data menggunakan program *software* statistik. Jika data normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik komparasi uji *One Way Anova*, dilanjutkan uji *Post Hoc Fisher's LSD (Least Significant Difference)*. Namun, jika data tidak normal, dilakukan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan uji *Post Hoc Mann-Whitney*.

### 3.10 Alur Penelitian

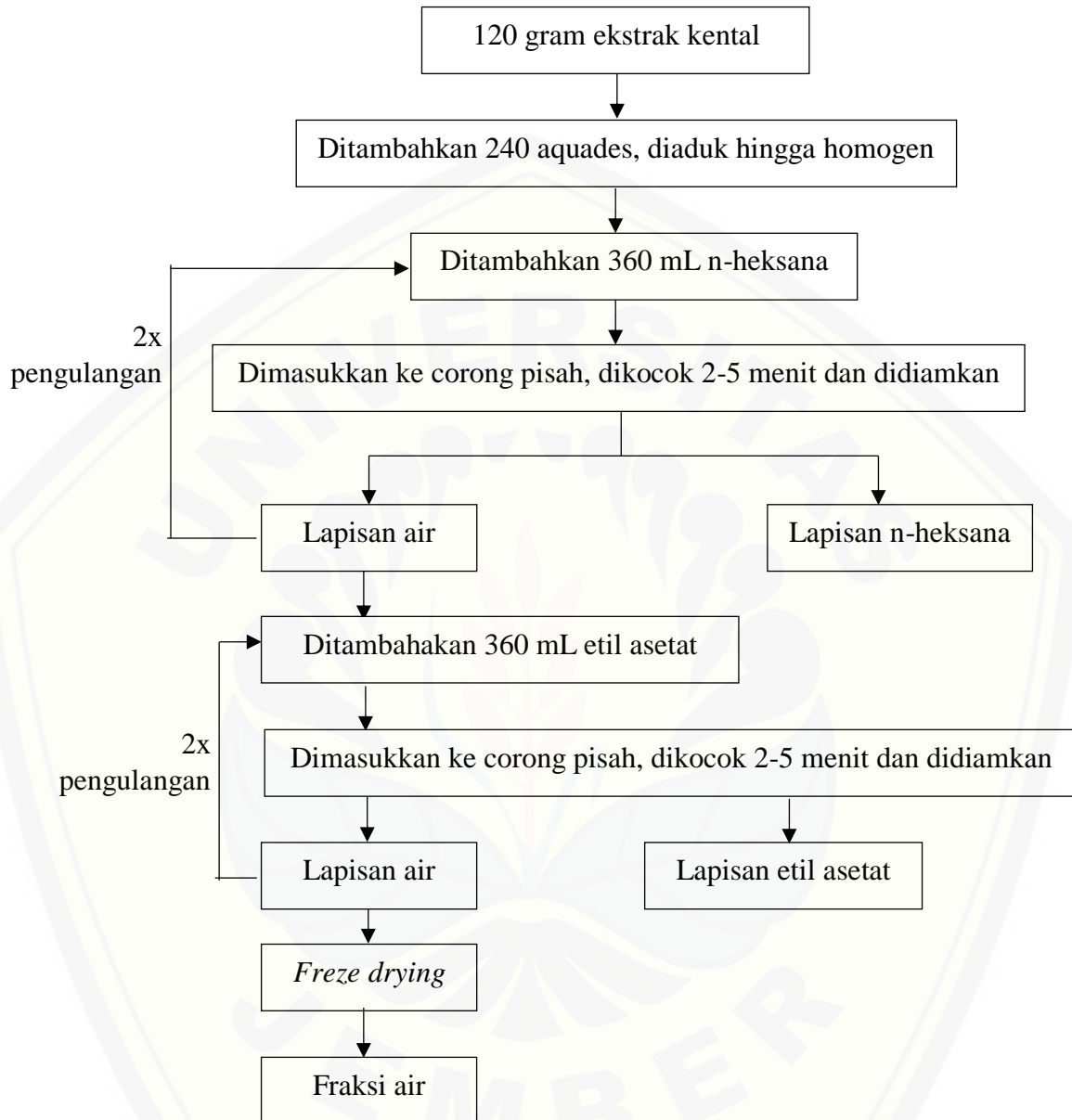
Alur penelitian ini dibagi dalam beberapa tahapan yakni sebagai berikut.

#### 3.10.1 Tahapan Pembuatan Ekstrak Umbi Bidara Upas



Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak umbi bidara upas

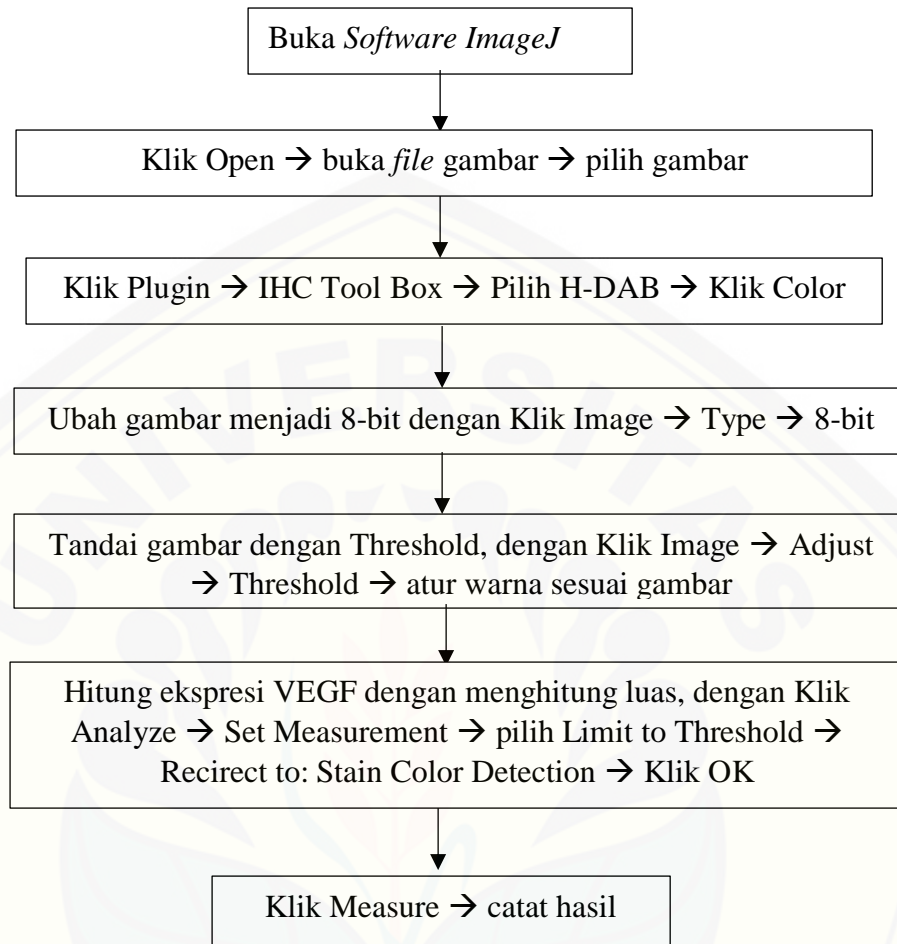
## 3.10.2 Tahapan Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas



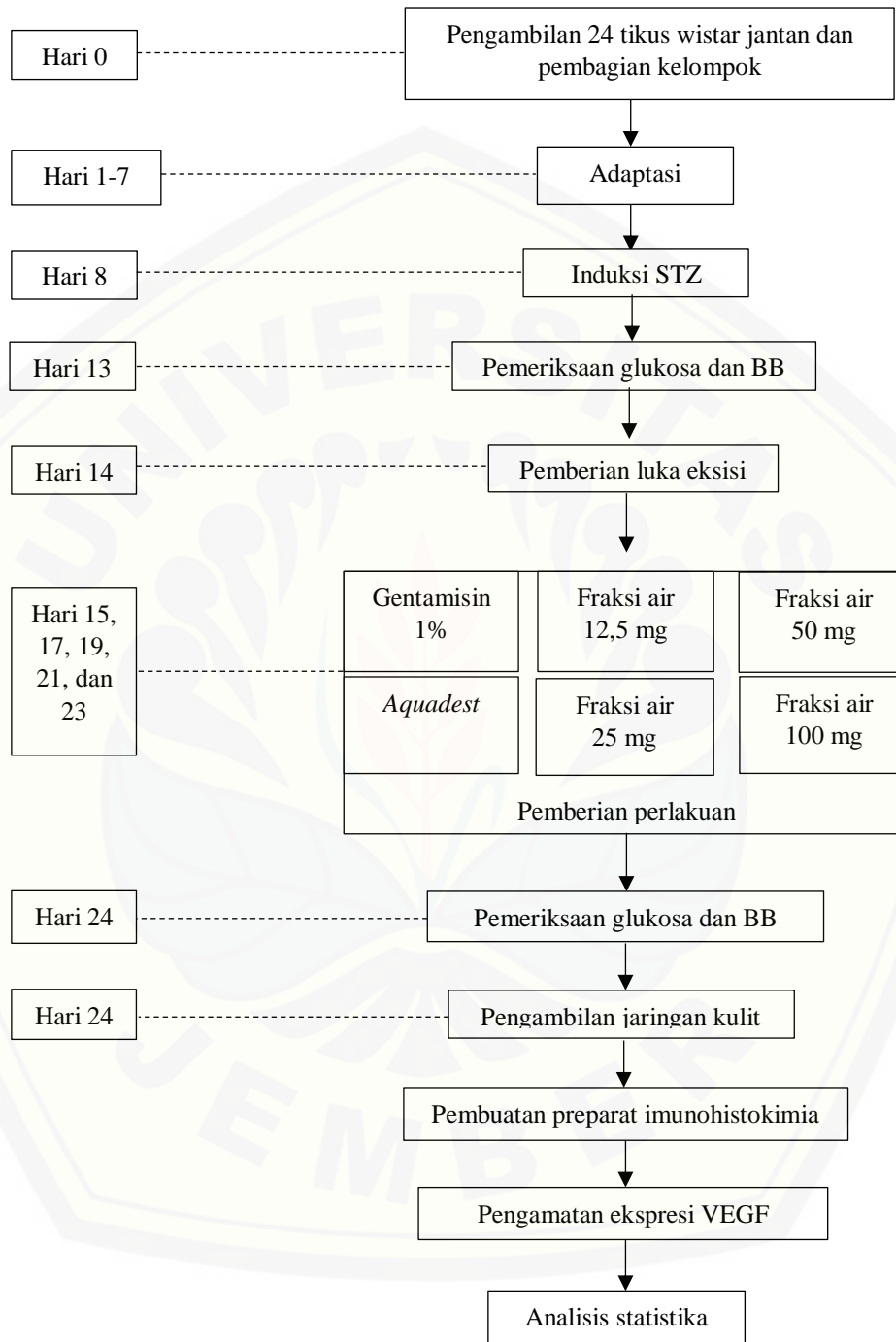
Gambar 3.4 Skema pembuatan fraksi air umbi bidara upas

## 3.10.3 Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Prosedur pembuatan preparat imunohistokimia dijabarkan pada Lampiran 3.1.

3.10.4 Langkah Penggunaan *Software ImageJ* dalam Perhitungan Ekspresi VEGFGambar 3.5 Skema perhitungan ekspresi VEGF dengan *software ImageJ*

## 3.10.5 Tahapan Perlakuan pada Hewan Coba

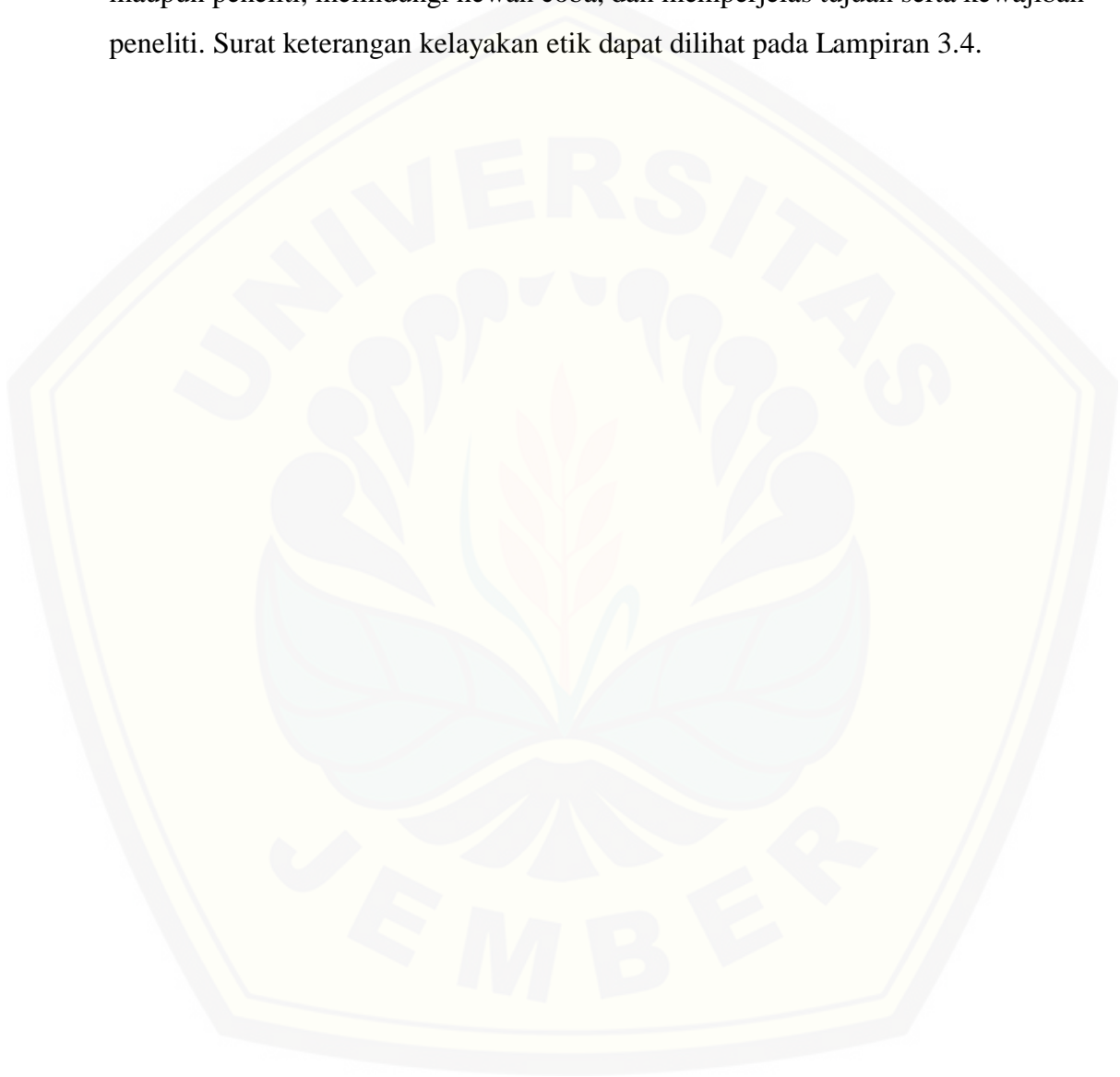


Gambar 3.6 Gambar tahapan perlakuan dan prosedur lain



### 3.11 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini ialah tikus putih wistar dengan jenis kelamin jantan yang harus mendapatkan sertifikat kelayakan etik dari komisi etik kedokteran. Sehingga diharapkan akan menjamin keamanan bagi hewan coba maupun peneliti, melindungi hewan coba, dan memperjelas tujuan serta kewajiban peneliti. Surat keterangan kelayakan etik dapat dilihat pada Lampiran 3.4.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari ekspresi VEGF dengan pemberian fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) pada penyembuhan luka tikus diabetes.

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian di atas, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pertimbangan bahan pembawa (*vehicle*) sebagai campuran dalam pemberian fraksi air umbi bidara upas agar didapatkan efek terapi yang lebih optimal. Pada penelitian selanjutnya dapat digunakan perlakuan pemberian terapi pada kontrol positif yang lebih sesuai untuk peningkatan VEGF seperti becaplermin atau bioplacenton, dan bisa juga diteliti sampai sejauh mana dosis fraksi air umbi bidara upas dapat mempengaruhi peningkatan ekspresi VEGF dan efektif dalam penyembuhan luka tikus diabetes. Di sisi klinisnya, penelitian ini memakai teknik perawatan luka terbuka yang mungkin untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan perawatan luka tertutup sehingga lebih menyerupai perawatan pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Agil, M., R. Widyowati, dan N. E. Nasution. 2013. Fraksinasi dan Uji Daya Hambat Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari Ekstrak N-Heksana dan Metanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall.). *Laporan Penelitian*. Surabaya: Perpustakaan Universitas Airlangga.
- Agra, I. K. R., L. L. S. Pires, P. S. M. Carvalho, E. A. Salva-Filho, S. Smanioto, dan E. Barreto. 2013. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia cirgilioides* stem barks in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 85(3):945-954.
- Agustina, D. R. 2011 Pengaruh Pemberian secara Topikal Kombinasi Rebusan 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: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Ahokas, H. P., J. Kuronen, dan Y. Wang. 2017. Extraction liquid-liquid and aqueous two-phase extraction. Espoo: Master's Programme in Chemical, Biochemical and Materials Engineering, Aalto University School of Chemical Technology.
- Altemimi, A., N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D. G. Watson, dan D. A. Lightfoot. 2017. Review pytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*. 6(42):1-23.
- 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 (ADA). 2018. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 41(Suppl. 1):S13-S27.
- Angelo, L. S. dan R. Kurzrock. 2007. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res*. 13: 2825-2830.
- Arifin, W. N., dan W. M. Zahiruddin. 2017. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med*. 24(5):101-105.

- Azwanida, N. N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. 4(3):196.
- Badr, G. 2013. Camel whey protein enhances diabetic wound healing in a streptozotocin-induced diabetic mouse model: the critical role of  $\beta$ -defensin-1, -2, and -3. *Lipids in Healt and Disease*. 12:46.
- Bajpai, V. K., R. Majumder dan J. G. Park. 2016. Isolation and purification of plant secondary metabolites using-column chromatography technique. *Bangladesh J Pharmacol*. 11:844-848.
- Baltzis, D., I. Eleftheriadou, dan A. Veves. 2014. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*. 31(8):817-836.
- Bao, P., Arber K., M. Tomic-Canic., M. S. Golinko, H. P. Ehrlich, dan H. Brem. 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg Res* 153(2):347-358.
- Barbara, G. 2014. Isolation and Characterization of The Bioactive Compound in The Stem Bark of *Albizia coriaria*. *Disertasi*. Kampala: Master of Science (Chemistry), Makerere University.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem, dan M. T. Canic. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg*. 16(5):585-601.
- Beamont, R. 2009. Research Mehods & Experimental Design. *Introduction to Health Informatics Research Method*. <http://www.floppybunny.org/robin/web/virtualclassroom/chap16/s1/sembk2.pdf> [Diakses pada 15 September 2018]
- Berdal, M. 2017. Wound Healing in Diabetes: An Intervention Study in db/db mice. *Disertasi*. Norway: Faculty of Health Sciences The Artic University of Norway.
- Bitto, A., L Minutoli, M. R. Galeano, D. Altavilla, F. Polito, T. Fiumara, M. Calo, L Zantilin, M. Giacca, F. Squadrito. 2008. Angiopoierin-1 gene transfer improves impaired wound healing in genetically diabetic mice without increasing VEGF expression. *Clin Sci (Lond)*. 144(12):707-718
- Bowker, J., dan M. Pfeifer. 2007. *Levin and O'Nel's The Diabetic Foot*. Edisi 7. Philadelphia: Elsevier.
- Brem, H., dan M. T. Canic. 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 117(5):1219-1222.

- Cao, J. Effects of MEBO on the expression of HIF-1 and VEGF in wound healing tissue. 2013. *J. Guiyang College Trad Chin Med.* 34: 47-48.
- Charan J., dan N. D. Kantharia. 2013. How to calculate sample size in animal studies?. *J Pharmacol Pharmacother.* 4(4):303-306
- Chatzigeorgiou, A., A. Halapas, K. Kalafatakis, dan E. Kamper. 2009. Review: the use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23:245-258.
- Chen, L., P. K. Gajendrareddy, L. A. Dipietro. 2012. Differential expression of HIF-1 alpha in skin and mucosal wounds. *J. Dental Res.* 871-876.
- Chen, P., J. Zhu, D. Liu, H. Li, N. Xu, dan M. Hou. 2014. Over-expression of survivin and VEGF in small-cell lung cancer may predict the poorer diagnosis. *Med Oncol.* 31(1):775.
- Chung, J. Y., T. Braunschweig, S-M. Hong, D. S. Kwon, S-H. Eo, H. Cho, S. M. Hewitt. 2014. Assesment of vascular endothelial growth factor in formalin fixed, paraffin embedded colon cancer specimens by means of a well-based reverse phase protein array. *Proteom Science.* 12:27.
- Coskun, O. 2016. Separation techniques: chromatography. *North Clin Istanbul.* 3(2):156-160.
- Dahal, R., K. Moriam, P. Seppala. 2016. Downstream Process: Liquid-Liquid Extraction. Espoo: Degree Programme in Chemical Technology, Aalto University School of Chemical Technology.
- Dahlan, M. S. 2014. Statika untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat dilengkapi Aplikasi dengan MEnggunakan SPSS. Edisi 6. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Damasceno, D. C., A. O. Netto, I. L. Iessi, F. Q. Gallego, S. B. Corvino, B. Dallaqua, Y. K. Sinzato, I. M. P. Calderon, dan M. V. C. Rudge. 2014. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed Research International* 2014:1-11.
- Dam, P. S. V., M. A. Cotter, B. Bravenboer., dan N. E. Cameron. 2013. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 719:180-186.
- Dayan, C., dan G. Williams. 2010. Disorders of glucose homeostasis. Dalam buku *Oxford Textbook of Medicine* Vol. 2. Editor: Warrell, D. A., T. M. Cox, dan J. D. Firth. New York: Oxford University Press Inc.

- De Haan, A., dan H. Bosch. 2013. Liquid-liquid extraction industrial separation processes – fundamentals. *De Gruyter*: 111-142.
- Destri, Ch., I. K. Sudiana, dan J. Nugraha. 2017. Potensi ekstrak *jatropha multifida* terhadap ekspresi vegf aphthous ulcer *rat norvegicus*. *Jurnal SainsHealth*. 1(2):5-12.
- Dorsett-Martin, W. A. 2004. Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Rep Reg*. 12:591-599.
- Doupis, J dan A. Veves. 2008. Classification, diagnosis, and treatment of diabetic foot ulcers. *Wound*. 20:117-126.
- Drela, E., A. Kulwas, B. Ruszkowska, dan D. Rosc. 2013. The diversity of angiogenesis in diabetic vascular complications. *Folia Medica Copernicana*. 1(2): 53-57.
- Etuk, E. U. 2010. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(2):130-134.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 366(9498):1736-1743.
- Farizal, J. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) terhadap Proliferasi Limfosit dan Produksi Roi Makrofag Studi Eksperimental Infeksi *Salmonella typhimurium* pada Mencit Balb. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Fatmawati, E. 2011. Ekstrak Etanol Daun Salam dan Fraksinya sebagai Inhibitor Alfa-Amilase. *Skripsi*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Fetse, J. P., J. O. Kyekyeku, E. Dueve, dan K. B. Mensah. 2014. Wound healing activity of total alkaloidal extract of the root bark of *Alstonia boonei* (Apocynacea). *British Journal of Pharmaceutical Research*. 4(23):2642-2652.
- Gopalakrishnan, A., M. Ram, S. Kumawat, S. K. Tandan, dan D. Kumar. 2016. Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- $\beta$ 1. *Indian Journal of Experimental Biology*. 54: 187-195.
- Guo, S., dan L. A. DiPietro. 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 89(3):219-229.

- Handa, S. S., S. P. S. Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: International Centre for Science and High Technology.
- Hariani, L dan Perdanakusuma, D. 2008. *Perawatan Ulkus Diabetes*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Harper, D., A. Young, dan C. E. McNaught. 2014. The physiology of wound healing. *Surgery*, 32:9.
- Hidayat, F. K., U. Elfiah, dan K. D. Sofiana. 2015. Perbandingan jumlah makrofag pada luka insisi *full thickness* antara pemberingan ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* ((Lour.))) Dengan NaCl pada tikus wistar jantan. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Hidayat, T. S. N. 2013. Peran Topikal Ekstrak Gel Aloe Vera pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dua Dalam. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Holemans, K. I., L. Aerts dan F. A. Van Assche. 2003. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *Journal of the Society for Gynaecology Intervention*. 10(7):392-399.
- International Diabetes Federation (IDF). 2017. *IDF Diabetes Atlas*. Edisi 8. [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org).
- Irmawati dan Nurhaedah. 2017. Bahan Ajar Kesehatan Lingkungan Metodologi Penelitian. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Ismail, B. 2010. *Chapter 27: Basic Principle of Chromatography*. Dalam buku Food Analysis, Food Science Text Series. Editor Nielsen, S. S. Springer Science.
- Isrofah, Sagiran, M. Afandi. 2015. Efektivitas salep ekstrak daun binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) terhadap proses penyembuhan luka bakar derajat 2 termal pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*). *Muhammadiyah Journal of Nursing* 2(2):27-38.
- Jain, A. K. C., dan S. Joshi. 2013. Diabetic foot classifications: review of literature. *Medicine Science Review*. 2(3):715-721.
- Jeon, H., H. Kim, D. Choi, D. Kim, S. Y. Park, Y. J. Kim, Y. M. Kim, dan Y. Jung. 2007. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. *Mol Pharmacol*. 71: 1676.

- Johnson, K. E., dan T. A. Wilgus. 2014. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Advances in Wound Care*. 3(10): 647-661.
- Jones, R. 2006. Exploring the complex care of the diabetic foot ulcer. *JAAPA*. 19(12):31-36.
- Julianto, I. G. P., U. Elfiah, K. D. Sofiana. 2015. Pengaruh pemberian ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* ((Lour.))) terhadap proses penyembuhan luka dan kadar gula darah pada tikus wistar jantan hiperglikemi. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Kearns, M. T., S. Dalal, S. A. Horstmann. 2012. Vascular endothelial growth factor enhances macrophage clearance of apoptotic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302:L711.
- Kementrian Kesehatan (Kemenkes). 2011. *Eksplorasi, Identifikasi dan Uji Sitotoksik Tanaman Obat serta Pengembangan Formulanya sebagai Antikanker Berbasis Ernotobatani Medis*. Karanganyar: Badan Litbang Kesehatan, Kementrian Kesehatan.
- King, A. J. F. 2012. Review: the use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 166:877-894.
- Kintoko, H. Karimatulhadj, T. Y. ELfasyari, E. A. Ihsan, T. A. Putra, P. Hariadi, C. Ariani dan Nurkhasanah. 2017. Pengaruh kondisi diabetes pada pemberian topical fraksi daun binahong dalam proses penyembuhan luka. *Trad. Med. J*. 22(2): 103-110.
- Kitagawa, I., K. Ohashi, N. I Baek, M. Sakagami, M. Yoshikawa, dan H. Shibuya. 1997. Indonesian medicinal plants. XIX. 1) Chemical structures of four additional resin-glycosides, mammosedes A, B, H1, and H2, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvuleae). *Chemical and Pharmacy Bulletin*. 45(5):786-794.
- Kruse, I dan S. Edelman. 2006. Evaluation and treatment of diabetic foot ulcers. *Clinical Diabetes*. 24(2): 91-93.
- Langi, Y. A. 2011. Penatalaksanaan ulkus kaki diabetes secara terpadu. *Jurnal Biomedik*. 3(2): 95-101.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51:216-226.



- Li, J., J. Si, H. Liu. 2017. Effects of astragaloside IV on the maturation of myocardial neovascularization and the expression of HIF-1 and VEGF in infarcted mice. *Chin Heart J.* 29: 269-275.
- Li, K., Y Diao, H. Zhang, S. Wang, Z. Zhang, B. Ui, S. Huang dan H. Yang. 2011. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula Fructus* Retz. Promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 11:86.
- Lin, C., G. Yin, M. Ou, dan S. Zheng. 2017. The effects of HIF-1 $\alpha$  and VEGF on wound healing in diabetic mice. *Biomedical Research.* 28(18): 8121-8124.
- Lubis, A. A., M. Fifendy, V. Fitriani. 2013. Pengaruh Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* ((Lour.) Hall.f) terhadap Petumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal.* Padang: Program Studi Pendidikan Biologi, Sekolah Tinggi Keguruan dan Ilmu Pendidikan PGRI Sumatera Barat.
- Maae, E., M. Nielsen, K. D. Steffensen, E. H. Jakobsen, A. Jakobsen, dan F. B. Sorensen. 2011. Estimation of immunohistochemical expression of VEGF in ductal carcinomas of the breast. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 59(8):750-760.
- 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 J. Med. Sci* 67:29-34.
- Martin, P. 1997. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276:75-81.
- Merpaung, P. N. S., A. C. Wullur, dan P. V. Y. Yamlean. 2014. Uji efektivitas sediaan salep ekstrak daun miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth.*) untuk pengobatan luka yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT.* 3(3): 170-175
- Montandon, D., G D'Aboiran, G. G. Gabbiani. The mechanism of wound contraction and epitelization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Surg.* 4:325-346.
- Mostafa, M. A. A., M. A. M Ibrahim. 2009. Management of aphthous ulceration with topical Quercetin. *Cairo Dental J.* 25: 9.
- Mustaghfiroh, I. T dan E. Probosari. 2014. Pengaruh pemberian tepung tempe dan pati garut (*Marantha arundinacea*) Termodifikasi terhadap kadar glukosa darah tikus hiperglikemi. *Journal of Nutrition College.* 3(1):76-82.

- Nagy, K., dan K. Vekey. 2008. *Chapter 5: Separation Method*. Dalam buku *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Editor Vekey, K., A. Telekes dan A. Vertex. Budapest: Chemical Research Center Hungarian Academy of Science.
- Ningsih, I. Y., E. Puspitasari, B. Triatmoko, dan D. Dianasari. 2016. Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia. Edisi 10. Jember: Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Nugroho, A. E. 2006. Review hewan percobaan diabetes mellitus: patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *Biodiversitas* 7(4):378-382.
- Okonkwo, U. A., and L. A. DiPietro. 2017. Review diabetes and wound angiogenesis. *Internation Journal of Molecular Sciences* 18 (1419): 1-15.
- Olevianingrum, M. 2010. Efek Ekstrak *N-Heksana*, Metanol dan Air Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall) sebagai Antibakteri *Mycobacterium tuberculosis*. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Pastore, S., D. Lulli, P. Fidanza, A. I. Potapovich, V. A. Kostyuk, C. De Luca, E. Mikhal'chik, dan L. G. Korkina. 2012. Plant polyphenols regulate chemokine expression and tissue repair in human keratinocytes through interaction with cytoplasmic and nuclear components of epidermal growth factor receptor system. *Antioxid Redox Signal*. 16: 314.
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI). 2015. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Cetakan 1. Jakarta: Pengurus Besar Perkumpulan Endokrinologi Indonesia.
- Prahesti, N. R., M. Suzery, dan B. Cahyono. 2015. The antioxidant activities, phenolic total and cytotoxicity of extract and fractions of *Aloe vera* Linn. *Jurnal Sains dan Matematika*. 23(2): 50-54.
- Prameswari, M. 2017. Pengaruh Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap Penyembuhan Luka pada Penderita Diabetes. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Purnamasari, D. 2014. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus*. Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid II. Edisi VI. Editor S. Setiati, I. Alwi, A. W. Sudoyo, M. Simadibrata, B. Setiyohadi dan A. Fahrial Syam. Jakarta Pusat: InternaPublishing Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam.
- Purwanto, B., P. Liben. 2014. Model Hewan Coba untuk Penelitian Diabetes. Surabaya: PT Revka Petra Media.
- Restuningtyas, A. 2016. Pengaruh Kombinasi Perawatan Luka Modern dengan Ozon *Bagging* terhadap Proses Penyembuhan Ulkus Kaki Diabetik pada

- Klien Diabetes Melitus di Rumah Rawat Luka Nirmala Jember. *Skripsi*. Jember: Program Studi Ilmu Keperawatan Universitas Jember.
- Rizkia, P. 2014. Uji Efektivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70%, Ekstrak dan Isolat Senyawa Flavonoid dalam Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rohilla, A., dan S. Ali. 2012. Review article alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Series* 3(2): 819-823.
- Rosyidah, D. U., I. Astuti, dan S. Widyarini. 2018. Uji efek hambatan atorvastatin terhadap pembentukan skar hipertrofi pada Kelinci New Zealand (Kajian terhadap morfologi klinis ketinggian jaringan skar, *scar elevation index*, kepadatan kolagen, dan ekspresi VEGF). *Biomedika*. 10(1):6-14.
- Sakinah, E. N., E. U. Ulfa, dan A. C. N. Marchianti. 2018. The effectiveness of *Merremia mammosa* (Lour.) extract fractions as diabetic wound healers on diabetic rat model. *Hiroshima J. Med. Sci* 67:70-77.
- Seitz, O., C. Schurman, J. Pfeilschifter, S. Frank, dan R. Sader. 2012. Identification of the Fra-1 transcription factor in healing skin flaps transplant: a potential role as a negative regulator of VEGF release from keratinocytes. *J Craniomaxillofac Surg*. 40: 379.
- 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.
- Setyowati, R., dan E. Lasmadiwati. 2003. *Bidara Upas*. Edisi 1. Jakat: Penerbit Penebar Swadaya.
- Sitompul, Y., Budiman, S. Soebardi, M. Abdullah. 2015. Profil pasien kaki diabetes yang menjalani reamputasi di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo tahun 2008-2012. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 2(1):9-14.
- Sofiana, K. D., U. Elfiah, dan E. Umayah. 2015. Pengaruh Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap Penyembuhan Luka Tikus Jantan Hiperglikemi. Jember: Universitas Jember. [http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/63314/Kristianingrum%20Dian%20Sofiana\\_pemula\\_172.pdf;sequence=1](http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/63314/Kristianingrum%20Dian%20Sofiana_pemula_172.pdf;sequence=1) [Diakses pada 9 September 2018]

- Stallmeyer, B., J. Pfeilschifter dan S. Frank. 2001. Systematically and topically supplemented leptin fails to reconstitute a normal angiogenic response during skin repair in diabetic ob/ob mice. *Diabetologia*. 44: 471.
- Stillman, R. M. 2008. Diabetic Ulcer. [www.emedicine.com](http://www.emedicine.com).
- Syahdrajat, T. 2017. Panduan Penelitian untuk Skripsi Kedokteran dan Kesehatan. *CV Sunrise*.
- Theoret, C., J. Schumacher. 2017. Physiology of Wound Healing. 3<sup>rd</sup> Ed. *Equine Wound Management*, 44-62.
- Tokopedia. 2015. Obat Herbal Alami Jogja. <https://www.tokopedia.com/herbalnyajogja/umbi-bidara-upas-12-kg> [Diakses pada 30 November 2018]
- Tyndall, W. A., H. A. Neam, C. Zarro, J. P. O'Connor, dan S. S. Linn. 2003. Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals. *Clin Orthop Relat Res*. (408):319-330.
- 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: Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
- Wagner, F. W. 1987. The diabetic foot. *Orthopedics*. 10: 163-172.
- Waspadji, S. 2014. *Kaki Diabetes*. Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid II. Edisi VI. Editor S. Setiati, I. Alwi, A. W. Sudoyo, M. Simadibrata, B. Setiyohadi dan A. Fahrial Syam. Jakarta Pusat: InternaPublishing Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam.
- Weir, G. C., L. Marselli, P. Marchetti, H. Katsuta, M. H. Jung, dan S. Bonner-Weir. 2009. Towards better understanding of the contributions of overwork and glucotoxicity to the  $\beta$ -cell inadequacy of type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 11(4):82-90.
- Werner, M. H., G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Kondoh, R. J. Fisher. 1994. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Letters*. 345(2-3):125-130.
- Werner, S., dan R. Grose. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 83(3):835-870.

- White, H., dan S. Sabarwal. 2014. Quasi-Experimental Design and Methods. *Methodological Briefs: Impact Evaluation* 8. Florence: UNICEF Office of Research.
- Winzell, M. S., dan b. Ahrem. 2004. The high-fat diet-fed mouse a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 53(3):215-219.
- World Health Organisation (WHO). 2018. Diabetes Mellitus. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>. [Diakses pada 9 Maret 2018].
- World Health Organisation (WHO). 2016. *Global Report on Diabetes*. France: WHO Library Cataloging-in-Publication Data.
- Wu, K. K., dan Y. Huan. 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol* 40:5.47.1-5.47.14
- Yoshikawa, K., C. Yagi, H. Hama, M. Tanaka, S. Arihara, dan T. Hashimoto. 2010. Ipomotaosides a-d, resin glycosides from the aerial oarts of *Ipomoea batatas* and their inhibitory activity agains COX-1 and COX-2. *J. Nat Prod*. 73(11):1763-1766.
- Yudaniayanti, I. S, E. Maulana, dan A. Ma'ruf. 2010. Profil penggunaan kombinasi ketamin-xylazine dan ketamin-midazolam sebagai anestesi umum terhadap gambaran fisiologis tubuh pada kelinci jantan. *Veterinaria Medika* 3(1):23-30.
- Zhou, J., M. Ni, X. Liu, Z. Ren, dan Z. Zheng. 2017. Curcumol promotes vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated diabetic wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Medical Science Monitor* 23:555-567.
- Zwir-Ferenc, A., M. Biziuk. 2006. Review: solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(5):677-690.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Prosedur ekstraksi dan fraksinasi

TEKNOLOGI TEPAT GUNA

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

1. Teknologi Pembuatan Ekstrak *M. mammosa*

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

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

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

## 2. Tenologi Pembuatan Fraksi Air Bidara Upas

### PROSEDUR TETAP

#### PEMBUATAN FRAKSI AIR *M. mammosa*

#### 4. PERSIAPAN

4.1. Dipersiapkan bahan yang diperlukan yaitu :

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

4.2. Alat –alat yang diperlukan :

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

#### 5. PEMBUATAN FRAKSI AIR BIDARA UPAS

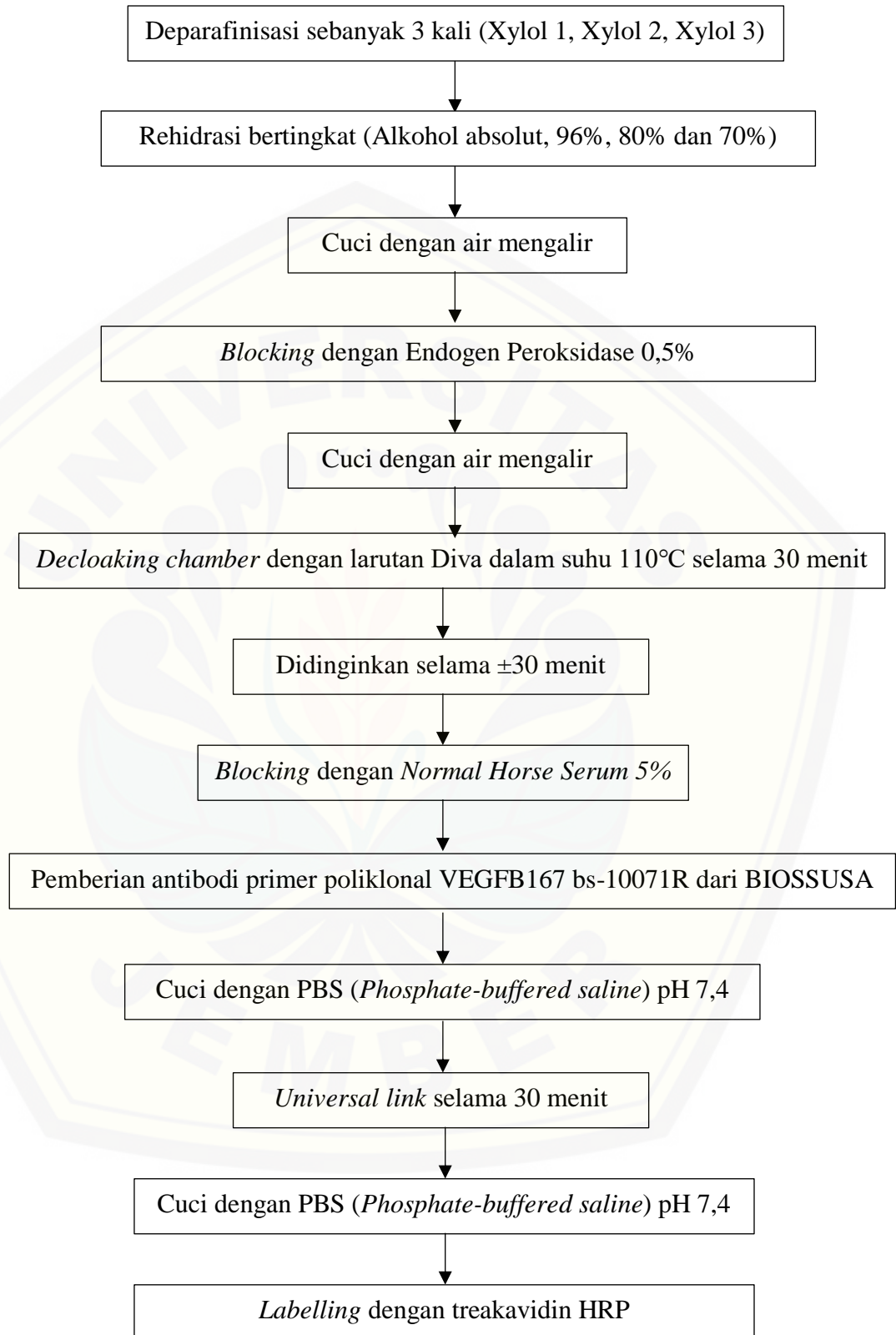
- 5.1. Ekstrak etanol kental sebanyak 120 g ditambah dengan 240 mL akuades dan diaduk hingga tercampur, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah

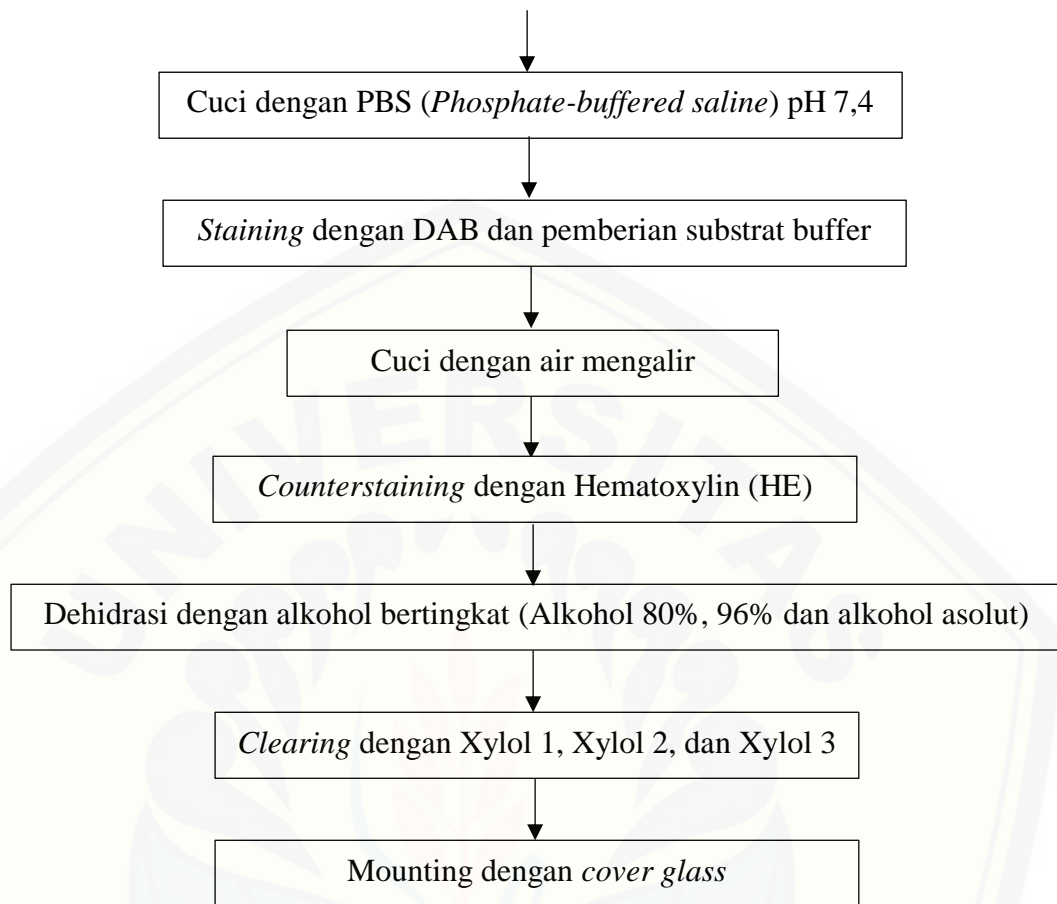
- 5.2. Ke dalam campuran ekstrak dan air ditambahkan n-heksana 360 ml. (perbandingan 1: 3) dan dikocok kuat selama 2-5 menit dan didiamkan sampai lapisan n heksana dan air terpisah sempurna. Lapisan n heksana (bagian atas diambil) melalui lubang atas setelah lapisan air dikeluarkan melalui kran bawah.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

## 6. PASCA PELAKSANAAN

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



**Lampiran 3. 2 Prosedur Pengecatan Imunohistokimia**



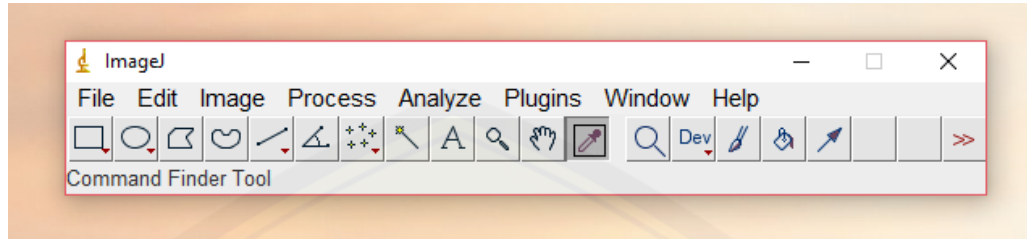


**PROSEDUR TETAP  
IMMUNOHISTOKIMIA  
DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMI  
FK UNAIR**

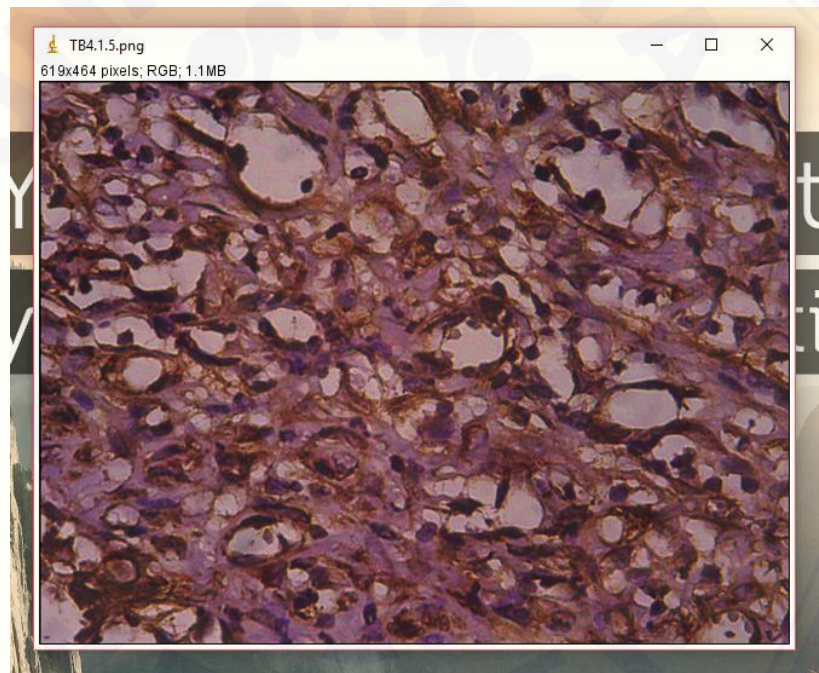
Deparafinisasi (Xylol 1, Xylol 2, Xylol 3) .....	@ 5 menit
Rehidrasi (Alkohol Absolut, Alkohol 96%, Alkohol 80%, Alkohol 70% .....	@ 4 menit
Cuci dengan air mengalir .....	5 menit
Blocking Endogen Peroksidase 0,5% .....	30 menit
Cuci dengan air mengalir .....	5 menit
Decloaking Chamber (110°C selama 30 menit) dengan larutan Diva	
Dinginkan .....	± 30 menit
Cuci dalam PBS pH 7,4 .....	3 menit
Blocking dengan Normal Horse Serum 5% .....	30 menit
Antibodi Primer .....	60 menit
Cuci dalam PBS pH 7,4 .....	3 menit
Universal Link .....	30 menit
Cuci dalam PBS pH 7,4 .....	3 menit
Trekavidin HRP Label .....	30 menit
Cuci dalam PBS pH 7,4 .....	3 menit
DAB + Substrat Buffer .....	2-5 menit
Cuci dengan air mengalir .....	5 menit
Counterstain dengan Haematoxylin .....	5-10 menit
Cuci dengan air mengalir .....	5 menit
Dehidrasi (Alkohol 80%, Alkohol 96%, Alkohol Absolut) .....	@ 5 menit
Clearing (Xylol 1, Xylol 2, Xylol 3) .....	@ 5 menit
Mounting dengan cover glass	

### Lampiran 3.3 Langkah Perhitungan Ekspresi VEGF

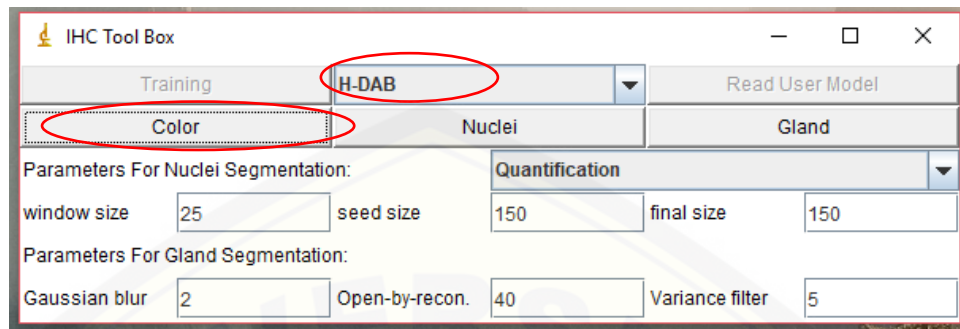
1. Buka *software* ImageJ



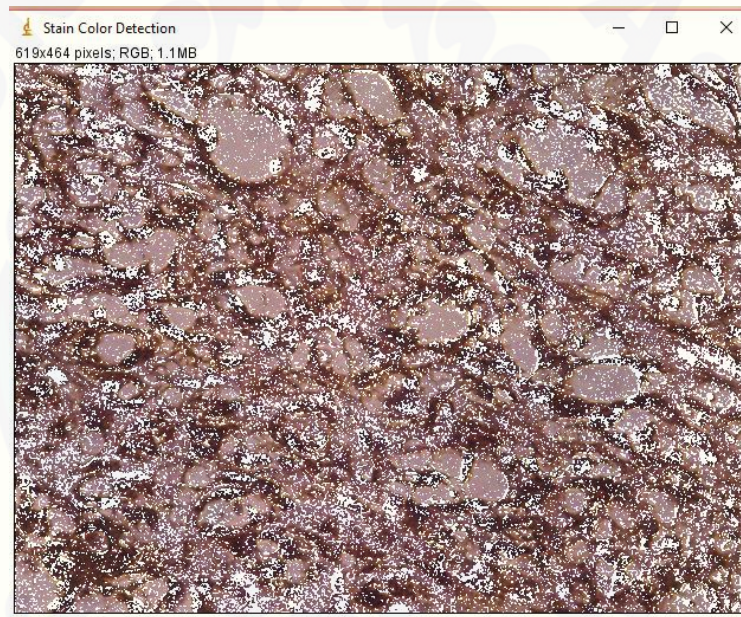
2. Pilih gambar yang akan dianalisis dengan klik *File* → *Open* atau *drag*/seret gambar pada *software* ImageJ hingga gambar muncul pada layar



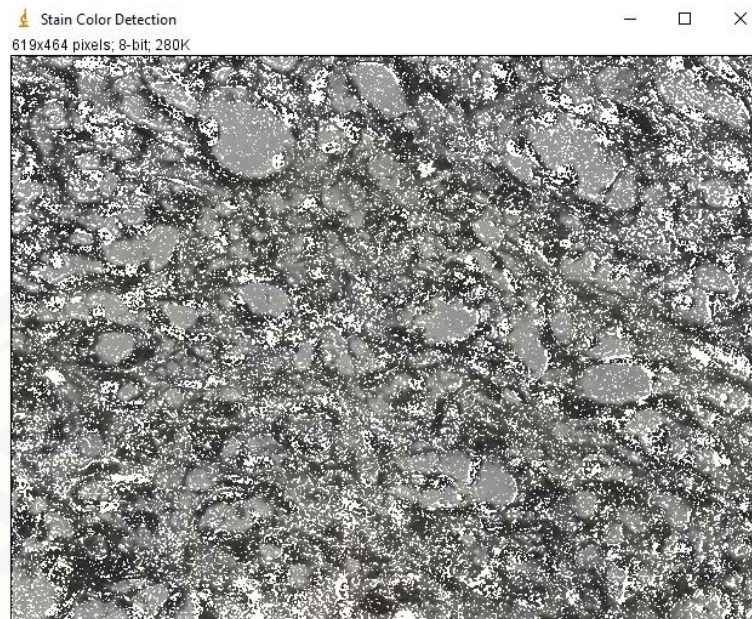
3. Pilih IHC *toolbox* pada menu *Plugin*. Pilih *Select Model* → H-DAB, kemudian pilih *color*.



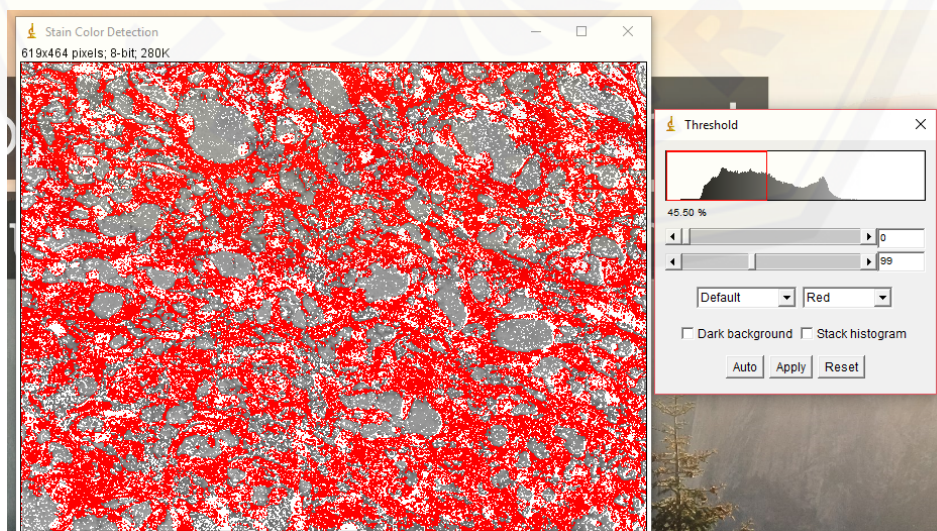
Kemudian akan muncul gambar seperti ini.

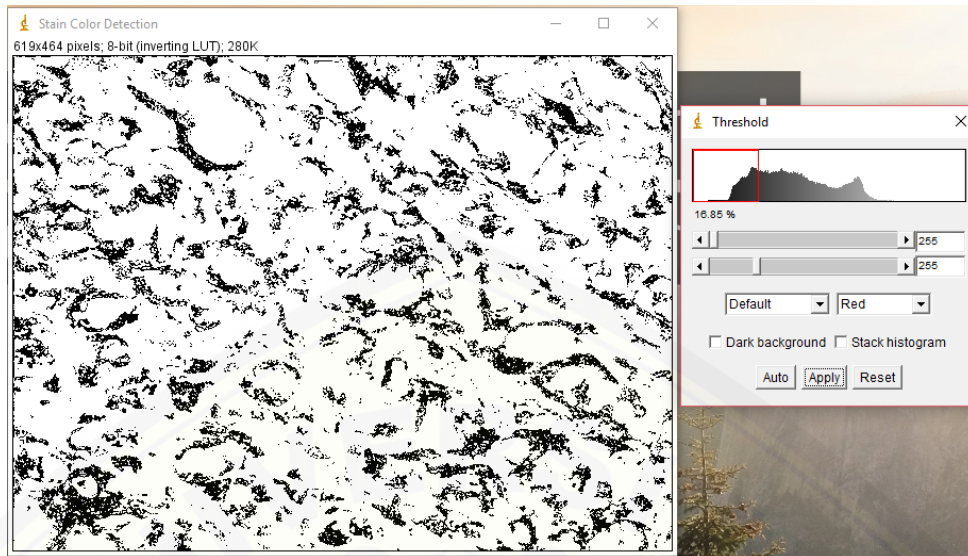


4. Pilih menu *image* → *type* → *8 bit*. Kemudian gambar akan berubah menjadi warna monokrom.

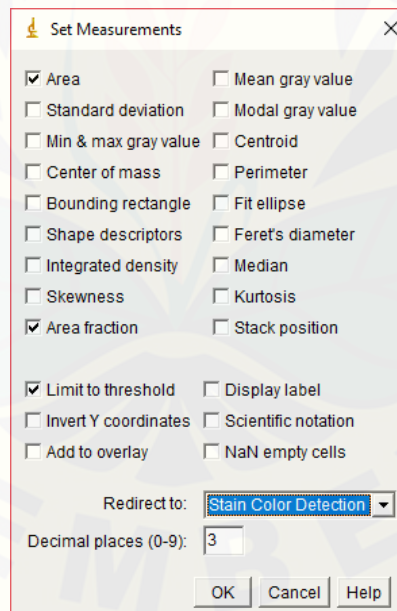


5. Pilih menu *Image* → *Adjust* → *Threshold* atau bisa langsung menggunakan *Ctrl+Shift+T*. Kemudian akan muncul menu *Threshold* dan gambar akan berubah warna. Atur *threshold* dengan menggerakkan garis sesuai intensitas yang diinginkan. Jika ingin mengetahui intensitas lemah, maka geser garis bagian atas ke arah kanan, jika ingin mengetahui intensitas kuat geser garis bagian bawah ke arah kiri. Kemudian klik *Apply*.

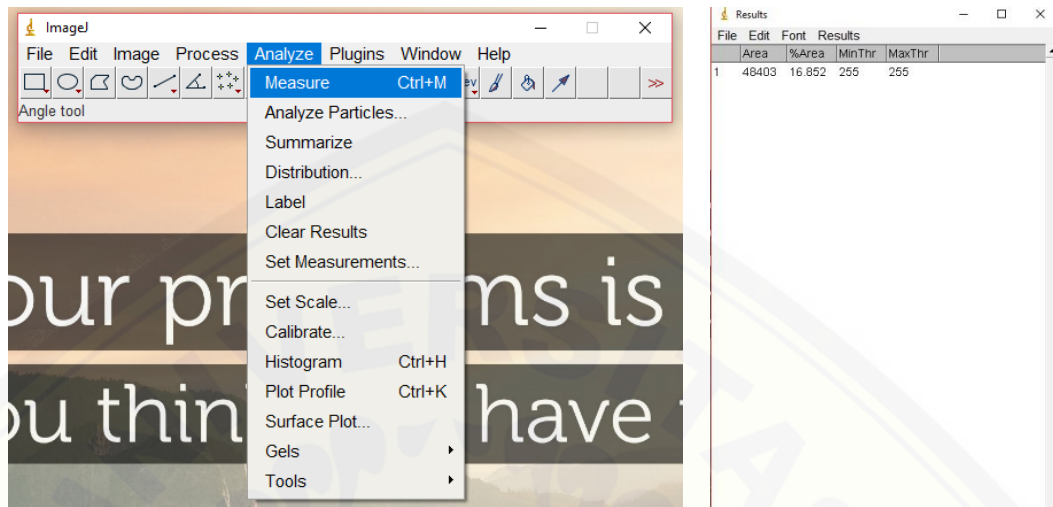




6. Setelah itu, pilih menu *Analyze* → *Set measurements*. Tandai *Area*, *Area fraction* dan *Limit to threshold*. Pilih *Redirect to: Stain Color Detection*.




7. Pilih menu *Analyze* → *Measure* atau bisa langsung dengan Ctrl+M, hingga muncul hasil.





**Lampiran 3. 4 Surat Keterangan Persetujuan Etik**

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

---

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*  
Nomor : 1261/H25.1.11/KE/2018

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

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



**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa (Lour.)*) PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS DIABETES MELALUI EKSPRESI VEGF**

Nama Peneliti Utama : Haqiqotul Fikriyah  
*Name of the principal investigator*

NIM : 152010101082

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

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

Jember, 12 - 12 - 2018  
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](mailto: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

## Lampiran 4.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

Proses Ekstraksi dan Fraksinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember

### A. Proses Ekstraksi

#### a. Tahap ekstraksi yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Sebanyak 10 Kg dipotong-potong kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
2. Setelah kering diblender untuk mendapatkan 1 Kg serbuk simplisia.
3. Sebanyak 1 Kg serbuk simplisia diekstraksi dengan ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70% 5 L selama 1 jam
4. Kemudian disaring dengan corong Buchner sehingga diperoleh filtrat.
5. Residu dimaserasi ulang satu kali.
6. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak etanol kental.

#### b. Jumlah pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi

1. Etanol 70% yang dibutuhkan = 10 L
2. Cara pembuatan Etanol 70% 10 L = 7,292 L Etanol 96% + 2,708 L Aquades

#### c. Hasil Ekstraksi

Hasil ekstrak etanol kental yang didapatkan 148 gram

### B. Proses Fraksinasi

#### a. Tahap fraksinasi yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol kental sebanyak 120 gram ditambahkan dengan 240 mL aquades kemudian diaduk hingga homogen
2. Ditambahkan 360 mL n-heksana dalam corong pisah lalu dikocok 2-5 menit dan dibiarkan sampai lapisan n-heksana dan air terpisah, kemudian seluruh lapisan n-heksana diambil. Tahap ini diulang dua kali
3. Lapisan n-heksana yang didapatkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi n-heksana
4. Sedangkan lapisan air ditambahkan 360 mL etil asetat dalam corong pisah, kemudian dikocok 2-5 menit dan dibiarkan sampai lapisan etil asetat dan air terpisah. Seluruh lapisan etil asetat diambil. Tahap ini diulang dua kali
5. Lapisan etil asetat yang didapatkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi etil asetat

6. Sedangkan lapisan air kemudian dipekatkan dengan *freeze drying* untuk mendapatkan fraksi air.
7. Ekstrak yang tidak dapat larut dalam air, n-heksana, dan etil asetat dianggap sebagai lapisan etanol yang tidak digunakan dalam penelitian

b. Bahan ekstrak yang digunakan

Ekstrak etanol kental yang digunakan 120 gram

c. Pelarut yang digunakan

1. Aquades = 240 mL.
2. n-Heksana = 1080 mL.
3. Etil asetat = 1080 mL.

a. Hasil Fraksinasi

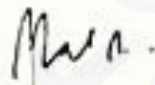
Hasil fraksinasi didapatkan :

1. Fraksi air = 74 gram
2. Fraksi n-heksana = 2 gram
3. Fraksi etil asetat = 26 gram
4. Ekstrak yang tidak dapat larut dalam air, n-heksana, dan etil asetat = 6 gram
5. Total penyusutan atau pengurangan berat adalah 12 gram yang terjadi akibat proses fraksinasi

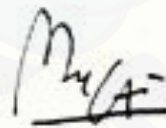
Mengetahui,

Analisis Laboratorium Biologi  
Fakultas Farmasi  
Universitas Jember

Dosen Pembimbing Tugas Akhir



( Parka Agnita )



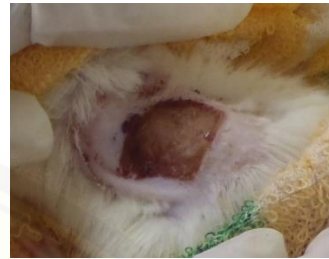
(dr. Ancah Caesarina N. M., Ph.D)

**Lampiran 4.2 Dokumentasi luka secara makroskopis**

a. Dokumentasi hari ke-3 post-eksisi



Kontrol negatif



Kontrol positif



Kelompok T1



Kelompok T2



Kelompok T3



Kelompok T4

b. Dokumentasi hari ke-5 post-eksisi



Kelompok K(-)



Kelompok K(+)



Kelompok T1



Kelompok T2



Kelompok T3



Kelompok T4

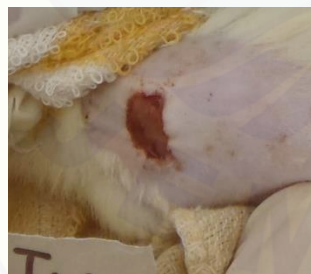
c. Dokumentasi hari ke-7 post-eksisi



Kelompok K(-)



Kelompok K(+)



Kelompok T1



Kelompok T2



Kelompok T3

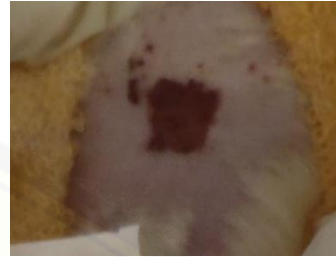


Kelompok T4

d. Dokumentasi hari ke-9 post-eksisi



Kontrol negatif



Kontrol positif



Kelompok T1



Kelompok T2



Kelompok T3



Kelompok T4

**Lampiran 4.3 Data Perhitungan Ekspresi VEGF**

a. Ekspresi VEGF dalam persentase dengan intensitas masing-masing

Nama Kelompok	Lapang Pandang	Luas Area Ekspresi VEGF			
		Lemah	Sedang	Kuat	Total
K+1	1	11.21	14.88	16.08	42.16
	2	18.61	9.98	13.51	42.10
	3	15.28	6.16	14.72	36.17
	4	15.33	9.93	16.44	41.69
	5	15.17	11.41	15.22	41.80
K+2	1	25.71	6.65	1.08	33.44
	2	25.68	5.78	2.46	33.92
	3	27.73	2.19	2.15	32.08
	4	30.39	2.50	2.09	34.98
	5	24.84	4.49	3.45	32.79
K+3	1	12.04	3.29	17.50	32.82
	2	10.18	2.07	11.60	23.85
	3	16.01	3.52	4.85	24.38
	4	7.17	5.38	8.08	20.64
	5	12.22	3.72	7.79	23.74
K+4	1	10.29	4.73	18.58	33.61
	2	10.43	4.53	22.54	37.50
	3	12.08	8.84	12.89	33.81
	4	14.53	0.44	20.36	35.33
	5	12.26	10.21	12.96	35.43
K-1	1	9.41	5.80	9.66	24.87
	2	8.17	8.00	8.65	24.82
	3	12.42	8.46	11.47	32.35
	4	12.59	6.58	8.33	27.50
	5	25.54	3.04	0.42	29.00
K-2	1	9.90	2.64	6.68	19.22
	2	11.40	2.72	8.71	22.84
	3	10.04	5.59	7.66	23.29
	4	9.78	3.49	8.63	21.90
	5	7.66	5.46	13.35	26.47
K-3	1	10.49	13.35	8.58	32.42
	2	11.35	4.15	9.78	25.28
	3	9.36	6.38	10.69	26.43
	4	11.29	4.22	5.34	20.85
	5	8.48	5.34	5.68	19.49
K-4	1	17.42	5.84	4.01	27.26



	2	7.65	5.22	2.52	15.39
	3	8.46	6.87	0.02	15.35
	4	14.11	0.34	5.51	19.96
	5	9.52	2.12	4.51	16.14
T1.1	1	11.612	7.06	12.011	30.68
	2	11.832	13.99	3.643	29.461
	3	9.565	14.66	0.681	24.907
	4	11.66	14.91	3.901	30.468
	5	18.4	9.32	0.184	27.903
T1.2	1	12.95	5.00	3.68	21.63
	2	11.45	3.94	3.10	18.50
	3	14.46	10.55	6.65	31.66
	4	11.99	4.14	7.01	23.14
	5	8.29	5.27	4.03	17.60
T1.3	1	7.745	5.48	3.41	16.635
	2	9.049	9.20	3.067	21.311
	3	12.219	5.64	0.49	18.348
	4	19.977	15.05	5.161	40.187
	5	10.802	9.51	17.509	37.817
T1.4	1	15.84	1.13	1.12	18.09
	2	14.78	7.59	1.92	24.30
	3	25.13	6.74	1.36	33.23
	4	13.59	9.68	1.66	24.93
	5	16.91	6.71	2.14	25.76
T2.1	1	10.91	9.49	13.65	34.06
	2	12.05	3.69	20.25	35.99
	3	12.03	2.70	22.67	37.40
	4	13.95	4.39	18.66	37.00
	5	21.37	11.26	15.70	48.33
T2.3	1	17.63	6.78	13.45	37.86
	2	11.37	8.91	7.99	28.27
	3	13.21	9.91	12.75	35.86
	4	16.12	7.72	11.09	34.93
	5	17.26	6.72	12.63	36.61
T2.4	1	23.10	4.07	3.98	31.14
	2	14.18	15.05	4.69	33.91
	3	14.30	7.71	0.56	22.57
	4	13.50	11.40	4.20	29.10
	5	17.82	11.17	3.53	32.52
T2.5	1	15.52	10.49	7.05	33.05
	2	15.71	11.49	9.14	36.34

	3	15.71	5.88	14.67	36.26
	4	5.32	5.87	25.63	36.82
	5	8.55	5.82	20.64	35.01
T3.1	1	10.15	8.90	16.65	35.70
	2	11.61	9.45	16.85	37.90
	3	11.11	13.97	13.05	38.13
	4	11.71	10.71	13.98	36.39
	5	15.31	7.05	14.89	37.24
T3.2	1	11.81	12.06	13.51	37.38
	2	14.85	9.22	13.79	37.85
	3	11.88	9.72	14.28	35.89
	4	11.11	5.98	15.70	32.78
	5	12.40	8.84	17.58	38.82
T3.3	1	13.99	4.49	19.80	38.28
	2	13.14	10.74	16.44	40.31
	3	15.70	6.21	17.93	39.84
	4	18.73	6.62	8.03	33.38
	5	13.34	14.82	14.10	42.26
T3.4	1	11.342	14.11	9.176	34.626
	2	15.207	11.95	11.271	38.426
	3	21.145	10.06	10.11	41.314
	4	12.066	14.03	6.639	32.736
	5	14.09	13.46	5.83	33.38
T4.1	1	18.17	18.66	8.47	45.30
	2	13.80	14.80	12.85	41.45
	3	11.08	17.57	16.85	45.50
	4	9.80	19.69	15.11	44.60
	5	14.10	14.79	14.10	42.99
T4.2	1	4.83	9.39	26.26	40.48
	2	6.66	13.24	20.31	40.21
	3	4.83	21.73	13.13	39.69
	4	10.07	10.65	19.28	39.99
	5	12.93	6.00	20.68	39.61
T4.3	1	8.88	1.61	44.28	54.76
	2	7.11	20.02	34.21	61.33
	3	7.78	10.97	42.58	61.33
	4	7.36	29.11	24.86	61.33
	5	14.14	21.23	8.41	43.78
T4.4	1	6.89	14.40	32.01	53.30
	2	7.21	14.27	31.47	52.95
	3	7.60	20.50	24.07	52.16

	4	7.19	18.12	23.96	49.27
	5	9.88	20.32	23.00	53.20

## b. Data skoring histologi ekspresi VEGF

Nama Kelompok	Lapang Pandang	Luas Area Ekspresi VEGF				Rerata
		Lemah	sedang	kuat	total	
K+1	1	11.21	29.756	48.231	89.19	81.64
	2	18.61	19.958	40.527	79.10	
	3	15.28	12.328	44.163	71.77	
	4	15.33	19.858	49.305	84.49	
	5	15.17	22.82	45.645	83.64	
K+2	1	25.71	13.306	3.249	42.26	42.26
	2	25.68	11.566	7.389	44.63	
	3	27.73	4.386	6.459	38.58	
	4	30.39	4.994	6.282	41.67	
	5	24.84	8.986	10.359	44.19	
K+3	1	12.04	6.57	52.491	71.10	48.61
	2	10.18	4.138	34.788	49.11	
	3	16.01	7.042	14.544	37.60	
	4	7.17	10.768	24.243	42.18	
	5	12.22	7.448	23.37	43.04	
K+4	1	10.29	9.466	55.749	75.51	75.82
	2	10.43	9.05	67.62	87.10	
	3	12.08	17.686	38.658	68.42	
	4	14.53	0.89	61.065	76.49	
	5	12.26	20.426	38.871	71.56	
K-1	1	9.41	11.604	28.968	49.98	49.49
	2	8.17	15.992	25.953	50.12	
	3	12.42	16.926	34.401	63.75	
	4	12.59	13.166	24.993	50.75	
	5	25.54	6.078	1.251	32.87	
K-2	1	9.90	5.284	20.037	35.22	44.74
	2	11.40	5.448	26.13	42.98	
	3	10.04	11.174	22.986	44.20	
	4	9.78	6.972	25.884	42.64	
	5	7.66	10.912	40.062	58.64	
K-3	1	10.49	26.708	25.731	62.93	47.61
	2	11.35	8.298	29.325	48.98	
	3	9.36	12.768	32.067	54.19	

	4	11.29	8.438	16.032	35.76	
	5	8.48	10.674	17.034	36.18	
K-4	1	17.42	11.67	12.033	41.12	29.53
	2	7.65	10.436	7.56	25.64	
	3	8.46	13.73	0.072	22.26	
	4	14.11	0.674	16.533	31.32	
	5	9.52	4.23	13.542	27.29	
T1.1	1	11.612	14.116	36.033	61.76	48.84
	2	11.832	27.972	10.929	50.73	
	3	9.565	29.322	2.043	40.93	
	4	11.66	29.814	11.703	53.18	
	5	18.4	18.638	0.552	37.59	
T1.2	1	12.95	9.99	11.037	33.98	38.07
	2	11.45	7.876	9.312	28.64	
	3	14.46	21.108	19.941	55.51	
	4	11.99	8.276	21.039	41.31	
	5	8.29	10.546	12.102	30.94	
T1.3	1	7.745	10.96	10.23	28.94	47.69
	2	9.049	18.39	9.201	36.64	
	3	12.219	11.278	1.47	24.97	
	4	19.977	30.098	15.483	65.56	
	5	10.802	19.012	52.527	82.34	
T1.4	1	15.84	2.266	3.351	21.46	34.91
	2	14.78	15.184	5.757	35.73	
	3	25.13	13.482	4.089	42.70	
	4	13.59	19.36	4.971	37.92	
	5	16.91	13.428	6.414	36.75	
T2.1	1	10.91	18.978	40.962	70.85	81.23
	2	12.05	7.38	60.75	80.18	
	3	12.03	5.4	68.001	85.43	
	4	13.95	8.778	55.986	78.71	
	5	21.37	22.522	47.1	90.99	
T2.3	1	17.63	13.566	40.341	71.54	65.88
	2	11.37	17.82	23.973	53.17	
	3	13.21	19.81	38.244	71.26	
	4	16.12	15.436	33.267	64.83	
	5	17.26	13.44	37.89	68.59	
T2.4	1	23.10	8.142	11.925	43.16	46.51
	2	14.18	30.096	14.061	58.33	
	3	14.30	15.42	1.686	31.40	
	4	13.50	22.802	12.609	48.91	

	5	17.82	22.332	10.596	50.75	
T2.5	1	15.52	20.974	21.135	57.62	74.26
	2	15.71	22.97	27.432	66.11	
	3	15.71	11.76	44.022	71.49	
	4	5.32	11.738	76.899	93.96	
	5	8.55	11.644	61.917	82.11	
T3.1	1	10.15	17.804	49.938	77.90	77.25
	2	11.61	18.898	50.535	81.04	
	3	11.11	27.934	39.162	78.21	
	4	11.71	21.412	41.928	75.05	
	5	15.31	14.09	44.664	74.06	
T3.2	1	11.81	24.114	40.539	76.46	75.65
	2	14.85	18.436	41.37	74.65	
	3	11.88	19.444	42.846	74.17	
	4	11.11	11.95	47.103	70.16	
	5	12.40	17.686	52.731	82.82	
T3.3	1	13.99	8.974	59.409	82.37	77.91
	2	13.14	21.478	49.308	83.92	
	3	15.70	12.428	53.799	81.92	
	4	18.73	13.242	24.087	56.06	
	5	13.34	29.636	42.303	85.28	
T3.4	1	11.342	28.216	27.528	67.09	66.03
	2	15.207	23.896	33.813	72.92	
	3	21.145	20.118	30.33	71.59	
	4	12.066	28.062	19.917	60.05	
	5	14.09	26.922	17.487	58.50	
T4.1	1	18.17	37.32	25.41	80.90	88.02
	2	13.80	29.59	38.55	81.94	
	3	11.08	35.146	50.556	96.78	
	4	9.80	39.386	45.318	94.50	
	5	14.10	29.586	42.288	85.97	
T4.2	1	4.83	18.786	78.771	102.39	92.06
	2	6.66	26.484	60.927	94.07	
	3	4.83	43.456	39.378	87.67	
	4	10.07	21.292	57.828	89.19	
	5	12.93	11.996	62.043	86.97	
T4.3	1	8.88	3.216	132.84	144.93	134.83
	2	7.11	40.034	102.618	149.76	
	3	7.78	21.946	127.725	157.45	
	4	7.36	58.214	74.586	140.16	
	5	14.14	42.452	25.23	81.82	

T4.4	1	6.89	28.8	96.03	131.72	123.50
	2	7.21	28.532	94.407	130.15	
	3	7.60	40.992	72.195	120.79	
	4	7.19	36.242	71.883	115.31	
	5	9.88	40.644	69.009	119.53	



**Lampiran 4.4 Uji Analisis Statistik**

**Case Processing Summary**

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Dosis_fraksi	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Ekspresi	Kontrol negatif	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%
_VEGF	12,5 mg	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%
	25 mg	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%
	50 mg	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%
	100 mg	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%
	Kontrol positif	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%

**Descriptives**

		Dosis_fraksi	Statistic	Std. Error	
Ekspresi	Kontrol	Mean	42.8425	4.54369	
_VEGF	negatif	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	28.3824	
			Upper Bound	57.3026	
		5% Trimmed Mean	43.2128		
		Median	46.1750		
		Variance	82.580		
		Std. Deviation	9.08738		
		Minimum	29.53		
		Maximum	49.49		
		Range	19.96		
		Interquartile Range	15.69		
		Skewness	-1.733	1.014	
		Kurtosis	3.065	2.619	
		12,5 mg	Mean	42.3775	3.46776
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	31.3415	
	Upper Bound		53.4135		
		5% Trimmed Mean	42.4333		
		Median	42.8800		

	Variance		48.102	
	Std. Deviation		6.93553	
	Minimum		34.91	
	Maximum		48.84	
	Range		13.93	
	Interquartile Range		12.85	
	Skewness		-.153	1.014
	Kurtosis		-4.864	2.619
25 mg	Mean		66.9700	7.50717
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	43.0788	
		Upper Bound	90.8612	
	5% Trimmed Mean		67.3144	
	Median		70.0700	
	Variance		225.430	
	Std. Deviation		15.01434	
	Minimum		46.51	
	Maximum		81.23	
	Range		34.72	
	Interquartile Range		28.14	
	Skewness		-1.040	1.014
	Kurtosis		.892	2.619
50 mg	Mean		74.2100	2.76763
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	65.4022	
		Upper Bound	83.0178	
	5% Trimmed Mean		74.4589	
	Median		76.4500	
	Variance		30.639	
	Std. Deviation		5.53527	
	Minimum		66.03	
	Maximum		77.91	
	Range		11.88	
	Interquartile Range		9.31	
	Skewness		-1.830	1.014
	Kurtosis		3.382	2.619

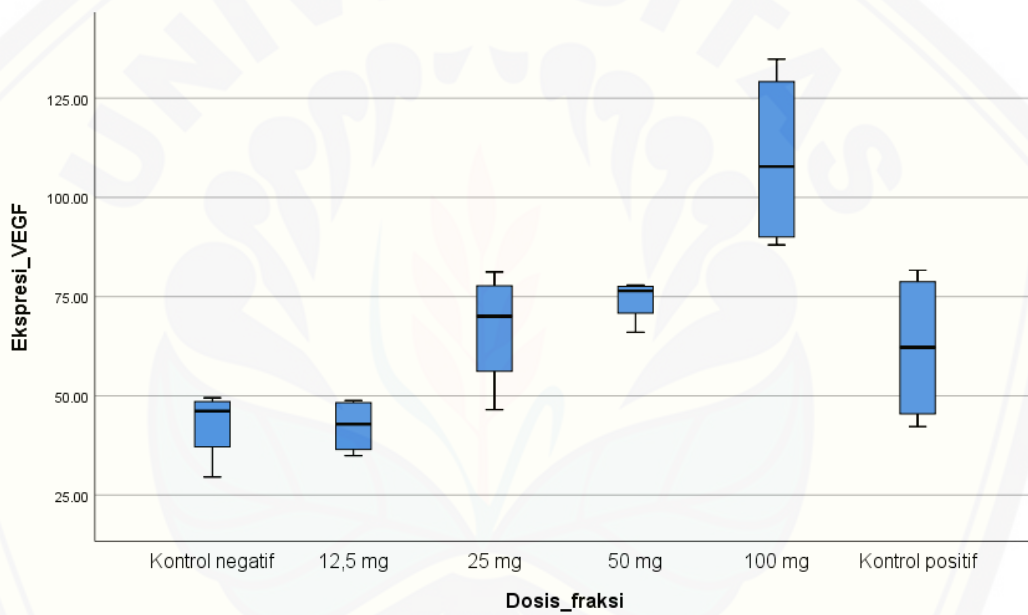


100 mg	Mean		109.6025	11.55823
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	72.8191	
		Upper Bound	146.3859	
	5% Trimmed Mean		109.4000	
	Median		107.7800	
	Variance		534.370	
	Std. Deviation		23.11645	
	Minimum		88.02	
	Maximum		134.83	
	Range		46.81	
	Interquartile Range		42.97	
	Skewness		.177	1.014
	Kurtosis		-4.698	2.619
	Kontrol positif	Mean		62.0825
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	30.9870	
		Upper Bound	93.1780	
5% Trimmed Mean			62.0972	
Median			62.2150	
Variance			381.885	
Std. Deviation			19.54187	
Minimum			42.26	
Maximum			81.64	
Range			39.38	
Interquartile Range			36.34	
Skewness			-.014	1.014
Kurtosis			-5.060	2.619

**Tests of Normality**

	Dosis_fraksi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi	Kontrol negatif	.333	4	.	.813	4	.128
_VEGF	12,5 mg	.278	4	.	.865	4	.279
	25 mg	.221	4	.	.943	4	.674
	50 mg	.353	4	.	.773	4	.062
	100 mg	.276	4	.	.873	4	.308
	Kontrol positif	.259	4	.	.871	4	.302

a. Lilliefors Significance Correction



**Test of Homogeneity of Variances**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi_	Based on Mean	6.717	5	18	.001
VEGF	Based on Median	5.088	5	18	.004
	Based on Median and with adjusted df	5.088	5	10.875	.012
	Based on trimmed mean	6.586	5	18	.001

**ANOVA**

Ekspresi\_VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12313.750	5	2462.750	11.340	.000
Within Groups	3909.021	18	217.168		
Total	16222.771	23			

**Multiple Comparisons**

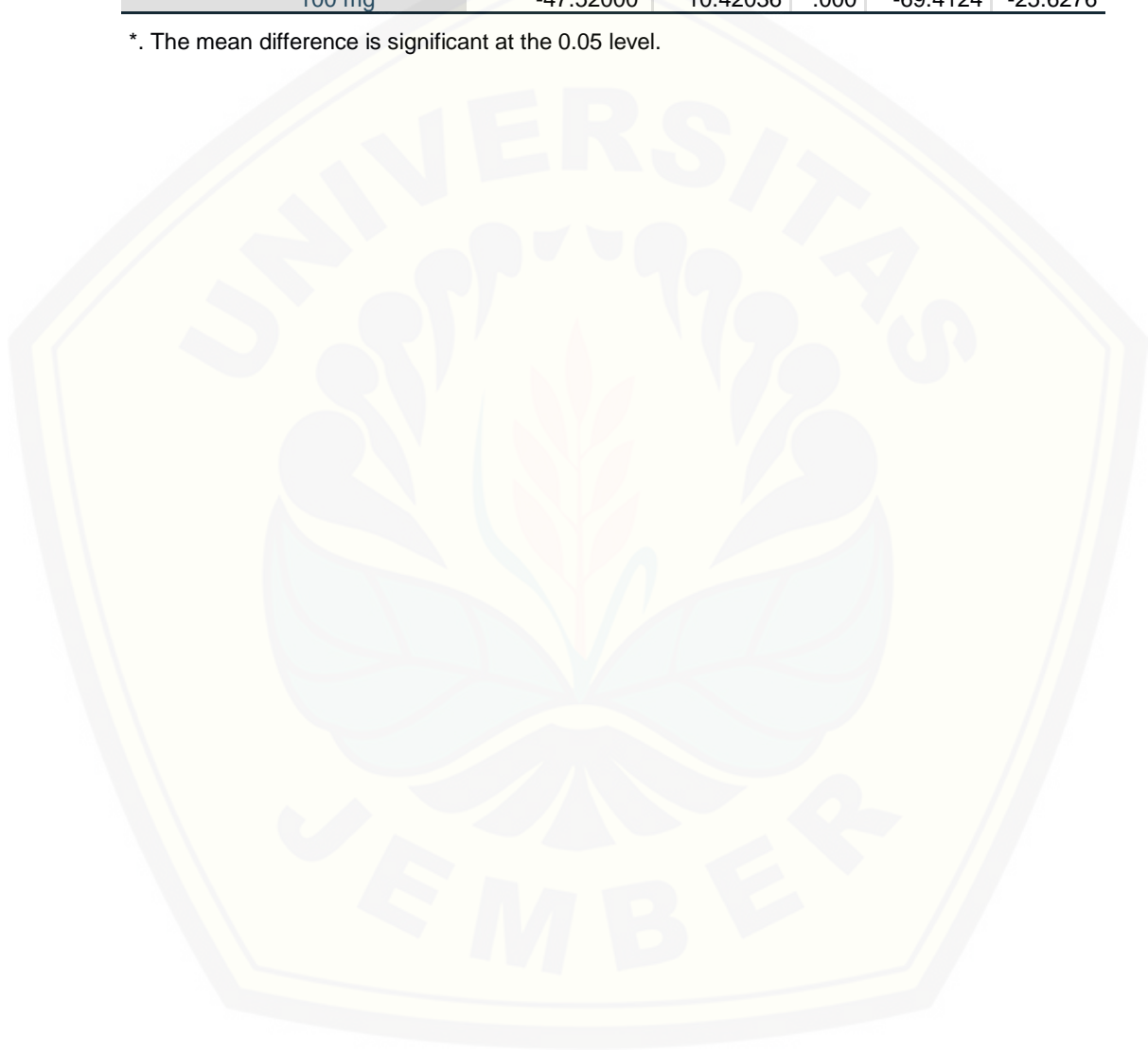
Dependent Variable: Ekspresi\_VEGF

LSD

(I) Dosis_fraksi	(J) Dosis_fraksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	12,5 mg	.46500	10.42036	.965	-21.4274	22.3574
	25 mg	-24.12750*	10.42036	.033	-46.0199	-2.2351
	50 mg	-31.36750*	10.42036	.008	-53.2599	-9.4751
	100 mg	-66.76000*	10.42036	.000	-88.6524	-44.8676
	Kontrol positif	-19.24000	10.42036	.081	-41.1324	2.6524
12,5 mg	Kontrol negatif	-.46500	10.42036	.965	-22.3574	21.4274
	25 mg	-24.59250*	10.42036	.030	-46.4849	-2.7001
	50 mg	-31.83250*	10.42036	.007	-53.7249	-9.9401
	100 mg	-67.22500*	10.42036	.000	-89.1174	-45.3326
	Kontrol positif	-19.70500	10.42036	.075	-41.5974	2.1874
25 mg	Kontrol negatif	24.12750*	10.42036	.033	2.2351	46.0199
	12,5 mg	24.59250*	10.42036	.030	2.7001	46.4849
	50 mg	-7.24000	10.42036	.496	-29.1324	14.6524
	100 mg	-42.63250*	10.42036	.001	-64.5249	-20.7401
	Kontrol positif	4.88750	10.42036	.645	-17.0049	26.7799
50 mg	Kontrol negatif	31.36750*	10.42036	.008	9.4751	53.2599
	12,5 mg	31.83250*	10.42036	.007	9.9401	53.7249
	25 mg	7.24000	10.42036	.496	-14.6524	29.1324
	100 mg	-35.39250*	10.42036	.003	-57.2849	-13.5001
	Kontrol positif	12.12750	10.42036	.260	-9.7649	34.0199
100 mg	Kontrol negatif	66.76000*	10.42036	.000	44.8676	88.6524
	12,5 mg	67.22500*	10.42036	.000	45.3326	89.1174
	25 mg	42.63250*	10.42036	.001	20.7401	64.5249

	50 mg	35.39250*	10.42036	.003	13.5001	57.2849
	Kontrol positif	47.52000*	10.42036	.000	25.6276	69.4124
Kontrol positif	Kontrol negatif	19.24000	10.42036	.081	-2.6524	41.1324
	12,5 mg	19.70500	10.42036	.075	-2.1874	41.5974
	25 mg	-4.88750	10.42036	.645	-26.7799	17.0049
	50 mg	-12.12750	10.42036	.260	-34.0199	9.7649
	100 mg	-47.52000*	10.42036	.000	-69.4124	-25.6276

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



**Lampiran 4.5 Dokumentasi Penelitian**

## a. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi



(1) Penimbangan simplisia umbi bidara upas



(2) Ekstraksi dengan menggunakan etanol 70%



(3) Ekstraksi dengan metode *ultrasound*



(4) Penyaringan dengan penyaring Bunchner



(5) Pemekatan fraksi dengan *rotary evaporator*



(6) Hasil fraksinasi umbi bidara upas

b. Perlakuan pada hewan coba



(1) Persiapan kandang untuk hewan coba



(2) Penutup pada kandang hewan coba



(3) Pengukuran berat badan hewan coba



(4) Pengukuran GDA pada hewan coba



(5) Induksi STZ pada hewan coba



(6) Pemberian dekstrosa 10% pada hewan coba



(6) Bahan untuk anestesi hewan coba



(7) Pemangkasan bulu pada hewan coba



(8) Eksisi kulit pada hewan coba



(9) Hasil eksisi kulit



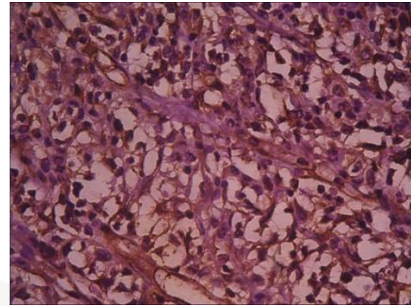
(10) Pengambilan jaringan kulit



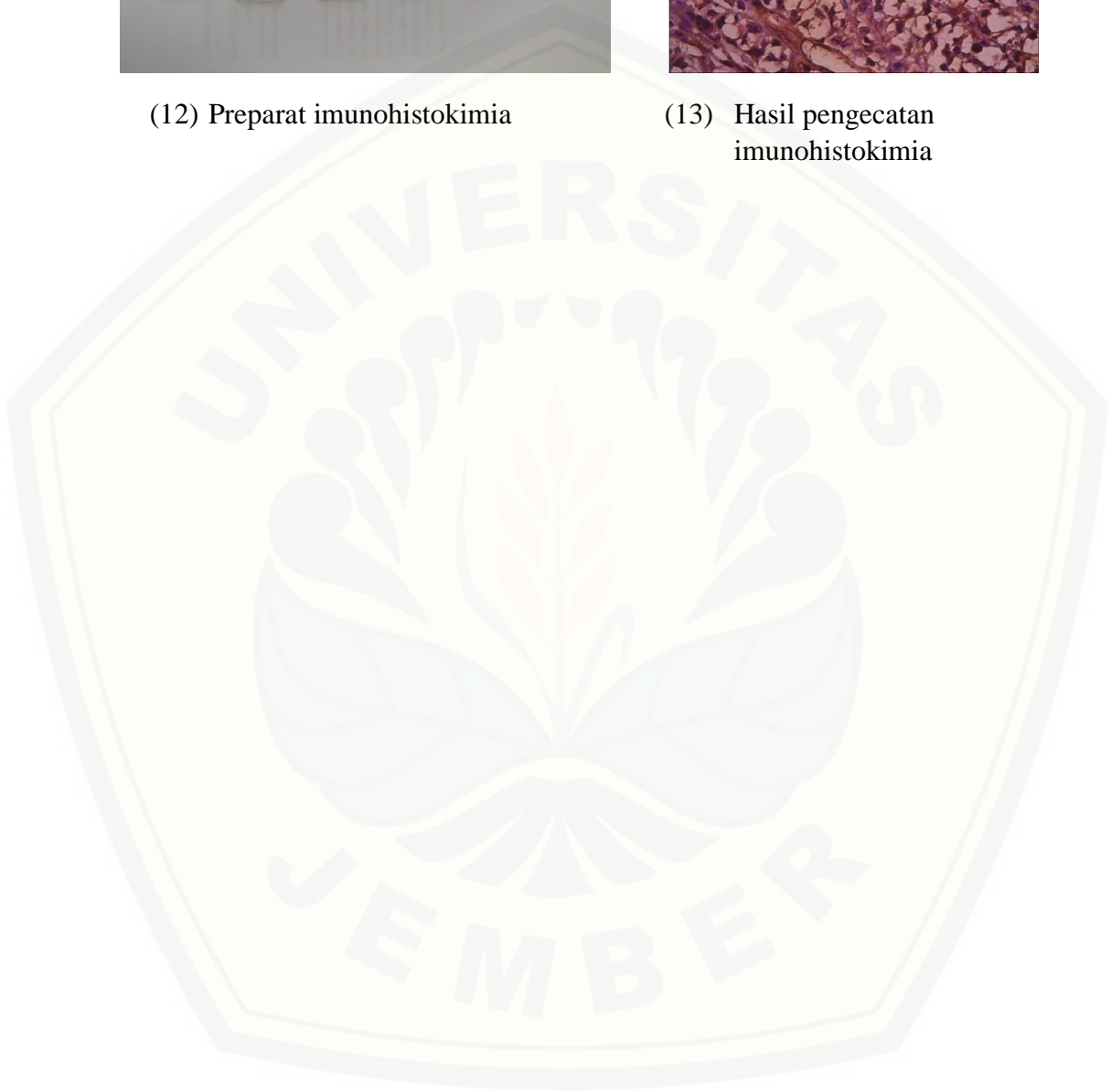
(11) Penyimpanan jaringan kulit



(12) Preparat imunohistokimia



(13) Hasil pengecatan imunohistokimia





**Lampiran 4.6 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi**

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

---

**REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI**

Nomor : 25 /H25.1.11/KBSI/2018

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

**EFEKTIVITAS FRAKSI AIR UMBI BIDARA UPAS (*MERREMIA MAMMOSA* (LOUR.)) PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS DIABETES MELALUI EKSPRESI VEGF**

Nama Penulis : Haqiqotul Fikriyah  
NIM. : 152010101082  
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "**BEBAS PLAGIASI**"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 9 Januari 2019  
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah  
Ketua,



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