



**PENGARUH PERBEDAAN *VEHICLES* DALAM GEL FRAKSI
AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia Mammosa*
(LOUR.)) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN PADA
PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK**

SKRIPSI

Oleh:

**Deuxy Ilma Wahyuliswari
NIM 152010101053**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PENGARUH PERBEDAAN *VEHICLES* DALAM GEL FRAKSI
AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia Mammosa*
(LOUR.)) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN PADA
PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK**

SKRIPSI

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

Oleh:

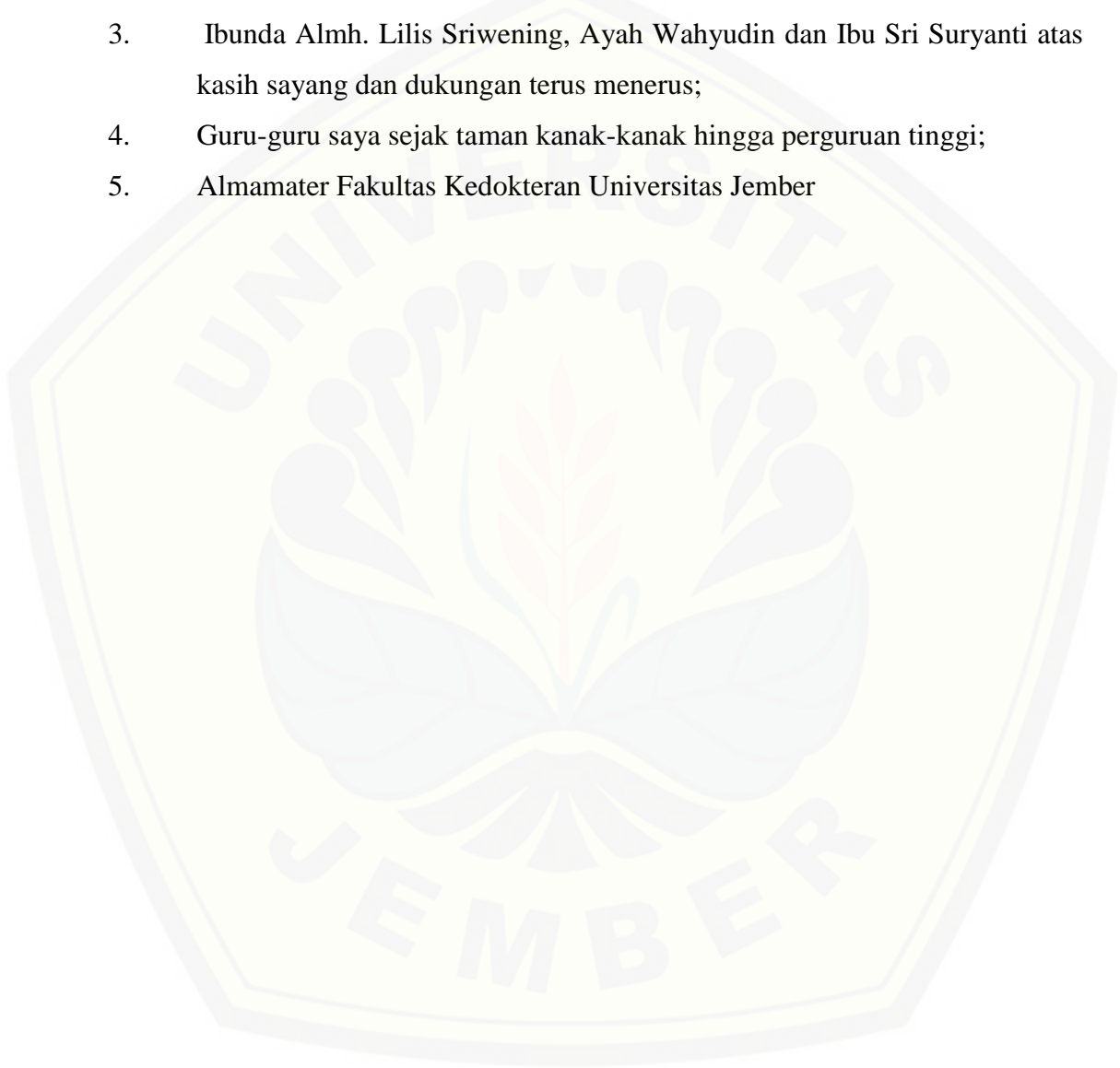
Deuxy Ilma Wahyuliswari
NIM 152010101053

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya yang tak terbatas;
2. Nabi Muhammad SAW, suri tauladan bagi saya;
3. Ibunda Almh. Lilis Sriwening, Ayah Wahyudin dan Ibu Sri Suryanti atas kasih sayang dan dukungan terus menerus;
4. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember



MOTO

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapa banyaknya Kami
tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”

(terjemahan Surat *Asy Syuara* ayat 7)¹



¹ Departemen Agama Republik Indonesia. *Al-Quran Tajwid dan Terjemahan*. 2006. Jakarta: Maghfirah Pustaka.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Deuxy Ilma Wahyuliswari

NIM : 152010101053

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Perbedaan *Vehicles* dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Diabetik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 17 Januari 2019

Yang menyatakan,

Deuxy Ilma Wahyuliswari

NIM 152010101053

SKRIPSI

**PENGARUH PERBEDAAN *VEHICLES* DALAM GEL FRAKSI
AIR EKSTRAK UMBI BIDARA UPAS (*Merremia Mammosa*
(LOUR.)) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN PADA
PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK**

Oleh:

Deuxy Ilma Wahyuliswari

NIM 152010101053

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota: dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Perbedaan *Vehicles* dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Diabetik” karya Deuxy Ilma Wahyuliswari telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 17 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

dr. Hairrudin, M. Kes

dr. Rena Normasari, M. Biomed

NIP 197510112003121008

NIP 198305122008122002

Anggota II,

Anggota III,

dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D

dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed

NIP 198203092008122002

NIP 198304052008121001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

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

NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Pengaruh Perbedaan Vehicles dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Diabetik; Deuxy Ilma Wahyuliswari, 152010101053; 2019; 67 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Diabetes Mellitus (DM) merupakan salah satu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia karena gangguan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. DM memiliki banyak komplikasi, salah satunya luka diabetik. Peningkatan kadar gula darah dapat menghambat kerja leukosit sehingga luka dengan mudah menjadi ulkus dan meluas. Manajemen luka diabetik cukup sulit karena adanya pemanjangan fase penyembuhan luka. Pembuatan gel fraksi air ekstrak etanol Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) diharapkan mampu menjadi pilihan alternatif dalam pengobatan luka diabetik.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh perbedaan *vehicles* dalam gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik. Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experimental design* dengan rancangan *post test only randomized control group design*. Terdapat 24 sampel penelitian yang dihitung berdasarkan rumus Federer yang dibagi menjadi tiga kelompok kontrol yaitu kontrol negatif (akuades), kontrol positif 1 (krim gentamisin 0,1%) serta kontrol positif 2 (gel Bioplacenton) dan empat kelompok perlakuan yaitu kelompok *vehicle* HPMC, kelompok *vehicle* Carbopol, dan kelompok *vehicle* Na CMC. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis *vehicles* gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas, krim gentamisin dan gel Bioplacenton. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah tingkat kepadatan kolagen kulit tikus. Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan usia 2-3 bulan berat 150-220 gram. Pembuatan ekstrak dengan teknik ultrasonikasi kemudian dilanjutkan fraksinasi dengan teknik partisi cair-cair untuk mendapat fraksi air dan dilakukan pembuatan gel dengan *vehicles* berbeda yaitu HPMC, Carbopol, dan Na CMC.

Penelitian ini dilakukan 25 hari dimulai adaptasi tikus selama 7 hari, induksi streptozotosin (STZ) 40 mg/kgBB, pemeriksaan glukosa, pemberian luka, dan pemberian perlakuan yang diberikan secara topikal 2 hari sekali selama 10 hari sesuai kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (akuades), kontrol positif 1 (krim gentamisin 0,1%), kontrol positif 2 (gel Bioplacenton®) dan 3 kelompok yaitu gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas dengan *vehicles* HPMC, Carbopol, dan Na CMC. Tikus dikorbankan pada hari ke-25 penelitian dan dilihat kepadatan kolagen pada preparat pewarnaan *Masson's Trichrome* dengan perbesaran 400x dalam 6 lapang pandang kemudian diolah menggunakan perangkat lunak *imageJ*. Uji statistik dilakukan menggunakan uji *One Way Anova Post Hoc Fisher's LSD*.

Hasil pengamatan kepadatan kolagen didapatkan nilai rata-rata K- (akuades) 24,60%, K+(1) (krim gentamisin 0,1%) 39,07%, K+(2) (gel Bioplacenton) 49,10%, P1 (*vehicle* HPMC) 52,71%, P2 (*vehicle* Carbopol) 38,59%, dan P3 (*vehicle* Na CMC) 54,88%. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antarkelompok, sedangkan hasil *post hoc* Fisher's LSD menunjukkan kelompok K- dengan K+(1), K+(2), P1, P2, dan P3 memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Kelompok K+(1) dengan K- dan P3 memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Kelompok K+(2) dengan K- memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Kelompok P1 dengan K- dan P2 memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Kelompok P2 dengan K-, P1, dan P3 memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Kelompok P3 dengan K-, K+(1), dan P2 memiliki nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan signifikan antarkelompok. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan terdapat pengaruh *vehicles* dalam gel fraksi air ekstrak etanol Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabeti dimana *vehicle* Na CMC memiliki pengaruh paling tinggi dibanding lainnya.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh *Vehicles* dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)) terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Diabetik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam pengerjaan skripsi ini;
2. dr. Hairrudin, M. Kes dan dr. Rena Normasari, M. Biomed selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam pengerjaan skripsi ini;
3. dr. Elly Nurus Sakinah M.Si dan Bu Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt atas bantuan yang diberikan selama penelitian;
4. Dr. Aries Prasetyo, dr., M. Kes selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
5. Ibunda Almh. Lilis Sriwening, Ayah Wahyudin, Ibu Sri Suryanti, Rizki Firsta, Tryas Roseita dan Bimbi Virgamantya, terima kasih atas kasih sayang sejak kecil;
6. Rekan penelitian Nurin Kamila, Mizan Maulana, Haqiqotul Fikriyah, dan Gusfita Trisna yang telah bekerja keras selama penelitian;
7. Sahabat-sahabat kampung halaman Catleyya, Shafira Eston, Ananda Alisya, Thalita Meidina, Muthia Khonsa, Rezi Berliana, Vhalin Tara, Ivan Aditama, Fiqri Yusril, Mutiara Aprilina dan Herlin Karisma yang telah kebersamai hingga saat ini;

8. Sahabat-sahabat di Jember Indi Kamilia, Hilya Itsnain, Ahmad Syaikudin, Firman Jaya, Fatimatuzzahra, Ardhita Meily, Firman Herdiana, Toyibatul Hidayati, Sofiannisa, Nizar Fiska, Ian Putra, Cagar Irwin, dan Laras Prasasti yang selalu mendukung dan menyemangati penulis;
9. Teman-teman Fakultas Kedokteran UNEJ angkatan 2015 dan BEM Fakultas Kedokteran UNEJ terima kasih atas persaudaraan dan kebersamaan;
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Jember, 14 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Umbi Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.))	5
2.1.1 Taksonomi.....	5
2.1.2 Kegunaan Umbi Bidara Upas	5
2.2 Diabetes Melitus (DM)	7
2.2.1 Definisi Diabetes Melitus (DM)	7
2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus (DM).....	7
2.2.3 Diagnosis Diabetes Melitus (DM)	7
2.3 Model Tikus Diabetes Melitus I	8
2.3.1 Induksi STZ.....	9
2.3.1 Induksi Aloksan	10
2.4 Luka Diabetik	10
2.4.1 Definisi Luka Diabetik.....	10
2.4.2 Patofisiologi Luka Diabetik	10
2.4.3 Klasifikasi Luka Diabetik	11
2.4.4 Penatalaksanaan Luka Diabetik	12
2.5 Proses Penyembuhan Luka	13
2.5.1 Proses Fisiologis Penyembuhan Luka.....	13
2.5.2 Proses Penyembuhan Luka pada Diabetes Melitus (DM)	15
2.6 Kepadatan Kolagen	15
2.6.1 Definisi Kepadatan Kolagen	15
2.6.2 Sintesis Kolagen.....	15
2.6.3 Peran Kolagen dalam Penyembuhan Luka	16
2.6.4 Pengukuran Kepadatan Kolagen	16
2.7 Tinjauan Umum Metode Pembuatan Ekstrak	18

2.7.1	Metode Ekstraksi Konvensional	18
2.7.2	Metode Ekstraksi Non-Konvensional	19
2.8	Tinjauan Umum Metode Pembuatan Fraksi	20
2.8.1	Pemisahan Kasar	20
2.8.2	Pemisahan Halus	21
2.9	Tinjauan Umum Metode Pembuatan Gel	23
2.9.1	Definisi Gel	23
2.9.2	Karakteristik Gel	24
2.9.3	Klasifikasi Gel	25
2.9.4	Persiapan dan Pengemasan Gel	26
2.9.5	Manfaat Penggunaan Gel	27
2.9.6	Definisi <i>Vehicles</i>	27
2.9.7	Peran <i>Vehicles</i> dalam Gel	27
2.10	Kerangka Konsep	30
2.11	Hipotesis	31
BAB 3	METODE PENELITIAN	32
3.1	Jenis Penelitian	32
3.2	Rancangan Penelitian	32
3.3	Populasi dan Sampel	33
3.3.1	Populasi	33
3.3.2	Sampel	33
3.3.3	Besar Sampel Penelitian	33
3.4	Tempat dan Waktu Penelitian	34
3.5	Variabel	35
3.5.1	Variabel Bebas	35
3.5.2	Variabel Terikat	35
3.5.3	Variabel Terkendali	35
3.6	Definisi Operasional	36
3.7	Alat dan Bahan	36
3.7.1	Alat Penelitian	36
3.7.2	Bahan Pengamatan	37
3.8	Prosedur Penelitian	38
3.8.1	Uji Kelayakan Etik	38
3.8.2	Pemilihan Hewan Coba	38
3.8.3	Adaptasi Hewan Coba	38
3.8.4	Pembagian Kelompok Perlakuan	38
3.8.5	Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas	39
3.8.6	Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas	39
3.8.7	Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas	40
3.8.8	Penginduksian Streptozotocin (STZ)	41
3.8.9	Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah	41
3.8.10	Eksisi Luka Jaringan Kulit	41
3.8.11	Pengolesan Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas ..	42
3.8.12	Pengambilan Jaringan Kulit	42
3.8.13	Pembuatan Preparat HistoPA	42
3.8.15	Pengamatan Kepadatan Kolagen	43

3.9 Analisis Data	44
3.10 Alur Penelitian	45
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	49
4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	49
4.1.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Umbi Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.)).....	49
4.1.2 Hasil Pembuatan Gel.....	50
4.1.3 Hasil Pengukuran Glukosa Darah Acak (GDA)	50
4.1.4 Hasil Pengamatan Kepadatan Kolagen	52
4.1.5 Analisis Data Statistik	53
4.2 Pembahasan	55
4.2.1 Perbandingan Kepadatan Kolagen antara Kelompok <i>Vehicles</i> Gel Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas dengan Kelompok Akuades.....	56
4.2.2 Perbandingan Kepadatan Kolagen antara Kelompok <i>Vehicles</i> dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas dengan Kelompok Gel Bioplacenton®.....	56
4.2.3 Perbandingan Kepadatan Kolagen antara <i>vehicle</i> HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam Gel Fraksi Air Ekstrak Umbi Bidara Upas.....	58
4.2.4 Keterbatasan Penelitian.....	60
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	61
5.1 Kesimpulan.....	61
5.2 Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR TABEL

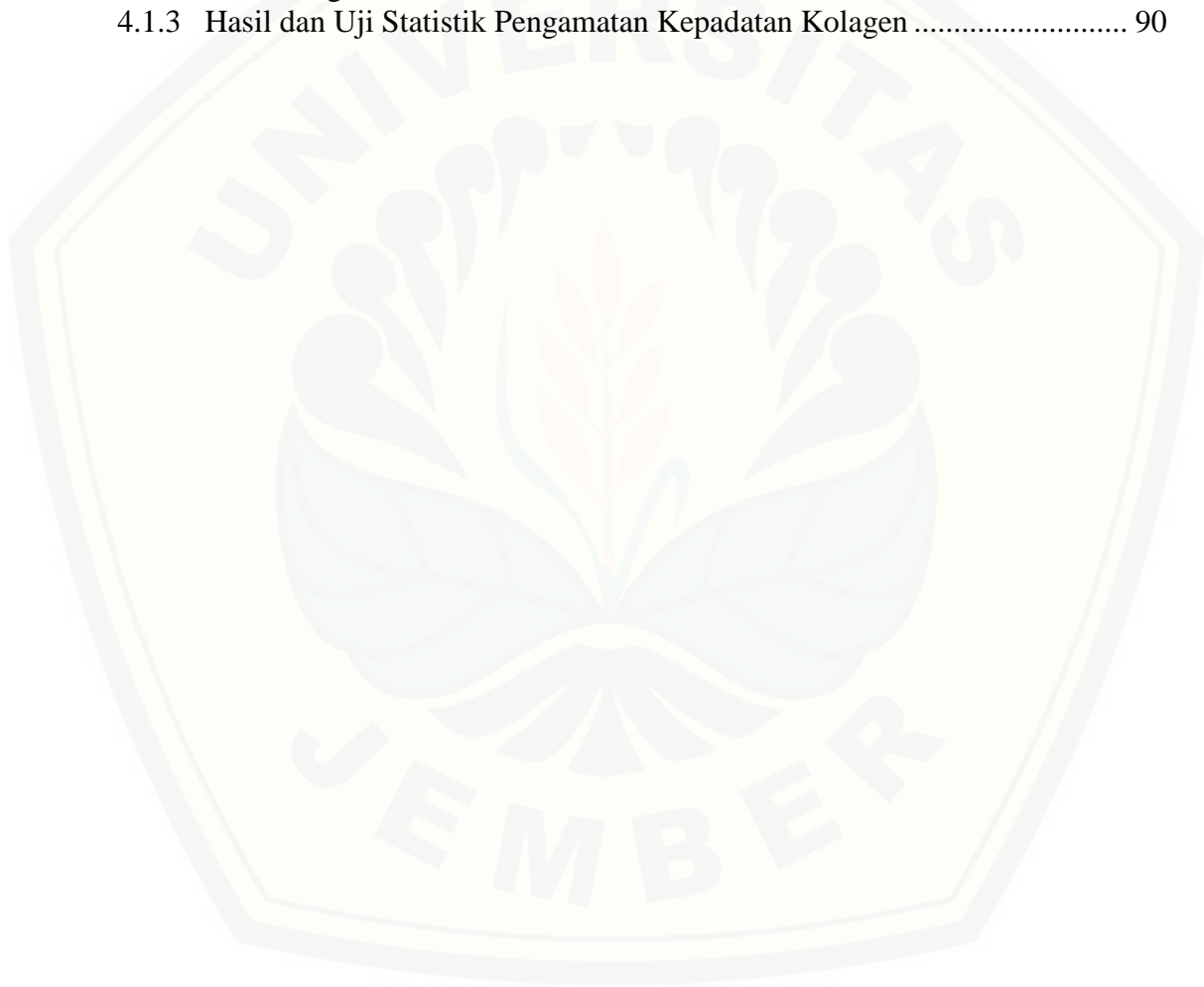
	Halaman
2.1 Klasifikasi Wagner-Meggitt.....	10
2.2 Klasifikasi <i>University of Texas</i>	11
2.3 Klasifikasi PEDIS	12
3.1 Definisi Operasional Variabel Bebas dan Terikat.....	38
3.2 Pembagian Kelompok Perlakuan	41
3.3 Formula Pembuatan Gel.....	42
4.1 Hasil Pengukuran GDA.....	52
4.2 Uji Normalitas dan Homogenitas GDA Hari ke-13	52
4.3 Uji Normalitas dan Homogenitas GDA Hari ke-25	52
4.4 Hasil Pengamatan Kepadatan Kolagen	53
4.5 Hasil Uji Normalitas Shapiro Wilk dan Uji Homogenitas Lavene's test Kepadatan Kolagen	54
4.6 Hasil Uji Post Hoc LSD Kepadatan Kolagen	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Umbi Bidara Upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.))	5
2.2 Fase Penyembuhan Luka.....	13
2.3 Kepadatan Kolagen pada Luka dengan Pewarnaan Masson's Trichome	18
2.4 Corong Pisah pada Proses Partisi Cair-Cair.....	22
2.5 Kerangka Teori.....	31
2.6 Kerangka Konsep	32
3.1 Skema Rancangan Penelitian	34
2.2 Proses Ekstraksi Umbi Bidara Upas	47
3.3 Skema Proses Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas.....	48
3.4 Skema Pembuatan Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas	48
3.5 Pembagian Kelompok Perlakuan	49
3.6 Skema Proses Penyembuhan Luka Diabetik.....	50
4.1 Grafik Hasil Pengamatan Kepadatan Kolagen.....	53
4.2 Hasil Pengamatan Histopa Kepadatan Kolagen.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.8 Dokumentasi Prosedur Penelitian	68
3.8.1 Surat Keterangan Persetujuan Etik.....	72
3.8.6 Protap Ekstraksi dan Fraksinasi	74
3.8.13 Protap Pewarnaan Preparat Menggunakan <i>Masson's Trichrome</i>	77
3.8.15 Cara Analisis Kepadatan Kolagen Menggunakan <i>ImageJ</i>	79
4.1.3 Hasil Pengukuran Gula Darah Acak	83
4.1.3 Hasil dan Uji Statistik Pengamatan Kepadatan Kolagen	90



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) ialah sebuah kondisi yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah (hiperglikemia) dan dapat berujung pada resiko kerusakan mikrovaskular (retinopati, nefropati, dan neuropati). DM dapat terjadi karena gangguan metabolik menahun akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Insulin adalah hormon yang mengatur keseimbangan gula darah, jika proses produksi maupun efektivitas tubuh dalam penggunaan insulin menurun maka akan terjadi hiperglikemia. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Litbangkes) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2018 menyebutkan bahwa prevalensi DM pada penduduk diatas usia 15 tahun sebesar 10%. Jumlah penderita DM di Jawa Timur menduduki peringkat terbanyak ke-5 dari 34 provinsi (WHO, 2006; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Komplikasi DM terbanyak di Indonesia yaitu neuropati (13%-78%), vaskulopati (16%-53%), dan luka diabetik (7.3%-24%). Luka diabetik adalah gabungan kondisi yang rumit dari neuropati, vaskulopati, dan rentan infeksi yang jika tidak disertai penanganan tepat dapat merujuk pada amputasi sehingga morbiditas meningkat dan kualitas hidup pasien akan menurun. Neuropati dapat menyebabkan luka diabetik karena menurunkan sensitivitas sentuhan dan tekanan di daerah tertentu sehingga pasien DM akan mengalami penurunan kewaspadaan terhadap benda yang dapat memicu terjadinya luka. Peningkatan kadar gula darah, disisi lain, juga menghambat kerja leukosit sehingga luka dengan mudah menjadi ulkus dan meluas. Estimasi insidensi seumur hidup pasien luka diabetik mencapai hampir 25% (Yotsu dkk., 2014; Yusuf dkk., 2016; Prameswari, 2017).

Manajemen luka diabetik dibagi menjadi beberapa tahapan, yaitu 1.) mengatasi penyakit komorbid; 2.) debridemen; 3.) menurunkan beban tekanan pada derah luka; 4.) penanganan infeksi; 5.) menjaga kelembapan luka. Pilihan obat seperti formulasi ekstrak plasenta dalam bentuk gel dapat mempercepat

penyembuhan luka dengan meningkatkan faktor pertumbuhan endotel vaskular dan sintesis kolagen. Sediaan gel memiliki efek bagus dalam menjaga kelembapan luka (Shukla dkk., 2004; Marchianti dkk., 2018).

Indonesia memiliki 40.000 tumbuhan endemik (khas daerah) dan 7000 diantaranya tercatat sebagai tumbuhan obat. Namun, hanya ada kurang lebih 200 tumbuhan obat yang pernah diteliti. Taman Nasional Meru Betiri yang terletak di Jember, Jawa Timur dihuni 26 tumbuhan obat yang telah teridentifikasi, salah satunya bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) yang digunakan sebagai terapi antidiabetik. Penelitian oleh Ratnadewi dkk., (2018) membandingkan kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan enam spesies tumbuhan obat antidiabetik yaitu *Antidesma bunius*, *Antidesma montanum*, *Arcangelista flava*, *Lagerstroemia speciosa*, *Lunasia amasa* Blanco, dan *Merremia mammosa* (Lour.). hasilnya, bidara upas *Merremia mammosa* (Lour.) memiliki jumlah total flavonoid dan aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan spesies lainnya. Bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) mengandung flavonoid (antiinflamasi dan antioksidan) dan senyawa resin glikosida seperti merremosida A, E, J, *mammosa* yang spesifik terkandung dalam akar dan umbinya, yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan cara membuat lubang pada membran. Kandungan tersebut juga dapat memicu makrofag untuk menghasilkan *growth factor*, menetralkan radikal bebas, mempercepat fase inflamasi, memicu proliferasi sel, dan meningkatkan sintesis kolagen yang berperan dalam penutupan luka (Hidayat dkk., 2015; Prameswari, 2017; Ratnadewi dkk., 2018).

Pemanfaatan umbi bidara upas sebagai alternatif obat penyembuhan luka diabetik pernah diteliti oleh Julianto (2015) dan Sofiana dkk. (2015) dengan hasil didapatkan pengaruh positif ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) 200 mg terhadap presentase penyembuhan luka diabetik. Namun pada kedua penelitian tersebut kandungan ekstrak umbi bidara upas masih bercampur dengan komponen tidak aktif sehingga perlu isolasi senyawa menggunakan metode fraksinasi. Penelitian Prameswari (2017) yang menggunakan metode fraksinasi dari ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dengan tiga jenis pelarut yang berbeda berdasarkan polaritas yaitu air, etil asetat,

dan n-heksana dengan melihat pengaruh secara mikroskopis yaitu kepadatan kolagen yang terbentuk memberikan hasil bahwa fraksi air memiliki pengaruh paling besar terhadap penyembuhan luka diabetik.

Peneliti ingin melanjutkan penelitian tersebut dengan menggunakan metode pembuatan sediaan gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dengan tiga jenis pembawa/*vehicle* yang berbeda yaitu HPMC, NACMC, dan Carbopol dan melihat pengaruh mikroskopis berdasarkan kepadatan kolagen yang terbentuk. Pembuatan sediaan gel diperlukan karena dapat menjaga kelembapan jaringan sehingga dapat mempercepat terjadinya reepitalisasi jaringan melalui stimulasi proliferasi dan migrasi sel epitel serta peningkatan aktivitas *growth factor*. Bahan pembawa/*vehicle* sangat penting dalam sediaan gel karena akan memberi pengaruh yang signifikan terhadap absorpsi obat, sehingga pemilihannya harus tepat yakni mudah diaplikasikan pada kulit, tidak mengiritasi serta dapat melepaskan bahan aktif ke sisi aksi dengan cepat. Pemeriksaan kepadatan kolagen dipilih karena peranan kolagen sangat penting pada proses penyembuhan luka yaitu dalam proses hemostasis, interaksi dengan trombosit dan fibronektin, peningkatan komponen seluler, peningkatan faktor pertumbuhan dan peningkatan proses fibroplasia serta proliferasi epidermis. Pembentukan serabut kolagen oleh sel fibroblas akan menutup luka seiring dengan peningkatan kepadatannya. Kepadatan kolagen akan dilihat menggunakan pewarnaan *Masson's trichrome* yang merupakan pewarnaan spesifik serabut kolagen dan diteliti dengan pengamatan preparat histopatologi kulit menggunakan mikroskop (Amin dan Doupis, 2016; Prameswari, 2017)

Berdasarkan uraian tersebut peneliti ingin mengetahui pengaruh bahan pembawa/*vehicles* dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* Lour) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka rumusan masalah yang diajukan adalah bagaimana pengaruh perbedaan bahan pembawa/*vehicles* HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas

(*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh perbedaan bahan pembawa/*vehicles* HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat teoritis penelitian ini sebagai berikut.

- a. Sebagai informasi ilmiah mengenai penggunaan bahan pembawa/*vehicles* dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) secara topikal dalam penyembuhan luka diabetik.
- b. Dapat dijadikan sebagai salah satu dasar pengembangan penelitian umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) sebagai terapi penyembuhan luka diabetik.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

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

2.1.1 Taksonomi

Menurut Plantamor (2018), taksonomi umbi bidara upas sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Solanales
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: <i>Merremia</i>
Spesies	: <i>Merremia mammosa</i> (Lour.)

Gambar umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 2.1 di bawah ini.



Gambar 2.1 Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.))
(Sumber: CCRC, 2014)

2.1.2 Kegunaan Umbi Bidara Upas

Bidara upas merupakan tanaman yang dapat ditemui di Taman Nasional Meru Betiri dan termasuk tanaman obat asal Indonesia. Umbi bidara upas memiliki beberapa kegunaan yaitu sebagai anti radang, analgesik, antitoksik

gigitan ular, pengobatan kusta, difteri, typhoid, dan diabetes melitus (DM). Kandungan umbi bidara upas berupa flavonoid dan senyawa glikosida resin seperti merremosida A, E, J *mammosa* memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Hidayat dkk., 2015).

a. Flavonoid

Flavonoid memiliki sifat lipofilik dan dapat menghancurkan membran bakteri. Flavonoid juga menghambat replikasi dan translasi bakteri melalui hambatan fungsi DNA *gyrase*. Selain itu, flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit yang dapat mengaktivasi sel CD⁺ untuk mempengaruhi SMAF (molekul IFN) sehingga makrofag teraktivasi dan terjadi proses fagositosis. Dengan aktivitas tersebut flavonoid dapat merangsang sel seperti makrofag untuk melakukan aktivasi *growth factor* seperti EGF, TGF- , IL-1, IL-4, IL-8 sehingga mempercepat memasuki fase proliferasi dan penyembuhan luka. Selain itu, efek antioksidan mempercepat fase inflamasi dengan menangkap radikal bebas dan mencegah reaksi oksidasi dengan meningkatkan aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD) dan glutation transferase. Flavonoid juga memiliki efek antidiabetik dengan menghambat enzim glukosidase dan alfa amilase yang berfungsi memecah karbohidrat menjadi monosakarida. Penghambatan tersebut menyebabkan kadar glukosa menurun dalam darah disebabkan oleh gagalnya pemecahan karbohidrat menjadi monosakarida (Hidayat dkk., 2015; Julianto, 2015).

b. Glikosida resin

Glikosida resin atau sering juga disebut glikoresin merupakan senyawa metabolit sekunder yang hanya dimiliki golongan tumbuhan famili Convolvulaceae. Glikosida resin tidak terkandung dalam semua organ, melainkan hanya pada biji dan akar tumbuhan famili Convolvulaceae saja. Glikosida resin memiliki beberapa aktivitas biologi seperti antibakteri, antituberkulosa, antitumor, antidepresan, dan anti konvulsan (Tasdemir dkk., 2008).

2.2 Diabetes Melitus (DM)

2.2.1 Definisi Diabetes Melitus (DM)

Diabetes Melitus merupakan penyakit endokrin yang ditandai dengan peningkatan glukosa darah atau hiperglikemia yang berujung pada kerusakan mikrovaskular (retinopati, nefropati, dan neuropati) (WHO, 2006). Sedangkan menurut Infodatin Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2014), Diabetes Melitus adalah penyakit gangguan metabolik kronis akibat kekurangan insulin atau resistensi insulin sehingga terjadi peningkatan konsentrasi glukosa darah atau hiperglikemia.

2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus (DM)

DM umumnya dibagi menjadi 2, DM tipe 1 dan DM tipe 2. DM tipe 1 merupakan penyakit autoimun yang disebabkan destruksi sel beta pankreas penghasil insulin. Karenanya, pasien DM tipe 1 hanya memproduksi sedikit insulin dan membutuhkan substitusi insulin untuk mengendalikan konsentrasi gula darah. DM tipe 2 disebabkan oleh resistansi insulin dan kompensasi yang buruk oleh sel beta pankreas sehingga menyebabkan defisiensi insulin. DM tipe 2 berhubungan dengan pola hidup dan jumlah kasusnya cukup tinggi pada kasus obesitas (Setiati dkk., 2014).

2.2.3 Diagnosis Diabetes Melitus (DM)

Menurut Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (2011) diagnosis DM ditegakkan atas dasar pemeriksaan kadar glukosa darah. Pemeriksaan yang dianjurkan antara lain pemeriksaan glukosa secara enzimatik dengan bahan darah plasma vena. Penggunaan bahan darah utuh (*whole blood*), vena, ataupun kapiler tetap dapat digunakan dengan memperhatikan angka-angka kriteria diagnostik sesuai pembakuan oleh WHO. Diagnosis dapat ditegakkan melalui tiga cara sebagai berikut.

- a. gejala klasik DM + glukosa plasma sewaktu >200 mg/dl (11,1 mmol/L)
- b. gejala klasik DM + glukosa plasma puasa >126 mg/dl (7,0 mmol/L)
- c. glukosa plasma 2 jam pada TTGO >200 mg/dl (11,1 mmol/L)

Gejala klasik tersebut antara lain poliuria, polidipsia, polifagia, dan berat badan menurun tanpa alasan jelas. Sementara gejala tidak khasnya antara lain kesemutan, lemas, luka sulit sembuh, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi (pria) dan pruritus vagina (wanita).

Glukosa plasma sewaktu adalah hasil pemeriksaan glukosa darah tanpa memperhatikan waktu makan terakhir, glukosa plasma puasa adalah hasil pemeriksaan glukosa darah setelah dipuasakan minimal 8 jam, sedangkan TTGO adalah toleransi glukosa oral dimana pemeriksaan dilakukan setelah dipuasakan 8 jam, diberi glukosa oral, dipuasakan kembali 2 jam lalu diperiksa kadar glukosa darahnya (Setiati dkk., 2014).

2.3 Model Tikus Diabetes Melitus I

Diabetes Melitus (DM) tipe 1 merupakan penyakit endokrin yang kompleks dimana banyak sistem organ yang terlibat. Oleh karena itu, dibuat model tikus DM tipe 1 untuk memudahkan pengamatan aspek penyakit yang akan diteliti (King, 2012). Penggunaan tikus sebagai model DM tipe 1 karena keunggulan tikus dibandingkan spesies lain seperti ukuran tikus yang mudah dilakukan induksi dan rentang periode induksi yang pendek pada tikus. Model tikus DM dapat dikatakan mengalami hiperglikemia jika level gula darah pada keadaan tidak puasa sebesar >200 mg/dl dan >150 mg/dl pada keadaan puasa (Furman, 2015).

DM tipe 1 memiliki karakteristik utama dimana terjadi destruksi autoimun dari sel beta pankreas, yang memungkinkan terjadinya penurunan produksi insulin. Sebagai akibatnya, terjadi hiperglikemia, polidipsia dan poliuria. Pada model tikus DM tipe 1, penurunan produksi insulin didapatkan melalui beberapa mekanisme seperti ablasi sel beta pankreas secara kimia sampai dengan melakukan rekayasa genetika untuk menghasilkan tikus yang terlahir dengan DM autoimun. Induksi model tikus DM tipe 1 secara kimia dapat dilakukan dengan dua senyawa yaitu *streptozotocin* (STZ) dan aloksan. Induksi dilakukan 5-7 hari

sebelum penelitian dilakukan untuk memastikan tikus mengalami hiperglikemia stabil (King, 2012).

2.3.1 Induksi STZ

STZ disintesis dari *Streptomyces achromogenes*. Administrasi STZ dapat dilakukan secara intravena maupun intraperitoneal. STZ yang telah diadministrasi akan masuk sel beta pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT-2) dan menyebabkan alkilasi DNA. Aktivasi berkelanjutan dari *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) menyebabkan deplesi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺), penurunan *adenosine triphosphate* (ATP) selular, dan inhibisi produksi insulin secara kontinyu. Selain itu, STZ juga merupakan sumber radikal bebas yang dapat merusak DNA dan berakibat kematian sel. STZ dapat diadministrasi secara dosis tinggi tunggal (*single high dose*) maupun dosis rendah berulang (*multiple low dose*) (King, 2012).

Administasi STZ secara dosis tinggi tunggal merupakan prosedur yang paling sering dilakukan, dimana dosis STZ yang dibutuhkan yaitu 40-70 mg/kgBB dan diinjeksikan kepada tikus berumur 8 sampai 10 minggu dalam satu waktu (Furman, 2015). Sedangkan pada administrasi STZ secara dosis rendah berulang, dosis yang digunakan yaitu 20-40 mg/kgBB dan diinjeksikan sekali sehari dalam 5 hari (King, 2012).

STZ tergolong sebagai larutan yang tidak seimbang, sehingga harus dilakukan penyimpanan pada suhu 20 derajat Celcius untuk menghindari penguapan. Pencampuran dengan buffer sitrat harus dilakukan tepat sebelum injeksi untuk menghindari dekomposisi STZ dalam buffer sitrat. Pemilihan jenis kelamin tikus juga berpengaruh dalam induksi STZ, karena sel beta pankreas tikus jantan lebih sensitif terhadap sitotoksitas STZ dibandingkan tikus betina. Hal tersebut dikarenakan hormon estrogen pada tikus betina dapat menurunkan sensitivitas terhadap STZ. Hipoglikemia sering terjadi 48 jam setelah injeksi STZ, sehingga perlu dilakukan pemberian sukrosa 10% untuk menghindari *sudden death hypoglycemic* (Furman, 2015).

2.3.1 Induksi Aloksan

Aloksan dapat menyebabkan efek diabetes pada tikus dengan pembentukan radikal bebas, dimana sel beta pankreas memiliki mekanisme pertahanan lemah dalam menangkal radikal bebas tersebut dan akan terfragmentasi. Dosis yang digunakan pada induksi aloksan terhadap tikus yaitu 40-200 mg/kgBB secara intravena namun juga dapat dilakukan secara intraperitoneal maupun subkutan dengan dosis tiga kali dosis intravena. Namun perlu diperhatikan bahwa aloksan memiliki rentang dosis diabetogenik yang sempit, sehingga sedikit saja terjadi kelebihan dosis dapat menyebabkan toksisitas yang meluas, terutama pada ginjal (King, 2012).

2.4 Luka Diabetik

2.4.1 Definisi Luka Diabetik

Luka diabetik adalah salah satu komplikasi diabetes melitus (DM) yang disebabkan beragam penyebab namun yang paling banyak ialah neuropati dan vaskulopati (Amin dan Doupis, 2016). Mekanisme penyembuhan luka yang lama pada luka diabetik menyebabkan resiko amputasi yang tinggi, dan berpengaruh terhadap kualitas hidup pasien serta meningkatnya morbiditas (Yotsu dkk., 2014).

2.4.2 Patofisiologi Luka Diabetik

Luka diabetik disebabkan oleh neuropati dan vaskulopati serta kegagalan resistensi terhadap infeksi mikroba. Luka diabetik dapat dipicu oleh trauma. Namun, adanya neuropati menyebabkan hilangnya sensasi pada saraf dan menyebabkan trauma tidak terasa sehingga hilangnya rasa awas diri yang berakibat lebih mudah terkena trauma lagi. 66% neuropati pada DM terjadi di ekstremitas bawah. Neuropati dapat disebabkan oleh hiperglikemia, abnormalitas metabolisme asam lemak, dan aktivasi jalur C-kinase. Protein C-kinase (PKC) merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam fungsi selular dan transduksi sinyal. PKC dapat teraktivasi karena hiperglikemia yang menyebabkan reduksi aktivitas $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ sehingga menurunkan konduksi dan regenerasi

saraf. Adanya vaskulopati menyebabkan iskemia jaringan, sehingga penyembuhan luka melambat dan prognosis memburuk (Noor dkk., 2015).

2.4.3 Klasifikasi Luka Diabetik

Klasifikasi luka diabetik didasarkan pada karakteristik lukanya seperti kedalaman, ukuran, lokasi dan penampakan. Pengklasifikasian luka diabetik digunakan untuk memetakan progres dalam tatalaksana (Noor dkk., 2015).

a. Klasifikasi Wagner-Meggitt

Klasifikasi Wagner-Meggitt dapat dilihat pada Tabel 2.1 berikut.

Tabel 2.1 Klasifikasi Wagner-Meggitt

Derajat	Luka diabetik
0	Luka tertutup atau selulitis
1	Luka superfisial
2	Luka dalam sampai tendon dan jaringan persendian
3	Luka dalam dengan abses, osteomyelitis, dan radang persendian
4	Gangren lokal
5	Gangren luas

Sumber: Noor dkk., 2015

b. Klasifikasi *University of Texas*

Klasifikasi ini merupakan modifikasi dari klasifikasi Wagner. Klasifikasi *University of Texas* dapat dilihat dalam tabel berikut.

Tabel 2.2 Klasifikasi *University of Texas*

Stage	Grades			
	0	1	2	3
A	Pre atau post luka diabetik yang telah sembuh	Luka superfisial tanpa melibatkan tulang	Luka terbuka hingga tendon atau kapsul sendi	Luka terbuka hingga tulang atau sendi
B	Luka dengan infeksi	Luka dengan infeksi	Luka dengan infeksi	Luka dengan infeksi
C	Luka dengan iskemia	Luka dengan iskemia	Luka dengan iskemia	Luka dengan iskemia
D	Luka dengan infeksi dan iskemia	Luka dengan infeksi dan iskemia	Luka dengan infeksi dan iskemia	Luka dengan infeksi dan iskemia

Sumber: Noor dkk., 2015

c. Klasifikasi PEDIS

Klasifikasi ini diajukan oleh *International Working Group on the Diabetic Foot*. Klasifikasi PEDIS dapat dilihat dalam Tabel 2.3 berikut.

Tabel 2.3 Klasifikasi PEDIS

Penurunan Perfusi	1= tidak ada 1= vaskulopati ringan 2= iskemik
Ukuran/Kedalaman	1= <i>full-thickness</i> superfisial, mencapai dermis 2= ulser dalam, melebihi dermis, struktur subkutan, fasia, otot dan tendon 3= seluruh lapisan hingga otot dan atau sendi
Infeksi	1= tidak ada infeksi 2= infeksi pada kulit dan jaringan subkutan 3= eritema >2cm atau infeksi yang melibatkan struktur subkutan tanpa respon imun sistemik 4= infeksi dengan manifestasi sistemik: demam, leukositosis, hipotensi
Penurunan Sensasi	1= tidak ada 2= ada

Sumber: Waspadji, 2015

2.4.4 Penatalaksanaan Luka Diabetik

Tatalaksana luka diabetik dapat dilakukan dengan debridemen dan pemberian antibiotik. Debridemen merupakan langkah pertama pada tatalaksana luka diabetik karena menghilangkan jaringan nekrotik. Namun harus berhati-hati pada keadaan iskemia, sehingga lebih baik dilakukan revaskularisasi sebelum dilakukan debridemen. Beberapa jenis debridemen dapat dilakukan bergantung pada derajat luka diabetik, contohnya debridemen *surgical*, debridemen enzimatis, dan debridemen mekanik (Amin dan Doupis, 2016).

Infeksi kerap terjadi pada luka diabetik sehingga perlu ditangani agar bakteri tidak menghambat proses penyembuhan luka. Antibiotik dapat diberikan secara tunggal ataupun dikombinasikan dengan *dressing*, kecuali pada luka diabetik nekrotik. Antibiotik yang efektif antara lain gentamisin, neomisin dan mupirosin. *Dressing* digunakan untuk meminimalisir iritasi dan rasa tidak nyaman serta meningkatkan kelembapan kulit (Amin dan Doupis, 2016).

2.5 Proses Penyembuhan Luka

2.5.1 Proses Fisiologis Penyembuhan Luka

Luka adalah keadaan dimana struktur anatomi dan fungsi jaringan mengalami kerusakan atau disrupsi (Velnar dkk., 2009). Proses penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks dan terdiri dari beberapa fase yaitu koagulasi dan hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodeling* (Barrientos dkk., 2008). Keempat fase tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.2 di bawah ini.



Gambar 2.2 Fase Penyembuhan Luka (Wound Care Community, 2015)

a. Fase Koagulasi dan Hemostasis

Bersamaan dengan terjadinya proses hemostatis, kaskade koagulasi teraktivasi melalui jalur ekstrinsik maupun intrinsik yang menyebabkan agregasi platelet dan formasi *blood clot*. Terjadinya kontak antara darah pada daerah luka dan platelet dengan kolagen dan matriks ekstraselular menyebabkan pelepasan faktor pembekuan darah dan formasi *blood clot* dari platelet yang terdiri dari fibronectin, fibrin, vitronektin, dan trombospondin. Koagulasi dan hemostatis terjadi tepat setelah adanya trauma. Mekanisme yang terjadi mempunyai tujuan jangka pendek yaitu mencegah perdarahan masif dan tujuan jangka panjang yaitu mempersiapkan matriks untuk fase penyembuhan selanjutnya (Velnar dkk., 2009).

b. Fase Inflamasi

Fase inflamasi dibagi menjadi dua tahap, *early inflammation* dan *late inflammation*. *Early inflammation* dimulai pada akhir fase koagulasi dan beberapa saat setelah fase tersebut berakhir. *Early inflammation* mengaktivasi kaskade komplemen yang mencetuskan infiltrasi neutrofil pada daerah luka. Fungsi neutrofil untuk mencegah infeksi dengan melakukan fagositosis bakteri, partikel asing dan jaringan rusak melalui pelepasan enzim proteolitik. Neutrofil akan berangsur-angsur berubah dalam beberapa hari setelah faktor kontaminan tereradikasi. Neutrofil kemudian akan dieliminasi dengan ekstruksi ke permukaan luka sebagai *slough* dan terapoptosis. *Late inflammation* terjadi 48-72 jam setelah trauma terjadi, ditandai dengan munculnya makrofag pada daerah luka yang melakukan fagositosis. Yang mencetuskan pelepasan makrofag antara lain faktor pembekuan darah, komponen komplemen, sitokin seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF- β), leukotriene B₄, dan faktor IV. Makrofag memiliki usia yang lebih panjang dibandingkan neutrofil dan bekerja dalam pH yang rendah. Peran penting makrofag dalam fase ini ialah berperan sebagai sel regulator yang memicu faktor pertumbuhan jaringan dan mediator lain seperti *fibroblast growth factor* (FGF) dan kolagen. Limfosit muncul 72 jam setelah terjadi trauma yang ditandai dengan aksi IL-1 yang berperan dalam regulasi kolagenase yang dibutuhkan untuk fase berikutnya (Velnar dkk., 2009)

c. Fase Proliferasi

Fase proliferasi dimulai pada hari ketiga setelah trauma dan bertahan sekitar 2 minggu. Secara mikroskopis, fase ini ditandai dengan migrasi fibroblas, desposisi matriks ekstraselular baru dan adanya pembentukan jaringan granul. Fibroblas sudah diproduksi oleh jaringan sekitar luka pada 3 hari pertama pascatrauma, kemudian bermigrasi ke daerah luka karena dipicu oleh TGF- β dan PDGF yang dihasilkan sel-sel inflamatori dan platelet. Setelah berada di daerah luka, fibroblas akan memproduksi matriks protein hialuronan, fibronektin, proteoglikan dan prokolagen tipe 1 dan 3. Kolagen merupakan komponen penting dalam proses penyembuhan luka karena memperbaiki integritas dan kekuatan

jaringan yang rusak. Proses yang terjadi selanjutnya ialah pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis (Velnar dkk., 2009).

d. Fase *Remodelling*

Fase terakhir dari penyembuhan luka ialah fase *remodeling*. Fase ini berperan dalam pertumbuhan jaringan epitel baru dan pembentukan jaringan parut. Bersamaan dengan pematangan matriks intraseluler, berkas kolagen juga bertambah diameternya serta asam hialuronik dan fibronektin terdegradasi. Proses ini dapat terjadi sampai setahun atau lebih, tergantung pada keparahan luka. Setelah luka sembuh, fibroblas dan makrofag akan jauh berkurang dan angiogenesis juga berhenti (Velnar dkk., 2009).

2.5.2 Proses Penyembuhan Luka pada Diabetes Melitus (DM)

Penderita DM mengalami penyembuhan luka yang lebih lama dibandingkan dengan keadaan normal, baik itu luka akut maupun luka kronis yang berujung pada *diabetic foot ulcer* (DFU). Beberapa mekanisme patofisiologi yang mendasari hal tersebut antara lain hipoksia jaringan, disfungsi sel epidermal dan fibroblas, angiogenesis yang tidak sempurna, peningkatan ROS atau radikal bebas, penurunan resistensi imun, dan neuropati (Guo dan Dipietro, 2010).

2.6 Kepadatan Kolagen

2.6.1 Definisi Kepadatan Kolagen

Kolagen adalah komponen terbesar yang membangun jaringan ikat dan merupakan sekitar 25% dari total protein seluruh tubuh (Murray dkk., 2009). Kolagen terdapat pada tendon, ligamen, matriks tulang dan dentin, kulit, arteri, dan kartilago. Dalam penyembuhan luka terdapat proses yang dinamis dan kompleks, salah satunya ialah pendepositan kolagen (Fratzl, 2008; Murray dkk., 2009; Velnar dkk., 2009).

2.6.2 Sintesis Kolagen

Kolagen disintesis di ribosom oleh fibroblas dalam bentuk prekursor yaitu preprokolagen. Preprokolagen memiliki rangkaian sinyal yang mengarahkan

rantai polipeptida tersebut ke dalam lumen retikulum endoplasma, kemudian di dalam lumen retikulum endoplasma terjadi eliminasi rangkaian sinyal secara enzimatik. Sintesis kolagen dimulai dengan polipeptida subunit atau rantai alfa yang dipilin menjadi struktur *triple helical*. Glisin, asam amino berukuran kecil, dimasukkan ke dalam inti dari struktur *triple helix* dan membentuk formasi Gly-X-Y. X dan Y dapat disusun dari berbagai jenis asam amino, namun 100 posisi dari formasi X disusun oleh prolin dan 100 posisi dari formasi Y disusun oleh hidroksiprolin. Hidroksiprolin dibentuk dari hidroksilasi prolin yang dikatalisasi oleh enzim *prolyl hydroxylase* dengan bantuan kofaktor vitamin C dan -ketoglutarat. Lisin pada formasi Y juga dapat dimodifikasi menjadi hidroksilisin melalui *lysyl hydroxylase*. Serabut kolagen yang telah terbentuk akan distabilisasi dengan pembentukan *covalent cross-link* antarunit *triple helix* (Murray dkk., 2009).

2.6.3 Peran Kolagen dalam Penyembuhan Luka

Kolagen memegang peranan penting dalam penyembuhan luka yaitu mengembalikan integritas dan kekuatan jaringan. Kolagen menjadi dasar bagi pembentukan matriks intraselular dalam luka. Pada jaringan dermis sehat, komposisi kolagen tipe 1 sebanyak 80% dan tipe 3 sebanyak 25%. Sedangkan dalam kondisi terluka, granulasi jaringan menyebabkan peningkatan komposisi kolagen tipe 3 menjadi 40%. Kolagen tipe 3 terbentuk pada hari pertama hingga hari ketiga pasca trauma kemudian digantikan kolagen tipe 1 yang lebih kuat (Velnar dkk., 2009)

2.6.4 Pengukuran Kepadatan Kolagen

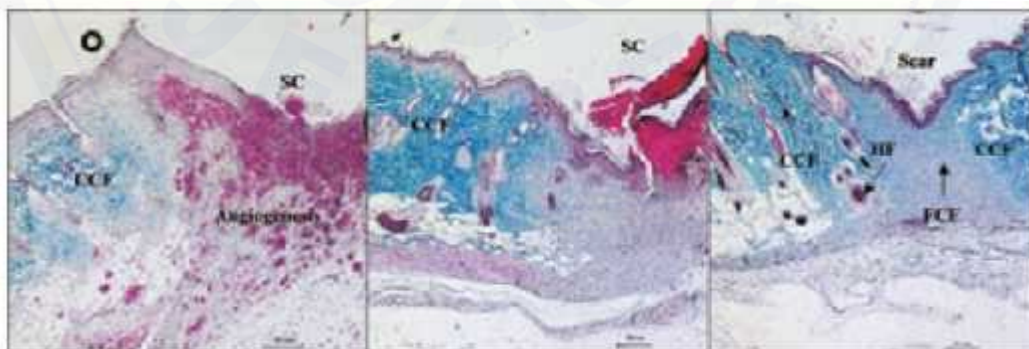
Kepadatan kolagen dapat dilihat melalui pengamatan preparat histoPA jaringan kulit yang diberi pewarnaan *Masson's trichrome* (MT). Jaringan yang diberi pewarnaan MT memperlihatkan desposisi serabut kolagen yang terpulas warna biru. Hal tersebut terjadi karena pada pewarnaan MT bagian yang bersifat asidofilik seperti sitoplasma, otot, dan kolagen mengikat pewarna yang bersifat asam. Kemudian diberikan asam *phosphomolybdic* untuk menghilangkan warna

pada kolagen namun tidak pada sitoplasma. Kolagen yang telah dihilangkan warnanya kemudian diwarnai menggunakan *methyl blue*, *aniline blue*, atau *fast green dye* (Suvik, 2012). Pengukuran kepadatan kolagen dapat dilakukan secara kuantitatif dan semikuantitatif.

Pengukuran kuantitatif dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan diambil gambar menggunakan kamera *optilab*. Kepadatan kolagen kemudian diukur menggunakan perangkat lunak analisis gambar seperti *imageJ* dengan menghitung luas kolagen berdasarkan kontras warna (Chen dkk., 2012; Pricilla dkk., 2017).

Pengukuran semikuantitatif berdasarkan *scoring* histoPA untuk kepadatan kolagen menurut Rizka dkk. (2013) sebagai berikut.

1. 0 = tidak ditemukan serabut kolagen pada daerah luka
2. +1 = kepadatan kolagen rendah jika serabut kolagen kurang dari 10% per lapang pandang
3. +2 = kepadatan kolagen sedang jika serabut kolagen 10-50% per lapang pandang
4. +3 = kepadatan kolagen rapat jika serabut kolagen 50-90% per lapang pandang
5. +4 = kepadatan kolagen sangat rapat jika serabut kolagen 90-100% per lapang pandang



Gambar 2.3 Kepadatan kolagen pada luka dengan pewarnaan *Masson's trichome* (Suvik, 2012)

2.7 Tinjauan Umum Metode Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi adalah proses mengeluarkan zat aktif dari simplisia nabati maupun simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan sehingga menyisakan massa atau serbuk berupa sediaan pekat yang disebut ekstrak. Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan teori penyarian yaitu peristiwa pemindahan massa. Pemindahan massa yang dimaksud ialah pengeluaran zat aktif dari dalam sel menggunakan cairan penyari sehingga larutan zat aktif terperangkap dalam cairan penyari (Ningsih dkk., 2016). Beberapa target ekstraksi antara lain (Mukhriani, 2014):

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui
2. Senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural.

Senyawa bioaktif pada tumbuhan diproduksi sebagai metabolit sekunder. Produksi dari metabolit sekunder pada spesies yang berbeda disebabkan spesies tersebut membutuhkannya. Contohnya, sintesis aroma pada beberapa spesies tumbuhan untuk memikat serangga melakukan penyerbukan, sintesis senyawa toksik untuk menghentikan tumbuhan lain yang mengganggu. Sehingga arti dari senyawa bioaktif pada tumbuhan adalah metabolit sekunder yang menimbulkan efek farmakologi ataupun efek toksik pada manusia dan hewan.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode yang secara garis besar dibagi menjadi metode konvensional dan metode non-konvensional (Azmir dkk., 2013).

2.7.1 Metode Ekstraksi Konvensional

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode paling sederhana untuk melakukan ekstraksi. Prinsip yang digunakan ialah melakukan perendaman serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel kemudian masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa bioaktif. Perbedaan konsentrasi antara cairan penyari dan cairan di dalam sel membuat senyawa bioaktif terdesak keluar, peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi

antara dalam sel dan luar sel. Maserasi digunakan untuk simplisia yang memiliki senyawa bioaktif mudah larut dalam cairan penyari (Ningsih dkk., 2016).

Cairan penyari dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu cairan penyari polar, cairan penyari semi-polar, cairan penyari non-polar (Mukhriani, 2014).

- i. Cairan penyari polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
- ii. Cairan penyari semi-polar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
- iii. Cairan penyari non-polar: n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya.

Keuntungan metode maserasi ialah peralatan yang digunakan sederhana dan prosedurnya tidak terlalu rumit. Namun metode ini memakan waktu cukup lama dan penyariannya kurang sempurna (Ningsih dkk., 2016)

b. Perkolasi

Pada metode ini, serbuk simplisia dibasahi secara perlahan dalam perkolator (wadah silinder dengan kran pada bagian bawahnya). Cairan penyari ditambahkan pada bagian atas serbuk simplisia dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah yang akan menyebabkan senyawa bioaktif terlarut (Mukhriani, 2014; Ningsih dkk., 2016).

c. *Soxhlet*

Keuntungan dari metode *soxhlet* ialah proses ekstraksi yang kontinyu sehingga tidak membutuhkan banyak cairan penyari dan menghemat waktu. Prosesnya dimulai dengan meletakkan serbuk simplisia dalam sarung selulosa atau kertas saring yang ditempatkan dalam klonsong (wadah seperti kaleng dengan lubang-lubang kecil). Klonsong ini ditempatkan di atas labu distilasi yang diisi cairan penyari. Ketika cairan penyari mulai meluap dari klonsong maka akan dihisap dengan *siphon*/penghisap untuk dikembalikan ke dalam labu distilasi. Ekstrak akan terbawa dan tertinggal dalam labu distilasi, proses ini berlangsung terus-menerus hingga ekstraksi selesai (Azmir dkk., 2013; Mukhriani, 2014).

2.7.2 Metode Ekstraksi Non-Konvensional

a. *Ultrasound-assisted Solvent Extraction*

Metode ini merupakan metode maserasi yang dimodifikasi menggunakan bantuan *ultrasound* frekuensi tinggi. *Ultrasound* adalah gelombang suara diatas ambang dengar manusia yaitu sekitar 20 kHz sampai 100 kHz. Tujuan penggunaan *ultrasound* supaya sel tertekan secara mekanik sehingga membentuk rongga pada sel dan menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa bioaktif dalam cairan penyari (Mukhriani, 2014). Gelombang *ultrasound* melewati medium dengan berkompresi dan berekspansi. Proses tersebut akan menghasilkan fenomena yang disebut kavitasi yang bermakna produksi, pertumbuhan, dan pengempisan rongga. Yang memiliki efek kavitasi hanyalah material cair atau material solid yang memiliki kandungan cairan. Keuntungan metode UAE antara lain waktu ekstraksi lebih singkat, efektivitas penyampuran antara cairan penyari dan simplisia, dan meningkatkan hasil ekstraksi (Azmir dkk., 2013).

b. *Microwave-assisted Extraction* (MAE)

Microwave adalah medan elektromagnetik dengan rentang frekuensi 3000 MHz sampai 300 GHz. Pertama, dilakukan pemisahan zat terlarut dari *active site* matriks simplisia dengan peningkatan temperatur dan tekanan. Kedua, dilakukan difusi oleh cairan penyari ke dalam matriks simplisia. Selanjutnya dilakukan pengeluaran ekstrak dari matriks simplisia ke cairan penyari. Beberapa keuntungan dari MAE yaitu pemanasan yang cepat untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dari simplisia, mengurangi gradien termal, meningkatkan jumlah ekstrak. MAE digolongkan sebagai *green technology* karena mengurangi pemakaian cairan penyari organik (Azmir dkk., 2013).

2.8 Tinjauan Umum Metode Pembuatan Fraksi

Pembuatan fraksi dilakukan untuk memisahkan senyawa yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama karena proses ekstraksi hanya menghasilkan campuran berbagai senyawa (Mukhriani, 2014). Pemisahan senyawa tersebut dibagi menjadi pemisahan kasar dan pemisahan halus.

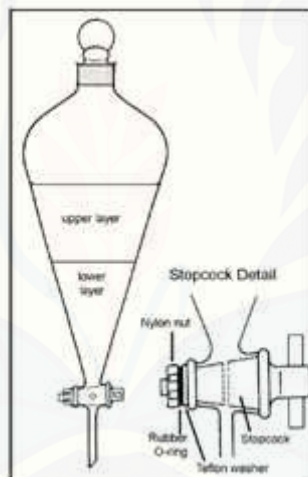
2.8.1 Pemisahan Kasar

Hasil ekstraksi yang diperoleh masih kasar dan sangat kompleks isinya, sehingga perlu dilakukan fraksinasi cair-cair atau partisi untuk memisahkan

senyawa berdasarkan kepolaran larutan yang digunakan. Ekstrak metanol atau etanol 70% umumnya dilarutkan dahulu ke dalam air hingga benar-benar larut kemudian dilakukan partisi bertingkat menggunakan larutan sebagai berikut.

- Butanol
- Etil asetat
- Kloroform/diklorometana
- Heksan

Partisi cair-cair dilakukan dengan menggunakan corong pisah dimana larutan yang digunakan adalah larutan yang memiliki perbedaan kepolaran. Larutan organik yang digunakan dalam partisi akan berada di lapisan atas air kecuali kloroform (Saifudin, 2014).



Gambar 2.4 Corong Pisah pada Proses Partisi Cair-Cair (Moldoveanu dan David, 2015)

2.8.2 Pemisahan Halus

Teknik kromatografi sering dilakukan pada pemisahan hasil ekstraksi tumbuhan. Teknik kromatografi merupakan metode fisik pemisahan berdasarkan perbedaan afinitas senyawa-senyawa terhadap dua fasa yaitu fasa stasioner/fasa diam dan fasa mobil/fasa gerak. Teknik kromatografi dibedakan menjadi beberapa jenis berdasarkan sifat fasa-fasa yang digunakan, sifat fenomena yang terjadi pada pemisahan, dan teknik pemisahan.

a. Berdasarkan sifat fasa-fasa yang digunakan:

1. Kromatografi cair-padat, dengan fasa gerak cair dan fasa diam padat

2. Kromatografi gas-padat, dengan fasa gerak gas dan fasa diam padat
 3. Kromatografi cair-cair, dengan fasa gerak cair dan fasa diam cair
 4. Kromatografi gas-cair, dengan fasa gerak gas dan fasa diam cair
- b. Berdasarkan sifat fenomena yang terjadi pada pemisahan:
1. Kromatografi adsorpsi
 2. Kromatografi partisi
 3. Kromatografi lapis penukar ion
 4. Kromatografi afinitas/filtrasi gel
- c. Berdasarkan teknik pemisahan
1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prinsip yang digunakan pada KLT ialah prinsip adsorpsi, dimana senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah akan terelusi lebih cepat dibandingkan senyawa-senyawa polar. Hal tersebut disebabkan senyawa polar terikat lebih kuat pada bahan silika yang mengandung silanol (SiOH_2) yang memiliki afinitas kuat terhadap senyawa polar (Endarini, 2016). Pada KLT pemisahan dilakukan menggunakan lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, plat aluminium, atau plat plastik yang bertindak sebagai adsorben/fasa diam (Mukhriani, 2014). Sampel ditotolkan di atas fasa diam menggunakan pipa kapiler (Endarini, 2016).

KLT digunakan untuk melihat kemurnian suatu senyawa organik, menentukan banyaknya komponen dalam campuran, mencari pelarut yang sesuai untuk kromatografi kolom, dan analisis fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom (Mukhriani, 2014; Endarini, 2016).

2. Kromatografi Kolom

Prinsip kromatografi kolom hampir sama dengan KLT yaitu menggunakan prinsip adsorpsi. Sampel yang digunakan biasanya berupa larutan pekat. Sampel ini diletakkan pada ujung kolom dan eluen/pelarut dialirkan secara kontinu ke dalam kolom. Eluen melewati kolom karena gaya gravitasi dan proses pemisahan akan terjadi. Eluen yang digunakan harus dimulai dari yang paling nonpolar kemudian dinaikkan gradien kepolarannya hingga pemisahan terjadi. Pemisahan dapat terjadi karena perbedaan afinitas antara senyawa pada adsorben dan eluen.

Hal yang harus diperhatikan pada kromatografi kolom antara lain pemilihan adsorben dan eluen, dimensi kolom yang digunakan serta kecepatan elusi (Endarini, 2016).

3. Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Metode ini digunakan untuk fraksinasi sampel dalam jumlah besar yaitu 10-50 gram. Sampel terlebih dahulu diadsorbsikan dalam silika kasar sebelum dipisahkan agar lebih teratur dan mencegah sampel langsung menerobos dinding kaca tanpa melewati adsorben dahulu. Kemudian kolom disambungkan dengan penampung eluen yang disambungkan dengan pompa vakum. Eluen dengan kepolaran rendah dituangkan ke permukaan penyerap yang sudah dimasuki sampel. Penghisapan dilakukan perlahan menggunakan vakum. Elusi kolom dilakukan dengan memilih elusi yang cocok. Eluen yang digunakan bertahap dari nonpolar ke polar. Pompa vakum akan menghisap eluen dari kolom dan proses pemisahan terjadi. Penghisapan dilakukan sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Hasil pemisahan fraksi-fraksinya dikelompokkan menjadi kelompok senyawa nonpolar, semipolar, dan polar (Atun, 2014).

2.9 Tinjauan Umum Metode Pembuatan Gel

2.9.1 Definisi Gel

Gel termasuk ke dalam bentuk sediaan semisolid yang dibuat dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar yang dipenetrasi oleh cairan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Gel yang terbuat dari material anorganik disebut sistem dua fase, dimana partikel kecil yang berlainan tersebar di seluruh media dispersi. Ketika ukuran partikel lebih besar, maka mereka disebut magma. Gel yang terbuat dari molekul organik disebut sistem fase tunggal, dimana tidak ada ikatan antara molekul terdispersi dengan medium dispersi. Medium dispersi yang biasa digunakan ialah cairan, meskipun tidak jarang media berminyak maupun hidroalkoholik juga digunakan. Tidak seperti suspensi dan emulsi, pergerakan dari molekul terdispersi terbatas pada gel karena makromolekul organik terlarut atau interkoneksi jaringan tiga dimensi partikel (Mahalingam dkk., 2008).

2.9.2 Karakteristik Gel

Gel dapat menunjukkan sifat fisik yang berbeda-beda, yaitu *imbibition*, *swelling*, *syneresis*, dan *thixotropy*. *Imbibition* merujuk pada penyerapan air atau cairan lainnya oleh gel tanpa disertai peningkatan volume sementara *swelling* merujuk pada peningkatan volume dikarenakan penyerapan air atau cairan lainnya. Kedua sifat fisik yang ditunjukkan gel tersebut dipengaruhi oleh suhu, pH, adanya elektrolit, dan bahan formulasi lainnya. *Syneresis* merujuk pada kontraksi atau penyusutan gel akibat keluarnya medium dispersi dari matriks gel karena pemelaran berlebihan dari makromolekul dan ekspansi selama *swelling*. Pada kondisi setimbang, gel akan mempertahankan stabilitas fisiknya karena kekuatan osmotik saat *swelling* menyeimbangi ekspansi kekuatan elastisitas makromolekul. Pada keadaan suhu menurun, tekanan osmotik akan menurun sehingga kekuatan elastisitas akan kembali normal, sehingga menghasilkan penyusutan dari molekul yang meregang dan mengeluarkan medium dispersi dari matriks gel. Penambahan agen osmotik seperti sukrosa, glukosa, dan elektrolit lainnya dapat membantu mempertahankan tekanan osmotik meski dalam temperatur rendah dan menghindari *syneresis* gel. *Thixotropy* merujuk pada aliran alami non-Newtonian dalam gel yang memiliki karakteristik formasi reversibel *gel-to-sol* tanpa perubahan volume maupun temperatur (Mahalingam dkk., 2008).

Sediaan gel biasanya diuji sifat fisiknya melalui uji sifat fisik gel untuk menjamin sediaan masih memiliki sifat yang sama setelah sediaan dibuat dan masih memenuhi kriteria. Ciri gel dengan ketidakstabilan fisik yaitu warna memucat atau muncul warna baru, timbul bau, pemisahan fase, sineresis, perubahan konsistensi, dan terdapat gas. Uji sifat fisik gel sebagai berikut (Maulina dan Sugihartini, 2015; Sayuti, 2015).

a. uji organoleptik dan homogenitas

uji organoleptik dilakukan dengan mengidentifikasi secara langsung warna dan aroma gel. Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan gel pada kaca dan dinyatakan homogen jika tidak ada butiran kasar pada sediaan (Maulina dan Sugihartini, 2015; Sayuti, 2015).

b. uji pH

uji pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH universal ke dalam sampel gel yang telah diencerkan kemudian diamati perubahan warnanya dan dicocokkan dengan standar pH universal (Maulina dan Sugihartini, 2015). Gel dengan pH yang mendekati pH kulit yaitu sekitar 4,5-6,5 dapat digolongkan sebagai gel yang baik (Sayuti, 2015).

c. Uji daya sebar

Gel diletakkan di atas kaca bulat sebanyak 0,5 gram kemudian ditumpuk dengan kaca bulat lainnya selama 1 menit. Beban diletakkan diatas tumpukan kaca bulat sebesar 150 gram lalu didiamkan lagi selama 1 menit dan diukur diameter konstan gelnya (Maulina dan Sugihartini, 2015). Daya sebar gel yang baik antara 5-7 cm (Sayuti, 2015).

d. Uji daya lekat

Gel sebanyak 0,25 gram diletakkan di antara dua gelas objek kemudian ditekan menggunakan beban 1 kg selama 5 menit. Beban tersebut diangkat dan diganti dengan beban 80 gram. Dua gelas objek dipisahkan dan waktunya dicatat (Maulina dan Sugihartini, 2015).

e. Uji konsistensi

Gel disentrifugasi dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam lalu diamati perubahan fisiknya (Maulina dan Sugihartini, 2015).

2.9.3 Klasifikasi Gel

Gel diklasifikasikan menjadi hidrogel dan organogel berdasarkan karakter fisik jenis material yang digunakan dalam proses dispersi (Mahalingam dkk., 2008).

a. Hidrogel

Hidrogel menggunakan material atau koloid yang larut dalam air. Gum natural dan sintetik seperti *tragacanth*, *sodium alginate*, dan *pectin*, material anorganik seperti alumina, *bentonite*, silika, dan *veegum*, dan material organik seperti polimer selulosa dapat membentuk hidrogel dalam air. Zat-zat tersebut akan didispersi sebagai partikel koloid halus atau seutuhnya larut dalam air untuk

membentuk struktur gel. Gum dan *vehicles* anorganik membentuk struktur gel berdasarkan sifat peningkatan viskositas mereka. *vehicles* organik yang umumnya derivat polimer selulosa dengan berat molekul tinggi membentuk struktur gel karena sifat *swelling* yang dimiliki dan ikatan rantainya (Mahalingam dkk., 2008).

b. Organogel

Organogel dibuat menggunakan lipid yang tidak larut air seperti asam lemak, yang menyebabkan pengembangan dalam air. Asam lemak yang umum digunakan antara lain *glycerol monooleate*, *glycerol monopalmito stearate*, dan *glycerol monolinoleate*. Zat-zat tersebut normalnya membentuk lilin dalam suhu ruang dan membentuk kristal cairan dalam air serta meningkatkan viskositas dispersi (Mahalingam dkk., 2008).

2.9.4 Persiapan dan Pengemasan Gel

Gel relatif lebih mudah untuk diproduksi, dibandingkan dengan salep dan krim. Beberapa faktor berikut mempengaruhi persiapan dan pengemasan (Mahalingam dkk., 2008).

a. Urutan Penyampuran Bahan

Urutan penyampuran bahan aktif dan bahan tambahan lain dengan *vehicles* berdasarkan pada pengaruh *vehicles* pada proses pembentukan gel. Jika *vehicles* mempercepat dan meningkatkan proses *swelling*, maka penyampuran *vehicles* dilakukan setelah bahan aktif dan bahan tambahan lain dicampurkan. Idealnya bahan aktif dan bahan tambahan lain dilarutkan menggunakan pelarut terlebih dahulu, kemudian *vehicles* ditambahkan dan proses *swelling* akan terjadi (Mahalingam dkk., 2008).

b. Kondisi Persiapan dan Durasi *Swelling*

Suhu, pH, dan durasi pada proses *swelling* sangat berpengaruh pada persiapan pembuatan gel. Kondisi ini sangat tergantung dengan jenis *vehicles*, contohnya air panas digunakan pada gelatin dan *polyvinyl alcohol* sementara air dingin digunakan pada *methylcellulose*. *Vehicles* seperti *carbomer*, gum guar, *hydroxypropyl cellulose*, *poloxamer* dan *tragacanth* membentuk gel dalam kondisi pH asam lemah atau netral (pH 5-8). *Vehicles* seperti Na CMC,

hydroxypropylmethyl cellulose, dan *sodium alginate* membentuk gel dalam kondisi pH dengan rentang cukup luas (pH 4-10).

c. Pengeluaran Udara

Gelembung udara yang terperangkap dalam matriks gel sering menjadi masalah, terlebih jika terjadi *swelling* dalam proses penyampuran bahan aktif dan bahan tambahan. Penyimpanan dalam suhu rendah, sonikasi, atau pemberian agen *antifoaming silicon* dapat dilakukan untuk mengeluarkan gelembung udara yang terperangkap.

2.9.5 Manfaat Penggunaan Gel

Pembuatan gel mudah dan cocok digunakan sebagai obat dengan pengaplikasian secara topikal, bukal, optalmikal, nasal, telinga, dan vaginal. Hal ini dikarenakan gel meningkatkan kontak antara bahan aktif dengan situs aksi dari penyerapan (Mahalingam dkk., 2008). Selain itu, gel juga mudah mengering, memberi sensasi dingin pada bagian yang diolesi serta membentuk lapisan film yang mudah dibilas (Sayuti, 2015).

2.9.6 Definisi *Vehicles*

Vehicles merupakan senyawa dengan berat molekul tinggi yang tersusun dari bahan alam maupun secara sintetis. *Vehicles* dapat larut dalam air, memiliki sifat *swelling*, dan meningkatkan viskositas dispersi. *Vehicles* yang ideal adalah *vehicles* yang tidak berinteraksi dengan komponen formulasi lain karena sifatnya sebagai pembentuk gel, serta bebas dari pengaruh mikroba (Mahalingam dkk., 2008).

2.9.7 Peran *Vehicles* dalam Gel

Pembuatan gel membutuhkan *vehicles* karena menentukan sifat fisika gel, memberikan sensasi dingin pada daerah pengaplikasian, dan memberikan aroma yang baik (Mahalingam dkk., 2008). Berdasarkan faktor-faktor tersebut, pemilihan *vehicles* sangat tergantung pada tujuan formulasinya. Macam-macam *vehicles* sebagai berikut.

a. *Carbomer*

Carbomer sangat sering digunakan sebagai *vehicle* dalam pembuatan gel topikal karena sifat fisik *swelling* yang tinggi. Nama lain dari *carbomer* ialah *carbopol*. *Carbomer* dapat dibentuk melalui *cross-linking acrylic acid* dengan *allyl sucrose* atau *allyl pentaerythritol*. *Carbomer* tersedia dalam bentuk bubuk higroskopik berwarna putih, namun menjadi tidak berwarna ketika digunakan dalam formulasi gel. Dispersi cair *carbomer* memiliki viskositas rendah dan butuh dinetralsir untuk membentuk gel dengan tingkat kekentalan tinggi. Material seperti *sodium hydroxide*, *sodium bicarbonate*, dan *borax* digunakan untuk menetralsir dispersi *carbomer*. Kurang lebih sebanyak 0,4 gram *sodium hydroxide* digunakan untuk menetralsir dispersi 1 gram *carbomer*. Namun viskositas gel juga tergantung pada berat molekul *carbomer* dan data *cross-linking*, termasuk penggunaan antioksidan, perlindungan dari cahaya, penyimpanan dalam suhu ruang. Faktor-faktor tersebut membantu untuk memperpanjang waktu dalam mempertahankan viskositasnya. Gel *carbomer* rentan terhadap perubahan warna pada keberadaan sejumlah besar elektrolit, asam kuat, dan polimer kationik. Kaca, plastik, dan wadah berlapis resin yang memiliki sifat tahan korosi baik digunakan untuk mengemas gel *carbomer* (Mahalingam dkk., 2008).

b. *Carboxymethylcellulose Sodium* (Na CMC)

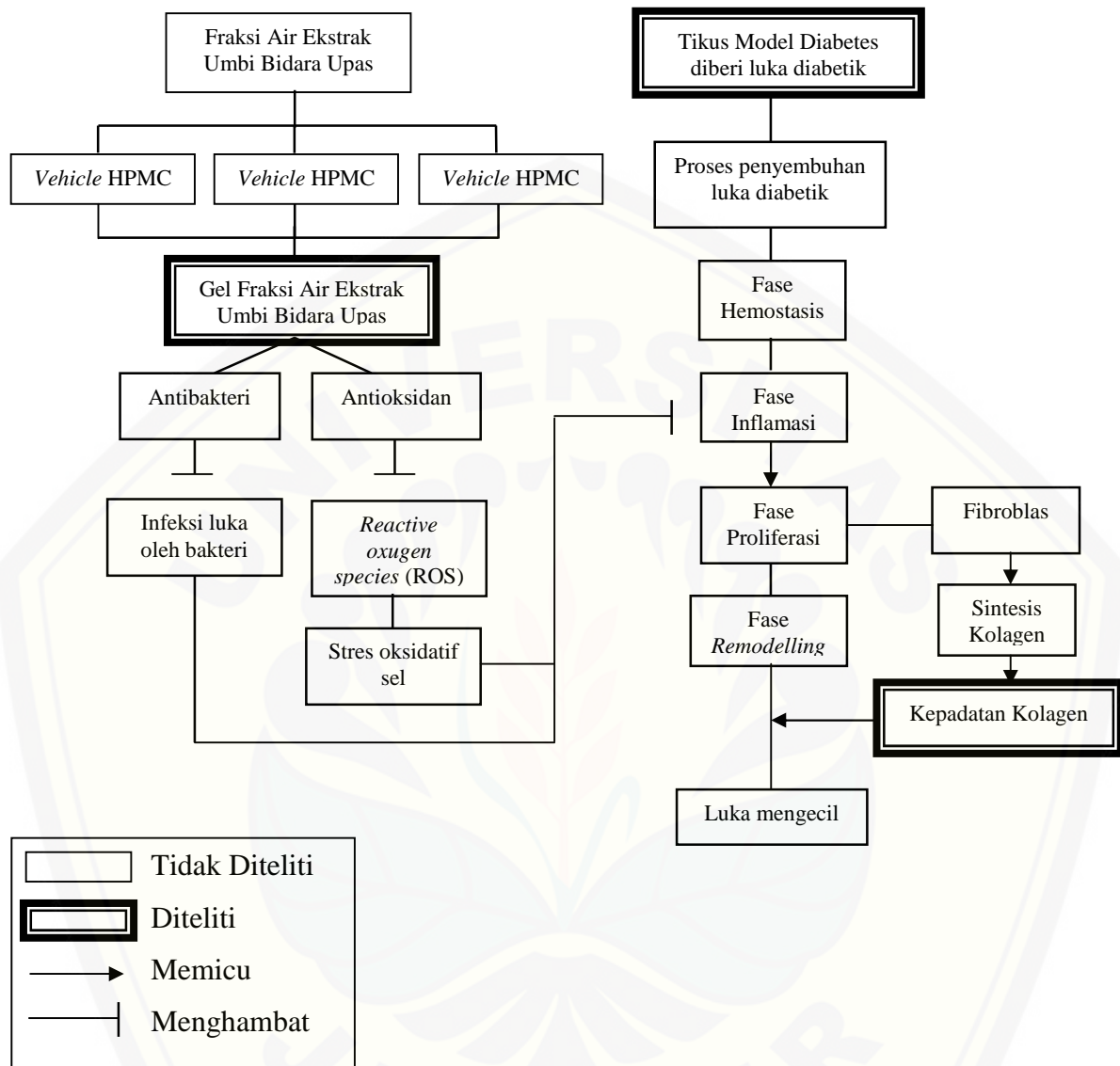
Na CMC merupakan garam selulosa *sodium polycarbomethyl ether* yang dibentuk dengan menyampurkan *alkaline cellulose* dengan *sodium monochloroacetate*. Na CMC tersedia dalam bentuk bubuk granular berwarna putih dan menjadi tidak berwarna ketika dilarutkan dalam air. Banyak jenis Na CMC dipasarkan secara luas berdasarkan tingkat viskositasnya. Perbedaan tingkat viskositas tersebut disebabkan oleh tingkat substitusi yang merepresentasikan rata-rata jumlah grup *hydroxyl* yang tersubstitusi dalam tiap unit *anhydroglucose*. Selain itu, tingkat substitusi juga menentukan kelarutan Na CMC. Viskositas gel Na CMC terjaga dalam kondisi pH netral, dan akan mengalami penurunan pada pH dibawah 2 atau diatas 10. Viskositas gel Na CMC juga mengalami penurunan

pada kondisi suhu yang meningkat. Kekentalan gel Na CMC berbanding lurus dengan jumlah konsentrasinya (Mahalingam dkk., 2008).

c. *Hydroxypropylmethyl Cellulose (HPMC)*

HPMC dibentuk dengan penyampuran *chloromethane* dan *propylene oxide*. HPMC tersedia dalam bubuk berwarna putih hingga putih kekuningan, tidak memiliki rasa dan tidak memiliki aroma. HPMC terlarut dalam air dingin. Persiapan dispersi cair HPMC menggunakan 25% air panas dengan pengadukan kuat, baru setelah mengalami hidrasi komplit air dingin dimasukkan dan dicampurkan. Viskositas gel HPMC tergantung pada konsentrasi material yang digunakan dan berat molekulnya, penambahan pelarut organik seperti etanol atau *dichloromethane* meningkatkan viskositas (Mahalingam dkk., 2008).

2.10 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka Teori

(Velnar dkk., 2009; Guo dan Dipietro, 2010; Hidayat dkk., 2015; Prameswari, 2017)

Luka diabetik menjadi salah satu komplikasi DM yang menjadi beban karena resiko amputasi tinggi, sebesar 11,2% dari 5,8% pasien DM harus menjalani amputasi (Hidayat dkk., 2015). Proses penyembuhan luka terdiri dari 4 fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase *remodeling* (Velnar dkk., 2009). Pada luka diabetik, keempat fase ini terlambat karena adanya hipoksia

jaringan, disfungsi sel epidermal dan fibroblas, angiogenesis tidak sempurna, penurunan resistensi imun dan neuropati (Guo dan Dipietro, 2010). Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) memiliki senyawa aktif flavonoid dan glikosida resin yang berfungsi sebagai antioksidan dan antibakteri. Pada penelitian oleh Prameswari (2017), dilakukan fraksinasi ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) dan terdapat pengaruh penyembuhan luka yang terlihat secara mikroskopis yaitu meningkatnya kepadatan kolagen pada luka diabetik. Pada proses penyembuhan luka diabetik kelembapan mejadi salah satu faktor penting, salah satu caranya dengan menggunakan sediaan gel topikal. *Vehicles* dalam gel memiliki peranan penting dalam signifikansi absorpsi bahan aktif obat, serta menjaga kelembaban jaringan sehingga memicu proses terjadinya reepitalisasi jaringan melalui stimulasi proliferasi dan migrasi sel epitel serta peningkatan aktivitas *growth factor* yang nantinya akan memicu peningkatan sintesis kolagen. Kolagen berperan penting dalam proses penyembuhan luka karena mengembalikan integritas dan kekuatan jaringan. Peningkatan kepadatan kolagen akan mengecilkan luka (Velnar dkk., 2009).

2.11 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah terdapat pengaruh perbedaan bahan pembawa/*vehicles* HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik.

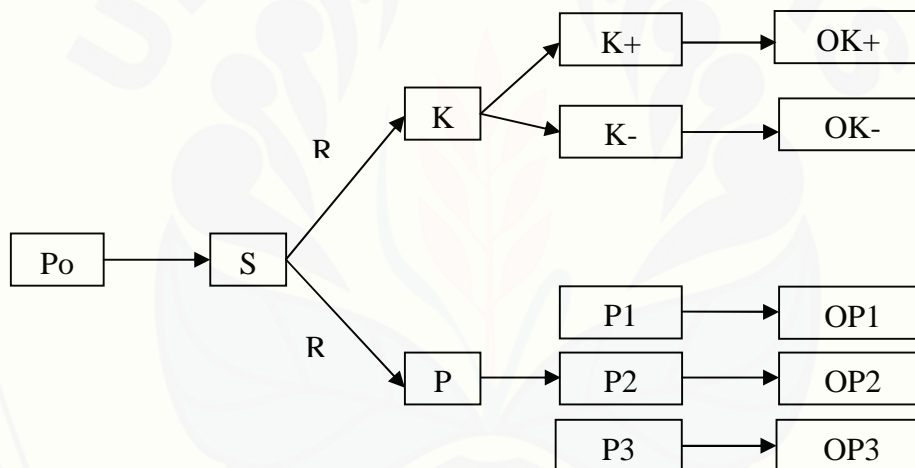
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini ialah *true experimental laboratories* karena dilakukan randomisasi dalam menentukan sampel, terdapat replikasi, dan terdapat kontrol internal.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini ialah *posttest-only control group design*. Rancangan penelitian secara sistematis dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

Po : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

K- : Kelompok kontrol negatif luka diolesi Akuades

K+ : Kelompok kontrol positif 1 luka diolesi gel Bioplacenton®

P1 : Kelompok perlakuan 1 luka diolesi gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas dengan *vehicle* HPMC

P2 : Kelompok perlakuan 1 luka diolesi gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas dengan *vehicle* Carbopol

- P3 : Kelompok perlakuan 1 luka diolesi gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas dengan *vehicle* Na CMC
- OK+ : Observasi kelompok kontrol positif (pengamatan histoPA kepadatan kolagen luka pada jaringan kulit tikus)
- OK- : Observasi kelompok kontrol negatif (pengamatan histoPA kepadatan kolagen luka pada jaringan kulit tikus)
- OP1 : Observasi kelompok perlakuan 1 (pengamatan histoPA kepadatan kolagen luka pada jaringan kulit tikus)
- OP2 : Observasi kelompok perlakuan 2 (pengamatan histoPA kepadatan kolagen luka pada jaringan kulit tikus)
- OP3 : Observasi kelompok perlakuan 3 (pengamatan histoPA kepadatan kolagen luka pada jaringan kulit tikus)

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini ialah tikus putih jantan galur Wistar dari peternakan di Surabaya.

3.3.2 Sampel

Dalam penelitian ini digunakan sampel tikus putih jantan galur Wistar dengan usia 2-3 bulan dan berat antara 150-220 gram.

3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik random bertingkat (*stratified random sampling*) dari populasi tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi DM yang akan dibagi dalam 5 kelompok. Besar sampel dihitung menggunakan rumus *Resource Equation* sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Minimum } n &= DF/k + 1 \\ &= 10/5 + 1 \\ &= 3 \end{aligned}$$

$$\text{Maximum } n = DF/k + 1$$

$$\begin{aligned} &= 20/5 + 1 \\ &= 5 \end{aligned}$$

n = jumlah sampel tiap grup

k = jumlah grup

DF = *degree of freedom*

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah perlakuan dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah sampel minimal 3 pada tiap kelompok dan maksimal 5, sehingga sampel yang diambil sebanyak 4 ekor dalam satu kelompok atau berjumlah total 20 ekor tikus. Sampel yang digunakan memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

- a. Kriteria inklusi
 1. Tikus galur Wistar
 2. Berjenis kelamin jantan
 3. Usia 2-3 bulan
 4. Berat badan 150-220 gram
 5. Tidak memiliki kelainan anatomis
 6. Sehat dan aktif selama masa adaptasi
 7. Kadar glukosa darah > 200 mg/dL
- b. Kriteria eksklusi
 1. Mati selama penelitian
 2. Sakit selama masa adaptasi (tidak bergerak aktif)

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Pada penelitian ini pembuatan fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan terhadap sampel dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pembuatan sediaan preparat histoPA dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Pengamatan kepadatan kolagen dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi

Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan selama bulan April sampai Juni 2018 meliputi masa adaptasi hingga terminasi.

3.5 Variabel

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini ialah jenis *vehicle* HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini ialah kepadatan kolagen pada luka diabetik kulit tikus.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini sebagai berikut.

1. Usia tikus
2. Jenis kelamin tikus
3. Berat badan tikus
4. Adaptasi dan pemeliharaan terhadap tikus
5. Rentang waktu perlakuan terhadap tikus
6. Dosis streptozotocin (STZ) 40 mg/kgBB
7. Dosis dextrose 10% 50 mL

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel Bebas dan Terikat

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Jenis <i>Vehicles</i>	Bahan dasar pembentuk gel terdiri dari HPMC, Carbopol, dan Na CMC. Masing-masing <i>Vehicle</i> membentuk sediaan gel melalui proses homogenisasi dengan bahan aktif (fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa (Lour.)</i>) trietanolamin <i>alkalizing agent</i> , propilen glikol kosolven, dan akuades pembawa yang menghasilkan total bahan 100 gram.	Jenis <i>vehicle</i>	Nominal
2.	gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa (Lour.)</i>)	Sediaan topikal berbentuk gel dengan bahan aktif fraksi air dari umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa (Lour.)</i>) yang telah diekstraksi menggunakan etanol.		Nominal
3.	Kepadatan Kolagen	Presentase luas serabut kolagen pada sediaan preparat histopatologi luka tikus yang diberi pewarnaan spesifik kolagen <i>Masson's trichome</i> dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x kemudian dilakukan pengambilan gambar. Gambar diolah menggunakan <i>software ImageJ</i> (Prameswari, 2017).	Presentase serabut kolagen tiap luas luka	Rasio
4.	Luka Diabetik	Perluasan yang diberikan menurut metode Morton, yaitu dengan eksisi kulit hingga lapisan subkutan beserta jaringan ikat di bawahnya di area punggung tikus model diabetes, luka berbentuk persegi berukuran 2 cm x 2 cm (Prameswari, 2017; Sakinah dkk., 2018)		Rasio

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan alat sebagai berikut.

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus antara lain bak plastik, penutup kawan yang dilapisi kasa, alas jaring-jaring kawat, tempat makan, botol minum, dan label nama.
- b. Alat yang digunakan untuk pembuatan gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas antara lain *blender*, ayakan, *beaker glass*, timbangan, corong *Buchner*, *rotator evaporator*, maserator, *freeze dryer*, *handscoon*, dan batang pengaduk.

- c. Alat untuk penginjeksian STZ antara lain *beaker glass*, batang pengaduk, spuit, neraca ohaus, dan *handscoon*.
- d. Alat untuk pembuatan Dextrose 10% antara lain beaker glass, timbangan, batang pengaduk, dan botol minum 50mL.
- e. Alat untuk memeriksa glukosa darah tikus antara lain gunting bedah, *glucotest* dan stik glukosa.
- f. Alat untuk melakukan eksisi luka pada punggung tikus antara lain spuit, stempel cetakan luka 2 cm x 2 cm, alat bedah, dan *handscoon*.
- g. Akat untuk mengoleskan gel terhadap luka antara lain wadah gel dan *handscoon*.
- h. Alat untuk mengambil jaringan kulit pada hari ke-26 antara lain alat bedah, tempat fiksasi, dan *handscoon*.
- i. Alat pengamatan preparat histoPA jaringan kulit antara lain mikroskop, kamera, laptop, dan *software imageJ*.

3.7.2 Bahan Pengamatan

Pada penelitian ini menggunakan bahan sebagai berikut.

- a. Bahan untuk pemeliharaan tikus antara lain pakan turbo dan sekam kering.
- b. Bahan untuk pembuatan gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas antara lain etanol 70%, akuades, HPMC, Carbopol, dan Na CMC.
- c. Bahan untuk injeksi STZ antara lain STZ dan buffer sitrat.
- d. Bahan untuk pembuatan Dextrose 10% antara lain bubuk glukosa dan akuades.
- e. Bahan untuk pemeriksaan glukosa darah tikus antara lain dan darah dari ekor tikus yang digunting $\pm 0,5$ cm.
- f. Bahan untuk anestesi tikus antara lain ketamine dan xylazin.
- g. Bahan untuk mengoleskan gel terhadap luka antara lain gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas dan Bioplacenton.
- h. Bahan untuk anestesi tikus saat mengambil jaringan kulit pada hari ke-26 antara lain eter dan buffer formalin 10%.

- i. Bahan pembuatan preparat histoPA jaringan kulit ialah *Masson's trichome* kit.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Dalam penelitian ini dibutuhkan uji kelayakan etik untuk menjamin keamanan bagi peneliti, subjek penelitian yaitu tikus sebagai hewan coba, serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti. Uji kelayakan etik diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Pemilihan Hewan Coba

Hewan coba didapatkan dari peternakan di Jember sebanyak 20 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus wistar*). Jumlah tersebut dibagi menjadi 5 kelompok secara random dengan menyesuaikan kriteria inklusi.

3.8.3 Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi tikus dilakukan selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Selama masa adaptasi, tikus diberikan makanan dan minuman secara *ad libitum*.

3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok tikus beserta perlakuan yang diberikan dapat dilihat pada Tabel 3.2 berikut.

Tabel 3.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kelompok K-	Pemberian akuades
Kelompok K+	Pemberian gel Bioplacenton®
Kelompok P1	Pemberian gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas dengan <i>vehicle</i> HPMC
Kelompok P2	Pemberian gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas dengan <i>vehicle</i> Carbopol
Kelompok P3	Pemberian gel fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas dengan <i>vehicle</i> Na CMC

3.8.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas

Pembuatan ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) sesuai dengan prosedur ekstraksi metode ultrasonik yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) segar 10 kg dibersihkan tanpa dikupas kemudian dipotong-potong dan dikeringkan dengan diangin-anginkan atau dioven suhu 60° Celcius. Kemudian umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) yang telah kering dihaluskan dengan blender. Selanjutnya umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) sebanyak 1 kg diekstraksi dengan ultrasonik menggunakan methanol 70 % 5 Liter (perbandingan 1:5) selama 1 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 1 jam, filtrat hasil diambil dengan penyaringan menggunakan corong *Buchner*. Residu di ekstraksi kembali dengan ultrasonik menggunakan etanol 70% sebanyak 5 Liter selama 1 jam dengan sesekali diaduk. Filtrat diambil dengan penyaringan menggunakan *Buchner* dan digabungkan dengan filtrat sebelumnya. Filtrat yang telah diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak etanol. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan penguapan diatas *water bath* sehingga didapatkan ekstrak etanol kental.

3.8.6 Pembuatan Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Pembuatan fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) sesuai dengan prosedur fraksinasi ekstrak yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Tata cara pembuatan fraksi air sebagai berikut.

1. Sebanyak 120 Gram ekstrak etanol kental ditambahkan dengan 240 mL akuades dan diaduk hingga tercampur, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah.
2. Ke dalam campuran ekstrak dan air ditambahkan n-heksana 360 mL (perbandingan 1:3) dan dikocok kuat selama 30 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.
3. Sisa lapisan air diukur volumenya dan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan dengan etil asetat perbandingan 1:3.
4. Campuran dikocok kuat selama 30 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. Lapisan air dipekatkan dengan *freeze drying* setelah dipisahkan dari residu ekstrak etanol yang tidak larut air.
6. Hasil *freeze drying* (fraksi air umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.))) ditimbang dan digunakan untuk formulasi gel.

3.8.7 Pembuatan Gel Fraksi Air Umbi Bidara Upas

Gel dibuat dengan mencampurkan basis gel dengan fraksi. *Vehicles* atau pembawa dalam gel dibedakan menjadi 3 jenis (HPMC, Carbopol, dan Na CMC). Formula pembuatan gel dapat dilihat dalam Tabel 3.3 berikut.

Tabel 3.3 Formula Pembuatan Gel

Bahan	Fungsi	Formulasi I	Formulasi II	Formulasi III
HPMC	<i>Vehicle</i>	1,5 g	-	-
Carbopol	<i>Vehicle</i>	-	1,5 g	-
Na CMC	<i>Vehicle</i>	-	-	5 g
Trietanolamin	<i>Alkalizing agent</i>	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Propilen glikol	Kosolven	20 g	20 g	20 g
Fraksi	Bahan aktif	10 g	10 g	10 g
Akuades	Pelarut	68 g	68 g	64,5 g

Proses pembuatan basis gel dimulai dengan mengembangkan *vehicle* dalam air panas dalam mortir, kemudian diaduk hingga homogen lalu ditambahkan trietanolamin (TEA) sedikit demi sedikit hingga terbentuk massa gel. Fraksi air ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa (Lour.)*) dicampurkan dengan propilen glikiol hingga homogen, kemudian dicampurkan ke dalam basis gel dan diaduk sampai homogen. Sisa akuades ditambahkan ke dalam gel sedikit demi sedikit hingga homogen.

3.8.8 Penginduksian Streptozotocin (STZ)

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, tikus diinduksi streptozotocin (STZ) 40 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 0,05 mol/L buffer sitrat (pH 4,5) secara intraperitoneal. Kemudian, setiap tikus diberikan *dextrose* 10% selama 24 jam setelah induksi STZ secara *ad libitum* menggunakan botol minum 50mL untuk menghindari *hypoglycemic sudden death* (Sakinah dkk., 2018). *Dextrose* 10% dibuat dengan melarutkan 100 gram bubuk glukosa ke dalam 1000 mL larutan akuades.

3.8.9 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Kadar gula darah tikus diperiksa menggunakan *glucotest* dan stik glukosa. Pertama ekor tikus digunting menggunakan gunting bedah sepanjang $\pm 0,25$ cm, kemudian darahnya diteteskan pada stik glukosa yang telah disambungkan dengan *glucotest*. Hasil kadar gula darah tikus akan muncul secara otomatis dalam 10 detik. Tikus dinyatakan positif diabetes jika kadarnya ≥ 200 mg/dL 5 hari setelah injeksi STZ (Sakinah dkk., 2018). Kadar gula darah diperiksa tiga kali pada hari ke-7, 13 dan 25..

3.8.10 Eksisi Luka Jaringan Kulit

Luka diabetik dibuat melalui eksisi jaringan kulit pada punggung tikus. Mula-mula tikus dianestesi menggunakan kombinasi ketamine HCl dosis 50 mg/kgBB dan Xylazine dosis 10 mg/kgBB secara intramuscular. Kemudian

rambut di punggung tikus dicukur dan diberi cetakan luka berbentuk persegi dengan ukuran 2 cm x 2 cm (Liu dkk., 2013; Sakinah dkk., 2018). Eksisi dilakukan dengan mengikuti bentuk cetakan hingga lapisan epidermis dan lapisan subkutan serta jaringan ikat di bawahnya terangkat (Prameswari, 2017).

3.8.11 Pengolesan Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas

Pengolesan gel dilakukan setiap 2 hari sekali dimulai 24 jam sejak dilakukannya eksisi luka atau pada hari ke-15 sampai hari ke-24. Mula-mula luka dioles menggunakan akuades untuk membersihkan luka dari kotoran maupun sisa gel sebelumnya, lalu aplikasikan gel dalam sekali oles.

3.8.12 Pengambilan Jaringan Kulit

Pada hari ke-25 jaringan kulit yang luka diambil, mula-mula tikus diterminasi dengan pemberian anestesi inhalasi eter. Jaringan kulit yang luka kemudian dieksisi secara melintang dan disimpan di dalam botol yang berisi cairan buffer formalin 10% (Prameswari, 2017; Marchianti dkk., 2018).

3.8.13 Pembuatan Preparat HistoPA

Pembuatan preparat jaringan kulit tikus dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Teknik pembuatan preparat histoPA menggunakan pewarnaan *Masson's trichome* yang spesifik untuk kolagen dengan memberi warna biru atau hijau terang pada serabut kolagen. Teknik yang dilakukan sebagai berikut.

a. Fiksasi

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

b. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat yang akan membuat jaringan lebih jernih dan transparan. Kemudian jaringan dimasukkan

dalam larutan *alcohol-xylol* selama 1 jam, dilanjutkan dengan larutan *xylol* murni selama 2x2 jam.

c. Impregnasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. *Embedding*

Potongan jaringan dimasukkan dalam paraffin cair dengan titik lebur 56-58°C dan ditunggu sampai paraffin menjadi padat. Jaringan dalam paraffin kemudian dipotong setebal 4 mikron dengan alat mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan diatas objek glass yang telah diolesi polilisin sebagai perekat. Selanjutnya jaringan pada kaca objek dipanaskan di dalam incubator suhu 56-58°C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan menggunakan metode *Masson's trichome*

Preparat difiksasi dengan formalin 10% lalu dilakukan deparafinisasi menggunakan akuades, dimasukkan dalam larutan boin's selama 1 jam pada suhu 56 °C, didinginkan dan cuci dengan air mengalir sampai warna kuningnya menghilang, lalu bilas dengan akuades. Preparat dimasukkan ke dalam larutan *weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit lalu cuci dengan air mengalir selama 10 menit, kemudian bilas dengan akuades. Rendam dalam larutan *biebrich scarlet-acid fuchisin* selama 2 menit, bilas kembali dengan akuades, dimasukkan ke dalam asam *phosphomolybdic-phosphotungstic* selama 10 menit lalu lanjutkan dengan larutan *methyl blue* selama 5 menit, bilas kembali akuades, dan masukkan dalam larutan asam glasial asetat selama 3 menit. Langkah terakhir dehidrasi dengan alcohol 95-100%, bersihkan dengan xylene sebanyak dua kali, lalu lakukan *mounting* dengan kanada balsam (Suvik, 2012; Prameswari, 2017).

3.8.15 Pengamatan Kepadatan Kolagen

Pengamatan dilakukan dengan pengawasan ahli Patologi Anatomi. Lokasi pengamatan kolagen yaitu di daerah bekas luka eksisi. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x pada 6 lapang pandang lalu dilakukan pengambilan gambar menggunakan optilab. Selanjutnya presentase kepadatan kolagen diukur menggunakan *software imageJ* (Prameswari, 2017).

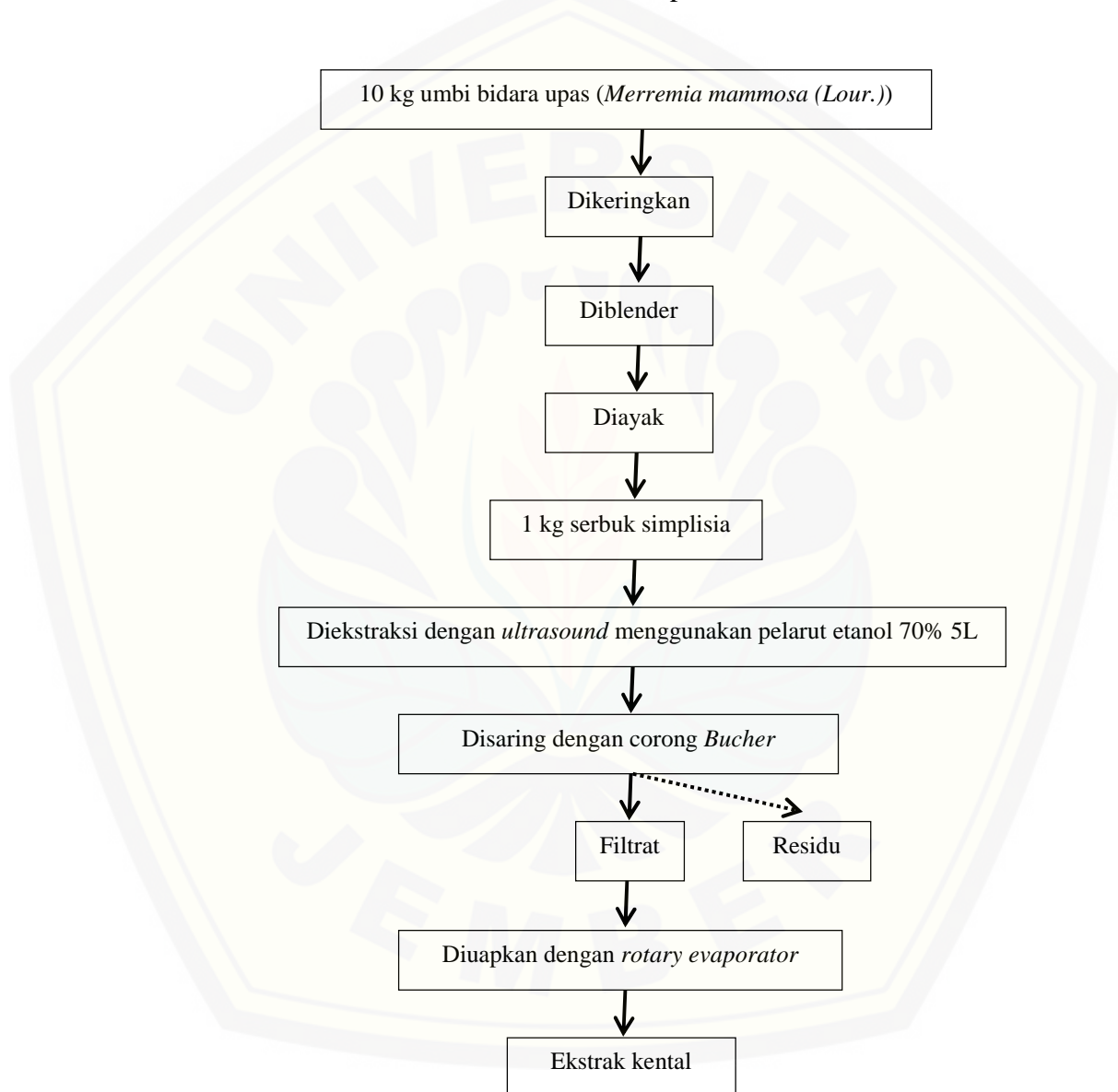
3.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan program analisis statistik. Uji hipotesis yang digunakan ialah uji komparatif numerik tidak berpasangan. Sebelum dilakukan uji statistik, dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* karena sampel kurang dari 50, kemudian mencari kesamaan varian atau homogenitas menggunakan *Levene's test*. Apabila data terdistribusi normal dengan varian sama maka dilakukan uji *One Way Anova* ($p < 0,05$) dilanjutkan uji *Post Hoc Fisher's LSD* ($p < 0,05$), apabila tidak maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$) dan dilanjutkan uji *Post Hoc Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

3.10 Alur Penelitian

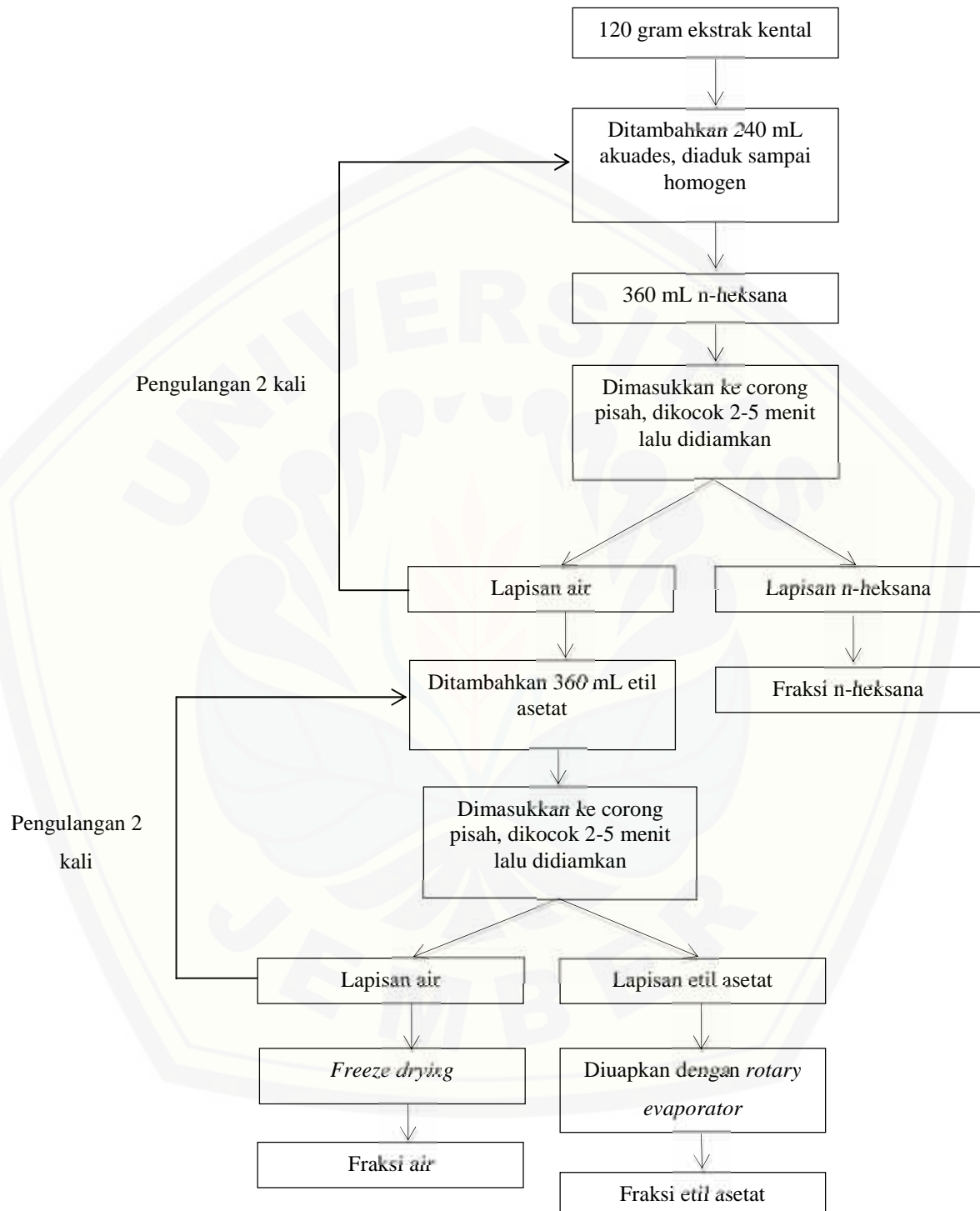
Penelitian ini memiliki beberapa tahap yang akan dijelaskan dalam skema berikut.

a. Skema Proses Ekstraksi Umbi Bidara Upas



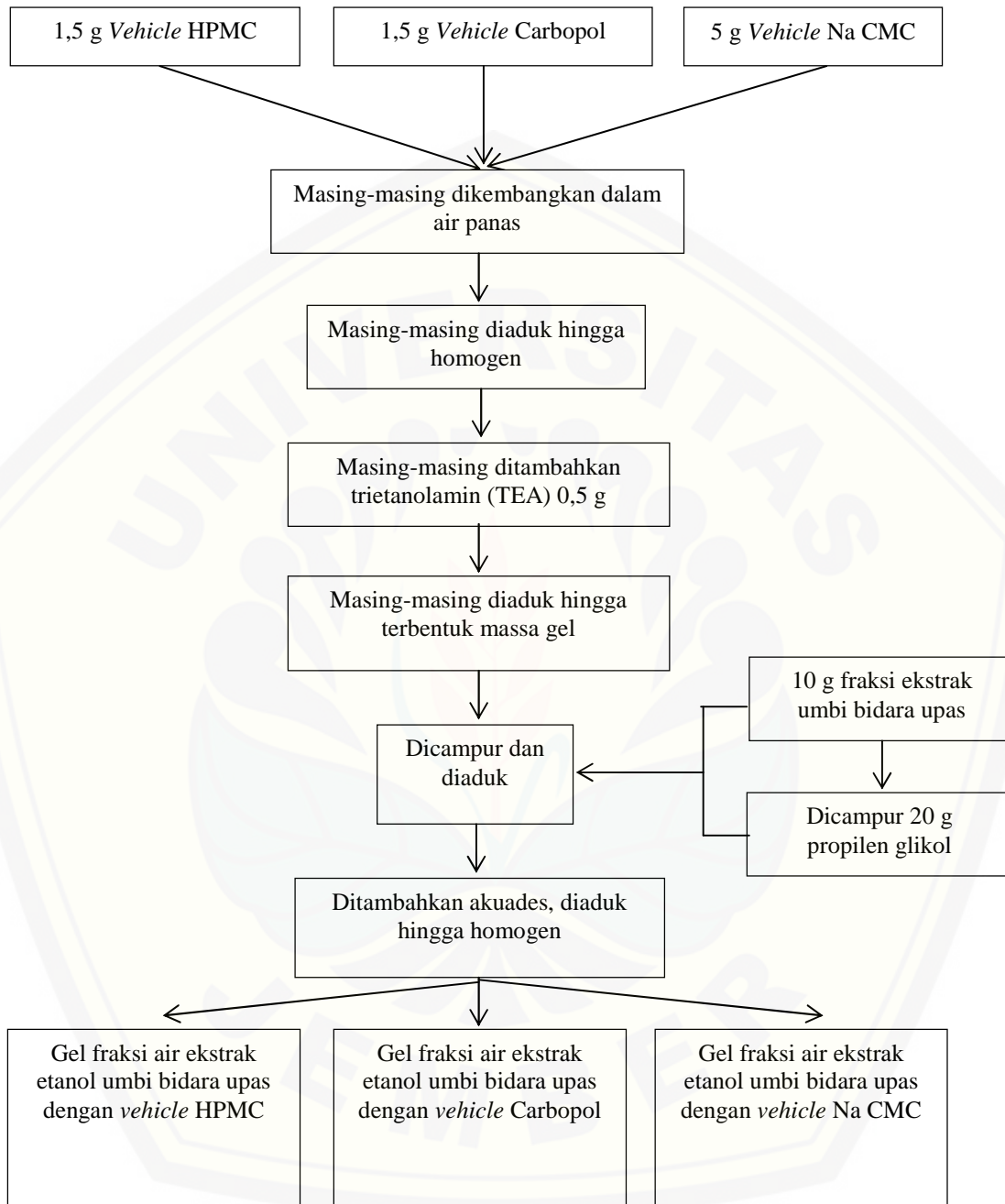
Gambar 3.2 Skema Proses Ekstraksi Umbi Bidara Upas

b. Skema Proses Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas



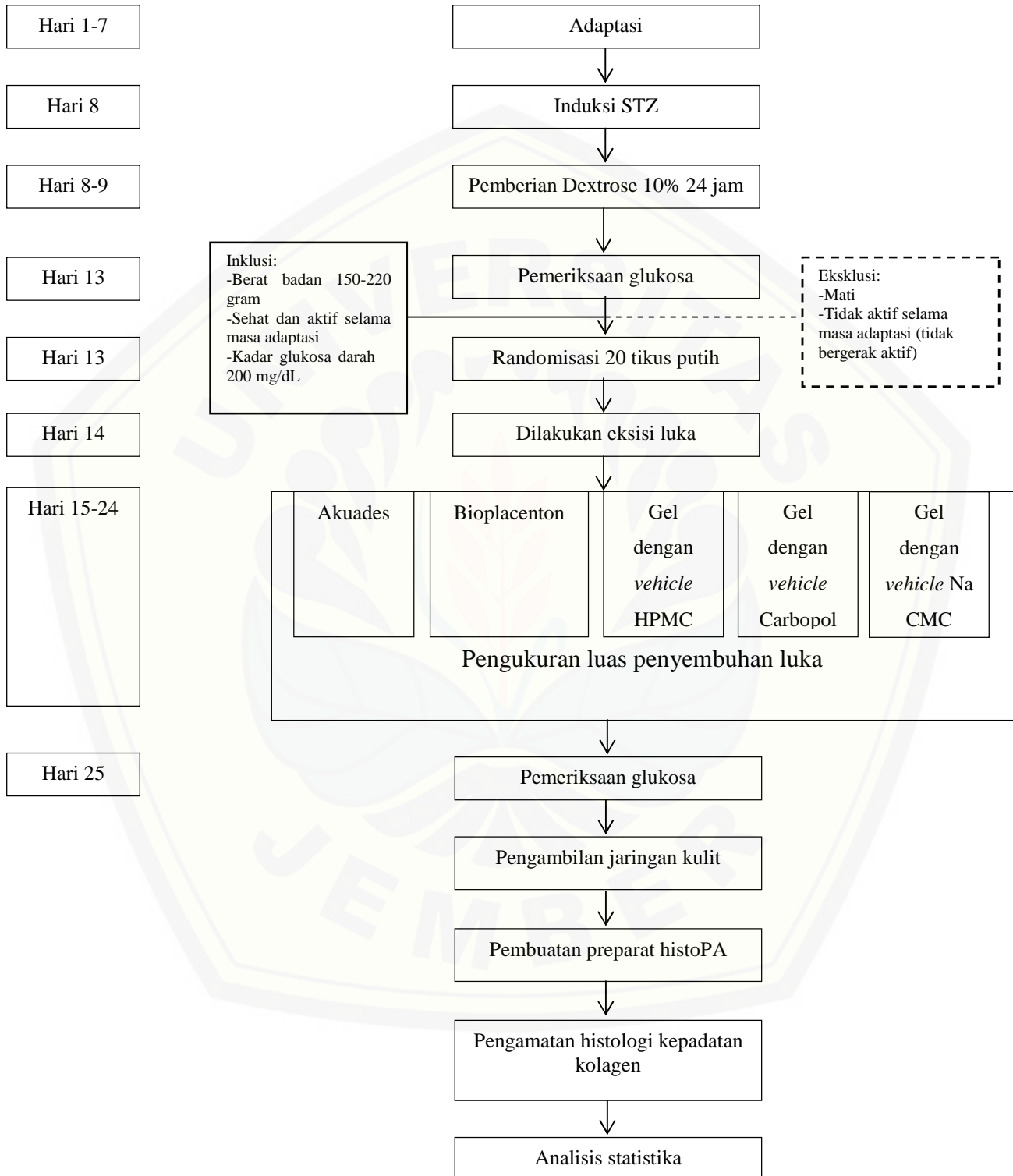
Gambar 3.3 Skema Proses Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas

c. Skema Pembuatan Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas



Gambar 3.4 Skema Pembuatan Gel Fraksi Air Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas

d. Skema Proses Penyembuhan Luka Diabetik



Gambar 3.5 Skema Proses Penyembuhan Luka Diabetik

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dan pembahasan sebelumnya, kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat pengaruh perbedaan bahan pembawa/*vehicles* HPMC, Carbopol, dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan luka diabetik. *Vehicle* Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) meningkatkan kepadatan kolagen paling tinggi pada penyembuhan luka diabetik.

5.2 Saran

- a. Diperlukan uji toksisitas untuk mengetahui efek samping *vehicles* dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)).
- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh *vehicle* HPMC dan Na CMC dalam gel fraksi air ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.)) terhadap parameter penyembuhan luka lainnya antara lain secara makroskopis yaitu luas luka dan secara mikroskopis yaitu konsentrasi VEGF dan kadar hidroksiprolin.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, N. dan J. Doupis. 2016. Diabetic foot disease : from the evaluation of the “foot at risk” to the novel diabetic ulcer treatment modalities. *World Journal of Diabetes*. 7(7):153–164.
- Atun, S. 2014. Metode isolasi dan identifikasi struktur senyawa organik bahan alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. 8:53–61.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, dan A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem, dan M. Tomic-canic. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 16
- Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). 2014. Bidara Upas (Merremia mammosa). <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/en/?page_id=126>. Diakses pada tanggal 10 November 2018.
- Chen, X., O. Nadiarynk, S. Plotnikov, dan P. J. Campagnola. 2012. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*. 7(4):654–669.
- Choi, J. S., J. D. Kim, H. S. Yoon, dan Y. W. Cho. 2013. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. *Tissue Engineering Part A*. 19(3–4):329–339.
- Dhivya, S., V. V. Padma, dan E. Santhini. 2015. Wound dressings - a review. *BioMedicine*. 5:24–28.
- Endarini, L. H. 2016. *Farmakognisi Dan Fitokimia*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Fratzl, P. 2008. Collagen : structure and mechanics , an introduction. In *Collagen* (pp.1-13). Springer, Boston, MA.
- Furman, B. L. 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*, 70(1), pp.5-47.
- Guo, S. dan L. A. Dipietro. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), pp.219–229.
- Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrandon, dan M. T. Longaker. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*. 453

- Hidayat, F. K., U. Elfiah, dan K. D. Sofiana. 2015. Jumlah makrofag pada luka insisi full thickness yang diberi ekstrak umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (*Lour.*)) pada tikus wistar jantan. *Pustaka Kesehatan*. 3(3):386–390.
- Jain, A. K. dan Y. S. Tanwar. 2012. Formulation and evaluation of topical diclofenac sodium gel using different gelling agent. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*. 4(1):1–6.
- Julianto, I. G. P. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (*Lour.*)) Secara Topikal Terhadap Gulda Darah Dan Luas Penyembuhan Luka Pada Tikus Wistar Jantan Hiperglikemi. Universitas Jember.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014a. *Info Datin: Situasi Dan Analisis Diabetes*. Jakarta
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014b. *Farmakope Indonesia*. Edisi Edisi V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Hasil Utama Laporan Riskesdas 2018*. Jakarta
- King, A. J. F. 2012. The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, 166(3), pp. 877-894.
- Liu, H., S. Lin, D. Xiao, X. Zheng, Y. Gu, dan S. Guo. 2013. Evaluation of the wound healing potential of resina draconis (*dracaena cochinchinensis*) in animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013
- Lü, J. M., P. H. Lin, Q. Yao, dan C. Chen. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(4):840–860.
- Mahalingam, R., X. Li, dan B. R. Jasti. 2008. *Semisolid Dosages: Ointments, Creams and Gels*. Dalam *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.,
- Marchianti, A. C. N., E. U. Ulfa, dan E. N. Sakinah. 2018. The dose dependence analysis of the water fraction of merremia mammosa (*Lour.*) extract on diabetic wound healing enhancement. *Hiroshima Journal Medical Science*. 67:29–34.
- Maulina, L. dan N. Sugihartini. 2015. Formulasi gel ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan variasi gelling agent sebagai sediaan luka bakar. *Pharmaciana*. 5(1):43–52.

- Moldoveanu, S. dan V. David. 2015. *Solvent Extraction*. Dalam Modern Sample Preparation for Chromatography. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Journal Kesehatan*. VII(2):361–367.
- Murray, R., D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, dan P. A. Weil. 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Edisi Edisi 28. Cina: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Newsholme, P., V. F. Cruzat, K. N. Keane, R. Carlessi, dan P. I. H. de Bittencourt. 2016. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*. 473(24):4527–4550.
- Ningsih, indah yulia, E. Puspitasari, B. Triatmoko, dan D. Dianasari. 2016. *Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia*. Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- Noor, S., M. Zubair, dan J. Ahmad. 2015. Diabetes & metabolic syndrome : clinical research & reviews diabetic foot ulcer — a review on pathophysiology , classification and microbial etiology. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 9(3):192–199.
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia. 2011. *Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia*. Jakarta: Perkumpulan Endokrinologi Indonesia.
- Plantamor. 2018. Bidara Upas (Merremia mammosa). <<http://plantamor.com/species/info/merremia/mammosa>>. Diakses pada tanggal 10 November 2018.
- Prameswari, M. C. 2017. Pengaruh Fraksinasi Ekstrak Umbi Bidara Upas (Merremia Mammosa Lour) Terhadap Penyembuhan Luka Pada Penderita Diabetes. Universitas Jember.
- Pricilla, E., I. Julianto, H. Kariosentono, D. R. Budiani, Y. Heru, Y. Rindiastuti, dan A. Veraida. 2017. The effect of injection of adsc compared to aape on collagen density in aging skin (animal study). 2(2):58–63.
- Ratnadewi, A. A. I., L. D. Wahyudi, J. Rochman, Susilowati, A. S. Nugraha, dan T. A. Siswoyo. 2018. Revealing anti-diabetic potency of medicinal plants of meru betiri national park , jember – indonesia. *Arabian Journal of Chemistry*. (did):0–5.
- Rizka, A., Budipramana, V.S. and Fauziah, D., 2013. Kepadatan Kolagen tipe 1 pada luka operasi tikus Wistar yang mengalami anemia karena perdarahan akut. *Media Journal Of Emergency*, 2(1), pp.1-12.

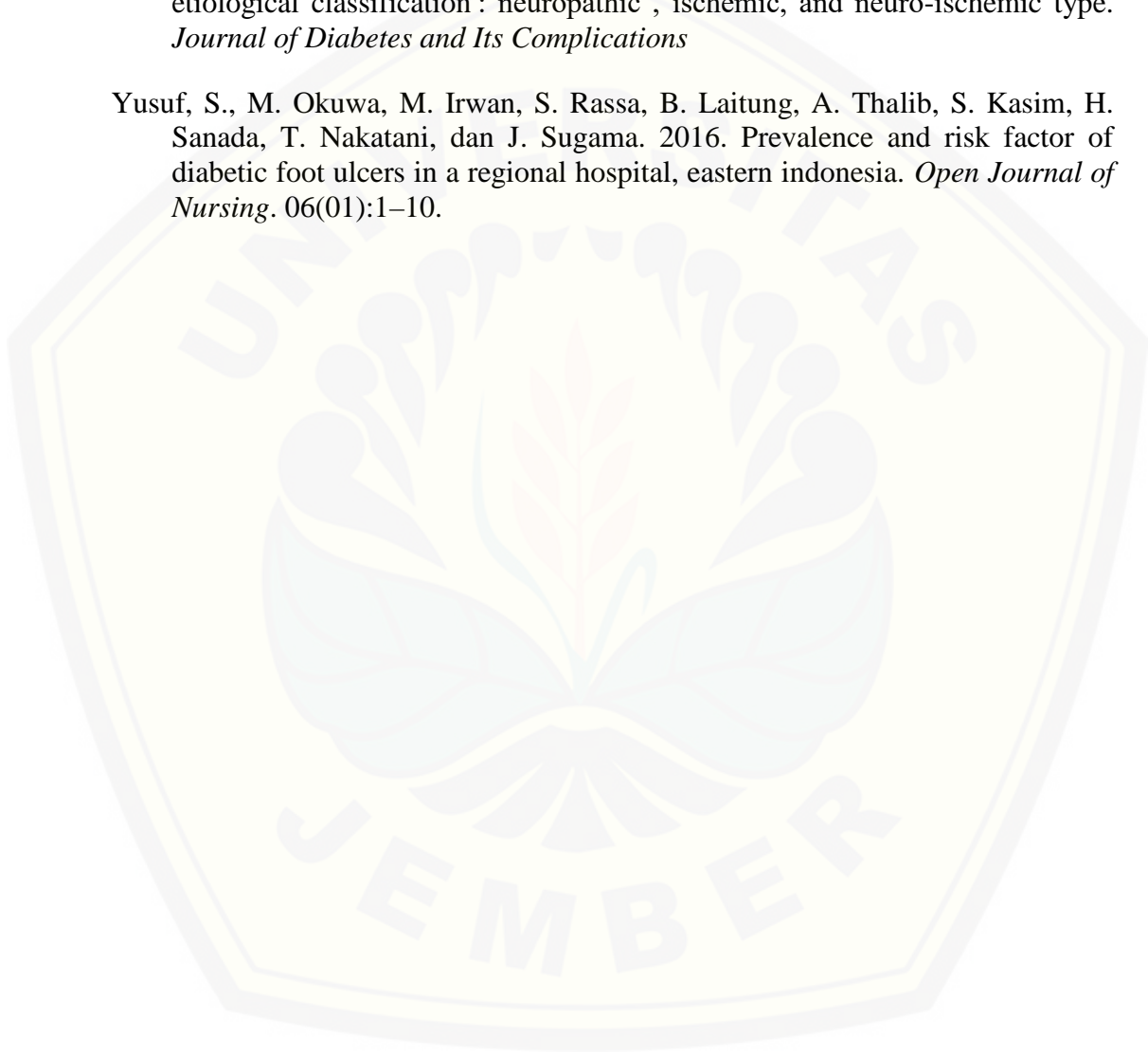
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, dan M. E. Quinn. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Edisi 6th Editio. London: Pharmaceutical Press.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, Dan Teknik Pemurnian*. Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Sakinah, E. N., E. U. Ulfa, dan A. C. N. Marchianti. 2018. The effectiveness of merremia mammosa (lour .) extract fractions as diabetic wound healers on diabetic rat model. *Hiroshima Journal Medical Science*. 67(37):70–77.
- Sayuti, nutrisia aquariushinta. 2015. Formulasi dan uji stabilitas fisik sediaan gel ekstrak daun ketepeng china (cassia alata l.). 5(2):74–82.
- Setiati, S., I. Alwi, A. W. Sudoyo, M. S. K., B. Setiyohadi, dan A. F. Syam. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II*. Edisi VI. Jakarta: InternaPublishing.
- Setiawan, M. R., N. Dewi, dan I. K. Oktaviyanti. 2015. Ekstrak ikan haruan (channa striata) meningkatkan jumlah neokapiler pada penyembuhan luka. *Journal of Dentomaxillofacial Science*, 14(1), pp.1-5.
- Shukla, V. K., M. a Rasheed, M. Kumar, S. K. Gupta, dan S. S. Pandey. 2004. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. *Journal of Wound Care*. 13(5):177–179.
- Suvik, A. 2012. The use of modified masson ' s trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Mal J Vet Res*, 3, pp.39-47.
- Tasdemir, D., R. Brun, S. G. Franzblau, Y. Sezgin, dan I. Çalis. 2008. Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of scrophularia cryptophila. *Phytomedicine*. 15(3):209–215.
- Tiwary, S. K., D. Shukla, A. K. Tripathi, S. Agrawal, M. K. Singh, dan V. K. Shukla. 2006. Effect of placental-extract gel and cream on non-healing wounds. 15
- Velnar, T., T. Bailey, dan V. Smrkolj. 2009. The wound healing process : an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), pp.1528-1542.
- Waspadji, S. 2015. *Kaki Diabetes*. Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Editor S. Setiati, I. Alwi, A. W. Sudoyo, B. Setiyohadi, dan A. . Syam. Jakarta: InternaPublishing.
- WHO. 2006. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia*. Geneva
- Wound Care Community. 2015. How Wound Heals: The 4 Main Phases of

Wound Healing.

<<http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>>. Diakses pada tanggal 10 November 2018.

Yotsu, R. R., N. M. Pham, M. Oe, T. Nagase, H. Sanada, H. Hara, S. Fukuda, J. Fujitani, R. Yamamoto-honda, H. Kajio, M. Noda, dan T. Tamaki. 2014. Comparison of characteristics and healing course of diabetic foot ulcers by etiological classification : neuropathic , ischemic, and neuro-ischemic type. *Journal of Diabetes and Its Complications*

Yusuf, S., M. Okuwa, M. Irwan, S. Rassa, B. Laitung, A. Thalib, S. Kasim, H. Sanada, T. Nakatani, dan J. Sugama. 2016. Prevalence and risk factor of diabetic foot ulcers in a regional hospital, eastern indonesia. *Open Journal of Nursing*. 06(01):1–10.



LAMPIRAN

Lampiran 3.8 Dokumentasi Prosedur Penelitian

a. Proses Ekstraksi



Hasil blender potongan umbi bidara upas



Penyampuran dengan larutan



Proses *rotary evaporator*



Proses *waterbath*

b. Proses Fraksinasi



Penambahan pelarut



Pengadukan pelarut dan ekstrak umbi bidara upas



Pemisahan akuades dan pelarut



Hasil freeze drying

c. Proses pembuatan gel



Bahan *vehicles*



Penimbangan bahan aktif



Proses pengadukan *vehicles* dan bahan aktif



Hasil akhir gel

d. Prosedur Perawatan Luka Tikus Model Diabetes



Anestesi dengan ketamine dan xylazine



Pencukuran rambut tikus



Insisi *full thickness* 2x2 cm



Pengolesan gel



Pengambilan jaringan setelah terminasi

e. Pengamatan Histopatologi



Lampiran 3.8.1 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 : ek_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL
Nomor : L.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 Ethica 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 PENYICMBUHAN LUKA DIABETIK

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

NIDN : 0005038206

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 12 Juni 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : tk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1.267/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 :

**PENGARUH VEHICLES DALAM GEL FRAKSI AIR EKSTRAK ETANOL UMBI
BIDARA UPAS (*Merremia mammosa Lour*) TERHADAP KEPADATAN KOLAGEN
PADA PENYEMBUHAN LUKA DIABETIK**

Nama Peneliti Utama : Deuxy Ilma Wahyuliswari.
Name of the principal investigator

NIM : 152010101053

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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



Lampiran 3.8.6 Protap 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 kontinu dan ultrasonikasi. Untuk mendapatkan ekstrak bidara upas berkualitas dengan kandungan berberin tinggi perlu mempertimbangkan bahan (simplosia), metode ekstraksi dan pelarut pengektaksi. Prosedur pembuatan ekstrak dan fraksi air bidara upas sebagai berikut :

PROSEDUR TETAP

PEMBUATAN EKSTRAK ETANOL *M. mammosa*

1. PERSIAPAN

1.1. Dipersiapkan bahan yang diperlukan yaitu :

- a. Simplosia Umbi bidara upas 1 kg (Umbi bidara upas busah 5-10 kg)
- b. Etanol 70% 10 L (7,292 L Etanol 96% + 2,708 L akuades)

1.2. Alat-alat yang diperlukan :

- a. Alat penggiling
- b. Tangki perendaman
- c. Ultrasonic bath
- d. Rotary evaporator
- e. Waterbath

2. PEMBUATAN EKSTRAK *Merremia mammosa*

- 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 ultrasonic 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 ultrasonik 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 ducuci dan ditiriskan hingga kering.
- 3.2. Alat selanjutnya disimpan pada rak penyimpanan.

2. Tenologi Pembuatan Fraksi Air Bidara Upas


PROSEDUR TETAP
PEMBUATAN FRAKSI AIR <i>M. mammosa</i>
4. PERSIAPAN
4.1. Dipersiapkan bahan yang diperlukan yaitu :
c. Ekstrak Etanol Kental Bidara Upas
d. N heksana
e. Akuades
f. Etill 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 3.8.13 Protap Pewarnaan Preparat Menggunakan *Masson's Trichrome*

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



**PROSEDUR TETAP
PEWARNAAN MASSON TRICHROME
DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMI
FK UNAIR**

- Tissue
- Kassa
- Cover glass
- Obyek glass
- Staining jar

Bahan :

- Xylol
- Alkohol
- Aquadest
- Methyl blue
- Acetic acid 1%
- Acid fuchsin
- Phosphomolybdic acid

C. FAKTOR PENYULIT

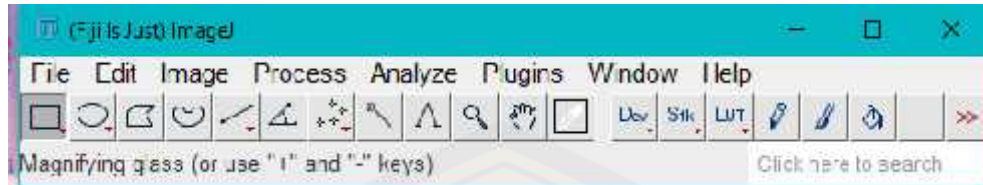
- Bahan untuk pengecatan jelek/kadaluarsa.

D. TENAGA

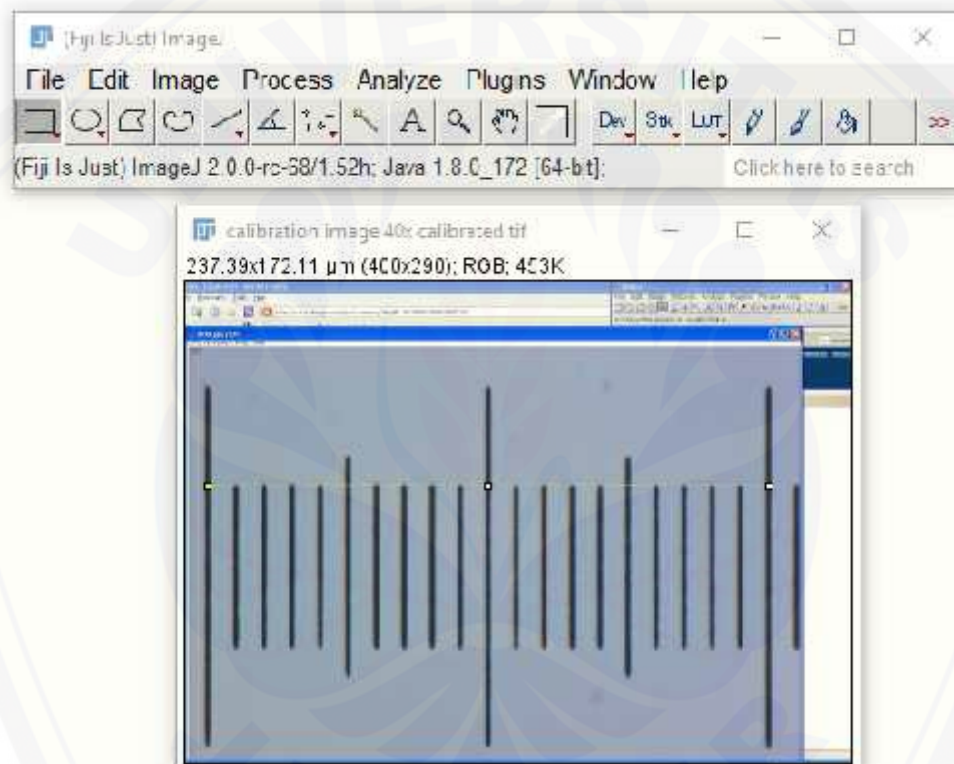
- Petugas Patologi Anatomi
- Teknisi Patologi Anatomi

Lampiran 3.8.15 Cara Analisis Kepadatan Kolagen Menggunakan *ImageJ*

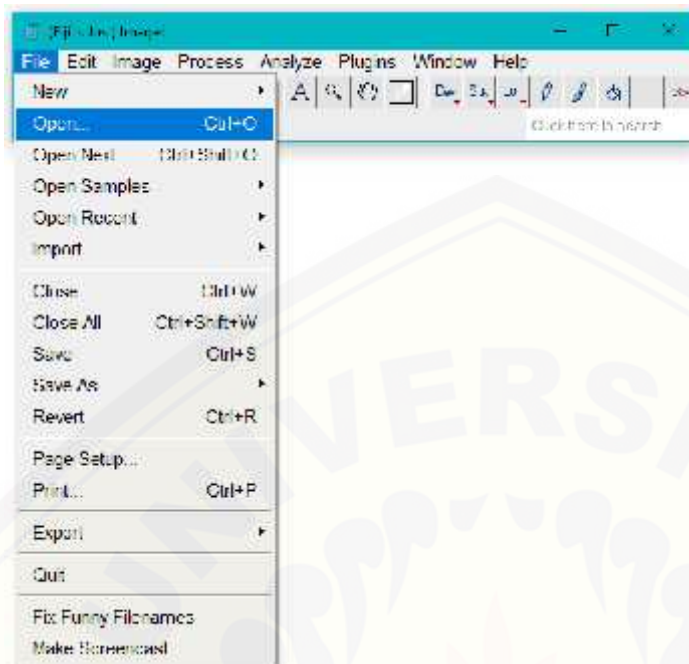
a. Buka aplikasi *ImageJ*



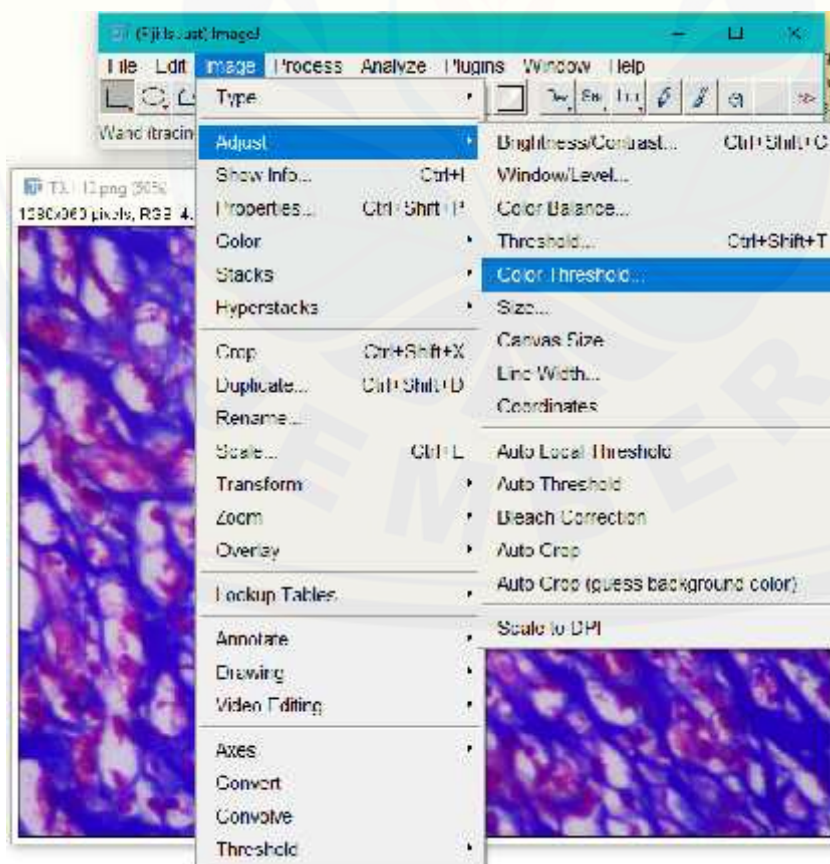
b. Pilih menu *File > Open >* pilih gambar *scale bar* perbesaran 400x untuk mengkalibrasi satuan *pixel* menjadi μm



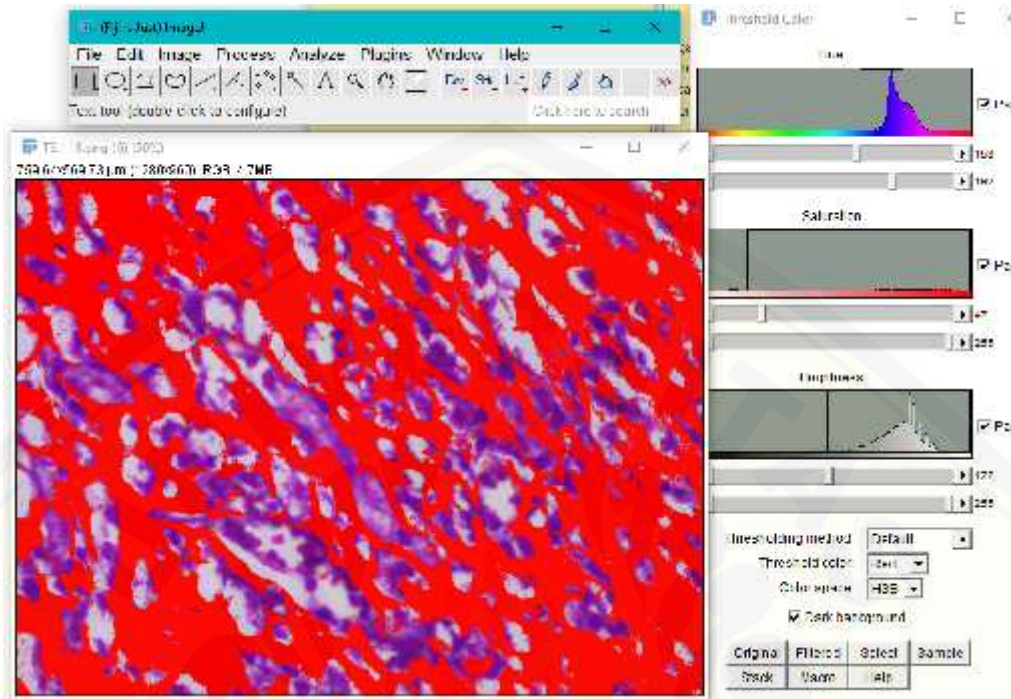
- c. Pilih menu *File > Open > pilih gambar*



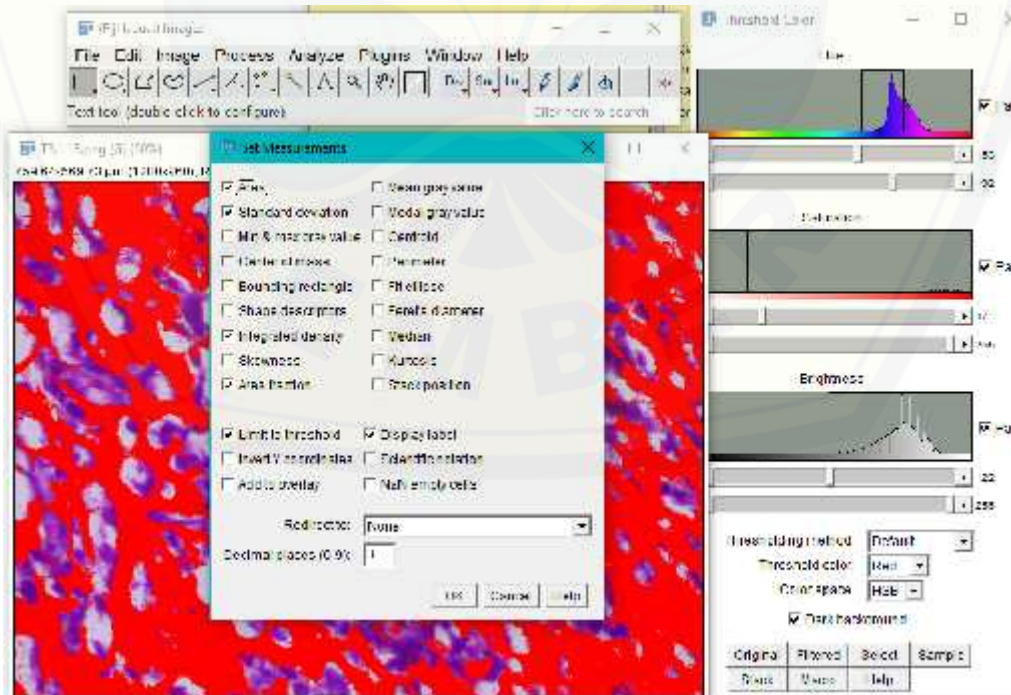
- d. Pilih menu *Image > Adjust > Color Threshold*



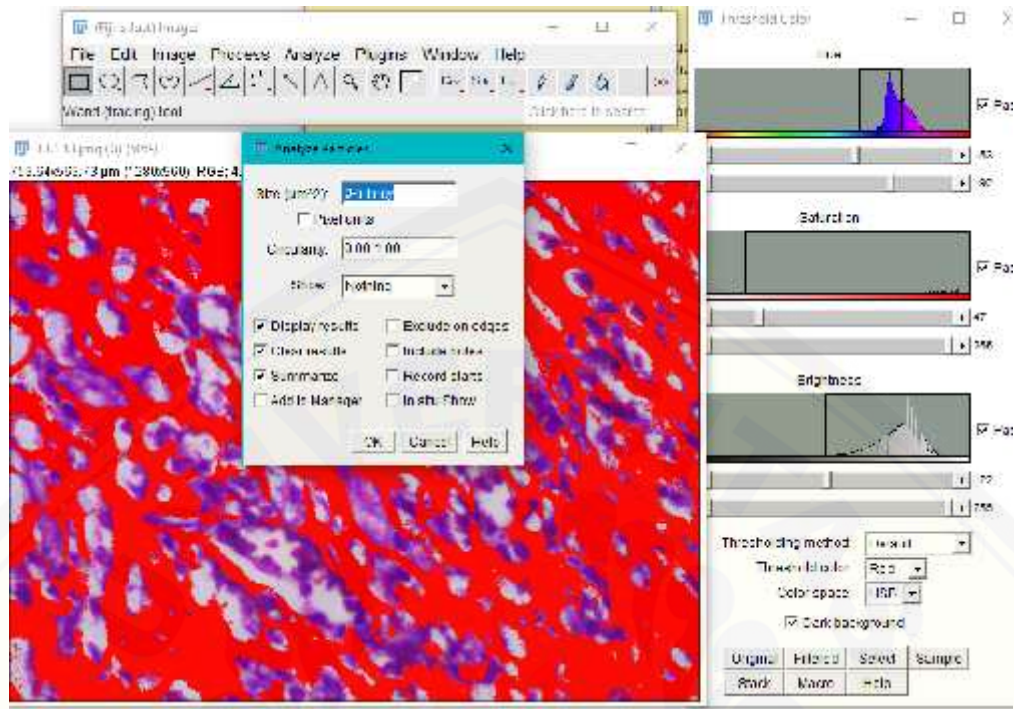
- e. Atur sesuai intensitas warna biru yang memulas kolagen pada pewarnaan *Masson's Trichrome*



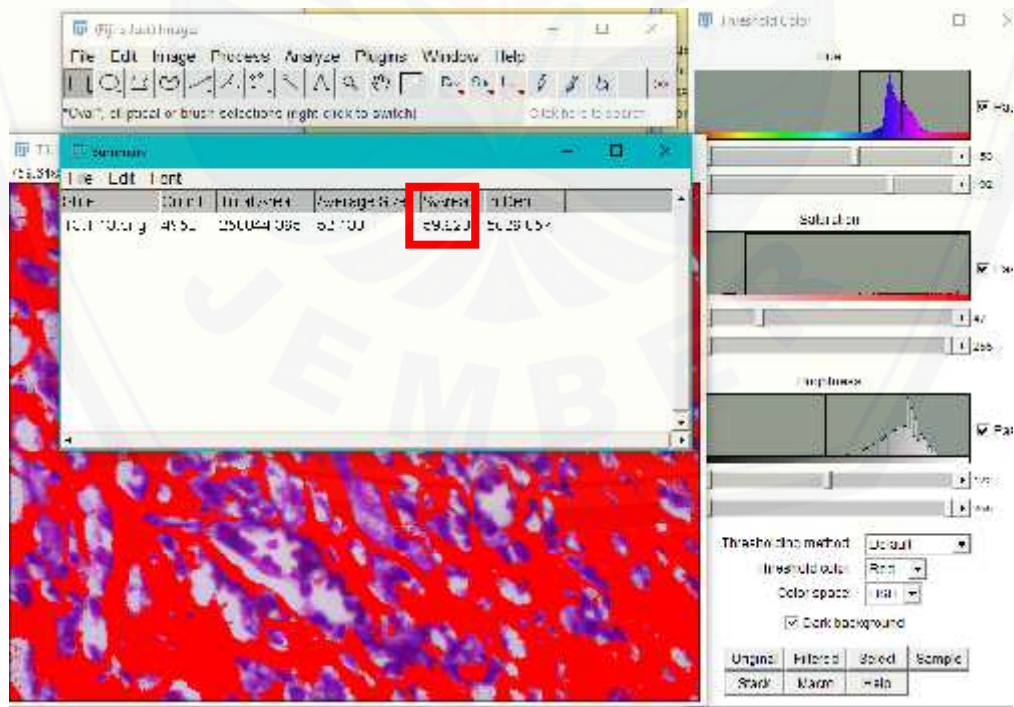
- f. Pilih menu *Analyze > Set Measurements*. Tandai *Area Fraction* dan *Limit to Threshold*







g. Pilih menu *Analyze > Analyze Particles*. Tandai *Summarize*



h. Akan muncul tabel *Summary*. Presentase kepadatan kolagen ditunjukkan oleh *%Area*



Lampiran 4.1.3 Hasil Pengukuran Gula Darah Acak

	 Kelompok	 GDA_hari 7	 GDA_hari 13	 GDA_hari 25
1	1	112	244	459
2	1	108	345	284
3	1	103	435	363
4	1	83	600	420
5	2	90	331	420
6	2	115	375	521
7	2	72	454	429
8	2	83	545	459
9	3	103	324	458
10	3	147	345	381
11	3	88	498	332
12	3	76	555	347
13	4	98	273	270
14	4	78	342	221
15	4	80	505	420
16	4	60	600	564
17	5	90	331	372
18	5	92	409	574
19	5	106	439	387
20	5	95	527	528

Descriptives					
Kelompok			Statistic	Std. Error	
GDA_hari_7	K-	Mean		101.50	6.436
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	81.02	
			Upper Bound	121.98	
		5% Trimmed Mean		101.94	
		Median		105.50	
		Variance		165.667	
		Std. Deviation		12.871	
		Minimum		83	
		Maximum		112	
		Range		29	
		Interquartile Range		23	
		Skewness		-1.531	1.014
		Kurtosis		2.420	2.619
		K+	Mean		90.00
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	60.98	
			Upper Bound	119.02	
	5% Trimmed Mean			89.61	
	Median			86.50	
	Variance			332.667	
	Std. Deviation			18.239	
	Minimum			72	
	Maximum			115	
	Range			43	
	Interquartile Range			34	
	Skewness			1.038	1.014
	Kurtosis			1.500	2.619
	P1		Mean		103.50
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	54.12	
			Upper Bound	152.88	
		5% Trimmed Mean		102.61	
		Median		95.50	
		Variance		963.000	
		Std. Deviation		31.032	
Minimum			76		
Maximum			147		
Range			71		
Interquartile Range			57		
Skewness			1.289	1.014	
Kurtosis			1.633	2.619	
P2		Mean		79.00	7.767
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	54.28		
		Upper Bound	103.72		

		5% Trimmed Mean	79.00	
		Median	79.00	
		Variance	241.333	
		Std. Deviation	15.535	
		Minimum	60	
		Maximum	98	
		Range	38	
		Interquartile Range	29	
		Skewness	.000	1.014
		Kurtosis	1.417	2.619
	P3	Mean	95.75	3.568
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	84.40
			Upper Bound	107.10
		5% Trimmed Mean	95.50	
		Median	93.50	
		Variance	50.917	
		Std. Deviation	7.136	
		Minimum	90	
		Maximum	106	
		Range	16	
		Interquartile Range	13	
		Skewness	1.530	1.014
		Kurtosis	2.353	2.619
GDA_hari_13	K-	Mean	406.00	75.522
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	165.66
			Upper Bound	646.34
		5% Trimmed Mean	404.22	
		Median	390.00	
		Variance	22814.000	
		Std. Deviation	151.043	
		Minimum	244	
		Maximum	600	
		Range	356	
		Interquartile Range	290	
		Skewness	.551	1.014
		Kurtosis	.076	2.619
	K+	Mean	426.25	47.056
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	276.50
			Upper Bound	576.00
		5% Trimmed Mean	424.94	
		Median	414.50	
		Variance	8856.917	
		Std. Deviation	94.111	
		Minimum	331	
		Maximum	545	

P1	Range	214		
	Interquartile Range	180		
	Skewness	.558	1.014	
	Kurtosis	-1.234	2.619	
	Mean	430.50	56.796	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	249.75	
		Upper Bound	611.25	
	5% Trimmed Mean	429.50		
	Median	421.50		
	Variance	12903.000		
	Std. Deviation	113.591		
	Minimum	324		
	Maximum	555		
	Range	231		
	Interquartile Range	212		
Skewness	.184	1.014		
Kurtosis	-4.628	2.619		
P2	Mean	430.00	74.676	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	192.35	
		Upper Bound	667.65	
	5% Trimmed Mean	429.28		
	Median	423.50		
	Variance	22306.000		
	Std. Deviation	149.352		
	Minimum	273		
	Maximum	600		
	Range	327		
	Interquartile Range	286		
	Skewness	.157	1.014	
	Kurtosis	-3.220	2.619	
	P3	Mean	426.50	40.500
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	297.61
Upper Bound			555.39	
5% Trimmed Mean		426.22		
Median		424.00		
Variance		6561.000		
Std. Deviation		81.000		
Minimum		331		
Maximum		527		
Range		196		
Interquartile Range		155		
Skewness		.176	1.014	
Kurtosis		.850	2.619	
GDA_hari_25 K-		Mean	381.50	38.010
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	260.54
	Upper Bound		502.46	

	5% Trimmed Mean		382.61	
	Median		391.50	
	Variance		5779.000	
	Std. Deviation		76.020	
	Minimum		284	
	Maximum		459	
	Range		175	
	Interquartile Range		146	
	Skewness		-.623	1.014
	Kurtosis		-.649	2.619
K+	Mean		457.25	22.827
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	384.60	
		Upper Bound	529.90	
	5% Trimmed Mean		455.78	
	Median		444.00	
	Variance		2084.250	
	Std. Deviation		45.654	
	Minimum		420	
	Maximum		521	
	Range		101	
	Interquartile Range		83	
	Skewness		1.295	1.014
	Kurtosis		1.140	2.619
P1	Mean		379.50	28.102
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	290.07	
		Upper Bound	468.93	
	5% Trimmed Mean		377.78	
	Median		364.00	
	Variance		3159.000	
	Std. Deviation		56.205	
	Minimum		332	
	Maximum		458	
	Range		126	
	Interquartile Range		103	
	Skewness		1.285	1.014
	Kurtosis		1.257	2.619
P2	Mean		368.75	77.637
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	121.67	
		Upper Bound	615.83	
	5% Trimmed Mean		366.11	
	Median		345.00	
	Variance		24110.250	
	Std. Deviation		155.275	
	Minimum		221	
	Maximum		564	

P3	Range		343		
	Interquartile Range		295		
	Skewness		.604	1.014	
	Kurtosis		-1.849	2.619	
	Mean		465.25	50.483	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		304.59	
		Upper Bound		625.91	
	5% Trimmed Mean		464.39		
	Median		457.50		
	Variance		10194.250		
	Std. Deviation		100.967		
	Minimum		372		
	Maximum		574		
	Range		202		
	Interquartile Range		187		
	Skewness		.158	1.014	
Kurtosis		-4.889	2.619		

Tests of Normality							
	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GDA_hari_13	K-	.174	4	.	.985	4	.930
	K+	.207	4	.	.966	4	.817
	P1	.274	4	.	.877	4	.324
	P2	.222	4	.	.948	4	.703
	P3	.189	4	.	.991	4	.965

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances			
GDA_hari_13			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.117	4	15	.385



ANOVA					
GDA_hari_13					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1653.800	4	413.450	.028	.998
Within Groups	220322.750	15	14688.183		
Total	221976.550	19			

Tests of Normality							
	kelompo k	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	df	Sig.	Statisti c	df	Sig.
GDA_hari_ 25	K-	.194	4	.	.971	4	.848
	K+	.235	4	.	.885	4	.362
	P1	.239	4	.	.898	4	.421
	P2	.238	4	.	.940	4	.651
	P3	.281	4	.	.861	4	.264
a. Lilliefors Significance Correction							

Test of Homogeneity of Variances			
GDA_hari_25			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.805	4	15	.025

ANOVA					
GDA_hari_25					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34912.700	4	8728.175	.963	.456
Within Groups	135980.250	15	9065.350		
Total	170892.950	19			

Lampiran 4.1.5 Hasil dan Uji Statistik Pengamatan Kepadatan Kolagen

	 Kelompok	 Persentase_Kolagen
1	1	21.95
2	1	22.79
3	1	19.36
4	1	34.29
5	2	49.00
6	2	49.90
7	2	51.87
8	2	45.65
9	3	53.40
10	3	61.83
11	3	51.03
12	3	44.59
13	4	41.93
14	4	45.51
15	4	31.62
16	4	35.30
17	5	73.31
18	5	55.99
19	5	53.47
20	5	36.75

Descriptives					
Kelompok			Statistic	Std. Error	
Persentase_Kolagen	K-	Mean	24.5982	3.31147	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	14.0596	
			Upper Bound	35.1368	
		5% Trimmed Mean	24.3506		
		Median	22.3697		
		Variance	43.863		
		Std. Deviation	6.62294		
		Minimum	19.36		
		Maximum	34.29		
		Range	14.92		
		Interquartile Range	11.40		
		Skewness	1.703	1.014	
		Kurtosis	3.182	2.619	
	K+	Mean	49.1035	1.29849	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	44.9711	
			Upper Bound	53.2358	
		5% Trimmed Mean	49.1419		
		Median	49.4494		
		Variance	6.744		
		Std. Deviation	2.59699		
		Minimum	45.65		
		Maximum	51.87		
		Range	6.22		
		Interquartile Range	4.89		
		Skewness	-.749	1.014	
		Kurtosis	1.275	2.619	
	P1	Mean	52.7138	3.56547	
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	41.3669		
		Upper Bound	64.0607		
5% Trimmed Mean		52.6586			
Median		52.2172			
Variance		50.850			
Std. Deviation		7.13093			
Minimum		44.59			
Maximum		61.83			
Range		17.25			
Interquartile Range		13.53			
Skewness		.400	1.014		
Kurtosis		1.059	2.619		
P2	Mean	38.5918	3.14342		
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	28.5880		
		Upper	48.5955		

		Bound		
	5% Trimmed Mean		38.5947	
	Median		38.6183	
	Variance		39.524	
	Std. Deviation		6.28683	
	Minimum		31.62	
	Maximum		45.51	
	Range		13.90	
	Interquartile Range		12.08	
	Skewness		-.016	1.014
	Kurtosis		-3.032	2.619
P3	Mean		54.8784	7.48156
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	31.0687	
		Upper Bound	78.6880	
	5% Trimmed Mean		54.8619	
	Median		54.7302	
	Variance		223.895	
	Std. Deviation		14.96312	
	Minimum		36.75	
	Maximum		73.31	
	Range		36.56	
	Interquartile Range		28.05	
	Skewness		.059	1.014
	Kurtosis		1.361	2.619

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persentase_Kolagen	K-	.357	4	.	.822	4	.147
	K+	.234	4	.	.968	4	.827
	P1	.212	4	.	.983	4	.922
	P2	.203	4	.	.957	4	.763
	P3	.220	4	.	.972	4	.852

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances			
Persentase_Kolagen			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.215	4	15	.345

ANOVA					
Persentase_Kolagen					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2503.962	4	625.991	8.578	.001
Within Groups	1094.631	15	72.975		
Total	3598.594	19			

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: Persentase_Kolagen							
	(I) Kelompo k	(J) Kelompo k	Mean Differe nce (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	K-	K+	- 24.5052 5*	6.040 51	.001	- 37.380 3	- 11.630 2
		P1	- 28.1155 8*	6.040 51	.000	- 40.990 6	- 15.240 5
		P2	- 13.9935 4*	6.040 51	.035	- 26.868 6	- 1.1185
		P3	- 30.2801 7*	6.040 51	.000	- 43.155 2	- 17.405 1
	K+	K-	24.5052 5*	6.040 51	.001	11.630 2	37.380 3
		P1	- 3.61033	6.040 51	.559	- 16.485 4	9.2647
		P2	10.5117 1	6.040 51	.102	- 2.3633	23.386 7
		P3	- 5.77492	6.040 51	.354	- 18.650 0	7.1001
	P1	K-	28.1155 8*	6.040 51	.000	15.240 5	40.990 6
		K+	3.61033	6.040 51	.559	- 9.2647	16.485 4
		P2	14.1220 4*	6.040 51	.034	1.2470	26.997 1
		P3	- 2.16459	6.040 51	.725	- 15.039 6	10.710 4
	P2	K-	13.9935 4*	6.040 51	.035	1.1185	26.868 6
		K+	- 10.5117 1	6.040 51	.102	- 23.386 7	2.3633
		P1	- 14.1220 4*	6.040 51	.034	- 26.997 1	- 1.2470
		P3	- 16.2866 3*	6.040 51	.017	- 29.161 7	- 3.4116

	P3	K-	30.2801 7*	6.040 51	.000	17.405 1	43.155 2
		K+	5.77492	6.040 51	.354	- 7.1001	18.650 0
		P1	2.16459	6.040 51	.725	- 10.710 4	15.039 6
		P2	16.2866 3*	6.040 51	.017	3.4116	29.161 7

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

