



**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK
PROANTOSIANIDIN KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao*
L.) TERHADAP JUMLAH SEL FIBROBLAS DAN PEMBULUH
DARAH PADA SOKET PASCA PENCABUTAN GIGI TIKUS**

SKRIPSI

Oleh

Nada Ocarina Savitri

NIM 161610101037

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK
PROANTOSIANIDIN KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao*
L.) TERHADAP JUMLAH SEL FIBROBLAS DAN PEMBULUH
DARAH PADA SOKET PASCA PENCABUTAN GIGI TIKUS**

SKRIPSI

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

Oleh

Nada Ocarina Savitri

NIM 161610101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat ridho serta perlindungan-Nya
2. Orang tua saya tercinta, Bapak Nurhidayat Yuliadi dan Ibu Retno Setyowati yang selalu memberikan dukungan semangat, kasih sayang, nasehat kesabaran, motivasi serta do'a yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
3. Guru-guru sejak TK, SD, SMP, SMA yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang sangat bermanfaat
4. Segenap almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

MOTTO

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”

(Q.S. Al-Insyirah: 6-8)

“Allah akan meninggikan derajat orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang memiliki ilmu pengetahuan.”

(Qs. Al-Mujadillah: 11)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nada Ocarina Savitri

NIM : 161610101037

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 12 Maret 2020

Yang menyatakan,

Nada Ocarina Savitri

161610101037

SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus

Oleh

Nada Ocarina Savitri

NIM 161610101037

Dosen Pembimbing Utama : drg. Budi Yuwono, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Yani Corvianindya Rahayu M.KG

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus” telah di uji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada :

Hari, tanggal : Kamis, 12 Maret 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Zainul Cholid, Sp.BM

drg. Winny Adriatmoko, M.Kes

NIP. 197105141998021001

NIP. 195610121984031002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Budi Yuwono, M.Kes

drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG

NIP. 196709141999031002

NIP. 197308251998022001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

drg. R Rahardyan Parnaadji, M.Kes.,Sp.Prof.

NIP.196901121996011001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus; Nada Ocarina Savitri; 161610101037; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Pencabutan gigi adalah suatu proses pengeluaran gigi dari alveolus, dimana pada gigi tersebut sudah tidak dapat dilakukan perawatan lagi. Akibat dari pencabutan gigi ini adalah rusaknya jaringan periodontal dan pembuluh darah di sekitar gigi yang memicu respon tubuh sehingga menyebabkan terjadinya proses penyembuhan luka. Pada umumnya, proses penyembuhan luka terdiri dari fase inflamasi, proliferasi dan remodeling. Namun apabila reaksi inflamasi yang terjadi berlebihan dapat menghambat proses penyembuhan. Di sinilah antiinflamasi sangat berperan untuk mempersingkat inflamasi ke tahap selanjutnya. Salah satu bahan alami yang memiliki potensi untuk mempercepat penyembuhan luka adalah kulit buah kakao. Di Jember merupakan salah satu produsen biji kakao terbesar di pulau Jawa. Selama ini pemanfaatan dari kakao hanya diambil bijinya saja, sedangkan kulit buahnya belum dimanfaatkan secara optimal, sehingga menjadi limbah yang merugikan. Kulit buah kakao memiliki beberapa kandungan, diantaranya proantosianidin yang merupakan komponen polifenol terbanyak pada kakao yaitu sebesar 58%. Proantosianidin memiliki berbagai macam manfaat, salah satunya adalah sebagai antiinflamasi. Sehingga mampu mempercepat proses penyembuhan.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *experimental laboratories* dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2019 sampai dengan bulan Desember 2019. Sampel yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus wistar jantan yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol positif yaitu dengan diberi gel oxyfresh, kelompok kontrol negatif yang diberi gel placebo dan kelompok perlakuan yang diberi gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma*

cacao L.) 100 mg/ml. Kemudian masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kelompok hari ke 7 dan 14. Hewan coba dianastesi kemudian dilakukan tindakan pencabutan pada gigi molar satu kiri rahang bawah. Kemudian lakukan aplikasi gel sebanyak satu kali sehari selama 7 dan 14 hari sesuai kelompok hewan. Selanjutnya dilakukan eutanasia dilakukan pada hari ke-7 dan ke-14 sesuai kelompok perlakuan, lalu lakukan pemotongan rahang bawah tikus dengan arah bukolingual, dilanjutkan dengan pembuatan jaringan secara histologis. Pemeriksaan histologi fibroblas dan pembuluh darah dilakukan pengamatan pada soket dengan pembesaran 400x sebanyak 3 lapang pandang yaitu pada puncak soket bukal, puncak soket bukal dan apikal soket, yang dilakukan oleh 3 pengamat pada daerah yang sama. Pada sel fibroblas setelah dilakukan pengamatan pada 3 lapang pandang kemudian dilakukan pengambilan gambar dan dimasukkan ke dalam aplikasi *imageJ* untuk mengetahui jumlah sel fibroblas.

Data dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, uji homogenitas menggunakan *Levene-Test*. Data yang diperoleh karena berdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way Anova* dan dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Difference*). Jumlah fibroblast dan Pembuluh darah paling tinggi yaitu pada kelompok kontrol positif yang diberi gel Oxyfresh, kemudian pada kelompok perlakuan yang diberi gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100 mg/ml, dan yang terakhir pada kelompok kontrol negatif yang diberi gel Placebo. Pada hasil uji LSD (*Least Significant Difference*) menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol positif yang diberi gel Oxyfresh dan pada kelompok perlakuan yang diberi gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100 mg/ml. Sehingga kesimpulannya adalah gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100 mg/ml mampu meningkatkan jumlah fibroblas dan pembuluh darah.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat mengemban ilmu dengan baik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, motivasi, semangat, dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan perlindungan-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros. selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Budi Yuwono, M.Kes selaku dosen pembimbing utama dan drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memotivasi, meluangkan waktu, kesabaran, pikiran, tenaga, dan ilmu dalam membimbing sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Zainul Cholid, Sp.BM selaku dosen penguji ketua dan drg. Winny Adriatmoko, M.Kes selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan tugas akhir saya;
5. Prof. Dr. drg. Hj. Herniyati. M.Kes. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan motivasi kepada saya;
6. Segenap almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Kedua orangtua yang saya cintai bapak Nurhidayat Yuliadi dan ibu Retno Setyowati yang selalu memberikan dukungan semangat, kasih sayang, nasehat, kesabaran, motivasi serta do'a yang tiada henti;

8. Kedua kakak saya Megasari Kusuma dan Bayu Citra Raharja yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, dan yang menguatkan saya;
9. Pihak-pihak yang berjasa dalam penelitian: mas Agus, dan bu Wahyu;
10. Teman - teman penelitian, Anya Tania dan Kristin Rizki yang sangat membantu saya dalam penelitian Proantosianidin ini;
11. Sahabat-sahabat Tim Hore (Reganita dan Rida), Sahabat Bangsuy (Anya, Kristin dan Diska), Sahabat si Anying (Ina, Cho, Ajeng dan Cimon), Sahabat Fakultas Pergigian (Risma, Selly dan Nunung), Sahabat Mantu Idaman (Risma dan Vina), Sahabat Serbaguna (Velly, Ima dan Okhsin), Cumi Regenerasi (Sella, Fitri, Farroh dan Mila) yang selalu memberi dukungan, motivasi, dan menghibur saya,;
12. Teman-teman yang selalu membantu memberi semangat, dukungan dan mendengar keluh kesah saya Nimas, Alfian, Nagara, Ghina, Shintya, Ghafran, Fairuz, Akbar, Devi, Novia, Nandita, Maya, Richlatussoliha dan Dinda;
13. Teman-teman tutor Zirkonia, Keluarga NIM 37 (37fams) dan Teman-teman KKN Sememu Pasirian yang sudah menemani dan memberikan semangat;
14. Teman-teman SD, SMP, SMA (VICTORY- SMADA JEMBER) yang selalu membantu saya disaat saya susah dan saat saya membutuhkan bantuan;
15. Keluarga Lisma yang selalu Jaya;
16. Seluruh teman-teman DEXTRA 2016 terimakasih atas kerjasama dan kebersamaannya selama ini;
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari keterbatasan dan kekurangan penulisan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 12 Maret 2020

Penulis

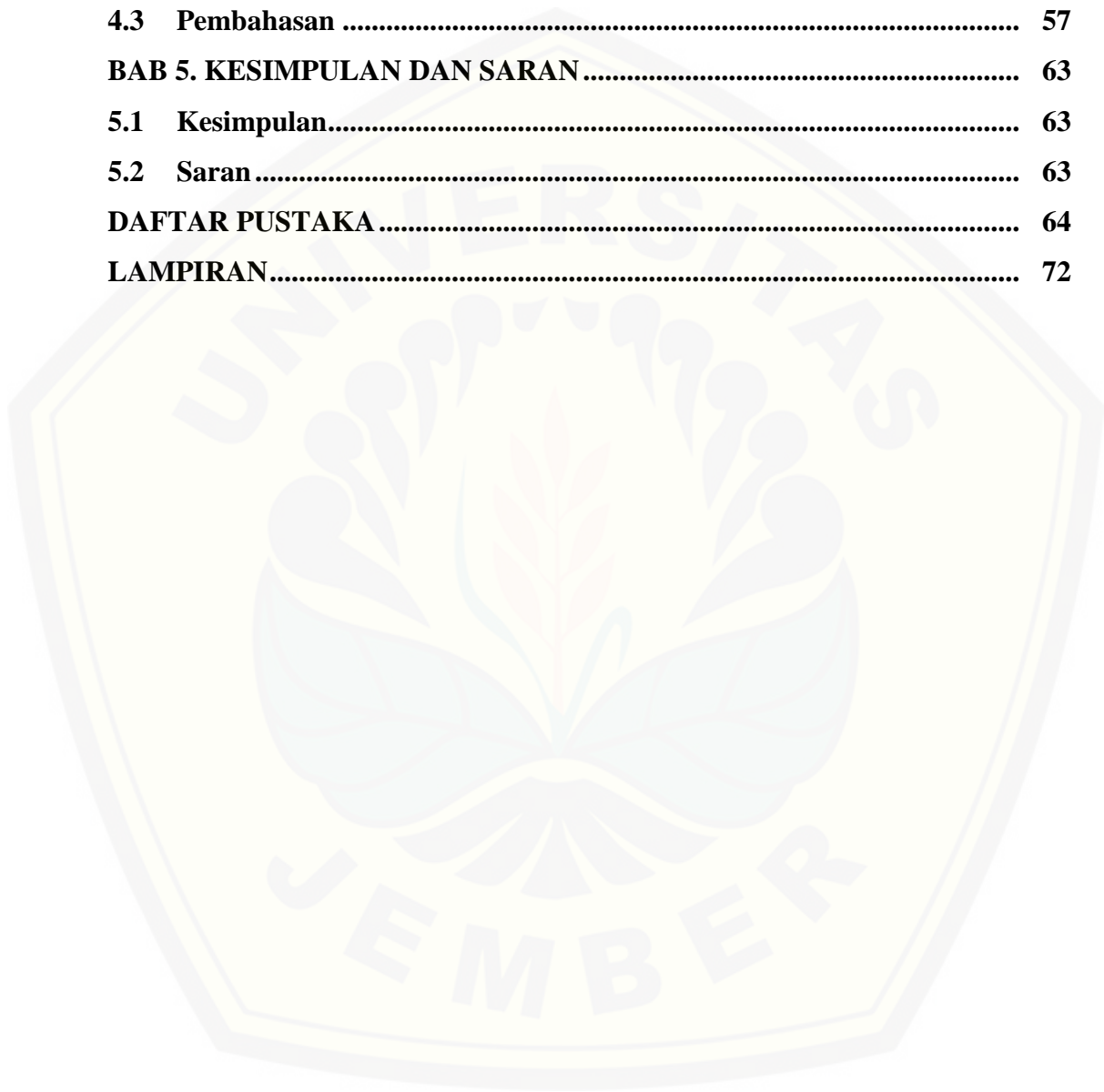
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN.....	v
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Pencabutan Gigi.....	5
2.2 Penyembuhan Luka.....	6
2.2.1 Pengertian Luka	6
2.2.2 Proses Penyembuhan Luka	6
2.2.3 Klasifikasi Penyembuhan Luka	7
2.2.4 Fase Penyembuhan Luka	8
2.2.5 Penyembuhan Soket Pasca Pencabutan Gigi	11
2.2.6 Penyembuhan Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus	12
2.2.7 Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka	12
2.3 Sel Fibroblas.....	13

2.3.1	Struktur Sel Fibroblas	13
2.3.2	Metode Pengamatan.....	14
2.3.3	Peran Sel Fibroblas Pada Proses Penyembuhan Luka	15
2.4	Pembuluh Darah.....	16
2.4.1	Struktur Sel Pada Pembuluh Darah.....	16
2.4.2	Metode Pengamatan.....	17
2.4.3	Peran Pada Proses Penyembuhan Luka	18
2.5	Kakao	19
2.5.1	Taksonomi Kakao	19
2.5.2	Morfologi Kakao.....	21
2.5.3	Kulit Buah Kakao	23
2.6	Proantosianidin	24
2.7	Media Sediaan	25
2.8	Oxyfresh.....	26
2.9	Gel Placebo	27
2.10	Aplikasi ImageJ	27
2.11	Kerangka Konsep	28
2.12	Penjelasan Kerangka Konsep.....	29
2.13	Hipotesis	30
BAB 3. METODE PENELITIAN.....		31
3.1	Jenis Penelitian.....	31
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	31
3.2.1	Tempat Penelitian	31
3.2.2	Waktu Penelitian.....	31
3.3	Variabel Penelitian	31
3.3.1	Variabel Bebas	31
3.3.2	Variabel Terikat	32
3.3.3	Variabel Terkendali	32
3.4	Definisi Operasional	32
3.4.1	Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao	32
3.4.2	Pencabutan Gigi Tikus.....	32

3.4.3	Jumlah Sel Fibroblas.....	33
3.4.4	Pembuluh Darah.....	33
3.5	Sampel Penelitian.....	33
3.5.1	Subyek Penelitian.....	33
3.5.2	Besar Sampel	33
3.5.3	Kriteria Sampel	34
3.6	Alat dan Bahan	34
3.6.1	Alat Penelitian.....	34
3.6.2	Bahan Penelitian	35
3.7	Penghitungan Dosis	35
3.7.1	Dosis Ketamin.....	35
3.7.2	Dosis Oxyfresh.....	35
3.8	Prosedur Penelitian	35
3.8.1	<i>Ethical Clearance</i>	35
3.8.2	Persiapan Hewan Coba	35
3.8.3	Identifikasi Tanaman	36
3.8.4	Pemilihan Kakao.....	36
3.8.5	Pembuatan Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao	36
3.8.6	Pembuatan Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao.....	37
3.8.7	Pengelompokan Hewan Coba.....	38
3.8.8	Pencabutan Gigi Tikus	39
3.8.9	Aplikasi Gel Perlakuan Kulit Buah Kakao	40
3.8.10	Eutanasia Hewan Coba	40
3.8.11	Pembuatan Sediaan Histologi	41
3.8.12	Tahap Pengamatan dan Perhitungan jumlah sel Fibroblas	45
3.8.13	Tahap Pengamatan dan Perhitungan Pembuluh Darah.....	45
3.9	Analisis Data	45
3.10	Alur Penelitian	46
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		47
4.1	Hasil Penelitian	47
4.1.1	Fibroblas	48

4.1.2 Pembuluh Darah.....	50
4.2 Analisis Data	52
4.2.1 Fibroblas	52
4.2.2 Pembuluh Darah.....	55
4.3 Pembahasan	57
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	63
5.1 Kesimpulan.....	63
5.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	72



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses Penyembuhan Luka Primer Dan Sekunder	8
2.2 Perbedaan Sel Fibroblas Aktif Dan Diam	14
2.3 Gambaran Proliferasi Sel Fibroblas.....	15
2.4 Gambaran Neovaskular	17
2.5 Percabangan Tanaman Kakao.....	20
2.6 Biji Kakao Jenis Lindak.....	20
4.1 Gambaran Histologis Jaringan Soket.....	48
4.2 Gambaran Histologis sel Fibroblas.....	48
4.3 Histogram Rerata Jumlah Sel Fibroblas	49
4.4 Gambaran Histologis Pembuluh Darah	50
4.5 Histogram Rerata Jumlah Pembuluh Darah	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Proses Pengecatan <i>Haematoksilin Eosin</i> (HE).....	44
4.1 Hasil rata-rata penghitungan jumlah sel fibroblast	49
4.2 Hasil rata-rata penghitungan jumlah Pembuluh Darah	51
4.3 Hasil uji One-way Anova Fibroblas	53
4.4 Hasil uji post hoc LSD Fibroblas	53
4.5 Hasil uji LSD Fibroblas hari ke-7	54
4.6 Hasil uji LSD Fibroblas hari ke-7	54
4.7 Hasil uji One-way Anova Pembuluh Darah	55
4.8 Hasil uji post hoc LSD Pembuluh Darah	56
4.9 Hasil uji LSD Pembuluh Darah hari ke-7	56
4.10 Hasil uji LSD Pembuluh Darah hari ke-14	57

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Keterangan Ethical Clearance	72
Lampiran B. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman.....	73
Lampiran C. Surat Keterangan Identifikasi Kandungan Proantosianidin.....	74
Lampiran D. Surat Keterangan Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kakao	75
Lampiran E. Surat Ijin Laboratorium Biomedik	76
Lampiran F. Interpretasi Hasil Analisis HPLC Ls-Ms Proantosianidin	77
Lampiran G. Alat dan Bahan Penelitian	78
Lampiran H. Proses Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kakao.....	82
Lampiran I. Gambaran Histologis Pada Perbesaran	84
Lampiran J. Data Hasil Penelitian.....	90
Lampiran K. Analisis Data Jumlah Sel Fibroblas.....	93
Lampiran L. Analisis Data Jumlah Pembuluh Darah.....	95

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Pencabutan gigi merupakan hal yang umum dilakukan dalam praktek kedokteran gigi. Pencabutan gigi akan meninggalkan soket gigi dan menimbulkan luka disekitar jaringan lunak (Risa 2017). Tindakan pencabutan gigi akan menyebabkan peradangan dan perdarahan di sekitar daerah luka. Tubuh mempunyai kemampuan untuk merespon injuri melalui proses penyembuhan luka (Hendrik, 2017).

Proses penyembuhan luka terdiri atas fase inflamasi, proliferasi dan remodeling jaringan. Fase inflamasi yang ditandai dengan adanya leukosit PMN terutama neutrofil dan makrofag (Risa, 2017). Fase proliferasi ditandai dengan migrasi sel granulasi seperti sel fibroblas, sel endotel. Peran sel fibroblas yaitu untuk menghasilkan produk protein yang digunakan untuk biosintesis kolagen yang akan membentuk kerangka jaringan (Velnar et.al., 2009). Sel endotel akan membentuk angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru. Fase remodeling terjadi proses penyembuhan luka berupa maturasi kolagen, kontaksi dan remodeling jaringan (Risa, 2017).

Bahan terapi tambahan untuk proses penyembuhan dapat menggunakan Oxyfresh Dental Gel (ODG) yaitu gel antibakteri dengan *Oxygene* yang merupakan salah satu bahan antimikroorganisme yang mengandung *chlorine dioxide* yang mampu membunuh hampir semua jenis bakteri, jamur, alga dan virus. *Folic acid* yang membantu regenerasi sel tubuh dan *Aloevera* yang berfungsi mempercepat penyembuhan luka (Anton et.al, 2015). Namun obat-obatan kimia memiliki efek samping yaitu perdarahan gastrointestinal, lamanya waktu perdarahan, serta dapat merusak fungsi ginjal. Sehingga diperlukan suatu

bahan yang memiliki efek samping seminimal mungkin tetapi memiliki efektivitas tinggi (Hapsari, 2014).

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai alternatif obat penyembuhan luka adalah kakao (*Theobroma cacao L.*). Salah satu perkebunan di wilayah II yang menjadi andalan produksi kakao khususnya berada di Kebun Banjarsari Afdeling Gerengrejo Jember. Produksi kakao yang paling melimpah adalah jenis *bulk* (Lindak) (Fadilah, 2017). Jenis Lindak memiliki ciri bijinya gepeng dan berwarna ungu, kulit buahnya keras dan sulit diiris. Memiliki cita rasa coklat yang kuat dan warna yang gelap, karena paling banyak mengandung polifenol dibandingkan jenis lainnya (Siregar et al., 2002).

Kulit buah kakao merupakan limbah dari industri pengolahan coklat. Perkiraan kulit buah kakao yang dihasilkan industri pengolahan coklat pada tahun 2012 sebanyak 52.500 ton per tahun dan meningkat menjadi 60.000 ton pada tahun 2014. Kulit biji kakao berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan karena mengandung senyawa polifenol dengan total fenolik sebesar 5,78 %, polifenol pada kulit biji kakao antara lain prosianidin, epikatekin, p-hidroksibenzoic acid, antosianin, proantosianidin dan clovamid (Ratri, 2017).

Kakao mengandung senyawa flavonoid lebih tinggi dibanding dengan kandungan flavonoid pada tanaman lain seperti pada teh hijau. Kandungan beberapa senyawa fenolik pada kakao di antaranya kandungan flavonoid (37%), proanthocyanidins (58%), dan anthocyanin (4%) (Carla, 2017). Sedangkan pada teh hijau Kandungan polifenol antara lain flavonoid dan asam fenolik (hingga 30% dari berat kering). Flavonoid yang paling penting adalah katekin (kandungan sekitar 10% dari berat kering) (Cahyani, 2015).

Proantosianidin adalah polimer dari flavonoid. Proantosianidin sebagai anti-inflamasi mampu mempercepat proses radang ke tahap proliferasi sehingga proses penyembuhan menjadi lebih cepat (Ardhiana, 2015). Mekanisme kerja Proantosianidin adalah berupa merangsang sel-sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin seperti *EGF*, *TGF- β* dan *IL-4*. *TGF- β* dan

EGF berfungsi untuk induksi angiogenesis dan proliferasi fibroblas sehingga dapat menginduksi sintesa kolagen mengaktivasi makrofag untuk memulai proses kemotaksis (Fuadi *et al.*, 2015).

Bentuk sediaan dari ekstrak proantosianidin yang dipilih adalah gel dengan alasan gel bersifat padat, lunak dan kenyal sehingga dalam pengaplikasian jaringan luka lebih mudah diletakkan dalam soket bekas pencabutan, dapat dengan cepat meresap ke dalam jaringan dan dapat bertahan lama dalam soket sampai pada saatnya masuk ke dalam proses penyembuhan luka (Zulfitri *et al.*, 2012).

Peneliti ingin mengetahui efek dari ekstrak gel proantosianidin kulit buah kakao terhadap penurunan proses peradangan yang dilihat dari jumlah sel fibroblas, dan pembuluh darah pada soket gigi pasca pencabutan pada tikus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimanakah pengaruh dari pemberian gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap jumlah sel fibroblas dan pembuluh darah pada soket pasca pencabutan gigi tikus?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap jumlah sel fibroblas dan pembuluh darah pada soket pasca pencabutan gigi tikus

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dapat memberikan informasi dan sebagai bahan pertimbangan bagi masyarakat mengenai peran ekstrak gel proantosianidin kulit buah kakao terhadap pertumbuhan sel fibroblas dan pembuluh darah pasca pencabutan gigi pada tikus,

2. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat dan tenaga kesehatan khususnya dalam mendukung upaya kesehatan gigi dan mulut dengan cara memanfaatkan bahan herbal kulit buah kakao yang mudah didapat,
3. Dapat digunakan sebagai acuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pencabutan Gigi

Pencabutan gigi adalah suatu proses pengeluaran gigi dari alveolus, dimana pada gigi tersebut sudah tidak dapat dilakukan perawatan lagi. Pencabutan gigi juga merupakan tindakan bedah minor pada bidang kedokteran gigi yang melibatkan jaringan keras dan jaringan lunak pada rongga mulut. Pencabutan gigi adalah pengeluaran suatu gigi yang utuh atau sisa akar tanpa menyebabkan rasa sakit dan trauma. Pada tindakan pencabutan gigi harus memerhatikan keadaan lokal maupun keadaan umum dan memastikan penderita dalam keadaan sehat (Lande et al, 2015).

Teknik pencabutan gigi terdiri atas 2 metode yaitu pencabutan intra alveolar dan pencabutan trans alveolar. Pencabutan intra alveolar adalah pencabutan gigi atau akar gigi dengan menggunakan tang atau bein atau keduanya. Metode ini sering disebut *forcep extraction* dan merupakan metode yang bisa dilakukan pada sebagian besar kasus pencabutan gigi. Pencabutan trans alveolar dilakukan pada beberapa kasus terutama pada gigi impaksi, pencabutan dengan menggunakan metode intra alveolar sering kali mengalami kegagalan sehingga perlu dilakukan metode trans alveolar. Metode ini dilakukan dengan terlebih dahulu mengambil sebagian tulang penyangga gigi. Metode ini sering disebut juga metode terbuka atau metode surgical (Rini, 2016)

Tindakan pencabutan gigi akan dijumpai beberapa masalah kesehatan yang sama dan terdapat pada masing-masing pasien pencabutan gigi. Beberapa faktor resiko yang biasanya menjadi penyebab komplikasi pencabutan gigi antara lain penyakit sistemik, umur pasien, keadaan akar gigi, dan adanya gangguan pada sendi temporomandibula. Komplikasi dapat digolongkan menjadi intraoperatif, segera sesudah pencabutan dan jauh setelah pencabutan. Komplikasi yang sering

ditemui pada pencabutan gigi antara lain perdarahan, pembengkakan, rasa sakit, dry socket, fraktur, dan dislokasi mandibula (Lande et al, 2015).

2.2 Penyembuhan Luka

2.2.1 Pengertian Luka

Luka merupakan suatu bentuk kerusakan jaringan pada kulit yang disebabkan kontak dengan sumber panas (seperti bahan kimia, air panas, api, radiasi, dan listrik), hasil tindakan medis, maupun perubahan kondisi fisiologis. Luka menyebabkan gangguan pada fungsi dan struktur anatomi tubuh. Berdasarkan waktu dan proses penyembuhannya, luka dapat diklasifikasikan menjadi luka akut dan kronik. Luka akut merupakan cedera jaringan yang dapat pulih kembali seperti keadaan normal dengan bekas luka yang minimal dalam rentang waktu 8-12 minggu. Sementara luka kronik merupakan luka dengan proses pemulihan yang lambat, dengan waktu penyembuhan lebih dari 12 minggu dan terkadang dapat menyebabkan kecacatan (Purnama, 2015).

2.2.2 Proses Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks karena adanya kegiatan bioseluler dan biokimia yang berkesinambungan. Penggabungan respon vaskuler, aktivitas seluler, dan terbentuknya senyawa kimia sebagai substansi mediator di daerah luka merupakan komponen yang saling terkait pada proses penyembuhan luka. Ketika terjadi luka, tubuh memiliki mekanisme untuk mengembalikan komponen-komponen jaringan yang rusak dengan membentuk struktur baru dan fungsional. Proses penyembuhan luka tidak hanya terbatas pada proses regenerasi yang bersifat lokal, tetapi juga dipengaruhi oleh faktor endogen, seperti umur, nutrisi, imunologi, pemakaian obat-obatan, dan kondisi metabolik (Purnama, 2015).

2.2.3 Klasifikasi Penyembuhan Luka

a) Penyembuhan Primer

Tipe ini, tepi luka akan menyatu sempurna karena tidak ada bagian yang hilang sehingga penyembuhan akan bergerak dari internal ke eksternal. Pada luka ekstra oral regio fasialis, penyembuhan primer diperlukan karena akan menghindarkan terbentuknya scar yang akan mengganggu estetika wajah (Mardiyantoro, 2018).

Penyembuhan luka secara primer, biasanya hanya menyebabkan cedera pada membran epitel basalis, kematian jaringan epitel dan jaringan ikat yang relatif sedikit. Lalu diikuti oleh terbentuknya jaringan granulasi dan penutupan epitel yang baru (Robbins et al, 2007)

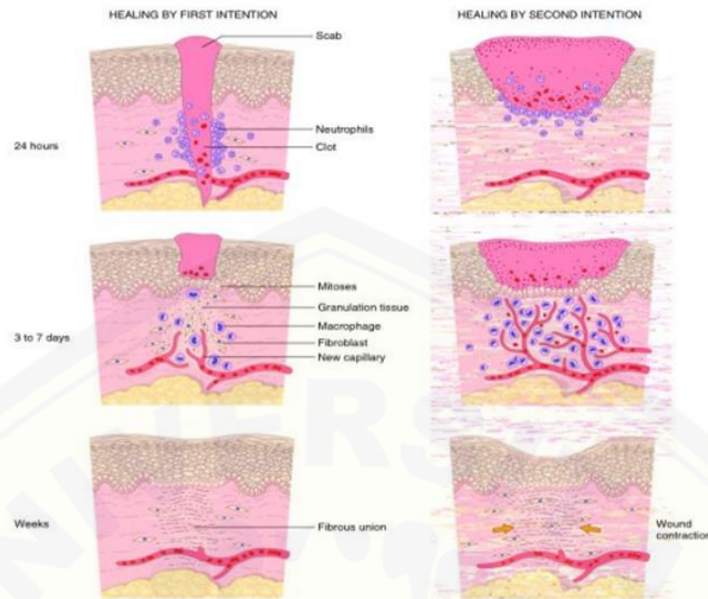
b) Penyembuhan Sekunder

Tipe ini terdapat kehilangan sebagian jaringan, sehingga penyembuhan akan dimulai dengan terbentuknya granulasi pada dasar luka hingga ke permukaan. Kasus penyembuhan pasca ekstraksi gigi akan mengikuti proses penyembuhan tipe ini, dimana terdapat jaringan gigi yang hilang (Mardiyantoro, 2018).

Proses penyembuhan luka secara sekunder ini lebih kompleks dan melibatkan regenerasi jaringan parut. Dalam penyembuhan luka ini, reaksi inflamasi lebih intens dan terdapat pertumbuhan jaringan granulasi yang luas dan diikuti pembentukan scar (Robbins et al, 2007).

c) Penyembuhan Tertier

Tipe ini merupakan penyembuhan luka yang terganggu oleh karena adanya infeksi atau gangguan penyembuhan karena faktor lain, penyembuhan ini akan berjalan lambat dan lama, bahkan terkadang perlu adanya intervensi bedah untuk melakukan penutupan luka (Mardiyantoro, 2018).



Gambar 2.1 Proses penyembuhan luka primer dan sekunder (Sumber: Mardiyantoro, 2018).

2.2.4 Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka dapat dikelompokkan menjadi tiga fase, yaitu:

1. Fase Inflamasi

Fase inflamasi merupakan reaksi tubuh terhadap luka yang dimulai setelah beberapa menit dan berlangsung sekitar 3 hari setelah cedera (Setyarini EA et.al., 2013). Fase inflamasi merupakan suatu bentuk pertahanan jaringan terhadap adanya jejas yang melibatkan pembuluh darah, saraf, limfe, cairan intersisial serta sel-sel di sekitar daerah jejas. Tanda klinis peradangan yaitu berupa tumor, rubor, calor, dolor dan functio laesa. Fase ini akan terjadi vasodilatasi yaitu melebarnya pembuluh darah di sekitar luka (Purnama, 2015). Perubahan struktur sel endotel dan kapiler menyebabkan protein plasma dan leukosit keluar dari pembuluh darah. Pelepasan protein yang mengandung eksudat ke dalam luka menyebabkan vasodilatasi dan pelepasan histamin maupun serotonin. Sitokin proinflamasi seperti IL-1 (*Interleukin-1*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) dan IF- γ (*Interferon gamma*) di daerah jejas mengaktifasi neutrofil

untuk bergerak keluar dari kapiler pembuluh darah. Neutrofil akan masuk ke daerah luka dan mulai membersihkannya dari bakteri serta sisa-sisa debris sel. Neutrofil melepaskan enzim proteolitik yang mencerna bakteri dan jaringan yang tidak berfungsi (Mardiyantoro, 2018).

Setelah 48 jam monosit akan bermigrasi ke area lesi dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang akan berperan melakukan fagositosis di area jejas. Makrofag yang aktif penting untuk transisi ke fase proliferasi serta membantu proses angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru), fibroplasia, dan mensintesis oksida nitrat. Banyak enzim dan sitokin yang disekresikan oleh makrofag termasuk kolagenase yang membersihkan luka, interleukin dan TNF yang merangsang fibroblas (menghasilkan kolagen) dan induksi angiogenesis, serta TGF yang menstimulasi keratinosit (Broughton et al., 2006).

2. Fase Proliferasi

Tahap proliferasi terdiri dari proses pembentukan pembuluh darah, proliferasi epitel, migrasi fibroblas dan pembentukan jaringan yang tergranulasi. Perjalanan proliferasi rata-rata berlangsung selama 2 sampai 4 minggu. Jaringan yang tergranulasi terbentuk oleh pembuluh darah kapiler dan limfatik ke dalam luka (Purnama, 2015).

Tahapan yang berjalan adalah proses pembentukan pembuluh darah baru berupa tunas-tunas yang terbentuk dari pembuluh darah dan akan berkembang menjadi percabangan baru pada jaringan luka. Pada proses ini terjadi proliferasi endotelial selular, pembuluh darah yang rusak akan digantikan dengan pembuluh darah baru yang diawali pembentukan darah kapiler. Stabilitas pembuluh darah yang baru terbentuk tergantung juga oleh deposisi matrik pembentuk sel endotelial. Pembuluh darah memiliki peranan penting dalam perbaikan jaringan untuk memberikan asupan nutrisi bagi jaringan yang sedang beregenerasi (Hendrik, 2017).

Pada tahap ini terjadi proses granulasi dimana terjadi peningkatan proliferasi fibroblas dan biosintesis kolagen yang akan membentuk

kerangka jaringan. Fibroblas tertarik pada daerah luka oleh sejumlah faktor, seperti PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), dan mendominasi populasi sel pada luka. Pada daerah luka fibroblas berkembang dan menghasilkan molekul struktural seperti fibrin, fibronectin, *glycosaminoglycans* (GAGs), kemudian diikuti oleh kolagen. Komponen-komponen ini bersama-sama membangun matriks, sementara fibrin berkontribusi terhadap pembentukan jaringan granulasi (Mardiyantoro, 2018).

Fibroblas membentuk matriks ekstraseluler dan mulai memproduksi tropokolagen. Fibroblas menyimpan tropokolagen yang nantinya digunakan untuk memproduksi kolagen. Keberadaan serabut kolagen yang cukup diperlukan dalam penyembuhan luka, banyak faktor pertumbuhan yang mengatur proliferasi fibroblas yang juga berperan serta dalam sintesis kolagen. Pembentukan kolagen diinduksi oleh sejumlah molekul meliputi faktor pertumbuhan seperti PDGF maupun TGF- β 1 (Robbins et al., 2007)..

3. Fase Remodeling

Fase remodeling merupakan tahap terakhir dari proses penyembuhan luka. Peran utama pada fase ini adalah pengendapan kolagen dalam jaringan. Selama fase ini sel-sel makrofag, sel endotel, fibroblas, dan myofibroblas mengalami apoptosis keluar dari daerah luka. Kolagen selanjutnya berkembang cepat membentuk matriks. Awalnya serabut kolagen terdistribusi secara acak membentuk persilangan dan beragregasi membentuk serabut fibrin yang secara perlahan menyebabkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan serta kekuatan ketegangan luka (Mardiyantoro, 2018).

Remodelling kolagen selama fase maturasi tergantung pada berlangsungnya sintesis kolagen dan adanya degradasi kolagen. Kolagenase dan metalloproteinase di dalam luka membuang kelebihan kolagen sementara sintesis kolagen yang baru tetap berlangsung. Selama remodeling, kolagen menjadi lebih terorganisir. Pada saat ini serabut-

serabut kolagen menutup bersama, menyebabkan kolagen crosslinking dan akhirnya mengurangi ketebalan scar. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan, mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis (Pramono, 2016)

2.2.5 Penyembuhan Soket Pasca Pencabutan Gigi

Proses penyembuhan luka tersebut terjadi ketika gigi dicabut, soket gigi yang kosong yang terdiri dari tulang kortikal (secara radiografik terlihat sebagai lamina dura) ditutupi oleh ligamen periodontal yang terputus, dengan sejumlah epitel mukosa yang tertinggal di bagian korona. Segera setelah ekstraksi soket gigi akan diisi dengan darah dari pembuluh darah yang terputus, yang mengandung protein dan sel-sel yang rusak. Segera setelah pencabutan gigi terjadi perdarahan pada soket gigi dan diikuti oleh terbentuknya bekuan darah. Jaringan fibrin yang terbentuk secara perlahan menutup pembuluh darah yang rusak diikuti terjadinya vasodilatasi yang kemudian terjadi migrasi leukosit dan pembentukan lapisan fibrin. Pada hari yang sama terjadi proses inflamasi, neutrofil migrasi ke daerah luka dan memfagosit jaringan nekrotik (Milorio, 2004).

Fase proliferasi dimulai pada hari ke-3 sesudah terjadinya jejas, ditandai dengan terbentuk jaringan granulasi terdiri dari pembuluh darah baru (*neovascular*), fibroblas, dan makrofag. Selanjutnya pada fase pembentukan jaringan, epitelisasi dan jaringan granulasi akan mengisi dan menutupi daerah luka guna memperbaiki kepadatan dan kerapatan jaringan. Dua minggu pasca ekstraksi, epitel berproliferasi melewati permukaan luka tetapi luka biasanya belum tertutup sempurna. Tepi dari soket alveolar diresorpsi oleh osteoklas. Pada minggu ketiga akan hampir terisi penuh oleh jaringan granulasi yang matang. Tulang trabekula muda yang berasal dari osteosid atau tulang yang belum terkalsifikasi terbentuk di seluruh tepi luka dari dinding soket. Tulang kortikal dari soket alveolar mengalami remodeling sehingga terdiri dari lapisan yang

padat. Tepi dari puncak alveolar akan diresorpsi oleh osteoklas. Pada saat ini, luka akan terepitelisasi secara sempurna (Hendrik, 2017).

Pada minggu keempat, luka mengalami tahap akhir penyembuhan. Sementara itu deposisi dan resorpsi tulang terjadi pada soket. Antara minggu keempat dan kedelapan setelah ekstraksi, jaringan osteogenik dan tulang trabekular dibentuk dan diikuti oleh proses pematangan tulang. Proses remodeling akan berlanjut selama beberapa minggu. Tulang masih mengalami sedikit kalsifikasi, sehingga akan terlihat radiolusen pada gambaran radiografik. Pada gambaran radiografik, proses pembentukan tulang tidak terlihat menonjol hingga minggu ke enam pasca ekstraksi (Mardiyantoro, 2018).

2.2.6 Penyembuhan Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus

Pada proses penyembuhan soket gigi pasca pencabutan pada tikus mengalami proses mirip pada manusia. Dimana yang membedakan hanya waktu terjadinya. Proses penyembuhan luka pada terbagi menjadi 4 fase yaitu koagulasi atau hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling. Tahap inflamasi dan hemostatis langsung terjadi beberapa saat setelah ekstraksi. Tahap proliferasi dimulai pada hari ke-3 sampai hari ke-7. Pada proses penyembuhan luka terjadi migrasi sel fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler, sintesis kolagen, angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi. Proses granulasi paling maksimal yaitu pada hari ke-7 sampai ke-14 dan mengalami penurunan pada hari ke 21, dimana hal ini menandakan bahwa fase proliferasi akan berakhir dan mulai berganti dengan proses remodeling jaringan (Sularsih, 2016).

2.2.7 Faktor yang mempengaruhi Penyembuhan Luka

Gangguan penyembuhan luka dapat meliputi faktor lokal dan faktor sistemik. Pada faktor lokal terdapat gangguan oksigenasi, terjadi infeksi, adanya benda asing di daerah luka atau kerusakan vaskuler terutama di daerah perifer. Sedangkan gangguan luka yang disebabkan oleh faktor sistemik yaitu adanya iskemia (Luka dengan suplai darah yang buruk akan sembuh dengan lambat),

sex hormone, stress, diabetes melitus, kegemukan, terapi kortikosteroid, merokok, kondisi imunokompromis dan kekurangan nutrisi (Mardiyantoro, 2018).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi dalam penyembuhan luka, Faktor yang mempegaruhi penyembuhan luka perineum diantaranya yaitu, status nutrisi, istirahat, stress, infeksi, merokok, kondisi medis dan pengobatan, dan obesitas. Faktor yang mempengaruhi proses penyembuhan luka salah satunya status nutrisi, diperlukan asupan protein, vitamin A dan C. Protein mensuplai asam amino yang dibutuhkan untuk perbaikan jaringan dan degenarasi. Diet yang baik juga mempertahankan tubuh terhadap infeksi. Jika faktor-faktor yang esensial untuk penyembuhan, seperti oksigen, asam amino, vitamin dan mineral, sangat lambat mencapai luka karena lemahnya vaskularisasi maka penyembuhan luka tersebut akan terhambat (Darmawati, 2013)

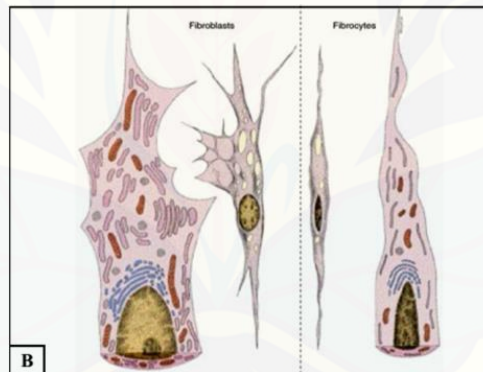
2.3 Sel Fibroblas

Fibroblas merupakan sel yang banyak didapat pada jaringan ikat terutama pada kulit. Sel fibroblas terlibat secara aktif dalam pembentukan serat-serat terutama serat kolagen dan matriks amorf ekstraseluler. Selain itu fibroblas terlibat dalam pertumbuhan normal, proses penyembuhan luka dan aktifitas fisiologis dari tiap jaringan dan organ dalam tubuh. Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan. Sel fibroblas mensekresikan sitokin dan beberapa faktor pertumbuhan (growth factors) diantaranya dapat menstimulasi proliferasi sel dan menghambat proses diferensiasi (Kurniawati, 2015).

2.3.1 Struktur Sel Fibroblas

Fibroblas tersebar luas sebagai sel tetap pada berbagai jaringan ikat, berasal dari sel mesensim yang belum berdiferensiasi dan berfungsi memproduksi matriks ekstrasel jaringan ikat. Gambaran histologik fibroblas berupa sel besar

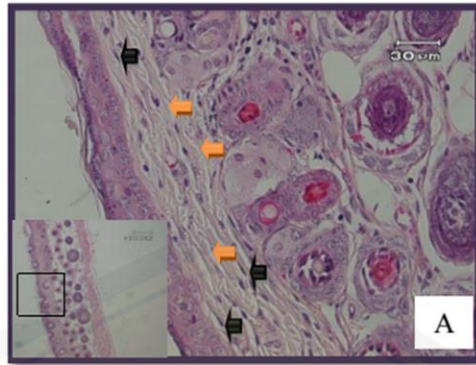
berbentuk gepeng dengan sitoplasma bercabang langsing, atau berbentuk gelendong atau fusiformis. Inti lonjong atau memanjang dengan satu atau dua buah anak inti, batas sel tidak jelas, sitoplasma homogen bersifat basofil karena terdapat banyak retikulum endoplasma granular (menunjukkan aktifitas sintesis untuk menghasilkan matriks ekstrasel). Bila aktivitas sintesis fibroblas berkurang, maka struktur selnya akan berubah. Sitoplasma menjadi basofil lemah dan mengandung sedikit retikulum endoplasma granuler, tetapi ribosom bebas banyak, juga inti menjadi lebih padat dan pipih, sel ini dinamakan fibrosit atau fibroblas inaktif. Kedua jenis sel ini dapat mengalami transisi, yaitu dari fibroblas menjadi fibrosit atau sebaliknya. Fibroblas dikenal sebagai sel tetap pada jaringan ikat, tetapi sel ini masih dapat melakukan pergerakan pada jaringan ikat dan berperan pada regenerasi jaringan yang rusak akibat peradangan atau trauma (contoh: luka bedah) dengan membentuk jaringan parut (Wangko, 2014).



Gambar 2.2 Perbedaan sel fibroblas aktif dan diam. (a) Sel fibroblas aktif; (b) Sel fibroblas diam (Sumber: Wangko, 2014).

2.3.2 Metode Pengamatan

Pengamatan sel fibroblas menggunakan Hematoksilin Eosin (HE) akan tampak inti sel fibroblast dengan jelas dengan satu atau dua inti, sedangkan bagian sitoplasmanya tidak tampak jelas (Aughey et all, 2001). Pengamatan dapat dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x (Amita, 2017).



Gambar 2.3 Gambaran proliferasi sel fibroblas pada hari ke 14 setelah pemberian akuades (A), Sel fibroblas (panah hitam) dan kolagen (panah kuning) (perbesaran 400x). (Sumber: Amita, 2017)

2.3.3 Peran Sel Fibroblas pada Proses Penyembuhan Luka

Proliferasi dari fibroblas menentukan hasil akhir dari penyembuhan luka. Fibroblas akan menghasilkan kolagen yang akan menautkan luka, dan fibroblas juga akan mempengaruhi proses reepitelisasi yang akan menutup luka. Peran fibroblas sangat besar pada proses perbaikan, yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang akan digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Proliferasi fibroblast dalam proses penyembuhan luka secara alami distimulasi oleh *Interleukin-1b* (IL-1b), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Migrasi fibroblast pada area perlukaan distimulasi oleh *Transforming Growth Factor* (TGF- β), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Proses penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh peranan migrasi dan proliferasi fibroblas pada area perlukaan (Juwita, 2010).

Proses penyembuhan luka (*wound healing*) dari awal trauma hingga tercapainya penyembuhan melalui tahapan yang kompleks. Proses ini terdiri dari beberapa fase, yaitu fase homeostasis dan inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi. Pada fase proliferasi, fibroblas memegang peranan yang penting. Fibroblas berasal dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi. Fibroblas akan menghasilkan bahan dasar serat kolagen yang akan mempertautkan tepi luka. Fibroblas juga akan membentuk jaringan ikat yang baru dan memberikan

kekuatan serta integritas pada semua luka sehingga menghasilkan proses penyembuhan yang baik. Meningkatnya jumlah sel fibroblas akan meningkatkan jumlah serat kolagen yang akan mempercepat proses penyembuhan luka (Schwartz, 2000).

Ketika proses penyembuhan luka mengalami kemajuan atau sembuh, jumlah sel fibroblas yang berproliferasi dan pembuluh darah baru akan berkurang. Pada akhirnya, jaringan granulasi yang berkembang menjadi suatu jaringan parut. Saat jaringan parut menjadi matang, akhirnya regresi pembuluh darah akan mengubah jaringan granulasi yang kaya akan pembuluh darah menjadi suatu jaringan parut yang pucat karena vaskularisasi sedikit (Robbins et al., 2007).

2.4 Pembuluh Darah

Sel endotel yang melapisi bagian dalam pembuluh darah merupakan sel-sel target regulator angiogenik. Sel endotel yang terangsang akan memproduksi *matrix metalloproteinases* yang mendegradasi basement membrane dan *extracellular matrix* (ECM), menstimulasi migrasi dan proliferasi sel endotel, mensekresi dan diferensiasi kolagen yang menghasilkan pembentukan tunas dan akhirnya terjadilah pembentukan pembuluh darah baru (Nugroho, 2016).

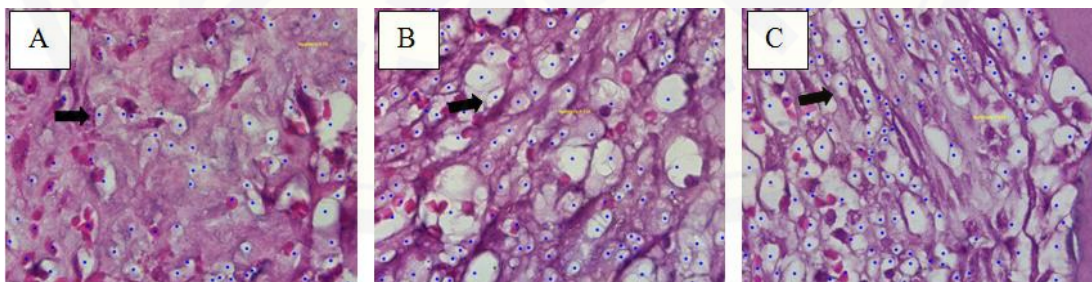
2.4.1 Struktur Sel pada Pembuluh Darah

Proses proliferasi sel endotel diawali dengan pembentukan lumen (kanalisasi) melalui mekanisme intrasel dan intersel termasuk pengerahan dan proliferasi dari perisit (untuk pembuluh darah) serta otot polos (untuk pembuluh darah besar) untuk mendukung dinding endotel dan menyediakan fungsi tambahan, anastomosis dengan sel progenitor endotel lainnya dan pembentukan simpul, perkembangan sirkulasi dan penyesuaian saluran-saluran dengan segmen-segmen arteri dan vena (Nofikasari, 2016).

Pada fase proliferasi rerata pembuluh darah yang terlihat pada preparat histologis lebih banyak dibandingkan pada hari ke-1 (inflamasi) karena pada saat itu kuncup pembuluh darah atau sel progenitor endotel menuju sirkulasi darah ke jaringan granulasi untuk menjadi endotel matur yang akan memulai angiogenesis. Pada hari ke-14 pembuluh darah yang terbentuk mulai stabil dan berkurang jumlahnya karena matriks ekstraselular mulai mengisi daerah yang hilang karena perlukaan, selain itu penurunan aktivitas VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) juga mempengaruhi penurunan jumlah rerata pembuluh darah (Nofikasari, 2016).

2.4.2 Metode Pengamatan

Pengamatan gambaran pembuluh darah dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Menggunakan pewarnaan Hematoxilin Eosin (Hendrik, 2017). Gambaran mikroskopis pembuluh darah yaitu berupa gambaran lumen berbentuk bulat/lonjong yang dibatasi oleh dinding sel yang terdiri dari sel-sel endotel yang tersusun teratur mengelilingi lumen (Robbins&Cotrans, 2007). Dinding pembuluh darah terdiri atas tiga bagian yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia. Tunika intima (tunika interna) terdiri atas selapis sel endotel yang membatasi permukaan dalam pembuluh. Tunika media terdiri dari sel-sel otot polos yang tersusun melingkar (sirkuler). Tunika adventisia terdiri atas jaringan penyambung dengan serabut-serabut elastin (Eroschenko, 2010).



Gambar 2.5 HPA neovaskular penyembuhan socket hari ke-3 dan 5. Keterangan: (A) kelompok HPMC 4% hari ke-3; (B) Kelompok GEGPA 60% hari ke-3; (C) kelompok *gelatin sponge* hari ke-3. Pembesaran 400x. Tanda hitam menunjukkan neovaskular (Sumber: Hendrik, 2017)

2.4.3 Peran Pembuluh Darah pada Proses Penyembuhan Luka

Pembentukan pembuluh darah baru merupakan suatu proses penting dalam penyembuhan luka yang melibatkan faktor pertumbuhan terutama PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factors*) dan FGF (*Fibroblast Growth Factors*), serta sel progenitor endotel. Pembentukan pembuluh darah baru dimulai dengan degradasi pembuluh darah lama dengan menyediakan pembentukan sel progenitor pembuluh darah. Sel progenitor pembuluh darah tersebut kemudian migrasi ke arah distal dari pembuluh darah kapiler semula untuk menstimulasi angiogenik. Migrasi sel progenitor pembuluh darah baru ini dipengaruhi oleh VEGF yang dikeluarkan sel makrofag saat pembuluh darah mengalami kerusakan dan hipoksia. Produksi VEGF juga diregulasi oleh faktor pertumbuhan lain seperti TGF- β dan PDGF. Menurut teori, produksi VEGF dan aktivitas VEGF yang berperan dalam angiogenesis meningkat pada fase awal luka yang mengalami hipoksia, kemudian mengalami penurunan setelah neovaskularisasi telah komplet serta perfusi di area luka telah kembali normal. Selain VEGF, FGF menginisiasi angiogenesis ketika terjadi kerusakan di area luka, FGF akan segera dilepas dan mempengaruhi sel-sel lain. Banyak sel yang memiliki reseptor FGF maka FGF yang terlarut menstimulasi beberapa proses seperti proliferasi dan migrasi sel endothelial (Nofikasari, 2016).

Proses proliferasi sel endotel diawali dengan pembentukan lumen (kanalisasi) melalui mekanisme intrasel yaitu pengerahan dan proliferasi dari perisit (untuk pembuluh darah) serta otot polos (untuk pembuluh darah besar) untuk mendukung dinding endotel, menyediakan fungsi tambahan, anastomosis dengan sel progenitor endotel lain, pembentukan simpul, perkembangan sirkulasi serta penyesuaian saluran-saluran dengan segmen-segmen arteri dan vena. Proses ini berperan memberikan suplai oksigen, nutrisi, sel inflamasi, dan menghilangkan jaringan yang mengalami nekrosis (Nofikasari, 2016).

2.5 Kakao

2.5.1 Taksonomi Kakao

Taksonomi Kakao adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales/Columniferae
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: Theobroma
Spesies	: Theobroma cacao L (Tjitrosoepomo, 2007)

Dari 22 jenis genus *Theobroma* familia Sterculiaceae, hanya *T. cacao* dan *T. grandiflorum* yang diusahakan secara komersial. Kakao tumbuh liar di lembah Amazon dan daerah tropis lainnya di Amerika Tengah dan Selatan. Tanaman kakao menyebar di beberapa negara, di antaranya Belize, Kolombia, Costa Rika, Pantai Gading, Republik Demokrasi Kongo, Dominika, Ekuador, Gabon, Ghana, Guinea, India, Indonesia, Jamaika, Madagaskar, Malaysia, Nigeria, Papua Nugini, Filipina, Samoa, Sao Tome et Principe, Sierra Leone, Srilanka, Suriname, Tanzania, Togo, Trinidad, dan Tobago, Uganda, serta Venezuela (Martono, 2016).

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tumbuhan yang berbentuk pohon hidup di daerah sub tropis dan berasal dari Amerika Selatan. Di alam aslinya kakao tumbuh mencapai tinggi 10 m, namun pada budidaya, tinggi tanaman dibuat tidak lebih dari 5 m. Hal ini dilakukan untuk memperbanyak cabang produktif. Dari biji tumbuhan kakao ini dihasilkan produk olahan yang dikenal sebagai coklat. Sistematika tanaman kakao Divisi *Spermatophyta*, Sub divisi

Angiospermae, Kelas *Dicotyledoneae*, Sub kelas *Dialypetaleae*, Bangsa *Malvales*, Marga *Theobroma*, Jenis *Theobroma cacao* L. (Siregar et al., 2006).

Tanaman kakao termasuk golongan tanaman tahunan (perennial) dan merupakan tanaman dikotil. *Theobroma cacao* dibagi dalam dua subjenis, yaitu *T. cacao* dan *T. sphaerocarpum* (chev.) Cuatr. Subjenis *T. cacao* dikelompokkan menjadi empat forma, yaitu (1) forma *cacao*: sifat biji bulat, biji berkualitas tinggi, dan kotiledon berwarna putih, (2) forma *pentagonum*: berbiji bulat besar, kualitas biji bagus, dan kotiledon berwarna putih, (3) forma *leiocarpum*: biji membulat (plum), kualitas biji bagus, kotiledon berwarna putih atau ungu pucat, dan (4) forma *lacandonense*: kakao liar yang berasal dari Meksiko (Martono, 2016). Tanaman kakao termasuk tanaman caulofloris, yaitu tanaman yang berbunga dan berbuah pada batang dan cabang. Tanaman ini pada garis besarnya dapat dibagi atas dua bagian, yaitu bagian vegetatif yang meliputi akar, batang, daun dan bagian generatif yang meliputi bunga dan buah (Lukito, 2010).



Gambar 2.6 Percabangan tanaman kakao (Sumber: Lukito, 2010)



Gambar 2.7 Biji Kakao jenis Lindak, dimana memiliki ciri khas yaitu biji yang berwarna ungu

2.5.2 Morfologi Kakao

a) Batang (caulis)

Habitat asli tanaman kakao adalah hutan tropis dengan curah hujan dan kelembapan yang tinggi sehingga tanaman tumbuh tinggi. Batang tanaman kakao tumbuh tegak, tinggi tanaman di kebun pada umur 3 tahun dengan kisaran 1,8-3 m dan pada umur 12 tahun mencapai 4,5-7 m, sedangkan kakao yang tumbuh liar ketinggiannya mencapai 20 m. Kakao yang diperbanyak dengan biji akan membentuk batang utama sebelum tumbuh cabang-cabang primer (Martono, 2016).

b) Daun (folium)

Warna flush bervariasi dari kecokelatan, coklat, coklat kemerahan, merah kecokelatan, kemerahan, merah, merah muda, merah cerah, merah tua, dan kuning kemerahan. Daun muda berwarna kuning, kuning cerah, coklat, merah kecokelatan, hijau kecokelatan, hijau kemerahan, dan hijau, panjang daun 10-48 cm dan lebar antara 4-20 cm. Daun kakao merupakan daun tunggal (folium simplex), pada tangkai daun hanya terdapat satu helaian daun. Tangkai daun (petiolus) berbentuk silinder dan bersisik halus (tergantung pada tipenya), pangkal membulat, ujung runcing sampai meruncing dengan panjang \pm 25-28 mm dan diameter \pm 3-7,4 mm. Susunan tulang daun (nervatio) menyirip (penninervis), hanya mempunyai satu ibu tulang daun yang berjalan dari pangkal ke ujung daun dan merupakan terusan dari tangkai daun, alur tulang daun tampak jelas (Martono, 2016).

c) Akar (radix)

Di samping untuk memperkuat berdirinya tanaman kakao, akar tanaman ini berfungsi untuk menyerap air dan zat-zat makanan yang terlarut di dalam air dari dalam tanah serta mengangkut air dan zat-zat makanan ke tempat-tempat yang memerlukan. Tanaman kakao mempunyai akar tunggang yang disertai dengan akar serabut dan berkembang di sekitar permukaan tanah kurang lebih sampai 30 cm. Pertumbuhan akar dapat mencapai 8 m ke arah samping dan 15 m ke arah

bawah. Ketebalan daerah perakarannya 30-50 cm. Pada tanah dengan permukaan air rendah, akar tumbuh panjang, sedangkan pada kedalaman air yang tinggi dan tanah liat, akar tidak begitu dalam dan tumbuh lateral dekat dengan permukaan tanah (Martono, 2016).

d) Bunga (flos)

Letak sebaran bunga dan buah pada batang dan cabang atau bersifat cauliflora. Bunga kakao terdapat hanya sampai cabang sekunder. Bunga kecil dan halus berwarna putih sedikit ungu kemerahan dan tidak berbau, diameter bunga 1-2 cm. Bunga kakao tergolong bunga sempurna terdiri dari daun kelopak (calyx) sebanyak 5 helai berwarna merah muda dan benang sari (androecium) berjumlah 10 helai. Panjang tangkai bunga 2-4 cm. Warna tangkai bunga beragam dari hijau muda, hijau, kemerahan, merah muda, dan merah. Dalam keadaan normal, tanaman kakao dapat menghasilkan bunga sebanyak 6000 – 10.000 per tahun dan hanya sekitar 5% yang dapat menjadi buah (Martono, 2016).

e) Buah (fructus)

Bentuk, ukuran, dan warna buah kakao bervariasi dan merupakan salah satu karakter penting sebagai penciri perbedaan antar genotipe kakao. Berdasarkan bentuk buah terbagi menjadi empat golongan, yaitu Angoleta (buah berbentuk oblong), Cundeamor (buah berbentuk ellips), Amelonado, dan Calabacil (buah berbentuk bulat). Permukaan buah halus, agak halus, agak kasar, dan kasar dengan alur dangkal, sedang, dan dalam, jumlah alur sekitar 10 dengan tebal antara 1-2 cm tergantung jenis klonnya. Panjang buah 16,2- 20,50 dengan diameter 8-10,07 cm. Buah muda bervariasi warnanya, yaitu merah muda, merah muda keputihan, merah muda kecokelatan, merah kecokelatan, merah kehijauan, merah kusam, merah, merah tua, merah tua mengkilap, hijau muda, hijau muda keputihan, kehijauan, hijau, dan kecokelatan. Buah masak berwarna merah kekuningan, kuning kemerahan, kuning cerah, kuning agak kehijauhijauan, dan orange. Buah kakao terdiri dari 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen terbesar dari buah kakao

adalah kulit buah (lebih dari 70% berat buah masak). Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29%, sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah. Kulit dalam (endocarpium) tebal, berdaging, keras seperti kayu saat dikeringkan dengan ketebalan antara 4-8 mm. Buah muda disebut pentil (cherelle) ukurannya kurang dari 10 cm, seringkali mengalami keguguran (cherelle wilt) sebagai gejala spesifik dari tanaman kakao (Martono, 2016).

f) Biji (semen)

Biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian pokok, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%), dan lembaga (0,9%). Jumlah biji per buah sekitar 20-60 dengan kandungan lemak biji 40- 59%. Biji berbentuk bulat telur agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao diselimuti oleh lendir (pulp) berwarna putih. Lapisan yang lunak dan manis rasanya, jika telah masak lapisan tersebut dinamakan pulp atau micilage (Martono, 2016).

2.5.3 Kulit Buah Kakao

Komponen terbesar dari buah kakao adalah kulit buah (lebih dari 70% berat buah masak). Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29%, sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah. Kulit dalam (endocarpium) tebal, berdaging, keras seperti kayu saat dikeringkan dengan ketebalan antara 4-8 mm (Mulato, 2004).

Kandungan kulit buah kakao adalah berupa campuran flavonoid seperti, antosianidin 4%, katekin 37 % dan proantosianidin 58% yang kadang-kadang terikat dengan glukosa dan kuersetin. Tannin yang terikat dengan gula umumnya mudah larut dalam pelarut hidroalkohol, sedangkan tannin terkondensasi atau proantosianidin lebih mudah terekstraksi dengan pelarut aseton 70 % (Carla, 2017).

2.6 Proantosianidin

Proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi. Tanin adalah senyawa fenolik kompleks. Tanin dibagi menjadi dua kelompok atas dasar tipe struktur dan aktivitasnya terhadap senyawa hidrolitik terutama asam, tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tanin yang dapat dihidrolisis (*hydrolyzable tannin*). Proantosianidin berperan sebagai antibakteri yang dapat menggumpalkan protoplasma bakteri (Ibtisam, 2008).

Proantosianidin adalah polimer dari flavonoid, Senyawa ini merupakan trimer yang tersusun dari *epicatechin* dan *catechin*. Proantosianidin memiliki sifat antioksidan dimana dapat menetralkan stres oksidatif dengan penghambatan pembentukan radikal bebas, sebagai anti-inflamasi dimana proantosianidin mencegah peroksidasi lipid dan menghambat pembentukan proinflamasi, serta sebagai antibakteri dengan merusak membrane sel bakteri. Proantosianidin sebagai anti-inflamasi mampu mempercepat proses radang ke tahap proliferasi sehingga proses penyembuhan menjadi lebih cepat. Efek antibakteri dapat sebagai pelindung jaringan dari bakteri dan virus sehingga proses penyembuhan tidak terganggu. Efek antioksidan dapat mengurangi kerusakan sel akibat radikal bebas sehingga fase proliferasi dapat lebih cepat (Ardiana, 2015).

Flavonoid terutama proantosianidin (tanin) yang terkandung dalam ekstrak limbah kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) memiliki kemampuan sebagai bahan antibakteri. Sebagai agen antibakteri, tannin bekerja dengan cara mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma bakteri. Potensi ekstrak kulit buah kakao sebagai antibakteri ini menyebabkan sel-sel radang dalam memfagosit bakteri menjadi lebih mudah, sehingga sitokin seperti *interleukin-1 β* (IL-1 β) dan *interleukin-2* (IL-2) yang dikeluarkan oleh sel-sel radang lebih sedikit (Naba'atin, 2014).

Kekuatan aktivitas antioksidan senyawa-senyawa sianidin termasuk proantosianidin sangat berhubungan erat dengan struktur senyawa tersebut. Umumnya, penangkapan radikal bebas atau aktivitas antioksidan tergantung pada

posisi dan jumlah gugus hidoksil (-OH) aromatik yang merupakan penyumbang proton. Semakin banyak jumlah gugus aromatik-OH pada posisi yang aktif mendonasi proton, maka makin kuat aktivitasnya dalam mengikat partikel radikal bebas. Penambahan jumlah gugus hidoksil proantosianidin akan meningkatkan pengikatan radikal bebas (Muchtari, 2006)

Proantosianidin dalam kulit kakao menghambat sitokin proinflammatory seperti IL-2 dan IL-1 β dengan cara PHA (*phytohemagglutinin*) pada *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) akan menghambat sel T untuk mensekresi IL-2 dan IL-1 β . Sel T yang beristirahat akan terstimulasi apabila ada injuri pada jaringan selanjutnya, sel T akan mengaktifkan sinyal faktor transkripsi seperti NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*), AP-1 (*Activation Protein*) dan NF-AT (*Nuclear Factor Activated T-cell*), untuk mensekresi IL-2 dan IL-1 β . Sehingga proses inflamasi dapat berlangsung dengan lebih singkat. Selain itu flavonoid dapat meningkatkan sitokin antiinflamasi seperti TGF- β . TGF- β merupakan sitokin yang berfungsi meningkatkan migrasi dan proliferasi sel fibroblas pada daerah luka (Naba'atin, 2014).

2.7 Media Sediaan

a) Salep

Salep merupakan sediaan setengah padat yang ditujukan untuk pemakaian topikal pada kulit atau selaput lendir. Formulasi salep dibutuhkan adanya suatu basis salep, basis salep sendiri merupakan zat pembawa yang bersifat inaktif dari sediaan topikal dapat berupa bentuk cair atau padat yang membawa bahan aktif untuk berkontak dengan kulit. Basis salep yang digunakan dalam sebuah formulasi obat harus bersifat inert tidak merusak ataupun mengurangi efek terapi dari obat yang dikandungnya (Novita, 2017).

b) Gel

Gel adalah sediaan semipadat yang terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar terpenetrasi oleh suatu cairan. Sediaan gel dipilih karena mudah

mengering, membentuk lapisan film yang mudah dicuci dan memberikan rasa dingin di kulit. Gel mempunyai banyak keuntungan diantaranya adalah tidak lengket, gel akan berbentuk padat apabila disimpan dan akan segera mencair bila dikocok, konsentrasi bahan pembentuk gel yang dibutuhkan hanya sedikit untuk membentuk massa gel yang baik, viskositas gel tidak mengalami perubahan yang berarti pada suhu penyimpanan. Selain itu, gel efektif terhadap penyembuhan luka socket bekas pencabutan gigi karena gel bersifat padat, lunak dan kenyal sehingga dalam pengaplikasiannya lebih mudah diletakkan dalam socket bekas pencabutan dan dapat bertahan lama dalam socket sampai pada saatnya masuk ke dalam proses penyembuhan luka (Zulfitri et al., 2012).

c) Krim

Krim berupa emulsi yang mengandung bahan dasar yang sesuai dan mengandung air tidak kurang dari 60%. Krim ada dua tipe, yaitu krim tipe minyak dalam air (M/A) dan tipe air dalam minyak (A/M). Krim yang mudah dicuci dengan air adalah tipe krim (M/A) yang ditujukan untuk penggunaan kosmetik (Hasniar, 2015).

d) Pasta

Pasta merupakan sediaan semipadat yang mengantung satu atau lebih bahan obat yang ditujukan untuk pemakaian topikal. Pasta biasanya dibuat dengan mencampurkan bahan obat yang berbentuk serbuk dalam jumlah besar dengan vaselin atau dengan bahan dasar tidak berlemak yang dibuat dengan gliserol, digunakan sebagai antiseptikum atau pelindung kulit (Anggi, 2016).

2.8 Oxyfresh Dental Gel

Oxyfresh Dental Gel mengandung Chlorine dioxide yang memiliki kemampuan sebagai antimikroorganisme. Kandungan lain dari Oxyfresh diantaranya adalah Matricaria Extract (*Chamomilla recutita*) yang membantu meredakan pembengkakan, Glycerin yang berfungsi membantu mengatasi infeksi

dan membantu gel saat dioleskan pada permukaan luka, serta mempercepat penyerapan bahan aktif, folic acid atau vitamin B yang berfungsi membantu regenerasi sel tubuh, zinc acetate yang memiliki kemampuan menetralkan efek racun dan bau dari VSC (*volatile sulfur compounds*) yang biasanya terbentuk pada luka, serta Aloe vera yang memiliki peran besar berfungsi mengurangi rasa sakit dan mempercepat penyembuhan luka. Efek farmakologis Aloe vera yang menonjol adalah kemampuan anti-inflamasi, anti-mikroba, dan penyembuhan. Kemampuan Aloe vera untuk mengobati beragam penyakit disebabkan karena lapisan dalam daun Aloe vera mengandung berbagai bahan aktif yang memiliki efek farmakologis yang menguntungkan. Kombinasi chlorine dioxide dan bahan-bahan ini mempunyai beberapa keuntungan, sebagai agen antimikroorganisme sekaligus mempercepat penyembuhan luka (Anton, 2015)

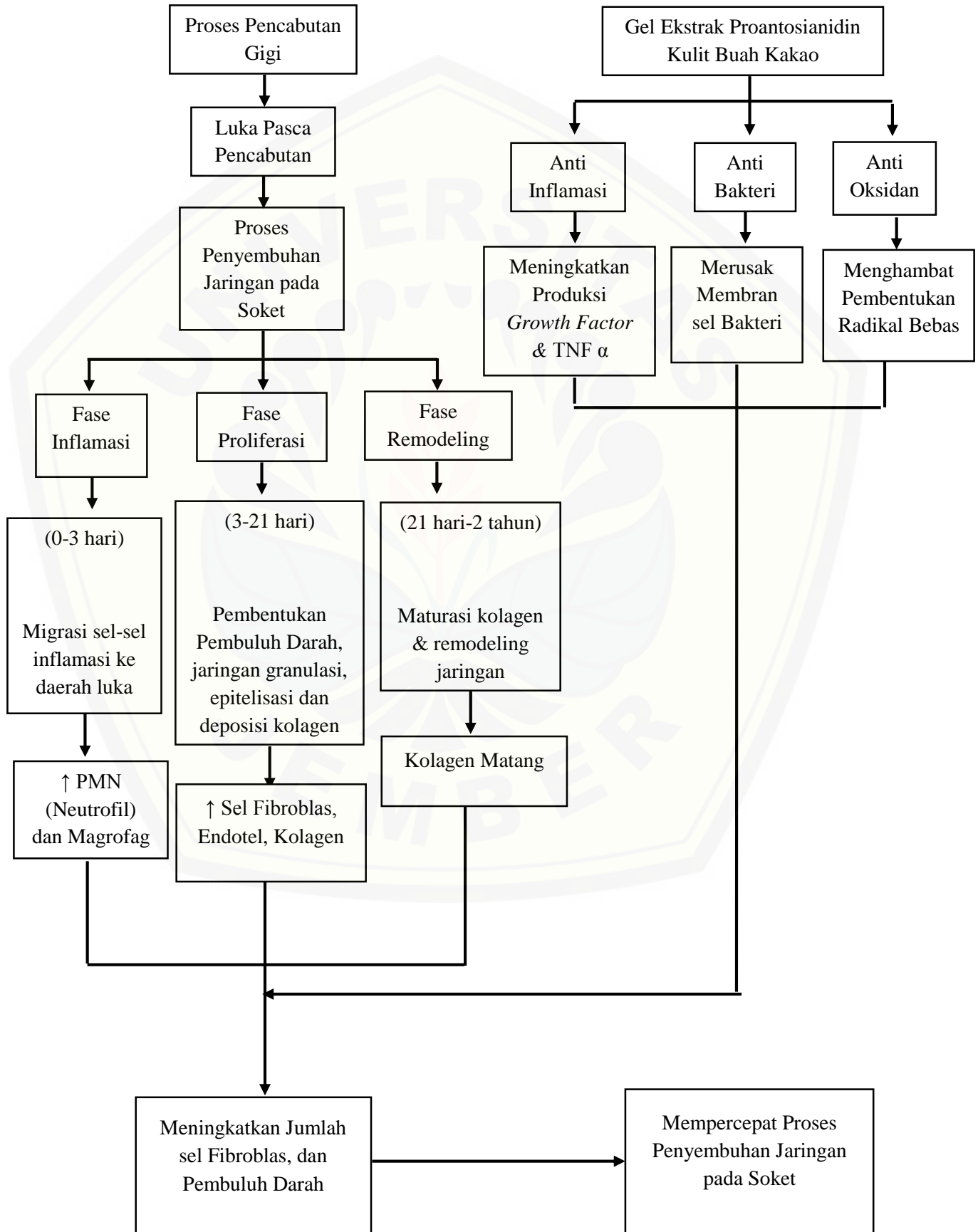
2.9 Gel Placebo

Gel Placebo adalah gel yang digunakan sebagai pembanding dari suatu kandungan zat dimana sifat placebo adalah netral atau tidak memiliki efek terhadap jaringan. Kandungan dari gel placebo yang digunakan adalah CMC-Na. CMC-Na didefinisikan sebagai garam dari poli-karboksi-metil-eter dari selulosa. CMC Na memiliki sifat yakni berwarna putih, tidak berbau, tidak berasa dan tidak memberikan efek terhadap jaringan (Rowe R.C. et.al., 2009). Na-CMC digunakan sebagai *Gelling agent* adalah agen pengikat (*binder*) yang bertanggung jawab dalam menjaga konsistensi padatan dan cairan dalam suatu bentuk sediaan gel (Indriyati et al, 2016).

2.10 Aplikasi ImageJ

Aplikasi *ImageJ* dapat mengukur Jumlah sel fibroblas yang terbentuk, dengan cara menghitung sel yang ada pada gambar. Jumlah sel fibroblas didapat dari rata-rata jumlah sel dalam 3 lapang pandang. Kemudian hasil dihitung nilai rata-rata dari setiap kelompok perlakuan (Aulia, 2014).

2.11 Kerangka Konseptual



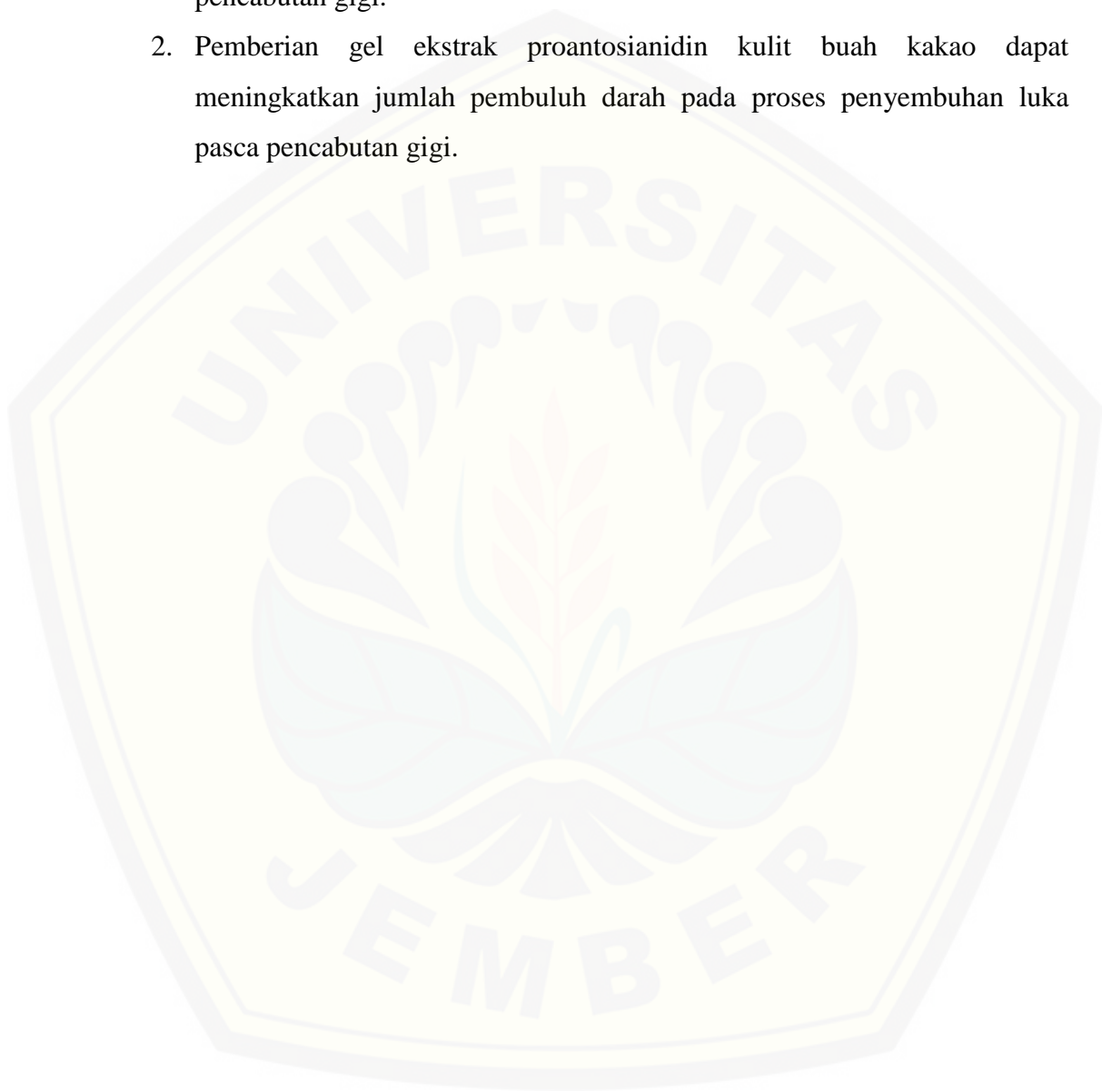
2.12 Penjelasan Kerangka Konsep

Tindakan pencabutan gigi akan menyebabkan terjadinya luka. Respon adanya luka atau trauma yaitu berupa proses penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka terdiri atas fase-fase yang saling berhubungan satu dan lainnya yaitu inflamasi, proliferasi dan remodeling jaringan. Fase inflamasi merupakan reaksi tubuh terhadap luka yang dimulai setelah beberapa menit dan berlangsung sekitar 3 hari setelah cedera. Perubahan struktur sel endotel dan kapiler menyebabkan protein plasma dan leukosit keluar dari pembuluh darah. Protein plasma akan mengaktifasi neutrofil untuk bergerak keluar dari kapiler pembuluh darah menuju luka. Monosit akan bermigrasi ke area lesi dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang akan berperan melakukan fagositosis di area jejas. Fase proliferasi rata-rata berlangsung selama 2 sampai 4 minggu. Tahapan yang berjalan adalah proses pembentukan pembuluh darah baru. Pada tahap ini terjadi proses granulasi dimana terjadi peningkatan proliferasi fibroblas yang akan membentuk kerangka jaringan. Fase remodeling merupakan tahap terakhir dari proses penyembuhan luka. Peran utama pada fase ini adalah pengendapan kolagen dalam jaringan.

Kakao memiliki kandungan beberapa senyawa fenolik diantaranya berupa proantosianidin yang memiliki sifat Efek Anti-inflamasi dimana proantosianidin mencegah peroksidasi lipid dan menghambat pembentukan proinflamasi dan mampu mempercepat proses radang ke tahap proliferasi sehingga proses penyembuhan menjadi lebih cepat, efek anti-inflamasi ini mampu meningkatkan jumlah sel fibroblas dan pembuluh darah. Efek antibakteri dengan merusak membrane sel bakteri sebagai pelindung jaringan dari bakteri dan virus sehingga proses penyembuhan tidak terganggu dan Efek Antioksidan dimana dapat menetralkan stres oksidatif dengan penghambatan pembentukan radikal bebas, dapat mengurangi kerusakan sel akibat radikal bebas sehingga fase proliferasi dapat lebih cepat. Dari ketiga efek tersebut akan menyebabkan percepatan pada proses penyembuhan jaringan pada soket pasca pencabutan.

2.13 Hipotesis

1. Pemberian gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.
2. Pemberian gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian ini adalah *post test only control group design* yaitu dilakukan pengukuran setelah perlakuan diberikan, kemudian hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

1. Politeknik Negeri Jember untuk identifikasi tanaman kakao
2. Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba pembuatan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*)
3. Laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba
4. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan preparat dan pengamatan jaringan.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober - Desember 2019

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Gel ekstrak proantosianin kulit buah kakao 100mg/ml

3.3.2 Variabel Terikat

- a) Jumlah sel fibroblas pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar
- b) Jumlah pembuluh darah pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar

3.3.3 Variabel Terkendali

- a) Kriteria hewan coba
- b) Tempat dan cara pemeliharaan hewan coba
- c) Cara dan waktu pemberian ekstrak proantosianidin kulit buah kakao
- d) Teknik pencabutan gigi pada tikus wistar jantan
- e) Cara pembuatan sediaan jaringan
- f) Pengecatan sediaan
- g) Cara pengukuran jumlah sel fibroblast
- h) Cara pengukuran jumlah apembuluh darah

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)

Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao adalah hasil ekstrak dari kulit buah kakao varietas Lindak dalam bentuk sediaan gel dengan konsentrasi 100 mg/ml yang diaplikasikan secara topical pada soket gigi pasca pencabutan. Kulit buah kakao didapatkan dari petani kakao di desa Pondok Rejo Kabupaten Jember

3.4.2 Pencabutan gigi tikus

Pencabutan gigi tikus adalah pencabutan gigi molar satu rahang bawah kiri tikus Wistar yang dilakukan dengan menggunakan metode pencabutan sederhana, yaitu menggunakan ekskavator dan sonde bengkok. Sebelumnya diberikan anastesi menggunakan Ketamin sebesar 0,004 – 0,01 ml/ 200 -250 g BB tikus. (Sitanya, 2016)

3.4.3 Jumlah sel Fibroblas

Jumlah sel fibroblas adalah jumlah dari sel yang berbentuk pipih memanjang, memiliki inti lonjong berwarna ungu dan memiliki sitoplasma yang tidak tampak jelas. Pengamatan dilakukan pada preparat yang dibuat dari soket atau jaringan granulasi pasca pencabutan dengan pewarnaan *Haematoksin Eosin* (HE) dengan perbesaran 400X. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *optilab* yang telah tersambung dengan mikroskop. Penghitungan jumlah sel fibroblas menggunakan aplikasi ImageJ untuk membantu penghitungan (Wangko, 2014).

3.4.4 Pembuluh Darah

Pembuluh Darah adalah berupa gambaran vaskularisasi dengan lumen berbentuk bulat/lonjong yang dibatasi oleh dinding sel yang terdiri dari sel-sel endotel yang tersusun teratur. Pengamatan dilakukan pada preparat yang dibuat dari soket atau jaringan granulasi pasca pencabutan yang diberi pewarnaan Hematoksin Eosin dengan perbesaran 400x. Penghitungan jumlah pembuluh darah dilakukan secara manual dengan dibantu menggunakan *optilab* yang telah tersambung dengan mikroskop (Hendrik, 2017).

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Wistar dengan jenis kelamin jantan yang dipelihara di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.5.2 Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan rumus Daniel (2008)

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

N = Besar sampel minimum

σ = Standart deviasi sampel

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi, diasumsikan $d=\sigma$

Z = Konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha=0,05$ maka $Z=1,96$

$$n = \frac{(1,96)^2 \times (0,05)^2}{(0,05)^2}$$

$$n = (1,96)^2$$

$$n = 3,8416$$

$$n = 4$$

Sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan rumus diatas adalah 4.

3.5.3 Kriteria Sampel

Kriteria sampel di dalam penelitian ini adalah:

- a. Tikus putih jantan galur wistar jenis kelamin jantan
- b. Tikus dengan umur 2-3 bulan
- c. Tikus dengan berat 200-250 gram
- d. Tikus dalam keadaan sehat

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Kandang tikus, Neraca digital (Ohaus), Labu penakar 10 ml, Corong kecil, Rotavapor, Freeze dried, Vial kedap udara, Kolom kecil untuk menyaring ekstrak, Lumpang, Tabung reaksi, Desicator, Spektrofotometer, Masker (Diapro, Indonesia), Sarung tangan (Evergloves, Indonesia), Ekskavator kecil, Syringe, *Object glass dan deck glass*, Mikrotom (Leica RM 2135, Jerman), *Base mole* (Daikin, Jepang), *Waterbath* (Memmert, Jerman), Rak pengecatan, Gelas ukur, Mikropipet kecil dan besar, *Automatic processing tissue*, Pinset dan *Slide warmer*

3.6.2 Bahan Penelitian

Kulit buah kakao 5 kg, n heksana 200 ml, Metanol 30 ml, Akuades 100 ml, Aseton 30 m Asam asetat 20 ml, Alas kapas dari glas wool, CMC-Na, Oxyfresh, Buffer formalin, Alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, Xylol, Paraffin, *Meyer egg albumin* dan *Cat Mayer's Haematoksin* eosin

3.7 Penghitungan Dosis

3.7.1 Dosis Ketamin

Dosis ketamin yang digunakan untuk anestesi tikus menurut adalah 20 – 40 mg /kg BB (Kusumawati, 2004). Jika dikonversikan untuk tikus coba, maka dosis ketamin yang digunakan adalah 0,004 – 0,01 ml/ 200 -250 g BB tikus.

3.7.2 Dosis Oxyfresh

Oxyfresh dengan dosis penggunaan 0,2 g untuk penggunaan pada manusia dengan berat badan 70 kg (Kusumawati, 2004).

$$\begin{aligned}\text{Dosis yang digunakan pada tikus (BB: 200g)} &= \text{Dosis manusia} \times 0,018 \\ &= 0,2 \text{ gram} \times 0,018 \\ &= 0,0036 \text{ gram} \times 1000 \\ &= 0,36 \text{ mg}\end{aligned}$$

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 *Ethical Clearance*

Prosedur pertama sebelum penelitian pada hewan coba, dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba di adaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dalam kandang tertutup dan diberi makan standart serta minum. Hal tersebut bertujuan untuk memperoleh keseragaman sebelum dilakukan penelitian untuk mengontrol hewan coba.

3.8.3 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tumbuhan merupakan menentukan nama yang benar, tempat yang tepat dalam klasifikasi suatu jenis tumbuhan. Identifikasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Politeknik Negeri Jember.

3.8.4 Pemilihan Kakao

Pemilihan Kakao adalah pada buah yang matang segar dan belum dilakukan pengolahan atau di fermentasi. Dikarenakan kandungan terbesar senyawa polifenol yang terdapat pada biji kakao matang yang segar dan belum dilakukan pengolahan/belum difermentasi yaitu sebesar 12-18% (Ratri, 2017)

3.8.5 Ekstraksi Proantosianidin Kulit Buah Kakao

1. Tahap awal adalah buah kakao sebanyak (5) kg dibersihkan dari kotoran yang menempel, lalu dikupas. Kemudian kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dipotong dan dioven dengan suhu 50 derajat selama 24 jam, setelah itu dilakukan penyerutan sampai terbentuk serutan-serutan halus. Kemudian hasil serutan diblender hingga mendapatkan serbuk halus dan ditimbang. Selanjutnya sebanyak 100 gram dari kulit buah kakao yang sudah menjadi bubuk ditambahkan dengan aseton 70% sebanyak 700 ml dan akuades sebanyak 300 ml yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
2. Kemudian larutan ekstrak diaduk menggunakan mengaduk kaca dengan arah berlawanan jarum jam. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* dengan suhu 50°C selama 20 menit. Setelah itu larutan ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan cairan ekstrak dan supernatannya. Setelah larutan ekstrak dipisahkan dari supernatan kemudian larutan ekstrak dimasukkan ke dalam rotavapor. Larutan ekstrak kemudian ditempatkan ke dalam cawan petri, lalu dimasukkan ke dalam oven. Setelah terdapat bagian yang kental di dasar cawan petri, lalu cawan petri dikeluarkan dari oven. Kemudian bagian yang kental yang berada di dasar cawan petri diambil dan diletakkan di gelas kecil.

3. Kemudian dilakukan pengujian menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yaitu suatu teknik kromatografi untuk pemisahan molekul berdasarkan perbedaan afinitasnya. Hasilnya berupa ekstrak proantosianidin dengan konstituennya yaitu proantosianidin A2 dan B2 (Lampiran E) (Wissam, 2013). Analisis spektrometri dari ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dilakukan menggunakan Agilent 6460 triple quadrupole yaitu suatu spektrometer yang dilengkapi dengan sumber ESI dalam mode ionisasi negatif. Tekanan nebulizer diatur menjadi 45 psi dan laju aliran gas pengeringan sebanyak 5 l/mt. Laju aliran dan suhu gas selubung masing-masing adalah 11 l/mt dan 350°C. Sekitar 0,3 ml/menit eluen dimasukkan ke dalam detektor massa. Selecting ion monitoring (SIM) digunakan untuk memilih ion molekuler isomer dari kelompok procyanidins dalam ekstrak proantosianidin kulit buah kakao sebagai kuantifikasi. Agilent Mass Hunter Workstation digunakan untuk akuisisi dan pemrosesan data (Qiang dkk., 2015).

3.8.6 Pembuatan gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao

Proses pembuatan gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*) dimulai dari pengukuran aquades 96 ml dengan labu ukur dan dituangkan ke dalam lumpang. Kemudian 4 gram CMC-Na diukur dengan timbangan analitik, lalu ditaburkan ke dalam lumpang yang berisi aquades. Diamkan sekitar 10-15 menit, aduk hingga mengembang dan digerus hingga membentuk gel berwarna bening. Lalu masukkan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*) ke dalam lumpang dan digerus sampai homogen

3.8.7 Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba tikus wistar jantan sebanyak 24 ekor dibagi menjadi tiga kelompok, yang terdiri dari kelompok kontrol positif yang diberi oxyfresh, kelompok kontrol negatif yang diberi gel plasebo dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak proantosianidin kulit buah kakao 100 mg/ml. Setelah dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 sub kelompok yang dilihat dari waktu dekaputasi yaitu pada hari ke 7 dan hari ke 14.

1. Kelompok I merupakan kelompok kontrol negatif.

Kelompok ini terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan. Hewan coba dilakukan pencabutan setelah dianastesi menggunakan anastesi ketamin, kemudian soket gigi pasca pencabutan diberi gel plasebo satu kali sehari. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu:

- a) Pada hari ke-7, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.
- b) Pada hari ke-14, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.

2. Kelompok II merupakan kelompok kontrol positif. Kelompok ini terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan. Hewan coba dilakukan pencabutan setelah dianastesi menggunakan anastesi ketamin, kemudian soket gigi pasca pencabutan diberi oxyfresh satu kali sehari. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu:

- a) Pada hari ke-7, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.

- b) Pada hari ke-14, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.
3. Kelompok III merupakan kelompok perlakuan. Kelompok ini terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan. Hewan coba dilakukan pencabutan setelah dianestesi menggunakan anestesi ketamin, kemudian soket gigi pasca pencabutan diberi ekstrak proantosianidin kulit buah kakao 100 mg/ml sebanyak satu kali sehari. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu:
 - a) Pada hari ke-7, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.
 - b) Pada hari ke-14, terdapat 4 ekor hewan coba didekaputasi, kemudian diambil bagian soket bekas pencabutan gigi molar kiri rahang bawah, selanjutnya diproses untuk pembuatan sediaan jaringan.

3.8.8 Pencabutan gigi tikus wistar

Pencabutan dilakukan masing-masing kelompok dilakukan pada gigi molar satu regio kiri rahang bawah, sebelum dilakukan pencabutan tikus dianestesi secara general terlebih dahulu menggunakan ketamin dengan dosis 0,04-0,08 ml/ 200-250 g BB tikus. Pencabutan gigi dilakukan dengan cara sonde setengah lingkaran dimasukkan ke dalam sulkus gingiva untuk merusak perlekatan gingiva dan gigi, selanjutnya gigi di goyang dengan menggunakan arteri clam serta diungkit dengan menggunakan ekskavator kecil.

3.8.9 Aplikasi gel plasebo, oxyfresh dan ekstrak proantosinidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*)

- a) Aplikasi gel satu kali sehari dilakukan setiap hari pada pagi hari setelah tikus makan
- b) Cara pengaplikasian secara apikal dengan menggunakan syring yang telah dimodifikasi dengan dilepaskan dari jarumnya dan dipotong ujungnya untuk memudahkan pengaplikasian.
- c) Pemberian gel dilakukan selama:
 - Kelompok perlakuan selama 7 hari untuk kelompok perlakuan dengan hewan coba yang akan diamati pada hari ke 7
 - Kelompok perlakuan selama 14 hari untuk kelompok perlakuan dengan hewan coba yang akan diamati pada hari ke 14.

3.8.10 Eutanasia Hewan Coba

- a) Pada hari ke-7 pasca pencabutan gigi, semua subkelompok yang dilakukan pengamatan pada hari ke-7 dieutanasia dengan menggunakan metode overdosis inhalasi eter. Hewan coba dimasukkan ke dalam wadah yang sudah berisi kapas yang sudah dibasahi larutan eter, kemudian wadah ditutup rapat, lalu ditunggu sampai hewan coba mati.
- b) Pada hari ke-14 pasca pencabutan gigi, semua subkelompok yang dilakukan pengamatan pada hari ke-14 dieutanasia dengan menggunakan metode overdosis inhalasi eter. Hewan coba dimasukkan ke dalam wadah yang sudah berisi kapas yang sudah dibasahi larutan eter, kemudian wadah ditutup rapat, lalu ditunggu sampai hewan coba mati.

3.8.11 Tahap Pembuatan Sediaan Histologis

Tahap pembuatan sediaan histologis sebagai berikut (Tim Patologi Anatomi FKG UNEJ, 2007):

1. Pengambilan sampel sediaan

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara melakukan pemotongan rahang bawah kiri bagian posterior yang diambil dengan melebihi pemotongan jaringan sepanjang 5 mm pada bagian mesial dan distal dari soket gigi molar pertama. Untuk pembuatan preparat jaringan diambil dengan arah buko-lingual agar bentuk soket gigi dapat terlihat dengan jelas. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam *buffer formalin* selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak rusak, mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi, dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci dengan air mengalir.

2. Pemrosesan jaringan

Pemrosesan jaringan diawali dengan proses dekalsifikasi. Dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi ini dilakukan dengan memakai larutan asam formic 10 % selama 7 hari atau hingga jaringan keras (tulang) dapat ditembus dengan jarum tanpa hambatan. Setelah proses dekalsifikasi lengkap, maka dilanjutkan dengan pemrosesan jaringan yang berfungsi untuk mempersiapkan jaringan sebelum dilakukan penyayatan dengan mikrotom. Pemrosesan jaringan meliputi beberapa prosedur, yaitu:

- a. Melakukan proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi dengan mencelupkan jaringan kedalam larutan sesuai dengan petunjuk pada tabel berikut :

- Dehidrasi:

Penarikan air dari dalam jaringan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi dengan celupkan ke dalam *buffer formalin*.

Tahapan Dehidrasi:

- 1) Alkohol 70% : ± 15 menit
- 2) Alkohol 80% : 1 jam
- 3) Alkohol 95% : 2 jam
- 4) Alkohol 95% : 1 jam
- 5) Alkohol absolut : 1 jam
- 6) Alkohol absolut : 1 jam
- 7) Alkohol absolut : 1 jam

- Clearing (Proses Penjernihan)

Menghilangkan alcohol sebelum jaringan ditanam dalam parafin. Dengan menggunakan bahan Xylol.

- 1) Xylol : 1 jam
- 2) Xylol : 2 jam
- 3) Xylol : 2 jam

- Impregnasi

Sebagai penyangga sediaan agar dapat dilakukan penyimpanan. Proses infiltrasi bahan embedding dalam jaringan pada suhu 56°- 60°. Caranya jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sample, kemungkinan ke dalam bahan embedding yaitu paraffin TD 56°- 60°C.

Tahapan Impregnasi:

- 1) Parafin cair (56°C-58°C) : 2 jam
- 2) Parafin cair (56°C-58°C) : 2 jam
- 3) Parafin cair (56°C-58°C) : 2 jam

b. Penanaman dalam paraffin (*Embedding*)

Merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *Embedding*. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan paraffin sebagai bahan untuk *Embedding*. Tahapan *Embedding* antara lain:

- 1) *Base mole* yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun diatas permukaan kaca. *Base mole* diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok paraffin yang sudah beku.
- 2) Paraffin dituangkan ke dalam *base mole* hingga penuh kemudian jaringan ditanam pada posisi sedemikian rupa sehingga didapatkan penampang jaringan dengan arah pemotong secara koronal dan dibiarkan membeku. Selanjutnya, blok paraffin dapat dikeluarkan dan dapat dilakukan penyayatan

c. Penyayatan Jaringan

- 1) Penyayatan mengguankan alat mikrotom, sebelumnya bersihkan pisau mikrotom dengan kasa/ kertas saring yang telah dibasahi dengan *xylol* dengan arah tegak lurus.
- 2) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom sebesar 6 mikron
- 3) Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas kemudian sayatan diletakkan diatas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56°-60°C hingga sayatan mekar.
- 4) Mengambil sayatan yang sudah mekar menggunakan *object glass* yang telah diolesi dengan *meyer egg albumin*. Selanjutnya dikeringkan dengan *slide warmer* minimal 12 jam suhu 30°-35°C

3. Pengecatan *Haematoksin Eosin* (HE)Tabel 3.2 Proses Pengecatan *Haematoksin Eosin* (HE)

Proses	Larutan	Waktu
Deparafinisasi	Xylol	2-3 menit
	Xylol	2-3 menit
	Xylol	2-3 menit
Dehidrasi	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Air mengalir	10 menit
Pewarnaan inti	<i>Mayer's Hematoylin</i>	15 menit
	Air mengalir	20 menit
Pewarnaan sitoplasma	Eosin	15 detik – 2 menit
Dehidrasi	Alkohol 95%	2-3 menit
	Alkohol 95%	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
<i>Clearing</i>	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
<i>Mounting</i>	Entelan	5 menit

Sumber: Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007.

3.8.12 Tahap Pengamatan dan Perhitungan Jumlah sel Fibroblas

Pengamatan dan penghitungan jumlah sel fibroblas menggunakan Kamera *OptiLab* yang tersambung pada mikroskop. Pengambilan gambar diambil dengan pembesaran 400x dari tiga lapang pandang yaitu pada puncak soket pada sisi bukal, lingual serta pada bagian apikal soket. Selanjutnya penghitungan dilakukan dengan menggunakan aplikasi ImageJ. Pertama membuka gambar dari aplikasi ImageJ. Setelah itu gambar dibuat kontras warna menjadi hitam putih dengan ukuran terkecil *8-bit*. Lakukan pengukuran luas area dengan menggunakan fitur *threshold*. Kemudian perhitungan jumlah partikel dengan *analyze particles* dengan memasukan pilihan *outlines*. Selanjutnya hasil dari jumlah sel akan muncul. Kemudian hasil dari penghitungan sel fibroblas dilakukan tabulasi dari tiap lapang pandang dan diambil rata-ratanya.

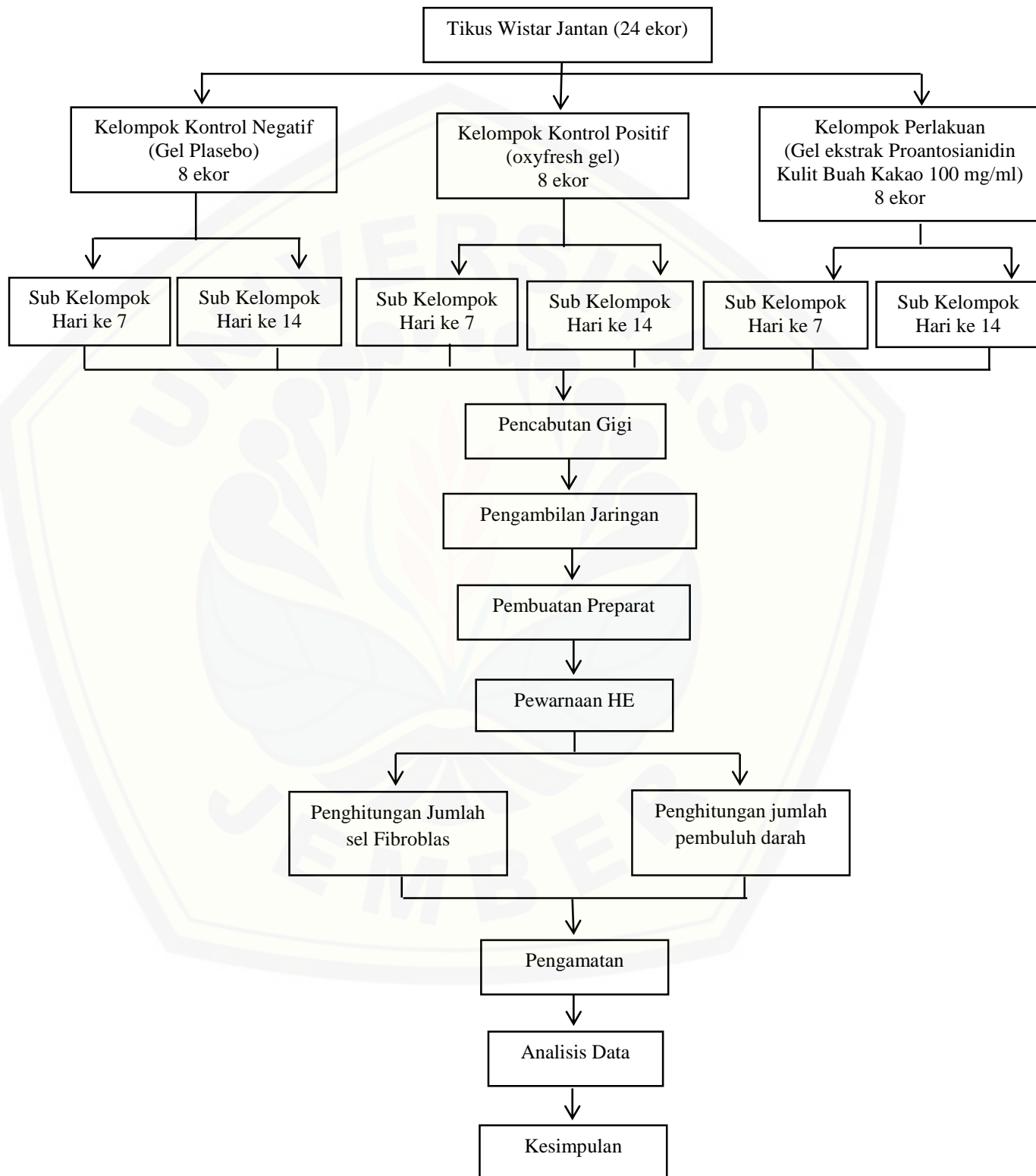
3.8.13 Tahap Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Pembuluh Darah

Pengamatan dan penghitungan jumlah endotel Pembuluh Darah menggunakan Kamera *OptiLab* yang tersambung pada mikroskop. Penghitungan dilakukan dengan menghitung secara mikroskopis jumlah endotel sebanyak tiga lapang pandang yaitu pada puncak soket bagian bukal, lingual dan pada dasar soket. Dilakukan dengan perbesaran mikroskop 400X dengan 3 orang pengamat pada lapang pandang yang sama. Kemudian, hasil penghitungan jumlah endotel dilakukan tabulasi dan diambil rata-ratanya.

3.9 Analisa data

Data yang telah diperoleh dilakukan uji normalitas dengan test *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Jika data normal dan homogen menggunakan uji parametrik yaitu *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$), yang dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

3.10 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100 mg/ml dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas pada soket gigi tikus wistar pasca pencabutan.
2. Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100 mg/ml dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada soket gigi tikus wistar pasca pencabutan.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan penulis adalah sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek pemberian ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap hari pengamatan yang berbeda sehingga didapatkan gambaran keseluruhan dari waktu penyembuhan soket.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap variabel lain pada proses penyembuhan luka sehingga didapatkan gambaran keseluruhan dari proses penyembuhan soket
3. Perlu dilakukan pengamatan jumlah sel fibroblas dan pembuluh darah pada daerah lapang pandang yang berbeda sehingga didapatkan gambaran keseluruhan dari daerah penyembuhan soket.

Daftar Pustaka

- Agung Ikaputri Mulatpeni Novitasari, Recita Indraswary, Rosa Pratiwi. 2017. Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Membran Kulit Telur Bebek 10% Terhadap Pepadatan Serabut Kolagen pada Proses Penyembuhan Luka Gingiva. *Odonto Dental Journal*. Volume 4. Nomer 1.
- Ajeng Saghita Enggardini, Syamsulina Revianti, Noengki Prameswari. 2016. Efektifitas Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Peningkatan Kepadatan Kolagen pada Proses Penyembuhan Alveolar Osteitis. Vol. 10 No. 1 . ISSN : 1907-5987
- Alhana, Pipih Suptijah, Kustiariyah Tarman. 2015. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen dari Daging Teripang Gamma. *JPHPI* Volume 18 Nomor 2. DOI: 10.17844
- Alifia Wandasari. 2018. Perbandingan Efektivitas Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L*) Dan Alvogyl Terhadap Peningkatan Ketebalan Epitel Soket Gigi Tikus Wistar Pasca Pencabutan. Fakultas Kedokteran Gigi: Universitas Jember
- Amita Kemala, Ummu Balqis, Cut Dahlia Iskandar. 2017. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Sayat pada Mencit (*Mus Musculus*) Menggunakan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis). *JIMVET*. 01(3): 584-591. ISSN : 2540-9492
- Anggi Viani. 2016. Formulasi Pasta Serbuk Kopi dengan Variasi Konsentrasi sebagai Daya Hambat terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *JF FIK UINAM* Vol.4 No.3
- Anton Kusumo Widagdo, Dahlia Herawati, Ahmad Syaify. 2015. Aplikasi Chlorine Dioxide Gel Pada Periodontitis Kronis Paska Kuretase (Kajian Pada Pocket Depth, Clinical Attachment Level dan Bleeding on Probing). *JKed Gi*, Vol. 6, No. 3: 265 – 270. ISSN 2086-0218

- Ardhiyanto, H.B. 2007. Proses penyembuhan luka post ekstraksi gigi. *Stomatognati*. 4(2): 60-65.
- Ardiana Tifani, Andina Rizkia Putri Kusuma, Muhammad Dian Firdausy. 2015. Efektivitas Pemberian Gel Binahong (*Anredera Cordifolia*) 5% Terhadap Jumlah Sel Fibroblast Pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Marmut (*Cavia Cobaya*). *Odonto Dental Journal*. Volume 2. Nomer 1.
- Aughey E, Fyre FL. 2001. *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. London: Manson Publishing.
- Aulia, A.F. 2014. Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) terhadap Pembentukan Jaringan Granulasi pada Luka Bakar Tikus Sprague dawley. *Skripsi*. Jakarta: FKIK UIN Syarif Hidayatullah.
- Brett, D., 2008, A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. *Wounds*; 20(12): 347-56.
- Broughton, G., Janis, J. E., Attinger, C. E. 2006. Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117: 1e-S
- Cahyani Dian Isti, Ninik Rustanti. 2015. Pengaruh Penambahan Teh Hijau Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Protein Minuman Fungsional Susu Kedelai Dan Madu. *Journal of Nutrition College*, Volume 4, Nomor 2, Halaman 394-399
- Carla D. Di Mattia, Giampiero Sacchetti, Dino Mastrocola, and Mauro Serafini 2017. From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on *In Vitro* Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers *In Vivo*. *Front Immuno jurnal*. PMID: 29033932
- Daniel, W. W. 2008. *Biostatic: A Foundation for Analysis in The Health Sciences*. 8thn ed. Georgia Wiley.

- Darmawati, Sastra. 2013. Hubungan Faktor-faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka dengan Lama Penyembuhan Luka Perineum Ibu Nifas. *Idea Nursing Journal*. Vol. II No. 3 . ISSN : 2087 – 2879
- Eroschenko V. P., Atlas Histologi Difiore: dengan Korelasi Fungsional, Ed. 11. ed., D. Dharmawan and N. Yesdelita, Eds., Jakarta: EGC, 2010.
- Fadilah Nurul, Hidayati Dwi Ratna. 2017. Manajemen Pemasaran Produk Kakao Kebun Banjarsari PTP XII Jember. *Neo-Bis Jurnal Berkala Temu Ekonomi*. Volume 11. No 1
- Fuadi, M. I., Elfiah U., Misnawi. 2015. Jumlah Fibroblas pada Luka Bakar Derajat II pada Tikus dengan Pemberian Gel Ekstrak Etanol Biji Kakao dan Silver Sulfadiazine. *Pustaka Kesehatan* 3 No. 2: 244–248.
- Hanny Setyowati, Wahyuning Setyani. 2015. Potensi Nanokolagen Limbah Sisik Ikan sebagai Cosmeceutical. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. hlm. 30-40 vol. 12 no. 1 ISSN: 1693-5683
- Hapsari, Kunti. 2014. Efektivitas Salep Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria* Sel PMN (Polimorfonuklear). Skripsi. Yogyakarta: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Hasniar, Yusriadi, Akhmad Khumaidi. 2015. Formulasi Krim Antioksidan Ekstrak Daun Kapas (*gossypium* sp.). *Galenika Journal of Pharmacy* vol. 1 (1) : 9 - 15 ISSN : 2442-8744
- Hendrik Setia Budi, Pratiwi Soesilowati, Zhafirah Imanina. 2017. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi pada Makrofag dan Neovaskular dengan Pemberian Getah Batang Pisang Ambon. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* Vol 3 No 3 , ISSN 2460-0164 , ISSN 2442-2576
- Huang et al. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. 2017:1-14

- Ibtisam, 2008. Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) Menggunakan Metode Perlokasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid. Institut Pertanian Bogor press
- Indriyati Wiwiek, Ida Musfiroh, Rembulan Kusmawanti, Sriwidodo, Aliya Nur Hasanah. 2016. Karakterisasi Carboxymethyl Cellulose Sodium (Na-CMC) dari Selulosa Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.) yang Tumbuh di Daerah Jatinangor dan Lembang IJPST Volume 3, Nomor 3
- Juwita, Harlystiarini, T. Widyaputri, A. Effendi, E.M Kaiin, Nurhidayat. 2010. Tingkat pertumbuhan dan analisa protein sel-sel fibroblas fetal tikus hasil kultur in vitro. Journal ipb. Vol 1. No 2
- Kumar, V., Cotran, R.S., dan Robbins S.L. 2007. Buku Ajar Patologi. Edisi 7; ali Bahasa, Brahm U, Pendt;editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari.-ed.7-Jakarta: EGC.
- Kurnia Pandika Agung, Ardhiyanto Hengky Bowo, Suhartini. 2015. Potensi Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Fibroblas Soket Pasca Pencabutan Gigi pada Tikus Wistar. e-Jurnal Pustaka Kesehatan, vol. 3(no.1)
- Kurniawati Yuli, Sudigdo Adi, Achadiyani, Oki Suwarsa, Dimas Erlangga, Tenny Putri. 2015. Kultur Primer Fibroblas: Penelitian Pendahuluan. MKA, Volume 38, Nomor 1, Jan-Apr
- Kusumawati, D. 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Yogyakarta: Gajah Mada
- Lande Randy, Billy J, Kepel Krista V, Siagian. 2015. Gambaran Faktor Risiko dan Komplikasi Pencabutan Gigi di RSGM PSPDG-FK UNSRAT. Jurnal e-GiGi (eG), Volume 3, Nomor 2
- Lukito, A.M., Y. Mulyono, I. Tetty, Hadi dan R. Nofiandi. 2010. Budidaya Kakao. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Jakarta. 298 hal.

- Mardiyantoro Fredy. 2018. Penyembuhan Luka Rongga Mulut. Penerbit UB Press: Malang
- Martono Budi. Karakteristik Morfologi dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao. Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar Vol 3, No 2 (2016): Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar *Publisher* : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
- Miloro M., 2004. Petersons Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd Ed Bc Decker Inc. London pp. 3-5
- Muchtaridi. Anas Subarnas. Nenden indiyati. 2006. Aktivitas antioksidan Proantosianidin dari Akar Pakis Tangkur (*Polypodium feii* METT.) secara In Vitro. FMIPA. UNPAD.
- Mulato, S. Widyotomo, Misnawi, Sahali dan E. Suharyanto. 2004. Petunjuk Teknis Pengolahan Produk Primer dan Sekunder Kakao. Bagian Proyek Penelitian dan Pengembangan Kopi dan Kkakao. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Jember.
- Naba`atin, Isnadia. 2014. Penambahan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Pada Periodontal Dressing Terhadap Kepadatan Kolagen Luka Gingiva Kelinci. BMKGI. 3(2): 28-38
- Nadia Farhatika. 2015. Efektivitas Gel Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Terhadap Intensitas Kolagen pada Penyembuhan Luka Jaringan Lunak Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran Gigi: Universitas Jember
- Nanda Afrizan, Zainuddin, Cut Dahlia Iskandar, Dian Masyitha, Winaruddin, Ummu Balqis. 2018. Struktur Histologi Kulit Belut Sawah (*Monopterus albus*). JIMVET E-ISSN : 2540-9492 :2(1):196-205
- Nofikasari Icha, Afi fah Rufaida, Chynintia Dewi Aqmarina, Failasofia, Annisa Rahmi Fauzia, Juni Handajani. 2016. Efek aplikasi topikal gel ekstrak

pandan wangi terhadap penyembuhan luka gingiva. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* Vol 2 No 2. ISSN 2460-0164

Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : Rineka Cipta.

Novita Rita, Munira, Rima Hayati. Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Etanol Pliek U sebagai Antibakteri. *Jurnal AcTion: Aceh Nutrition Journal*; 2(2): 103-108. E-ISSN : 2548-574

Nugroho Ardhina Mahadica, Ulfa Elfiah, Rena Normasari. 2016. Pengaruh Gel Ekstrak dan Serbuk Mentimun (*Cucumis sativus*) terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat IIB pada Tikus Wistar. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*, vol. 4 (no. 3)

Pramono Wisnu Budi, Ery Leksana, Hari Hendriarto Satoto. 2016. Pengaruh Pemberian Ropivakain Infiltrasi Terhadap Tampilan Kolagen Di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar. *Jurnal Anestesiologi Indonesia*. Volume VIII, No 1.

Purnama Handi, Sriwidodo, Soraya Ratnawulan. 2015. Review Sistematis: Proses Penyembuhan dan Perawatan Luka. *Farmaka Suplemen* volume 15 nomor 2

Qiang, Lv., F. Luo¹, X. Zhao, Y. Liu, G. Hu, C. Sun, X. Li, K. Chen. 2015. Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity. *Plos One*. 10(3): 1-17.

Ratri Retno Utami, S. Supriyanto, Sri Rahardjo, Ria Armunanto. 2017. Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao dari Hasil Penyangraian Biji Kakao Kering pada Derajat Ringan, Sedang dan Berat. *AGRITECH*, Vol. 37, No. 1. ISSN 0216-0455

Rini Sitanaya. 2016. *Exodontia Dasar-dasar ilmu pencabutan gigi*. Penerbit: Deepublish: Yogyakarta

- Risa Rahma Putri. 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*) Terhadap Jumlah Fibroblas Pada Proses Penyembuhan Luka Di Mukosa Oral. *Journal Caninus Dentistry* Vol 2. No 1
- Robbins, SL Kumar V, dan Cotran RS. 2007. Buku Ajar Patologi. Edisi 7. Alih Bahasa oleh Awal Prasetyo, Barm U dan Toni Priliono. Jakarta: EGC
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Weller, P.J. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipient, Sixth Edition*. The Pharmaceutical Press and The American Pharmaceutical Association : London, pp. 581-585
- Ruby Riana. 2014 Peran Heparin Dalam Angiogenesis, Epitelisasi dan Penyembuhan Luka Bakar. Vol 7 No 14
- Sabirin Indah Puti Rahmayani, Ani Melani Maskoen, Bethy S. Hernowo. 2013. Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar. *MKB*, Volume 45 No. 4
- Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC. *Intisari Prinsip-Prinsip Ilmu Bedah Edisi 6*. Chandranata L, editor. Jakarta: EGC; 2000.
- Setyarini EA, Barus LS, Dwitari A., 2013. Perbedaan alat ganti verband antara dressing set dan dressing trolley terhadap resiko infeksi nosokomial dalam perawatan luka post operasi. *Jurnal Kesehatan STIKes Santo Borromeus* 1(1): 11-23. Soh LK, Tsatsouli
- Siregar, T.H.S., S. Riyadi, dan L. Nuraeni. 2006. *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Coklat*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Soukaina T. Ryalat¹ , Mohammad H. Al-Shayyab¹ , Ahmed Marmash¹ , Faleh A. Sawair¹ , Zaid H. Baqain¹ , Ameen S. Khraisat². 2011. The Effect of Alvogyl™ When Used As a Post Extraction Packing. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 4, No.

- Tarigan, R., Pemila, U. 2007. Perawatan Luka: Moist Wound Healing. Makalah, Jakarta: Universitas Indonesia.
- Tjitrosoepomo, Gembong. 2007. Morfologi Tumbuhan. Yogyakarta: Gajah Mada University Press
- Tita Erlanggawati, Agung Aji Prasetyo, Puspita Kusuma Dewi. 2018. Gambaran Vaskularisasi Retina Pasca Pemberian Oksigen Konsentrasi Tinggi (Studi Eksperimental Retinopathy of Prematurity pada Tikus Wistar). Jurnal Kedokteran Diponegoro Volume 7, Nomor 4. ISSN Online : 2540-8844
- Triyono, B., 2005, Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupikain dan yang Tidak Diberi Levobupikain, Thesis, Semarang: Universitas Diponegoro
- Velnar, T, Bailey T dan V Smrkloj. 2009. The Wound Healing Process: an Overview of the Celluler and Molecular Mechanisms. The Journal of International Medical Research 37(5): 1528-2542
- Wangko Sunny, Ronny Karundeng. 2014. KOMPONEN SEL JARINGAN IKAT. Jurnal Biomedik, Volume 6, Nomor 3, Suplemen, November , hlm. S1-7
- Wissam Z., G.Bashour, W.Abdelwahed, dan W.Khayata. 2013. Simple and fast method for the extraction of polyphenol and the separation of proanthocyanidins from carob pods. SAJP. 2(5): 375-380.
- Yolanda Eka Putri. 2019. Efek Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Terhadap Kadarcyclooxygenase-2 Pada Cairan Sulkus Gingiva Tikus Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*. Fakultas Kedokteran Gigi: Universitas Jember
- Zulfitri, A.M.I., Khoswanto, C., Istiati. 2012. Efek gel ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap jumlah sel fibroblas dan pembuluh darah kapiler pada luka pasca pencabutan gigi marmot (*Cavia cobaya*). Oral Biology Dental Journal. 4(2): 51-55.

LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Keterangan Ethical Clearance

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER <i>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</i></p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No.441/UN25.8/KEPK/DL/2019</u></p>	
Title of research protocol	: "Effect Gel Ekstrac Proantosianidin Pod Husk Cacao (Theobroma Cacao L) For Total Cell Fibroblas Collagen Intercity And Argiogenesis In Socket Post Ekstraktion In Rat"
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Nada Ocarina Savitri
Member of research	: -
Responsible Physician	: Nada Ocarina Savitri
Date of approval	: May-July 27 th , 2019
Place of research	: Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, May 28th, 2019</p>	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (drg. R. R. Hardyan P. M. Kes, Sp. Pros)	 Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember (Drg. Dwi Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)

Lampiran B. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN**

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 13/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 2189/UN25.8.TL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Nada Ocarina Savitri
NIM : 161610101037
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 23 Mei 2019

Ka. Laboratorium Tanaman

Ir. Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran C. Surat Keterangan Identifikasi Kandungan Proantosianidin



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☐(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : /513 /UN25.8.TL/2019
Perihal : Identifikasi Kandungan Proantosianidin

04 APR 2019

Kepada Yth
Kepala Laboratorium Teknik Kimia
Politeknik Negeri Malang
Di Malang

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk melakukan identifikasi kandungan proantosianidin yang digunakan sebagai objek penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- | | | |
|----|------------------------|--|
| 1 | Nama | : Nada Ocarina Savitri |
| 2 | NIM | : 161610101037 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2018/2019 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrip II no 12 |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek gel ekstrak Proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap penurunan respon peradangan yang dilihat dari jumlah sel fibroblas, proses angiogenesis dan intensitas kolagen pada soket pasca pencabutan gigi tikus |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang |
| 8 | Data/alat yg di pinjam | : - |
| 9 | Waktu | : April 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk menganalisis efektifitas gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap penurunan respon peradangan yang dilihat dari jumlah sel fibroblas, proses angiogenesis dan intensitas kolagen pada soket pasca pencabutan gigi tikus |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Budi Yuwono, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya Rahayu M.KG. |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. HDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

Lampiran D. Surat Keterangan Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kakao



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☐(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 1704UN25.8.TL/2019
Perihal : Ekstraksi Kulit Buah Kakao
Kepada Yth
Direktur Rumah Sakit Gigi dan Mulut
Universitas Jember
Di Jember

16 APR 2019

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk melakukan ekstraksi kulit buah kakao yang digunakan sebagai objek penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- | | | |
|----|------------------------|---|
| 1 | Nama | : Nada Ocarina Savitri |
| 2 | NIM | : 161610101037 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2018/2019 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrip II no 12 |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap penurunan respon peradangan yang dilihat dari jumlah sel fibroblas, proses angiogenesis dan intensitas kolagen pada soket pasca pencabutan gigi tikus |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yg di pinjam | : - |
| 9 | Waktu | : April 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk menganalisis efek ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap penurunan respon peradangan yang dilihat dari jumlah sel fibroblas, proses angiogenesis dan intensitas kolagen pada soket pasca pencabutan gigi tikus |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Budi Yuwono, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya Rahayu M.K.G. |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Lampiran E. Surat Ijin Laboratorium Biomedik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 5789/UN25.8.TL/2019

Perihal : Izin Penelitian Gel Proantiosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao

12 SEP 2019

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Histologi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian menguji senyawa proantiosianidin ekstrak kulit buah kakao bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- | | | |
|----|------------------------|---|
| 1 | Nama | : Nada Ocarina Savitri |
| 2 | NIM | : 161610101037 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2019/2020 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrip 2 No. 12 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Proantiosianidin Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap Jumlah Sel Fibroblas, Intensitas Kolagen dan Angiogenesis pada Soket Pasca Pencabutan Gigi pada Tikus |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas jember |
| 8 | Data/alat yg di pinjam | : Mikroskop, alkohol, xylol, haematoxilin, dll. |
| 9 | Waktu | : September 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk menguji senyawa proantiosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap jumlah sel fibroblas, intensitas kolagen dan angiogenesis pada soket pasca pencabutan gigi pada tikus |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Budi Yuwono, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya, M.KG |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

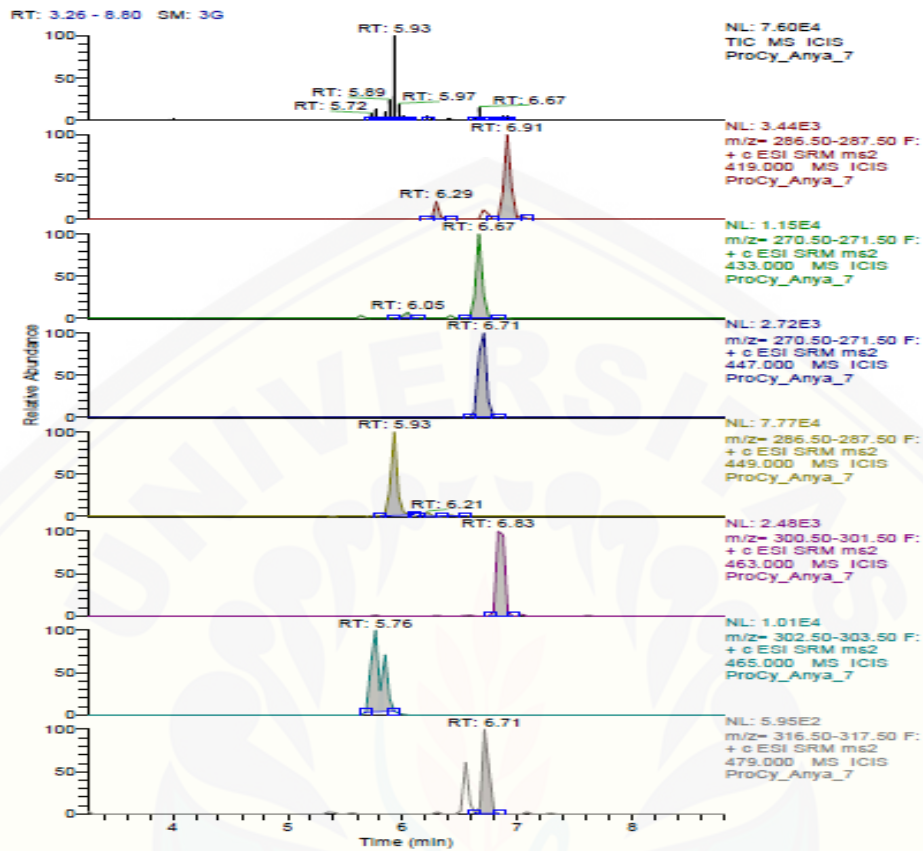
an. Dekan
Wakil Dekan I,



Dr. drs. Hastiani Novita, M.Kes., Sp. OF(K)

NIP. 196811251999032001

Lampiran F. Interpretasi Hasil Analisis HPLC Ls-MS Proantosianidin

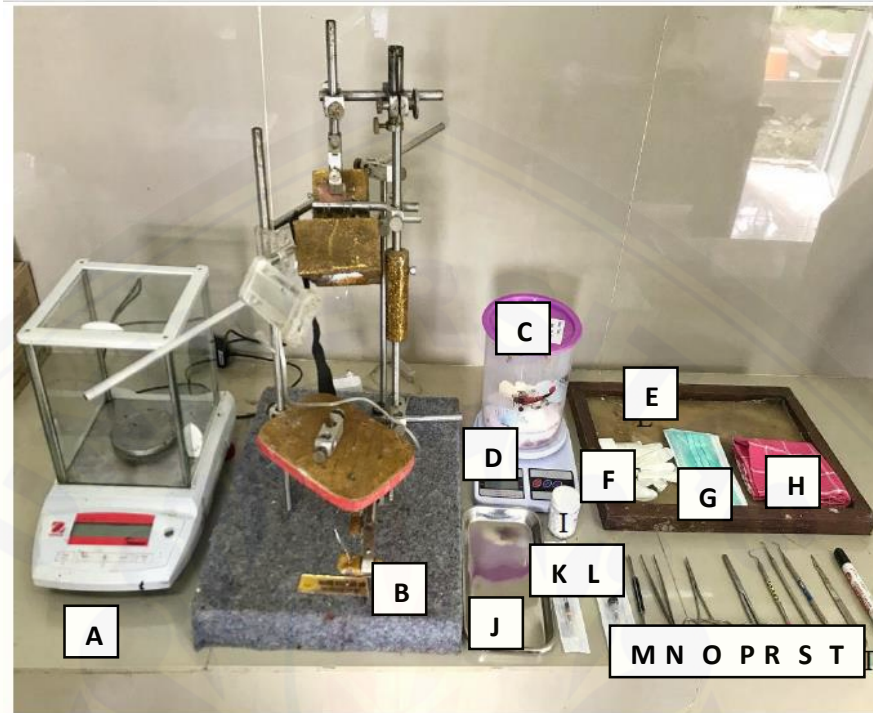


Hasil identifikasi dan kuantifikasi proantosianidin dalam HPLC menggunakan ESI-MS

Peak No.	RT (min)	m/z	ESI MS ²	Content ppm	Tentative identification
1	6.91	286.50	491.000	3.44	Procyanidins B2
2	6.67	270.50	433.000	1.15	Procyanidins A2
3	6.71	271.50	447.000	2.73	Procyanidins B2
4	6.21	286.50	449.000	7.77	Procyanidins B2
5	6.83	302.00	463.000	6.48	Procyanidins B2
6	5.76	302.00	465.000	1.01	Procyanidins B2
7	6.71	316.00	479.000	5.95	Procyanidins B2

Lampiran G. Alat dan Bahan Penelitian

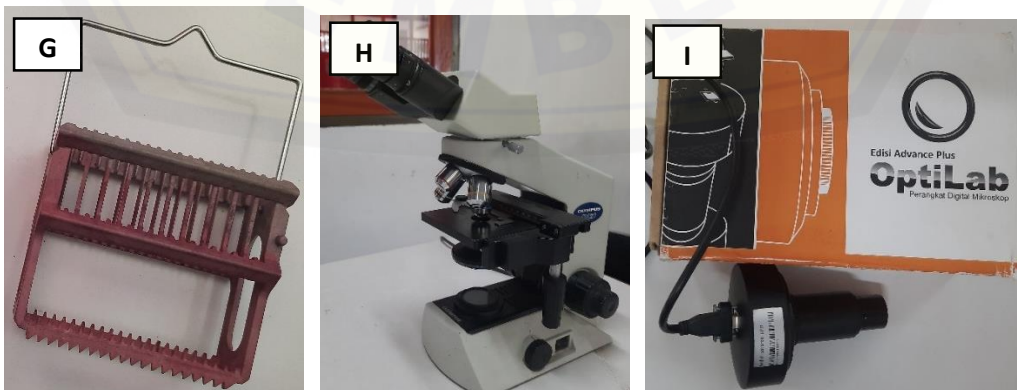
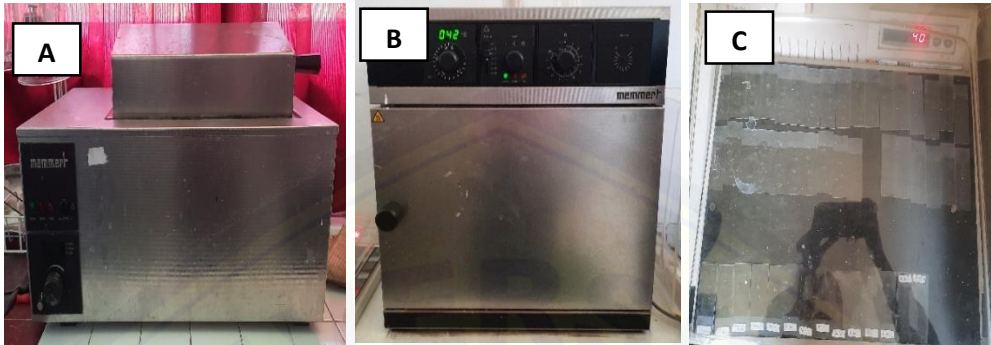
a. Alat penelitian untuk pencabutan gigi



Keterangan :

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| A. Neraca digital | M. Pisau malam |
| B. Dental rat chair | N. Pinset |
| C. Tabung plastik | O. Arteri clam |
| D. Timbangan digital | P. Gunting bedah |
| E. Papan bedah | Q. Sonde setengah lingkaran |
| F. <i>Handscoon</i> | R. Eskavator kecil |
| G. Masker | S. Eskavator besar |
| H. Kain lap | T. Blade dan scalpel |
| I. <i>Cotton roll</i> | U. Spidol |
| J. Baki stainless steel | |
| K. <i>Disossible syringe</i> 1 ml | |
| L. <i>Disossible syringe</i> 5 ml | |

b. Alat penelitian untuk pemrosesan jaringan dan pembuatan preparat



Keterangan :

A : Waterbath

B : Oven Memert

C : Slide warmer

D : Automatic processing tissue

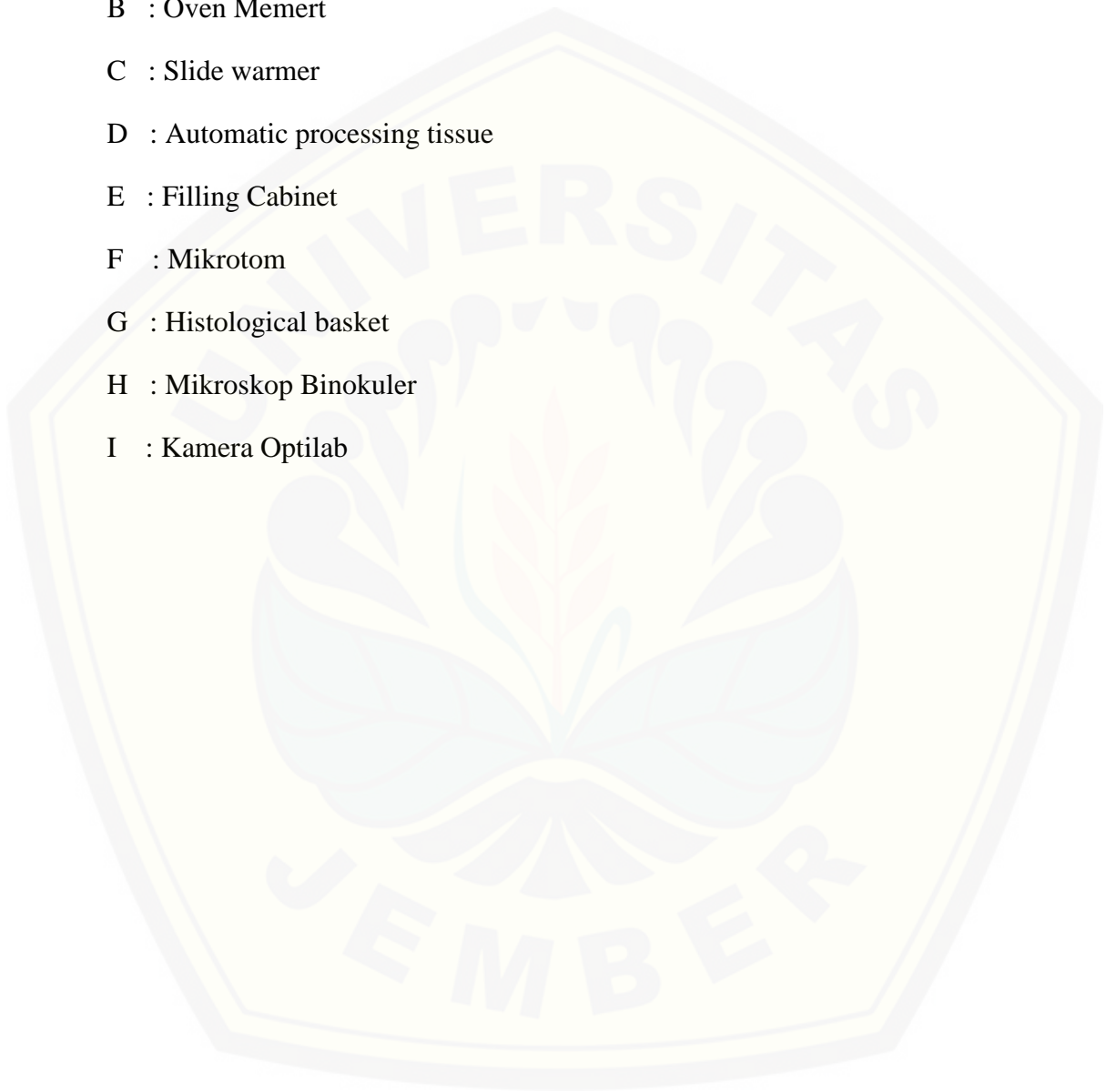
E : Filling Cabinet

F : Mikrotom

G : Histological basket

H : Mikroskop Binokuler

I : Kamera Optilab



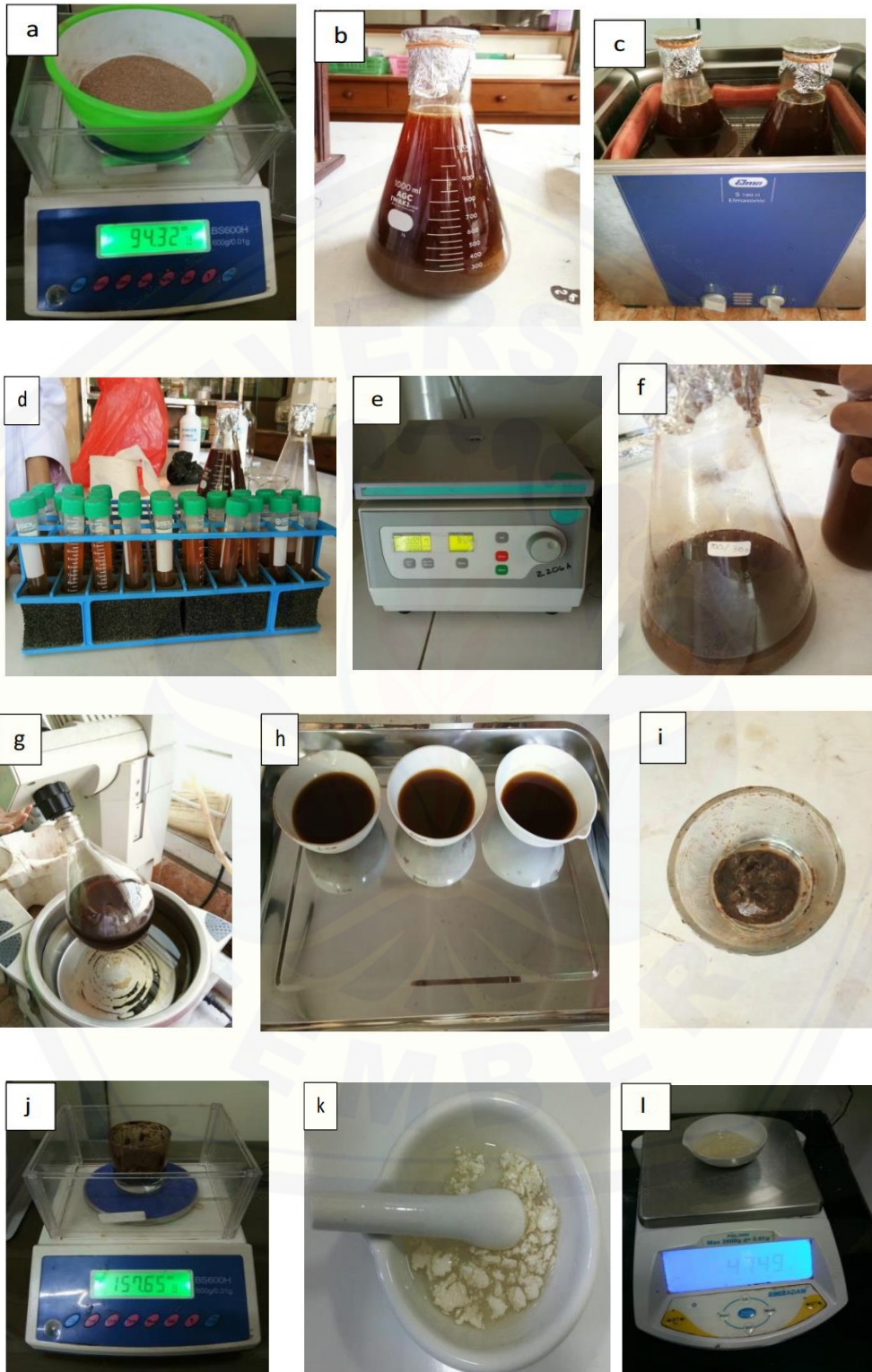
c. Bahan penelitian untuk pemrosesan jaringan dan pembuatan preparat



Keterangan :

- 1 : Etanol
- 2 : Deckglass
- 3 : Object glass
- 4 : Alkohol 95 %
- 5 : Enthelan
- 6 : Xylol
- 7 : Hemaktosilin
- 8 : Eosin 2 %
- 9 : Parafin
- 10 : Formic Acid 10 %

Lampiran H. Proses Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kakao





Keterangan :

A : Menimbangan kulit buah kakao yang sudah dijadikan bubuk

B : Ditambahkan dengan aseton 70% dan akuades

C : Dimasukkan ke dalam mesin ultrasonik dengan suhu selama 20 menit

D : Dimasukkan ke dalam valcon tube

E : Disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 10 menit

F : Larutan ekstrak dipisahkan dari supernatan

G : Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam rotavapor

H : Larutan ekstrak yang sudah dirotavapor ditempatkan ke cawan petri

I : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao

J : Penimbangan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao

K : Pembuatan CMC-Na

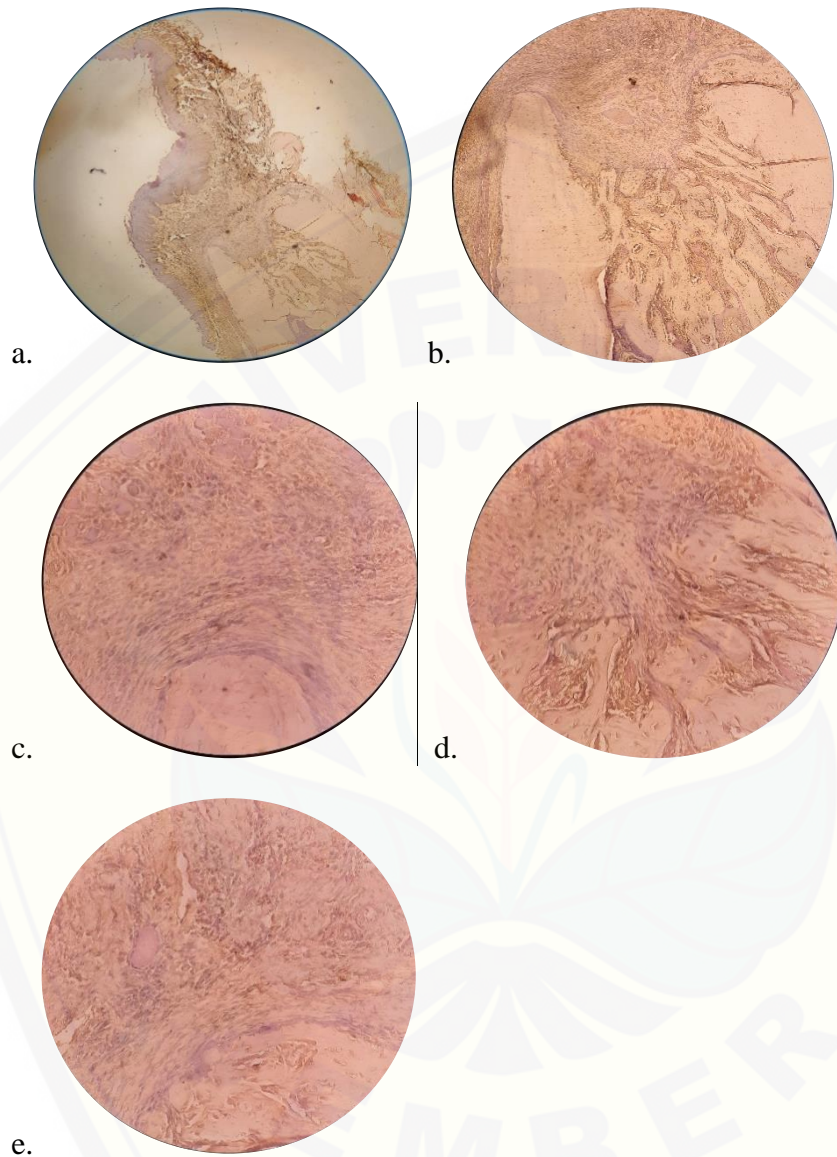
L : Penimbangan CMC-Na

M : CMC-Na dicampur dengan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao

N : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao 100mg/ml dalam bentuk gel

Lampiran I. Gambaran Histologis Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar

Kontrol Positif hari ke 7



Keterangan:

A = Perbesaran 40x

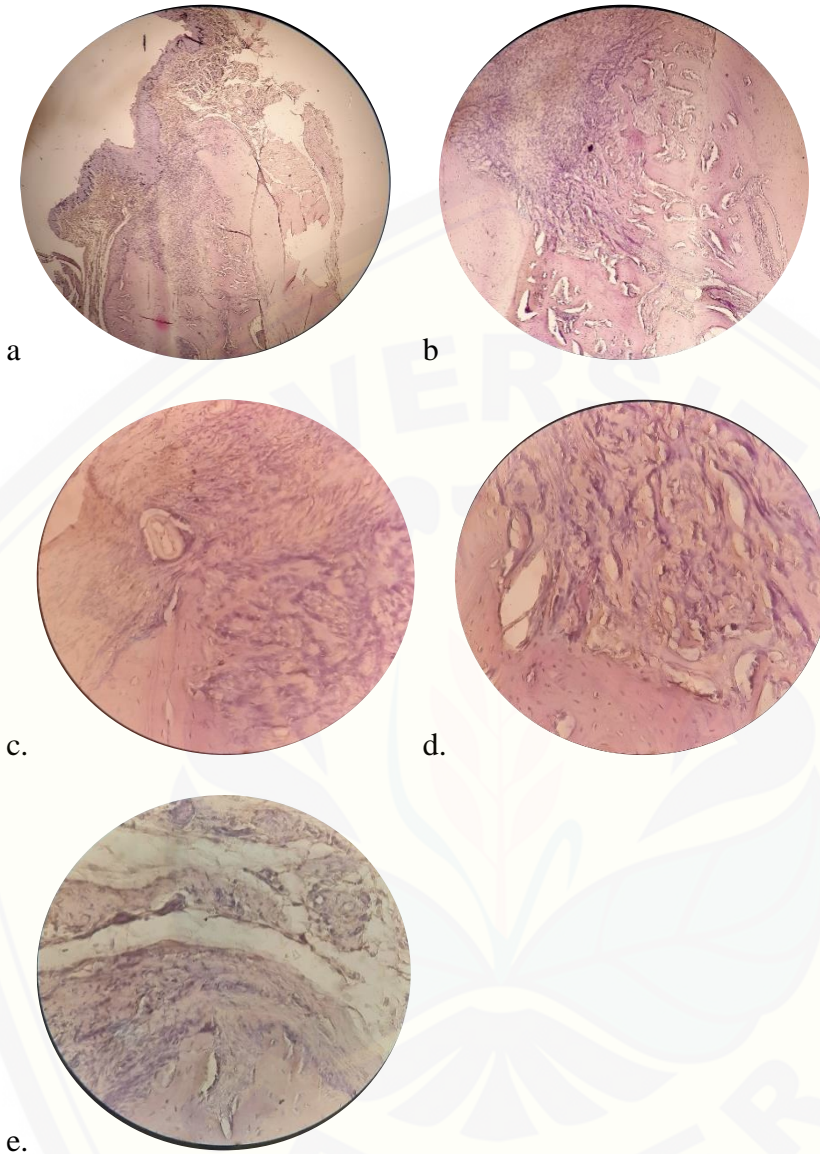
B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

Kontrol Positif hari ke 14



Keterangan:

A = Perbesaran 40x

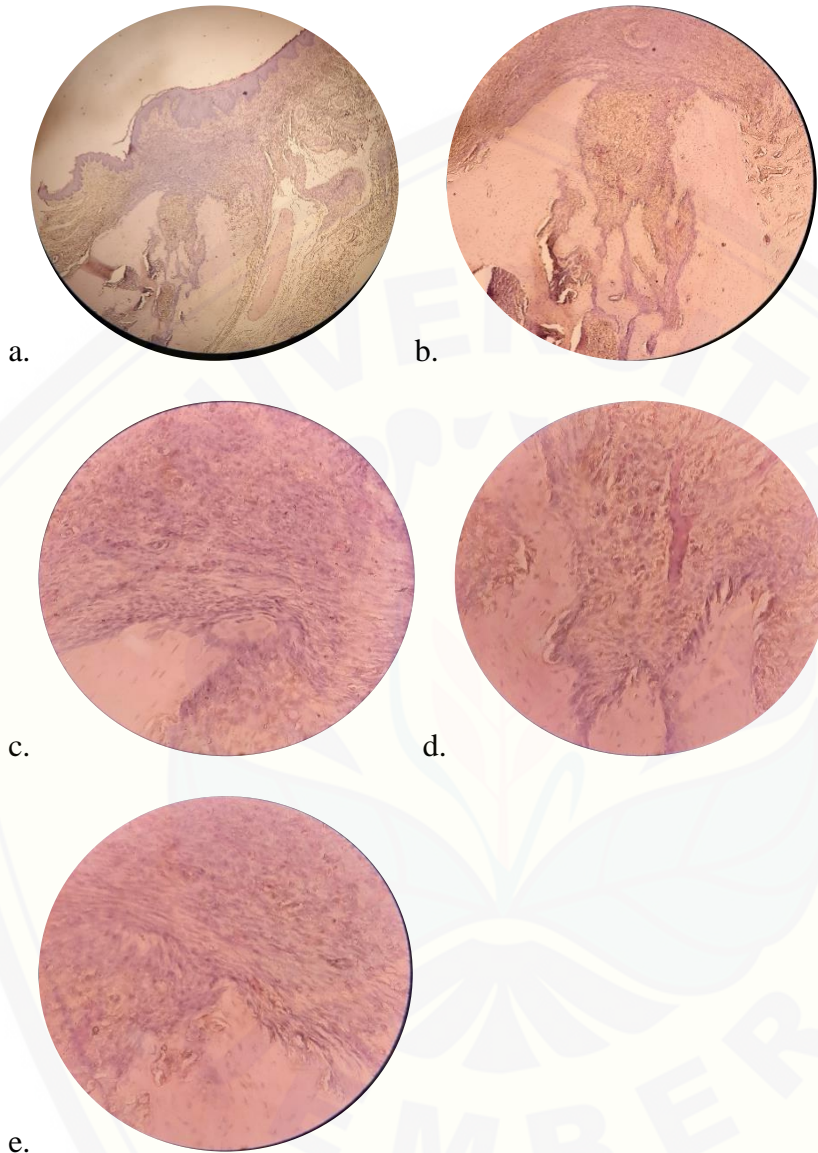
B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

Kontrol Negatif hari ke 7



Keterangan:

A = Perbesaran 40x

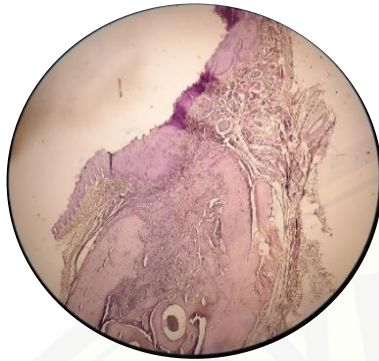
B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

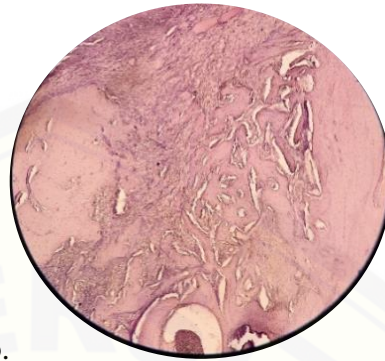
D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

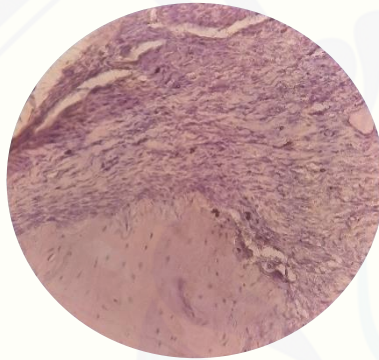
Kontrol Negatif hari ke 14



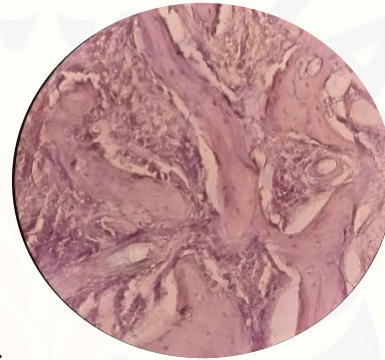
a.



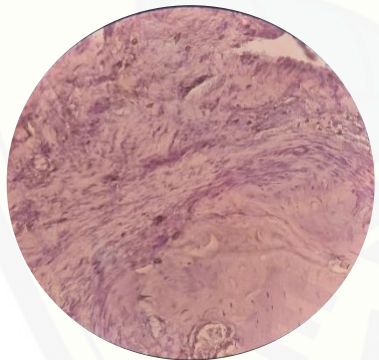
b.



c.



d.



e.

Keterangan:

A = Perbesaran 40x

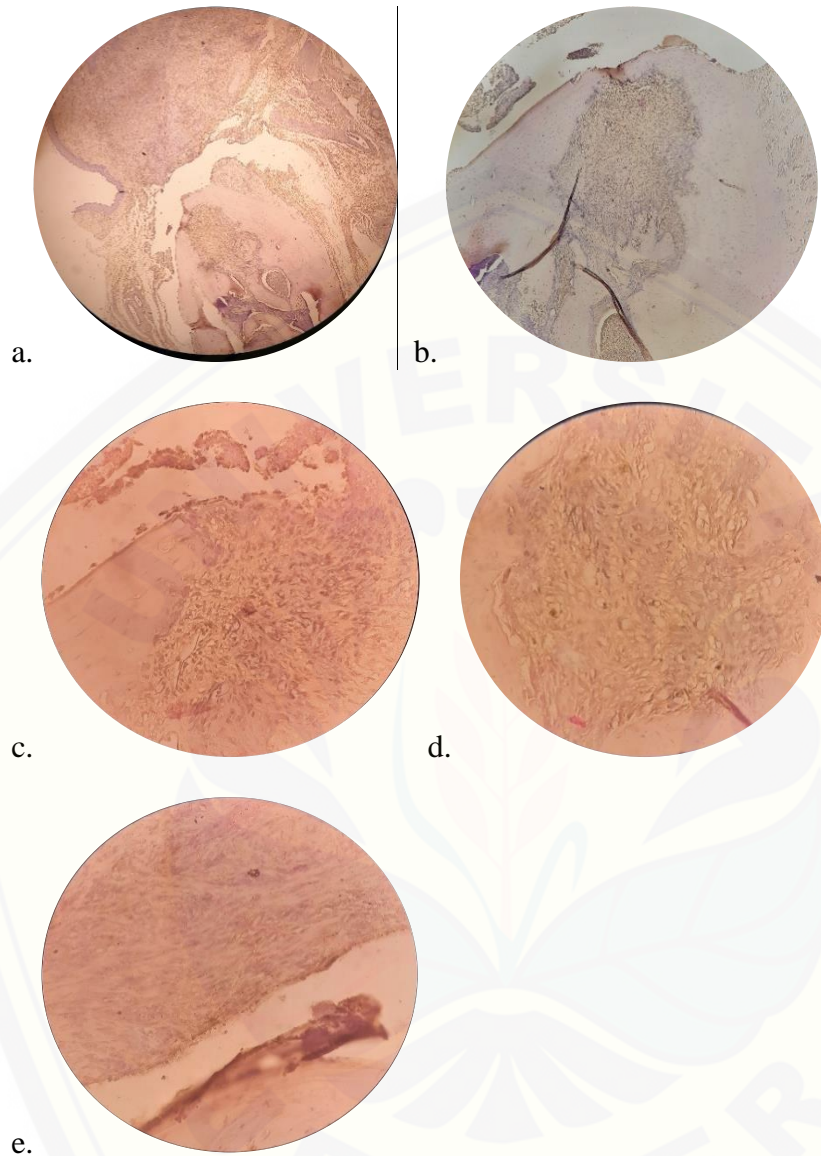
B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

Perlakuan hari ke 7



Keterangan:

A = Perbesaran 40x

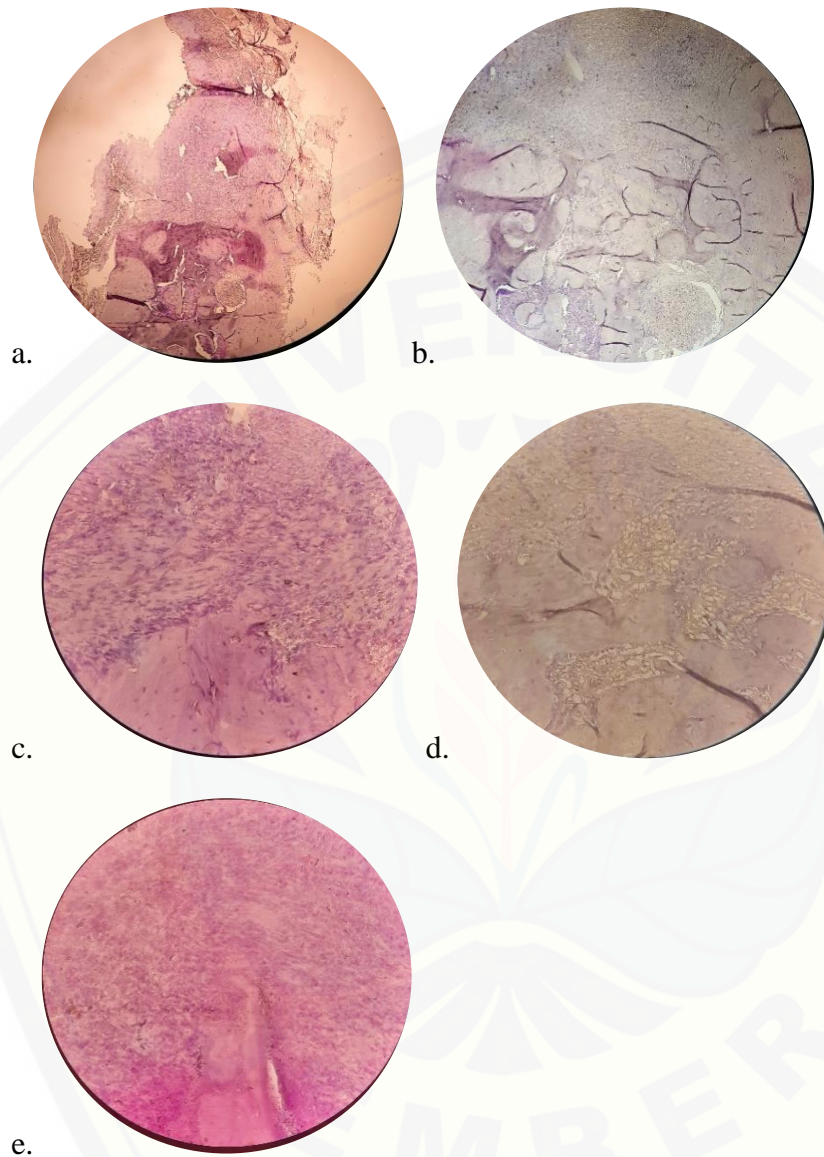
B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

Perlakuan hari ke 14



Keterangan:

A = Perbesaran 40x

B = Perbesaran 100x

C = Perbesaran 400x puncak soket sisi lingual

D = Perbesaran 400x sisi apikal soket

E = Perbesaran 400x puncak soket sisi bukal

Lampiran J. Data Hasil Penelitian

Tikus Hari-7	Tempat			Rata-rata
	Lingual	Apikal	Bukal	
K (+)	6525	5643	6250	5597
	5420	4613	5102	
	4281	4801	6896	
	6266	4703	6658	
K (-)	6024	4722	5000	4789
	5067	5185	4364	
	3882	4904	3961	
	5660	4478	4218	
P	5532	6733	4959	5466
	5590	4228	6050	
	6812	4625	7073	
	5749	3819	4423	
Rata-rata				5495

Tikus Hari-14	Tempat			Rata-rata
	Lingual	Apikal	Bukal	
K (+)	6280	6323	6312	6333
	5971	6360	7122	
	6353	6649	5556	
	7041	5243	6787	
K (-)	5028	6034	4732	5423
	5900	5077	5670	
	5014	4385	6883	
	4869	5876	5612	
P	6842	5576	6758	6093
	6683	5731	5674	
	4826	6565	6258	
	6766	4938	6493	
Rata-rata				5950

B. Pembuluh Darah Hari ke-7

Perlakuan	Tikus	Pengamat	Tempat			Rata-rata Pengamat	Rata-rata
			Labial	Apikal	Bukal		
K (+)	Tikus 1	Pengamat 1	5	3	10	6	7
		Pengamat 2	6	5	11	7	
		Pengamat 3	5	4	11	7	
	tikus 2	Pengamat 1	6	8	11	8	8
		Pengamat 2	7	6	11	8	
		Pengamat 3	7	5	11	8	
	Tikus 3	Pengamat 1	8	4	11	8	7
		Pengamat 2	6	4	10	7	
		Pengamat 3	6	4	10	7	
	Tikus 4	Pengamat 1	7	7	9	8	7
		Pengamat 2	7	7	8	7	
		Pengamat 3	7	6	9	7	
K (-)	Tikus 1	Pengamat 1	6	2	5	4	5
		Pengamat 2	5	2	6	4	
		Pengamat 3	6	3	6	5	
	tikus 2	Pengamat 1	2	1	5	3	3
		Pengamat 2	3	1	5	3	
		Pengamat 3	3	1	6	3	
	Tikus 3	Pengamat 1	6	0	2	3	2
		Pengamat 2	6	0	2	3	
		Pengamat 3	5	0	1	2	
	Tikus 4	Pengamat 1	0	2	1	1	1
		Pengamat 2	0	2	1	1	
		Pengamat 3	0	2	1	1	
P	Tikus 1	Pengamat 1	5	3	7	5	4
		Pengamat 2	4	2	5	4	
		Pengamat 3	6	3	5	5	
	tikus 2	Pengamat 1	6	5	9	7	6
		Pengamat 2	7	5	7	6	
		Pengamat 3	7	4	7	6	
	Tikus 3	Pengamat 1	5	4	7	5	6
		Pengamat 2	6	5	7	6	
		Pengamat 3	6	3	8	6	
	Tikus 4	Pengamat 1	6	6	5	6	4
		Pengamat 2	5	7	6	6	
		Pengamat 3	6	7	6	6	
Rata-rata							5

Pembuluh Darah Hari ke-14

Perlakuan	Tikus	Pengamat	Tempat			Rata-rata Pengamat	Rata-rata
			Labial	Apikal	Bukal		
K (+)	Tikus 1	Pengamat 1	9	5	8	7	7
		Pengamat 2	8	4	8	7	
		Pengamat 3	7	4	7	6	
	tikus 2	Pengamat 1	8	4	5	6	5
		Pengamat 2	7	4	5	5	
		Pengamat 3	7	3	5	5	
	Tikus 3	Pengamat 1	8	4	10	7	7
		Pengamat 2	8	3	9	7	
		Pengamat 3	8	4	8	7	
	Tikus 4	Pengamat 1	8	6	8	7	7
		Pengamat 2	8	6	7	7	
		Pengamat 3	6	6	8	7	
K (-)	Tikus 1	Pengamat 1	2	3	4	3	3
		Pengamat 2	2	2	4	3	
		Pengamat 3	3	2	5	3	
	tikus 2	Pengamat 1	4	1	2	2	2
		Pengamat 2	4	0	3	2	
		Pengamat 3	4	0	2	2	
	Tikus 3	Pengamat 1	4	2	6	4	4
		Pengamat 2	5	2	4	4	
		Pengamat 3	4	1	4	3	
	Tikus 4	Pengamat 1	4	1	3	3	2
		Pengamat 2	3	2	2	2	
		Pengamat 3	3	1	3	2	
P	Tikus 1	Pengamat 1	7	4	3	5	5
		Pengamat 2	7	4	3	5	
		Pengamat 3	6	4	3	4	
	tikus 2	Pengamat 1	3	4	7	5	5
		Pengamat 2	5	3	6	5	
		Pengamat 3	5	3	6	5	
	Tikus 3	Pengamat 1	5	4	5	5	5
		Pengamat 2	6	4	5	5	
		Pengamat 3	5	4	5	5	
	Tikus 4	Pengamat 1	8	3	6	6	6
		Pengamat 2	7	3	7	6	
		Pengamat 3	8	3	7	6	
Rata-rata							5

Lampiran K. Analisis Data Jumlah Sel Fibroblas

1. Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk

Tests of Normality							
	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Fibroblas	Hari ke 7 Kontrol Positif	,182	12	,200*	,929	12	,366
	Hari ke 7 Kontrol Negatif	,105	12	,200*	,967	12	,876
	Hari ke 7 Perlakuan	,130	12	,200*	,953	12	,677
	Hari ke 14 Kontrol Positif	,212	12	,144	,942	12	,518
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	,190	12	,200*	,952	12	,670
	Hari ke 14 Perlakuan	,211	12	,148	,871	12	,067

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji homogenitas menggunakan uji Levene

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Fibroblas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,345	5	66	,051

3. Hasil Uji Beda One Way ANOVA

ANOVA

Jumlah Fibroblas

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17826912,125	5	3565382,425	5,766	,000
Within Groups	40813118,750	66	618380,587		
Total	58640030,875	71			

4. Uji LSD (Least Significant Difference)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Fibroblas

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Hari ke 7 Kontrol Positif	Hari ke 7 Kontrol Negatif	807,75000*	321,03494	,014	166,7831	1448,7169
	Hari ke 7 Perlakuan	130,41667	321,03494	,686	-510,5503	771,3836
	Hari ke 14 Kontrol Positif	-736,58333*	321,03494	,025	-1377,5503	-95,6164
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	173,16667	321,03494	,591	-467,8003	814,1336
	Hari ke 14 Perlakuan	-496,00000	321,03494	,127	-1136,9669	144,9669
Hari ke 7 Kontrol Negatif	Hari ke 7 Kontrol Positif	-807,75000*	321,03494	,014	-1448,7169	-166,7831
	Hari ke 7 Perlakuan	-677,33333*	321,03494	,039	-1318,3003	-36,3664
	Hari ke 14 Kontrol Positif	-1544,33333*	321,03494	,000	-2185,3003	-903,3664
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	-634,58333	321,03494	,052	-1275,5503	6,3836
	Hari ke 14 Perlakuan	-1303,75000*	321,03494	,000	-1944,7169	-662,7831
Hari ke 7 Perlakuan	Hari ke 7 Kontrol Positif	-130,41667	321,03494	,686	-771,3836	510,5503
	Hari ke 7 Kontrol Negatif	677,33333*	321,03494	,039	36,3664	1318,3003
	Hari ke 14 Kontrol Positif	-867,00000*	321,03494	,009	-1507,9669	-226,0331
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	42,75000	321,03494	,894	-598,2169	683,7169
	Hari ke 14 Perlakuan	-626,41667	321,03494	,055	-1267,3836	14,5503
Hari ke 14 Kontrol Positif	Hari ke 7 Kontrol Positif	736,58333*	321,03494	,025	95,6164	1377,5503
	Hari ke 7 Kontrol Negatif	1544,33333*	321,03494	,000	903,3664	2185,3003
	Hari ke 7 Perlakuan	867,00000*	321,03494	,009	226,0331	1507,9669
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	909,75000*	321,03494	,006	268,7831	1550,7169
	Hari ke 14 Perlakuan	240,58333	321,03494	,456	-400,3836	881,5503
Hari ke 14 Kontrol Negatif	Hari ke 7 Kontrol Positif	-173,16667	321,03494	,591	-814,1336	467,8003
	Hari ke 7 Kontrol Negatif	634,58333	321,03494	,052	-6,3836	1275,5503
	Hari ke 7 Perlakuan	-42,75000	321,03494	,894	-683,7169	598,2169
	Hari ke 14 Kontrol Positif	-909,75000*	321,03494	,006	-1550,7169	-268,7831
	Hari ke 14 Perlakuan	-669,16667*	321,03494	,041	-1310,1336	-28,1997
Hari ke 14 Perlakuan	Hari ke 7 Kontrol Positif	496,00000	321,03494	,127	-144,9669	1136,9669
	Hari ke 7 Kontrol Negatif	1303,75000*	321,03494	,000	662,7831	1944,7169
	Hari ke 7 Perlakuan	626,41667	321,03494	,055	-14,5503	1267,3836
	Hari ke 14 Kontrol Positif	-240,58333	321,03494	,456	-881,5503	400,3836
	Hari ke 14 Kontrol Negatif	669,16667*	321,03494	,041	28,1997	1310,1336

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

Lampiran L. Analisis Data Jumlah Pembuluh Darah

1. Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk

Tests of Normality							
	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Pembuluh Darah	Hari 7 Kontrol Positif	,207	12	,167	,915	12	,246
	Hari 7 Kontrol Negatif	,223	12	,101	,864	12	,055
	Hari 7 Perlakuan	,214	12	,135	,944	12	,547
	Hari 14 Kontrol Positif	,159	12	,200*	,906	12	,191
	Hari 14 Kontrol Negatif	,197	12	,200*	,960	12	,780
	Hari 14 Perlakuan	,179	12	,200*	,881	12	,090

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji homogenitas menggunakan Uji Levene

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Pembuluh Darah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,919	5	66	,103

3. Hasil Uji Beda One Way ANOVA

ANOVA

Jumlah Pembuluh Darah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	226,667	5	45,333	12,321	,000
Within Groups	242,833	66	3,679		
Total	469,500	71			

4. Uji LSD (Least Significant Difference)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Pembuluh Darah

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Hari 7 Kontrol Positif	Hari 7 Kontrol Negatif	4,41667*	,78308	,000	2,8532	5,9801
	Hari 7 Perlakuan	1,41667	,78308	,075	-,1468	2,9801
	Hari 14 Kontrol Positif	,91667	,78308	,246	-,6468	2,4801
	Hari 14 Kontrol Negatif	4,83333*	,78308	,000	3,2699	6,3968
	Hari 14 Perlakuan	2,41667*	,78308	,003	,8532	3,9801
Hari 7 Kontrol Negatif	Hari 7 Kontrol Positif	-4,41667*	,78308	,000	-5,9801	-2,8532
	Hari 7 Perlakuan	-3,00000*	,78308	,000	-4,5635	-1,4365
	Hari 14 Kontrol Positif	-3,50000*	,78308	,000	-5,0635	-1,9365
	Hari 14 Kontrol Negatif	,41667	,78308	,596	-1,1468	1,9801
	Hari 14 Perlakuan	-2,00000*	,78308	,013	-3,5635	-,4365
Hari 7 Perlakuan	Hari 7 Kontrol Positif	-1,41667	,78308	,075	-2,9801	,1468
	Hari 7 Kontrol Negatif	3,00000*	,78308	,000	1,4365	4,5635
	Hari 14 Kontrol Positif	-,50000	,78308	,525	-2,0635	1,0635
	Hari 14 Kontrol Negatif	3,41667*	,78308	,000	1,8532	4,9801
	Hari 14 Perlakuan	1,00000	,78308	,206	-,5635	2,5635
Hari 14 Kontrol Positif	Hari 7 Kontrol Positif	-,91667	,78308	,246	-2,4801	,6468
	Hari 7 Kontrol Negatif	3,50000*	,78308	,000	1,9365	5,0635
	Hari 7 Perlakuan	,50000	,78308	,525	-1,0635	2,0635
	Hari 14 Kontrol Negatif	3,91667*	,78308	,000	2,3532	5,4801
	Hari 14 Perlakuan	1,50000	,78308	,060	-,0635	3,0635
Hari 14 Kontrol Negatif	Hari 7 Kontrol Positif	-4,83333*	,78308	,000	-6,3968	-3,2699
	Hari 7 Kontrol Negatif	-,41667	,78308	,596	-1,9801	1,1468
	Hari 7 Perlakuan	-3,41667*	,78308	,000	-4,9801	-1,8532
	Hari 14 Kontrol Positif	-3,91667*	,78308	,000	-5,4801	-2,3532
	Hari 14 Perlakuan	-2,41667*	,78308	,003	-3,9801	-,8532
Hari 14 Perlakuan	Hari 7 Kontrol Positif	-2,41667*	,78308	,003	-3,9801	-,8532
	Hari 7 Kontrol Negatif	2,00000*	,78308	,013	,4365	3,5635
	Hari 7 Perlakuan	-1,00000	,78308	,206	-2,5635	,5635
	Hari 14 Kontrol Positif	-1,50000	,78308	,060	-3,0635	,0635
	Hari 14 Kontrol Negatif	2,41667*	,78308	,003	,8532	3,9801

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

