

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Pendahuluan

Kulit adalah organ terbesar didalam tubuh manusia, kulit berfungsi sebagai pelindung yang sangat baik. Namun, diketahui bahwa penyebab umum luka dikarenakan adanya sifat fisik, zat kimia, panas atau perubahan suhu (Laut *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2023). Salah satu luka akut pada kulit karena adanya kontaminasi oleh mikroorganisme dan luka dapat sembuh secara alami dalam waktu 14 hari hingga 30 hari (Morguette *et al.*, 2023). Jumlah infeksi kulit dengan rasio kematian sebesar 20,3% dan tingkat kematian tahunan sebesar 3,4 per 100.000 orang (Marzaman *et al.*, 2022). Infeksi luka *Staphylococcus aureus* adalah salah satu infeksi paling umum yang menyebabkan banyak morbiditas pada kematian dan dapat menyebar ke aliran darah (Elbatouti *et al.*, 2023).

Penyembuhan luka yang tidak tepat, karena adanya pendarahan, infeksi, peradangan, dan masalah dengan angiogenesis serta regenerasi. Proses penyembuhan luka terdiri dari fase inflamasi, proliferasi dan maturasi (Vitale *et al.*, 2022; Wen *et al.*, 2023). Pada pengelolaan pengobatan luka infeksi dapat mendukung proses penyembuhan peradangan dan perbaikan jaringan (Mofazzal Jahromi *et al.*, 2018). Sebagian besar infeksi dapat dicegah melalui penggunaan profilaksis antimikroba yang tepat. Namun, penggunaan ini juga dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti resisten terhadap antimikroba (Morguette *et al.*, 2023). Oleh karena itu, diperlukan pilihan terapi alternatif selain penggunaan antibiotik untuk mengatasi masalah resistensi dan efek samping (Elbatouti *et al.*, 2023). Produk alami yang telah digunakan dalam pengobatan tradisional memiliki sifat antiinflamasi dan antibakteri karena keanekaragaman molekul bioaktif. Penggunaan senyawa alami dalam pembuatan obat luka dapat mengurangi ketergantungan pada antibakteri, antiinflamasi dan mengurangi biaya perawatan kesehatan. Senyawa-senyawa alami dapat dimasukkan ke dalam formulasi farmasi yang mengandung polimer alami (Vitale *et al.*, 2022)

Salah satu sumber alami yang berpotensi dalam upaya pencegahan adalah Fukoidan. Fukoidan adalah polisakarida yang terdapat pada dinding sel alga cokelat dan tersusun dari α -(1 \rightarrow 3)-L-fukosa yang tersulfatasi. Senyawa ini larut dalam air dan memiliki berat molekul bervariasi antara 100 hingga 1600 kDa, serta diketahui tidak beracun (Habibi *et al.*, 2024). Pada tahun 1913 ditemukan ekstraksi pertama Fukoidan adalah *Ascophyllum nodosum* dan *Fucus vesiculosus* (Luthuli *et al.*, 2019). Tetapi belum ada isolasi dari *Sargassum polycystum*. Fukoidan memiliki beragam aktivitas biologis sebagai antikanker, antibakteri, antivirus, antialergi, antikoagulan, antioksidan,



stimulan, serta memiliki sifat kardioprotektif dan hepatoprotektif. Senyawa alami yang berpotensi dalam upaya pencegahan penyakit antibakteri adalah Alga cokelat *Sargassum polycystum*. Alga cokelat adalah alga cokelat yang melimpah di perairan Sulawesi Selatan (Abdel-anggau *et al.*, 2022). Oleh sebab itu, dalam penelitian ini telah dilakukan karakterisasi senyawa Fukoidan dari alga cokelat *Sargassum polycystum* dan aktivitas biologisnya sebagai antibakteri dan antiinflamasi dalam penyembuhan

luka yang diharapkan mampu menjadi terapi pilihan dalam pencegahan luka pada kulit melalui aplikasi topikal.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana mengisolasi Fukoidan dari *Sargassum polycystum*?
2. Bagaimana hasil karakterisasi Fukoidan yang diisolasi dari *Sargassum polycystum*?
3. Bagaimana aktivitas Fukoidan yang diisolasi dari *Sargassum polycystum* sebagai agen penyembuhan luka pada tikus yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

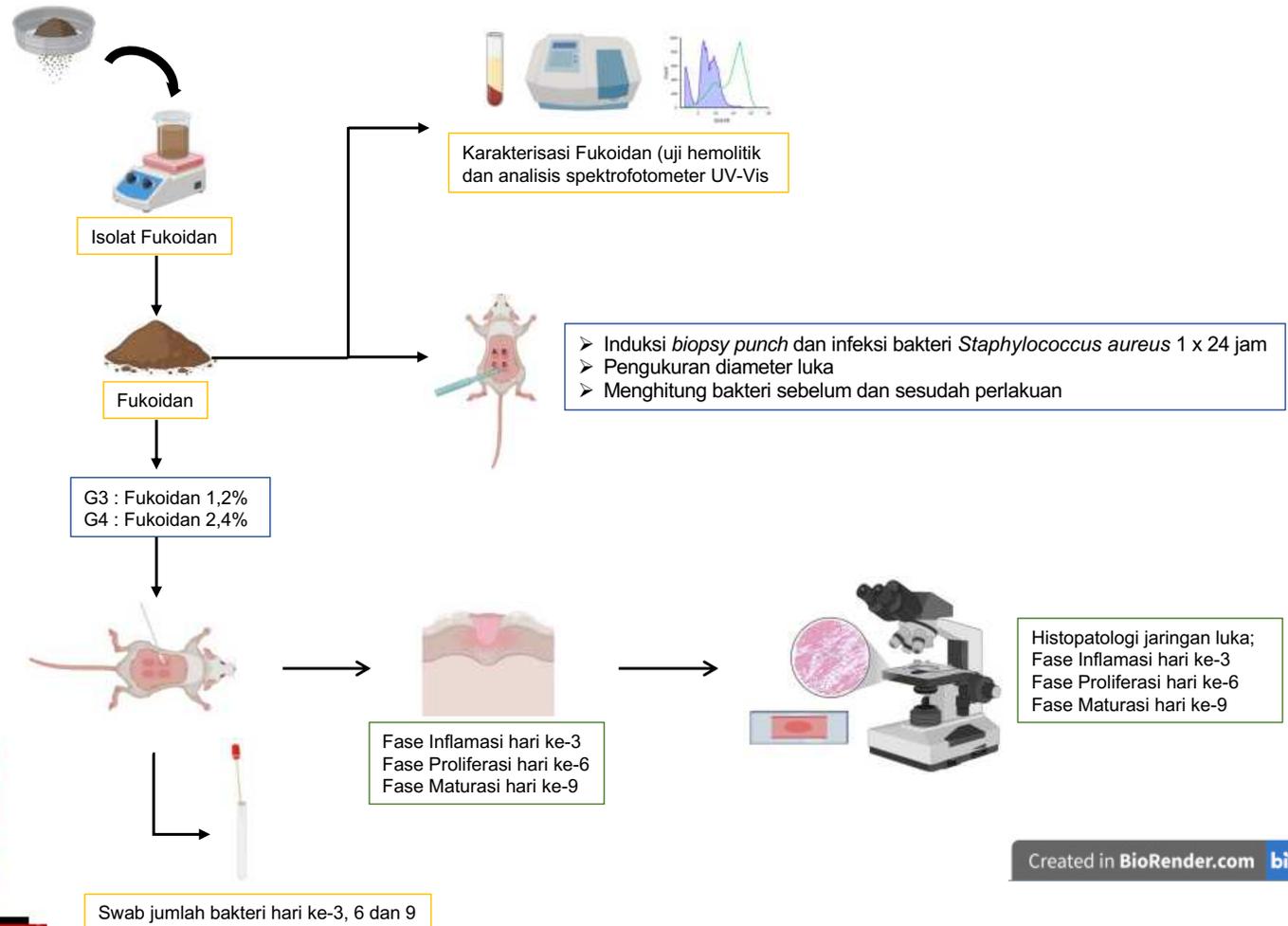
1. Mengetahui cara mengisolasi Fukoidan dari *Sargassum polycystum*.
2. Menganalisis hasil karakterisasi Fukoidan yang diisolasi dari *Sargassum polycystum*.
3. Mengetahui aktivitas Fukoidan yang diisolasi dari *Sargassum polycystum* pada penyembuhan luka tikus yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya wawasan dan pemahaman ilmiah mengenai potensi Fukoidan sebagai senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas terapeutik, khususnya dalam penyembuhan luka.



1.5 Kerangka Konsep



- Variabel
- Variabel
- Variabel



Gambar 1. Kerangka konsep

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara experimental di laboratorium untuk mengetahui aktivitas senyawa Fukoidan yang telah di isolasi sebagai penyembuhan luka pada tikus model perlukaan akut terinfeksi secara *in vivo dan in vitro* yang dilakukan di laboratorium Biofarmasi dan Farmakologi Toksikologi, laboratorium mikrobiologi fakultas farmasi, dan laboratorium HUM-RC fakultas kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®). Batang pengaduk, Cawan Porselen, *Centrifuge* (Oregon® LC-04S), Hotplate (Maspion®). Kertas saring *Whatman* No. 41/110, Lemari pendingin, *Magnetic stirrer*, Mikropipet, Oven (Mettler®), Pipet mikro, Spektrofotometer UV-Vis (Biobase®), Termometer, Timbangan analitik (Sartorius®) dan Jangka sorong.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, Aqua Destilata (*Water One*), Kalsium Klorida (CaCl_2), Aquadest, Alkoho, Bakteri *Staphylococcus aureus*, Etanol Pro Analisis, I, Fenol 5%, Fukoidan, Natrium Klorida (NaCl), Vaselin, *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Pakan Tikus AD II, dan Aluminium Foil.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan sampel

Alga cokelat *Sargassum polycystum* yang diambil dari perairan Kabupaten Takalar, Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia. Lokasi pengambilan sampel berada pada titik koordinat 5°15'45" Lintang Selatan (LS) dan 119°28'12" Bujur Timur (BT), yang setara dengan 5 derajat, 15 menit, 45 detik LS dan 119 derajat, 28 menit, 12 detik BT. Sampel dikumpulkan pada kedalaman air sekitar 5 meter.

2.3.2 Proses ekstraksi dan isolasi alga cokelat

Alga cokelat pertama-tama dicuci dengan air laut, kemudian dibilas dengan air tawar yang mengalir untuk menghilangkan kontaminan seperti pasir dan garam. Kemudian dibersihkan lebih lanjut dengan air suling untuk menghilangkan sifat organoleptik seperti bau dan rasa. Setelah dibersihkan, alga cokelat dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering, alga cokelat dicacah kecil-kecil dan digiling menjadi bubuk halus, kemudian diayak dengan ayakan 100 mesh.

Sebanyak 50 g bubuk alga cokelat halus diisolasi dengan menggunakan 1 liter etanol puran tersebut diaduk dan dibiarkan selama 12 jam pada suhu dan disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan protein. Endapan yang dihasilkan dikeringkan semalaman dan dilanjutkan, 5 g serbuk kering dicampur dengan 100 mililiter air pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Untuk mendapatkan supernatan dimetil, larutan dicampur dengan



1% CaCl₂ dan dibiarkan semalaman pada suhu 4°C untuk mengendapkan asam alginat. Endapan kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit, dan supernatan dikumpulkan dan dicampur dengan etanol 99% untuk mencapai konsentrasi akhir 30%. Larutan disimpan selama 4 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi lagi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit (Palanisamy *et al.*, 2017). Terakhir, sediaan dikeringkan dengan cara dibekukan dan digerus menjadi serbuk halus. Persentase rendemen dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Kim *et al.*, 2021)

$$\text{Fucoidan (\%)} = \frac{\text{Berat fucoidan kering yang diperoleh sebagai hasil dari pengendapan etanol}}{\text{berat biomassa}} \times 100\%$$

2.3.3 Karakterisasi Fukoidan

2.3.3.1 Determinasi alga cokelat

Determinasi alga cokelat yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan untuk memastikan identifikasi spesies yang tepat. Proses dideterminasi di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan Departemen Biologi, FMIPA Universitas Hasanuddin untuk mengidentifikasi spesies alga cokelat (Sundari *et al.*, 2023).

2.3.3.2 Analisis Spektroskopi Inframerah Fourier-Transform (FTIR) Fukoidan

Eksperimen dilakukan dalam berbagai molekul yang berada dalam matriks biomassa yang dianalisis oleh instrument FTIR Shimadzu® type IRPrestige-21. Isolasi fucoidan yang di FTIR dicatat dalam mode ATR. Spektrum FTIR direkam pada bilangan gelombang 4000-500 cm⁻¹. Pengukuran dilakukan menggunakan mode transmisi dengan resolusi 4 cm⁻¹, durasi pemindaian 32 menit, dan data spektral disimpan dengan nama dan kode sampel yang ditetapkan (Enggi *et al.*, 2024; Hans *et al.*, 2023; Qi *et al.*, 2022; Sapiun *et al.*, 2024).

2.3.3.3 Analisis pada spektrofotometer UV-Vis

a. Pembuatan larutan stok Fukoidan

Untuk membuat larutan stok Fukoidan standar, ditimbang 5 mg Fukoidan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, akuades ditambahkan ke labu ukur hingga tanda batas untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 1000 bpj (Stephanie *et al.*, 2024).

b. Penentuan panjang gelombang absorbansi maksimum untuk Fukoidan dalam air



Penelitian ini dilakukan untuk penentuan gelombang maksimum dengan larutan stok Fukoidan 1000 bpj dan dicuplik sebanyak 400 µL ke dalam labu ukur kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 5 mL. Labu ukur tersebut diberi larutan fenol 5% dan H₂SO₄ dengan perbandingan volume 1:1:8, kemudian cukupkan dengan larutan air untuk menghasilkan konsentrasi 80 bpj. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-

800 nm (Stephanie *et al.*, 2024). Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Manikandan *et al.*, 2020). Panjang gelombang maksimum diidentifikasi berdasarkan nilai absorbansi tertinggi yang tercatat dari sampel.

c. Penentuan kurva baku Fukoidan

Pada larutan stok Fukoidan dengan 1000 bpj dibuat menjadi larutan stok 500 bpj, lalu dicuplik sebanyak 12.5, 25, 50, 100, 200 dan 400, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL agar memperoleh dengan seri konsentrasi dari 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 µg/mL, masing-masing konsentrasi ditambahkan 500 µL fenol 5%, H₂SO₄ dibuat sebanyak tiga kali dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

d. Penyiapan larutan Fukoidan

Larutan isolat dibuat dengan konsentrasi 40 µg/mL. Konsentrasi dibuat dengan tiga replikasi dan diukur pada panjang gelombang maksimum. Kadar fukoidan dari isolat dihitung berdasarkan persamaan garis kurva baku (Stephanie *et al.*, 2024)

2.4 Studi uji aktivitas hemolisis Fukoidan secara *in vivo*

Uji aktivitas hemolisis untuk menilai biokompatibilitas dan toksisitas sistem penghantaran obat dan merupakan bagian uji toksisitas awal Fukoidan. Dalam metode ini, menggunakan sampel darah tikus Wistar. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam tabung steril Falcon™ 50 mL untuk memisahkan plasma dari sel darah merah (RBC) dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan yang mengandung plasma dibuang, kemudian endapan tersebut dibilas selama tiga kali menggunakan larutan PBS. Setelah dibilas tiga kali, eritrosit yang terkumpul dibilas lagi dan disuspensikan kembali menggunakan larutan PBS, divortex selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya eritrosit diencerkan dengan larutan PBS untuk mendapatkan konsentrasi akhir 10% v/v (Tangdilintin *et al.*, 2024). Eritrosit diencerkan dalam larutan PBS untuk mencapai konsentrasi 10, 100, dan 1000 µg/mL dalam 900 µg/mL. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, setelah diinkubasi, sampel disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit. Pengukuran absorbansi diukur menggunakan spektrofotomer UV-Vis untuk mengetahui jumlah hemoglobin bebas yang didapatkan pada panjang gelombang maksimum hemoglobin, yaitu 540 nm. Eritrosit yang ditambahkan larutan PBS merupakan kontrol negatif dan eritrosit yang ditambahkan air merupakan kontrol positif (C. A. Fernando *et al.*, 2023; Stephanie *et al.*, 2024). Untuk menghitung presentase hemolisis dinyatakan sesuai dengan persamaan berikut ini (Fontelo *et al.*, 2022):

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi sampel} - \text{Kontrol Negatif})}{\text{Kontrol Positif} - \text{Kontrol Negatif}} \times 100$$



as Fukoidan *in vivo*

ediaan topikal Fukoidan

ini digunakan hasil isolat Fukoidan dengan variasi dosis 1,2% dan /aselin yang dibuat sebanyak 10 g, yaitu 1,2% menggunakan 120 nsentrasi 2,4% menggunakan 240 mg Fukoidan dan 9,76 g Vaselin.

2.5.2 Aklimatisasi hewan uji coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang akan di aklimatisasi 7-14 hari terlebih dahulu sebelum dilakukan penelitian untuk mengadaptasikan tikus dengan lingkungan laboratorium Farmakologi dan Toksikologi fakultas farmasi Universitas Hasanuddin. Hewan coba tersebut dipantau setiap hari untuk memastikan kesehatan hewan coba. Hewan coba juga ditimbang setiap minggu untuk mengetahui berat badan dan perkembangannya. Hewan coba ditempatkan pada kandang yang diberikan pakan standar AD II dan air minum secara *ad Libitum*. Kandang hewan coba juga diperhatikan kebersihannya dengan cara dibersihkan dua kali seminggu untuk memastikan tingkat kelembaban, kenyamanan, kebersihan dan keamanan hewan coba. Lingkungan laboratoium diatur dengan suhu berkisar 25-30°C, serta cahaya gelap terang setiap 12 jam (dos Santos *et al.*, 2022).

2.5.3 Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Semua peralatan yang digunakan dalam pembuatan suspensi bakteri disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Setiap peralatan ditutup dengan kapas dan aluminium foil untuk menjaga sterilitas. Pembuatan media agar dilakukan dengan menimbang 0,39 gram Nutrient agar, kemudian dilarutkan dalam 10 mL akuades di dalam labu Erlenmeyer. Larutan tersebut dipanaskan dengan menggunakan pemanas listrik hingga semua komponen larut secara homogen. Setelah itu, media dipindahkan ke dalam tabung reaksi dengan posisi miring 90° hingga mengering dan mengeras. Mikroorganisme *Staphylococcus aureus* dibiakkan di dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan suspensi bakteri diukur dengan membandingkan hasilnya dengan larutan standar *McFarland* 1 menggunakan *densitometer McFarland*. Jika kekeruhan melebihi standar yang ditetapkan, larutan NaCl 0,9% steril ditambahkan hingga mencapai tingkat kejernihan yang sesuai (García-Vidal *et al.*, 2022; Sartini, 2020).

2.5.4 Induksi luka akut dan infeksi *Staphylococcus aureus*

Dalam penelitian ini, 15 ekor tikus dibius menggunakan 0,3 mL ketamin secara intraperitoneal. Punggung tikus dicukur hingga bersih dan tidak ada bulu sama sekali. Kemudian dibuat 4 luka pada punggung tikus dengan diameter 6 mm menggunakan *biopsy punch*. Luka diberi kode G1, G2, G3 dan G4 dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* secara intradermal pada daerah punggung hewan coba sebanyak 0,1 mL sebagai pembentukan koloni (CFU/mL). Kemudian ditutup menggunakan kain kasa dan *Parafilm* persegi. Setelah diinduksi dan diinfeksi, hewan percobaan ditempatkan kembali ke dalam kandangnya (Elbatouti *et al.*, 2023).

2.6 Hewan dan protokol perlakuan eksperimental



Optimized using
trial version
www.balesio.com

2.6.1 Hewan

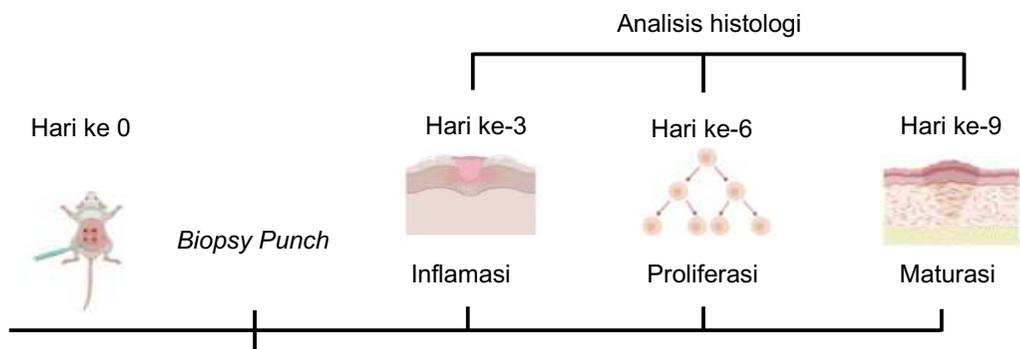
Penelitian ini menggunakan lima belas ekor hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah dipelihara selama 3 minggu, dengan berat sekitar 200-230 g, dipelihara pada suhu 25°C dan kelembaban bebas terhadap air dan makanan, dalam siklus terang-gelap 12/12 jam. Penelitian ini dilakukan dengan persetujuan resmi. Seluruh prosedur dalam penelitian ini dilakukan sesuai pedoman Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi,

Universitas Hasanuddin, dengan nomor etik yang telah disetujui Nomor 913/UN4.17/KEP/2024. Tikus diaklimatisasi selama 2 minggu sebelum percobaan kemudian dibagi secara acak menjadi lima kelompok yang masing-masing terdiri dari 15 ekor tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok dengan 5 ekor hewan coba tikus masing-masing. Setiap hewan coba tikus menerima perawatan khusus untuk empat area luka yang berbeda, seperti pada **Gambar 2**. dengan proses inflamasi, proliferasi dan maturasi.

Sebagian luka diobati G1 (Vaselin sebagai kontrol negatif), G2 k(rim penyembuh luka Nisagon® digunakan sebagai kontrol positif), G3 (Fukoidan berbasis Vaselin 1,2%) dan G4 (Fukoidan berbasis Vaselin 2,4%). Perlakuan diberikan setiap hari pada siang hari pukul 12.00 siang ke seluruh bagian tubuh yang diinduksi luka dan diinfeksi *Staphylococcus aureus*.

Perlakuan dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan sebanyak 10 mg menggunakan *cotton* swab steril, perlakuan juga dilakukan dengan mengukur diameter luka awal hingga pengukuran penyembuhan pada akhir, selama 10 hari berturut-turut hingga hewan coba dianalisis lukanya.

1. 5 ekor hewan uji coba sebagai representatif kondisi luka pada fase inflamasi. Dibuat kelompok I pada hari ke-3, dilakukan pengambilan jaringan untuk melihat proses fase Inflamasi pada makrofag, leukosit dan ulkus.
2. 5 ekor hewan uji coba sebagai representatif kondisi luka pada fase proliferasi. Dibuat kelompok II pada hari ke-6, dilakukan pengambilan jaringan untuk melihat proses fase proliferasi pada angiogenesis dan fibroblast.
3. 5 ekor hewan uji coba sebagai representatif kondisi luka pada fase maturasi. Dibuat kelompok III pada hari ke-9 perlakuan, dilakukan pengambilan jaringan untuk melihat proses fase kolagen re-epitelisasi.



Infeksi bakteri
Staphylococcus aureus
1 : 24 jam



Gambar 2. Proses inflamasi, proliferasi dan maturasi

lihat koloni *Staphylococcus aureus* sebelum dan sesudah

diambil dengan menggunakan ose, dimasukkan ke dalam tabung berisi 0,5 mL akuades steril, dan divortex selama 1 menit. Dipipet

0,1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang berisi 0,4 mL akuades dengan pengenceran 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 , kemudian divortex selama 1 menit. Ganti ujung mikropipet untuk setiap pengenceran. Sampel sebanyak 100 μ l dari setiap pengenceran diambil dan digoreskan ke dalam cawan petri yang berisi media *count plate agar* (PCA) steril. Kemudian, media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, jumlah koloni diamati dengan dua cara yaitu menghitung menggunakan *colony count* dan menghitung secara manual menggunakan cawan petri tertutup. Memotret dan menghitung jumlah koloni secara visual dengan mengamati dari bagian belakang cawan petri (Makrai *et al.*, 2023; Olivia *et al.*, n.d.).

2.6.3 Aktivitas Fukoidan dalam penyembuhan diameter luka

Model luka *biopsy punch* pada tikus digunakan untuk mengevaluasi aktivitas penyembuhan luka Fukoidan. Sebelum pembuatan luka, tikus ditimbang untuk menghitung dosis anestesi yang sesuai dan diberikan secara injeksi intraperitoneal 0,3 mL ketamin. Dibuat empat luka melingkar dengan masing-masing berdiameter 6 mm. Setelah luka dibuat, dilakukan pengambilan foto pada setiap luka sebelum dibalut (Ishi *et al.*, 2023; Sari *et al.*, 2024).

Diameter penyembuhan luka diukur pada tiga titik yang berbeda untuk memastikan akurasi dan konsistensi ukuran luka pada hari ke-3, ke-6 dan ke-9. Kontraksi luka dihitung sebagai persentase pengurangan area luka, seperti yang ditunjukkan dalam rumus di bawah ini (Moglad *et al.*, 2020).

$$\text{Wound Healing (\%)} = \frac{(\text{luas luka hari pertama} - \text{luas luka hari terakhir})}{\text{luas luka pertama}} \times 100$$

2.6.4 Pembuatan preparat analisis histopatologi kulit

Jaringan kulit yang telah dipotong akan diproses melalui serangkaian tahap dan pemeriksaan histopatologi ini dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya

1. Fiksasi : jaringan difiksasi menggunakan larutan *buffer* formalin 10% dengan pH 7,0-7,4 selama 12 hingga 18 jam.
2. Dehidrasi : Jaringan direndam secara bertahap dalam larutan etanol dengan konsentrasi yang meningkat, dimulai dari etanol 70%, diikuti oleh etanol 90%, 95%, dan akhirnya etanol 100%.
3. Pembeningan : jaringan direndam dalam xylol tahap pertama (xylol I) selama satu jam, kemudian dipindahkan ke xylol tahap kedua (xylol II) dan diinkubasi selama 30 menit hingga satu jam.
4. Pembenanaman : jaringan dimasukkan ke dalam parafin dengan titik lebur rendah, yaitu $56-60^\circ\text{C}$ selama 30 menit.



ses pembuatan blok parafin untuk mempermudah pemotongan

perekatan : jaringan dipotong tipis dan direkatkan ke kaca objek analisis lebih lanjut (Elbatouti *et al.*, 2023; Tana *et al.*, n.d.).

Tikus kemudian di-eutanasia dengan dislokasi leher, diambil kulit bagian luka dan kulit dibilas dengan larutan NaCl 0,9% dan dimasukkan dalam formalin buffer netral 10% dan setelah 24 jam diganti kelarutan alkohol 70% untuk studi histopatologi.

2.6.5 Pengumpulan data

Luka dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis, durasi, mekanisme, lokasi dan tingkat kontaminasi. Namun, seluruh luka umumnya melalui 3 tahap penyembuhan. Perbedaannya terletak pada durasi setiap tahap dan faktor yang menghambat transisi antar tahap hingga luka tertutup sepenuhnya (Muñoz-Torres *et al.*, 2025). Analisis kuantitatif pada fase inflamasi, proliferasi dan maturasi dilakukan dengan menghitung jumlah sel inflamasi rata-rata pada tiga bidang lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x. Dokumentasi visual diperoleh dengan pengambilan gambar menggunakan kamera mikroskop. Selanjutnya, berdasarkan kriteria penilaian histologi yang telah ditetapkan sesuai dengan fase penyembuhan luka, karakteristik sel diklasifikasikan.

Tabel 1. Gambaran histopatologi dan skor perubahan jaringan luka (modifikasi metode penilaian)

Tahap	Karakteristik	Skor	Indikator
Inflamasi	Ulkus	0	Tidak ada
		1	Jumlah sel sedikit
		2	Jumlah sel sedang
		3	Jumlah sel melimpah
	Leukosit	0	Tidak ada
		1	<30% jumlah sel leukosit
		2	30-60% jumlah sel sedang
	Makrofag	3	>60% jumlah sel banyak
		0	Tidak ada
1		Jumlah sel sedikit	
Proliferasi	Angiogenesis	2	Jumlah sel sedang
		3	Jumlah sel melimpah
		0	Tidak ada
		1	Sedikit
	Fibroblast	2	Banyak
		3	Melimpah
		0	Tidak ada
	Kolagen	1	Hanya terdapat diruang perivaskular
		2	<50% Jaringan luka
3		>50% jaringan luka	
0		Tidak ada	
Re-epitelisasi	1	Terdapat sekitar pembuluh darah	
	2	Terdapat jumlah sedang	
	3	Terdapat jumlah banyak	
Re-epitelisasi	0	Tidak ada	
	1	Sebagian	
	2	Lengkap tipis	
		3	Lengkap dan matur



Seluruh sampel diklasifikasikan berdasarkan fase seluler yang diamati, kemudian data yang diperoleh dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS versi 20. Uji statistik yang digunakan meliputi *Kruskal-Wallis*, diikuti dengan uji lanjut *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antara kelompok.

2.7 Kode etik

Pada pelaksanaan penelitian ini setiap perlakuan yang dilakukan telah mendapatkan izin. Hewan coba yang dilakukan perlakuan digunakan sebagai sampel penelitian dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komisi Etik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan *Ethical Clearance* 913/UN4.17/KEP/2024

2.8 Analisis data

Hasil eksperimen dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk rata-rata \pm standar deviasi (SD) dan dianalisis menggunakan IBM® SPSS® Statistics 21.0 (IBM, Armonk, New York, USA). Sementara itu, proses data berupa grafik dan diagram dilakukan dengan GraphPad Prism® versi 10.2 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

