

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka dapat disebabkan oleh berbagai faktor diantaranya yaitu: tekanan, sayatan, luka akibat operasi, interaksi dengan bahan kimia, dan sentuhan dengan benda panas. Pada beberapa kasus, luka pada kulit dapat sembuh dengan sendirinya tanpa penanganan dokter. Namun, pada kondisi tertentu seperti luka yang terlalu besar atau terlalu dalam, menyebabkan kulit akan kehilangan kemampuannya untuk menyembuhkan diri sendiri. (Vachhrajani & Khakhkhar, 2020) Semua trauma yang mencapai dermis dapat menyebabkan perdarahan. Segera setelah terjadi perlukaan, tahap koagulasi dan hemostasis dimulai. Pembuluh darah yang rusak akibat trauma langsung berkonstriksi, agregasi platelet, pembekuan dan aktivasi komplemen lainnya dengan membentuk pembekuan darah untuk mencegah perdarahan. Inflamasi dimulai dengan adanya aktivasi dari komplemen, baik klasik ataupun alternatif dan infiltrasi neutrophil ke lokasi luka dalam waktu 24 – 48 jam. Setelah beberapa hari pertama, sel darah putih yang berubah menjadi neutrofil digantikan oleh makrofag. Makrofag dapat melepaskan berbagai macam kolagenase dan memproduksi faktor pertumbuhan yang bertanggung jawab terhadap proliferasi otot polos, sel endotelial, dan proliferasi fibroblas. Seluruh proses tersebut menunjang pembentukan dari matriks ekstraseluler. Faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh makrofag yaitu PDGF, TGF- β , fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), dan TGF- α . Adanya gangguan pada makrofag jaringan atau monosit pada sirkulasi mengakibatkan buruknya debridemen intrinsik, keterlambatan proliferasi dari fibroblas, angiogenesis yang tidak memadai dan akhirnya menghasilkan proses penyembuhan yang buruk. (Snyder et al., 2016) Sitokin proinflamasi yang dapat ditemukan pada fase ini yaitu IL-1, IL-6, dan TNF- α . IL-1 dapat berfungsi menginduksi ekspresi keratin 6 dan keratin 16 pada saat proses migrasi keratinosit dan mengaktifasi fibroblas untuk mensekresikan FGF-7. Reepitelialisasi merupakan kejadian penting pada fase ini. Selama fase proliferasi, sintesis kolagen diinduksi oleh PDGF, FGF, TGF- β , IL-1 dan TNF. (Vaidyanathan, 2021) Fase remodeling merupakan fase terakhir dari proses penyembuhan luka. Interaksi antara matriks ekstraseluler dan fibroblas menyebabkan kontraksi luka dan dipengaruhi oleh banyak sitokin seperti TGF- β , PDGF, dan FGF. TGF- β memegang peran penting pada fase awal dari remodeling. (Falanga, 2005)

Manajemen luka saat ini menjadi tantangan besar di seluruh dunia. Pembalut luka yang dapat memfasilitasi penyembuhan luka telah diteliti sejak lama. Beberapa pembalut luka konvensional, seperti perban, hidrogel dan foam, tidak seefisien yang diharapkan karena tidak dapat merespon proses penyembuhan luka dengan baik. Pembalut luka pintar yang dapat berinteraksi dengan luka, merasakan dan bereaksi terhadap kondisi luka atau perubahan lingkungan dengan menggunakan sensor bawaan dan/atau bahan pintar seperti bahan yang responsif terhadap rangsangan dan bahan penyembuhan diri, telah diusulkan untuk memfasilitasi luka secara efektif sembuh. (Dogan, 2019; Tottoli et al., 2020)

Seiring dengan perkembangan teknologi dalam ilmu kedokteran, saat ini tersedia berbagai metode perawatan luka, termasuk pembalut luka, perawatan terapeutik, dan

pengobatan.(Kazemi et al., 2020; Tottoli et al., 2020) Oleh sebab itu, pemilihan metode untuk jenis luka tertentu diperlukan untuk penyembuhan yang lebih efektif. Beberapa jenis metode dressing konvensional antara lain: kain kasa, plester, serat, perban alami atau sintetis, dan kapas.(Shukla et al., 2019; Tort et al., 2020) Meski terbukti memiliki kontribusi pada penyembuhan luka, bahan pembalut tersebut dapat memberikan lingkungan yang lembab ke daerah yang terluka sehingga saat ini diganti dengan metode *dressing modern* dengan formulasi lebih baik.(Kazemi et al., 2020) *Dressing modern* dirancang tidak hanya untuk melindungi daerah yang terluka dari infeksi eksternal tetapi juga untuk menjaga agar luka tetap terhidrasi dan mempercepat penyembuhan. Namun, sebagian besar pembalut luka modern yang dikomersialkan adalah berbahan dasar polimer sintetis. Saat ini, berbagai biomaterial alami seperti gelatin juga sering dipertimbangkan penggunaannya dalam pengobatan luka.(Tort et al., 2020)

Gelatin merupakan biomaterial alami yang sangat kompatibel karena menyerupai matriks ekstraseluler jaringan tubuh manusia. Gelatin dianggap sebagai biomaterial yang fleksibel dan stabil, sehingga dapat dipilih sebagai bahan berbagai produk medis yang bersifat implan.(Boateng, 2020; Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019) Gelatin memiliki beberapa sifat yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka. Gelatin memiliki efek homeostasis dimana gelatin mampu menstimulasi percepatan terbentuknya trombus dan menyediakan dukungan struktural. Dibandingkan dengan kolagen, gelatin menunjukkan sifat hemostasis yang lebih superior. (Şelaru et al., 2019) Gelatin juga dapat mengabsorpsi eksudat yang terdapat pada area luka dan membuat lingkungan yang mendukung dimulainya fase-fase penyembuhan luka. Pada fase proliferasi, gelatin merangsang migrasi dari sel-sel terutama fibroblast pada situs luka. (Kang & Park, 2021; Tanaka et al., 2005) Pada sebuah penelitian menunjukkan bahwa gelatin dapat mempengaruhi ekspresi sitokin pro inflamasi IL-6. Penelitian yang dilakukan oleh Zeng et al menemukan adanya peningkatan ekspresi dari VEGF, HGF, bFGF, dan PDGF pada sel punca yang diberikan gelatin microgel (Zeng et al., 2015). Adanya peningkatan dari sistem parakrin ini, maka gelatin dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Hidrogel merupakan pembalut luka berbentuk lembaran dengan kandungan sejumlah air yang tinggi, mirip seperti jaringan alami pada makhluk hidup. Selain itu, hidrogel juga memiliki kemampuan yang baik dalam menyerap cairan luka, memiliki stabilitas yang baik pada pH asam sehingga baik digunakan untuk pengobatan luka. (Fan et al., 2021; Kang & Park, 2021) Sifat utama gelatin adalah non toksik, biodegradable, dan biokompatibilitas karena merupakan bahan alami yang mengandung asam amino tinggi serta mampu membentuk aksi pengikatan yang unik, sehingga mampu membentuk hidrogel. Hidrogel gelatin telah banyak mendapatkan minat yang tinggi dalam bidang teknik jaringan karena sifat non imunogeniknya.(Tarmidzi et al., 2020).

Jaipan et. al menyatakan bahwa gel bioadhesive berbasis gelatin menjadi prioritas utama penyembuhan luka karena biaya produksinya yang rendah, tingkat penyembuhan yang lebih cepat, dan aplikasi yang mudah.(T. Li et al., 2022) Studi oleh Islam et al., menunjukkan bahwa gelatin yang dikemas dalam bentuk gelatin-based instant gel-forming volatile spray memiliki dampak positif terhadap penyembuhan luka. Aplikasi gelatin juga berpengaruh terhadap peningkatan kadar growth faktor yang mempercepat penyembuhan luka.(Islam et al., 2021) Aplikasi gelatin terdapat beberapa bentuk sediaan

dimana salah satunya adalah gelatin spray. Aplikasi Gelatin dalam bentuk spray diyakini lebih efektif untuk diaplikasikan untuk penyembuhan luka karena lebih mudah menyerap ke dalam jaringan kulit sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka. (Kang & Park, 2021)

Hidrokoloid (HCD) membentuk gel khusus dengan menyerap air dan zat-zat berat molekul rendah, sehingga memperkuat sistem imun dan mengurangi dampak kolonisasi bakteri. Dibandingkan dengan terapi lainnya, hidrokoloid telah terbukti secara signifikan mengurangi frekuensi infeksi berdasarkan studi klinis yang melibatkan lebih dari 2000 pasien dengan luka tekan. Ini merupakan keuntungan utama penggunaan HCD dibandingkan metode tradisional. Hidrokoloid telah mengalami inovasi revolusioner dalam struktur dan fungsinya sejak pertama kali diperkenalkan di lingkungan klinis. Namun, kekurangan utama dari HCD konvensional adalah sifatnya yang opak, yang membuat sulit untuk memeriksa luka, eksudat, dan kondisi kulit di sekitar balutan. Hal ini seringkali menyebabkan balutan dilepas lebih awal untuk memeriksa kondisi luka. Selain itu, balutan ini juga memiliki beberapa kekurangan lain seperti profil tepi yang relatif tinggi pada beberapa jenis yang tidak memiliki border, keterbatasan dalam kesesuaian, residu gel cair yang tertinggal di luka dan kulit di sekitarnya, serta bau yang tidak sedap setelah menyerap eksudat luka. Faktor-faktor ini dapat mempersingkat durasi penggunaan HCD yang efektif, yang langsung berdampak pada durasi dan biaya perawatan, kualitas perawatan, dan hasil akhir dari terapi tersebut. (Huang et.al., 2023)

Pada praktik klinis, cara terbaik untuk menilai progresi penyembuhan luka dilihat dari perubahan area permukaan luka. Perubahan ukuran dari luka merupakan parameter klinis yang paling sering digunakan untuk menilai proses penyembuhan luka. (Falanga, 2005). Pemeriksaan histopatologi luka berguna untuk pemantauan progresi penyembuhan luka sebagai respon terhadap terapi. Beberapa komponen histopatologi yang dinilai pada luka yaitu sel darah putih (makrofag, sel mast, limfosit, dan neutrofil), pembuluh darah, fibroblas, dan kolagen. (Masson-Meyers et al., 2020) Beberapa faktor pertumbuhan dan pro inflamasi yang berperan dalam proses penyembuhan luka, salah satunya yaitu vascular endothelial growth factor (VEGF) dan interleukin-6 (IL-6). Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah hidrokoloid. Terapi ini bersifat menghambat pertumbuhan mikroba dan mempercepat proses penyembuhan luka. (Kang & Park, 2021) Oleh karena itu pada penelitian ini peneliti ingin meneliti mengenai perbandingan efektivitas terapi gelatin spray dan hidrokoloid pada penyembuhan luka serta pengaruhnya terhadap peningkatan kadar faktor pertumbuhan VEGF dan faktor inflamasi IL-6.

1.2 Teori

1.2.1 Definisi Luka

Luka adalah terputusnya kontinuitas suatu jaringan oleh karena adanya cedera atau pembedahan dimana terjadi kerusakan fungsi pelindung kulit yang disertai hilangnya kontinuitas jaringan epitel dengan atau tanpa kerusakan jaringan lain seperti otot, tulang dan saraf, yang disebabkan oleh beberapa faktor yaitu: tekanan, sayatan dan luka akibat operasi. Luka dapat diklasifikasikan menurut struktur anatomi, sifat, proses penyembuhan dan durasi penyembuhan. (Putrianirma et al., 2019)

Luka secara umum terdiri dari luka yang disengaja dan luka yang tidak

disengaja. Luka yang disengaja bertujuan sebagai terapi, misalnya pada prosedur operasi atau pungsi vena, sedangkan luka yang tidak disengaja terjadi secara accidental. Adapun berdasarkan sifatnya yaitu: abrasi, memar, insisi (iris), laserasi, terbuka, penetrasi, tusukan, sepsis. (Mustamu et al., 2020)

Luka berdasarkan gambaran derajat luka dijabarkan sebagai berikut: (Kardikadewi, 2019)

1. Stadium I: Luka superfisial (non blanching erythema) yaitu luka yang terjadi pada lapisan epidermis kulit.
2. Stadium II: Luka (partial thickness) yaitu hilangnya lapisan kulit pada lapisan epidermis dan bagian atas dari dermis. Tandanya adalah abrasi, blister atau lubang yang dangkal.
3. Stadium Luka (full thickness) yaitu hilangnya kulit keseluruhan meliputi kerusakan atau nekrosis jaringan subkutan yang dapat meluas sampai bawah tetapi tidak melewati jaringan yang mendasarinya.
4. Stadium IV: Luka (full thickness) yang telah mencapai lapisan otot, tendon, dan tulang dengan adanya destruksi kerusakan yang luas.

Luka dapat menyebabkan kematian sel yang diakibatkan oleh berbagai faktor yaitu: tekanan, gesekan, lipatan, bahan kimia, mati rasa, serta kekurangan oksigen. (Primadina et al., 2019)

1.2.2 Penyembuhan Luka

Secara fisiologis, tubuh dapat memperbaiki kerusakan jaringan kulit sendiri yang dikenal dengan penyembuhan luka. Penyembuhan luka adalah respon organisme terhadap kerusakan jaringan atau organ dan usaha untuk mengembalikannya ke keadaan homeostatis sedemikian rupa sehingga tercapai stabilitas fisiologis jaringan atau organ dimana terjadi reorganisasi jaringan kulit yang disebabkan oleh pembentukan jaringan fungsional epitel yang menutupi luka. Sifat penyembuhan semua luka adalah sama, dengan variasi tergantung pada lokasi luka, tingkat keparahan luka dan luasnya luka. Selain itu, penyembuhan luka dipengaruhi oleh kemampuan sel dan jaringan untuk beregenerasi. (Bagchi et al., 2020; Febrianti et al., 2019; Tanaka et al., 2005)

Metode penyembuhan luka didasarkan pada jenis atau metode penyembuhannya, yaitu penyembuhan luka primer (primary intent), sekunder (secondary intent) dan tersier (tertiary intent atau delay primary intent). (Bagchi et al., 2020)

1. Penyembuhan luka primer (primary intention)

Penyembuhan luka secara primer (primary intention) adalah luka yang ditutup dengan cara dirapatkan kembali dengan 12 menggunakan alat bantu sehingga bekas luka (scar) tidak ada atau minimal. Luka berkembang tanpa banyak kehilangan jaringan kulit. Luka ditutup dengan cara direkatkan kembali dengan alat agar bekas luka tidak ada atau minimal. Proses yang terjadi adalah epitelisasi dan deposisi jaringan ikat. Contohnya termasuk luka sayat dan luka operasi yang dapat sembuh dengan jahitan, stapler, taos eksternal, atau lem yang kencang.

2. Penyembuhan luka sekunder (secondary intention)

Penyembuhan luka secara sekunder (secondary intention). Pada proses penyembuhan luka sekunder kulit mengalami luka (kerusakan) dengan kehilangan banyak jaringan sehingga memerlukan proses granulasi (pertumbuhan sel), kontraksi, dan epitelisasi (penutupan epidermis) untuk menutup luka. Dalam keadaan luka

penyembuhan sekunder, jika dijahit, risiko terbuka kembali atau nekrosis (mati) sangat besar.

3. Penyembuhan luka tersier (delayed primary)

Penyembuhan luka secara tersier atau delayed primary terjadi jika penyembuhan luka secara primer mengalami infeksi atau ada benda asing sehingga penyembuhannya terlambat. Luka akan mengalami proses debris hingga luka menutup. Penyembuhan luka dapat juga diawali dengan penyembuhan secara sekunder yang kemudian ditutup dengan balutan jahitan/dirapatkan kembali. Contohnya adalah luka operasi yang terinfeksi.

Berdasarkan waktu penyembuhannya, luka dapat dibagi menjadi dua yaitu luka akut dan luka kronis. (Bagchi et al., 2020)

1. Luka akut adalah luka yang terjadi kurang dari 5 hari dengan diikuti proses hemostasis dan inflamasi. Luka akut sembuh atau menutup sesuai dengan waktu penyembuhan luka fisiologis 0-21 hari. Luka akut juga merupakan luka trauma yang biasanya segera mendapat penanganan dan biasanya dapat sembuh dengan baik bila tidak terjadi komplikasi.
2. Luka kronik merupakan luka yang berlangsung lama atau sering timbul kembali (rekuren), dimana terjadi gangguan pada proses penyembuhan yang biasanya disebabkan oleh masalah multifaktor dari penderita. Luka kronik juga sering disebut kegagalan dalam penyembuhan luka.

Secara umum proses penyembuhan luka terdiri dari beberapa fase penyembuhan dimana dibagi dalam empat fase utama yaitu (1) Fase hemostatis, (2) Fase inflamasi, (3) Fase proliferasi, (4) Fase maturasi. Fase-fase penyembuhan luka dapat dijabarkan sebagai berikut:

1. Fase hemostatis

Semua trauma yang mencapai dermis dapat menyebabkan perdarahan. Segera setelah terjadi perlukaan, tahap koagulasi dan hemostasis dimulai. Pembuluh darah yang rusak akibat trauma langsung berkonstriksi, agregasi platelet, pembekuan dan aktivasi komplemen lainnya dengan membentuk pembekuan darah untuk mencegah perdarahan. Peristiwa seluler dan biofisiologis pada fase hemostatis, yaitu kontriksi pembuluh darah, agregasi platelet, degranulasi, dan pembentukan fibrin (trombus). Degranulasi platelet melepaskan α -granules dimana komponen ini mensekresikan beberapa faktor pertumbuhan seperti platelet-derived growth factors (PDGF), insulin-like growth factors, epidermal growth factors (EGF), transforming growth factor- β (TGF- β), dan platelet factor 4. Tujuan utama fase hemostatis adalah untuk mencegah perdarahan yang berlebih. Tujuan lainnya, yaitu menyediakan sebuah matriks untuk sel-sel penginvansi yang dibutuhkan pada tahap penyembuhan selanjutnya. Keseimbangan dinamis di antara sel-sel endotel, platelet, koagulasi, dan fibrinolisis mempengaruhi proses reparatif karena mengatur hemostasis dan penentu besarnya fibrin dalam penyembuhan luka. (Hanifatunnisa, 2020)

2. Fase Inflamasi

Inflamasi dimulai dengan adanya aktivasi dari komplemen, baik klasik ataupun alternatif dan infiltrasi neutrophil ke lokasi luka dalam waktu 24 – 48 jam. Sel darah putih memiliki beberapa fungsi, yaitu fagositosis material nekrosis dan produksi beberapa sitokin. Neutrofil adalah sel pertama yang memberikan respon terhadap produk kemotaktik

platelet. Setelah berada pada lokasi luka, neutrofil akan melekat pada pembuluh darah dan dengan bantuan cell adhesion molecules (CAMs) kemudian bermigrasi ke ruang ekstraseluler. Neutrofil juga memproduksi tumor necrosis factor - α (TNF- α) dan IL-1. Fungsi dari kedua sitokin ini yaitu menarik fibroblas dan sel epitel.(Patel et al., 2016)

Setelah beberapa hari pertama, sel darah putih yang berubah menjadi neutrofil digantikan oleh makrofag. Makrofag merupakan komponen penting pada fase ini dan biasanya mulai terlihat pada lokasi luka 72 jam setelah terjadinya luka. Makrofag dapat melepaskan berbagai macam kolagenase dan memproduksi faktor pertumbuhan yang bertanggung jawab terhadap proliferasi otot polos, sel endotelial, dan proliferasi fibroblas. Seluruh proses tersebut menunjang pembentukan dari matriks ekstraseluler. Faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh makrofag yaitu PDGF, TGF- β , fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), dan TGF- α . Adanya gangguan pada makrofag jaringan atau monosit pada sirkulasi mengakibatkan buruknya debridemen intrinsik, keterlambatan proliferasi dari fibroblas, angiogenesis yang tidak memadai dan akhirnya menghasilkan proses penyembuhan yang buruk.(Snyder et al., 2016)

Makrofag terbagi menjadi M1 (classically activated) dan M2 (alternatively activated). M1 diaktivasi oleh adanya interferon γ dan TNF- α . M1 melepaskan IL-12 dan mempromosikan respon imun proinflamasi. Aktivasi dari M2 diperantai oleh IL-4 dan IL-13 dimana makrofag jenis ini melepaskan sitokin antiinflamasi IL-10. Makrofag M2 ditemukan pada proses penyembuhan luka saat terjadi pembentukan jaringan granulasi.(Snyder et al., 2016). Sitokin proinflamasi yang dapat ditemukan pada fase ini yaitu IL-1, IL-6, dan TNF- α . IL-1 dapat berfungsi menginduksi ekspresi keratin 6 dan keratin 16 pada saat proses migrasi keratinosit dan mengaktivasi fibroblas untuk mensekresikan FGF-7.

3. Fase Proliferasi

Fase ini ditandai oleh adanya migrasi fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler dan pembentukan jaringan granulasi. Proliferasi dimulai 3 hari setelah terjadi luka dan dapat bertahan 2 – 4 minggu. Reepitelialisasi merupakan kejadian penting pada fase ini. Proses ini melibatkan migrasi keratinosit dan hubungan ketergantungan antara pergerakan keratinosit di matriks fibrin, rekrutmen fibroblas, dan pembentukan matriks ekstraseluler.

PDGF dan TGF- β akan menarik fibroblas ke lokasi luka. Pada akhirnya fibroblas akan berproliferasi dan memproduksi matriks yang terdiri dari fibronectin, hialuronan, kolagen, dan proteoglikan. Seluruh komponen ini penting untuk pembentukan matriks ekstraseluler yang baru dan perbaikan jaringan. Matriks ekstraseluler terbuat dari beberapa protein perekat yang tertanam pada proteoglikan, glikosaminoglikan, kolagen dan elastin. Selama fase proliferasi, sintesis kolagen diinduksi oleh PDGF, FGF, TGF- β , IL-1 dan TNF. Ekspresi gen kolagen diatur oleh beberapa faktor, seperti TGF- β dan FGF. TGF- β menstimulasi produksi dari kolagen tipe I dan III.(Vaidyanathan, 2021)

Protein perekat seperti fibronectin, laminin, trombospondin, dan integrin membantu dalam migrasi seluler.(Becchetti & Arcangeli, 2010) Fibronectin terhubung permukaan sel, membrane basal dan matriks ekstraseluler. Selain itu, fibronectin dapat melekat pada komponen matriks ekstraseluler seperti kolagenm, fibrin, proteoglikan, atau integrin dan secara langsung memediasi terjadinya migrasi sel. Integrin memiliki

peranan penting dalam adesi antar sel dan adesi sel dengan matriks. Fungsi dari integrin yaitu membantu regulasi interaksi antara matriks ekstraseluler dengan sitoskeleton.

Setelah matriks sementara telah terbentuk, keratinosit akan bermigrasi untuk membentuk epitel pada luka. Matrix metalloproteinase (MMP) memiliki fungsi yang penting pada proses pelepasan keratinosit dari hemidesmosomal dan desmosomal pada tepi luka dan bermigrasi melintasi matriks sementara. Protein penting lainnya yaitu plasminogen activator inhibitor dan urokinase plasminogen activator. Aktivasi dari kedua protein tersebut penting untuk migrasi keratinosit dimana proses ini juga bergantung pada interaksi antara keratinosit dan kolagen. Komponen lain yang memiliki peranan penting untuk migrasi keratinosit dan epitelialisasi yaitu MMP-1. Agar migrasi keratinosit dapat terjadi, dibutuhkan pemotongan kolagen tipe IV dan VII yang diperantai oleh MMP 9.

Proses migrasi keratinosit dari tepi luka dan skin appendages dalam 24 jam pertama. Peningkatan aktivitas mitotik pada 12 jam pertama dari basal sel epitel dari tepi luka berguna untuk memfasilitasi migrasi. Selanjutnya keratinosit akan melepaskan perlekatan dari dermis dan bermigrasi. Pada akhirnya akan terbentuk membran basalis baru dan mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel epitel lebih lanjut untuk membentuk epitel.

Sel endotel merupakan target langsung dan tidak langsung dari aktivasi jalur IL-6/IL-6R/gp130, yang berimplikasi pada penyembuhan luka. Ketika dirangsang dengan IL-6, sel endotel lebih proliferaif dan menghasilkan MCP-1, IL-8, dan IL-6 dengan cara yang bergantung pada JAK/STAT, berkontribusi pada lingkungan mikro inflamasi dengan merekrut leukosit. Fibroblas, keratinosit, dan makrofag mengekspresikan faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) sebagai respons terhadap IL-6. VEGF adalah salah satu stimulator utama neovaskularisasi. Vaskularisasi merupakan komponen penting penyembuhan luka, dan gangguan vaskularisasi menunda penutupan luka. (Johnson et al., 2020)

4. Fase Remodeling

Fase ini merupakan fase terakhir dari proses penyembuhan luka. Fase ini merupakan fase terpanjang, yang melibatkan sintesis dan penghancuran kolagen secara berkelanjutan. Proses ini dapat dimulai di awal dari tahapan penyembuhan luka dan berlanjut hingga beberapa bulan. Interaksi antara matriks ekstraseluler dan fibroblas menyebabkan kontraksi luka dan dipengaruhi oleh banyak sitokin seperti TGF- β , PDGF, dan FGF. TGF- β memegang peran penting pada fase awal dari remodeling. TGF- β mencegah degradasi kolagen dan mempromosikan terjadinya kontraksi luka dengan menginduksi terlepasnya tissue inhibitor metalloprotease. Proses remodeling dari matriks ekstraseluler dan pergerakan sel sangat tergantung oleh MMP. MMP diproduksi oleh fibroblas, neutrofil, keratinosit, makrofag, kolagenase interstisial, dan gelatinase. MMP-10 memecah komponen non kolagen matriks ekstraseluler dan memfasilitasi terjadinya migrasi. Aktivitas dari MMP diregulasi secara ketat karena MMP dapat mengakibatkan degradasi kolagen dan mengganggu proses penyembuhan. MMP diaktivasi oleh beberapa protein tertentu dan diinhibisi oleh spesifik metalloproteinase. Selama fase ini, sel pada luka kembali ke fenotipe stabil, material dari matriks ekstraseluler mengalami perubahan dan jaringan granulasi menghilang. (Falanga, 2005)

Faktor lokal yang berperan dalam penyembuhan luka seperti hipotermia, nyeri, infeksi, radiasi, dan tekanan oksigen jaringan. Faktor ini secara langsung memengaruhi

karakteristik dari luka tersebut. Oksigen merupakan komponen penting dalam proses penyembuhan luka, dimana oksigen dapat mencegah terjadinya infeksi, menginduksi angiogenesis, meningkatkan diferensiasi dan migrasi keratinosit, menginduksi reepitelialisasi, meningkatkan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen. (Guo & DiPietro, 2010). Pada saat terjadi luka awal, lingkungan di sekitar luka akan mengalami hipoksia akibat adanya kerusakan vaskular dan tingginya konsumsi oksigen oleh sel yang aktif secara metabolik. Kondisi hipoksia sementara dapat menginduksi terjadinya proses penyembuhan luka, namun jika kondisi ini terjadi dalam waktu yang lama maka proses penyembuhan akan terganggu. Hipoksia dapat memicu makrofag, keratinosit, dan fibroblas untuk memproduksi sitoki dan faktor pertumbuhan. Beberapa sitokin yang diproduksi saat terjadi hipoksia yaitu platelet derived growth factors, tumor growth factor β , vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor α , dan endothelin-1. (Bishop, 2008).

Faktor lokal lain yang memengaruhi proses penyembuhan luka adalah infeksi. Ketika terjadi kerusakan pada kulit, mikroorganisme yang secara normal terdapat pada permukaan kulit akan berusaha masuk ke dalam jaringan di bawah kulit. Inflamasi merupakan proses yang normal terjadi pada proses penyembuhan luka. Kondisi ini penting dalam hal menyingkirkan mikroorganisme kontaminan. Bakteri dan endotoksin dapat menyebabkan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 dan TNF α secara berkepanjangan. Jika fase ini terus berlanjut, maka luka dapat menjadi kronis dan gagal untuk sembuh. Inflamasi berkepanjangan juga dapat menyebabkan terjadinya peningkatan MMP dan mengakibatkan degradasi matriks ekstraseluler berlebihan.

Faktor sistemik merupakan kondisi tubuh secara umum yang berdampak pada kemampuan individu untuk sembuh. Beberapa faktor sistemik yang memengaruhi proses penyembuhan luka yaitu usia, gender, hormon seksual, stress, iskemia, nutrisi, alkoholisme, merokok, dan penyakit lain seperti diabetes melitus. Proses penuaan menyebabkan perubahan seluler dan molekuler yang dapat berdampak pada terlambatnya penyembuhan luka. Keterlambatan ini berhubungan dengan perubahan respon inflamasi, seperti terlambatnya infiltrasi sel T pada area luka, adanya perubahan produksi kemokin, dan berkurangnya kapasitas fagosit dari makrofag. (Guo & DiPietro, 2010). Pada orang usia tua juga ditemukan adanya keterlambatan dari reepitelialisasi, sintesis kolagen, dan angiogenesis selama proses penyembuhan luka. Selain usia, hormon seksual juga berpengaruh terhadap penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka pada laki – laki membutuhkan waktu lebih lama dibandingkan wanita. Hal ini dikaitkan dengan perbedaan ekspresi gen dimana hormon esterogen yang paling berperan pada penyembuhan luka. Efek dari hormon esterogen terhadap luka yaitu produksi dan regenerasi matriks, menghambat protease, dan memperbaiki fungsi epidermis. Faktor sistemik lainnya yaitu stress. Studi menemukan adanya hubungan stress psikologis dengan kejadian terlambatnya penyembuhan luka. Stress akan menginduksi pelepasan glukokortikoid dan menurunkan kadar sitokin pro inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α pada lokasi luka. Glukokortikoid berperan sebagai anti inflamasi dan memodulasi respon imun Th1 dimana respon ini penting selama fase inflamasi saat penyembuhan luka. Malnutrisi atau defisiensi nutrien juga memiliki dampak terhadap pada proses penyembuhan luka setelah terjadinya trauma. (Lee et al., 2012)

1.2.3 Parameter penyembuhan luka

1.2.3.1 Laju penyembuhan luka

Tujuan akhir dari tatalaksana luka adalah penutupan luka yang permanen dan sempurna. Pada praktik klinis, cara terbaik untuk menilai progresi penyembuhan luka dilihat dari perubahan area permukaan luka. Perubahan ukuran dari luka merupakan parameter klinis yang paling sering digunakan untuk menilai proses penyembuhan luka. (Falanga, 2005) Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengukur area permukaan luka yaitu menggunakan penggaris atau algoritma analisis gambar. Selain itu, terdapat metode intravital imaging dimana metode ini menilai sel secara aktual dan langsung menggunakan protein histon H2B dengan green fluorescent protein (GFP).

1.2.3.2 Analisis luka menggunakan gambar atau foto

Fotografi merupakan alat yang banyak digunakan di dunia kedokteran, khususnya bidang dermatologi. Gambar atau foto dapat memberikan informasi penting mengenai perubahan morfologi, variasi warna, dan sebagainya selama proses penyembuhan luka. Pada saat mengambil foto secara digital penting untuk menggunakan kamera dengan resolusi tinggi dan angka pixel yang digunakan harus mampu untuk memproduksi.

1.2.3.3 Analisis histopatologi

Pemeriksaan histopatologi luka berguna untuk pemantauan progresi penyembuhan luka sebagai respon terhadap terapi. Secara klinis, lokasi terbaik untuk melakukan analisis ini adalah pada tepi luka karena pada daerah tersebut dapat dilakukan perbandingan antara area luka dan kulit sehat di sekitarnya.

Beberapa komponen histopatologi yang dinilai pada luka yaitu sel darah putih (makrofag, sel mast, limfosit, dan neutrofil), pembuluh darah, fibroblas, dan kolagen. Komponen sel darah putih ini digunakan untuk mengevaluasi fase inflamasi. Proses angiogenesis dievaluasi dengan melakukan penilaian terhadap pembuluh darah. Penilaian terhadap serat kolagen penting dikarenakan orientasi dan pengaturan kolagen berperan penting saat fase remodeling dan apabila terjadi gangguan dapat menyebabkan terbentuknya jaringan parut disaat luka sudah menutup. (Masson-Meyers et al., 2020)

1.2.3.4 Metode imunologis

Selama proses penyembuhan luka, terjadi komunikasi antara sel dengan sel dan sel dengan matriks ekstraseluler. Mekanisme komunikasi antar sel dibantu oleh sitokin dan faktor pertumbuhan, dimana keduanya menginduksi terjadinya perbaikan endogen melalui sinyal ke sel tersebut untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Molekul pensinyalan ini dapat diidentifikasi melalui beberapa teknik, seperti imunohistokimia dan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

ELISA merupakan metode laboratorium yang paling sering digunakan untuk mengukur konsentrasi dari sebuah analyte (biasanya antibodi atau antigen). Metode ini dapat digunakan untuk melihat komponen yang berperan penting pada proses penyembuhan luka, seperti sitokin dan faktor pertumbuhan yang berasal dari jaringan atau kultur sel. Beberapa komponen yang paling sering dinilai pada proses penyembuhan luka seperti sitokin pro inflamasi $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , sitokin anti inflamasi IL-10, EGF, PDGF, TGF- β 1, VEGF, dan FGF. Kadar dari $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 dan IL-6 ditemukan lebih tinggi pada luka yang tidak sembuh dibandingkan pada luka yang telah

sembuh. Sebuah studi menemukan kadar IL-1 9,200 U/mL (1,300 – 48,000 U/mL) pada luka yang tidak sembuh dan 2,700 U/mL (400 – 14,000 U/mL) pada luka yang sembuh. (Diegelmann, R. F. et al., 2005) Hal ini juga serupa ditemukan pada kadar TNF- α dan IL-6, dimana kedua sitokin ini didapatkan kadar yang lebih tinggi pada luka yang tidak sembuh. (Diegelmann, R. F. et al., 2005)

1.2.4 Gelatin

Gelatin merupakan salah biomaterial yang sering digunakan dalam sediaan farmasi (Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019b), (T. Li et al., 2022b). Gelatin merupakan polimer alami yang merupakan derivat dari kolagen tidak terlarut yang diproses melalui hidrolisis. (Neves & Reis, 2016) Gelatin terdiri dari prolin, glisin, dan hidroksiprolin dimana komposisi ini menyerupai matriks ekstraseluler (Sulaiman et al., 2020). Gelatin merupakan polimer polielektrolit yang memiliki sejumlah senyawa terionisasi dan bersifat larut dalam air. Gelatin bersifat kompatibel pada jaringan tubuh manusia dan bersifat fleksibel, serta stabil. Karena hal tersebut, gelatin banyak digunakan dalam industri farmasi dalam berbagai sediaan obat termasuk untuk penyembuhan luka bakar.

Gelatin mengandung asam amino glisin yang membuatnya dapat melekat pada jaringan tubuh manusia. Jaringan tubuh juga dapat memetabolisme gelatin serta penggunaannya tidak merangsang reaksi inflamasi sehingga banyak digunakan dalam berbagai sediaan farmasi. Gelatin terdiri atas prolin, glycin, hidroksiprolin, serta asam amin-asam amino lain yang serupa dengan kolagen. Hal tersebut membuat struktur dari gelatin serupa dengan matriks ekstraseluler. Struktur dari gelatin sendiri bergantung dari proses ekstrasinya. Berdasarkan dari proses ekstrasinya, gelatin dapat dikategorikan menjadi tipe A dan tipe B. Tipe A merupakan gelatin yang melalui ekstraksi melalui asam, sedangkan gelatin tipe B diperoleh dari proses alkalin. Dalam proses ekstraksi tersebut, titik isoelektrik yang didapatkan menentukan ikatan gelatin terhadap agen-agen terapeutik. (Andriani, 2018; Kardikadewi, 2019; Mubarakah, 2019)

Gelatin didapatkan dari berbagai sumber seperti mammalian, porcine, bovin, kulit ikan (*Labeo rohita*), ayam, kaki burung (*Encephalopet*), kulat unta, rumput laut, dan berbagai sumber lainnya. (Islam et al., 2021) Gelatin memiliki ukuran peptide yang kecil, dan bersifat hidrofilik. Gelatin merupakan derivat dari kolagen dimana kolagen sendiri merupakan komponen penyusun dari matriks ekstraseluler. Ikatan hidrogen yang kuat membentuk jaringan makromolekul 3 dimensi yang menyebabkan mobilitas rantai molekul gelatin berkurang drastis, dengan demikian electrosppinnability gelatin menjadi sangat rendah. Untuk meningkatkan sifat mekanik dan stabilitasnya, gelatin memerlukan proses pengikatan silang agar perancah (*scaffold*) gelatin tidak mudah larut dalam lingkungan biologis. Keberadaan PVA sebagai campuran gelatin dapat meningkatkan electrosppinnability dan kekuatan mekanik dari membran, namun dengan tetap mempertahankan sifat adhesi sel yang baik dan menjaga kelembaban pada luka karena sifat hidrofiliknya. (Al-Nimry et al., 2021; Kang & Park, 2021)

Gelatin memiliki beberapa sifat yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka. Gelatin memiliki efek homeostasis dimana gelatin mampu menstimulasi percepatan terbentuknya trombus dan menyediakan dukungan struktural. Dalam waktu 2 hari sampai 6 minggu, struktur gelatin dapat terserap atau mencair dan berguna sebagai agen hemostasis. Dibandingkan dengan kolagen, gelatin menunjukkan

sifat hemostasis yang lebih superior. Selain itu, gelatin merupakan struktur biofriendly yang menyerupai matriks ekstraseluler, gelatin dapat berinteraksi secara sempurna dengan adiposit, keratinosit, dan sel punca serebelum. Ketika dipertemukan dengan keratinosit, gelatin tidak memperlihatkan adanya efek sitotoksik. Karena sifatnya tersebut, maka gelatin mampu meningkatkan proses vaskularisasi pada lokasi penyembuhan (Şelaru et al., 2019). Integrasi efek antibakterial ke dalam biomaterial merupakan komponen penting untuk mencegah terjadinya kolonisasi bakteri pada lokasi luka. Gelatin, seperti kolagen alami tidak memiliki sifat sebagai antibakterial. Maka dari itu, inkorporasi efek antibakterial ke dalam biomaterial diperlukan untuk meningkatkan keefektifitasannya. Efek antibakterial dari gelatin dapat diperoleh melalui integrasi gelatin dengan ekstrak ginkgo biloba.

Gelatin dapat berpenetrasi ke sel membran dan menjadi molekul aktif yang berfungsi sebagai agen hemostatik untuk menginisiasi penyembuhan luka. Gelatin juga dapat mengabsorpsi eksudat yang terdapat pada area luka dan membuat lingkungan yang mendukung dimulainya fase-fase penyembuhan luka. Pada fase proliferasi, gelatin merangsang migrasi dari sel-sel terutama fibroblast pada situs luka. Gelatin dapat berinteraksi dengan adiposit, keratinosit, sel punca serebelum, serta pre-osteoblas karena strukturnya yang menyerupai matriks ekstraseluler. Hal tersebut membuat gelatin dapat merangsang pembentukan jaringan baru dan memberi kekuatan mekanis pada struktur sekitar jaringan luka. Kelemahan dari polimer alam ini adalah sifatnya yang rentan terhadap kontaminasi mikroba. (Kang & Park, 2021; Tanaka et al., 2005) Pada sebuah penelitian menunjukkan bahwa gelatin dapat mempengaruhi ekspresi sitokin pro inflamasi IL-6. Penelitian yang dilakukan oleh Zeng et al menemukan adanya peningkatan ekspresi dari VEGF, HGF, bFGF, dan PDGF pada sel punca yang diberikan gelatin microgel (Zeng et al., 2015). Adanya peningkatan dari sistem parakrin ini, maka gelatin dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Gelatin mampu merangsang epitelisasi, granulasi, dan pembentukan jaringan baru dan sering dikombinasikan dengan polimer lain seperti kitosan dan asam hialuronat untuk meningkatkan atau memodifikasi sifat biologis atau mekanik (Hanifatunnisa, 2020). Choi dkk. menyelidiki efek penyembuhan luka dari gelatin alginat sebagai bahan pembalut luka dengan kemampuan penyembuhannya. Demikian pula, Kawai dkk., mikrosfer gelatin yang diresapi dengan faktor pertumbuhan fibroblas dasar menjadi dermis buatan untuk regenerasi kulit. (Andriani, 2018) Studi lain menunjukkan efektivitas gelatin memainkan peran penting pada proses penyembuhan luka. Kemampuannya dalam membantu proses pembentukan jaringan granulasi, meningkatkan reepitelisasi, serta angiogenesis. (Andriani, 2018) Selain itu, gelatin juga dapat menunjukkan efek antimikrobia jika digabung dengan PEG dan DEE. Hasil penelitian Arrochman dkk. menyimpulkan bahwa sediaan modern dressing berbahan gelatin dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Hasil serupa diperoleh dari penelitian Salsabilah yang menyimpulkan, terapi gel berbahan gelatin efektif dalam mempercepat penyembuhan luka pada penderita diabetes. (Salsabilah, 2021) Atas dasar tersebut, gelatin saat ini dapat menjadi salah satu modalitas terapi yang digunakan sebagai perawatan luka.

1.2.5 Terapi Gelatin Spray

Pembalut modern dirancang tidak hanya untuk melindungi daerah yang terluka

dari infeksi eksternal tetapi juga untuk menjaga agar luka tetap terhidrasi dan mempercepat penyembuhan. Namun, sebagian besar balutan luka canggih yang dikomersialkan terutama didasarkan pada polimer sintetik (Dhivya et al., 2015). Beberapa contoh terkenal dari balutan modern termasuk balutan film semipermeabel, balutan busa semipermeabel, balutan hidrogel, balutan hidrokoloid, dan balutan alginat. Jenis lain dari metode perawatan luka adalah balutan obat pengganti kulit yang direkayasa jaringan (Liesenfeld B et al., 2009), dan balutan komposit. Pembalut ini semakin diminati di bidang medis karena biodegradabilitasnya, biokompatibilitasnya, dan tidak toksik terhadap lingkungan. Namun, ada beberapa batasan yang terkait dengan balutan modern tersebut. Misalnya, balutan komposit mahal dan kurang fleksibel; film semi-permeabel dan balutan busa membutuhkan balutan yang sering dan tidak cocok untuk luka dengan eksudat rendah, dan balutan alginat membutuhkan balutan sekunder lainnya (Selvaraj et al. 2015). Untuk alasan ini, ahli biokimia, ahli biologi, dan insinyur jaringan masih berjuang untuk produksi massal pengganti kulit yang direkayasa jaringan (Catalano et al., 2013).

Hidrogel lunak menawarkan sifat luar biasa yang mengatasi sebagian besar tantangan yang terkait dengan pembalut luka, seperti mengisi luka yang tidak teratur dan pelepasan senyawa bioaktif yang terkontrol. Namun, hidrogel ini membatasi pertukaran gas di lokasi luka (T. Li et al., 2022a). Selain itu, ada juga kekhawatiran tentang keramahan pengguna dan portabilitas. Masalah ini dapat diatasi dengan mengembangkan semprotan pembentuk gel cepat, yang cocok untuk dioleskan langsung ke luka tanpa kontak dengan penyeka kapas atau tangan, sehingga mengurangi kemungkinan kontaminasi atau infeksi. Dalam kebanyakan kasus, semprotan ini membentuk lapisan tipis dan bioabsorbing, sehingga tidak ada kemungkinan mengalami trauma sekunder saat menerapkan balutan atau balutan ulang (Y. Li et al., 2021; Retnowati et al., 2021) mengembangkan semprotan nano kurkumin/kitosan yang dimodifikasi EGF dan menerapkannya pada luka dengan ketebalan penuh yang dibuat pada model tikus. Tikus yang diobati dengan formulasi nano-spray menunjukkan karakteristik penyembuhan yang sangat baik dan memiliki tingkat penutupan luka rata-rata ~ 98% dalam 12 hari (Y. Li et al., 2021). Dalam penelitian lain, (Chen et al., 2020) merancang obat antifibrotik (pirfenidone) yang mengandung asam hialuronat yang dikombinasikan dengan pembalut semprot berbasis kristal cair lyotropik yang membentuk gel rakitan sendiri yang terdiri dari struktur nano kisi. Gel semprot yang disiapkan menunjukkan efek profilaksis bekas luka yang sangat baik dan menunjukkan prognosis penyembuhan luka yang ideal (Chen et al., 2020). (Wayal et al., 2021) menyiapkan semprotan pembentuk film berbahan dasar sutra yang dapat membentuk gel dalam waktu 5 menit di lingkungan terbuka (Wayal et al. 2021). Semua formulasi semprot yang disebutkan di atas sangat menjanjikan untuk aplikasi penyembuhan luka karena aktivitas proliferasi sel yang ditingkatkan dan menambah kenyamanan. Namun, perbaikan masih diperlukan, terutama pada waktu pembentukan gel untuk memastikan peningkatan perlindungan terhadap infeksi dan kehilangan darah. Larutan semprot harus memiliki viskositas yang lebih tinggi untuk pembentukan gel yang lebih cepat, dan dengan demikian dapat memberikan perawatan luka yang lebih baik (Khan et al., 2010).

Untuk mengatasi masalah tersebut, gel bioadhesif berbasis gelatin

mendapatkan prioritas karena biaya produksinya yang lebih rendah, tingkat penyembuhan yang lebih cepat, dan aplikasi yang mudah terlepas dari lokasi luka (Jaipan et al., 2017). Kolagen dan turunannya yang terhidrolisis, gelatin, adalah blok bangunan yang paling tepat untuk menyiapkan pembalut luka karena bersifat biomimetik pada kulit manusia (Gaspar-Pintiliescu et al., 2019). Selain itu, (1) gelatin lebih mudah larut dibandingkan protein ECM lainnya; sebagai hasilnya, lebih mudah digunakan untuk aplikasi biomedis, (2) memiliki ketersediaan yang lebih tinggi dan lebih murah tetapi memiliki struktur kimia yang mirip dengan kolagen, (3) mengandung bagian pengikat untuk dilampirkan dengan sel, (4) tidak menginduksi toksisitas atau antigenisitas dalam sel, dan (5) gelatin yang dimetabolisme dapat digunakan sebagai prekursor untuk biosintesis protein sehingga dapat menginduksi proses penyembuhan (Bello et al., 2020). Ikatan silang merupakan fenomena yang sangat baik yang dapat meningkatkan viskositas dengan meningkatkan berat molekul gelatin yang berikatan silang dan mengarah pada peningkatan sifat mekanik (Zaman et al., 2011). Dalam beberapa tahun terakhir, polietilen glikol (PEG) telah mendapatkan pengakuan yang signifikan sebagai eksipien polimer yang dapat digunakan dalam larutan gelatin untuk sifat tambahan seperti gelas yang lebih baik dan peningkatan aktivitas antimikroba (Adamic et al., 1991; J. M. Lee et al., 2020). Namun demikian, bioadhesive berbasis gelatin yang murah, serta bahan pembalut pertolongan pertama seperti semprotan, belum pernah dilaporkan. Penelitian yang dilakukan oleh Mohammed, dkk merupakan pengembangan solusi pembentuk gel bioadhesif PEG berbasis gelatin yang dapat dengan mudah diterapkan pada luka ringan hingga sedang terlepas dari posisi cedera. Solusinya disiapkan menggunakan bahan baku yang tersedia, diproduksi secara lokal, dan lebih murah. Prosedur pengoperasiannya juga sangat sederhana, cocok untuk produksi skala besar, dan jauh lebih murah. Selain itu, ditemukan biokompatibel, tidak beracun, dan ramah lingkungan, yang menawarkan pengurangan rasa sakit, perlindungan dari infeksi bakteri, dan sifat penyembuhan luka yang cepat.

Hidrogel merupakan pembalut luka berbentuk lembaran dengan kandungan sejumlah air yang tinggi, mirip seperti jaringan alami pada makhluk hidup. Selain itu, hidrogel juga memiliki kemampuan yang baik dalam menyerap cairan luka, memiliki stabilitas yang baik pada pH asam sehingga baik digunakan untuk pengobatan luka. Pembalut luka hidrogel memiliki permeabilitas oksigen yang lebih rendah, sehingga tekanan oksigen diluar permukaan luka menjadi tinggi. Hal tersebut berdampak pada semakin cepatnya pembentukan kolagen pada jaringan sekitar luka secara alami. (Fan et al., 2021; Kang & Park, 2021)

Hidrogel merupakan bentuk tiga dimensi hasil ikat silang jaringan polimer hidrofilik yang mengembang namun tidak terlalu larut ketika dibawa saat bersentuhan dengan air. Hidrogel memiliki bentuk yang bermacam-macam antara lain seperti slabs (potongan), mikropartikel, nanopartikel, coating (pelapis), dan film (lapisan tipis). Sebagai hasil, pada umumnya hidrogel digunakan pada bidang kesehatan dan obat-obatan dalam aplikasi yang luas, termasuk biosensor, teknik jaringan dan obat regeneratif, pemisahan bimolekul atau sel dan pembawa materi pada pelekatan pengaturan aktivitas biologi. Hidrogel dapat melindungi obat dari kondisi lingkungan yang tidak sesuai sebagai contoh kehadiran enzim dan pH rendah pada cairan tubuh. Sifat penyerapannya mengijinkan obat-obatan dibuat dalam bentuk matriks gel dan melepas sebelum laju terurainya bahan

aktif obat.(Kang & Park, 2021; Tarmidzi et al., 2020)

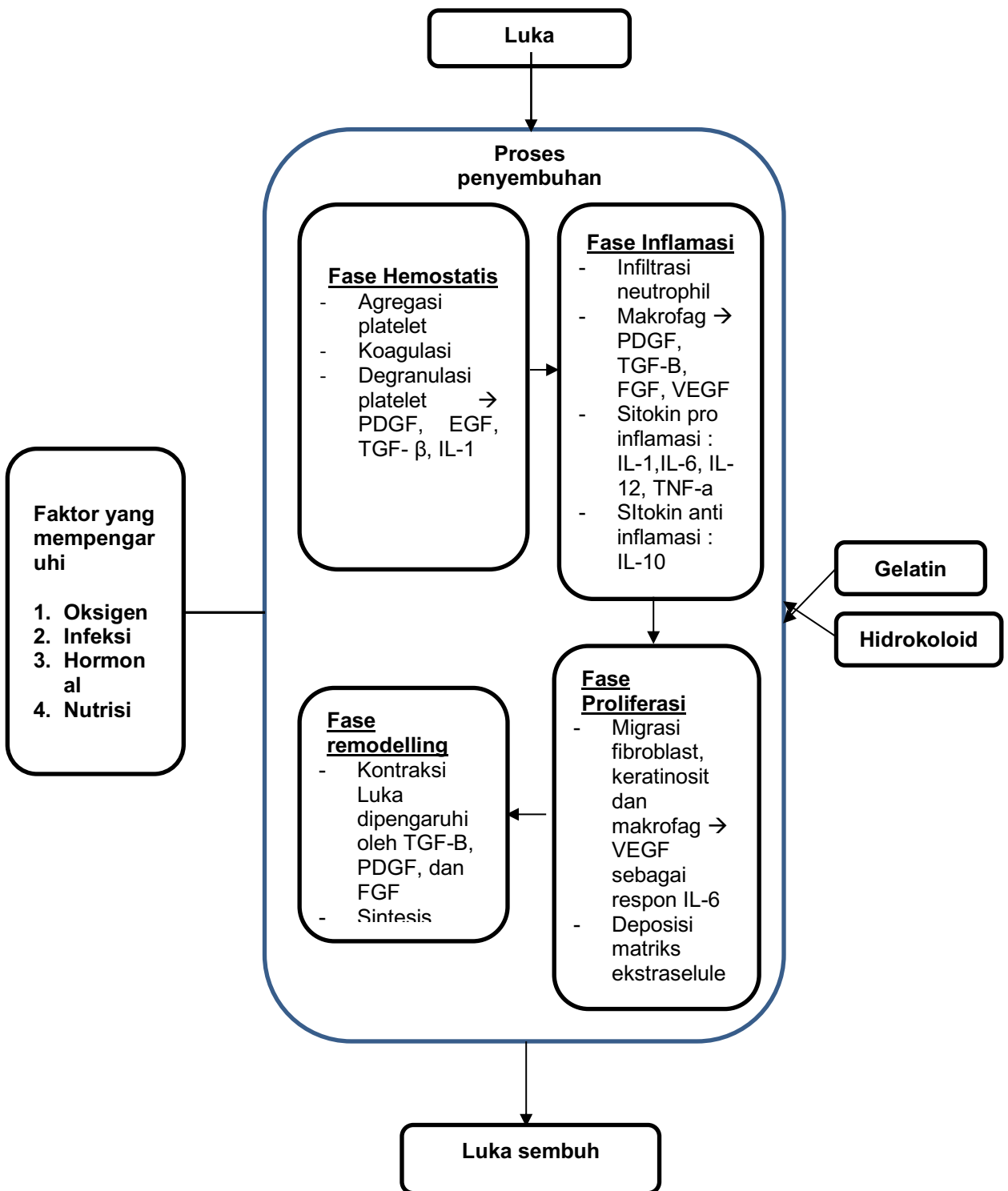
Dalam penelitian ini, hidrogel yang digunakan berbahan dasar gelatin. Gelatin merupakan suatu senyawa protein yang diekstraksi dari hewan, dapat diperoleh dari jaringan kolagen hewan yang terdapat pada kulit, tulang dan jaringan ikat dimana pada umumnya diproduksi dari kulit dan tulang sapi atau babi. Komponen utama gelatin adalah protein yang kandungannya berkisar antara 85-92%, terdiri dari 19 jenis asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida membentuk rantai polimer panjang. Sifat utama gelatin adalah non toksik, biodegradable, dan biokompatibilitas karena merupakan bahan alami yang mengandung asam amino tinggi serta mampu membentuk aksi pengikatan yang unik, sehingga mampu membentuk hidrogel. Hidrogel gelatin telah banyak mendapatkan minat yang tinggi dalam bidang teknik jaringan karena sifat non imunogeniknya.(Tarmidzi et al., 2020)

1.2.6 Terapi Hidrokoloid

Bukti modern tentang penyembuhan luka telah mengubah praktik perawatan luka berdasarkan pendekatan holistik. Penyembuhan luka basah terbukti lebih baik daripada penyembuhan kering baik untuk luka kronis seperti ulkus dekubitus maupun luka bedah akut. Pembalut oklusif dapat mempertahankan lingkungan lembab yang sesuai dan kondisi aseptik, hangat, dan hipoksia pada luka, memungkinkan aktivitas berbagai sitokin dan migrasi sel epitel secara bebas. Isolasi termal meningkatkan fungsi neutrofil dan makrofag, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri, dan kondisi hipoksia memfasilitasi angiogenesis. Pembalut hidrokoloid memiliki permukaan bagian dalam yang mengandung partikel hidrokoloid dan permukaan luar film poliuretan. Permukaan bagian dalam yang bersentuhan dengan luka dapat menyerap eksudat luka dan membentuk gel hidrofilik yang memfasilitasi debridemen autolitik. Ini menutupi luka sepenuhnya dan melindungi dari lingkungan luar, mencegah invasi mikroba dan menjaga suhu luka.(Fujimoto et al., 2008)

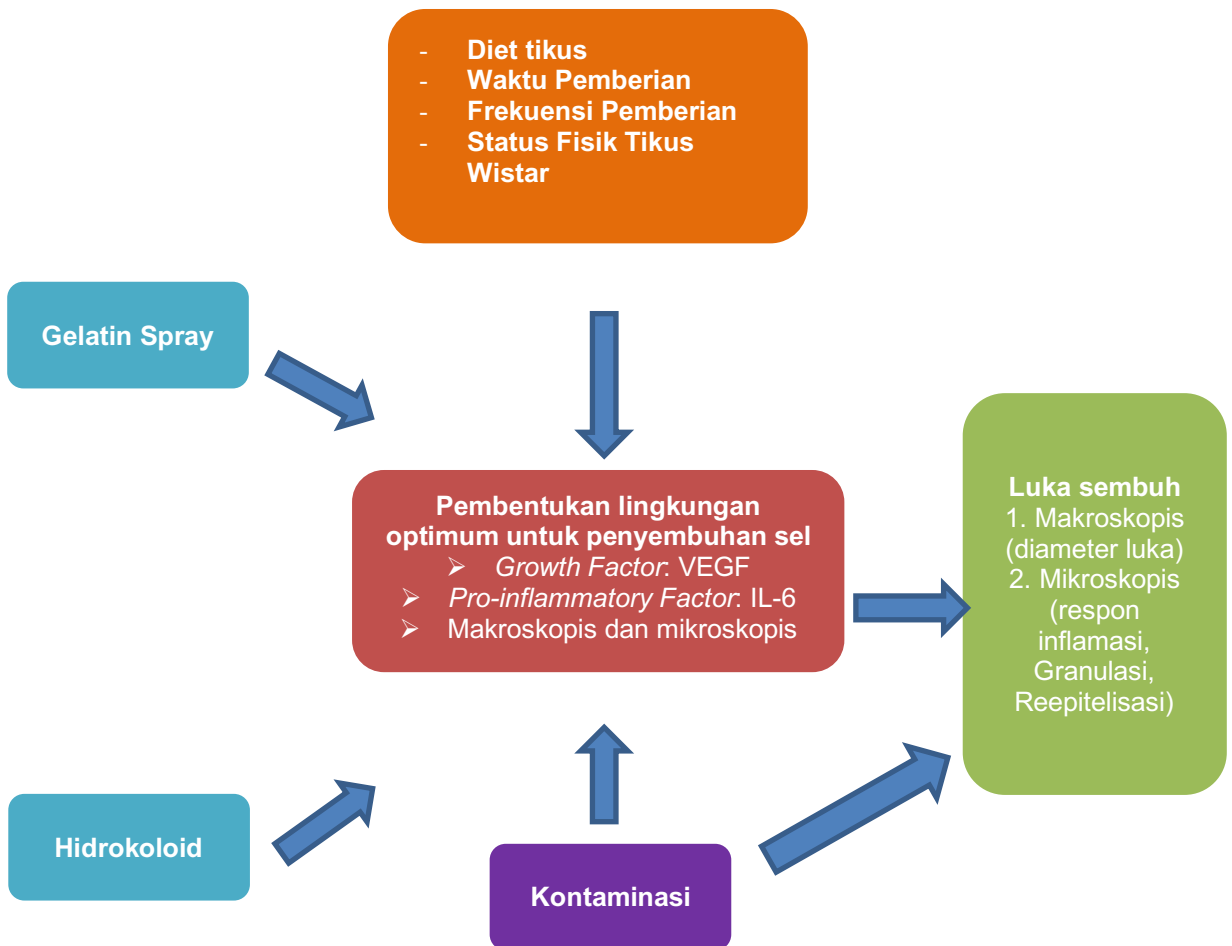
Hidrokoloid terdiri dari matriks gel poliuretan berpererekat di mana butiran dengan daya serap tinggi tertanam. Beberapa menyerap cairan luka hingga 10 kali beratnya. Sebagian besar tidak benar-benar oklusif: banyak yang memiliki lapisan film yang menjadikannya semi-oklusif. Film poliuretan memungkinkan uap air keluar dari balutan ke atmosfer. Penyerapan selektif menyebabkan faktor pertumbuhan vital (platelet-derived growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor) tertinggal di dasar luka, sehingga proses penyembuhan luka dapat terus berlanjut tanpa hambatan. Bukti menunjukkan bahwa hidrokoloid dan film semipermeabel tidak mungkin menyebabkan atau mendorong infeksi luka. PH darah pada dasarnya netral. Namun, ketika kulit rusak dan luka terkena udara, jaringan akan kehilangan uap air dan karbon dioksida, dan mungkin menjadi sedikit basa, yang secara teori membuat luka rentan terhadap infeksi bakteri. Namun Chen dkk. menyarankan pH luka dapat bervariasi, tergantung pada zat eksogen apa yang diterapkan padanya. Beberapa hidrokoloid mengubah pH luka menjadi lingkungan yang sedikit asam yaitu pH 5,6 setelah 24 jam yang menghambat pertumbuhan beberapa bakteri secara in vivo. Lingkungan luka seperti itu juga mempunyai efek menguntungkan pada epitelisasi.(Bryan, 2004; Thomas, 1996)

1.2.7 Kerangka Teori



Gambar 1.1 Kerangka teori

1.2.8 Kerangka Konsep



	Variabel bebas
	Variabel antara
	Variabel kontrol
	Variabel tergantung
	Variabel perancu

Gambar 1.2 Kerangka Konsep

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dirumuskan pertanyaan sebagai berikut:

1. Bagaimana diameter luka pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi gelatin spray dibandingkan dengan pemberian hidrokoloid?
2. Bagaimana respon inflamasi proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi gelatin spray dibandingkan dengan pemberian hidrokoloid?
3. Bagaimana reepitelisasi pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi gelatin spray dibandingkan dengan pemberian hidrokoloid?
4. Bagaimana granulasi pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi gelatin spray dibandingkan dengan pemberian hidrokoloid?
5. Bagaimana kadar IL-6 dan vascular endothelial growth factor (VEGF) pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi gelatin spray dibandingkan dengan pemberian hidrokoloid?
6. Bagaimana perbandingan efektifitas terapi gelatin spray dan hidrokoloid sebagai terapi penyembuhan luka?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas terapi gelatin spray dan hidrokoloid terhadap penyembuhan luka pada tikus wistar.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui perubahan diameter luka secara makroskopis pada tikus wistar sebelum dan setelah diterapi dengan gelatin spray dan hidrokoloid.
2. Untuk mengetahui respon inflamasi proses penyembuhan luka pada tikus wistar sebelum dan setelah diterapi dengan gelatin spray dan hidrokoloid.
3. Untuk mengetahui reepitelisasi pada proses penyembuhan luka pada tikus wistar sebelum dan setelah diterapi dengan gelatin spray dan hidrokoloid.
4. Untuk mengetahui granulasi proses penyembuhan luka pada tikus wistar sebelum dan setelah diterapi dengan gelatin spray dan hidrokoloid.
5. Untuk mengetahui kadar VEGF dan IL-6 pada proses penyembuhan luka tikus wistar yang diterapi dengan gelatin spray dibandingkan dengan hidrokoloid.
6. Untuk mengetahui perbandingan efektivitas terapi gelatin spray dan hidrokoloid sebagai terapi penyembuhan luka.

1.5 Hipotesis Penelitian

1. Gelatin spray lebih efektif sebagai terapi penyembuhan luka dibanding hidrokoloid.
2. Gelatin spray berpengaruh terhadap peningkatan kadar VEGF dan IL-6.

1.6 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritik
Dapat menjadi rujukan dan menambah pengetahuan khususnya tentang keefektifan gelatin spray sebagai terapi penyembuhan luka / wound dressing dan bagaimana terapi tersebut berpengaruh terhadap penyembuhan jaringan luka.
2. Manfaat metodologi

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk meningkatkan pelayanan masyarakat sebagai terapi penyembuhan luka / wound dressing.

3. Manfaat aplikatif

Hasil penelitian ini juga dapat menjadi sumber rujukan bagi peneliti selanjutnya yang ingin meneliti tentang modalitas terapi penyembuhan luka

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode true-experimental design, pre- and post-treatment yang bertujuan untuk mengukur efek sebelum dan setelah diberikan perlakuan pada beberapa buah kelompok (kontrol dan perlakuan) yang dikondisikan secara identik dan telah dikendalikan berbagai variabel yang tidak dikehendaki. Pada beberapa kelompok tertentu diberikan intervensi berbeda, kemudian dibandingkan efek yang terjadi antara kelompok-kelompok tersebut.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu PSKH - FKUH. Penelitian akan dilakukan kurang lebih selama 1 bulan dari bulan Juni 2024 – Juli 2024.

2.3 Populasi Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar.

2.4 Sampel dan Cara Pengambilan Sampel

- Sampel penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) Galur wistar yang terstandar oleh LIPI (usia 12 minggu, berat badan 200-250 gram, jantan)
- Sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selanjutnya ditentukan secara kuota usia jumlahnya untuk masing-masing kelompok

2.5 Perkiraan Besar Sampel

Penelitian akan membagi tikus Wistar yang sehat sebagai subjek penelitian yang diisolasi selama 1 minggu kemudian dibagi menjadi 9 kelompok:

1. Kelompok 1, Pada hari ke-2, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung tanpa perlakuan dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
2. Kelompok 2, Pada hari ke-2, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang telah disemprot dengan gelatin spray dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
3. Kelompok 3, Pada hari ke- 2, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang ditutup dengan hidrokoloid dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
4. Kelompok 4, Pada hari ke- 7, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung tanpa perlakuan dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
5. Kelompok 5, Pada hari ke- 7, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang telah disemprot dengan gelatin spray dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
6. Kelompok 6, Pada hari ke- 7, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang ditutup dengan hidrokoloid dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
7. Kelompok 7, Pada hari ke- 14, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung tanpa perlakuan yang telah ditutup dengan plester luka dilakukan pemeriksaan diameter

luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.

8. Kelompok 8, Pada hari ke- 14, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang telah disemprot dengan gelatin spray dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.
9. Kelompok 9, Pada hari ke- 14, 3 tikus Wistar dengan luka di punggung yang ditutup dengan hidrokoloid dilakukan pemeriksaan diameter luka, histopatologi (Vaskularisasi, reepitelisasi, respon inflamasi), dan kadar IL-6 dan VEGF.

Jumlah sampel pada penelitian ini akan ditentukan menggunakan rumus Federer

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

Keterangan:

n = Jumlah replikasi

t = jumlah perlakuan

$$(9-1)(n-1) \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,8 \rightarrow 3$$

Maka dari itu dari rumus diatas, didapati bahwa setiap kelompok membutuhkan 3 sampel tikus. Sehingga total sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 27 ekor tikus.

2.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

➤ Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini antara lain tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang telah ditetapkan dalam standard penelitian LIPI:

1. Tikus jantan
2. Usia 12 minggu
3. Tikus dengan berat badan 200-250 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat

➤ Kriteria Eksklusi

1. Tikus Wistar yang sakit dalam percobaan
2. Tikus Wistar yang mati dalam percobaan
3. Tikus Wistar yang secara makroskopis mengalami kelainan

2.7 Identifikasi Variabel

1. Variabel bebas :Gelatin spray, Hidrokoloid
2. Variabel kontrol :Diet tikus, waktu pemberian perlakuan, frekuensi pemberian, dan status fisik tikus winstar
3. Variabel tergantung :Perkembangan penyembuhan luka (makroskopis, mikroskopis, IL-6 dan VEGF)

4. Variabel antara :Pembentukan lingkungan optimum untuk penyembuhan sel
5. Variabel Perancu : Kontaminasi

2.8 Ijin Penelitian dan Kelayakan Etik

Permintaan ijin serta persetujuan kelayakan etik penelitian dari Komisi Etik penelitian biomedis pada hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

2.9 Alat dan Bahan

Alat dan Bahan

a. Alat

- Punch biopsy ukuran 8 mm
- Blade holder no.3
- Blade no.10
- Pinset anatomis
- Kasa steril 1x1 cm
- Kapas alkohol 70%
- Gunting tajam tumpul kecil
- Silet
- Mistar besi
- Timbangan digital merk KK 500 PS®
- Spidol marker
- Pot sediaan, ukuran 5 ml
- Disposable spuit 1 cc
- Mikroskop Olympus DP 12®

b. Bahan

- Ketamin ampul
- Xylazine ampul
- Formalin Buffer
- Gelatin spray
- Hidrokoloid (Duoderm®)

2.10 Defenisi Operasional Variabel

- Luka akut dibuat pada punggung area thoracolumbar tikus Wistar berbentuk bulat dengan diameter 8 mm. Luka dibuat dengan kedalaman mencapai subkutis (tidak boleh mengenai otot) menggunakan punch biopsi ukuran 8 mm.
- Gelatin spray merupakan cairan yang berisi solusio gelatin 30% dengan polyethylene glycol (15:3, gelatin/PEG, w/v) akan disemprotkan sebanyak 0,2 cc pada luka dengan jarak 3 cm dan di aplikasikan 2 kali per hari.
- Hidrokoloid (Duoderm®) merupakan pembalut luka semi-permeable dengan ukuran 1x1 cm diaplikasikan pada luka dan diganti dua kali sehari.
- Penyembuhan luka adalah proses regenerasi dan reparasi jaringan yang rusak melalui 4 fase yakni fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Penilaian luka diukur pada hari ke 2, 7 dan 14.

Penilaian penyembuhan luka efektif dilihat dari kriteria berikut:

1. Diameter luka diukur dengan melihat diameter terpanjang luka sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Dokumentasi gambar luka menggunakan kamera digital. Pengukuran diameter menggunakan perangkat lunak analisis gambar Scion Image Beta 4.02 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).
2. Respon jaringan granulasi adalah parameter yang terdiri dari proliferasi kapiler pembuluh darah dan fibroblast dari jaringan kulit tikus Wistar yang mengalami proses penyembuhan, yakni antara lain :
 - 1 : respon ringan, jaringan granulasi 0-25%
 - 2 : respon sedang yakni jaringan granulasi 50-75%
 - 3 : respon lengkap yakni jaringan granulasi lebih 75%
3. Pengukuran skor reepitelisasi adalah proses pembentukan kembali epitel pada saat proses penyembuhan luka, yakni:
 - 1 : tidak dijumpai reepitelisasi pada penyembuhan luka
 - 2 : reepitelisasi <50 % dari luas luka
 - 3 : reepitelisasi 50-90 % dari luas luka
 - 4 : reepitelisasi sempurna 100%
4. Pengukuran skor sel radang adalah keberadaan sel-sel radang sel PMN (limfosit, makrofag, sel debris) pada saat proses penyembuhan luka, yakni:
 - 1 : Sel radang ringan / sedikit
 - 2 : Sel radang sedang / moderate
 - 3 : Sel radang berat / padat
- Interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin pro inflamasi yang diproduksi oleh platelet dan makrofag selama proses penyembuhan luka. Sitokin yang berasal dari jaringan luka akan di ukur menggunakan metode ELISA pada hari 2,7 dan 14.
- VEGF (Vascular endothelial growth factor) merupakan faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh keratinosit, sel endotel, platelet, neutrofil, makrofag dan berperan dalam proses penyembuhan luka. VEGF yang diukur berasal dari jaringan luka akan di ukur menggunakan metode ELISA pada hari 2,7 dan 14.

2.11 Prosedur Penelitian

2.11.1. Persiapan

1. Peneliti diberi izin untuk melaksanakan penelitian oleh Departemen Dermatologi dan Venereologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
2. Rancangan penelitian diajukan ke Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin untuk mendapatkan persetujuan (ethical clearance).

2.11.2. Teknik Pelaksanaan

1. Persiapan Gelatin spray
 - Gelatin spray dibuat di PT Kymmoshi Global Indonesia, Jawa Tengah.
 - Komposisi dari bahan pembuatan Gelatin spray yaitu Ethanol 96% teknis 96 ml, Gelatin 20 gram, Lithium sodium silicate 2 gram, DM DM hidantoin 2 ml, dan Aquadest 300 ml.

- Sebanyak 400 ml Gelatin spray dibuat dengan cara langkah pertama yaitu melarutkan serbuk gelatin ke dalam 100 ml aquadest panas (suhu lebih dari 60°C) hingga terlarut sempurna. Pada wadah lain dimasukkan lithium sodium silicate ke dalam 200 ml aquadest dingin dan diaduk menggunakan alat mixer hingga terlarut sempurna. Dimasukkan cairan gelatin ke dalam larutan lithium sodium silicate sambil dilakukan pengadukan. Dimasukkan DM DM dan alkohol ke dalam campuran tersebut hingga tercampur homogen. Diamkan campuran yang sudah jadi hingga busanya menghilang.
- Uji stabilitas gelatin spray

Tabel 2.1 Kriteria parameter uji stabilitas gelatin spray

Kriteria uji	Parameter	Standar
Organoleptik	Warna	Jernih, kuning kecoklatan
	Bau	Bau khas gelatin
	Bentuk	Cair
Kimia	pH	6,50 – 7,00
	Viskositas	20 – 30 mPa.s

Tabel 2.2 Hasil pengamatan uji stabilitas gelatin spray

Periode (Hari ke-)	Batch 1			Batch 2			Batch 3		
	Tampilan fisik	Viskositas (mPa.s)	pH	Tampilan fisik	Viskositas (mPa.s)	pH	Tampilan fisik	Viskositas (mPa.s)	pH
1	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,85	6,82	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,91	6,90	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,41	6,86
7	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,90	6,84	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,97	6,94	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,55	6,88
14	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,90	6,87	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,99	6,95	Cairan, jernih kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,94	6,89

21	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	26,05	6,88	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	26,00	6,95	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	25,96	6,91
30	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	26,30	6,90	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	26,21	6,96	Cairan, jerning kuning kecoklatan Bau khas gelatin	26,13	6,93

Produk gelatin spray masih stabil pada kurun waktu penyimpanan selama 30 hari

2. Persiapan sampel tikus

- 27 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar), usia 12 minggu, dengan berat badan 200-250 gram, dikelompokkan menjadi 9 kelompok yang masing-masing terdiri atas 3 ekor. Setiap tikus memiliki kandang sendiri, yang artinya untuk total sampel pada penelitian ini dibutuhkan sebanyak 27 kandang. Tujuan dari penempatan tikus pada kandang masing-masing adalah untuk menghindari terjadinya serangan tikus satu sama lain. Jika terjadi serangan seperti gigitan, dapat terjadi manipulasi pada luka sehingga pengamatan dapat terganggu.
- Makanan tikus putih berupa biji-bijian dan daun dengan frekuensi 2-3 kali sehari dengan pakan standar.
- Setiap tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 1 minggu. Kemudian dilakukan injeksi ketamin 20mg/kgBB dan xylazine 100 mg/kgBB secara intramuskular, kemudian menunggu hingga tikus Wistar teranestesi, setelah itu bulu tikus di daerah punggung dicukur dengan menggunakan gunting dan silet. Area dibersihkan dengan kapas alkohol, kemudian dibuat luka menggunakan teknik punch biopsy ukuran diameter 8 mm dengan kedalaman mencapai lapisan subkutis dan dipastikan tidak ada otot yang masuk dalam jaringan yang dieksisi, masing-masing tikus Wistar diberi nomor.
- Gelatin spray diaplikasikan di atas luka lalu diratakan dari anterior ke posterior pada kelompok intervensi tikus putih. Pengolesan dilakukan dua kali sehari pada hari ke 0 hingga hari ke 14.
- Hidrokoloid (Duoderm®) diaplikasikan di atas luka pada kelompok kontrol tikus putih dan diganti dua hari sekali pada hari ke 0 hingga hari ke 14.
- Pada hari ke-0, semua tikus Wistar yang akan mendapat perlakuan maupun yang tidak mendapat perlakuan diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi menggunakan teknik punch biopsy pada punggung sekitar daerah luka. Tiga jaringan tikus Wistar sebagai baseline akan difiksasi dalam formalin buffer 10%.
- Pada hari ke-2, 9 tikus Wistar baik kelompok yang tidak mendapat perlakuan, kelompok gelatin spray dan hidrokoloid diberi ketamin xilacin sebagai anestesi

kemudian diambil jaringan kulit/biopsi menggunakan teknik punch biopsy pada pungung sekitar daerah luka. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.

- Pada hari ke-7, 9 tikus Wistar baik kelompok yang tidak mendapat perlakuan, kelompok gelatin spray dan hidrokoloid diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi menggunakan teknik punch biopsy pada pungung sekitar daerah luka. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.
- Pada hari ke-14, 9 tikus Wistar baik kelompok yang tidak mendapat perlakuan, kelompok gelatin spray dan hidrokoloid diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi menggunakan teknik punch biopsy pada pungung sekitar daerah luka. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.

3. Pemeriksaan Makroskopik

Penyembuhan luka yang dinilai secara makroskopis yaitu besar diameter luka dengan mengukur perubahan diameter luka dari luka yang dibuat dengan luka setelah perlakuan. Diameter luka diukur dengan melihat diameter terpanjang luka sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Dokumentasi gambar luka menggunakan kamera digital. Pengukuran diameter menggunakan perangkat lunak analisis gambar menggunakan ImageJ.

4. Pemeriksaan Histopatologis

Sampel jaringan difiksasi buffer formalin 10%. 27 jaringan ditaruh dalam blok parafin dan dipotong dengan ketebalan 4-5 μ M. Tiap bagian yang dipotong kemudian dideparafinasi dengan xylene dan dibagi skala dengan serial alkohol ke air kemudian diwarnai dengan hematoxylin eosin untuk evaluasi standar mikroskop Olympus CV®.

a) Bahan pewarnaan Hematoxylin Eosin (Modifikasi Harri's)

- 1) Asam alkohol 1%
- 2) Saturated Lithium Carbonate
- 3) Ammonia water
- 4) Eosin-Phloxine solution
- 5) Komposisi HE (Modifikasi Harri's):

- Hematoksilin.....	5 gram
- Alkohol, 100% etil.....	50 ml
- Potassium/ammonium, alum.....	100 gram
- Aqua destilata.....	1000 gram
- Mercuri oxide, red.....	2,5 gram

b) Prosedur pewarnaan Hematoxylin Eosin (Modifikasi Harri's)

- 1) Deparafinisasi dan hidrasi pada aqua destilata
- 2) Warnai dalam filtrasi segar Hematoksilin modifikasi Harri's selama 6-15 menit
- 3) Cuci dengan air mengalir selama 2-5 menit
- 4) Diferensiasi dalam asam alkohol 1% 1-2 tetes
- 5) Cuci dengan perlahan dan terbalik dibawah air kran
- 6) Letakkan pada bagian atas cover ammonia water atau larutan jenuh lithium carbonate sampai tampak berwarna biru kelam.

- 7) Cuci secara langsung dalam air mengalir selama 10 menit
- 8) Tempatkan 200% etil alkohol untuk 1-2 menit
- 9) Dehidrasi dan bersihkan langsung dua perubahan dari masing-masing 95% etil alkohol, etil alkohol absolut dan xylene masing-masing 2 menit
- 10) Simpan dengan medium resinous

5. Pemeriksaan ELISA

a) Tahap persiapan

1. Menyiapkan semua reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi. Membawa semua reagen ke suhu kamar sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.
2. Menentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Memasukkan strip ke dalam frame untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2-8°C.
3. Menambahkan standar 50ul ke wadah standar. Catatan: Jangan menambahkan antibodi ke standar karena larutan standar mengandung antibodi terbiotinilasi.
4. Tambahkan 40ul sampel ke wadah sampel dan kemudian tambahkan 10ul antibodi VEGF dan IL-6 ke sumur sampel, lalu tambahkan 50ul streptavidin-HRP ke wadah sampel dan wadah standar (Bukan wadah kontrol kosong). Campur dengan baik. Tutupi wadah dengan sealer. Inkubasi 60 menit pada suhu 37°C.
5. Lepaskan sealer dan cuci wadah 5 kali dengan buffer pencuci. Rendam sumur dengan buffer pencuci 300ul selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi atau tuang setiap wadah dan cuci 5 kali dengan buffer pencuci. Blot wadah ke handuk kertas atau bahan penyerap lainnya.
6. Tambahkan 50ul larutan substrat A ke setiap wadah, lalu tambahkan 50ul larutan substrat B ke setiap wadah. Inkubasi wadah kemudian ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada 37 ° C pada tempat gelap.
7. Tambahkan 50ul Stop Solution ke masing-masing wadah, dan akan terjadi perubahan warna biru akan langsung berubah menjadi kuning.
8. Tentukan densitas optik (nilai OD) masing-masing wadah segera dengan menggunakan pembaca pelat mikro yang disetel ke 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan stop solution.

b) Pengamatan

1. Menyiapkan semua reagen, sampel dan standar
2. Menambahkan sampel dan reagen ELISA ke dalam masing-masing wadah. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
3. Mencuci wadah sebanyak 5 kali.
4. Tambahkan larutan substrat A dan B. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.
5. Tambahkan stop solution dan warna berkembang.
6. Baca nilai OD dalam 10 menit

6. Pengamatan dan Pencatatan

- Dilakukan pengamatan terhadap perkembangan penyembuhan luka pada masing-masing tikus putih pada hari ke 2, 7, dan 14.
- Perkembangan penyembuhan luka dinilai secara makroskopis, mikroskopis, dan metode ELISA untuk melihat kadar IL-6 dan VEGF.

2.12 Pengolahan Data dan Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan R studio. Data perbandingan waktu meliputi hari 2, hari 7, dan hari 14 pada sampel dengan menggunakan uji repeated measures ANOVA ketika data yang digunakan berdistribusi normal dan menggunakan uji Friedman ketika data yang digunakan tidak berdistribusi normal. Data perbandingan perlakuan meliputi gelatin spray, hidrokoloid, dan kontrol negatif. Analisis data menggunakan uji one way ANOVA ketika data yang digunakan berdistribusi normal dan uji Wilcoxon Ketika data yang digunakan tidak berdistribusi normal.

2.13 Skema Alur Penelitian

