

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit rongga mulut yang menempati urutan pertama dalam catatan buku rekor dunia tahun 2001 sebagai penyakit yang paling sering dialami manusia. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018 melaporkan bahwa prevalensi penyakit periodontal di Indonesia sebesar 74,1%. Penyebab primer dari penyakit periodontal adalah iritasi bakteri. Sedangkan faktor risiko lain yang mempengaruhi tingkat keparahan penyakit periodontal antara lain umur, jenis kelamin, pengetahuan, faktor lokal mulut, perilaku menyikat gigi, scalling, kunjungan rutin ke dokter gigi, konsumsi buah dan sayur, merokok, konsumsi kopi, stres dan faktor sistemik. Peradangan pada periodontal akan semakin parah jika kondisi oral hygiene buruk, dan mempunyai riwayat penyakit sistemik seperti diabetes mellitus (Rohmawati, 2019). Tujuan utama dari perawatan periodontal adalah untuk memulihkan dan memelihara kesehatan dan kekuatan perlekatan gigi (Sari US, 2024; Idaryati NP, 2023).

Luka adalah rusaknya kesatuan atau komponen jaringan yang secara spesifik terdapat substansi jaringan yang rusak atau hilang. Luka pencabutan yang lambat penyembuhannya dapat menyebabkan keluhan dari penderita antara lain adanya rasa sakit, pembengkakan, perdarahan, gangguan fungsi pengunyahan, gangguan fungsi bicara, bahkan dapat terjadi infeksi. Penyembuhan luka dipengaruhi oleh kemampuan sel dan jaringan dalam melakukan regenerasi atau kembali ke struktur normal melalui pertumbuhan sel. Penyembuhan luka yang normal merupakan suatu proses yang kompleks dan dinamis dan mempunyai suatu pola yang dapat diprediksi. Proses penyembuhan luka dapat dibagi menjadi tiga fase pokok yaitu fase hemostatis dan inflamasi, fase proliferasi, fase maturasi dan remodeling. Fase-fase ini terjadi saling bertindihan (overlapping) dan berlangsung sejak terjadinya luka sampai tercapainya resolusi luka. Makrofag merupakan sel yang berperan utama pada proses inflamasi. Makrofag diaktifkan oleh berbagai rangsangan, dikhususkan untuk melaksanakan fungsi penelanan dan penghancuran semua partikel patogen yaitu bakteri, sel yang rusak atau tidak berguna, serta sel tumor dengan proses fagositosis. Selain fagositosis, makrofag juga mensekresi sitokin dan faktor penting pada proses penyembuhan luka (Nugranti, 2019).

Pada proses penyembuhan luka membutuhkan perawatan yang mencakup pembersihan luka bersih dan debridemen, pengolesan preparat antibiotik topikal serta pembalutan. Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks dengan melibatkan banyak sel. Proses yang dimaksudkan disini karena penyembuhan luka melalui beberapa fase. Fase tersebut meliputi: koagulasi, inflamasi, proliferasi, dan fase remodeling (Sajidah, 2020).

Fase inflamasi terjadi segera setelah terjadinya luka sampai hari kelima. Proses konstriksi dan retriksi pembuluh darah yang putus disertai dengan reaksi hemostasis berupa agregasi trombosit dan jala fibrin yang melakukan pembekuan darah untuk mencegah kehilangan darah. Agregat trombosit mengeluarkan sitokin dan growth factor mediator inflamasi TGF- β 1. Proses angiogenesis terjadi saat sel

endotel pembuluh darah di sekitar luka membentuk kapiler baru. Karakteristik fase inflamasi yaitu tumor, rubor, dolor, color, dan functio lesa (Naziyah, 2022).

Fase proliferasi atau fibroplasia berlangsung selama tiga minggu. Fase ini disebut juga sebagai fase granulasi karena terdapat pembentukan jaringan granulasi sehingga luka tampak berwarna merah segar dan mengkilat. Jaringan granulasi terdiri dari fibroblas, sel inflamasi, pembuluhdarah baru, fibronectin, dan asam hialuronat. Fibroblas berproliferasi dan menyintesis kolagen yang menyatukan tepi luka. Matriks fibrin digantikan oleh jaringan granulasi yang terdiri dari sel fibroblast, makrofag, dan endotel. Fibroblas memproduksi matriks ekstraseluler, komponen utama pembentukan parut, yang menyebabkan pergerakan keratinosit melalui pengisian luka. Makrofag menghasilkan growth factor yang merangsang proliferasi, migrasi, dan pembentukan matriks ekstraseluler oleh fibroblast. Selanjutnya, terjadi epitelialisasi berupa migrasi keratinosit dari jaringan sekitar epitel untuk menutupi permukaan luka (Naziyah, 2022).

Fase remodelling atau maturasi yang berlangsung dari beberapa minggu sampai dua tahun berupaya memulihkan struktur jaringan normal. Pada fase ini, tanda inflamasi menghilang, terjadi penyerapan sel radang, pematangan sel muda, serta penutupan dan penyerapan kembali kapiler baru. Terbentuknya kolagen baru mengubah bentuk luka serta meningkatkan kekuatan jaringan (*tensile strength*). Remodelling kolagen, pembentukan parut yang matang, keseimbangan sintesis dan degradasi kolagen terjadi pada fase ini. Proses penyembuhan luka diakhiri oleh terbentuknya parut (*scar tissue*) 50-80% memiliki kekuatan yang sama dengan jaringan sebelumnya (Naziyah, 2022).

Faktor luka terdiri dari oksigenasi yang penting terhadap kecepatan penyembuhan, pada daerah yang memiliki vaskularisasi baik luka dapat sembuh dengan cepat dan begitu pula sebaliknya, lalu ada tidaknya hematoma atau seroma yang dapat menghalangi proses penyembuhan luka dengan menambah jarak tepi luka dan jumlah debridemen yang diperlukan sebelum fibrosis terbentuk. Teknik operasi juga berpengaruh disebabkan penyembuhan luka normal memerlukan keseimbangan antara lisis dan pembentukan kolagen. Sementara pada factor umum, penyembuhan luka dipengaruhi oleh nutrisi terutama pada kekurangan vitamin C, kekurangan seng terutama pada luka bakar, steroid yang dapat menghalangi lisis kolagen, sepsis, dan obat sitotoksik (Naziyah, 2022). Perawatan luka dengan larutan povidone iodine 10% sampai saat ini masih banyak digunakan. Namun ternyata dapat menyebabkan iritasi, alergi, residu, toksik pada sel. Oleh karena itu diperlukan terapi alternatif salah satunya dengan menggunakan biji kenari (Firdaus, 2020).

Kenari (*Canarium indicum L.*) merupakan tanaman buah tropis dari keluarga Burseraceae yang tumbuh di wilayah Asia Tenggara terutama di Indonesia, Malaysia dan Philipina. Tanaman kenari merupakan tanaman dari kehutanan yang memiliki banyak manfaat mulai dari daun, batang, dan buahnya (Alim, 2023) Kenari memiliki profil yang unik: mereka kaya akan asam lemak tak jenuh ganda, yang dapat meningkatkan lipid darah dan Kenari (*Canarium indicum L.*) mengandung banyak asam-asam lemak omega-3, asam fenolik, vitamin, tanin, dan flavonoid, dengan hampir 90% fenol terdapat di bagian kulit. Senyawa tersebut bermanfaat

bagi kesehatan jantung, meningkatkan fungsi kognitif, melawan diabetes, mencegah kanker, dan dapat pula membantu mendapat tidur malam yang pulas. Kenari diduga kaya akan n-6 (linoleat) dan n-3 (linolenate) asam lemak tak jenuh ganda (Masyitah, 2018).

Penggunaan biji kenari (*Canarium indicum* L.) sebagai alternatif dalam penyembuhan luka didasari oleh kandungan bioaktifnya, seperti asam lemak tak jenuh ganda, omega-3, tanin, dan flavonoid. Senyawa-senyawa ini diketahui memiliki potensi anti-inflamasi dan antioksidan yang berperan dalam meningkatkan aktivitas makrofag, sel yang krusial dalam proses penyembuhan luka. Makrofag tidak hanya berfungsi dalam fagositosis untuk membersihkan area luka dari bakteri dan sel yang rusak, tetapi juga melepaskan growth factor yang merangsang regenerasi jaringan. Dengan demikian, biji kenari berpotensi mempercepat fase inflamasi dan mendukung proliferasi sel fibroblas yang dibutuhkan dalam proses penyembuhan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas biji kenari terhadap jumlah sel makrofag dalam proses penyembuhan luka insisi gingiva pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*), yang diharapkan dapat memberikan alternatif terapi luka yang aman dan efektif.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis tertarik melakukan penelitian untuk membahas pengaruh pengaplikasian ekstrak biji kenari (*Canarium Indicum* L) terhadap jumlah sel makrofag pada proses penyembuhan luka insisi gingiva tikus wistar (*Rattus Norvegicus*).

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini dilakukan untuk pengaruh pengaplikasian ekstrak biji kenari (*Canarium Indicum* L.) terhadap jumlah sel makrofag pada proses penyembuhan luka insisi gingiva tikus wistar (*Rattus Norvegicus*).

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk melihat apakah ada peningkatan jumlah rata-rata makrofag pada regenerasi jaringan gingiva *Rattus Norvegicus* yang diberikan aplikasi ekstrak biji kenari (*Canarium Indicum* L.).

1.4 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kesempatan untuk mengembangkan keterampilan penelitian, mulai dari perumusan hipotesis, pengumpulan data, hingga analisis hasil, yang sangat berharga untuk karir akademis dan profesional di masa depan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya literatur ilmiah mengenai penggunaan bahan alami dalam proses penyembuhan luka, khususnya dalam konteks kesehatan mulut.

3. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan baru mengenai ekstrak biji kenari sebagai alternatif terapi yang lebih aman dan alami untuk meningkatkan penyembuhan luka.

1.5 Studi Teori

1.5.1 Gingiva

Gingiva merupakan jaringan lunak yang menempel secara kuat melalui ligamen periodontal hingga ke periosteum, berwarna merah muda yang memegang gigi pada soket tulang. Gingiva merupakan bagian dari jaringan periodontal yang paling luar. Gingiva sering kali dipakai sebagai indikator jika jaringan periodontal terkena penyakit. Hal ini disebabkan karena kebanyakan penyakit jaringan periodontal di mulai dari gingiva. Berikut perbedaan gingiva normal dan gingiva tidak normal (Asmawati, 2023).

Gambaran klinis gingiva normal sangat bervariasi:

- 1) Warna gingival normal umumnya merah jambu,
- 2) Besar gingiva ditentukan oleh jumlah elemen seluler, intraseluler dan pasokan darah, perubahan besar gingiva merupakan gambaran yang sering dijumpai pada penyakit jaringan periodontal.
- 3) Kontur gingiva dipengaruhi oleh bentuk dan susunan gigi-geligi pada lengkungnya, lokalisasi dan luas area kontak proksimal (interdental) gingiva oral maupun vestibular, papila interdental menutupi bagian interdental sehingga tampak lancip.
- 4) Konsisten gingiva melekat erat ke struktur di bawahnya dan tidak mempunyai lapisan submukosa sehingga tidak dapat digerakkan dan kenyal.
- 5) Tekstur permukaan gingiva coklat berbintik-bintik seperti kulit jeruk (*stippling*), terlihat jelas jika permukaan gigi dikeringkan, *stippling* terjadi karena ada penonjolan berselang-seling dengan lekukan karena ikatan serat kolagen yang melekat pada papilla jaringan pengikat gingiva cekat.

Gambaran klinis peradangan gingiva adanya perubahan warna dari merah muda menjadi merah, lama kelamaan menjadi merah kebiruan, adanya perubahan bentuk gingiva dari yang awal bentuk tipis dengan batas tajam menjadi oedema dan bengkak pada papila interdental, perubahan pada posisi gingiva dengan pembengkakan tepi gingiva yang terletak pada tonjolan mahkota, perubahan tekstur permukaan menjadi mengkilat, kehilangan bentuk gingiva yang bergelombang, kehilangan interdental groove dan free marginal gingiva, serta terjadi perdarahan pada tekanan ringan sampai spontan, atau timbulnya eksudat supiratif melalui orifice gingiva (Rosmalia, 2017)

Gingiva dapat merespon peradangan terhadap luka dengan adanya bantuan sistem imun tubuh. Salah satu sel radang yang terlibat dalam respon inflamasi adalah makrofag. Pada inflamasi kronis, terjadi peningkatan kadar sel makrofag dan limfosit B. Pada proses penyembuhan luka, makrofag memiliki peranan yang penting. Saat proses radang kronik, monosit memasuki jaringan dan berdiferensiasi menjadi sel makrofag yang akan memfagositosis jaringan yang rusak termasuk PMN yang telah mati (Pratiwi AR, 2023).

1.5.2 Perawatan Periodontal

Penyakit periodontal merupakan penyakit inflamasi yang disebabkan oleh biofilm bakteri pada permukaan gigi serta salah satu penyebab utama kehilangan gigi akibat kerusakan jaringan periodontal yang bersifat permanen (Wahyuni,2018). Data penelitian Global Burden of Disease tahun 1990-2010 menunjukkan bahwa periodontitis berat (severe periodontitis) merupakan penyakit dengan prevalensi tertinggi keenam (11,2%) dan diderita oleh sekitar 743 juta jiwa di dunia serta mengalami peningkatan prevalensi sebesar 57.3% dalam kurun waktu 10 tahun. Secara global, kerugian akibat berkurangnya produktivitas karena periodontitis berat diperkirakan mencapai 53,99 juta Dolar Amerika per tahunnya (Tonneti et al., 2017, Cit., Wijaksana, 2019).

Perawatan penyakit periodontal terdiri atas 4 fase, yaitu fase non bedah, bedah, restoratif, dan pemeliharaan. Fase pertama fokus pada pengendalian faktor penyebab, seperti plak dan kalkulus, melalui prosedur seperti skaling dan root planning, serta pendidikan pasien mengenai kebersihan mulut. Fase kedua melibatkan terapi korektif, termasuk tindakan bedah untuk menghilangkan poket periodontal dan memperbaiki deformitas yang terjadi akibat penyakit sebelumnya. Tujuan utama dari perawatan periodontal adalah untuk memulihkan dan memelihara kesehatan dan kekuatan perlekatan gigi. Keberhasilan penyembuhan luka pasca perawatan periodontal dipengaruhi oleh banyak faktor baik lokal maupun sistemik (Azizah,2021).

Perawatan periodontal diperlukan untuk menjaga gigi dengan menghilangkan peradangan, meregenerasi periodonsium yang hilang, menjaga estetika, dan menghentikan perkembangan penyakit. Perawatan periodontal merupakan bagian yang tidak dapat dipisahkan dari perawatan dental dan memiliki tahap-tahap atau fase-fase yang berhubungan satu sama lain.

Penyakit periodontal dibagi menjadi dua yaitu gingivitis dan periodontitis. Gingivitis merupakan keadaan kondisi inflamasi yang reversible dari papila dan tepi gingiva dengan tanda klinis gingiva berwarna merah, membengkak dan merah berdarah tanpa ditemukan kerusakan tulang alveolar (Souliissa, 2014). Periodontitis merupakan peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan kelompok mikroorganisme tertentu yang mengakibatkan penghancuran progresif ligamentum periodontal dan tulang alveolar dengan pembentukan poket, resesi atau keduanya (Elisabetta, 2010).

1.5.2.1 Perawatan Non Bedah

Perawatan periodontal non-bedah adalah terapi tahap pertama dalam rangkaian prosedur yang menentukan perawatan periodontal. Tujuan perawatan non-bedah adalah mengurangi etiologi mikroba dan faktor-faktor yang berperan dalam perkembangan penyakit gingiva dan periodontal. Pada perawatan periodontal non bedah dinyatakan terdapat penyembuhan jaringan periodontal, berupa penurunan perdarahan saat probing, penurunan kedalaman poket, dan terjadinya peningkatan perlekatan klinis karena penurunan peradangan pada dasar poket (Zulfa,2011). Fase nonbedah atau fase I diarahkan untuk meningkatkan kebersihan mulut pasien dan juga menghilangkan faktor etiologi penyakit dengan melakukan pembersihan kalkulus (scaling), root planing, koreksi

faktor iritan pada restorasi dan prostetik, ekskavasi karies dan restorasi, terapi antimikroba baik lokal maupun sistemik, terapi oklusi, splinting sementara dan protesa sementara, juga mengontrol diet untuk pasien dengan karies rampan.

Apabila setelah menjalankan fase nonbedah tidak ditemukan tanda-tanda peradangan pada gingiva, pasien tidak perlu melanjutkan ke fase II atau fase bedah. Namun, apabila setelah menjalankan fase I dan masih terlihat tanda-tanda klinis kerusakan jaringan periodontal, pasien harus segera menjalani fase II.

Berbagai metode perawatan, antara lain instrumentasi mekanis, ultrasonic debridement, irigasi supragingiva, irigasi subgingiva, pemberian obat-obatan secara lokal, antibiotika sistemik, dan modulasi respon inang dapat dilakukan pada perawatan non-bedah. Tujuan utama dari perawatan periodontal non-bedah adalah untuk menekan dan mencegah flora patogen mikrobial subgingiva berkembang kembali sehingga lesi inflamasi dapat berkurang (Zulfa L, 2011).

1.5.2.2 Perawatan Bedah

Perawatan bedah periodontal merupakan langkah penting dalam mengelola penyakit periodontal yang parah, terutama ketika terapi non-bedah tidak memberikan hasil yang memadai. Perawatan bedah dilakukan untuk mengeliminasi penyakit periodontal dengan pembuangan jaringan gingiva seperti dengan melakukan bedah kuretase, bedah flep dan gingivektomi. Namun, bedah periodontal hanya dapat dilakukan apabila pasien telah memenuhi keberhasilan pada perawatan fase nonbedah.

Perawatan bedah periodontal disebut juga perawatan fase II. Teknik bedah meningkatkan akses ke permukaan akar, memungkinkan dokter menghilangkan semua iritan, mengurangi atau menghilangkan kedalaman poket, sehingga memungkinkan pasien mempertahankan permukaan akar bebas dari biofilm, dan membentuk kembali jaringan lunak dan keras untuk mencapai topografi yang harmonis (Newman et al., 2019). Dalam prosedur bedah periodontal, gingiva memerlukan evaluasi dan reseksi untuk mendapatkan akses ke permukaan akar dan struktur pendukung tulang. Kompromi estetik pada daerah anterior dapat menjadi konsekuensi serius prosedur bedah periodontal (Oktawati S, 2014).

Fase bedah dapat dilaksanakan setelah kontrol plak berhasil, inflamasi telah hilang dan jaringan sudah siap bedah. Dengan melaksanakan kontrol plak, dokter gigi dan pasien dapat mengevaluasi kebersihan mulut pasien, respon jaringan mulut dan seberapa besar kepedulian pasien dalam menjalani perawatan, dan pencegahan akumulasi plak (Carranza, 2019).

1.5.2.3 Fase penyembuhan Luka (Wound Healing)

Proses penyembuhan luka jaringan lunak rongga mulut pada dasarnya sama dengan luka pada bagian tubuh daerah lainnya seperti kulit. Penyembuhan luka pada dasarnya merupakan gabungan dari proses regenerasi dan perbaikan jaringan. Regenerasi jaringan periodontal menunjukkan adanya perlekatan baru atau pembentukan sementum baru, tulang alveolar serta ligamen periodontal yang identik dengan jaringan yang hilang. Sementara perbaikan merupakan proses penggantian jaringan yang rusak menjadi jaringan yang tidak dapat menduplikasi fungsi jaringan asli (Aziza and Adam Mardiana, 2021).

Penyembuhan luka adalah suatu proses dimana jaringan yang rusak

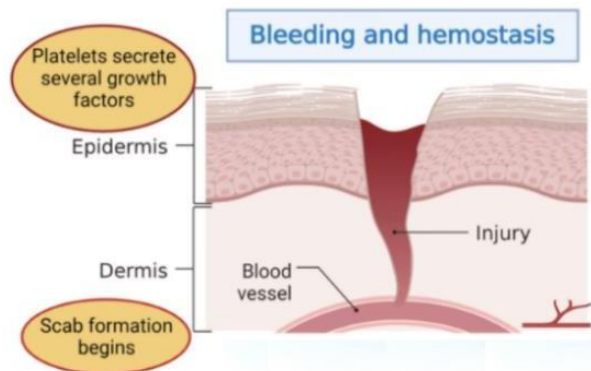
dikembalikan sebisa mungkin ke keadaan yang normal, dan kontraksi luka adalah proses penyusutan area luka tersebut. Hal ini terutama tergantung kepada kemampuan perbaikan dari jaringan, jenis dan luasnya kerusakan, dan keadaan kesehatan umum jaringan tersebut. Penyembuhan luka melibatkan respons seluler dan biokimia yang terjadi baik secara lokal maupun sistemik, dan melibatkan serangkaian tahapan yang dinamis dan kompleks (Primadina et al. 2019). Penyembuhan luka terdiri dari 4 fase berkelanjutan, diantaranya :

1. Fase hemostasis: fase ini dimulai segera setelah cedera terjadi. Tujuan utama dari fase ini adalah menghentikan pendarahan dan membatasi kehilangan darah.
2. Fase inflamasi: fase ini adalah respons tubuh terhadap cedera dan bertujuan untuk membersihkan luka dari bakteri, debris seluler, dan jaringan yang mati.
3. Fase proliferasi: fase ini berfokus pada pembentukan jaringan baru dan penyembuhan luka.
4. Fase remodeling: fase ini berfokus pada penyempurnaan dan penguatan jaringan yang baru terbentuk. Pada fase ini, jaringan granulasi yang terbentuk di fase proliferasi mulai digantikan oleh kolagen yang lebih kuat (Pramono WB, 2016).

Setiap fase memiliki jangka waktu yang spesifik untuk setiap fase diatas mulai dari 1-3 hari, 3- 20 hari, 7-40 hari, dan 40 hari hingga 2 tahun. Terdapat perbedaan jangka waktu penyembuhan luka pada rongga dibandingkan pada kulit. Sel-sel epitel mulai berkembang biak pada 24 jam setelah luka, kemudian re-epitelisasi akan terjadi pada hari ke 2 hingga 3 pada mukosa, dilanjutkan dengan peradangan pada hari ke 2-3 dan akan hilang pada hari ke 6. Fase proliferasi lebih lanjut berlangsung mulai dari hari ke 2-7, yang kemudian diikuti oleh fase remodelling kolagen (Pereira and Sequeira, 2021).

1.5.2.4 Tahap Hemostasis

Fase pertama hemostasis dimulai segera setelah luka terjadi, dengan konstiksi vascular dan pembentukan fibrin. Gumpalan dan sekitar jaringan luka mengeluarkan sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan seperti growth factor (TGF)- β , platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), dan epidermal growth factor (EGF). Saat perdarahan dikontrol, sel-sel yang menyebabkan inflamasi menuju ke luka (kemotaksis) dan mendukung fase inflamasi, dengan karakteristik pembentukan neutrofil, makrofag, dan limfosit (Antia, 2019).



Gambar 1. Tahap Pendarahan dan Hemostasis

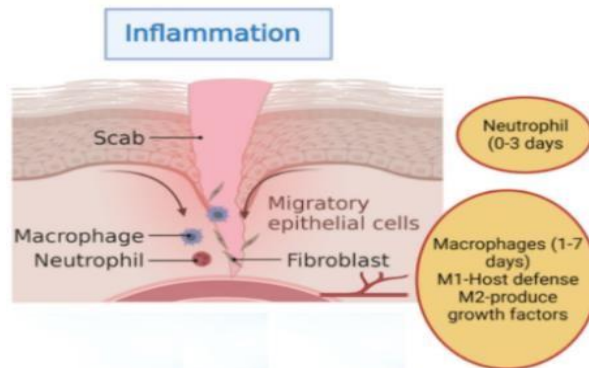
Homeostasis memiliki peran protektif yang membantu dalam penyembuhan luka. Pelepasan protein yang mengandung eksudat ke dalam luka menyebabkan vasodilatasi dan pelepasan histamin maupun serotonin. Hal ini memungkinkan fagosit memasuki daerah yang mengalami luka dan memakan sel-sel mati (jaringan yang mengalami nekrosis). Eksudat adalah cairan yang diproduksi dari luka kronik atau luka akut, serta merupakan komponen kunci dalam penyembuhan luka, mengalir luka secara berkesinambungan dan menjaga keadaan tetap lembab. Eksudat juga memberikan luka suatu nutrisi dan menyediakan kondisi untuk mitosis dari sel-sel epitel (Purnama H, 2017).

1.5.2.5 Tahap Inflamasi

Pada fase Inflamasi terjadi proses vasokonstriksi, pengerutan ujung pembuluh darah yang putus (retraksi), dan reaksi hemostasis. Jika fase inflamasi berlangsung berlarut-larut, ini akan sangat menghambat proses penyembuhan luka karena fase proliferasi baru bisa dimulai jika fase inflamasi sudah berakhir dimana jaringan luka sudah terbebas dari komponen jaringan yang rusak, mikroorganisme, serta sel-sel host yang sudah tidak berfungsi lagi. Makrofag dan mononuklear leukosit lain merupakan sel yang berperan pada fase inflamasi. Makrofag berfungsi mempertahankan jaringan normal dengan memakan sel mati, debris sel, dan benda asing lain kemudian memecah sel-sel tersebut dengan enzim lisosom. Makrofag muncul 24 jam setelah terjadinya luka untuk menggantikan neutrofil dan akan menjadi dominan pada jaringan luka setelah hari ke-5. Selain fagositosis makrofag juga merupakan sel utama yang mensekresi sitokin. Mediator ini sangat penting untuk fase penyembuhan luka selanjutnya, karena mempengaruhi diferensiasi dan dapat membantu membangun kembali jaringan yang rusak. Berakhirnya fase inflamasi ditandai dengan menurunnya jumlah makrofag.

Proses inflamasi dimediasi oleh histamin, prostaglandin, eicosanoid, leukotrien, sitokin, nitrit oksida, dan lain-lain. Proses terjadinya inflamasi dimulai dengan kerusakan jaringan akibat stimulus yang menyebabkan pecahnya sel mast diikuti dengan pelepasan mediator inflamasi, dilanjutkan dengan terjadinya vasodilatasi yang kemudian menyebabkan migrasi sel leukosit. Pada tahap inflamasi dapat menyebabkan edema, ekimosis, kemerahan, serta nyeri. Inflamasi disebabkan oleh mediasi oleh sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, dan efek

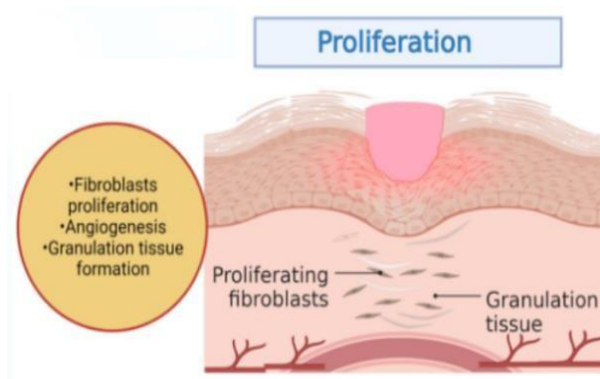
terhadap reseptor. Proses kontriksi dan retriksi pembuluh darah yang putus disertai dengan reaksi hemostasis berupa agregasi trombosit dan jala fibrin yang melakukan pembekuan darah untuk mencegah kehilangan darah. Agregat trombosit mengeluarkan sitokin dan growth factor mediator inflamasi TGF- β 1. Proses angiogenesis terjadi saat sel endotel pembuluh darah di sekitar luka membentuk kapiler baru. Karakteristik fase inflamasi yaitu tumor, rubor, dolor, color, dan functio lesa (Handi Purnama et al., 2017).



Gambar 2. Tahap Inflamasi

1.5.2.6 Tahap Proliferasi

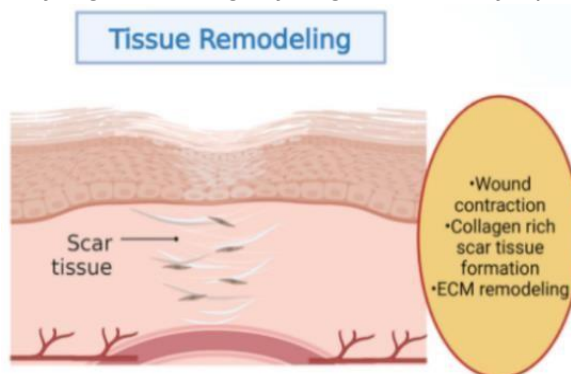
Dimulai hari ke 3-4 hingga hari ke 21. Fibroblas menyintesis kolagen dan substansi dasar. Lapisan dari sel epitel melintasi luka dan aliran darah yang disebut granulasi. Fase proliferasi atau fibroplasia berlangsung selama tiga minggu. Fase ini disebut juga sebagai fase granulasi karena terdapat pembentukan jaringan granulasi sehingga luka tampak berwarna merah segar dan mengkilat. Jaringan granulasi terdiri dari fibroblas, sel inflamasi, pembuluh darah baru, fibronectin, dan asam hialuronat. Fibroblas berproliferasi dan menyintesis kolagen yang menyatukan tepi luka. Matriks fibrin digantikan oleh jaringan granulasi yang terdiri dari sel fibroblast, makrofag, dan endotel. Fibroblas memproduksi matriks ekstraseluler, komponen utama pembentukan parut, yang menyebabkan pergerakan keratinosit melalui pengisian luka. Makrofag menghasilkan growth factor yang merangsang proliferasi, migrasi, dan pembentukan matriks ekstraseluler oleh fibroblast. Selanjutnya, terjadi epitelialisasi berupa migrasi keratinosit dari jaringan sekitar epitel untuk menutupi permukaan luka (Naziyah, 2022).



Gambar 3. Tahap Proliferasi

1.5.2.7 Fase Remodelling

Dimulai pada hari ke 21 hingga luka sembuh sempurna. Kolagen baru menyatu menekan pembuluh darah dalam luka sehingga bekas menjadi rata dan tipis (Firdaus, 2020). Fase remodelling atau maturasi yang berlangsung dari beberapa minggu sampai dua tahun berupaya memulihkan struktur jaringan normal. Pada fase ini, tanda inflamasi menghilang, terjadi penyerapan sel radang, pematangan sel muda, serta penutupan dan penyerapan kembali kapiler baru. Terbentuknya kolagen baru mengubah bentuk luka serta meningkatkan kekuatan jaringan (tensile strength). Remodelling kolagen, pembentukan parut yang matang, keseimbangan sintesis dan degradasi kolagen terjadi pada fase ini. Proses penyembuhan luka diakhiri oleh terbentuknya parut (scar tissue) 50-80% memiliki kekuatan yang sama dengan jaringan sebelumnya (Naziyah, 2022).



Gambar 4. Tahap Remodelling

1.5.3 Biji Kenari (*Canarium Indicum* L.)

1.5.3.1 Pengertian Biji Kenari (*Canarium Indicum* L.)

Pohon kenari merupakan tanaman hutan dan belum banyak dibudidayakan. Kenari merupakan tanaman asli Indonesia yang banyak tumbuh di daerah Indonesia bagian Timur, seperti Sulawesi Utara, Maluku dan Pulau Seram. Tanaman ini berpotensi ekonomi, kenari diambil buahnya terutama bagian dalam bijinya untuk dimakan dan bijinya untuk diolah menjadi minyak. Kenari (*Canarium indicum* L.) merupakan tanaman buah tropis dari keluarga Burseraceae yang

tumbuh di wilayah Asia Tenggara terutama di Indonesia, Malaysia dan Philipina. Kenari merupakan jenis kacang- kacangan yang bijinya memiliki kandungan antioksidan dengan salah satu komponennya yaitu senyawa polifenol.



Gambar 5. Biji Kenari (*Canarium Indicum L.*)

1.5.3.2 Taksonomi Biji Kenari (*Canarium Indicum L.*)

Tabel 1. Taksonomi Biji Kenari

Klasifikasi Ilmiah	
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Kelas	Magnoliopsida
Orde	Sapindales
Famili	Burceraceae
Genus	<i>Canarium</i>
Spesies	<i>Canarium Indicum L.</i>

1.5.3.3 Kandungan dan Manfaat Biji Kenari (*Canarium Indicum L.*)

Biji Kenari (*Canarium indicum L.*) mengandung banyak asam-asam lemak (kandungan terbesar 60-70%), asam fenolik, vitamin, tanin, dan flavonoid, dengan hampir 90% fenol terdapat di bagian kulit. Senyawa tersebut bermanfaat bagi Kesehatan jantung, meningkatkan fungsi kognitif, melawan diabetes dan mencegah kanker dengan kandungan terbesar adalah asam-asam lemak, terdapat asam laurat 1,16%, asam miristat 0,48%, asam palmitat 24,69%, asam oleat 46,86% dan asam linoleat 11,35% (Rahman et al., 2015; Bai et al., 2017).

Mengonsumsi biji kenari diyakini dapat mencegah kanker prostat, memperlambat dan menghentikan pertumbuhan tumor. Senyawa seperti omega-3, asam fenolik, vitamin, tanin, dan flavonoid bermanfaat dalam mencegah kanker, dimana efek menguntungkan tersebut dapat diperoleh dengan cara mengonsumsi kacang kenari harian.

Biji kenari (*Canarium indicum L.*) memiliki manfaat signifikan dalam penyembuhan luka berkat kandungan antioksidan, flavonoid, dan tanin yang

mempercepat proses regenerasi jaringan. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kenari dapat menurunkan kadar glukosa darah, yang berkontribusi pada pengurangan peradangan dan mempercepat penyembuhan luka. Selain itu, senyawa fenolik dalam biji kenari juga berperan dalam meningkatkan kesehatan jantung dan fungsi kognitif.

Biji kenari (*Canarium indicum* L.) berperan dalam penyembuhan luka melalui beberapa mekanisme. Kandungan antioksidan dan senyawa bioaktif dalam biji ini membantu mengurangi peradangan dan mempercepat regenerasi sel. Selain itu, biji kenari kaya akan protein, vitamin E, dan mineral yang mendukung proses penyembuhan dengan meningkatkan fungsi sel imun dan memperbaiki jaringan yang rusak (Ridwan, 2022).

1.5.3.4 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

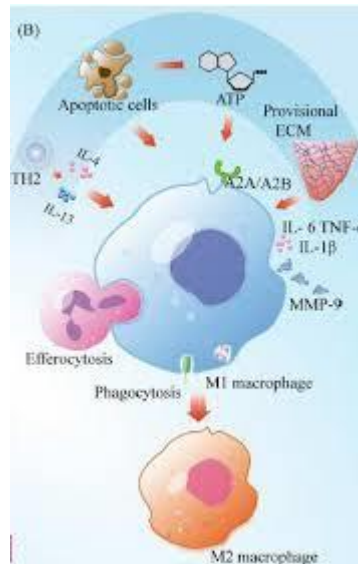
Dalam uji efek penyembuhan luka, digunakan dua jenis kontrol: kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif berhubungan dengan mekanisme yang mengaktifkan atau memperkuat respons makrofag, meningkatkan kemampuannya dalam melawan infeksi atau peradangan. Kontrol positif adalah suatu kelompok eksperimen yang diberi perlakuan yang sudah diketahui memiliki efek atau hasil yang diinginkan. Perlakuan ini digunakan sebagai acuan untuk membandingkan efektivitas perlakuan lain yang sedang diuji. Kontrol positif berupa povidone iodine berfungsi sebagai acuan untuk membandingkan efek penyembuhan luka dengan gel ekstrak biji kenari yang diuji, terutama dalam hal jumlah fibroblas selama proses penyembuhan. Povidone iodine 10%, yang terkandung dalam Betadine®, masih menjadi alternatif yang banyak digunakan untuk perawatan luka karena penggunaannya praktis, mudah didapatkan, dan harganya terjangkau. Namun, antiseptik dalam povidone iodine dapat dianggap sebagai benda asing oleh tubuh karena komposisi dan strukturnya berbeda dengan sel tubuh (Cahya et al., 2020).

Sementara itu, kontrol negatif merupakan kelompok yang tidak diberikan perlakuan apapun terhadap luka yang dibuat. Kelompok kontrol negatif ini digunakan sebagai pembanding antara luka gingiva yang diberikan pengobatan dan luka yang dibiarkan sembuh dengan sendirinya. Kontrol positif dan negatif pada makrofag adalah dua sisi dari mekanisme pengaturan yang seimbang, yang penting untuk menjaga homeostasis tubuh. Kontrol positif mengarah pada aktivasi makrofag untuk meningkatkan respons imun terhadap infeksi atau kerusakan jaringan, sementara kontrol negatif berfungsi untuk mencegah peradangan berlebihan yang dapat merusak jaringan tubuh sendiri. Interaksi antara berbagai molekul dan jalur sinyal yang mengatur kedua jenis kontrol ini sangat penting untuk menjaga keseimbangan dalam sistem imun tubuh. Fungsi utama kontrol negatif adalah untuk memastikan bahwa efek yang diamati pada kelompok perlakuan yang diuji bukanlah akibat dari faktor eksternal atau efek samping dari proses eksperimen itu sendiri, seperti manipulasi fisik atau intervensi yang tidak spesifik.

Dalam penelitian penyembuhan luka, kontrol positif dan negatif pada makrofag adalah dua sisi dari mekanisme pengaturan yang seimbang, yang penting untuk menjaga homeostasis tubuh. Kontrol positif mengarah pada aktivasi makrofag untuk meningkatkan respons imun terhadap infeksi atau kerusakan

jaringan, sementara kontrol negatif berfungsi untuk mencegah peradangan berlebihan yang dapat merusak jaringan tubuh sendiri. Interaksi antara berbagai molekul dan jalur sinyal yang mengatur kedua jenis kontrol ini sangat penting untuk menjaga keseimbangan dalam sistem imun tubuh.

1.5.4 Makrofag



Gambar 6. Peranan makrofag dalam fase inflamasi luka

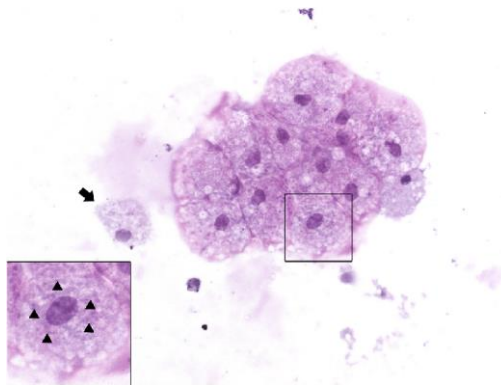
Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing. Peranan makrofag dalam fase inflamasi luka yakni makrofag menghilangkan fragmen sel, patogen, dan sel apoptosis, serta menghasilkan sejumlah besar sitokin proinflamasi untuk merekrut sel imun. Polarisasi ke tipe M2 di bawah pengaruh sitokin TH2, sel apoptosis, nukleotida, dan basa ekstraseluler sementara (Ricardo,2024).

Makrofag dapat dikenali melalui karakteristik morfologinya di bawah mikroskop, seperti bentuk yang tidak beraturan dengan sitoplasma luas yang sering mengandung vakuola dan granula fagositik. Nukleusnya berbentuk oval atau menyerupai ginjal, biasanya terletak di tengah atau agak ke tepi sel, dengan pewarnaan hematoxylin-eosin menunjukkan nukleus berwarna ungu gelap dan sitoplasma berwarna merah muda. Dalam preparat histologi, keberadaan vakuola atau debris fagositosis pada sitoplasma sering menjadi indikator aktivitas makrofag. Fungsi utama makrofag meliputi fagositosis, yaitu membersihkan area luka dari bakteri, debris seluler, dan patogen, serta sekresi sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 yang merekrut sel imun lainnya ke area luka. Selain itu, makrofag juga melepaskan growth factors seperti VEGF dan $\text{TGF-}\beta$ yang merangsang proliferasi fibroblas, keratinosit, serta angiogenesis untuk pembentukan jaringan baru (Blanco et al., 2019).

Makrofag memainkan peran yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka, karena mereka terlibat dalam hampir setiap tahap

penyembuhan, mulai dari pengendalian peradangan hingga regenerasi dan pemulihan jaringan yang rusak. Proses penyembuhan luka melibatkan beberapa fase utama: hemostasis (penghentian perdarahan), peradangan, proliferasi, dan pematangan atau remodeling jaringan. Makrofag berperan signifikan di semua fase ini, terutama dalam fase peradangan dan proliferasi.

Makrofag muncul di area luka setelah proses cedera pada fase inflamasi. Mereka bermigrasi dari darah sebagai monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag di jaringan, dengan kemunculan awal mulai 24-48 jam setelah cedera.



Gambar 7. Histopatologi yang menunjukkan makrofag, secara tunggal (tanda panah) dan berkelompok. Inset: makrofag mengandung bahan eosinofilik intraseluler (tanda panah), yang secara morfologi mirip dengan fragmen lensa katarak pada Gambar 3 (pewarnaan hematoksin-eosin, x630; inset x1000)

Pada hari kedua hingga ketiga, mereka mulai menggantikan peran neutrofil yang mendominasi pada awal fase inflamasi, dan mencapai puncak aktivitas pada hari ketiga hingga kelima. Kehadiran makrofag ini tidak hanya membersihkan debris seluler dan mikroba, tetapi juga mengatur transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi melalui pelepasan berbagai mediator dan faktor pertumbuhan (Wee et al., 2022; Loynes et al., 2018).

1.5.5 Tikus Wistar

Tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar merupakan tikus albino adalah salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian biomedik (Johnson, 2012). Tikus Wistar (albino) dikembangkan pertama kali di Wistar Institute (Philadelphia, PA) pada tahun 1906 dengan nama katalog WISTARAT® (Fitria, 2014).

Penggunaan hewan model atau hewan coba sangat diperlukan dalam penelitian secara *in vivo* dalam bidang kesehatan sebab bermanfaat untuk pemahaman mengenai fungsi gen, etiologi, serta mekanisme suatu penyakit, uji efektivitas dan keamanan suatu obat atau bahan kimia. Tikus wistar (*Rattus Norvegicus*) dapat digunakan sebagai hewan percobaan sebab memiliki kemiripan genetik yang tinggi dengan manusia. Diketahui sekitar 90% gen manusia memiliki homolog pada tikus. Tikus putih bereproduksi dalam siklus yang cepat dan dapat menghasilkan keturunan dalam waktu singkat sehingga memungkinkan penelitian untuk dilakukan dengan cepat dan hasil yang diperoleh dapat diperbanyak dalam

jumlah yang cukup (Rosidah et al., 2020).

Tikus Sprague-Dawley merupakan salah satu galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian, karena memiliki perkembangbiakan yang cepat, temperamen yang tenang, dan penanganan yang relatif mudah. Tikus Sprague-Dawley memiliki umur hingga 3,5 tahun, dengan berat badan tikus dewasa biasanya berkisar antara 250-300gram untuk betina dan 450-520gram untuk jantan.



Gambar 8. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Tabel 2. Taksonomi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) (Rosidah et al., 2020)

Klasifikasi Ilmiah	
Kingdom	Animalia (Hewan)
Filum	Chordata
Kelas	Mammalia
Ordo	Rodentia
Subordo	Odontoceti
Famili	Muridae
Genus	<i>Rattus</i>
Spesies	<i>norvegicus</i>

Sebelum melakukan penelitian, peneliti perlu memilih hewan uji yang sesuai dengan tujuan studi, dengan mempertimbangkan beberapa aspek penting (Handajani, 2021):

- Pemilihan spesies hewan yang relevan dengan fokus penelitian
- Kemiripan anatomi dan fisiologi dengan manusia
- Kemudahan hewan tersebut untuk berkembang biak dan dipelihara di laboratorium, sehingga dapat memastikan ketersediaan galur murni dan populasi homogen untuk penelitian
- Kesesuaian hewan model dengan metode yang digunakan, serta kemudahan

- dalam pengadaan dan perawatan
- e. Pertimbangan biaya yang dimiliki peneliti
 - f. Ketahanan terhadap penyakit lain selain yang diinduksi dalam model, untuk mengurangi risiko infeksi

Penggunaan jumlah hewan uji yang seminimal mungkin tetapi tetap memberikan kontribusi signifikan pada perkembangan ilmu pengetahuan dan kesejahteraan manusia.

1.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah bahwa pemberian ekstrak biji kenari dapat menurunkan jumlah makrofag pada luka insisi tikus secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ekstrak biji kenari diprediksi mengandung senyawa bioaktif seperti asam lemak esensial, polifenol, dan antioksidan yang berperan dalam merangsang proliferasi makrofag, sehingga mempercepat pembentukan jaringan baru dan mendukung proses penyembuhan luka.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratories*. Metode ini dipilih karena memungkinkan pengendalian yang baik terhadap sampel dan perlakuan, sehingga hasilnya lebih terukur dan dapat dipercaya. Rancangan penelitian yang digunakan adalah desain kelompok *kontrol post-test*, di mana satu kelompok menerima perlakuan dan kelompok lainnya berfungsi sebagai kontrol, lalu dilakukan observasi.

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.2.1 Lokasi Penelitian

1. Pembuatan ekstrak biji kenari dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
2. Pemeliharaan hewan coba dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.
3. Pemeriksaan histologi jumlah makrofag dilakukan Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.

2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2024 s/d Oktober 2024

2.3 Variabel dan Defenisi Operasi Penelitian

2.3.1 Variabel Penelitian

1. Variabel dependen: Jumlah sel makrofag
2. Variabel independen: Minyak kenari
3. Variabel terkontrol: Tikus wistar

2.3.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Ekstrak biji kenari (*Canarium indicum L.*) merupakan ekstrak yang dibuat dengan metode modifikasi maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%.
2. Hewan coba adalah tikus wistar jantan yang berumur sekitar 6-8 minggu dengan berat badan 150-250 gram yang sebelumnya telah diadaptasi selama 7 hari.
3. Makrofag berbentuk tidak beraturan serta mempunyai inti lonjong atau bentuk seperti ginjal, yang akan diamati secara histopatologi. Sel ini memegang peranan penting pada imunitas innate dan adaptive serta diketahui sebagai bentuk mature dari monosit. Monosit beredar dalam sirkulasi dan berdiferensiasi secara terus-menerus menjadi makrofag. Makrofag berperan penting dalam memfasilitasi transisi fase inflamasi-proliferasi selama penyembuhan luka. Makrofag diketahui lebih aktif dalam melakukan fagositosis dibandingkan monosit dan lebih banyak memiliki granula dengan kandungan enzim hidrolitik.

2.4 Teknik dan Besar Sampel Penelitian

2.4.1 Teknik Sampling

Jumlah sampel dalam penelitian dibagi menjadi 3 kelompok dan dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer :

Rumus Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$(n-1) 2 \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 15 + 2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \approx 9$$

Keterangan :

n = besar sampel tiap kelompok.

t = banyaknya kelompok jumlah intervensi atau pengamatan.

Berdasarkan perhitungan diatas didapatkan minimal jumlah 9 tikus wistar untuk 3 macam kelompok perlakuan, sehingga didapatkan jumlah keseluruhan hewan coba dalam penelitian ini adalah 27 ekor.

2.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan yaitu hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 27 ekor tikus wistar dengan bahan uji yaitu ekstrak minyak biji kenari (*Canarium Indicum L*) dengan tujuan untuk mengetahui penurunan jumlah sel makrofag melalui pengamatan preparat histologi, dengan kriteria:

1. Kriteria Inklusi
 - a. Tidak memiliki cacat fisik
 - b. Jenis kelamin jantan
 - c. Berat badan 150-250 gram
 - d. Umur sekitar 6-8 minggu
2. Kriteria Eksklusi
 - a. Tikus tidak dalam keadaan sehat
 - b. Aktivitas dan tingkah laku tikus tidak normal
 - c. Tikus mati saat penelitian

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Pengurusan Etik Penelitian

Setelah melakukan seminar proposal dan mendapatkan persetujuan atas penelitian yang akan dilakukan, peneliti mengurus berkas-berkas untuk mendapatkan Surat Etik Penelitian sehingga dapat melangsungkan penelitian. Adapun berkas yang dilampirkan untuk mendapatkan etik penelitian adalah:

1. Surat Permohonan Rekomendasi Etik
2. Proposal Penelitian
3. Ringkasan Proposal
4. Formulir Pengajuan Etik Penelitian Kesehatan yang memanfaatkan Hewan Percobaan
5. Surat Persetujuan Pembimbing
6. Bukti Pembayaran pengurusan Etik Penelitian

2.5.2 Persiapan Alat dan Bahan

- A. Alat
 1. Rotary evaporator

2. Stirer
3. Blade
4. Scalpel
5. Wadah tikus
6. Paraffin Block
7. Mikrotom
8. Water Bath
9. Object Glass
10. Cover Glass
11. Mikroskop dengan pembesaran 400x
12. Kaca preparat

B. Bahan

1. Xylazine hydrochloride
2. Ketmine hydrochloride
3. Oxoferin
4. Akuades
5. Ether
6. Neutral Buffer Formalin (10%)
7. Alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, 100%
8. Larutan xylol
9. Paraffin
10. Albumingliserin
11. Hematoxylin eosin
12. Permount
13. Kapas steril
14. Povidone Iodine 10%
15. Kapas Steril

2.5.3 Pengolahan Ekstrak

Biji kenari yang telah dihaluskan seberat 800 gram dicampurkan dengan etanol 96% dan diaduk menggunakan stirrer selama satu jam. Setelah itu, campuran direndam selama semalam (24 jam). Filtrat yang dihasilkan dari perendaman hari pertama kemudian disaring. Ampas dari proses ekstraksi ini diekstraksi ulang dengan tambahan etanol 96% selama empat hari. Semua filtrat selanjutnya dipadatkan menggunakan rotary evaporator hingga tersisa sepertiga dari volume awal. Sisa etanol kemudian diuapkan dalam cawan porselen di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak pekat dengan berat yang konstan.

2.5.4 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-12 minggu dan berat 150-250 gram diadaptasikan dengan lingkungan Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan cara dikandangkan secara individual pada suhu ruangan sekitar 25°C, dengan ventilasi yang baik. Tikus diberi makan dengan standart laboratory pellet diet dan air secara ad libitum selama minimal 5 hari. Tikus putih galur Wistar dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bahan plastik dengan alas sekam serta kawat sebagai penutupnya. Kandang tersebut dibersihkan minimal 2 kali dalam seminggu.

2.5.5 Perlakuan pada Hewan Coba

2.5.5.1 Pembuatan luka insisi pada gingiva bagian labial tikus wistar (*Rattus Norvegicus*)

Tikus coba dibagi menjadi tiga kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Daerah yang dibuat perlakuan adalah gingiva bagian labial di bawah kedua gigi anterior mandibula. Semua tikus akan dianestesi dengan menggunakan injeksi single intramuskular 1-2 mg/kg xylazine hydrochloride dan 10 mg/kg ketamine hydrochloride. Perlakuan akan dibuat pada gingiva bagian labial di bawah kedua gigi anterior mandibula dengan menggunakan blade dan scalpel sepanjang 5 mm.

2.5.5.2 Aplikasi ekstrak biji kenari (*Canarium Indicum L.*) pada luka insisi

Pada kelompok perlakuan diaplikasikan ekstrak biji kenari (*Canarium Indicum L.*) secara topikal dengan kapas steril setiap harinya sampai hari ke-7. Diaplikasikan 2 kali sehari, yaitu pada pagi hari dan sore hari yakni pukul 08.00 dan 16.00 selama 7 hari. Pada kelompok kontrol negatif tidak diberikan perlakuan apapun, luka dibiarkan sembuh dengan sendirinya. Povidone iodine diaplikasikan pada kelompok kontrol positif. Setelah selesai diberikan perlakuan, maka semua tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan kemudian dieutanasia dengan ether, yakni kapas yang dibasahi dengan ether diletakkan dalam satu wadah yang sesuai dengan besar hewan cobanya. Kemudian tikus Wistar dimasukkan satu per satu ke dalam wadah tersebut ditunggu hingga mati. Setelah dilakukan pembedahan jaringan maka tikus Wistar dikuburkan.

2.5.5.3 Pembuatan Sampel untuk Preparat Pemeriksaan Histologi

Bagian yang diberi perlakuan dilakukan pembedahan jaringan dan difiksasi dengan cara memasukkan potongan jaringan ke dalam larutan Neutral Buffer Formalin (10%) selama 18-24 jam. Selanjutnya jaringan dipotong dengan ketebalan sekitar 2-3 mm. Perendaman bertingkat, mulai dari perendaman dalam alkohol 70% yang dilakukan selama 15 menit, selanjutnya alkohol 80% selama 1 jam, kemudian alkohol 95% selama 2 jam, 96% selama 1 jam dan alkohol 100% selama 3 jam. Perendaman dalam larutan xylol (clearing) dilakukan sebanyak 3 kali pada wadah yang berbeda dengan rentang waktu 1 jam, 2 jam dan 2 jam pada perendaman terakhir. Kemudian jaringan diinfiltrasi dengan menggunakan paraffin selama 1,5 jam. Selanjutnya dilakukan penanaman jaringan pada paraffin block dan pembedahan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron. Kemudian jaringan diletakkan pada water bath. Kemudian potongan jaringan dipindahkan ke object glass yang sebelumnya telah dioleskan albumingliserin sebagai perekat didiamkan selama 12 jam. Lalu dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol selama 2-3 menit kemudian 4 tabung alkohol masing-masing selama 3 menit dan air mengalir sampai bersih.

Setelah itu dilakukan pewarnaan preparat dengan menggunakan pewarnaan hematoxylin eosin (HE) dengan 3 tahap yaitu pewarnaan, dehidrasi dan penjernihan. Pewarnaan dilakukan dengan pewarna utama hematoxylin selama 10- 15 menit, cuci dengan air mengalir selama 20 menit, celupkan ke dalam acid alcohol, celupkan ke dalam air dan lakukan dengan pewarna pembeding

dengan eosin 10-15 menit. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%, 80%, 96%, dan 100% masing-masing selama 2-3 menit. Penjernihan dilakukan dengan larutan xylol selama 60 menit dan diulangi agar hasil pewarnaan dapat terlihat dengan jelas. Sediaan preparat dikeringkan dan ditetesi dengan perekat permount dan kemudian ditutup dengan cover glass dan ditunggu beberapa menit hingga perekatnya mengering.

2.5.6 Penghitungan Sel Makrofag

Dipersiapkan 4 preparat dari tiap masing-masing kelompok. Kemudian preparat dapat diamati dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x dan pengamatan dengan 5 lapangan pandang untuk melihat jumlah makrofag yang ada. Pengamatan dan perhitungan dengan 5 lapangan pandang adalah melakukan perhitungan sebanyak 5 kali pergantian lapangan pandang berbeda yang tampak dalam lensa objektif dengan cara menggeser lensa ke bagian atas, tengah dan bawah preparat. Kemudian hasilnya dijumlahkan dan diambil nilai rata-ratanya untuk mendapatkan jumlah makrofag setiap preparat.

2.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisis kuantitatif. Data ini menggunakan uji one way ANOVA dengan menggunakan program SPSS (Statistical Package for Social Science) dan $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya. One Way Anova digunakan karena penelitian ini menggunakan lebih dari dua kelompok untuk menguji generalisasi sehingga dua sampel dianggap mewakili populasi. Apabila antar kelompok perlakuan diperoleh hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan uji tukey $\alpha = 0,05$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan.

2.7 Alur Penelitian

