

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Kulit merupakan organ yang memiliki fungsi khusus, yaitu bersentuhan langsung dengan lingkungan eksternal dan memiliki berbagai fungsi yang penting bagi tubuh, mulai dari mengatur suhu hingga merasakan stimulus eksternal. Kulit juga berperan sebagai pelindung utama tubuh, yang mampu mencegah kerusakan mekanik, termal dan kimia terhadap struktur internal. Kulit juga memiliki mekanisme yang efisien dan cepat untuk memperbaiki kerusakan pada strukturnya, yang dikenal dengan proses penyembuhan luka. (Wilkinson & Hardman, 2020) Luka sendiri dapat didefinisikan sebagai adanya kerusakan pada kontinuitas kulit, ataupun adanya gangguan pada struktur dan fungsi anatomis normal pada kulit. Luka dapat menjadi suatu masalah yang berat, dengan berbagai komplikasi yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas. (Chhabra et al., 2017)

Prevalensi dari luka sendiri cenderung meningkat pada populasi yang memiliki risiko tinggi, meliputi populasi dengan usia tua, meningkatnya insidensi diabetes dan nutrisi yang buruk. Studi di Australia menyebutkan bahwa 500.000 populasi memiliki luka yang tidak sembuh dengan baik, yang disertai dengan beban finansial dan perburukan kualitas hidup. (Sussman, n.d.) Oleh karena itu, diperlukan perawatan luka yang bersifat adekuat dan cepat untuk mencegah infeksi dan hilangnya cairan transepidermal yang pada akhirnya mempercepat proses penyembuhan luka. (Islam et al., 2021)

Proses penyembuhan luka merupakan suatu proses biologis yang kompleks, melibatkan berbagai tahap, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling. Setiap fase memiliki karakteristik aktivitas seluler yang spesifik dan memiliki persinyalan molekuler yang dapat memfasilitasi perbaikan jaringan. Fase inflamasi sendiri merupakan fase yang krusial pada proses ini, dikarenakan adanya persiapan untuk proses penyembuhan selanjutnya dengan cara perekrutan sel imun pada lokasi luka, yang diperlukan untuk membersihkan debris dan patogen. (Nordin et al., 2022) Fase proliferasi sendiri merupakan fase yang melibatkan pembentukan jaringan granulasi, reepitelisasi dan angiogenesis, yang merupakan keadaan vital untuk mengembalikan keutuhan dari kulit. Selanjutnya, fase remodelling yang dapat berlangsung dalam hitungan bulan hingga tahun, dapat melibatkan maturasi kolagen dan reorganisasi dari



la akhirnya dapat membentuk luka. (Venugopal et al., 2023) penyembuhan luka sendiri dipengaruhi oleh berbagai faktor, ka, baik luka tersebut bersifat akut maupun luka kronik, sien, dan faktor lainnya. Luka-luka kronis seperti luka yang rgan iskemia, diabetes mellitus maupun penyakit vena stasis penyembuhan luka yang berbeda dengan luka kronik. Selain itu, ngaruhi penyembuhan luka dapat dikategorikan menjadi faktor

lokal dan faktor sistemik. Faktor lokal merupakan faktor yang mampu memengaruhi secara langsung karakteristik luka tersebut, sedangkan faktor sistemik merupakan kondisi kesehatan umum dari seseorang yang memengaruhi kemampuan penyembuhan luka. Beberapa faktor lokal meliputi oksigenasi, infeksi, serta benda asing, sedangkan faktor sistemik meliputi usia dan jenis kelamin, obesitas, riwayat pengobatan, riwayat merokok, nutrisi dan kondisi immunokompromais.(Guo & DiPietro, 2010)

Prinsip yang penting dalam manajemen perawatan luka adalah penilaian secara periodik dari proses penyembuhan luka untuk mendokumentasikan proses penyembuhan dan menilai efektivitas perawatan luka tersebut. Terdapat berbagai mekanisme untuk menilai proses penyembuhan luka, meliputi penilaian visual dari klinisi dan pengukuran dari volume luka.(Barber, 2008) Metode penilaian volume luka , menggunakan penilaian digital maupun visual, dengan mengukur dua aksis dari luka memiliki efektivitas yang tinggi dalam menilai proses penyembuhan luka,(Dolibog et al., 2023) selain itu, penilaian vaskularisasi juga diperlukan dalam menilai proses penyembuhan luka. Penilaian makrosirkulasi maupun mikrosirkulasi merupakan hal yang penting untuk proses penyembuhan luka. Perfusi yang tidak adekuat dapat mengganggu angiogenesis, deposisi kolagen dan epitelisasi yang dapat menyebabkan inflamasi yang bersifat persisten.(Li et al., 2016) Proses penyembuhan luka juga dapat dinilai menggunakan matriks metalloproteinase, yaitu kelompok proteinase yang dapat meningkat pada berbagai kasus penyembuhan luka yang gagal.

Prinsip perawatan luka sendiri meliputi mengenali penyebab dari luka dan penggunaan dari *dressing*, yang dibagi menjadi pembalut pasif dan bioaktif. Pembalut pasif sendiri meliputi penggunaan *gauze*, *lint* dan tulle. Penggunaan perawatan luka ini cenderung terbatas untuk perawatan primer. Disisi lain, perawatan bioaktif dapat meliputi hydrogel, hidroaktif dan hidrokoloid, yang memiliki fungsi proteksi, absorpsi hidrasi dan fungsi antimikrobal serta modulasi jaringan.(Sussman, n.d.) Penggunaan pemablut tradisional kerap kali memiliki kekurangan, meliputi proses penyembuhan yang cenderung lama serta adanya komplikasi yang kerap muncul dari luka tersebut. Penggunaan pembalut tradisional seperti kassa maupun sediaan semi-solid juga tidak memberikan efektivitas yang maksimal, meliputi kurangnya proteksi terhadap bakteri dan tidak memberikan lingkungan yang lembab untuk penyembuhan luka. Berbagai jenis pembalut modern seperti pembalut hidrokolloid, nylon dan lainnya juga memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing.(Monika et al., 2022)



merupakan suatu material yang didapatkan melalui hidrolisis memiliki struktur yang serupa dengan kolagen. Oleh karena itu, sifat *biodegradable* dan *biocompatible*. Selain itu, gelatin juga material yang tahan akan panas, serta mampu larut dalam air idrofilik pada permukaan untuk membentuk berbagai ikatan n memiliki fungsi kompensasi untuk memperbaiki jaringan

disekitar luka dan menyediakan zat natural untuk matriks ekstraseluler.(Islam et al., 2021)

Gelatin juga memiliki berbagai fungsi yang dapat memfasilitasi penyembuhan luka, meliputi proses hemostasis, fungsi antibakteri, antiinflamasi dan mampu meningkatkan regenerasi pembuluh darah. Penggunaan perawatan luka berbasis gelatin kerap digunakan mengingat biokompabilitas dan kemudahan dalam perawatan luka.(Islam et al., 2021) Meski demikian, struktur polimer dari gelatin kerap kali terdegradasi dengan mudah sebelum luka dapat sembuh dengan baik. Oleh karena itu, durabilitas dari hidrogel berbasis gelatin dapat diperbaiki dengan mengubah konsentrasi zat tersebut ataupun menggunakan komponen matriks ekstraseluler lainnya. Beberapa studi menunjukkan penggunaan gelatin berbasis hidrogel memiliki efektivitas yang baik dalam meningkatkan kesembuhan luka.(Altunbek et al., 2024) Penggunaan gelatin berbasis spray juga terbukti dapat memiliki efektivitas antimikobial, *biocompatible* dan tidak memiliki sifat toksik serta aman digunakan pada area disekitar luka, serta memiliki efek anestesi. Hal ini menyebabkan mungkinnya *spray* diberikan secara langsung untuk memberikan proteksi , pengurangan rasa nyeri dan dirasakannya rasa nyaman pada pasien, serta memberikan peningkatan pergerakan sel pada jaringan granulasi awal, yang dapat meningkatkan proses penyembuhan luka.(Islam et al., 2021)

Material berbasis gelatin juga dapat menyerap eksudat luka, yang mencegah komplikasi serta meningkatkan aktivitas seluler yang dibutuhkan untuk regenerasi jaringan. Adanya asam amino spesifik, seperti asam arginin, glisin dan aspartic pada gelatin diketahui dapat meningkatkan adesi sel dan proliferasi sel yang penting dalam proses penyembuhan luka. Selain itu, gelatin juga diketahui dapat meningkatkan proses angiogenesis, yang penting dalam memberikan nutrisi dan oksigen kepada jaringan yang sedang mengalami proses penyembuhan.(Mony et al., 2021) Disisi lain, gel polyhexanide betaine merupakan jenis material yang memiliki sifat antimikrobial yang baik. Mekanisme kerja dari polyhexanide melibatkan kerusakan pada membran sel bakteri, yang menurunkan kadar bakteri pada permukaan luka.(Chen et al., 2023) Aktivitas antimikrobial ini memiliki manfaat yang spesifik dalam menangani luka, utamanya luka kronis. Bentuk gel tersebut dapat memberikan lingkungan yang lembab, serupa dengan gelatin yang penting untuk kondisi kesehatan yang optimal.(Wang et al., 2021)

Beberapa studi membandingkan efikasi antara gelatin dan gel polyhexanide betaine pada berbagai model penyembuhan luka. Perawatan luka dapat meningkatkan migrasi fibroblast dan sintesis kolagen, an efek penutupan luka yang lebih cepat dibandingkan secara tradisional. Studi lainnya yang melibatkan tikus Wistar wa kedua zat tersebut dapat memberikan efek penyembuhan eski spray gelatin memiliki efek yang lebih baik pada regenerasi ogenesis.(Fu, 2024) Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui



perbandingan efektivitas terapi *gelatin spray* dan *PHMB betaine gel* terhadap penyembuhan luka.

1.2 Teori

1.2.1 Proses penyembuhan luka

Saat terjadi luka, luka akan menutup dan kulit akan yang mengalami kerusakan akan mengalami regenerasi dengan cepat untuk mengembalikan fungsi *barrier* kulit. Penyembuhan luka adalah proses yang kompleks dan terorganisir. Proses penyembuhan luka terdiri dari empat fase yang dapat saling bertumpang tindih satu dengan yang lainnya.

1. Koagulasi

Setelah terjadi luka, akan terjadi pelepasan sel darah dan elemen lainnya dari pembuluh darah untuk menghasilkan bekuan darah dan mengaktifasi faktor eksternal serta faktor internal yang berperan dalam koagulasi. Bekuan darah memiliki beberapa fungsi, yaitu sebagai hemostasis pada lumen pembuluh darah dan saat di area luka, bekuan darah akan berperan sebagai matriks sementara untuk migrasi sel yang berperan dalam proses pembentukan matriks ekstra seluler sebagai sumber produksi sitokin dan faktor pertumbuhan. (Patel et al., 2016). Trombosit akan melepaskan α -*granules* yang akan mensekresikan beberapa faktor pertumbuhan seperti *insulin-like growth factors*, *epidermal growth factors* (EGF), *platelet-derived growth factors* (PDGF) *transforming growth factor- β* (TGF- β), dan *platelet factor* 4. Trombosit juga akan melepaskan faktor kemotaktik yang akan menarik trombosit lainnya, leukosit, dan fibroblas ke area luka. (Patel et al., 2016) (Golebiewska & Poole, 2015) Trombosit juga akan melepaskan vasoamin serotonin yang akan meningkatkan permeabilitas untuk memfasilitasi migrasi sel. Bekuan darah terdiri dari komponen lain yaitu fibronektin, fibrin, fibronektin, dan trombospondin. Seluruh komponen tersebut akan menghasilkan matriks untuk migrasi sel. Setelah agregasi trombosit terjadi, maka akan terjadi pelepasan faktor Hageman XII yaitu enzim yang dapat menginisiasi jalur koagulasi intrinsik. Protrombin akan berubah menjadi trombin yang akan merubah fibrinogen terlarut menjadi fibrinogen tidak terlarut.

2. Inflamasi

Inflamasi terjadi dalam waktu 24 jam dan berlangsung selama 2 minggu atau lebih. Sel inflamasi akan melepaskan enzim dan berbagai mediator sehingga muncul tanda klasik inflamasi yaitu *dolor* (nyeri), *rubor* (kemerahan), *tumor* (bengkak). Inflamasi akan dimulai saat terjadi aktivasi komplemen klasik maupun alternatif serta infiltrasi neutrofil ke waktu 24 – 48 jam. Leukosit berfungsi untuk fagositosis material dan produksi beberapa sitokin. Neutrofil, makrofag, dan limfosit T berperan penting untuk penyembuhan. Neutrofil adalah sel pertama yang memberikan respon terhadap produk kemotaktik trombosit.

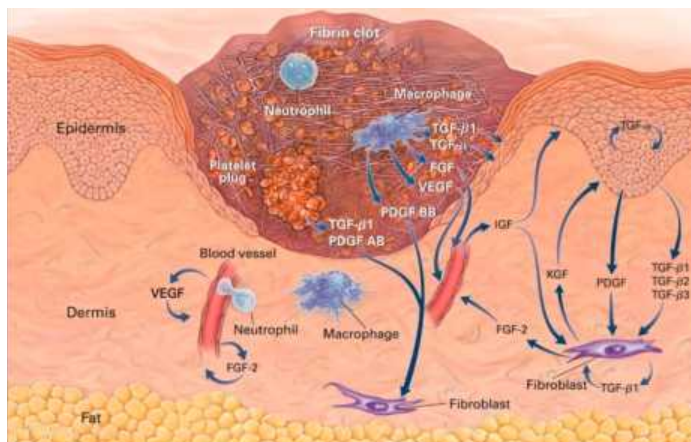


Saat sampai di area luka, maka neutrofil akan melekat dengan sel endotel pembuluh darah dan akan bermigrasi ke ruang ekstravaskular dengan bantuan *cell adhesion molecules* (CAMs). Selain itu, neutrofil juga memproduksi *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan IL-1 yang berperan untuk menarik fibroblas dan sel epitel.(Patel et al., 2016)

Setelah beberapa hari, neutrofil akan digantikan oleh makrofag yang juga merupakan komponen penting pada fase ini. Makrofag akan berada di area luka 72 jam setelah luka muncul dan akan melepaskan berbagai kolagenase serta memproduksi faktor pertumbuhan yang berperan penting dalam proliferasi otot polos, sel endotel, dan proliferasi fibroblas. Proses tersebut akan membantu pembentukan matriks ekstraseluler. Makrofag juga akan berperan dalam proses fagositik dengan melepaskan faktor pertumbuhan dan sitokin seperti PDGF, TGF- β , TGF- α ., *fibroblast growth factor* (FGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *interleukin-1* (IL-1), dan *interleukin-6* (IL-6) yang akan membantu proses penyembuhan luka masuk ke dalam fase proliferaatif. Gangguan pada makrofag jaringan atau monosit pada sirkulasi, akan mengakibatkan debridemen intrinsic yang buruk, proliferasi fibroblas yang terlambat, dan angiogenesis yang tidak memadai sehingga proses penyembuhan menjadi kurang baik.(Patel et al.,2016) (Snyder et al., 2016)

Makrofag terbagi menjadi dua yaitu M1 (*classically activated*) dan M2 (*alternatively activated*). M1 adalah bentuk makrofag yang paling banyak ditemukan dan berperan dalam fagositosis patogen serta menghancurkan atau menyingkirkan sel yang telah rusak, termasuk neutrofil. Setelah M1 diaktivasi oleh interferon- γ (IFN- γ) dan TNF- α , akan terjadi pelepasan IL-12 dan respon imun pro-inflamasi. Berbeda dengan M1, M2 memiliki fungsi regenerasi dan perbaikan. Aktivasi M2 akan terjadi dengan bantuan dari IL-4 dan IL-13. Setelah teraktivasi, M2 akan melepaskan IL-10 yang merupakan sitokin anti-inflamasi. M2 muncul pada proses penyembuhan luka saat terjadi pembentukan jaringan granulasi. Pergantian atau polarisasi M1 menjadi M2 menggambarkan proses diferensiasi makrofag yang merubah sel yang memiliki fungsi inflamasi menjadi fungsi proliferasi(Snyder et al., 2016) Pada fase inflamasi akan ditemukan sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1, IL-6, dan TNF- α . IL-1 dapat berfungsi untuk memicu ekspresi keratin 6 dan keratin 16 pada saat proses migrasi keratinosit serta mengaktivasi fibroblas untuk mensekresikan FGF-7.





Gambar 1.1 Peranan Faktor Pertumbuhan pada fase inflamasi (Park et al., 2020)

3. Proliferasi

Pada fase ini akan terjadi migrasi fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler dan pembentukan jaringan granulasi. Proliferasi dimulai 3 hari setelah terjadi luka dan dapat berlangsung selama 2 – 4 minggu. Re-epitelisasi merupakan proses penting dalam fase ini di mana pada proses ini akan terjadi 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 area luka yang akan berproliferasi dan memproduksi matriks yang tersusun atas fibronectin, kolagen, hialuronan, dan proteoglikan. Seluruh komponen matriks berperan penting untuk pembentukan matriks ekstraseluler yang baru dan perbaikan jaringan. Matriks ekstraseluler tersusun atas beberapa protein adhesi yang tertanam pada proteoglikan, glikosaminoglikan, kolagen, dan elastin. Pada fase ini juga terjadi sintesis kolagen yang dipicu oleh PDGF, FGF, TGF- β , IL-1, dan TNF. FGF dan TGF- β juga mengatur ekspresi kolagen, selain itu TGF- β juga menstimulasi produksi dari kolagen tipe I dan tipe III. Ekspresi VEGF juga membantu proses pembentukan jaringan granulasi. (Vaidyanathan, 2021)

Migrasi seluler dibantu oleh beberapa protein perekat seperti laminin, trombospondin, dan integrin. (Becchetti & Arcangeli, 2010) Fibronectin terhubung pada permukaan sel, membran basal dan matriks ekstraseluler. Fibronectin juga melekat pada komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen, fibrin, proteoglikan, atau integrin dan akan memediasi terjadinya migrasi sel secara

berperan penting dalam proses adhesi baik adhesi antar sel dengan matriks, integrin juga berfungsi untuk membantu antara matriks ekstraseluler dengan sitoskeleton.

sel akan bermigrasi ke bagian tengah luka lesi saat bagian dasar luka diisi oleh jaringan granulasi untuk membentuk epitel pada bagian atas luka. Migrasi sel keratinosit dibantu oleh beberapa protein yaitu *matrix*



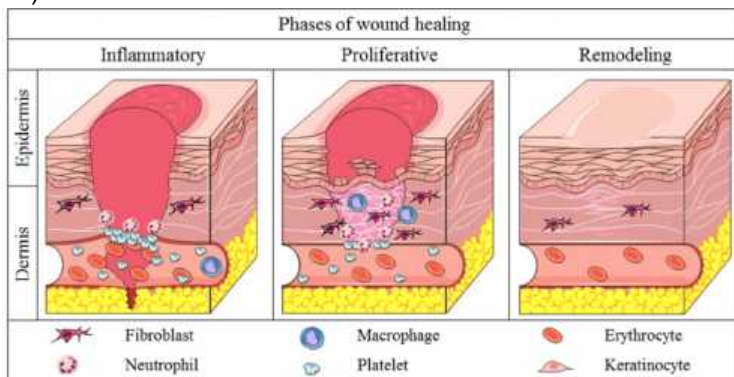
metalloproteinase (MMP), *plasminogen activator inhibitor* (PAI), *urokinase plasminogen*, dan MMP-1 yang berperan penting juga dalam epitelisasi. Aktivasi dari *plasminogen activator inhibitor* dan *urokinase plasminogen activator* juga bergantung pada interaksi antara keratinosit dengan kolagen. Sebelum terjadi migrasi keratinosit, perlu terjadi pemotongan kolagen tipe IV dan VII yang diperantarai oleh MMP. Proses migrasi keratinosit dari bagian tepi luka dan *skin appendages* akan berlangsung dalam 24 jam pertama. Re-epitelisasi kulit dapat dijelaskan oleh dua model yaitu *sliding* dan *rolling model*. Pada *sliding model*, keratinosit di lapisan basal akan mengalami modifikasi desmosom dan hemidesmosom sehingga keratinosit akan lepas dan bermigrasi dari bagian tepi luka menjadi bagian tengah luka. Sebelum keratinosit lepas, akan terjadi peningkatan aktivitas mitotik pada basal sel epitel di tepi luka dalam 12 jam pertama untuk memfasilitasi migrasi keratinosit. Sedangkan pada *rolling model*, keratinosit akan mengalami modifikasi morfologi dan fungsional bersama dengan desmosom dan akan bergulir ke keratinosit basal yang tetap melekat di membrana basalis. Regenerasi lapisan basal akan menuntun keratinosit untuk berproliferasi dan berdiferensiasi secara vertikal, memulihkan ciri fisiologis dari jaringan epitel yang berlapis-lapis. (Tottoli et al., 2020) Pada akhirnya, membran basalis baru akan terbentuk di mana membran ini berperan untuk mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel epitel lebih lanjut untuk membentuk epitel.

4. Remodeling

Fase *remodeling* adalah fase terakhir dari proses penyembuhan luka. Fase ini dimulai kurang lebih tiga minggu setelah trauma dan merupakan fase penyembuhan luka yang terpanjang (berlangsung selama beberapa bulan hingga lebih dari satu tahun). Pada fase ini terjadi sintesis dan penghancuran kolagen secara berkelanjutan. Interaksi antara epidermis dan dermis dengan *feedback* tambahan akan meregulasi integritas kulit dan homeostasis secara terus menerus. Pada fase ini akan terjadi interaksi antara matriks ekstraseluler dengan fibroblas yang akan menyebabkan terjadinya kontraksi luka. Interaksi ini dipengaruhi oleh banyak sitokin yaitu TGF- β , PDGF, dan FGF. TGF- β berperan penting pada awal *remodeling* di mana sitokin ini akan mencegah degradasi kolagen dan memicu pelepasan *tissue inhibitor metalloproteinase* agar terjadi kontraksi luka. MMP berperan penting dalam *remodeling* matriks ekstraseluler dan migrasi sel. MMP diproduksi oleh fibroblas, neutrofil, keratinosit, makrofag, kolagenase interstisial, dan gelatinase. MMP-10 akan memecah komponen non kolagen matriks ekstraseluler dan memfasilitasi proses migrasi sel. MMP akan berinteraksi dengan beberapa protein dan dihambat oleh *metalloproteinase*. Aktivitas MMP secara ketat karena MMP dapat menyebabkan degradasi kolagen yang mengganggu proses penyembuhan.. Selama fase *remodeling*, sel keratinosit akan menjadi tidak aktif (stabil), terjadi perubahan bahan matriks ekstraseluler jaringan granulasi akan menghilang. Makrofag, sel endotel, dan miofibroblas akan mengalami apoptosis atau berpindah dari area yang kaya akan kolagen dan deposisi protein matriks



ekstraseluler. Kolagen tipe III yang berada di matriks ekstraseluler akan digantikan secara bertahap dalam waktu 6 – 12 bulan.(Falanga, 2005) (Tottoli et al., 2020)



Gambar 1.2 Fase penyembuhan luka fisiologis (Gushiken et al., 2021)

1.2.1 Faktor yang memengaruhi penyembuhan luka

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 kompoten 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 sitokin 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 kersakan 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.

Infeksi yang berkepanjangan dapat menyebabkan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α yang dapat menghambat proses penyembuhan luka. Jika fase ini terus berlanjut, maka luka dapat menjadi kronis dan tidak dapat sembuh. Inflamasi berkepanjangan ini juga dapat meningkatkan aktivitas MMP dan mengakibatkan degradasi matriks ekstraseluler.

Kondisi ini 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. Populasi geriatri di atas usia 60 tahun memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjadi gangguan pada proses penyembuhan luka. 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. Pada pasien dengan luka kronik biasanya ditemukan defisiensi nutrisi dan membutuhkan nutrisi khusus. Karbohidrat dan lemak merupakan sumber energi utama selama proses penyembuhan luka. Glukosa dibutuhkan untuk proses angiogenesis dan deposisi jaringan baru. Protein berperan penting dalam proses pembentukan kapiler, proliferasi fibroblas, sintesis proteoglikan, sintesis kolagen, dan remodeling luka. Defisiensi dari protein menyebabkan gangguan pada proses penyembuhan luka. Nutrien lainnya yang dibutuhkan selama proses penyembuhan luka yaitu lemak dan vitamin. Lemak dibutuhkan untuk memenuhi kebutuhan energi dan dibutuhkan untuk proses perbaikan jaringan. Beberapa vitamin yang berperan pada proses penyembuhan luka yaitu vitamin C, A, dan E. Defisiensi dari vitamin C dikaitkan dengan penurunan dari sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas, menghambat proses angiogenesis dan meningkatkan kerapuhan kapiler. Vitamin A memiliki efek anti oksidan, dapat meningkatkan proliferasi fibroblas, meningkatkan sintesis kolagen dan hialuronat, dan mengurangi degradasi matriks ekstraseluler. Vitamin E



mbentukan jaringan parut berlebih pada proses penyembuhan ti inflamasi dan anti oksidan. Dari yang sudah disebutkan di mpulan bahwa selama proses penyembuhan luka dibutuhkan agar proses penyembuhan luka dapat berlangsung dengan)

1.2.2 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. (Papazoglou et al., 2010) 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.

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



umbuhan, dimana keduanya menginduksi terjadinya perbaikan
yal ke sel tersebut untuk memperbaiki kerusakan jaringan.

ini dapat diidentifikasi melalui beberapa teknik, seperti
enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

akan metode laboratorium yang paling sering digunakan untuk
si dari sebuah *analyte* (biasanya antibodi atau antigen). Metode

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 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , sitokin anti inflamasi IL-10, EGF, PDGF, TGF- β 1, VEGF, dan FGF. Kadar dari TNF- α , 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.(Chin 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.(Shah et al., 2012)

1.2.3 Gelatin

Gelatin merupakan salah biomaterial yang sering digunakan dalam sediaan farmasi.(Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019), (Li et al., 2022) Gelatin merupakan polimer alami yang merupakan derivat dari kolagen tidak larut yang diproses melalui hidrolisis.(Nikkhah et al., 2016) Gelatin terdiri dari prolin, glisin, dan hidroksipolin 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 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 *electrospinnability* gelatin menjadi sangat rendah. Untuk meningkatkan sifat mekanik dan stabilitasnya, gelatin memerlukan proses pengikatan silang agar struktur gelatin tidak mudah larut dalam lingkungan biologis. Keberadaan PVA sebagai campuran gelatin dapat meningkatkan *electrospinnability* 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



Gelatin memiliki efek homeostasis dimana gelatin mampu jatan terbentuknya trombus dan menyediakan dukungan itu 2 hari sampai 6 minggu, struktur gelatin dapat terserap atau a sebagai agen hemostasis. Dibandingkan dengan kolagen, sifat hemostasis yang lebih superior. Selain itu, gelatin *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 merupakan salah satu biopolimer yang banyak digunakan untuk *interactive / artificial wound dressing*. Kebanyakan dari *wound dressing* ini memiliki film dan bentuk polimerik transparan. Film ini memiliki sifat permeabel terhadap air dan oksigen namun impermeabel terhadap bakteri. (Sindi et al., 2021)

Gelatin dapat berpenetrasi ke sel membran dan menjadi molekul aktif yang berfungsi sebagai agen hemostatik untuk menginisiasi penyembuhan luka dan menyerap eksudat pada luka sehingga menciptakan lingkungan yang sesuai untuk dimulainya fase inflamasi. Gelatin juga dapat mengabsorpsi eksudat yang terdapat pada area luka dan membuat lingkungan yang mendukung dimulainya fase penyembuhan luka (fase inflamasi) dimana gelatin bersifat protektif terhadap kulit. 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 (Tanaka et al., 2005), (Kang & Park, 2021). Pada sebuah penelitian menunjukkan bahwa gelatin dapat mempengaruhi ekspresi sitokin pro inflamasi IL-6 (Yao et al., 2023) Penelitian yang dilakukan oleh Zang 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. Studi lain menunjukkan efektivitas gelatin memainkan peran penting pada proses penyembuhan luka. Kemampuannya dalam membantu proses pembentukan jaringan granulasi, meningkatkan reepitelisasi, serta angiogenesis. (Naomi et al.,



atin juga dapat menunjukkan efek antimikrobia jika digabung EE. Hasil penelitian yang diperoleh dari sSalsabilah yang pi gel berbahan gelatin efektif dalam mempercepat ada penderita diabetes. (Salsabillah, 2021) Atas dasar tersebut, menjadi salah satu modalitas terapi yang digunakan sebagai

1.2.4 Polyhexanide betaine (PHMB-betaine)

Seperti yang sudah disebutkan sebelumnya bahwa terdapat banyak faktor yang dapat memengaruhi proses penyembuhan luka, salah satunya adalah infeksi. Lesi kronik dapat berkembang ketika terjadi keterlambatan pada proses penyembuhan luka. Kontaminasi $>10^5$ sel bakteri per gram jaringan dapat menciptakan lingkungan pro inflamasi dan meningkatkan risiko terjadinya infeksi. Maka dari itu, adanya pengurangan *bioburden* dari bakteri dengan menciptakan kondisi pada luka yang mendukung viabilitas jaringan dan tidak mendukung pertumbuhan mikroorganisme, dapat mengurangi terjadinya kerusakan dan keterlambatan pada proses penyembuhan luka. Kadar bakteri jaringan yang tinggi dapat mengganggu proses penyembuhan luka dan mencegah terjadinya kesembuhan. (Shah et al., 2012)

Polyhexanide (PHMB) merupakan sintetik polimer yang banyak digunakan sebagai antiseptik sejak tahun 1950. Selain digunakan sebagai antiseptik pada luka, PHMB dapat digunakan sebagai desinfektan alat kedokteran, pengawet dalam larutan lensa kontak, kosmetik dan produk perawatan pribadi. PHMB efektif melawan bakteri gram positif dan negatif termasuk bakteri yang sulit dikontrol seperti *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *vancomycin-resistant Enterococci* (VRE). Selain bakteri, PHMB juga efektif melawan jamur, ragi, amoeba, virus herpes simpleks, dan HIV.

Studi sebelumnya menunjukkan PHMB ditoleransi dengan baik ketika diaplikasikan secara topikal pada luka. PHMB memiliki efek toksitas dan daya penetrasi pada kulit yang rendah. Selain itu, PHMB juga menunjang proses penyembuhan luka dengan mendukung terbentuknya jaringan granulasi pada permukaan luka. (Kramer et al., 2018) PHMB tidak hanya dapat digunakan pada luka kronis, juga dapat digunakan pada luka yang bersifat akut. (Paydar et al., 2017). PHMB memiliki berbagai sediaan, seperti cairan irigasi 0.025, 0.04%, 0.1% dan sediaan gel 0.1%. (Kramer et al., 2018) Penggunaan gel PHMB 0.1% dapat menurunkan kontaminasi luka $\geq 3 \log 10$. Untuk penggunaan gel, luka harus terpapar dengan PHMB dengan durasi minimal 3 jam. (Kramer et al., 2018)

Betaine merupakan surfaktan yang dikembangkan untuk produk perawatan pribadi. Surfaktan ini merupakan derivat dari *undecylenic acid* yang merupakan fungsional natural. Betaine mampu menembus, merusak, membersihkan dan menghilangkan *biofilm* dan kotoran pada luka secara efektif. Pada studi in vitro, betaine menunjukkan adanya potensi untuk mengurangi sitotoksitas fibroblas mencapai 50% dan efektif melawan *Pseudomonas aeruginosa*.

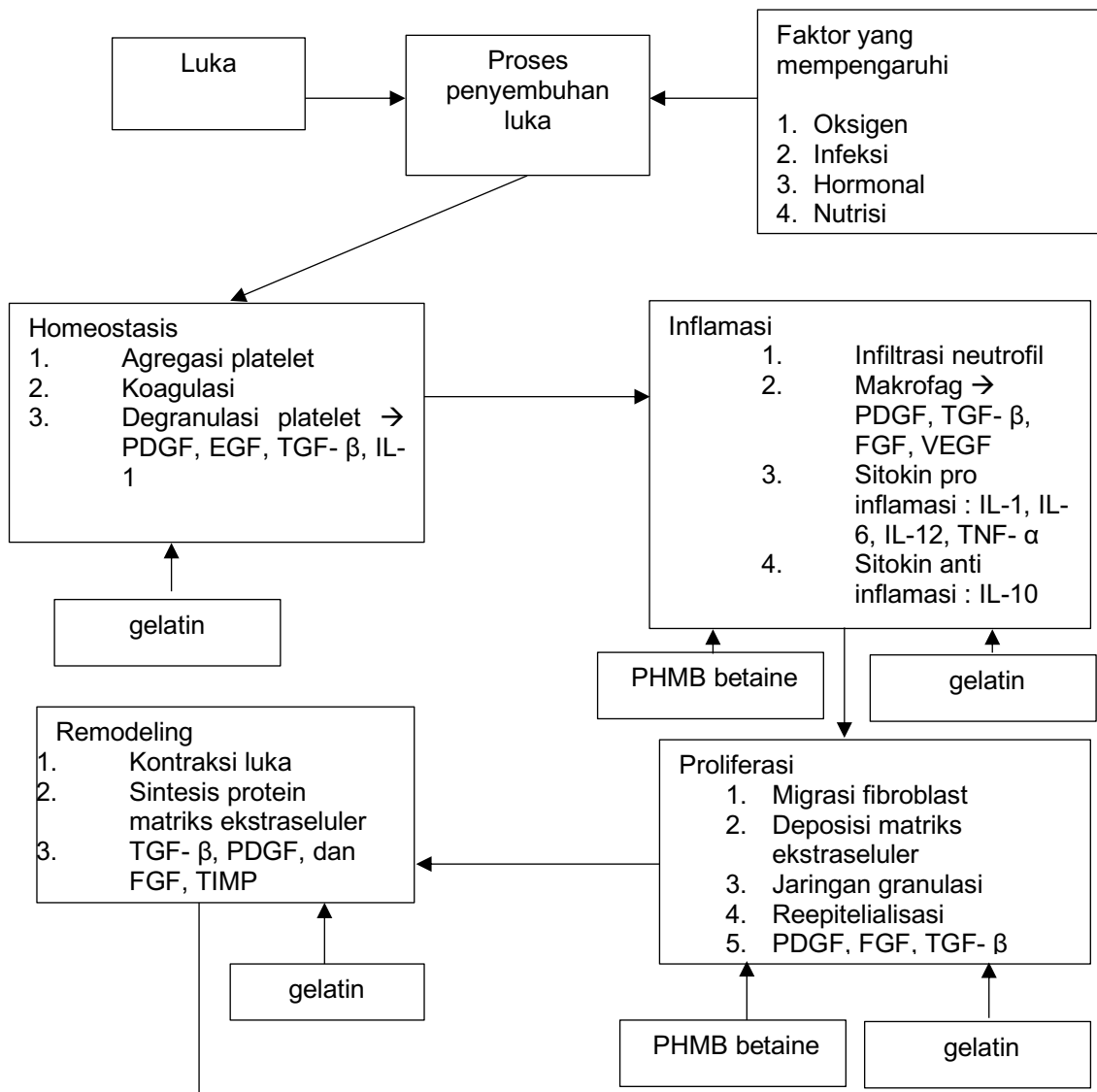
Pada beberapa studi penggunaan PHMB-betaine berhubungan dengan penyembuhan luka. Kombinasi PHMB-betaine, terjadi efek antimikrobal karena adanya perubahan sifat fisik dari et al., 2017) Selain meningkatnya efek antimikroba, kombinasi juga mengurangi efek sitotoksik dan peningkatan kinerja (2009) Selain itu, PHMB juga dapat menstimulasi produksi seperti IL-6 dan IL-12. Produksi sitokin ini dibantu oleh makrofag (essa et al., 2015) IL-6 berperan dalam mekanisme antibakterial



dimana pada penelitian didapatkan *mesenchymal stem cells* (MSCs) memiliki fungsi antibakterial dengan cara sekresi peptide antribakteri (LL-37) dan IL-6.(Şelaru et al., 2019) Kombinasi PHMB dan betaine 0,1% dapat menjaga kelembapan luka. Dalam penyembuhan luka, terdapat proses epitelisasi. Epitelisasi adalah migrasi sel epitel dari tepi luka ke pusat luka. Ketika epitel menutupi luka, maka luka tersebut dianggap telah sembuh. Epitelisasi dapat dipercepat jika kelembaban luka dapat dipertahankan.Pada luka yang membran basalnya masih utuh, epitelisasi berlangsung lebih cepat sehingga keratinosit dirangsang untuk bermigrasi.(Kristianto et al., 2020)



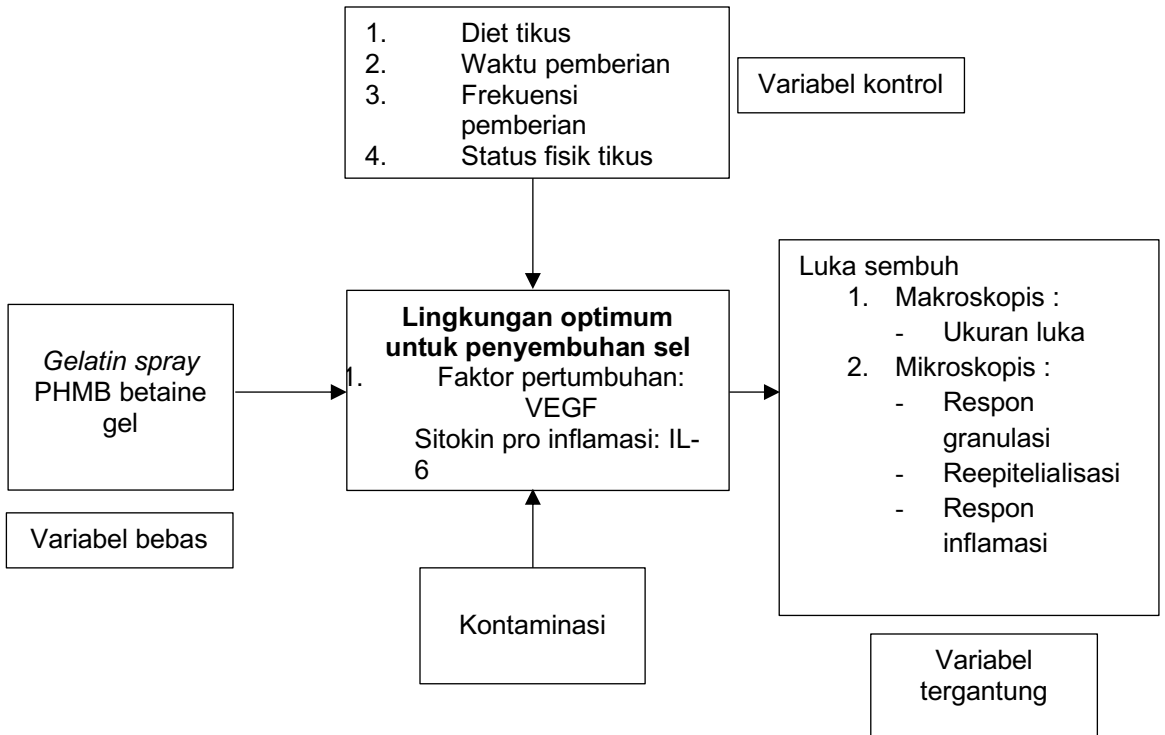
1.2.5 Kerangka teori



Gambar 1.3 Kerangka teori



1.2.6 Kerangka konsep



Gambar 1.4 Kerangka konsep

1.3 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang dirumuskan pertanyaan sebagai berikut:

1. Bagaimana perubahan diameter luka pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine ?
2. Bagaimana respon inflamasi proses penyembuhan luka tikus Wistar yang yang diberi *gelatin spray* dibandingkan dengan pemberian gel polyhexanide-betaine?
3. Bagaimana respon granulasi pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang ay dibandingkan dengan pemberian gel polyhexanide-betaine?
4. Bagaimana respon reepitelisasi pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang ay dibandingkan dengan pemberian gel polyhexanide-betaine?



5. Bagaimana kadar IL-6 dan VEGF pada proses penyembuhan luka tikus Wistar yang diberi *gelatin spray* dibandingkan dengan pemberian gel polyhexanide-betaine?
6. Bagaimana perbandingan efektifitas *gelatin spray* dan gel polyhexanide-betaine sebagai terapi penyembuhan luka?

1.4 Tujuan penelitian

a. Tujuan umum

- Mengetahui efek pemberian *gelatin spray* dibandingkan gel polyhexanide-betaine terhadap penyembuhan luka.

b. Tujuan khusus

- Mengetahui perubahan diameter luka secara makroskopis pada tikus Wistar setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan pemberian gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui kadar VEGF setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui kadar IL-6 setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui respon inflamasi setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui respon granulasi setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui reepitelisasi setelah hari ke- 2, 7 dan 14 pada tikus Wistar yang diaplikasikan *gelatin spray* dibandingkan dengan gel polyhexanide-betaine.
- Mengetahui perbandingan efektifitas *gelatin spray* dan gel polyhexanide-betaine sebagai terapi penyembuhan luka .



elitan

ila pemberian *spray gelatin* dan gel polyhexanide betaine tidak radaan dalam penyembuhan luka.

bila pemberian *spray gelatin* dan gel polyhexanide betaine radaan dalam penyembuhan luka.

1.6 Manfaat penelitian

1. Manfaat teoritik
 - Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk menjadi bahan acuan sebagai *wound dressing* .
 - Data efektifitas penggunaan spray gelatin sebagai material *wound dressing*.
 - Menambah pengetahuan terhadap material baru yang dapat digunakan sebagai *wound dressing*.
2. Manfaat aplikatif
 - Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk meningkatkan pelayanan masyarakat sebagai *wound dressing*.
 - Pasien mendapatkan tambahan obat yang diaplikasikan untuk *wound dressing*.
3. Manfaat metodologi
 - Hasil penelitian ini dapat menjadi bahan dasar untuk penelitian selanjutnya.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental dengan pendekatan *true-experimental design, pre- and post-treatment*

2.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu PSKH- FKUH Makassar pada bulan Juni 2024

2.3 Populasi penelitian

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

2.4 Sampel penelitian

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 akan ditentukan sesuai jumlah masing – masing kelompok.

2.5 Jumlah sampel

Penentuan besar sampel berdasarkan rumus Federer:

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

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

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

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

Keterangan:

t: jumlah kelompok uji

n: besar sampel per kelompok

Besar sampel ideal menurut hitungan rumus Federer adalah 3 ekor tikus Wistar atau lebih per kelompok uji. Dengan demikian jumlah tikus Wistar semua kelompok uji secara keseluruhan adalah 27 ekor. 27 ekor tikus terbagi menjadi 3



ontrol negatif tanpa perlakuan dengan jumlah 9 ekor
ontrol positif yang diberikan gelatin spray dengan jumlah 9 ekor
ontrol positif yang diberikan PHMB betaine gel dengan jumlah 9 ekor

2.6 Kriteria sampel

2.6.1 Kriteria inklusi :

- Tikus Wistar jantan usia 12 minggu dengan berat badan 200-250 gram dan dalam keadaan sehat

2.6.2 Kriteria eksklusi :

- Tikus Wistar yang sakit dalam percobaan
- Tikus Wistar yang mati dalam percobaan
- Tikus Wistar yang secara makroskopis mengalami kelainan

2.7 Izin penelitian dan kelayakan etik

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

2.8 Alat dan bahan

Alat dan Bahan

a. Alat

- *Punch biopsy* ukuran 8 mm
- *Blade holder* no.3
- *Blade* no.10
- *Pinset anatomis*
- Kasa steril 5x5 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

- Ketain ampul
- Xylazine ampul
- Formalin Buffer hari 3

alat

binasi PHMB-betaine



2.9 Prosedur penelitian

2.9.1 Cara pembuatan *gelatin spray*

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 akan dimasukan lithium sodium silicate ke dalam 200 ml aquadest dingin dan dicampur menggunakan alat mixer hingga terlarut sempurna. Kemudian cairan gelatin dimasukan ke dalam larutan lithium sodium silicate dan dilakukan pengadukan. Dimasukkan DM dan alkohol ke dalam campuran tersebut hingga tercampur homogen. Diamkan campuran yang sudah jadi hingga busanya menghilang.

2.9.2 Komposisi *gelatin spray*

400 mL cairan *gelatin spray* terdiri dari ethanol 96% teknis 96 ml, gelatin 20 gram, lithium sodium silicate 2 gram, DM DM hidantoin 2 ml, dan aquadest 300 ml

2.9.3 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	25,85	6,82	Cairan, jernih kuning kecoklatan	25,91	6,90	Cairan, jernih kuning kecoklatan	25,41	6,86



7	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,90	6, 84	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,97	6, 94	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,55	6, 88
14	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,90	6, 87	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,99	6, 95	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,94	6, 89
21	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	26,05	6, 88	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	26,00	6, 95	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	25,96	6, 91
30	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	26,30	6, 90	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	26,21	6, 96	Cairan, jerning kuning kecokl atan Bau khas gelatin	26,13	6, 93

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

2.9.4 Persiapan sampel tikus



37 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* galur Wistar), usia 12 minggu, dengan berat 200-250 gram, dikelompokan menjadi 10 kelompok yang masing-masing terdiri atas 3 ekor. Setiap tikus memiliki kandang sendiri, untuk total sampel pada penelitian ini dibutuhkan sebanyak 30 kandang. Jumlah tikus yang ditempatkan pada kandang masing-masing disesuaikan dengan kebutuhan penelitian 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 pakan standar dan daun dengan frekuensi 2-3 kali sehari. Tidak diberikan makanan yang mengandung protein tinggi seperti daging karena dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka
- Setiap tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 1 minggu. Seluruh sampel penelitian 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.
- Pada kelompok *gelatin spray*, gelatin disemprotkan pada jarak 3 cm sebanyak 0,2 cc hingga menutupi seluruh permukaan luka. Gelatin disemprotkan sebanyak 2 kali per hari pada luka (setiap 12 jam). Sebelum diaplikasikan pada luka, *gelatin spray* disemprotkan terlebih dulu sebanyak 1 kali semprot pada cawan petri dan dilakukan perhitungan volume. Pada kelompok gel PHMB betaine diaplikasikan dengan ketebalan 3-4 mm dan menutupi luka. PHMB betaine diaplikasikan 2 kali per hari pada luka (setiap 12 jam).
- Pada hari ke-2 (48 jam setelah perlukaan), 3 tikus Wistar pada kelompok yang tidak mendapat perlakuan, 3 tikus Wistar kelompok spray gelatin dan 3 tikus Wistar kelompok gel diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi pada punggung sekitar daerah luka. Dilakukan insisi tepi luka dan bersama dengan lapisan dasar dinding otot dipisahkan dari jaringan sekitarnya. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.
- Pada hari ke-7 (168 jam setelah perlukaan), 3 tikus Wistar pada kelompok yang tidak mendapat perlakuan, 3 tikus Wistar kelompok spray gelatin dan 3 tikus Wistar kelompok gel diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi pada punggung sekitar daerah luka. Dilakukan insisi tepi luka dan bersama dengan lapisan dasar dinding otot dipisahkan dari jaringan sekitarnya. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.
- Pada hari ke-14 (336 jam setelah perlukaan), 3 tikus Wistar pada kelompok yang tidak mendapat perlakuan, 3 tikus Wistar kelompok spray gelatin dan 3 tikus Wistar kelompok gel diberi ketamin xilacin sebagai anestesi kemudian diambil jaringan kulit/biopsi pada punggung sekitar daerah luka. Dilakukan insisi tepi luka dan bersama dengan lapisan dasar dinding otot dipisahkan dari jaringan sekitarnya. Jaringan difiksasi dalam formalin buffer 10%.



2.9.5 Pemeriksaan makroskopis

Penyembuhan luka yang dinilai secara makroskopis yaitu diameter luka dengan mengukur perubahan diameter luka. Pengukuran diameter menggunakan mistar dan perangkat lunak analisis gambar ImageJ.

2.9.6 Pemeriksaan histopatologis

Sampel jaringan difiksasi buffer formalin 10%. 27 jaringan ditaruh dalam blok parafin dan dipotong dengan ketebalan 4-5 μM . 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 dab bersihkan langsung dua perubahan dari masing-masing 95% etil alkohol, etil alkohol absolut dan *xylene* masing-masing 2 menit
- 10) Simpan dengan medium *resinous*



1 ELISA

siapan

n semua reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi. semua reagen ke suhu kamar sebelum digunakan. Pengujian la 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 Human 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

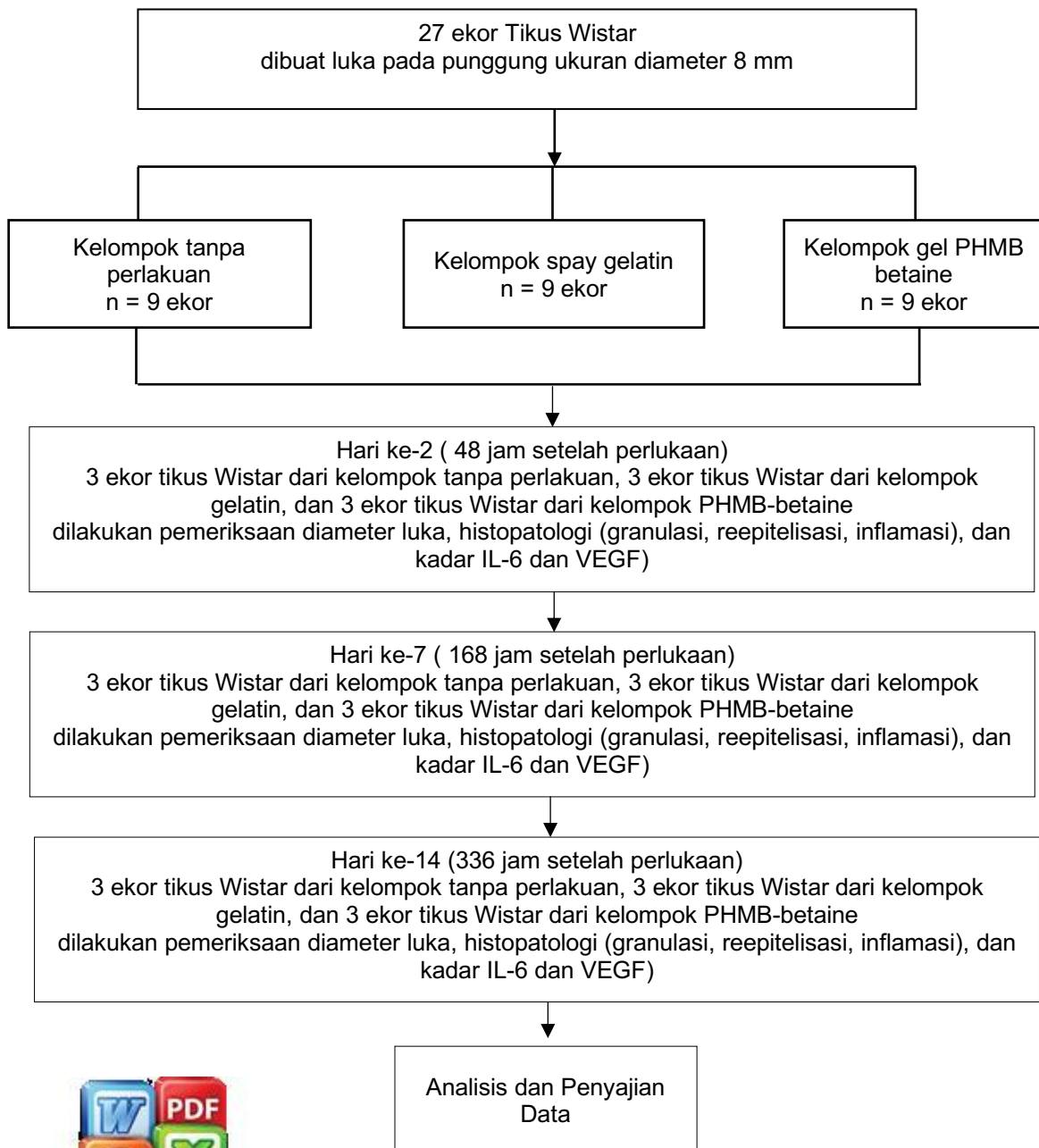
1. Menyiapkan semua reagen, sampel dan standar
2. Menambahkan sampel dan reagen ELISA ke dalam masing-masing wadah. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
3. Mencuci wadah sebanyak 5 kali.
4. Tambahkan larutan substrat A dan B. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.
5. Tambahkan stop solution dan warna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

2.9.8 Pengamatan dan pencatatan

- Dilakukan pengamatan terhadap perkembangan penyembuhan luka pada tikus putih pada hari ke-2 (48 jam setelah perlukaan), 7 (168 jam setelah perlukaan), dan 14 (336 jam setelah perlukaan) dan penyembuhan luka dinilai secara makroskopis, mikroskopis, ELISA untuk melihat kadar IL-6 dan VEGF



2.10 Skema Alur Penelitian



2.11 Identifikasi variabel

1. Variabel bebas : *gelatin spray*, gel polyhexanide betaine (PHMB-betaine)
2. Variabel Kontrol : waktu pemberian perlakuan, frekuensi pemberian, dan status fisik tikus wistar
3. Variabel tergantung : perkembangan penyembuhan luka (diameter luka, kadar VEGF, kadar IL-6, respon inflamasi, respon granulasi dan reepitelisasi)

2.12 Definisi operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan dan membatasi penelitian, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut

- Luka akut dibuat pada punggung area thoracolumbar tikus Wistar berbentuk bulat dengan diameter 8 mm. Luka dibuat sedalam subkutis menggunakan tehnik *punch biopsy*
- *Gelatin spray* merupakan cairan yang mengandung ethanol 96%, gelatin, lithium sodium silicate, DM hidantoin, dan aquadest yang akan diaplikasikan pada luka 2 x/hari (setiap 12 jam) sebanyak 0,2 cc dengan jarak penyemprotan 3 cm dari luka
- Gel polyhexanide betaine (PHMB-betaine) merupakan gel yang mengandung bahan aktif 0.1% polyhexanide dan 0.1% betaine (Prontosan®) yang akan diaplikasikan pada luka 1x/hari (setiap 24 jam) dengan lapisan tipis 3 – 4 mm dan menutupi luka
- Penyembuhan luka adalah proses regenerasi dan reparasi jaringan yang rusak melalui 4 fase yakni fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Penilaian penyembuhan luka diukur mulai hari 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 dilakukan menggunakan kamera digital dan pengukuran diameter menggunakan mistar dan perangkat lunak analisis gambar ImageJ
 2. Respon granulasi adalah proliferasi kapiler pembuluh darah dan fibroblas dari jaringan kulit tikus Wistar yang mengalami proses penyembuhan, dengan skor :
 - 1 : respon ringan, jaringan granulasi 0-25%
 - 2 : respon sedang yakni jaringan granulasi 50-75%
 - 3 : respon lengkap yakni jaringan granulasi lebih 75%



Reepitelisasi adalah pembentukan kembali epitel pada saat proses penyembuhan luka, dengan skor:

- 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. Respon inflamasi adalah keberadaan PMN pada saat proses penyembuhan luka, dengan skor:
- 1 : Sel radang sedikit / ringan
 - 2 : Sel radang moderate / sedang
 - 3 : Sel radang padat / berat
- 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 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.

2.13 Pengolahan 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 uji Friedman ketika data yang digunakan tidak berdistribusi normal. Data perbandingan perlakuan meliputi kontrol negatif, gel PHMB-betaine, dan *gelatin spray*. Analisis data menggunakan uji *one way* ANOVA ketika data yang digunakan berdistribusi normal dan uji Kruskal-Wallis ketika data yang digunakan tidak berdistribusi normal.

