

Karya Akhir

**SKOR HISTOLOGI CD8⁺ PADA PROSES PENYEMBUHAN
LUKA TIKUS WISTAR : PENGARUH INFILTRASI
ANESTETIK LOKAL LEVOBUPIVAKAIN**



Oleh:
Dr. Imam Sudrajat
G3F001071

Pembimbing:
Dr.H. Abdul Lian, SpAn, KNA

BAGIAN ANESTESIOLOGI FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2005

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft.	4445/7/ FK/CI...
Tgl.	: 9 - 8 - 06

LEMBAR PENGESAHAN

Karya Akhir dengan judul:

**SKOR HISTOLOGI CD8⁺ PADA PROSES PENYEMBUHAN
LUKA TIKUS WISTAR : PENGARUH INFILTRASI
ANESTETIK LOKAL LEVOBUPIVAKAIN**

Diajukan sebagai salah satu syarat dalam menjalani

PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS ANESTESIOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG

S E M A R A N G, OKTOBER 2005

Telah diperiksa dan disetujui :

Pembimbing


Dr. Abdul Lian, SpAn, KNA

NIP. 140 073 471

Ketua Bagian
Anestesiologi FK UNDIP


Dr. Hariyo Satoto, SpAn, K

NIP. 140 096 999



Ketua Program Studi
Anestesiologi FK UNDIP


Dr. Uripno Budiono, SpAn, K

NIP. 140 098 893

KATA PENGANTAR

Bismillaahirrohmaanirrohiim.

Puji syukur Alhamdulillahirobbil 'aalamiin kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya kami dapat menyelesaikan penelitian ini.

Penelitian ini kami lakukan dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan dalam menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bidang Anestesiologi di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang.

Atas kesempatan, bantuan, dorongan dan bimbingan yang diberikan kepada kami selama melakukan penelitian dan menyelesaikan karya akhir ini, maka pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada yang terhormat :

1. Prof. Dr. Kabulrachman, Sp KK, K

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

2. Dr. H. Gatot Suharto, M.Kes. MMR

Direktur Utama RSUP Dr. Kariadi Semarang.

3. Dr. Hariyo Satoto, SpAn, K

Ketua Bagian Anestesiologi FK UNDIP/ RSUP Dr. Kariadi Semarang

4. Dr. Uripno Budiono, SpAn, K

Ketua Program Studi Bagian Anestesiologi FK UNDIP Semarang

5. Dr. Abdul Lian, SpAn, KNA

Pembimbing karya akhir ini

6. Dr. Edi Dharmana, Phd

Pembimbing Tesis S2

7. Prof. Dr. Soenarjo, SpAn, KIC
Guru Besar Anesthesiologi FK UNDIP Semarang
8. Seluruh Staf Pengajar Bagian Anesthesiologi FK UNDIP Semarang.
9. Seluruh Staf Pengajar Bagian Patologi Anatomi FK UNS Surakarta
10. Seluruh Karyawan / karyawan / karyawati Bagian Patologi Anatomi FK UNS Surakarta.
11. Seluruh Karyawan / karyawan / karyawati Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM
Yogyakarta
12. Seluruh teman sejawat residen Bagian Anesthesiologi FK UNDIP Semarang.
13. Semua pihak yang telah membantu kami yang tidak mungkin disebutkan satu
persatu disini.

Kami menyadari bahwa karya akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu besar harapan kami untuk mendapatkan kritik dan saran demi perbaikan sehingga bisa bermanfaat bagi perkembangan di bidang anestesi.

Akhirnya kepada semua pihak kami mohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan dan kekhilafan baik yang sengaja maupun yang tidak yang mungkin kami perbuat selama menjalani pendidikan di Bagian Anesthesiologi FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Semarang, Oktober 2005.

Peneliti,

Imam Sudrajat

ABSTRACT

Background : Pain control will result immune response which makes the wound healing process becomes better. Infiltration of local anesthetic around the wound can removed pain. Levobupivacaine is a local anesthetic with long duration of work. One of important immune system that participate on the wound healing is lymphocyte CD8⁺ as down regulating wound healing.

Objective : The aim of this study was to analyze the relation between infiltration of levobupivacaine as a local anesthetic and CD8⁺ histoscore.

Method : This study was laboratory experimental study designed as "Randomized Post test only control group design". Ten Wistar mice was divided into two groups, 5 mice randomized for each group. Group 1, mice with 2 cm incision without levobupivacaine infiltration. Group 2, mice with 2 cm incision and levobupivacaine infiltration every 8 hours for 24 hours. Detection of CD8⁺ was performed immunohistochemically by the use of monoclonal antibody and the staining was scored by histoscore system, taking from the 5th day biopsy tissue. Statistical analysis were performed by independent samples T-test.

Results : Characteristic data was not differ significantly between two groups. This study showed CD8⁺ histoscore between 2 groups with and without levobupivacaine was significant different ($p=0,023$; $p<0,05$). Group 1 had higher mean (5,92) than group 2 (4,96). It showed that in samples wound incision with Levobupivacain infiltration had lower CD8⁺ histoscore than group without Levobupivacain infiltration .

Conclusion : Administration of local anesthetic infiltration around the wound was decreasing CD8⁺ histoscore.

Keywords : local anesthetic, levobupivacain, wound healing, histoscore, CD8⁺

ABSTRAK

Latar belakang : Kontrol terhadap Nyeri akan meningkatkan respon imun dalam penyembuhan luka sehingga penyembuhan luka lebih baik. Salah satu cara mengontrol nyeri dapat menggunakan infiltrasi anestetik lokal disekitar luka. Levobupivakain merupakan obat anestetik lokal dengan durasi panjang. Sistem imun yang memegang peran penting dalam penyembuhan luka salah satunya adalah CD8⁺. CD8⁺ merupakan *downregulating wound healing*.

Tujuan : Menganalisa hubungan pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain di sekitar luka dengan skor histologi CD8⁺.

Metode : Dilakukan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain "*Randomized Post test only control group design*", pada 10 ekor tikus Wistar. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua kelompok secara acak masing masing 5 ekor. Kelompok 1, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, disuntik tiap 8 jam selama 24 jam tanpa diberikan infiltrasi levobupivakain. Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain tiap 8 jam selama 24 jam. Kandungan CD8⁺ disekitar luka insisi dinilai dengan skor histologi dari preparat yang dilakukan pengecatan secara imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal, yang diambil dari biopsi jaringan pada hari ke 5. Metode perhitungan statistik menggunakan *independent samples T - test*.

Hasil : Data karakteristik pada tikus Wistar berbeda tidak bermakna pada kedua kelompok. Terdapat penurunan yang signifikan terhadap skor histologi CD8⁺ ($p < 0,05$) pada kelompok 2 dibanding kelompok 1.

Kesimpulan : Infiltrasi anestetik lokal Levobupivacain disekitar luka terbukti dapat mengurangi jumlah skor histologi CD8⁺. Karena perannya sebagai *downregulating wound healing*, penurunan CD8⁺ diharapkan mencerminkan perbaikan luka.

Kata kunci : Anestetik lokal, levobupivakain, penyembuhan luka, skor histologi, CD8⁺

DAFTAR ISI

ISI	Halaman
LEMBAR JUDUL -----	i
LEMBAR PENGESAHAN -----	ii
KATA PENGANTAR -----	iii
ABSTRACK -----	v
ABSTRAK -----	vi
DAFTAR ISI -----	vii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah -----	1
1.2 Rumusan Masalah -----	3
1.3 Tujuan Penelitian -----	3
1.4 Manfaat Penelitian -----	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Levobupivakain -----	5
II.2 Patofisiologi Nyeri -----	6
II.3 Proses Penyembuhan Luka -----	9
II.4 Pengaruh Pemakaian Anestetik Lokal Pada Penyembuhan Luka ---	16
II.5 Peran Limfosit CD8 ⁺ pada penyembuhan luka -----	18
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
III.1 Kerangka Teori -----	21
III.2 Kerangka Konsep -----	22
III.3 Hipotesis -----	22

BAB IV	METODOLOGI PENELITIAN	
IV.1	Rancangan Penelitian -----	23
IV.2	Sampel Penelitian -----	23
IV.3	Waktu dan Lokasi Penelitian -----	24
IV.4	Variabel Penelitian -----	25
IV.5	Bahan dan Alat Penelitian -----	27
IV.6	Pelaksanaan Penelitian -----	28
IV.7	Alur Kerja -----	30
IV.8	Prosedur Pemeriksaan -----	30
IV.9	Cara Pengumpulan Data -----	32
IV.10	Analisis Data -----	32
BAB V	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	
V.1	Hasil Penelitian -----	33
V.2	Analisa Data -----	33
BAB VI	PEMBAHASAN -----	35
BAB VII	KESIMPULAN DAN SARAN	
VII.1	Kesimpulan -----	40
VII.2	Saran -----	40
DAFTAR PUSTAKA	-----	41
LAMPIRAN	-----	44

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang masalah

Penyembuhan luka merupakan proses kompleks dan dinamis dari perbaikan struktur sel dan jaringan. Penyembuhan luka melibatkan berbagai proses dengan urutan : hemostasis, inflamasi akut, regenerasi sel parenkim, migrasi dan proliferasi sel parenkim, sintesis protein *extra cellular matrix* (ECM), remodeling jaringan ikat dan komponen parenkim, kolagenasi dan akuisisi kekuatan luka^{1,2}. Pembagian secara garis besar meliputi fase inflamasi, proliferasi dan remodeling³.

Terdapat faktor sistemik dan lokal yang mempengaruhi penyembuhan luka. Salah satu faktor sistemik yang berperan adalah hormon glukokortikoid. Hormon ini mempunyai efek anti inflamasi, supresi netrofil, menghambat pembentukan fibroblas dan mengganggu sintesis kolagen¹. Elenkov dkk melaporkan bahwa glukokortikoid, katekolamin, histamin akan menyebabkan supresi imunitas seluler dan respons imun humoral⁴. Webster dkk melaporkan *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH) berperan sebagai pengatur reaksi *Hypothalamic Pituitary Adrenal* (HPA) sebagai respon tubuh terhadap stres. CRH akan menekan sistem imun tidak langsung melalui glukokortikoid dan atau mekanisme sistem simpatis, faktor inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α , *Interleukin* (IL-1), IL-6 memacu CRH dan atau sekresi vasopresin sebagai pencegah inflamasi yang berlebihan^{4,5}.

Pembedahan menimbulkan respon stres berupa peningkatan sekresi hormon katabolik yaitu glukokortikoid, hipermetabolisme, aktivasi sistem otonom, peningkatan

kerja jantung, rasa nyeri, gangguan terhadap paru, saluran cerna, gangguan sistem koagulasi, fibrinolitik dan imunosupresi⁶.

Pedersen mengurangi respon stres pembedahan dengan teknik pembedahan non invasif, penggunaan analgetik opioid dan blok saraf. Cara ini mampu menurunkan katabolisme protein, gangguan paru, mengurangi pelepasan katekolamin, kortisol dan glukosa⁶. **Bardram** melaporkan teknik laparoskopi, anestesi ekstradural, nutrisi dini, mobilisasi dini, dan analgetik adekuat terbukti mampu mengurangi respon stres⁷.

Sel T atau limfosit T terdiri dari T helper, T supresor dan T sitotoksik, masing-masing dibedakan karena mempunyai fungsi yang berbeda dan mengekspresikan antigen permukaan yang karakteristik dan berkorelasi dengan stadium differensiasi di timus. $CD8^+$ (*Cluster of differentiation antigen* atau *cluster designation*) merupakan subset sel T dapat merupakan sel T penekan dan sitotoksik^{8,9,10,11}. Pada beberapa penelitian, dalam proses penyembuhan luka $CD8^+$ bersama-sama $CD4^+$ turut mengatur proses penyembuhan luka. $CD8^+$ merupakan *downregulating wound healing* sedangkan $CD4^+$ merupakan *upregulating wound healing*^{12,13}. Peningkatan rasio $CD4^+/CD8^+$ menggambarkan perbaikan proses penyembuhan luka^{12,13}.

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat mengurangi intensitas nyeri, sehingga menurunkan sekresi hormon glukokortikoid^{1,2}. Penggunaan bupivakain 0,25% dosis tunggal dengan pemberian infiltrasi dapat mengurangi nyeri selama 24 jam pasca operasi¹⁴. **Bultmann** melaporkan infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal mampu mengurangi nyeri pasca operasi dan mengurangi kebutuhan analgetik opioid. Penggunaan konsentrasi 0,25% lebih efektif dibandingkan 0,5%, namun berbeda tidak bermakna dengan 0,125%^{15,16}. Penggunaan infiltrasi bupivakain pada dosis berulang dengan

menyisipkan kateter subkutan pada ujung luka terbukti efektif mengurangi nyeri, tanpa komplikasi infeksi dan inflamasi lokal^{16,17}.

Pemakaian anestetik lokal bupivakain topikal dan sistemik pada luka akan menghambat ekstrasvasasi plasma, mengurangi nyeri, mengurangi komplikasi infeksi, alergi, tanpa peradangan lokal, efek bakterostatik dan antimikroba dan proses penyembuhan luka baik^{17,18,19}.

I.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

Apakah infiltrasi anestetik lokal levobupivakain menurunkan skor histologi limfosit CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka pada binatang percobaan.

I.3. Tujuan penelitian

I.3.1. Umum

Membuktikan efek infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dalam proses penyembuhan luka berupa penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ pada binatang percobaan.

I.3.2. Tujuan khusus

Membuktikan terdapatnya penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ di sekitar daerah luka pada kelompok yang diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka dibanding kelompok yang tidak diberikan infiltrasi levobupivakain.

I.4. Manfaat penelitian

- Penelitian ini diharapkan dapat menjadikan sumbangan teori untuk mengungkap mekanisme kesembuhan luka akibat infiltrasi anestetik lokal levobupivakain.
- Aplikasi klinis berupa infiltrasi levobupivakain disekitar luka dapat menjadi alternatif dalam mempercepat proses penyembuhan luka.
- Sebagai landasan penelitian selanjutnya baik dalam penelitian terhadap obat anestetik lokal, profil histologi maupun hubungan keduanya dalam proses penyembuhan luka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1. Levobupivakain

Levobupivakain adalah obat anestetik lokal golongan amida (CONH-) dengan atom karbon asimetrik dan isomer Levo(-). Levobupivakain memiliki pKa 8,1. Peningkatan pH akan meningkatkan molekul basa bebas, molekul bebas melintasi membran akson dengan mudah dan beraksi lebih cepat. Sebaliknya pada pH rendah sedikit molekul basa bebas melintasi membran akson dengan aksi farmakologis lebih lambat, contoh pada infeksi lokal. Ikatan dengan protein lebih dari 97% terutama pada asam α 1 glikoprotein dibandingkan pada albumin. Pada pasien hipoproteinemi, sindrom nefrotik, kurang kalori protein, bayi baru lahir dengan sedikit kadar protein, menyebabkan kadar obat bebas dalam plasma tinggi sehingga efek toksik terlihat pada dosis rendah^{16,17}. Metabolisme obat terjadi di hepar oleh enzim sitokrom P450. Bersihan obat dalam plasma akan menurun bila terjadi gangguan fungsi hepar²⁰.

Mekanisme aksi levobupivacain sama dengan bupivakain atau obat anestetik lokal lain. Apabila *minimum local analgesic concentration* (MLAC) tercapai, obat akan melingkupi membran akson, menutup kanal natrium berakibat hambatan permeabilitas kanal natrium, sehingga tidak tercapai ambang aksi potensial dan menghambat depolarisasi. Terjadi hambatan transmisi impuls saraf^{20,22}. Levobupivakain menimbulkan depresi jantung lebih sedikit dibandingkan bupivakain dan ropivakain. Gejala toksisitas sistem saraf pusat pada bupivacain terjadi pada dosis lebih rendah dibandingkan levobupivakain²¹.

Levobupivakain dapat digunakan untuk epidural, subaraknoid, blok saraf perifer, infiltrasi lokal, analgesi obstetri, pengelolaan nyeri setelah operasi. Lama kerja obat pada pemberian infiltrasi adalah 240-480 menit. Dosis tunggal maksimum yang digunakan 2 mg/kg bb dan 5,7 mg/kg bb (400 mg) dalam 24 jam^{20,22}. Dosis infiltrasi maksimal 175 mg dosis tunggal²². Efek samping obat diantaranya hipotensi, bradikardi, mual, muntah, gatal, nyeri kepala, pusing, telinga berdenging, gangguan buang air besar dan kejang²².

II. 2. Patofisiologi nyeri

Nyeri merupakan gejala umum dari penyakit, bersifat subyektif dengan gejala psikologis bervariasi. Nyeri merupakan suatu pengalaman hidup kompleks, menyatu dengan emosi dan pikiran yang berproses menghasilkan pengalaman nyeri²³. Nyeri merupakan sensasi tidak nyaman²⁴, pengalaman sensorik dan emosional tidak menyenangkan akibat terjadinya kerusakan jaringan²⁵.

Luka irisan bedah menimbulkan nyeri klinis akibat kerusakan jaringan. Proses inflamasi terlokalisir, serta hilang bila inflamasi jaringan sembuh. Nyeri merupakan reaksi sensoris sistem nosiseptif mendadak dan merupakan sinyal mekanisme pertahanan tubuh²⁵. Kerusakan di jaringan kulit atau jaringan perifer menyebabkan terlepasnya mediator kimiawi dan mensensitisasi nosiseptor sehingga terjadi penurunan nilai ambang nyeri. Mediator bradikinin, substansi P turut mempengaruhi dalam proses terjadinya impuls nosiseptif²⁶. Tahap proses terjadinya nyeri sebagai berikut :

II.2.1 Transduksi

Kerusakan jaringan menyebabkan terlepasnya substansi kimiawi endogen yaitu :

bradikinin, substansi P, serotonin, histamin, ion H, ion K, prostaglandin.. Kerusakan membran sel akan melepaskan senyawa phospholipid yang mengandung asam arakhidonat dan akibat pengaruh *prostaglandin endoperoxide synthase* akan membentuk mediator inflamasi sekaligus mediator nyeri yaitu tromboksan, prostaglandin, prostasiklin. Kombinasi senyawa ini menimbulkan vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler lokal. Stimulasi dan sensitisasi terus menerus menyebabkan hiperalgesia, alodina dan berakhir sesudah terjadi penyembuhan. Lekotrien D4 melepas substansi P, lekosit *polymorphonuclear* (PMN) melepaskan lekotrien B4. Keduanya berperan dalam sensitisasi nosiseptor. Pada inflamasi, sistem imun akan melepaskan sitokin proinflamasi yaitu : IL-1 β , IL-6, TNF α , *Interferon* (IFN) γ , yang akan berinteraksi dengan saraf perifer melalui mediator. Platelet dan sel mast melepas serotonin yang langsung mengaktifkan atau mensensitisasi nosiseptor dan menimbulkan hiperalgesia. Proses transduksi dapat dihambat oleh obat anti inflamasi non steroid^{27,28,29}.

H.2.2. Transmisi

Impuls akan ditransmisi oleh serabut aferen nosiseptif primer lewat radiks posterior menuju kornu posterior medula spinalis. Serabut perifer terdiri dari serabut sensorik, motorik somatik, motorik otonomik. Serabut aferen primer nosiseptif khusus yang menghantarkan impuls nosiseptif terdapat di kulit, periosteum, sendi, ligamen, otot dan visera. Serabut yang menghantarkan impuls nosiseptif hanya serabut A δ dan C, yang tidak bermielin atau bermielin halus. Stimulus yang dapat direspon adalah stimulus mekanik, mekanotermal dan polimodal. Impuls di neuron

aferen primer melewati radiks posterior menuju medula spinalis pada berbagai tingkat dan membentuk badan sel dalam ganglia radiks posterior. Serabut aferen primer berakhir pada lamina I, substansia gelatinosa (lamina II, III), lamina V dan lamina IV. Impuls ditransmisi ke neuron sekunder dan masuk ke traktus spinothalamikus lateralis. Korne posterior berfungsi sebagai jalur masuk desendens dari otak untuk melakukan modulasi impuls dari perifer. Impuls selanjutnya disalurkan ke daerah somatosensorik di korteks serebri. Proses transmisi dapat dihambat oleh obat anestetik lokal^{29,30}.

II.2.3. Modulasi

Impuls setelah mencapai korne posterior medula spinalis akan mengalami penyaringan intensitas. Sistem pengendali modulasi ini adalah sistem gerbang kendali spinal atau *the gate control theory of pain*. Apabila impuls melebihi ambang sel T maka akan melewati sistem kendali gerbang spinal dan diteruskan ke pusat supraspinal di korteks somatosensoris. Substansi yang bekerja sebagai modulator penghambat nyeri di medula spinalis yaitu dinorfin, enkefalin, noradrenalin, dopamin, serotonin dan *gamma amino butyric acid* (GABA). Sedangkan substansi yang meningkatkan nyeri yaitu substansi P, *adenosin triphosphate* (ATP) dan asam amino eksitatori^{27,29,30}.

II.2.4. Persepsi

Hasil proses integrasi pada pusat kognisi, afeksi dan impuls nyeri yang dirasakan individu dan bagaimana cara individu menghadapinya^{27,29,30}.

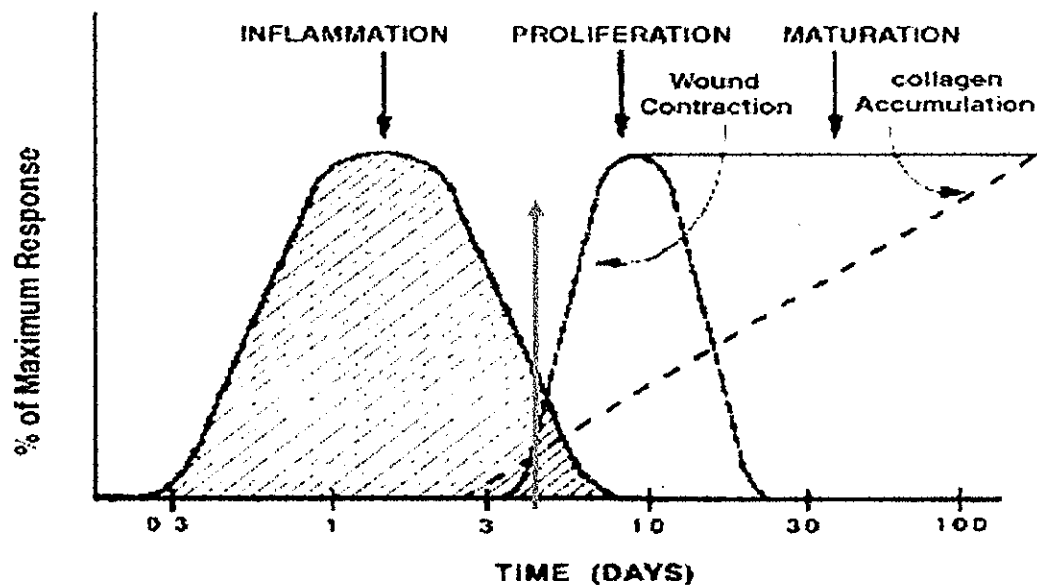
Nyeri sebagai mekanisme protektif bersifat subyektif dalam derajat, kualitas nyeri, individu dan periode²⁹. Pengelolaan nyeri tidak adekuat akan berakibat : penurunan gerak pernapasan, kemampuan batuk, ketakutan mobilisasi, kecemasan, peningkatan pelepasan katekolamin. Katekolamin yang tinggi berefek terutama terhadap pemanjangan fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin³¹. Bardram melaporkan 15 pasien dengan resiko tinggi, usia 81 tahun yang menjalani operasi reseksi kolon dengan teknik laparoskopi, teknik anestesia ekstradural, nutrisi dini, mobilisasi dini dan analgetik opioid mampu mengurangi lama rawat inap di rumah sakit tanpa komplikasi kelainan jantung, tromboemboli, infeksi dan kelelahan³².

II. 3. Proses penyembuhan luka

Sitokin bersama faktor pertumbuhan seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) aktif berperan melaksanakan proses penyembuhan. Beberapa macam sitokin terlibat dalam proses penyembuhan yaitu : TNF α , IL 1, IL 6, IL 8 dan *transforming growth factor* (TGF) β 1. Sesudah disekresi oleh sel T, sel B, makrofag, platelet, sel endotel, fibroblas, plasenta, tulang dan ginjal segera melepas dimer biologis aktif dari komponen molekul laten. TGF β juga menstimulasi kemotaksis fibroblas, inhibisi produksi kolagen dan fibronektin, menghambat degradasi kolagen karena peningkatan atau penurunan inhibitor protease. Pada inflamasi kronis TGF β terlibat dalam pertumbuhan fibrosis^{1,8}.

Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan sitokin yaitu PDGF, FGF, TGF β dan IL1, IL 4, *immunoglobulin G1*

(IgG1) yang diproduksi oleh lekosit dan limfosit pada saat sintesis kolagen. Pada proses remodeling jaringan faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF β 1 dan IL 1, TNF akan menstimulasi sintesis kolagen, memodulasi sintesis dan aktivasi *metaloproteinase*, suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen ECM. Hasil sintesis dan degradasi ECM merupakan remodeling kerangka jaringan ikat. Struktur ini merupakan gambaran pokok penyembuhan luka pada inflamasi kronis. Proses degradasi kolagen dan protein ECM lain dilaksanakan oleh *metaloproteinase* yang terdiri atas kolagenase, gelatinase, yang diproduksi oleh : fibroblas, makrofag, netrofil, sel sinovial dan sel epitel. Untuk melepaskan perlu stimulus tertentu yaitu PDGF, FGF, IL1, TNF α , fagosit dan stres fisik^{1,3}.



Gambar 2.1 : Skema fase penyembuhan luka (dimodifikasi dari: Wound Healing. <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm>)

II.3.1. Fase inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada hari 0 – 5. Kerusakan sel memicu reaksi vaskuler kompleks pada jaringan ikat dengan pembuluh darah. Reaksi ini berguna sebagai proteksi terhadap jaringan yang mengalami kerusakan untuk tidak mengalami infeksi dan meluas tak terkendali. Proses inflamasi sangat erat berhubungan dengan penyembuhan luka. Inflamasi dan penyembuhan luka cenderung menimbulkan nyeri. Tanpa adanya inflamasi tidak akan terjadi proses penyembuhan dan luka akan tetap menjadi sumber nyeri¹. Fase inflamasi dimulai segera setelah terjadi luka. Luka mengakibatkan kerusakan struktur jaringan dan perdarahan. Darah akan mengisi jaringan cedera dan terjadi degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor Hageman. Terjadi pengaktifan komplemen kinin, kaskade pembekuan dan pembentukan plasmin. Keadaan ini memperkuat sinyal dari daerah terluka, yang tidak saja mengaktifkan pembentukan bekuan yang menyatukan tepi luka tetapi juga akumulasi dari beberapa mitogen dan menarik zat kimia ke daerah luka. Pembentukan kinin dan prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas dari pembuluh darah. Hal ini menyebabkan edema dan menimbulkan pembengkakan dan nyeri. Sel PMN terutama netrofil adalah sel pertama yang menuju ke daerah luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncak pada 24–48 jam. Netrofil memfagositosis dan mencerna organisme patologis dan sisa jaringan. Bila tidak terjadi infeksi, netrofil berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga^{3,7}.

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Muncul

pertama 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3. Makrofag berumur dan tetap ada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T dengan jumlah bermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Makrofag dan limfosit T penting keberadaanya pada penyembuhan luka normal. Makrofag memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas zat biologis aktif. Zat ini mempermudah terbentuknya sel inflamasi tambahan yang membantu makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan. Makrofag melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan jaringan granulasi³³.

II.3.2.Fase proliferasi

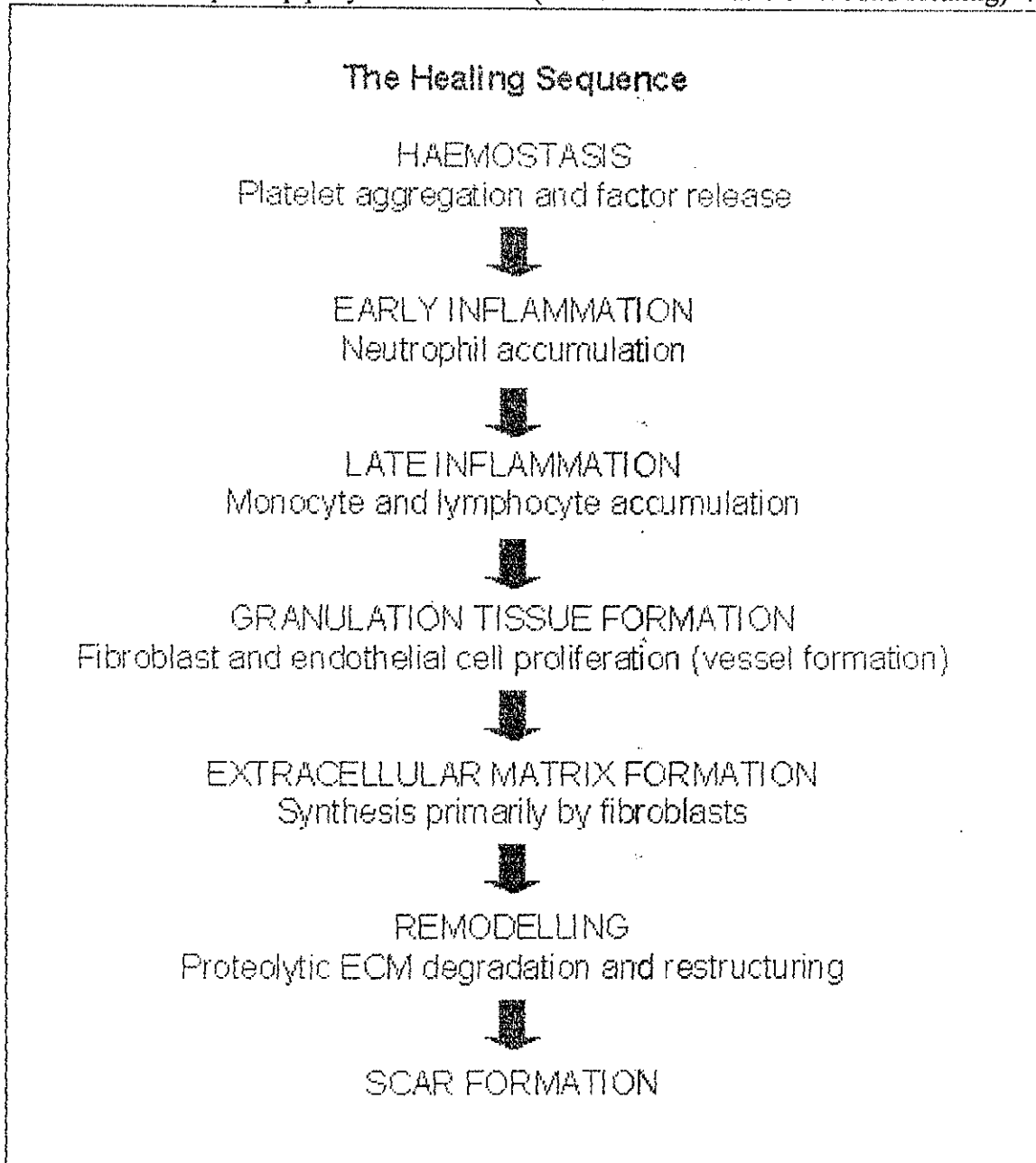
Fase ini terjadi pada hari ke 3 – 14. Fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, bersamaan dengan timbulnya kapiler baru tertanam dalam jaringan longgar ekstra seluler dari matriks kolagen, fibronectin dan asam hialuronik. Fibroblas muncul pertama kali secara bermakna pada hari ke 3 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Peningkatan jumlah fibroblas pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi. Fibroblas ini berasal dari sel-sel mesenkimal lokal yang berhubungan dengan lapisan adventisia, pertumbuhannya dipacu oleh sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit. Fibroblas merupakan elemen utama pada proses perbaikan untuk pembentukan protein struktural. Fibroblas juga memproduksi kolagen dalam jumlah

besar, kolagen ini berupa glikoprotein berantai tripel, unsur utama matriks ekstraseluler yang berguna membentuk kekuatan pada jaringan parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke 3 setelah luka, meningkat sampai minggu ke 3. Kolagen terus menumpuk sampai tiga bulan. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia^{1,3}.

Revaskularisasi dari luka terjadi secara bersamaan dengan fibroplasia. Tunas kapiler tumbuh dari pembuluh darah yang berdekatan dengan luka. Pada hari ke 2 sel endotelial pembuluh darah mulai bermigrasi sebagai respon stimulasi angiogenik. Proses ini terjadi dari kombinasi proliferasi dan migrasi. Sitokin merupakan stimulan potensial pada neovaskularisasi, termasuk *acidic fibroblast growth factor* (aFGF), *epidermal fibroblast growth factor* (eFGF), bFGF dan TGF $\alpha \beta$ ^{1,3,7}.

Pada permukaan luka juga terjadi pembentukan epitel beberapa jam setelah luka. Sel epitel tumbuh dari tepi luka, bermigrasi ke jaringan ikat yang masih hidup. Epidermis segera mendekati tepi luka dan menebal dalam 24 jam setelah luka. Ikatan sel basal dari dermis di dekatnya menjadi longgar. Sel basal membesar dan bermigrasi ke permukaan luka. Sel basal membelah cepat dan bermigrasi dengan pergerakan menyilang satu dengan yang lain sampai defek yang terjadi tertutup semua. Ketika sudah terbentuk jembatan, sel epitel berubah bentuk menjadi lebih kolomner dan meningkat aktifitas mitotiknya. Proses reepitelisasi sempurna terjadi kurang dari 48 jam pada luka sayat yang tepinya saling berdekatan dan memerlukan waktu lebih panjang pada luka dengan defek lebar. Stimulator reepitelisasi ini belum diketahui secara lengkap. Faktor yang diduga berperan adalah EGF, TGF β , bFGF, PDGF dan *insulin like growth factor* (IGF λ)^{1,3,7}.

Tabel.2.1. Tahap-tahap penyembuhan luka (The Scientific Basis of Wound Healing)³⁶.



II.3.3. Fase maturasi

Fase ini berlangsung dari hari ke 7 sampai dengan 1 tahun. Segera setelah matriks ekstrasel terbentuk dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronectin. Terjadi migrasi sel substratum dan pertumbuhan sel ke dalam,

penumpukan kolagen oleh fibroblas. Terbentuk asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar berperan dalam pembentukan matriks ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentuk matriks. Serabut kolagen pada permulaan terdistribusi acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel fibril yang secara perlahan menyebabkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan dan kekuatan ketegangan. Sesudah 5 hari periode jeda, dimana saat ini bersesuaian dengan pembentukan jaringan granulasi awal dengan matriks sebagian besar tersusun dari fibronektin dan asam hialuronidase, terjadi peningkatan cepat dari kekuatan tahanan luka karena fibrogenesis kolagen. Pencapaian kekuatan tegangan luka berjalan lambat. Sesudah 3 minggu kekuatan penyembuhan luka mencapai 20% dari kekuatan akhir. Bagaimanapun, kekuatan akhir luka tetap lebih lemah dibanding dengan kulit utuh, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh^{1,3}.

Pengembalian kekuatan tegangan berjalan perlahan karena deposisi jaringan kolagen terus menerus, remodeling serabut kolagen membentuk bundel kolagen lebih besar dan perubahan dari *cross linking* inter molekuler. Remodeling kolagen selama pembentukan jaringan parut tergantung pada proses sintesis dan katabolisme kolagen. Degradasi kolagen pada luka dikendalikan oleh enzim kolagenase. Kecepatan sintesis kolagen mengembalikan luka ke jaringan normal terjadi dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. Remodeling aktif jaringan parut akan terus berlangsung sampai 1 tahun dan tetap berjalan dengan lambat seumur hidup^{1,3,7}. Pada proses remodeling terjadi reduksi secara perlahan pada vaskularisasi dan selularitas jaringan yang

mengalami perbaikan sehingga terbentuk jaringan parut kolagen yang relatif avaskuler dan aseluler^{1,3}.

Tabel 2.2. Peran sel pada fase penyembuhan luka

FASE	SEL-SEL YANG BERPERAN
Proses koagulasi	Platelet
Inflamasi	Platelet Netrofil
Migrasi / proliferasi / granulasi	Platelet Makrofag Lymfosit Fibroblas Sel epithelial Sel endotel

II. 4. Pengaruh pemakaian anestetik lokal pada penyembuhan luka

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat mengurangi intensitas nyeri dengan menghambat jalur transmisi impuls nyeri. Infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal di sekitar luka irisan dapat mengurangi nyeri pasien yang menjalani seksio sesaria 24 jam pasca operasi⁷. Infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal di sekitar luka telah terbukti mampu mengurangi nyeri pasca operasi dan mengurangi kebutuhan analgetik opioid. Penggunaan konsentrasi 0,25% lebih efektif dibandingkan 0,5%, namun berbeda tidak bermakna dengan 0,125%^{5,34}. Penggunaan infiltrasi bupivakain pada dosis berulang dengan menyisipkan kateter epidural di bawah luka, efektif mengurangi nyeri, tanpa komplikasi infeksi, inflamasi lokal dan efek samping mual muntah¹⁴.

Nyeri secara langsung dapat menimbulkan stres pada sistem imun, atau lewat peptida hipotalamus, pituitaria dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis. Substansi yang merupakan penghubung antara kedua sistem, otak dan sistem imun,

adalah CRH, *Adreno Corticotropine Hormone* (ACTH), β endorfin, substansi P, dan lain-lain. Otak memberikan respon terhadap stres dengan melepas CRH yang dilakukan oleh *Paraventricularis Nukleus* (PVN), dan diperkirakan berperan sebagai mediator primer dari beberapa perubahan yang diinduksi nyeri. Perubahan tersebut termasuk aktivasi aksis HPA (*Hipotalamus-Pituitaria-Adrenal*) dan aksis SAM (*sympathetic adrenal medullary*). Pada nyeri hebat sinyal berjalan melewati aksis HPA, menimbulkan disregulasi sistem imun sehingga terjadi penurunan ketahanan tubuh. Sinyal tersebut juga melewati aksis SAM, menimbulkan gejala patofisiologis berupa respon otonom, yaitu suatu respon biologis yang diekspresikan dalam bentuk peningkatan tekanan darah, nadi, respirasi, keringat dingin dan spasme otot. Respon ini disebut sebagai respon darurat¹.

Impuls nyeri yang dihambat oleh anestetik lokal pada jalur transmisi bersifat lebih terkendali, tidak bersifat darurat. Otak akan memproyeksikan impuls ini dan memberikan sinyal ke hipokampus, amigdala, dan hipotalamus. Dalam sel PVN hipotalamus terjadi aktivasi dan berespon dengan melepaskan CRH yang tidak bersifat darurat. Selanjutnya CRH mengaktifkan kelejar pituitaria untuk melepaskan ACTH dan β endorfin masuk ke sirkulasi darah. Hormon CRH melalui serabut preganglioner simpatis mengaktifkan medula adrenal untuk melepaskan katekolamin dalam kadar normal sehingga tidak menimbulkan respon stres berlebihan. Hormon ACTH sampai ke adrenal, mengaktifkan korteks adrenal dan melepaskan glukokortikoid (kortisol) dalam dosis tidak tinggi. Kadar kortisol yang tidak tinggi tersebut tidak lagi menimbulkan supresi atau inhibisi tetapi berubah menimbulkan stimulasi atau eksitasi^{1,35}. *Cluster Differentiation* (CD4) akan terstimulasi kortisol menjadi lebih banyak dan aktif, begitu pula *T Helper* (TH1), TH2 dan TH3, semuanya menjadi lebih aktif. Peningkatan aktivitas sel B dibantu juga

oleh TH2 yang mendapat stimulasi dari TH1 karena TH2 mengandung IL-2R dan berkaitan dengan IL-2 yang disekresi oleh TH1. *Interferon* γ yang disekresi TH1 jumlah dan aktivitasnya juga meningkat, sitokin ini bekerja dalam sel B dan aktif menginduksi perubahan *immunoglobulin* (Ig) menjadi *immunoglobulin* G1 (IgG1), suatu isotipe Ig yang berikatan erat dengan reseptor dari permukaan makrofag, sehingga dapat bekerja sebagai opsonin yang poten^{1,35}. Peran TH3 selain mengaktifkan pertahanan mukosa, juga lebih menonjol peran biologis TGF β yaitu meningkatkan ECM, meningkatkan kolagenasi dan mempercepat remodeling untuk penyembuhan luka. Pada saat yang sama makrofag aktif melepaskan beberapa sitokin untuk pertahanan tubuh dan penyembuhan jaringan yang rusak³⁵.

II.5. Peran Limfosit CD8⁺ pada penyembuhan luka

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Sistem imun terdiri dari sistem imun alamiah (*natural/innate*) dan didapat (*adaptive/acquired*). Sistem imun didapat terdiri atas pertahanan humoral/sel B dan pertahanan seluler/sel T. Sel-sel imunokompeten yang utama adalah limfosit T dengan berbagai subsetnya (CD4⁺ dan CD8⁺) dan limfosit B, masing-masing dapat dibedakan satu dari yang lain karena mempunyai fungsi yang berbeda dan mengekspresikan antigen permukaan (imunofenotip) yang karakteristik. Antigen permukaan ini mempunyai korelasi dengan stadium diferensiasi, karena itu disebut juga sebagai antigen diferensiasi (*cluster of differentiation / cluster designation* = CD). Sel T berdiferensiasi dalam kelenjar timus

sedangkan sel B berdiferensiasi dalam sumsum tulang dan organ limfoid perifer. Adapun yang berperan dalam sistem imun spesifik seluler adalah limfosit T atau sel T^{8,10,11}.

Limfosit T dapat dibagi menjadi dua subset mayor yaitu CD4⁺ (*Thelper cells*) dan CD8⁺ (*Teytotoxic cells*)³⁶. Molekul CD4⁺ dan CD8⁺ tidak menunjukkan persamaan struktur, namun dalam fungsinya keduanya menunjukkan homologi. CD4⁺ dan CD8⁺ masing-masing diekspresikan pada permukaan subset limfosit matang⁸.

Sel Th (*Thelper*) berperan menolong sel B dalam diferensiasi dan memproduksi antibodi. Untuk membentuk antibodi kebanyakan antigen T dependen harus dikenal lebih dahulu baik oleh sel T maupun oleh sel B. sel Th juga berpengaruh atas sel Tc dalam mengenal sel yang terinfeksi virus dan jaringan cangkok *allogenic*. Istilah sel *Tinducer* dipakai untuk menunjukkan aktivitas sel Th dalam mengaktifkan sel subset T lainnya. Sel Th juga melepaskan limfokin yang mengaktifkan makrofag sehingga dapat menghancurkan patogen yang dimakannya dan sel-sel lainnya⁹.

Sel Tc (sitotoksik) adalah limfosit yang berasal dari sel asal dalam sum-sum tulang. Sel tersebut matang dalam timus untuk mendapat reseptor spesifik terhadap fragmen antigen. Kebanyakan sel Tc adalah CD8⁺ dan hanya mengenal antigen yang berhubungan dengan MHC kelas I. Fungsi utamanya ialah mengeliminir sel yang terinfeksi virus. Sel Tc akan juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel seperti penolakan pada tranplantasi. Dalam keadaan tertentu dapat pula menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri. Mempunyai kemampuan untuk menghancurkan sel *allogeneic* dan sel sasaran yang mengandung virus^{8,9,10,11}.

Selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung, sel Tc juga menghasilkan gamma-interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke dalam

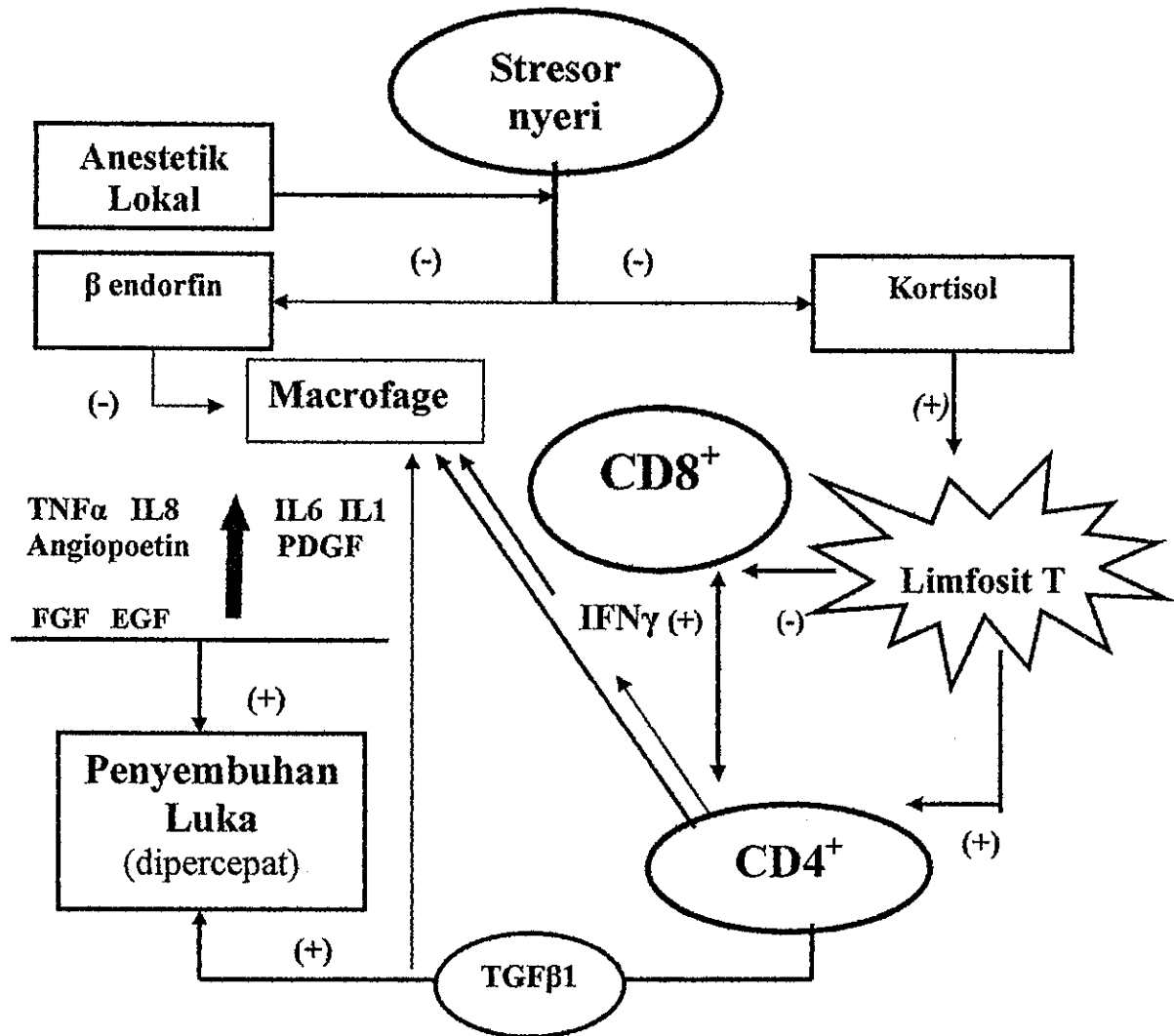
sel lain dimana membantu memperkecil penyebaran virus ke sel-sel lain yang berdekatan (kebal)^{8,9,11}.

Limfosit merupakan komponen yang berperan pada akhir inflamasi. Predominan merupakan limfosit T walau limfosit B juga ditemukan pada jaringan permukaan manusia. Pada hewan percobaan yang dilakukan deplesi limfosit T, terjadi penghambatan proses penyembuhan luka (Barbul, 1990). $CD4^+$ (sel Thelper) dan $CD8^+$ (sel Tsitotoksik), pembagian fungsinya mengikuti aturan dari keseimbangan respon imun. Terbukti hubungan yang relevan pada proses penyembuhan luka hewan percobaan, bahwa Tlimfosit $CD8^+$ menghambat penyembuhan luka dan Tlimfosit $CD4^+$ mendorong penyembuhan luka dalam model penyembuhan tikus *in vitro*³⁶. Dukungan terhadap percobaan ini berupa penelitian pada manusia selama satu minggu setelah pembedahan menemukan peningkatan level sel-sel $CD4^+$ dibandingkan dengan kenaikan jumlah sel-sel $CD8^+$ ditemukan dengan segera penutupan luka (Boyce et al, 2000)³⁷. Penelitian lain menunjukkan deplesi limfosit $CD4^+$ memperlihatkan penurunan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Sedangkan deplesi limfosit $CD8^+$ memperlihatkan kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Dapat disimpulkan bahwa deplesi limfosit T pada penyembuhan luka pada subset terdapat pengaturan yang berlawanan, yaitu $CD8^+$ merupakan *downregulating wound healing* sedangkan $CD4^+$ merupakan *upregulating wound healing*^{12,13}.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

III.1. Kerangka teori

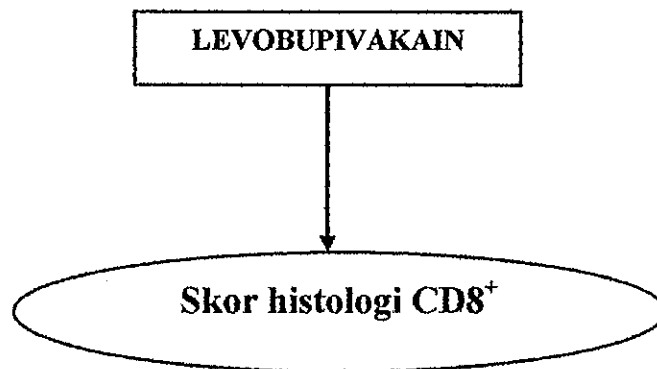


Gambar 2. Modifikasi dari penelitian Stephanus Mulyata untuk disertasi UNAIR Surabaya tahun 2002 : Mekanisme peningkatan kecepatan kesembuhan luka persalinan post partum; Paket Penyuluhan Kognitif dan Senam Prapersalinan Pada Primigravida, Mengurangi Cemas dan Nyeri Persalinan, Meningkatkan Skor Apgar Bayi, Serta Mempercepat Penyembuhan Luka Persalinan³⁷.

keterangan gambar

- ↑ : kenaikan kadar
- (+) : stimulasi / eksitasi
- (-) : menghambat / inhibisi
- : pengaruh
- CRF : *Corticotropin Releasing Factor*
- ACTH : *Adrenocorticotropic Hormon*
- CD : *Cluster Differentiation*
- IL : *Interleukin*
- PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*
- FGF : *Fibroblast Growth Factor*
- TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*
- TGF- β 1 : *Transforming Growth Factor Beta 1*
- EGF : *Epidermic growth factor*
- IFN γ : *Interferon gamma*
- PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

III.2. Kerangka konsep



III.3. Hipotesis

Pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain akan menyebabkan terjadi perubahan respon imun yang dicerminkan dengan menurunnya skor histologi CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka.

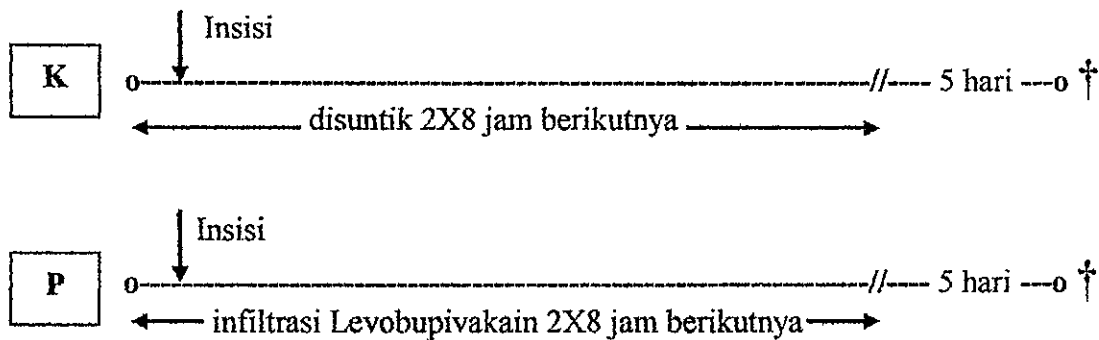
BAB IV
METODOLOGI PENELITIAN

IV.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain “*Randomized Post test only control group design*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua yaitu kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P), penjelasan sebagai berikut:

- K : Kelompok Kontrol, tikus Wistar yang dilakukan insisi sepanjang 2 cm, Disuntik disekitar luka, disuntik ulang 2X setiap 8 jam berikutnya.
- P : Kelompok Perlakuan, tikus Wistar yang dilakukan insisi sepanjang 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka, diinfiltrasi ulang 2X setiap 8 jam berikutnya.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



IV.2. Sampel penelitian

Hewan coba adalah tikus jenis Wistar yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta.

Kriteria inklusi:

- Tikus Wistar, keturunan murni
- Belum pernah digunakan untuk penelitian
- Jenis kelamin jantan
- Umur dua sampai dua setengah bulan
- Berat badan 250-300 gram.
- Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria eksklusi:

- Sakit (gerakan tidak aktif) selama masa adaptasi 7 hari
- Terlihat adanya tanda-tanda infeksi disekitar luka
- Mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*).

Besar sampel : menurut WHO untuk penelitian dengan hewan percobaan, tiap kelompok minimal 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 5 ekor tiap kelompok³⁸.

Randomisasi : 10 tikus dikelompokkan secara random menjadi dua kelompok yaitu:

- Kelompok kontrol (K) : 5 ekor
- Kelompok perlakuan (P) : 5 ekor

IV.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada tikus, proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta. Proses pembuatan preparat dan pewarnaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

IV.4. Variabel Penelitian

IV.4.1. Variabel bebas

Anestetik lokal levobupivakain 0,25%.

IV.4.2. Variabel tergantung

- Hasil pemeriksaan imunohistokimia antibodi monoklonal CD8⁺, yang dihitung berdasarkan skor histologi.

IV.4.3. Definisi operasional

1. Infiltrasi levobupivakain adalah pemberian suntikan suatu obat anestesi lokal yang mempunyai masa kerja panjang berupa larutan 0,5% Chirokain yang diencerkan menjadi larutan 0,25% disuntikan di sekitar luka $\pm 0,5$ cm dari tepi luka dengan spuit tuberkulin sepanjang luka insisi sampai kedalaman subkutis. Dilakukan jahitan sebanyak 5 jahitan sederhana setiap $\pm 0,5$ cm untuk menghilangkan celah antar luka.
2. Pemeriksaan imunohistokimia merupakan metode pemeriksaan pewarnaan jaringan berdasar kerja imunoenzym untuk memeriksa adanya antigen atau mencari lokasi antigen dalam spesimen (Warsito 1991). Imunohistokimia dilaksanakan berdasarkan pada interaksi antigen-antibodi yang terjadi antara marker sel CD8⁺ dengan antibodi primer. Deteksi yang digunakan adalah deteksi kromogenik berdasarkan warna yang timbul sebagai akibat reaksi ensimatis yang terjadi antara enzim HRP dengan substratnya.

Skor menggunakan skor histologi dengan menggunakan *software* OLYSIA tahun 2002 di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret. Interpretasi berupa perhitungan presentasi sel dan intensitas warna (*Leake, 2000*)

Presentasi : Skor 0 : tidak ada sel positif

1 : sel positif 1 – 25%

2 : sel positif 26 – 50%

3 : sel positif 51 – 75%

4 : sel positif 76 – 100%

Intensitas : Skor 0 : tidak terwarnai / negatif

1 : positif lemah

2 : positif sedang

3 : positif kuat

Skor = (IK x PK) + (IS x PS) + (IL x PL) + (IN x PN)

Dimana : I = intensitas

P = presentase

K = intensitas positif kuat

S = intensitas positif sedang

L = intensitas positif lemah

N = intensitas negatif

IV.5. Bahan dan alat penelitian

IV.5.1. Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah tikus Wistar dengan umur 2,5 sampai 3 bulan dan berat 250-300 gram. Tikus Wistar adalah salah satu galur ratus-ratus, hidup di benua Amerika. Banyak digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian di bidang kedokteran, pengobatan, dan kedokteran hewan.

Tikus jenis Wistar diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan standar dan minum secukupnya. Pakan standar yang diberikan adalah buatan laboratorium PAU Pangan dan Gizi UGM (Prof. Dr.Hastari,DVM., MSc) yang terdiri dari campuran bahan-bahan:

- Selulose (agar)	5%
- Lemak hewani	4,5%
- Kolesterol	0,5%
- Sukrose	20%
- Tepung jagung	40%
- Kasein	25%
- Vitamin/mineral	5%

IV.5.2. Bahan untuk eksisi-biopsi

- Inkubator 56⁰ C
- Mikrotom
- Kaca obyek dan penutup

IV.5.3. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia

- a) Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti CD8⁺*
- b) *Kit universal streptavidin-biotin*
- c) Pensil PAP
- d) *Waterbath*
- e) Tempat pewarnaan dan cucian
- f) Pipet serologi
- g) Kertas saring
- h) *Freezer*
- i) *Timer*
- j) Tabung plastik dan pipet
- k) *Epismikrometer sekuler*

IV.5.3. Alat untuk pembacaan preparat

- Mikroskop OLYMPUS seri BX 41
- Kamera digital DP-70
- Software OLYSIA tahun 2002

Alat-alat diatas telah dirangkai menjadi satu kesatuan.

IV.6. Pelaksanaan penelitian

IV.6.1. Cara perlakuan

Sejumlah 10 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangan secara individual dan diberi pakan standar secukupnya selama 7 hari.

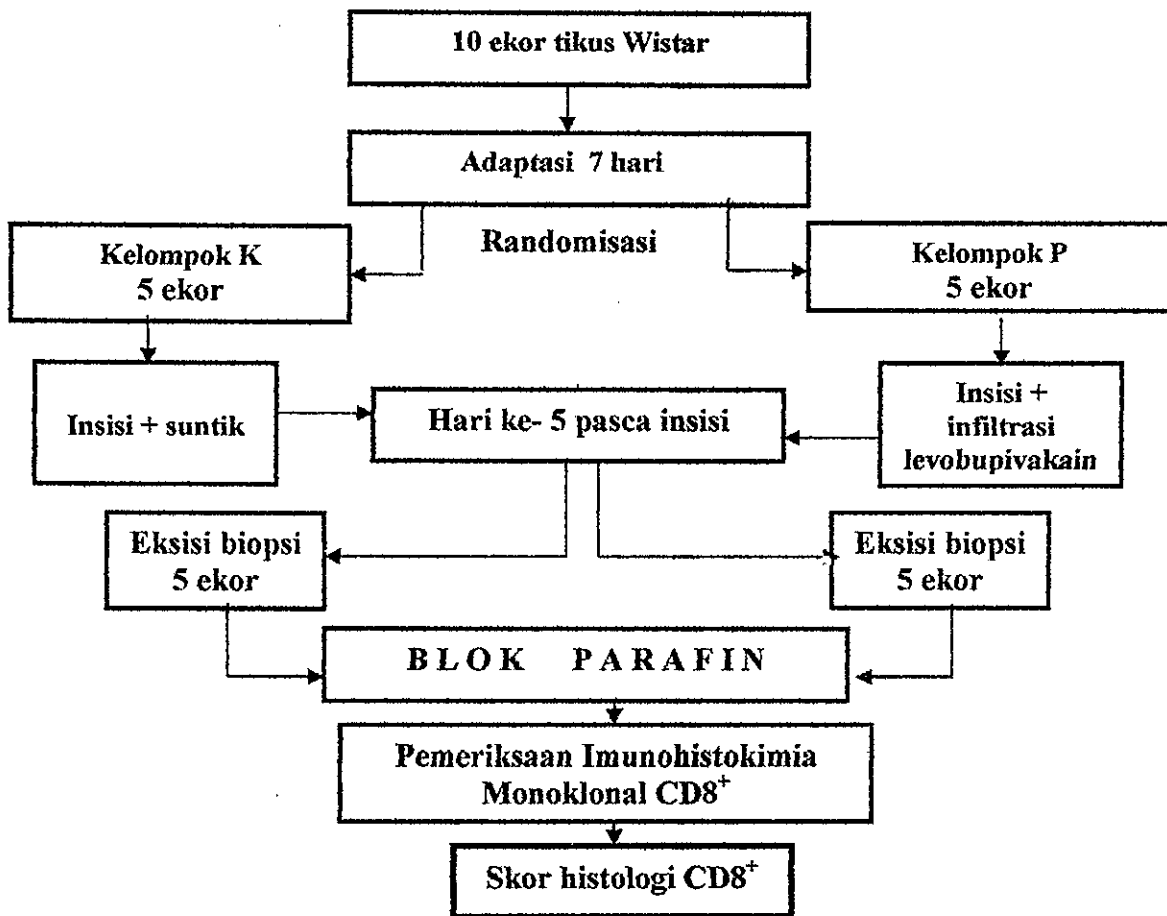
Tikus dibagi menjadi dua kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang ditentukan secara acak. Perlakuan yang diberikan adalah:

K : Kelompok Kontrol, tikus yang dilakukan 2 buah insisi 2 cm, disuntik ulang 2X tiap 8 jam berikutnya.

P : Kelompok Perlakuan, tikus yang dilakukan 2 buah insisi 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivacain 2X setiap 8 jam berikutnya.

Setelah adaptasi selama 7 hari, tikus-tikus dari kelompok perlakuan maupun kontrol dibius dengan menggunakan eter. Sesudah terbius, bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan betadine. Selanjutnya dibuat irisan sepanjang 2 cm dan kedalaman sampai subkutis. Luka irisan dibersihkan dan dioles larutan betadin, kemudian luka ditutup dengan 5 jahitan tunggal sederhana menggunakan benang nilon steril nomor 000. Infiltrasi dilakukan pada kelompok perlakuan berupa larutan levobupivacain. Sediaan berupa larutan 0,5% Chirokain yang diencerkan menjadi larutan 0,25%. Pemberian dengan infiltrasi memakai jarum tuberkulin di sekitar luka irisan. Sedangkan pada kelompok kontrol suntikan dilakukan tanpa obat. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan betadine dan dirawat. Pasca bedah diberikan *penicillin oil* 15 mg, intra muskular. Pengulangan penyuntikan baik dengan atau tanpa levobupivacain dilakukan sebanyak dua kali dengan tenggang waktu 8 jam.

IV.7. Alur kerja



IV.8. Prosedur pemeriksaan

IV.8.1. Prosedur eksisi-biopsi

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, pada kedua kelompok masing-masing diambil 5 ekor. Dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether. Setelah tikus terbius kemudian pada jaringan bekas irisan diusap dengan alkohol 70% lalu dibuat eksisi-biopsi kira-kira 0,5 cm persegi melintasi garis irisan pada bagian tengah dan tepi. Jaringan biopsi diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat dengan blok parafin.

IV.8.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

a. Deparafinisasi

Rendam slide yang ditempeli potongan jaringan biopsi dari blok parafin, meliputi:

- Xylol I dan Xylol II masing-masing selama 5 menit
- Alkohol Absolut I dan Alkohol Absolut II masing-masing selama 5 menit
- Alkohol 90% dan Alkohol 70% masing-masing selama 5 menit
- Aquabides I dan Aquabides II masing-masing selama 5 menit

b. *Quenching Endogenous Peroxidase*

Rendam Slide dalam methanol ditambah 0,3% H₂O₂ selama 30 menit

c. *Unmasking Antigen*

Membuka kembali epitope antigen yang tertutup selama proses parafinisasi dengan bufer sitat pH 6,4 dalam *microwave oven* suhu sedang selama 2 menit kemudian dalam suhu rendah selama 2 menit.

d. *Imunostaining*

- Bloking serum albumin ditetaskan diatas potongan jaringan dalam *slide* 30 menit
- Inkubasi antibodi primer (dengan pengenceran 1:50 sampai 1:200) selama 1 jam dalam temperatur 25⁰ C.
- Cuci 2 kali dengan aquades
- SA-HRP
- Cuci 2 kali dengan aquades

- DAB
- *Counterstain HE*
- Canada balsem

IV.9. Cara pengumpulan data

Dari masing masing kelompok pada hari ke 5 dilakukan biopsi pada daerah tengah luka. Hasil biopsi difiksasi dengan blok parafin. Pada Pemeriksaan Imunohistokimia dimaksudkan untuk menentukan ekspresi dari CD8⁺. Ekspresi sel dilakukan lewat pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada jaringan sekitar luka yang dapat dilihat pada mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Dipilih lapang pandang yang paling banyak sel positifnya dengan pembesaran 400X, selanjutnya dihitung jumlah sel positif pada lima lapang pandang searah jarum jam. Dihitung skor histologi dan dibandingkan antara kontrol dan perlakuan.

IV.10. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi data. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif skor histologi CD8⁺ dan rasio disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median. Pengujian distribusi data dilakukan dengan tes non parametrik *One-Sample Kolmogorov-Smirnov*. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji non parametrik *Independent T-test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 11.0 *for windows*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

V.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian hewan coba mengenai pengaruh infiltrasi anestetik lokal levobupivakain disekitar luka terhadap skor histologi sel CD8⁺ pada hari ke lima. Hasilnya adalah sebagai berikut (tabel 5.1):

Tabel 5.1 Skor Histologi sel Limfosit CD8⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima

No	Skor Histologi Sel CD8 ⁺	
	Non Levobupivakain	Levobupivakain
1	6	4,8
2	5	5,2
3	5,6	4,8
4	6	5,2
5	7	4,8

Sumber : data primer 2005

V.2 Analisa Data

V.2.1 Pembuktian Homogenitas Kedua Kelompok

Tabel 5.2.1 Hasil uji berat badan hewan coba.

Faktor	Non Levobupivakain (n = 5)	Levobupivacain (n = 5)	Uji statistik	p
Berat badan	274,62 ± 13,62	280,5 ± 14,12	t = -0,670	0,857*

Sumber : data primer 2005

Keterangan :

t = pengujian dengan *independent sample t-test* (data normal)

* Berbeda bermakna pada 5% ($P < 0,05$).

Dari tabel 5.2.1 diatas didapatkan berat badan hewan coba dari kelompok tanpa levobupivakain dan kelompok dengan levobupivakain hampir berbeda tidak bermakna ($p=0,857$; $p>0,05$). Hal ini berarti bahwa bias sampel dapat terhindari.

V.2.2 Hasil Setelah Mendapat Perlakuan

Table 5.2.2 Hasil uji beda kandungan sel CD8⁺ pada hewan coba :

	Non Levobupivakain (n = 5)	Levobupivacain (n = 5)	Uji statistik	p
Skor histologi	5,92 ± 0,73	4,96 ± 0,22	t = 2,82	0,023*

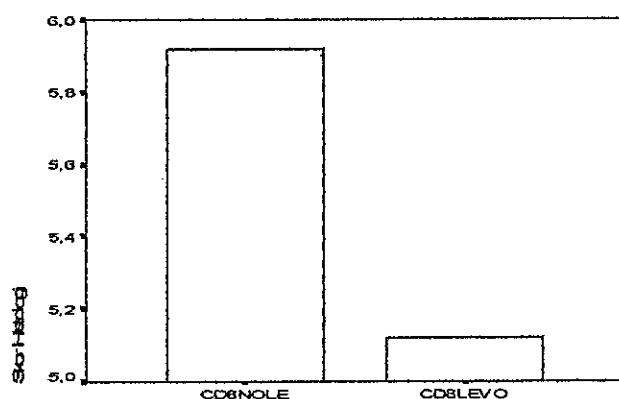
Sumber : data primer 2005

Keterangan :

t = pengujian dengan *independent sample t-test* (data normal)

* Berbeda bermakna pada 5% ($P<0,05$).

Dari tabel 5.2.2 diatas menunjukkan kandungan sel CD8⁺ antara kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain berbeda bermakna ($p=0,23$ atau $p<0,05$). Rerata dari kelompok dengan levobupivakain lebih rendah dari kelompok tanpa levobupivakain. Hal ini menunjukkan bahwa pada luka insisi hewan coba yang di infiltrasi anestetik lokal levobupivakain jumlah kandungan sel CD8⁺ lebih sedikit dibanding pada hewan coba tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain.



Gambar 5.2.1 Perbandingan rerata skor histologi CD8⁺ pada hewan coba.

Keterangan : NOLE : non levobupivakain LEVO : levobupivakain

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini terutama bertujuan untuk mencari data mengenai pengaruh infiltrasi lokal anestetik levobupivacain terhadap penyembuhan luka. Anestetik lokal diharapkan mampu mengurangi intensitas nyeri dengan menghambat impuls transmisi. Nyeri, terutama pada nyeri hebat sinyal berjalan melewati aksis HPA (*Hipothalamus-Pituitaria-Adrenal*), menimbulkan disregulasi sistem imun berakibat terjadi penurunan ketahanan tubuh yang dapat menghambat penyembuhan luka. Impuls nyeri yang dihambat oleh anestetik lokal pada jalur transmisi bersifat lebih terkendali, tidak bersifat darurat, sehingga katekolamin dilepas dalam kadar normal dan tidak menimbulkan respon stres berlebihan, dimana jumlah glukokortikoid (kortisol) dalam dosis tidak tinggi. Kadar kortisol yang tidak tinggi tersebut tidak lagi menimbulkan supresi atau inhibisi tetapi berubah menimbulkan stimulasi atau eksitasi terhadap sistem imun^{1,35}.

Jadi infiltrasi levobupivacain bukan dimaksud untuk menghilangkan proses inflamasi, tetapi untuk mengendalikan proses inflamasi menjadi tidak berlebihan. Reaksi inflamasi berguna sebagai proteksi terhadap jaringan yang mengalami kerusakan untuk tidak mengalami infeksi dan meluas tak terkendali. Proses inflamasi sangat erat berhubungan dengan penyembuhan luka. Tanpa adanya inflamasi tidak akan terjadi proses penyembuhan luka, luka akan tetap menjadi sumber nyeri sehingga proses inflamasi dan penyembuhan luka akan cenderung menimbulkan nyeri¹.

Proses inflamasi terjadi pada jaringan ikat dengan pembuluh darah yang mengandung plasma, sel yang bersirkulasi, elemen seluler dan ekstra seluler jaringan

pengikat. Termasuk komponen seluler adalah eritrosit, leukosit : netrofil, eosinofil, basofil, monosit, limfosit, trombosit. Termasuk sel jaringan pengikat adalah sel mast, fibroblast, monosit, makrofag dan limfosit. Elemen ekstra seluler diantaranya kolagen, elatin, glikoprotein adesif : fibronektin, laminin, kolagen non fibril, tenasen, proteoglikan¹.

Proses penyembuhan luka terjadi pada awal inflamasi, selanjutnya akan bersamaan. Dalam proses inflamasi terjadi kerusakan, pelarutan dan penghancuran sel atau agen penyebab kerusakan sel. Pada saat yang sama terjadi proses reparasi, proses pembentukan kembali jaringan rusak atau proses penyembuhan jaringan rusak. Proses ini baru selesai sempurna sesudah agen penyebab kerusakan sel dinetralkan. Selama proses reparasi berlangsung, jaringan rusak diganti oleh regenerasi sel parenkimal asli dengan cara mengisi bagian yang rusak dengan jaringan fibroblast (proses *scarring*). Atau kombinasi keduanya¹.

Pada hewan percobaan yang dilakukan deplesi limfosit T, terjadi penghambatan proses penyembuhan luka (Barbul, 1990). $CD4^+$ (sel T helper) dan $CD8^+$ (sel T sitotoksik dan supresor), pembagian fungsinya mengikuti aturan dari keseimbangan respon imun. Terbukti hubungan yang relevan pada proses penyembuhan luka hewan percobaan, bahwa limfosit $CD8^+$ menghambat penyembuhan luka dan limfosit $CD4^+$ mendorong penyembuhan luka dalam model penyembuhan tikus in vitro³⁶. Dukungan terhadap percobaan ini berupa penelitian pada manusia selama satu minggu setelah pembedahan menemukan peningkatan level sel-sel $CD4^+$ dibandingkan dengan kenaikan jumlah sel-sel $CD8^+$ ditemukan dengan segera penutupan luka (Boyce et al, 2000)³⁷. Penelitian lain menunjukkan deplesi limfosit CD4 memperlihatkan penurunan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Sedangkan

depleksi limfosit CD8 memperlihatkan kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Dapat disimpulkan bahwa depleksi limfosit T pada penyembuhan luka pada subset terdapat pengaturan yang berlawanan, yaitu CD8⁺ merupakan *downregulating wound healing* sedangkan CD4⁺ merupakan *upregulating wound healing*^{12,13}.

Dalam penelitian ini dilibatkan 10 ekor tikus galur Wistar dewasa yang dilakukan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain kemudian dibuat insisi dan dilihat pengaruhnya terhadap skor histologi sel CD8⁺. Penelitian ini menggunakan subyek tikus Wistar dikarenakan tidak etis dilakukan pada manusia, sebab pada hari ke lima dilakukan biopsi jaringan untuk melihat kandungan sel CD8⁺ secara imunohistokimia. Jenis kelamin tikus juga dipilih jantan dikarenakan secara hormonal, jenis kelamin betina lebih banyak terpengaruh.

Untuk uji homogenitas kedua kelompok dengan variabel yang dapat diukur yaitu berat badan, dimana didapat hasil statistik berbeda tidak bermakna dengan $p > 0.05$ (tabel 5.2.1), sehingga kelompok yang dibandingkan relatif homogen. Hal ini dikarenakan tikus berasal dari satu galur murni atau satu indukan yang mempunyai karakteristik yang sama, dengan pemberian pakan yang sama maka homogenitas lebih terjamin.

Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada sekitar luka akan menurunkan skor histologi sel CD8⁺. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan sel CD8⁺ pada jaringan sekitar luka dapat dipengaruhi oleh pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain, perbedaanya bermakna $p = 0,023$; $p < 0.05$ (tabel 5.2.2), artinya bahwa kandungan sel CD8⁺ pada

kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain. Dimana sel CD8⁺ ini penting untuk regulasi penyembuhan luka.

Walaupun pada percobaan ini terbukti bahwa kandungan CD8⁺ menurun, tetapi bukan jaminan bahwa penyembuhan luka dapat lebih baik. Untuk mendukung penelitian ini, sebaiknya di teliti juga komponen-komponen yang mendukung kesembuhan luka. Misalnya CD4⁺ yang bersama-sama dengan CD8⁺ mengatur keseimbangan penyembuhan luka sebagai *upregulating wound healing*^{12,13}.

Produk-produk lain yang dapat mempengaruhi proses inflamasi dan dapat mendukung proses penyembuhan misalnya kortisol, β endorfin, CRF (*Corticotropin Releasing Factor*), ACTH (*Adrenocorticotropic Hormon*), CD45 (*Cluster Differentiation*), IL (*Interleukin*) 4, IL6, IL8, IL10, PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*), EGF (*Epidermic growth factor*), IFN γ (*Interferon gamma*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*). Faktor-faktor diatas akan mendukung dan saling memperkuat hasil penelitian tentang pengaruh infiltrasi levobupivakain terhadap kesembuhan luka.

Misalnya TGF- β 1 berperan dalam meningkatkan formasi ECM (*extra cellular matrix*), kolagenasi dan mempercepat remodeling. Adanya E-selektin dan VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) menempelkan fibroblas dan kolagen pada jaringan rusak. Ditambah peran faktor pertumbuhan PDGF dan FGF maka terbentuklah jaringan baru dan terjadi proses penyembuhan luka.

Faktor pertumbuhan lain adalah TNF- α yang dapat menyebabkan sel endotel vaskuler mengekspresikan reseptor sehingga permukaan sel endotel menjadi adesif untuk

neutrofil, kemudian untuk leukosit dan limfosit. TNF- α mampu meningkatkan kelekatan leukosit pada dinding sel tempat jaringan yang rusak, mampu mengaktifkan neutrofil, eosinofil dan mononuklear fagosit, untuk membunuh mikroba. Bekerja bersama mononuklear fagosit dan sel endotel vaskuler menstimulasi sekresi IL-1 dan IL-6 ke dalam sirkulasi, mengaktifasi sel endotel vaskuler mengekspresi molekul adhesi seperti: E-selektin dan P-selektin, demikian juga ICAM-1 dan VCAM-1 yang masing-masing dapat berikatan dengan integrin spesifik pada sel lain.

Contoh-contoh diatas memberikan gambaran betapa kompleksnya sistem tubuh kita dalam upaya untuk penyembuhan terhadap luka. Diluar contoh-contoh diatas tentu saja masih banyak faktor-faktor maupun proses-proses yang mempengaruhi penyembuhan luka³⁷. Karena itu walaupun penelitian ini mempunyai hasil bermakna, belumlah merupakan jaminan penyembuhan luka pasti lebih baik.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

VII.1 Kesimpulan

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada sekitar luka insisi menurunkan kandungan sel CD8⁺, yang dapat mencerminkan perbaikan proses penyembuhan luka.

VII.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada sekitar luka insisi benar-benar memperbaiki proses penyembuhan luka dengan meneliti komponen-komponen imunologi lain yang berpengaruh terhadap proses penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathology basic of disease. 6th ed. Philadelphia : WB Saunders Co, 1999 : 21-201
2. Constantinnides P. General pathobiology. 1st ed. Norwalk Connecticut : Appleton and Lange, 1994 : 173-186
3. Mast AB. Normal wound healing. In : Achauer BM, Eriksson E, eds. Plastic Surgery, Indications, Operations and Outcomes. St. Louis Missouri : Mosby Inc, 2000 : 37-53
4. Elenkov IJ, Webster E, Torpy DJ, et al. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response : acute and cronic effects. Annals of the New York academy of sciences 1999 ; 876 : 1-13. [on line]: URL. <http://annalsnyas.org/cgi/876/1/1>
5. Webster E, Torpy DJ, Elenkov I, et al. Corticotropin releasing hormone and inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences 1998 ; 840 : 21-32
6. Pedersen D. Accelerated surgical stay programe. Annals of Surgery 1994 ; 219 : 374-81
7. Bardram L, Funch-Jensen P, Kehlet H. Recovery after laparoscopic colonic surgery with epidural analgesia and early oral nutrition and mobilisation. Lancet 1995 ; 345 : 763-4
8. Kresno SB. Imunologi, diagnosis dan prosedur laboratorium. 4th ed. Jakarta : Balai penerbit FK UI, 2003 : 4-32
9. Roitt I, Kekebalan Dapatan Spesifik. Dalam : Imunologi. Edisi 8. Jakarta : Widya Medika 2002
10. Baratawidjaja KG, Sistem Imun. Dalam : Imunologi Dasar. Edisi 4. Jakarta : FKUI 2000 : 3-21
11. Roitt, Brostoff, Male. Cells, tissue and organ of the immune system Immunology. Immunology. 6th ed. London : Mosby 2001 : 15-45
12. Boyce DE, Jones WD, Ruge F. The Role of Lymphocytes in Human Dermal Wound Healing. Aidline national library or medicine 2000 Jul; 143 (1): 59-65. <http://www.aegis.com/aidline/2000/nov/A00B1207.html>

13. Davis PA, Corless DJ, Aspinal R, Wastell C. Effect of CD4(+) and CD8(+) cell depletion on wound healing. Departement of Academic Surgery, Imperial College School of Medicine, Chelsea and Westminster Hospital, London, UK. Br J Surg. 2001 Feb;88(2):298-304. peteralexanderdavis@yahoo.com
14. Christie JM, Chen GW. Secondary hyperalgesia is not affected by wound infiltration with bupivacaine. Can J of An 1993 ; 40 : 1034-37
15. Pettersson N, Berggren P, Larsson M, et al. Pain relief by wound infiltration with bupivacaine or high dose ropivacaine after inguinal hernia repair. Reg Anesth Pain Med 1999 ; 24 : 569-75
16. Bultmann M, Streich R, Risse A, et al. Postoperative analgesia in children after hernioplasty, wound infiltration with different concentrations of bupivacaine : a pilot study (German). Anaesthesist 1999 ; 48 : 439-43
17. Vintar N, Pozlep G, Rawal N, et all. Incisional self-administration of bupivacaine or ropivacaine provides effective analgesia after inguinal hernia repair. Can J Anaesth 2002 ; 49: 481-6
18. Anonymous. Wound healing. [on line]: URL. <http://www.orthoteers.co.uk/Nruip-ij33lm/orthwound.htm>
19. Rossenberg PH, Renkonen OV. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. Anesthesiology 1985 ; 62 : 178-9
20. Galindo MA. Levobupivacain, a long acting local anaesthetic, with less cardiac and neurotoxicity. [on line]: URL. <http://www.ndaa.ox.ac.uk/wfsa/html/u14/u1407-01.html>
21. Doctor's guide. Chirocaine anesthetic use to post op pain management. Global edition. 2000. [on line]: URL. <http://www.pslgroup.com/dg/195B36.htm>
22. Stoelting RK. Local Anesthetics. In : Stoelting RK. Pharmacology and physiology in anesthetic practice. 3rd ed. Philadelphia : JB Lippincott, 1999 : 45-67
23. Field HL. Pain. 1st ed. New York : Mc Graw Hill book Co, 1987 : 1-51
24. Devor M. Pain mechanism and pain syndrome. In : Champbell JN. Pain 1996 an update review. Seattle : IASP press, 1996 : 103-112
25. Raymond RG, William GB. Pain management. In : Morgans GE, Mikhail MS, eds. Clinical anesthesiology. 1st ed. New Jersey : Prentice hall int. Inc, 1992 : 269-73

26. Melzacks R, Wall P. The gate control theory of pain. In : Melzacks R, Wall P. The challenge of pain. 1st ed. Penguin education, 1984 : 223-61
27. Pleuvry BJ. The chemical modulation of nociceptive responses and pain. In : Healy TEJ, Cohen PJ, eds. A Practice of anesthesia. 6th ed. London : Edward Arnold, 1995 : 80-8
28. Cervero F. Mechanism of visceral pain, past and present. In : Gebhart GF. ed. Visceral pain, progress in pain research and management. Seattle : IASP press, 1995 ; 5 : 469-88
29. Bonica JJ. Anatomic and physiologic basis of pain, nociception and pain. In : Bonica JJ. ed. The management of pain. Pennsylvania : Lea and Febiger, 1990 : 12-28
30. Notoedirdjo M. Nyeri dan tatalaksana penanggulangannya. Makalah Pertemuan Klinik Ikatan Ahli Kesehatan Jiwa Cabang Surabaya. Malang, 1996
31. Edward W, Hahn CEW, Adams AP. Principle and practice series patients controlled analgesia. London : BMJ Publ group, 1995 : 1-21
32. Mercandetti M, Cohen A. Wound healing, healing and repair. EMedicine. 2002. [on line]: URL. <http://www.eMedicine.com.Inc>
33. Hollmann, Markus W, Durieux E. Local anesthetics and the inflammatory response : A new therapeutic indication?. Anesthesiology 2000 ; 93 : 858-75
34. Rahardjo E. Analgesia pasca bedah, cara invasif atau non invasif, sebuah tinjauan klinis. Surabaya: Instalasi Anestesi dan Reanimasi RSUD Dr Soetomo, 1997 : 2-7
35. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Edisi 2. Jakarta : Sagung seto, 2002 : 247-9
36. Moore K. The Scientific Basis of Wound Healing. <http://www.woundscience.com/Scientific%20Basis%20of%20Wound%20Healing%20-%204.htm>
37. Mulyata S: Paket Penyuluhan Kognitif dan Senam Prapersalinan Pada Primigravida, Mengurangi Cemas dan Nyeri Persalinan, Meningkatkan Skor Apgar Bayi, Serta Mempercepat Penyembuhan Luka Persalinan . Disertasi S3 Universitas Airlangga Surabaya. 2002: 122-4
38. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York : 1993 : 40-44