

**PERBEDAAN TAMPILAN KOLAGEN DI SEKITAR LUKA
INSISI PADA TIKUS *WISTAR* YANG DIBERI INFILTRASI
PENGHILANG NYERI LEVOBUPIVAKAIN DAN YANG
TIDAK DIBERI LEVOBUPIVAKAIN**

Suatu Studi Histokimia



Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Mencapai gelar derajat Sarjana S-2

MAGISTER ILMU BIOMEDIK

Dan

PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I

BIDANG ANESTESIOLOGI

Bambang Triyono

G4A001011

G3F001068

**PROGRAM PASCASARJANA DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2005

**PERBEDAAN TAMPILAN KOLAGEN DI SEKITAR LUKA INSISI PADA
TIKUS WISTAR YANG DIBERI INFILTRASI PENGHILANG NYERI
LEVOBUPIVAKAIN DAN YANG TIDAK DIBERI LEVOBUPIVAKAIN**

Suatu Studi Histokimia



Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Mencapai gelar derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik

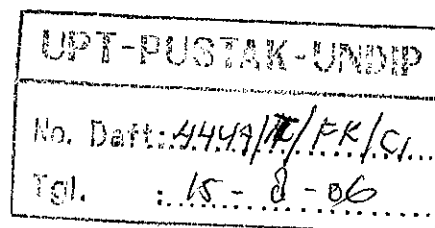
Dan

Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bidang Anestesiologi

Bambang Triyono

G4A001011

**PROGRAM PASCASARJANA DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2005**



Lembar Pengesahan

Tesis

**PERBEDAAN TAMPILAN KOLAGEN DI SEKITAR LUKA INSISI PADA
TIKUS WISTAR YANG DIBERI INFILTRASI PENGHILANG NYERI
LEVOBUPIVAKAIN DAN YANG TIDAK DIBERI LEVOBUPIVAKAIN**

Suatu Studi Histokimia

Oleh

Bambang Triyono

G4A001011

telah disetujui

oleh

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Tanggal :

Tanggal :

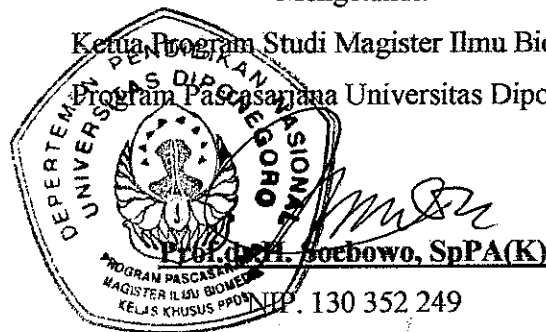
dr. Witjaksono, SpAn(K), M Kes Prof. Dr. dr. H. Tjahyono, SpPA(K), FIAC

NIP. 130 605 723

NIP. 130 368 076

Mengetahui:

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh berasal dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Nopember 2005

Dr. Bambang Triyono

NIM: G4A001011

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Bambang Triyono
NIM / NIP : G4A001011 / 140 328 209
Tempat / Tanggal lahir : Klaten , 3 Pebruari 1967
Agama : Kristen
Jenis Kelamin : Laki – laki
Alamat : Jl. Ulin Selatan II / 66 Banyumanik , Semarang

Riwayat Pendidikan

1. SD : 1979
2. SMP : 1982
3. SMA : 1985
4. FK UNS : 1992

Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PTT Puskesmas Asam-Asam, Kal-Sel : Tahun 1993 – 1994
2. Dokter PTT Puskesmas Kintap, Kal – Sel : Tahun 1994 – 1996
3. Kepala Puskesmas Sine, Kab. Ngawi, Jatim : Tahun 1996 – 2000

Riwayat Keluarga

Nama Isteri : Ratna Kristianing Diati
Nama Orang Tua Ayah : Drs. Sastro Daryono
Ibu : Supartiyem
Nama Anak : 1. Antonius Dimas Wahyu Permadi
2. Berlian Wahyu Puspita Hapsari
3. Natasya Wahyu Tri Cahyaningrum

KATA PENGANTAR

Puji syukur dan terima kasih penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Perbedaan tampilan kolagen di sekitar luka insisi pada tikus *Wistar* yang diberi infiltrasi penghilang nyeri levobupivakain dan yang tidak diberi levobupivakain”, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh derajat sarjana S₂ di bidang Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bidang Anestesiologi Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini tidak akan mampu penulis selesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Khusus kepada dr. Witjaksono, SpAn K. Mkes sebagai dosen pembimbing utama dan Prof.Dr.dr. H . Tjahyono, SpPA K, FIAC sebagai dosen pembimbing kedua, penulis mengucapkan terima kasih atas segala bimbingan, sumbangan pikiran, waktu serta dorongan semangat dalam penulisan tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. Rektor Universitas Diponegoro di Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I di bidang Anestesiologi dan Program Pascasarjana Program Studi Ilmu Biomedik.
2. dr. Kabul Rachman, SpKK (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan mengikuti

Pendidikan Dokter Spesialis dan Program Pascasarjana Program Studi Ilmu Biomedik.

3. dr. Hariyo Satoto, SpAn (K), selaku Kepala Bagian Anestesiologi FK UNDIP / RS.dr. Kariadi Semarang yang memberikan dukungan dan semangat selama penulis mengikuti pendidikan dokter spesialis.
4. Prof.dr. H. Soebowo, SpPA (K), selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang, yang telah memberikan kesempatan mengikuti Program Pascasarjana Ilmu Biomedik.
5. dr.Uripno Budiono, SpAn (K), Ketua Program Studi Anestesiologi FK UNDIP / RS.dr.Kariadi Semarang yang telah memberi dukungan dan dorongan semangat selama penulis mengikuti program pendidikan dokter spesialis anestesiologi dan Program Pascasarjana Ilmu Biomedik.
6. Prof.dr. Soenarjo SpAn KIC dan seluruh staf pengajar Bagian Anestesiologi FK UNDIP / RS. Dr. Kariadi Semarang yang telah memberi bimbingan dan dorongan selama penulis mengikuti pendidikan.
7. dr. Soeharsono, SpOG, Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis FK UNDIP yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan dokter spesialis.
8. Dra. Dyah Retno Budiani, Msi, Staf pengajar Patologi Anatomi FK UNS Surakarta yang telah membimbing serta memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium Biomedik FK UNS Surakarta.

9. dr. Niken Puruhita, Sp GK. MSi, yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam analisis statistik dan metodologi penelitian.
10. Tim penguji dan nara sumber proposal dan penguji tesis yang telah berkenan memberi masukan dan arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
11. Pimpinan Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta dan Kepala Bagian Patologi Anatomi FK UNS Surakarta, yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini.
12. Isteriku Ratna Kristianingdiati, ibu dan ayah, mertua serta ketiga buah hatiku Dimas, Elin dan Echa yang dengan penuh pengertian, kesabaran serta senantiasa mendoakan dan memberikan dorongan semangat agar penulis dapat menyelesaikan pendidikan spesialis dan pendidikan magister.
13. Abangku Bonar Sihombing, SH SpN yang telah memberikan dukungan baik moral maupun material sehingga penulis dapat mengikuti pendidikan spesialis dan program magister.
14. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan andil yang besar dalam penulisan tesis ini.

Akhir kata. penulis yakin bahwa tulisan ini masih banyak kekurangan serta jauh dari kesempurnaan, karenanya sangat diharapkan saran serta kritik demi kesempurnaan tulisan ini. Penulis berharap agar penelitian ini secara luas dapat berguna bagi pembaca, masyarakat dan berguna untuk perkembangan ilmu kedokteran serta menjadi wacana untuk penelitian lebih lanjut.

Semarang, Nopember 2005

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman judul	i
Halaman pengesahan	ii
Pernyataan	iii
Daftar riwayat hidup	iv
Kata pengantar	v
Daftar isi	viii
Daftar tabel	x
Daftar singkatan	xi
Daftar gambar	xii
Daftar lampiran	xiii
Abstrak	xiv
Abstract	xv
BAB I : PENDAHULUAN	
I.1. Latar Belakang Masalah	1
I.2. Rumusan Masalah	5
I.3. Tujuan Penelitian	5
I.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
II.1. Levobupivakain	7
II.2. Patofisiologi nyeri	9
II.3. Penyembuhan luka	11
II.4. Kolagen	18
II.5. Peranan kolagen dalam penyembuhan luka.....	19
II.6. Pengaruh faktor sistemik dan lokal dalam proses penyembuhan luka	21
II.7. Pengaruh anestesi lokal terhadap penyembuhan luka operasi	22

BAB III. :	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
III.1.	Kerangka teori	24
III.2.	Kerangka konsep	25
III.3.	Hipotesis	25
BAB IV.	METODE PENELITIAN	
IV.1.	Rancangan penelitian	26
IV.2.	Sampel penelitian	27
IV.3.	Waktu dan lokasi penelitian	28
IV.4.	Variabel penelitian	28
IV.5.	Definisi operasional	29
IV.6.	Bahan dan alat penelitian	31
IV.7.	Pelaksanaan Penelitian	32
IV.8.	Prosedur pemeriksaan	35
IV.9.	Cara pengumpulan data	36
IV.10.	Analisa data	37
BAB V. :	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	
V.1.	Hasil penelitian	38
V.2.	Analisis hasil	39
BAB VI. :	PEMBAHASAN	43
BAB VII.:	SIMPULAN DAN SARAN	50
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Hasil pengamatan tampilan kolagen pada penelitian tikus Wistar hari kelima secara kuantitatif dan kualitatif

Tabel 5.2. Hasil analisis tampilan kolagen

Tabel 5.3. Hasil uji Bonferroni terhadap tampilan kolagen

DAFTAR SINGKATAN

ADH	: Antidiuretic Hormon
ECM	: Extra Cellular Matrix
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
IL-1/-4 /-6/-8	: Interleukin-1 / -4/-6 / -8
Ig G1	: Immunoglobulin G 1
IFN- γ	: Interferon gamma
TNF α	: Tumor Necrosis Factor α
TH1/2/3	: T Helper 1 / 2 / 3
CD4 ⁺	: Cluster of Differentiation 4 ⁺
CRH	: Corticotropic Releasing Hormon
ACTH	: Adreno Corticotrophic Hormone
PVN	: Paraventricularis Nucleus
HPA	: Hipotalamus Pituitaria Adrenal
PMN	: Polimorphonuclear
bFGF	: basic Fibroblast Growth Factor
aFGF	: acidic Fibroblast Growth Factor
eFGF	: epidermal Fibroblast Growth Factor
EGF	: Epidermic Growth Factor
m RNA	: messenger Ribonucleid Acid
ICAM	: Intracellular Adhesion Molecule

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Modifikasi dari Wound healing
- Gambar 2. Grafik Boxplot tampilan kolagen
- Gambar 3. Perbandingan rerata tampilan kolagen pada kelompok kontrol perlakuan 1, perlakuan 2
- Gambar 4 & 5. Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta
- Gambar 6 & 7. Kandang tikus tunggal
- Gambar 8. Pemberian infiltrasi levobupivakain setelah dilakukan insisi
- Gambar 9. Pembiusan tikus dengan ether sebelum dilakukan insisi
- Gambar 10. Pengambilan jaringan biopsi
- Gambar 11. Luka bekas pengambilan jaringan insisi
- Gambar 12. Jaringan biopsi
- Gambar 13. Mikrotom
- Gambar 14. Pengecatan dengan Van Giesson
- Gambar 15. Pembacaan hasil dengan mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 memakai software OLYSIA
- Gambar 16. Kelompok kontrol : kelompok tanpa dilakukan insisi dan tanpa infiltrasi levobupivakain
- Gambar 17. Kelompok perlakuan 1, dilakukan insisi tanpa infiltrasi levobupivakain
- Gambar 18. Kelompok perlakuan 2, dilakukan insisi dan infiltrasi levobupivakain

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Dokumentasi pelaksanaan penelitian dan pengamatan hasil
- Lampiran 2. Analisis statistik

ABSTRAK

Latar belakang : Nyeri pasca bedah adalah nyeri akut yang tidak menguntungkan penderita. Keadaan ini mengakibatkan penyembuhan luka yang lambat. Dalam keadaan stres dan nyeri berat, kadar β -endorfin yang disekresi kelenjar pituitaria akan meningkat dan mensupresi makrofag, sehingga aktivitas makrofag akan menurun. Penurunan aktivitas makrofag berakibat aktivitassitokin yang dilepaskan makrofag seperti $TNF\ \alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, TGF β menurun. TGF β mempunyai peran meningkatkan matrik ekstraseluler (ECM) dan meningkatkan kolagenasi, sehingga apabila TGF β menurun berakibat terjadi hambatan kesembuhan luka. Levobupivakain sebagai anestetik lokal mampu menurunkan intensitas nyeri akut akibat insisi pembedahan. Kolagen merupakan komponen kunci semua fase penyembuhan luka. Segera setelah injuri, paparan kolagen ke darah akan menyebabkan agregasi dan aktivasi trombosit dan melepaskan faktor-faktor kemotaksis yang memulai proses penyembuhan luka. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa infiltrasi levobupivakain pada insisi akan meningkatkan jumlah serabut kolagen dalam proses penyembuhan luka.

Metode : Dilakukan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "Randomized Post test only control group design", yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Sampel dibagi tiga kelompok, kelompok kontrol yaitu tikus sehat yang tidak diberikan perlakuan sama sekali, kelompok P_1 yaitu kelompok yang setelah diinsisi tidak diberikan infiltrasi levobupivakain, dan kelompok P_2 yaitu kelompok yang setelah dilakukan insisi diberikan infiltrasi levobupivakain setiap 8 jam dalam 24 jam pertama. Pada hari kelima, tikus dibunuh. Dibuat sediaan histologik pada daerah insisi, dipulas dengan Van Giesson. Tampilan kolagen dihitung dengan komputer (Software Olysia). Perbedaan jumlah kolagen dianalisa dengan uji *One Way Anova* dan uji *Bonfferoni* dengan derajat kemaknaan $p < 0.05$.

Hasil : Tampilan kolagen pada kelompok kontrol 7768.25 ± 699.5 , kelompok P_1 1528.37 ± 583.81 dan kelompok P_2 4369.35 ± 919.42 . Terdapat perbedaan yang bermakna antara tampilan kolagen pada kelompok P_1 dan P_2 $p=0.018$. ($p < 0.05$)

Simpulan : Jumlah kolagen pada kelompok yang diberi infiltrasi levobupivakain lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi infiltrasi levobupivakain.

Kata kunci : nyeri, levobupivakain, kolagen, penyembuhan luka

ABSTRACT

Background : post-surgery pain is an acute pain commonly causes unpleasant condition for the patient, which may result in delayed wound healing. In stress and severe pain, β endorphin secreted by pituitary gland will increase and suppress the activity of macrophage include the sitokin (e.g.: $TNF\alpha$, IL 1, IL 6, $TGF\beta$) which released by its own macrophage. . $TGF\beta$ take role on extracellular matrix (ECM) enhancement and increase the collagenation. Levobupivacaine as the a local anesthetic can descend acute pain intensity after incised surgery. Collagen is the major component in every phase of wound healing process. Right after injury, the chollagen exposure promote the aggregation and activation of platelet, followed by chemotactic factors release to initiate the wound healing process. The aim of this research is to prove that levobupivacaine infiltration potencie to increase collagen fibre in wound healing.

Method : a laboratoric experimental study with "*randomized post test only control group design*" recruited animals as the object. Sample was divided into 3 groups, control group consists of health mice with no intervention. P1 group is incised without levobupivacaine infiltration while the P2 group received the levobupivacaine infiltration after incised every 8 hours on first 24 hours. On the 5th day, mice were killed, made the histologic preparation on the incised area, twisted by Van Giesson. Collagen appearance were counted by *Software Olysia*. Data was analyzed by *one way annova* and *bonfferoni test* ($p < 0,05$).

Result : collagen present on control group 7768.25 ± 699.5 , the P1 group 1528.37 ± 583.81 , and the P3 group 4369.35 ± 919.42 . There's a significant differences on the collagen appearance between P1 and P2 group $p = 0.018$ ($p < 0,05$)

Conclusion : collagen appearance on the group received infiltration of levobupivacaine is higher than the group which not receive it. So it suggested to give levobupivacaine infiltration on the post-surgery wound to increase the wound healing process.

Keyword : pain, levobupivacaine, collagen, wound healing

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang masalah

Nyeri pasca bedah adalah nyeri akut yang diawali oleh kerusakan jaringan akibat tindakan pembedahan . Nyeri akut tidak menguntungkan bagi penderita seperti kegelisahan, perubahan hemodinamik, gangguan pernafasan, retensi urine, ileus dan lain-lain. Keadaan-keadaan tersebut mengakibatkan penyembuhan luka yang lambat, gangguan mobilisasi dan jangka waktu rawat di rumah sakit semakin bertambah.^{1,2}

Setiap pasien yang mengalami trauma berat atau post-operasi harus dilakukan penanganan nyeri yang sempurna, karena dampak dari nyeri itu sendiri akan menimbulkan *Metabolic Stress Respons* (MSR) yang mempengaruhi semua sistem tubuh penderita dan menimbulkan perubahan fisiologi dan psikologi pada penderita seperti :^{3,4}

- Perubahan kognitif (sentral) misalnya: kecemasan, ketakutan, gangguan tidur dan putus asa.
- Perubahan neurohumoral : hiperalgesia perifer, peningkatan kepekaan luka.
- Plastisitas neuronal (kornu dorsalis) : transmisi nosiseptif yang difasilitasi sehingga meningkatkan kepekaan nyeri
- Aktivasi simpathoadrenal : pelepasan renin,angiotensin, hipertensi, takikardi.
- Perubahan neuroendokrin : memperpanjang fase katabolik, karena meningkatnya katekolamin diikuti peningkatan hormon katabolik seperti glukagon, kortikosteroid dan terjadi resistensi insulin.^{3,4}

Aktivasi sistem simpathoadrenal dan perubahan pada neuroenokrin akan mengakibatkan peningkatan kortisol, ADH, aldosteron, epinefrin / norepinefrin, hiperglikemia dan menekan sistem imun tubuh yang dampak akhirnya akan memperlambat penyembuhan luka.⁵

Penyembuhan luka merupakan fenomena kompleks dan melibatkan berbagai proses dengan urutan sebagai berikut^{6,7}:

1. Inflamasi akut menyusul terjadinya kerusakan jaringan.
2. Regenerasi sel parenkimal.
3. Migrasi dan proliferasi sel parenkimal.
4. Sintesis protein *extra cellular matrix* (ECM).
5. Remodeling jaringan ikat dan komponen parenkimal.
6. Kolagenasi dan akuisisi kekuatan luka.

Proses penyembuhan luka pada umumnya dibagi atas beberapa fase yang masing-masing saling berkaitan yaitu fase inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Kolagen adalah komponen kunci pada fase dari penyembuhan luka. Segera setelah injuri, paparan kolagen *fibriler* ke darah akan menyebabkan agregasi dan aktivasi trombosit dan melepaskan faktor-faktor kemotaksis yang memulai proses penyembuhan luka. Fragmen-fragmen kolagen melepaskan kolagenase leukositik untuk menarik fibroblas ke daerah injuri. Selanjutnya kolagen menjadi pondasi untuk matrik ekstraseluler yang baru.^{8,9}

Akumulasi kolagen pada daerah luka tergantung pada ratio antara sintesis kolagen dan degradasi kolagen oleh enzim lokal. Pada fase awal proses penyembuhan luka, jumlah degradasi kolagen rendah, tetapi akan meningkat seiring dengan maturasi dari luka.⁸

Proses penyembuhan luka yang kompleks dan urut tidak terlepas dari peran dan pengaruh sitokin. Pada tahap deposisi matrik ekstraseluler (ECM), sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan sitokin, yaitu: PDGF, FGF, TGF β , IL1, IL 4, IgG1 pada tahap sintesis kolagen. Mathew R dkk (1999) dalam penelitian pada tikus menunjukkan bahwa TGF β akan mempercepat sintesis dan deposit kolagen. Menurut Stites dan Ferr (1991) faktor pertumbuhan TGF β mempunyai efek kemotaksis dan mitogenik pada fibroblas sehingga akan meningkatkan sintesis kolagen.^{10,11}

Dalam keadaan nyeri, kadar β endorfin yang disekresi kelenjar pituitari meningkat dan mensupresi makrofag sehingga aktifitas makrofag yang dipengaruhi oleh IFN γ menurun. Penurunan aktifitas makrofag ini akan berakibat aktifitas sitokin yang dilepaskan makrofag seperti TNF α , IL-1,IL-6,IL-8, TGF β menurun. Penurunan beberapa faktor pertumbuhan ini akan berakibat hambatan kesembuhan luka. Pada keadaan nyeri juga terjadi peningkatan hormon kortisol glukokortikoid (kortisol) dan menghambat faktor pertumbuhan lain yaitu IL-1 yang bekerja menstimuli sel untuk pembentukan prokolagenase guna proses kolagenase.^{11,12}

Nyeri menjadi stresor yang memicu timbulnya gejala klinis patofisiologis, memicu modulasi respon imun, sehingga menyebabkan penurunan sistem imun yang berakibat pemanjangan penyembuhan luka¹. Nyeri bila tidak dikelola dengan tepat akan berakibat memperpanjang fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikosteroid dan resistensi insulin. Peningkatan hormon glukokortikoid menjadi salah satu faktor sistemik yang menghambat penyembuhan luka.¹¹

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain mengurangi intensitas nyeri dengan menghambat jalur transmisi impuls nyeri¹³, sehingga menurunkan sekresi hormon

glukokortikoid dan menghilangkan salah satu faktor penghambat penyembuhan luka^{6,7}. Infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal di sekitar luka irisan dapat mengurangi nyeri pasien yang menjalani seksio sesaria 24 jam pasca operasi. Namun tidak mempengaruhi hiperalgesia sekunder⁶. 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%^{7,8}. Penggunaan infiltrasi bupivakain pada dosis berulang telah dilakukan dengan menyisipkan kateter epidural subkutan, sub fascia, di bawah otot, ujung luka. Kateter dihubungkan dengan pompa balon elastik sebagai tombol pemberian obat. Hasilnya efektif mengurangi nyeri, tanpa komplikasi infeksi, inflamasi lokal dan efek samping mual muntah^{10,13}. Dari uraian tersebut diatas peneliti terdorong untuk melakukan penelitian tentang pengaruh infiltrasi anestetik lokal levobupivakain sebagai obat anestesi lokal melalui proses hambatan rangsang nyeri, terhadap perubahan pada tingkat seluler gambaran kolagen yang merupakan faktor yang penting dalam proses penyembuhan luka. Penelitian yang pernah dilakukan oleh Gillian S dkk (1999) yaitu dengan pemberian estrogen topikal akan mempercepat penyembuhan luka dengan merubah respon inflamasi yang dibuktikan dengan meningkatnya jumlah kolagen pada hari ke-7 . Mulyata St (2002) dalam penelitian pada tikus yang mendapatkan rangsang stres akan mengalami perpanjangan masa penyembuhan luka yang dibuktikan dengan tidak ditemukannya TGF β dibandingkan dengan tikus yang tidak mendapat rangsang stres.^{10,12}

I.2. Rumusan masalah

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

Apakah infiltrasi anestetik lokal levobupivakain meningkatkan tampilan kolagen dalam kaitannya dengan penyembuhan luka pada binatang percobaan.

I.3. Tujuan penelitian

I.3.1. Tujuan umum

Membuktikan pengaruh pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain terhadap tampilan kolagen pada tikus *Wistar*

I.3.2. Tujuan khusus

1. Mengukur tampilan kolagen dengan metode histokimia pada kelompok K (kelompok kontrol yaitu tikus *Wistar* tanpa insisi dan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain), kelompok P₁ (kelompok perlakuan yang dilakukan insisi tanpa diberi infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) dan kelompok P₂ (kelompok perlakuan yang dilakukan insisi dan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain)
2. Membandingkan tampilan kolagen antara kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P₁), dan kelompok perlakuan 2 (P₂)

I.4. Manfaat penelitian

Apabila hipotesis penelitian ini terbukti, maka diharapkan :

1. Penelitian ini dapat menjadikan sumbangan teori untuk mengungkap mekanisme kesembuhan luka akibat pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain
2. Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat dipertimbangkan dalam penggunaannya baik sebagai penghilang rangsang nyeri pasca bedah yang sekaligus membantu proses penyembuhan luka.
3. Karena penelitian ini dilakukan pada binatang coba maka dapat dijadikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. LEVOBUPIVAKAIN

II.1.1 Sifat kimia

Levobupivakain adalah obat anestesi lokal dengan durasi lama. Termasuk golongan amid (CONH-) yang memiliki atom karbon asimetrik dan isomer Levo(-). Levobupivakain memiliki pKa 8,1 , pKa berarti pH pada saat 50% molekul basa bebas dan 50% molekul dengan muatan ion positif. Bila ditambahkan bikarbonat pH akan meningkat sebanding dengan molekul basa bebas, molekul akan bebas melintasi membran akson dengan mudah dan secara farmakologis beraksi lebih cepat. Sebaliknya pada pH rendah atau asam akan lebih 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, sedangkan ikatan protein dengan bupivakain 95%. Hal ini berarti kurang dari 3% obat berada bebas dalam plasma. Fraksi konsentrasi yang kecil ini dapat berefek pada jaringan lain yang menyebabkan efek samping dan manifestasi toksik. 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 ^{14,15,16}.

II.1.2 Farmakokinetik

Metabolisme obat terjadi di hepar oleh enzim sitokrom P 450 terutama CYP1A2 dan CYP3A4 *isoforms*. Cara pemberian melalui epidural , spinal, blok saraf perifer dan infiltrasi. Penggunaan intravena sangat terbatas karena beresiko toksik. Bersihan obat dalam plasma akan menurun bila terjadi gangguan fungsi hepar¹⁴.

II.1.3 Farmakodinamik

Mekanisme aksi sama dengan bupivakain atau obat anestesi lokal lain. Apabila MLAC (*minimum local analgesic concentration*) tercapai, obat akan melingkupi membran akson sehingga memblok kanal natrium dan akan menghentikan transmisi impuls saraf. Konsentrasi untuk menimbulkan efek toksik pada jantung dan saraf lebih besar pada levobupivakain dari pada bupivakain. Batas keamanan 1,3 berarti efek toksik tidak akan terlihat sampai konsentrasi 30%^{14,15,16}.

II.1.4 Efek toksik

Levobupivakain menimbulkan depresi kardiak lebih sedikit dibandingkan bupivakain dan ropivakain. Gejala toksisitas sistem saraf pusat pada bupivacain lebih rendah rata rata 47,1 mg dibandingkan levobuvikain 56.1 mg.^{14,15}

II.1.5 Aplikasi klinik

Levobupivakain dapat digunakan untuk epidural, subaraknoid , blok pleksus brakialis, blok supra dan infra klavikuler, blok interkostal dan interskalen, blok saraf perifer, blok peribulber dan retrobulber, infiltrasi lokal, analgesi obstetri, pengelolaan nyeri setelah operasi, pengelokaan nyeri akut dan kronis. Dosis tunggal maksimum yang digunakan 2 mg /kg bb dan 5,7 mg/kg bb (400 mg) dalam 24 jam^{14,15,16}.

II.1.6 Efek samping

Sama dengan efek samping obat anestesi lainnya, diantaranya hipotensi, bradikardi, mual, muntah, gatal, nyeri kepala, pusing, telinga berdenging, gangguan buang air besar dan kejang.^{14,15,16}

II.2. PATOFISIOLOGI NYERI

Nyeri merupakan gejala umum dari hampir setiap penyakit, bersifat subyektif, dan disertai konsekuensi psikologis bervariasi, menyebabkan nyeri memiliki definisi bermacam-macam. Nyeri merupakan suatu pengalaman hidup kompleks, sinyal neurologis yang berasal dari jaringan tubuh terluka akan menyatu dengan emosi dan pikiran yang berproses menghasilkan pengalaman nyeri⁴. Nyeri juga merupakan suatu sensasi tidak nyaman yang dirasakan timbul dari bagian tubuh tertentu, yang disebabkan proses yang merusak atau berpotensi merusak jaringan tubuh^{17,18}. Nyeri berarti pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan yang berhubungan dengan terjadinya kerusakan jaringan atau yang cenderung merusak jaringan^{18,19,20}.

Luka irisan bedah termasuk nyeri klinis. Pada nyeri klinis terjadi perubahan kepekaan sistem saraf terhadap rangsang nyeri, sebagai akibat kerusakan jaringan yang disertai proses inflamasi, terlokalisasi, hilang bila inflamasi dan jaringan sembuh. Nyeri klinis termasuk nyeri akut, yaitu reaksi sensoris sistem nosiseptif mendadak yang merupakan sinyal mekanisme pertahanan tubuh. Nyeri akut dipicu oleh kerusakan somatik atau viseral dengan lama berlangsungnya bersamaan dengan penyembuhan luka.^{3,19,21,22}

Menurut McCance (1994) nyeri dan cemas secara langsung dapat menimbulkan stres pada sistem imun, atau lewat peptida hipotalamik, pituitari dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis. Substansi yang merupakan penghubung antara kedua sistem otak dan sistem imun adalah CRH, ACTH, β -endorfin, substansi P dan masih banyak lagi. Otak memberikan respon terhadap stres dengan melepas CRH yang dilakukan oleh PVN dan diperkirakan berperan sebagai mediator primer dan beberapa perubahan yang diinduksi stres. Perubahan tersebut termasuk aktivasi aksis HPA dan aksis SAM (*Sympathetic Adrenal Medullary*).^{10,23}

Dalam keadaan stres dan nyeri berat, β -endorfin yang dilepas pituitaria kadarnya juga meningkat dan mempunyai sifat mensupresi makrofag, sehingga aktivitas makrofag yang dipengaruhi IFN γ lebih menurun lagi. Penurunan aktivitas makrofag akan berakibat pada sitokin yang dilepaskan makrofag seperti TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, TGF β aktivitasnya juga ikut menurun. Sel TH₃ yang didiferensiasi dari CD⁴⁺, karena pengaruh supresi kortisol, aktivitasnya juga menurun sehingga TGF β yang diproduksi TH₃, jumlah dan aktivitasnya juga ikut menurun. Padahal TGF β mempunyai peran meningkatkan matrik ekstraseluler (ECM) dan meningkatkan kolagenasi, sehingga apabila TGF β menurun, sitokin yang mempunyai peran penyembuhan luka kadarnya ikut menurun, sehingga berakibat terjadi hambatan kesembuhan luka.^{3,10,21,23}

Kerusakan di jaringan kulit atau jaringan perifer menyebabkan terlepasnya mediator kimiawi dan mensensitisasi nosiseptor sehingga terjadi penurunan nilai ambang. Mediator lain : bradikinin, substansi P, turut berpengaruh dan timbul impuls nosiseptif. Terjadilah proses transmisi, yang mengantar impuls nosiseptif melalui

serabut aferen primer nosispetif dari perifer lewat radiks posterior menuju kornu posterior medula spinalis. Dalam kornu posterior terdapat sistem modulasi impuls nosiseptif yang disebut gerbang kendali nyeri (*gate control theory of pain*). Gerbang kendali nyeri berperan sebagai modulator terhadap semua impuls nosiseptif yang masuk, dengan memperbesar atau menghambat impuls. Serabut fasikulus desenden keluar dari otak berjalan menuju gerbang kendali nyeri menuju setiap segmen medula spinalis. Serabut ini berfungsi membantu menghambat impuls nosiseptif yang berjalan dari perifer menuju sentral dan melewati gerbang kendali nyeri. Apabila intensitas impuls nosiseptif melampaui ambang sel transmisi T, maka impuls nosispetif akan berjalan mengikuti sistem aksi menuju pusat supraspinal untuk dipersepsi di pusat somatosensoris sebagai pengalaman nyeri .^{3,18,23}

II.3. PENYEMBUHAN LUKA

Rangsang eksogen dan endogen dapat menimbulkan kerusakan sel, dan selanjutnya memicu reaksi vaskuler kompleks pada jaringan ikat yang ada pembuluh darahnya. 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 nyeri.^{3,8,24}

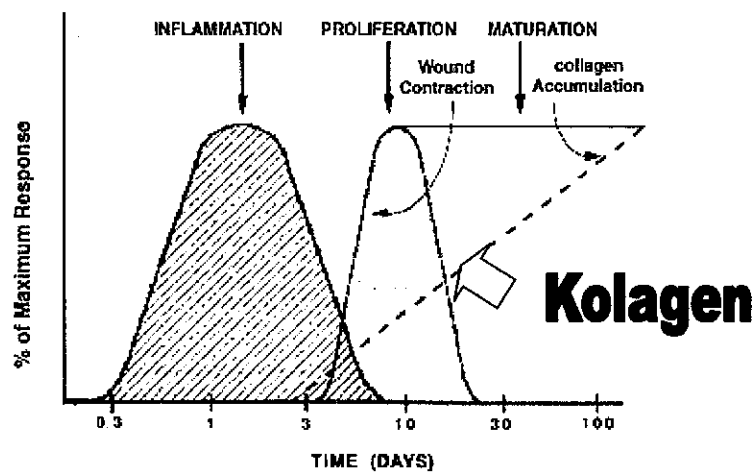
Penyembuhan luka merupakan proses terus menerus dari peradangan dan perbaikan, dimana sel-sel inflamasi, epitel, endotel, trombosit dan fibroblas keluar secara bersamaan dari tempatnya semula dan berinteraksi untuk mengembalikan

kerusakan. Kerusakan jaringan akan diikuti reaksi kompleks dalam jaringan pengikat yang mempunyai pembuluh darah. Sel dalam jaringan rusak akan melepaskan mediator kimiawi yaitu kemoatraktan dan sitokin, yang mempunyai daya kemotaktik, mampu menarik lekosit dalam sirkulasi kapiler. Netrofil akan tertarik dan terjadi akumulasi mendekati sel endotel dinding venula. Proses ini disebut *marginasi*. Akumulasi netrofil akan menempel pada permukaan endotel karena adanya molekul adesi yang dilepaskan oleh endotel karena pengaruh IL 1 yang diproduksi netrofil.^{8,10,26,27}

Molekul adesi tersebut antara lain E-selektin, ICAM 1, ICAM 2. Selanjutnya netrofil akan bergerak menggelinding pada permukaan endotel akibat daya dorong aliran plasma. Perlekatan netrofil pada endotel makin kuat dan bergerak aktif secara *diapedesis*, kemudian berhenti dan mengeluarkan *pseudopodia*, mengerutkan diri menyisip lewat celah antar membran basalis sel endotel untuk keluar *ekstravasasi* dan transmigrasi meninggalkan kapiler menuju jaringan interstitial yang rusak.^{6,7,25,26}

Sitokin bersama faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF aktif berperan melaksanakan proses penyembuhan. Beberapa macam sitokin terlibat dalam proses penyembuhan yaitu : TNF α , IL 1, IL 6, IL 8 dan TGF β . Pada inflamasi kronis TGF β terlibat dalam pertumbuhan fibrosis.⁶ Dalam keseimbangan antara deposisi dan degradasi fibrin fungsi sitokin keseluruhan dapat menggeser keseimbangan tersebut ke arah residu fibrin.^{10,11,28}

II.3.1. Fase penyembuhan luka



Gambar 1. Modifikasi dari **Wound healing** (dikutip dari <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm> Kolagen berperan pada fase akhir inflamasi sampai fase maturasi

II.3.1.1. Fase inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada hari 0 – 5. Proses penyembuhan terjadi pada saat terjadi luka. Luka karena trauma atau luka karena pembedahan mengakibatkan kerusakan pada struktur jaringan dan mengakibatkan perdarahan. Pada awalnya darah akan mengisi jaringan yang cedera dan terpaparnya darah terhadap kolagen akan mengakibatkan terjadinya degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor Hageman. Hal ini kemudian akan memicu sistem biologis lain seperti 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 di daerah luka. Hal

ini menyebabkan edema dan kemudian menimbulkan pembengkakan dan nyeri pada awal terjadinya luka. Poli morfo nuklear (PMN) adalah sel pertama yang menuju ke tempat terjadinya luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncaknya pada 24 – 48 jam. Fungsi utamanya adalah memfagositosis bakteri yang masuk. Pada penyembuhan luka normal tampaknya kehadiran sel-sel ini tidak begitu penting sebab penyembuhan luka dapat terjadi tanpa keberadaan sel-sel ini. Adanya sel ini menunjukkan bahwa luka terkontaminasi bakteri. Bila tidak terjadi infeksi sel-sel PMN berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga.
6,9,11,12

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Muncul pertama 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3 . Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN 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. Sebaliknya dari PMN, makrofag dan limfosit T penting keberadaanya pada penyembuhan luka normal. Makrofag seperti halnya netrofil, memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Zat ini mempermudah terbentuknya sel inflamasi tambahan yang membantu makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan. Makrofag juga melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi.^{6,9,12}

II.3.1.2 Fase proliferasi

Fase ini terjadi pada hari ke 3 – 14. Bila tidak ada kontaminasi atau infeksi yang bermakna, fase inflamasi berlangsung pendek. Fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, yang bersamaan dengan timbulnya kapiler baru tertanam dalam jaringan longgar ekstra seluler dari matriks kolagen, fibronektin 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 memproduksi kolagen dalam jumlah besar, kolagen ini berupa glikoprotein berantai tripel, unsur utama matriks luka 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. Penumpukan kolagen pada saat awal terjadi berlebihan kemudian fibril kolagen mengalami reorganisasi sehingga terbentuk jaringan reguler sepanjang luka. Fibroblas juga menyebabkan matriks fibronektin, asam hialuronik dan glikosaminoglikan.

6,8,29,30

Revaskularisasi dari luka terjadi secara bersamaan dengan fibroplasia. Tunas-tunas kapiler tumbuh dari pembuluh darah yang berdekatan dengan luka. Tunas-tunas kapiler ini bercabang di ujungnya kemudian bersatu membentuk lengkung kapiler dimana darah kemudian mengalir. Tunas-tunas baru muncul dari lengkung kapiler membentuk pleksus kapiler. Faktor-faktor terlarut yang menyebabkan angiogenesis ini masih belum diketahui. Tampaknya proses ini terjadi dari kombinasi proliferasi dan migrasi. Mediator pertumbuhan sel endotelial ini dan kemotaksis termasuk sitokin yang dihasilkan trombosit, makrofag dan limfosit pada luka, tekanan oksigen

yang rendah, asam laktat dan amin biogenik. Sitokin merupakan stimulan potensial untuk pembentukan formasi baru pembuluh darah termasuk *basic fibroblast growth faktor* (bFGF), asidic FGF (aFGF), *transforming growth factor* α β (TGF α β) dan *epidermal growth factor* (eFGF). FGF pada percobaan *invivo* merupakan substansi poten dalam neovaskularisasi.^{6,12}

Proses tersebut terjadi dalam luka, sementara itu pada permukaan luka juga terjadi restorasi integritas epitel. Reepitelisasi ini terjadi 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. Sel basal marginal pada tepi luka menjadi longgar ikatannya dari dermis di dekatnya, membesar dan bermigrasi ke permukaan luka yang sudah mulai terisi matriks sebelumnya. Sel basal pada daerah dekat luka mengalami pembelahan yang cepat dan bermigrasi dengan pergerakan menyilang satu dengan yang lain sampai defek yang terjadi tertutup semua. Ketika sudah terbentuk jembatan, sel epitel yang bermigrasi berubah bentuk menjadi lebih kolumnar dan meningkat aktifitas mitotiknya. Proses reepitelisasi sempurna 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 faktor yang diduga berperan adalah EGF, TGF β , Bfgf, PDGF dan *insulin like growth factor* (IGF λ).^{6,8}

II.3.1.3. Fase maturasi

Fase ini berlangsung dari hari ke 7 sampai dengan 1 tahun. Segera setelah matrik ekstrasel terbentuk, dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronektin. Hal ini tidak hanya menghasilkan migrasi sel substratum dan

pertumbuhan sel ke dalam tetapi juga menyebabkan penumpukan kolagen oleh fibroblas. Terbentuk asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar berperan dalam pembentukan matrik ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentuk matrik. Serabut kolagen pada permulaan terdistribusi acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel-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 matrik 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 penyembuhan luka tetap kurang dibanding dengan kulit yang tidak pernah terluka, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh.^{6,11,29}

Pengembalian kekuatan tegangan berjalan perlahan karena deposisi jaringan kolagen terus menerus, remodeling serabut kolagen membentuk bundel-bundel kolagen lebih besar dan perubahan dari *cross linking* inter molekuler. Remodeling kolagen selama pembentukan jaringan parut tergantung pada proses sintesis dan katabolisme kolagen yang berkesinambungan. Degradasi kolagen pada luka dikendalikan oleh enzim kolagenase . Kecepatan tinggi sintesis kolagen mengembalikan luka ke jaringan normal dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. Remodeling aktif jaringan parut akan terus berlangsung sampai 1 tahun dan tetap berjalan dengan lambat seumur hidup.^{6,29,30,31}

II.4. KOLAGEN

Kolagen memegang peranan yang sangat penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis.^{29,30}

Kolagen adalah protein utama yang menyusun komponen matrik ekstraseluler dan merupakan protein yang paling banyak ditemukan di dalam tubuh manusia. Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai α polipeptida.²⁹

Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan sitokin yaitu PDGF, FGF, TGF β dan IL1, IL 4, IgG1 yang diproduksi oleh leukosit dan limfosit pada saat sintesis kolagen. Pada proses remodeling jaringan faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF β dan IL 1, TNF α akan menstimulasi sintesis kolagen serta jaringan ikat lain yang selanjutnya sitokin dan faktor pertumbuhan memodulasi sintesis dan aktivasi metaloproteinase, suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen ECM. Hasil dari sintesis dan degradasi ECM merupakan remodeling kerangka jaringan ikat, dan struktur ini merupakan gambaran pokok penyembuhan luka pada inflamasi kronis.

II.4.1. Sintesis kolagen

Sintesis kolagen secara berurutan meliputi kombinasi dari asam amino ke bentuk rantai yang bergabung membentuk molekul, dan kemudian bergabung untuk membentuk *fibril-fibril* yang menyatu kedalam *bundle*. Fibroblas merupakan tipe sel

utama untuk sintesis kolagen. Tahap pertama sintesis berada pada intraseluler, untuk menghasilkan molekul prokolagen dimana dalam keadaan aktif berada di ruang ekstraseluler. Sintesis di intraseluler terjadi di nukleus dimana gen-gen diaktifkan dan terjadi perubahan mRNA, khas untuk rantai polipeptida tunggal. mRNA masuk kedalam sitoplasma dan diubah pada ribosom dari retikulum endoplasma dan secara simultan terjadi sintesis rantai polipeptida *triple*. Tiga rantai α yang identik sebagai kolagen tipe III dan tiga rantai yang berbeda sebagai tipe I. Prokolagen selanjutnya meninggalkan sel, kemudian beberapa asam amino membelah secara enzimatis membentuk tropokolagen. Tropokolagen inilah yang secara definitif disebut molekul kolagen. Molekul-molekul ini secara spontan bersatu kedalam *fibril-fibril* yang selanjutnya mengalami *cross-linking* membentuk yang lebih tebal atau *bundle*. Kolagen disintesis oleh fibroblas dan juga oleh kondroblas, osteoblas, otot polos, sel endotel dan sel epitel.^{8,29} Prolyl hydroxylase merupakan salah satu enzim yang membatasi sintesa kolagen. Substrat dan kofaktor seperti besi, α -ketoglutarat, asam askorbat, dan oksigen juga merupakan faktor yang penting yang menyertai proses ini.³⁰

II.5. PERANAN KOLAGEN DALAM PROSES PENYEMBUHAN LUKA

Penyembuhan luka adalah proses yang kompleks dan berkesinambungan. Hemostasis atau penghentian perdarahan adalah proses pertama dalam proses penyembuhan luka. Trombosit dan faktor-faktor pembekuan merupakan faktor hemostatik intravaskuler yang utama. Kolagen merupakan agent hemostatik yang sangat efisien, sebab trombosit melekat pada kolagen, membengkak dan melepaskan substansi yang memulai proses hemostasis. Interaksi kolagen-trombosit tergantung

pada tingkat polimerisasi dari maturasi kolagen dan pengaruh positif pada molekul kolagen.^{29,30,31,32}

Kolagen dapat juga membantu agregasi trombosit oleh karena kemampuannya untuk mengikat fibronektin. Mekanisme yang pasti dari interaksi kolagen sepenuhnya belum diketahui secara jelas, tetapi data yang pasti menunjukkan bahwa interaksi kolagen dan trombosit merupakan tahap pertama terjadinya proses penyembuhan yaitu proses hemostasis.²⁹

Hemostasis kemudian diikuti dengan vasokonstriksi dan vasodilatasi. Vasokonstriksi berlangsung \pm 5 -10 menit dan mengurangi keluarnya darah dari daerah luka. Selama vasodilatasi, daerah non injuri menjadi lebih permeabel dan terjadi perembesan hormon, protein plasma, elektrolit, antibodi, cairan dan lekosit PMN. Hal ini berlangsung beberapa jam. Vasokonstriksi dan vasodilatasi diikuti dengan pembersihan daerah luka. Terjadi akumulasi yang cepat dari lekosit PMN dan makrofag pada tempat injuri. Kolagen mempunyai kemampuan kemotaksis terhadap monosit. Monosit seperti makrofag berfungsi memfagosit daerah luka dan membersihkan debris. Menurunnya jumlah makrofag akan memperlambat pembersihan daerah luka. Makrofag akan menarik fibroblas ke tempat luka dan mulai terjadi sintesis kolagen.^{29,30,31}

Fibroblas merupakan komponen yang paling banyak pada jaringan granulasi. Sintesis dan deposit kolagen merupakan saat yang penting pada fase proliferasi dan penyembuhan luka secara umum. Kolagen disekresi ke ruang ekstraseluler dalam bentuk prokolagen. Bentuk ini kemudian membelah diri pada segmen terminal dan disebut tropokolagen. Tropokolagen dapat bergabung dengan molekul tropokolagen lainnya membentuk filamen kolagen. Filamen – filamen ini kemudian bergabung

membentuk *fibril* . *Fibril-fibril* kolagen ini selanjutnya bergabung membentuk serabut-serabut kolagen. Bentuk filamen, *fibril*, dan serabut terjadi di dalam matrik glikosaminoglikan, asam hialuronidase, chondroitin sulfat, dermatan sulfat dan heparin sulfat yang dihasilkan oleh fibroblas. Sintesa kolagen dimulai hari ke-3 setelah injuri dan berlangsung secara cepat sekitar minggu ke 2 – 4. Sintesis kolagen dikontrol oleh kolagenase dan faktor- faktor lain yang merusak kolagen sebagai kolagen yang baru.^{8,12,29}

Remodeling kolagen selama fase maturasi tergantung pada berlangsungnya sintesis kolagen dan adanya degradasi kolagen. Kolagenase dan metalloproteinase di dalam luka membuang kelebihan kolagen sementara sintesis kolagen yang baru tetap. Selama remodeling, kolagen menjadi lebih terorganisir. Fibronectin secara bertahap menghilang dan asam hialuronidase dan glikosaminoglikan diganti tempatnya oleh proteoglikan. Kolagen tipe III tempatnya digantikan oleh kolagen tipe I. Air diserap dari *scar*. Pada saat ini serabut-serabut kolagen menutup bersama, menyebabkan kolagen *cross-linking* dan akhirnya mengurangi ketebalan *scar*. Kolagen intermolekul dan intramolekul *cross-link* menghasilkan peningkatan kekuatan luka.^{10,29,30}

II.6. PENGARUH FAKTOR SISTEMIK DAN LOKAL DALAM PROSES PENYEMBUHAN LUKA

Proses inflamasi dan proses perbaikannya (*repair*) berjalan bersamaan, hanya arahnya yang berlawanan . Terdapat sejumlah faktor sistemik dan faktor lokal yang dapat mengganggu proses penyembuhan luka.⁶

Faktor-faktor tersebut antara lain, faktor sistemik :

1. Nutrisi, pengaruhnya sangat menonjol. Defisiensi protein dan vitamin C mengganggu sintesis kolagen dan memperlama penyembuhan
2. Status metabolik, misalnya diabetes melitus
3. Status sirkulasi darah
4. Hormon glukokortikoid mempunyai pengaruh anti inflamasi, dapat mempengaruhi komponen inflamasi dan fibroplasia, sehingga dapat mengganggu sintesis kolagen

Faktor lokal

1. Infeksi, merupakan penyebab tunggal keterlambatan penyembuhan
2. Faktor mekanik misal mobilisasi awal, memperlambat penyembuhan luka
3. Benda asing seperti benang jahitan yang tidak terresorpsi, fragmen baja, pecahan tulang, merupakan halangan untuk penyembuhan luka
4. Macam, lokasi dan ukuran besarnya luka, mempengaruhi penyembuhan

Komplikasi penyembuhan luka timbul karena beberapa penyebab antara lain ¹⁰

1. Pembentukan jaringan parut tidak cukup
2. Pembentukan komponen perbaikan berlebihan
3. Terjadinya kontraktur

IL.7. PENGARUH ANESTESI LOKAL TERHADAP PENYEMBUHAN LUKA OPERASI

Nyeri secara langsung dapat menimbulkan stress pada sistem imun, atau lewat peptida hipotalamus, pituitari dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis. Substansi yang merupakan penghubung antara kedua sistem, otak dan sistem imun, adalah CRH (*Cortitrophin Releasing Hormon*), ACTH, β endorfin, substansi P, dan

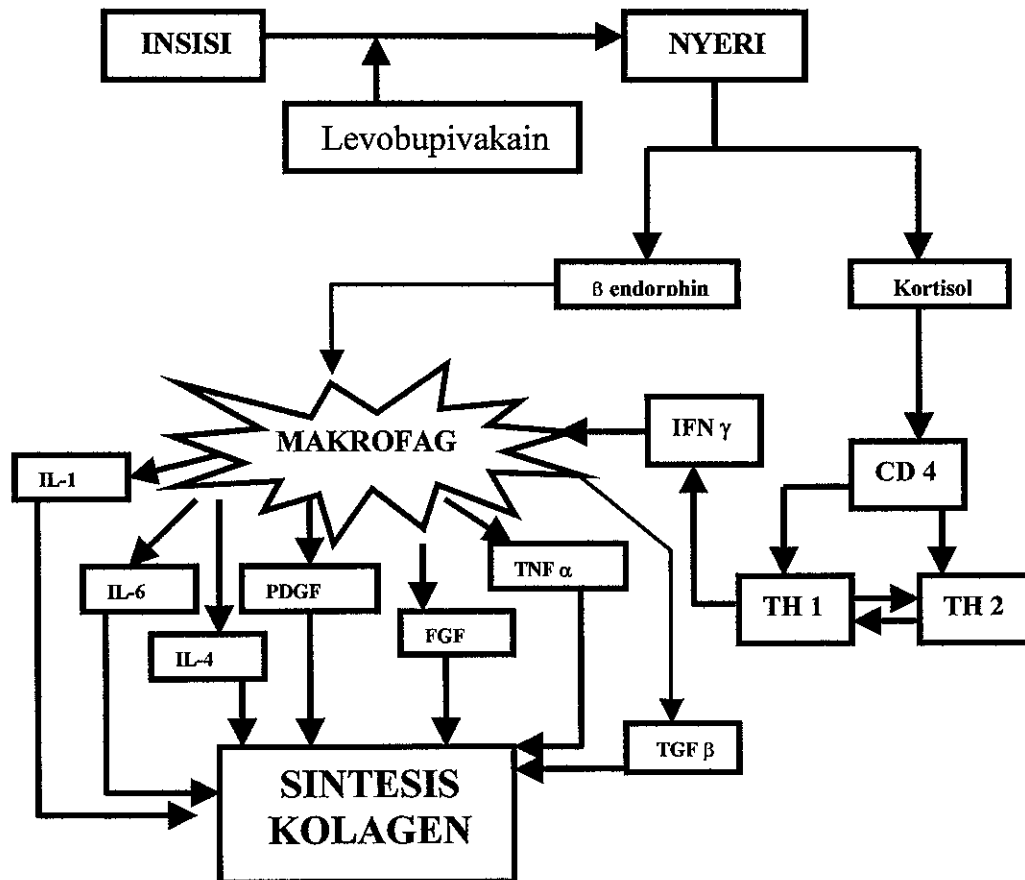
lain-lain. Otak memberikan respon terhadap stress dengan melepas CRH yang dilakukan oleh PVN (*Paraventricularis Nukleus*), dan diperkirakan berperan sebagai mediator primer dari beberapa perubahan yang diinduksi nyeri. Perubahan tersebut termasuk aktivasi aksis HPA (*Hipotalamus-Pituitaria-Adrenal*) dan aksis SAM (*Simpatetik Adrenal Medulary*). 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.¹⁰

Telah dilaporkan beberapa efek anestesi lokal terhadap proses penyembuhan luka. Cassuto dkk melaporkan bahwa pemakaian anestetik lokal secara topikal dan sistemik pada luka bakar akan menghambat ekstrasvasasi plasma pada tikus. Sedangkan Brofeldt dkk melaporkan penggunaan lidokain krim 5 % pada luka bakar parsial dengan konsentrasi yang dinaikkan sampai 2,25 mg/cm² berhubungan dengan berkurangnya nyeri, hilangnya komplikasi infeksi maupun alergi serta proses penyembuhan luka yang baik. Schimidt dan Rosenktanz melaporkan bahwa lidokain 2 % menghambat pertumbuhan semua bakteri patogen kecuali *streptococcus aureus* dan *pseudomonas aeruginosa*. De Amici dkk melaporkan bahwa bupivakain menghambat replikasi virus, sedang Rossenberg PH dkk melaporkan adanya efek bakteriostatik dan antimikroba bupivakain. Vintar dkk melaporkan penggunaan anestesi lokal bupivakain lewat kateter pada luka efektif mengurangi nyeri setelah operasi hernia inguinalis dan penyembuhan lukanya lebih baik.^{32,33,34,35}

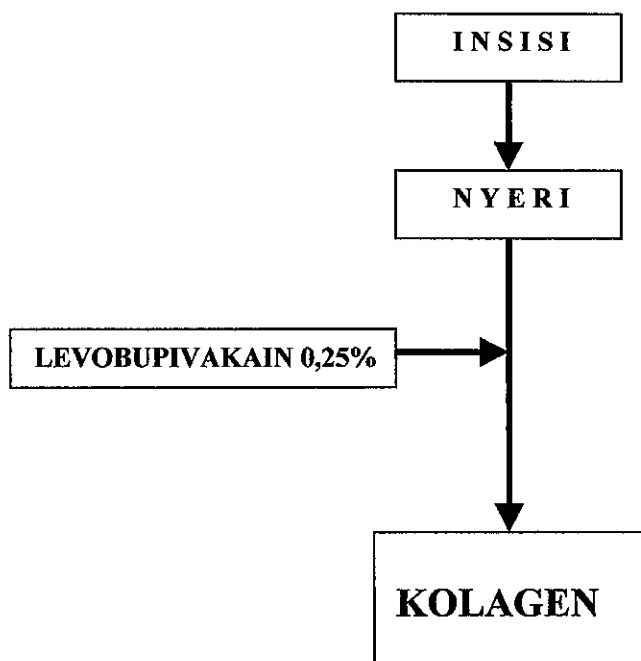
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

III.1. Kerangka teori



III.2. Kerangka Konsep



III.3. HIPOTESIS

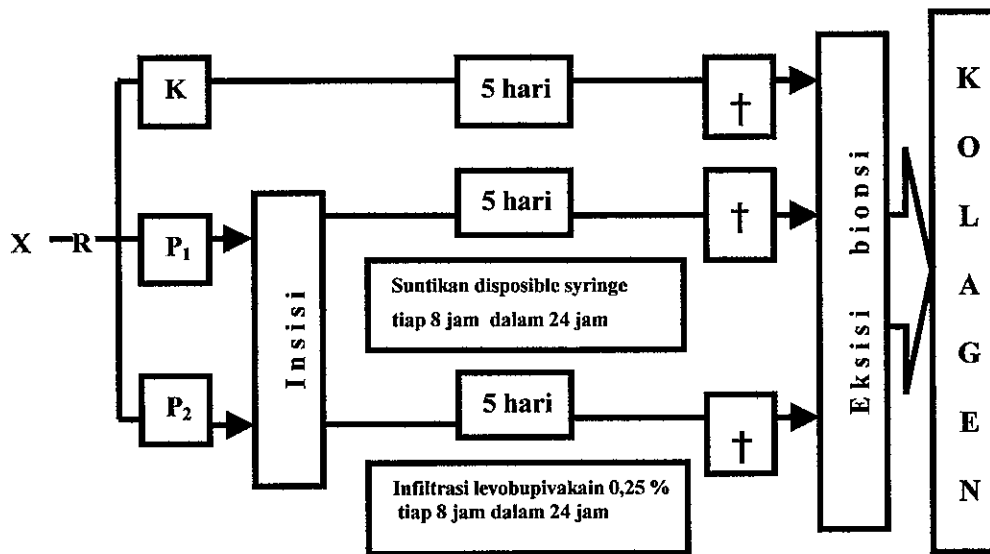
Terdapat perbedaan tampilan kolagen di sekitar luka insisi pada tikus yang diberi infiltrasi penghilang nyeri Levobupivakain dengan yang tidak diberi Levobupivakain.

BAB IV
METODE PENELITIAN

IV.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Randomized Post test only control group design*” yang menggunakan tikus *Wistar* percobaan sebagai obyek penelitian. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dengan keluaran (*outcome*) berupa tampilan kolagen

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Keterangan :

X → R : Masa adaptasi 7 hari

R : Randomisasi

† : Tikus dimatikan dan dilakukan eksisi biopsi di daerah punggung

- K : Kelompok kontrol , sebagai pembanding gambaran kolagen tikus *Wistar* tanpa dilakukan insisi dan tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain 0,25%
- P₁ : Kelompok perlakuan I, tikus *Wistar* yang dilakukan insisi tanpa diberikan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain 0,25% dan diberi suntikan dengan disposable syringe setiap 8 jam pada 24 jam pertama
- P₂ : Tikus yang diberi perlakuan setelah dilakukan insisi kemudian diberi infiltrasi anestetik lokal levobupivakain 0,25 % setiap 8 jam pada 24 jam pertama

IV.2. Sampel penelitian

Hewan coba adalah tikus *Wistar* yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Kriteria inklusi:

- a. Keturunan murni
- b. Umur dua sampai dua setengah bulan
- c. Berat badan 250-300 gram.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria eksklusi:

- a. Sakit selama masa adaptasi 7 hari
- b. Infeksi selama perlakuan berlangsung
- c. Mati selama perlakuan berlangsung.

Besar sampel menurut WHO adalah 5 ekor³⁶. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 15 ekor, tiap kelompok 5 ekor.

Randomisasi: 15 tikus dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu:

Kelompok Kontrol (K) : 5 tikus

Kelompok Perlakuan (P₁) : 5 tikus

Kelompok Perlakuan (P₂) : 5 tikus

IV.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada tikus sampai tindakan eksisi biopsi dilakukan di Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Proses blok parafin, pewarnaan dengan metode Van Giesson dan interpretasi hasil pemeriksaan gambaran kolagen dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Biomedik FK UNS Surakarta .

IV.4. Variabel penelitian

IV.4.1. Variabel bebas

Pemberian infiltrasi levobupivakain

IV.4.2. Variabel tergantung

Hasil pemeriksaan tampilan kolagen

Interpretasi hasil tampilan kolagen didapatkan dengan melakukan *cropping* (pembatasan area) kolagen yang tampak pada lima lapang pandang dari setiap preparat dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri BX41 yang dilengkapi dengan kamera digital dan memakai software OLYSIA. Tampilan kolagen dinyatakan dalam *pixel*². Hasil pengamatan tampilan kolagen pada lima lapang pandang dari masing-masing sampel kemudian dirata-rata.

Dari data kuantitatif tampilan kolagen yang didapatkan dari hasil pembacaan pada penelitian ini kemudian dilakukan penilaian makna kualitatif dengan membuat range dari tampilan kolagen yang terendah ke tampilan kolagen yang tertinggi, kemudian di bagi menjadi 3 range yaitu positif kuat, positif sedang dan positif lemah

Contoh: Tampilan kolagen terendah : 25 pixel²

Tampilan kolagen tertinggi : 100 pixel²

Nilai Range : $100 - 25 = 75 \rightarrow$ dibagi 3 $\rightarrow 25$



Interpretasi hasil tampilan kolagen secara kualitatif :

1. Hasil tampilan kolagen antara 25 – 50 : Positif lemah
2. Hasil tampilan kolagen antara 51 – 75 : Positif sedang
3. Hasil tampilan kolagen antara 76 – 100 : Positif kuat

IV.5. Definisi operasional

- 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%. di sekitar luka \pm 0,5 cm dari tepi luka dengan spuit tuberkulin sepanjang luka insisi dengan dosis 0,0126 mg/kgBB

- Tampilan kolagen adalah daerah berwarna merah (pewarnaan Van Giesson). Jumlah kolagen diukur dengan melakukan *cropping* (pembatasan area) menggunakan mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang dilengkapi dengan kamera digital DP-70 dan memakai software OLYSIA dengan pembesaran 400 kali. Tiap sediaan diperiksa pada luas pandang 5 area dan dinyatakan dalam *pixel*². Prosedur pembacaan dilakukan sebagai berikut :

Setelah sediaan diletakkan di mikroskop, dipilih lapang pandang (sesuai dengan pola pembacaan pada alur kerja) dengan pembesaran 400 kali. Pada monitor komputer yang dilengkapi software OLYSIA tampak beberapa menu pilihan. Untuk menilai gambaran kolagen dipilih menu *Measure*. Dari menu ini dipilih *option* area, selanjutnya dengan menggunakan *mouse* komputer dilakukan *cropping* pada daerah yang berwarna merah sesuai dengan gambaran kolagen pada pulasan Van Giesson.. Jika gambaran kolagen sudah di *cropping*, maka akan keluar dalam tampilan komputer nilai tampilan kolagen yang dinyatakan dalam satuan *pixel*². Data gambar dan hasil pembacaan kemudian disimpan dalam file.

- Pemeriksaan histokimia adalah suatu metode pemeriksaan pewarnaan jaringan berdasarkan reaksi kimia yang terjadi antara jaringan dan zat kimia yang terdapat pada bahan pewarna. Pada penelitian ini menggunakan pewarnaan Van Gieson

IV.6. Bahan dan alat penelitian

V.6.1. Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah tikus *Wistar* dengan umur 2 sampai 2,5 bulan dan berat 250-300 gram. Tikus *Wistar* adalah salah satu galur ratus-ratus, berasal dari benua Amerika. Banyak digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian di bidang kedokteran, pengobatan, dan kedokteran hewan (Ensik.Nas.Ind.1991 hal. 308).

Tikus diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan standar dan minum secukupnya. Pakan standar yang diberikan dibuat oleh Laboratorium Pangan dan Gizi UGM (Wuryastuti *cit* Mulyata. St, 2002)

IV.6.2. Bahan dan alat untuk insisi

Perangkat operasi minor :

- Pisau scalpel
- Pinset *chirurgis*
- Gunting
- Benang sutera dan cat-gut No.000
- Tang pemegang jarum
- Doek steril

IV.6.3. Bahan dan alat untuk infiltrasi

- a. Disposable syringe 1cc
- b. Larutan bupivakain 0,25%

V.6.4. Bahan dan alat untuk pemeriksaan histokimia

- a) Formalin buffer 10%.
- b) Alkohol 50% , 70 % , 80% , 96% , absolut.
- c) Xylol.
- d) Parafin cair (Histoplast).
- e) Bahan pengecatan Van Gieson.
- f) Balsam Kanada .

(Larssol, 1991; Wasito, 1991).

IV.7. Pelaksanaan penelitian

IV.7.1. Cara perlakuan

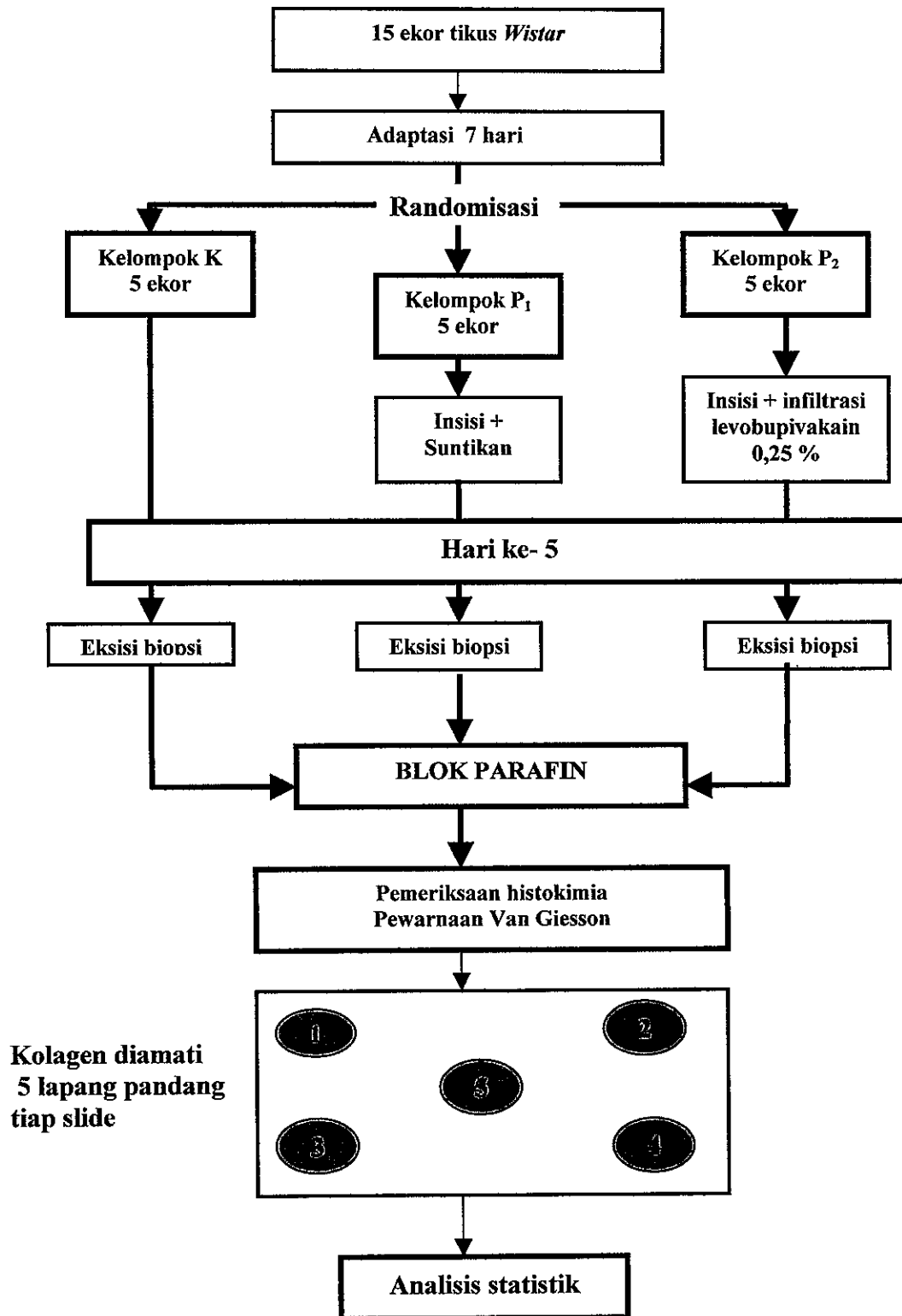
Sejumlah 15 ekor tikus Wistar betina dilakukan adaptasi di laboratorium dengan kandang tunggal dan diberi pakan standar secukupnya selama 7 hari. Sesudah masa adaptasi 7 hari berakhir, tikus dibagi secara acak menjadi 3 kelompok (K, P₁, P₂) masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang ditentukan secara acak, kemudian dipindahkan ke dalam kandang tunggal setiap kelompoknya.

Tikus kelompok K tidak diberikan perlakuan, kelompok P₁ dan kelompok P₂ dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether . Pada tikus kelompok Perlakuan I (P₁), sesudah terbius bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan betadin. 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 *nylon* steril nomor 0000. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan betadin dan dirawat. Pasca bedah diberikan penicillin oil 15 mg , intra muskular. Pada kelompok perlakuan II (P₂), sesudah tikus terbius bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi

menggunakan betadin. Selanjutnya dibuat irisan sepanjang 2 cm dan kedalaman sampai subkutis. Luka irisan dibersihkan dan dioles larutan betadin, kemudian jaringan subkutis diberikan infiltrasi levobupivakain 0,25% dengan dosis 0,0126mg/kgBB dan luka ditutup dengan 5 jahitan tunggal sederhana menggunakan benang *nylon* steril nomor 0000. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan betadin dan dirawat. Pasca bedah diberikan penicillin oil 15 mg, intra muskular. Setelah 8 jam, tikus pada kelompok perlakuan II (P₂) diberikan infiltrasi ulang levobupivakain 0,25% pada jaringan subkutis kedua daerah luka insisi, sedangkan pada kelompok Perlakuan I (P₁) hanya dilakukan tusukan dengan jarum suntik. Hal ini dilakukan selama 24 jam pertama.

Pada hari ke 5 tikus dibius dengan menggunakan ether. Setelah tikus terbius kemudian dilakukan biopsi-eksisi pada jaringan bekas luka irisan 3 cm persegi dengan kedalaman sampai subkutis. Dari masing masing kelompok (K, P₁ dan P₂) diambil 5 jaringan eksisi biopsi, dilakukan blok parafin kemudian dibuat preparat histokimia dengan pewarnaan Van Giesson. Kemudian sediaan diperiksa dibawah mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang dilengkapi dengan kamera digital DP-70 dan memakai software OLYSIA dengan pembesaran 400 kali dari satu sediaan histokimia diamati 5 area. Tampilan kolagen pada tiap sediaan diukur dengan perhitungan komputer (Software Olysia). Dengan cara *cropping* komputer menghitung tampilan kolagen dalam satuan *pixel*².

IV.7.2. Alur kerja



IV.8. Prosedur pemeriksaan

IV.8.1. Prosedur eksisi-biopsi

Tikus pada setiap kelompok dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether. Kelompok K , sesudah terbius bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan betadin, kemudian diusap dengan alkohol 70% selanjutnya dibuat eksisi biopsi kira-kira 3 cm persegi. Pada kelompok P₁ dan Kelompok P₂, jaringan bekas irisan diusap dengan alkohol 70% lalu dibuat eksisi-biopsi kira-kira 3 cm persegi melintasi garis irisan dengan kedalaman sampai subkutis. Semua jaringan eksisi biopsi dibuat blok parafin kemudian dibuat preparat histokimia dengan pewarnaan Van Gieson.

IV.8.2. Prosedur pembuatan preparat histokimia

a. Fiksasi

Jaringan biopsi eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam Phospat Buffer Saline pada pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18 – 24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2 jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam

d. Embedding

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰ C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58⁰ C sampai parafin mencair.

e. Pewarnaan dengan metode Van Giesson

Metode pewarnaan ini berdasar pada 3 warna (Trichrom) yaitu asam pikrat dan asam fuchsin dengan hematoksilin. Jaringan pada kaca obyek dilakukan deparafinisasi sampai alkohol 70%, kemudian diberi larutan Hematoksilin WEIGERT (A dan B sama banyak) diamkan selama 5 menit, kemudian larutkan dalam air hangat 60⁰C agar berwarna biru kurang lebih selama 3- 10 menit. Bilas dengan aquabides dan bilas cepat dalam larutan C dengan cepat (1x celup). Kemudian dilakukan dehidrasi alkohol 96% 2x, absolut 2x, xylol 2x. Berikan Canada balsem dan tutupdengan kaca penutup.

V.9. Cara pengumpulan data

Dari masing masing kelompok pada hari ke-5 dilakukan eksisi biopsi . Jaringan eksisi biopsi difiksasi dengan buffer formalin, dibuat blok parafin kemudian dipulas dengan Van Giesson. Jumlah kolagen dihitung dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang dilengkapi dengan kamera digital DP-70 dan memakai software OLYSIA.

V.10. Analisis data

Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dahulu di-*edit*, di-*coding*, di-*entry* dalam file computer dan di-*cleaning*, setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif dan analitik.

Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (*mean* dan *median*) dan sebaran (SD) dari variabel tergantung (tampilan kolagen). Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel. Dibuat grafik *box-plot* menurut kelompok perlakuan. Untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji *Shapiro-Wilk*. Data hasil pemeriksaan kolagen dilakukan uji hipotesis dengan *One-Way ANOVA*. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 13. *for windows*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

V.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian hewan coba mengenai perbedaan tampilan kolagen disekitar luka insisi pada tikus *Wistar* yang diberi infiltrasi penghilang nyeri levobupivakain dan yang tidak diberi levobupivakain. Hewan coba yang digunakan adalah 15 ekor tikus *Wistar*, umur kurang lebih 2 – 2,5 bulan, dengan berat badan 250 - 300 gram yang dibagi menjadi 3 kelompok (K, P₁, P₂). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta mulai dari pemeliharaan tikus sampai insisi biopsi sedang pembuatan preparat histokimia serta inteprestasi hasil dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi / Biomedik Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian efek perlakuan terhadap tampilan kolagen pada hari ke lima. Hasilnya adalah sebagai berikut (tabel 5.1):

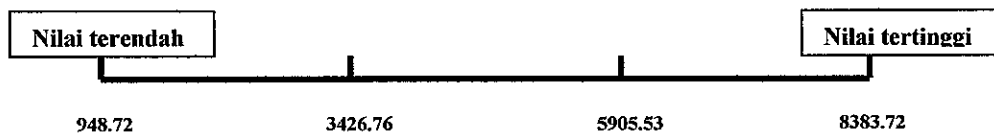
Tabel 5.1 Hasil pengamatan tampilan kolagen pada penelitian tikus *Wistar* hari kelima secara kuantitatif dan kualitatif

NO	KODE SAMPEL	PERLAKUAN	TAMPILAN KOLAGEN (KUANTITATIF) ($pixel^2$)	MAKNA TAMPILAN KOLAGEN (KUALITATIF)
1	K1.1	JARINGAN NORMAL	7854.66	Positif kuat
2	K1.2	JARINGAN NORMAL	6706.81	Positif kuat
3	K1.3	JARINGAN NORMAL	8383.72	Positif kuat
4	K1.4	JARINGAN NORMAL	8383.72	Positif kuat
5	K1.5	JARINGAN NORMAL	7512.32	Positif kuat
6	P1.1	TANPA LEVOBUIPAKAIN	2288.20	Positif lemah
7	P1.2	TANPA LEVOBUIPAKAIN	1868.21	Positif lemah
8	P1.3	TANPA LEVOBUIPAKAIN	1584.07	Positif lemah
9	P1.4	TANPA LEVOBUIPAKAIN	953.09	Positif lemah
10	P1.5	TANPA LEVOBUIPAKAIN	948.31	Positif lemah
11	P2.1	DENGAN LEVOBUIPAKAIN	7115.77	Positif kuat
12	P2.2	DENGAN LEVOBUIPAKAIN	1632.35	Positif lemah
13	P2.3	DENGAN LEVOBUIPAKAIN	3683.478	Positif sedang
14	P2.4	DENGAN LEVOBUIPAKAIN	5862.82	Positif sedang
15	P2.5	DENGAN LEVOBUIPAKAIN	3552.3	Positif sedang

V.2. Analisis hasil

Dari tabel 5.1 didapatkan hasil bahwa tampilan kolagen yang paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol (kelompok tikus sehat tanpa insisi dan tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain), sementara hasil tampilan kolagen paling rendah didapatkan pada kelompok P1 (kelompok tikus yang dilakukan insisi tanpa diberi infiltrasi anestetik lokal levobupivakain).

Dari tampilan kolagen secara kuantitatif tersebut di atas kemudian dilakukan penilaian makna tampilan kolagen secara kualitatif dengan membuat range dari tampilan kolagen tertinggi (= 8383.72) dan tampilan kolagen terendah (=948.31), kemudian dibagi menjadi 3 kelompok maka didapatkan nilai range sebagai berikut :

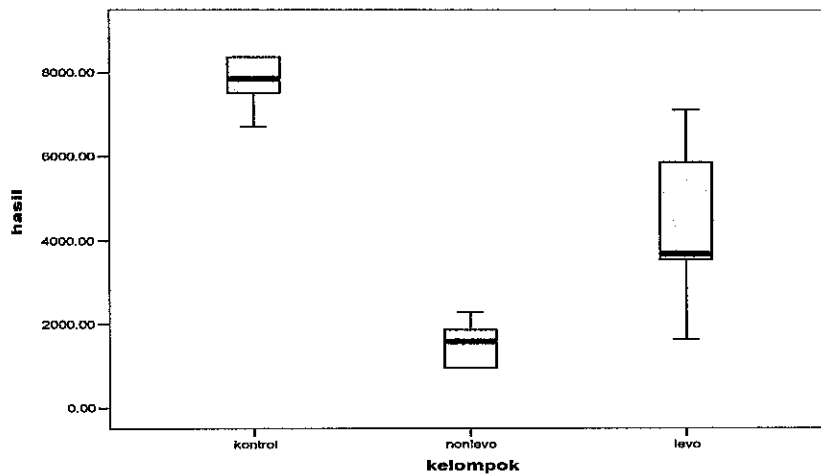


Interpretasi makna kualitatif tampilan kolagen pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Positif lemah : 948.72 – 3426.76
2. Positif sedang : 3426,77 – 5905.53
3. Positif kuat : 5905.54 – 8383.72

Tabel 5.2. Hasil analisis tampilan kolagen

Kelompok Perlakuan	N	Rerata ± SD	Median	Standar Error	Interval		Minimum	Maksimum
					Kepercayaan 95%			
					Batas Bawah	Batas Atas		
K	5	7768.25± 699.5	7854.66	312.83	6899.67	8636.8	6706.81	8383.72
P1	5	1528.37± 583.8	1584.07	261.09	803.47	2253.28	948.31	2288.20
P2	5	4369.35± 919.4	3683.48	959.23	1706.10	7032.59	1632.35	7115.77



Gambar 2. Grafik Boxplot tampilan kolagen

Dari tabel 5.2 dan gambar 2 terlihat bahwa rerata tampilan kolagen yang paling tinggi didapatkan pada kelompok K, yaitu kelompok tikus sehat yang tidak diberi perlakuan insisi maupun infiltrasi anestetik lokal levobupivakain, yaitu mencapai 7768.25 ± 699.5 , sedangkan rerata tampilan kolagen terendah pada kelompok P1, yaitu kelompok tikus yang diberi perlakuan insisi dan tidak diberikan obat levobupivakain mencapai 1528.37 ± 583.81

Setelah dilakukan analisis statistik, diketahui bahwa distribusi data tampilan kolagen pada penelitian ini berdistribusi normal (Lampiran 2), sehingga uji hipotesisnya menggunakan *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Bonfferoni*. Dari uji *ANOVA* diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada tampilan kolagen antar kelompok perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok perlakuan, dianalisis menggunakan uji *Bonfferoni*, seperti yang terdapat pada tabel 5.3 di bawah ini :

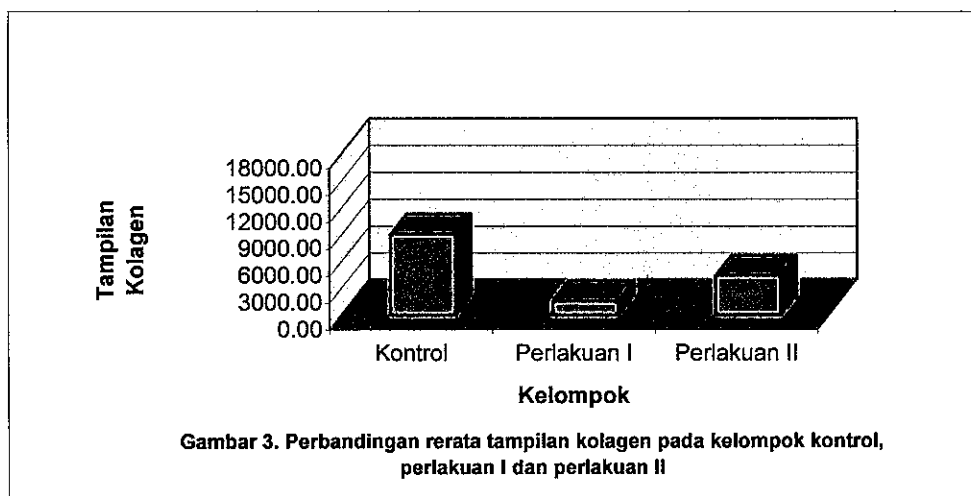
Tabel 5.3. Hasil uji Bonferroni terhadap tampilan kolagen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: hasil
Bonferroni

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	nonlevo	6239.87160*	850.94045	.000	3874.7055	8605.0377
	levo	3398.89800*	850.94045	.005	1033.7319	5764.0641
nonlevo	kontrol	-6239.8716*	850.94045	.000	-8605.0377	-3874.7055
	levo	-2840.9736*	850.94045	.018	-5206.1397	-475.8075
levo	kontrol	-3398.8980*	850.94045	.005	-5764.0641	-1033.7319
	nonlevo	2840.97360*	850.94045	.018	475.8075	5206.1397

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Dari tabel 5.3 dan gambar 3 diatas terlihat dengan jelas bahwa kelompok kontrol (tikus yang tidak dilakukan insisi dan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) dibandingkan dengan kelompok P1 (kelompok tikus yang diberi perlakuan insisi tanpa diberi infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.001$), sedangkan kelompok kontrol dibandingkan kelompok P2 (kelompok tikus yang diberi perlakuan insisi dan diberikan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) juga berbeda secara bermakna ($p = 0.005$) . Pada kelompok P1 jika dibandingkan dengan kelompok P2 juga terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0.018$) atau $p < 0.05$. Dari uji *One-way ANOVA* yang dilanjutkan dengan Uji *Bonferoni* terlihat bahwa levobupivakain dapat meningkatkan sintesa kolagen. Hal ini dapat dilihat dari rerata tampilan kolagen pada kelompok P1 dan P2 yang berbeda secara bermakna . Sementara untuk kelompok kontrol hanya untuk mengetahui gambaran kolagen pada tikus tidak stres, dimana didapatkan gambaran kolagen dalam keadaan normal yang ditunjukkan pada hasil kelompok kontrol.

BAB VI

PEMBAHASAN

Levobupivakain adalah obat anestesi lokal dengan durasi lama. Termasuk golongan amid (CONH-) yang memiliki atom karbon asimetrik dan isomer Levo(-). Levobupivakain memiliki pKa 8,1 , pKa berarti pH pada saat 50% molekul basa bebas dan 50% molekul dengan muatan ion positif. Mekanisme aksi sama dengan bupivakain atau obat anestesi lokal lain. Apabila MLAC (*minimum local analgesic concentration*) tercapai, obat akan melingkupi membran akson sehingga memblok kanal natrium dan akan menghentikan transmisi impuls saraf. ^{14,15,16}

Levobupivakain dapat digunakan untuk epidural, subaraknoid , blok pleksus brakialis, blok supra dan infra klavikuler, blok interkostal dan interskalen, blok saraf perifer, blok peribulber dan retrobulber, infiltrasi lokal, analgesi obstetri, pengelolaan nyeri setelah operasi, pengelolaan nyeri akut dan kronis. ^{14,15,16}

Nyeri berarti pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan yang berhubungan dengan terjadinya kerusakan jaringan atau yang cenderung merusak jaringan. Luka irisan bedah termasuk nyeri klinis. Pada nyeri klinis terjadi perubahan kepekaan sistem saraf terhadap rangsang nyeri, sebagai akibat kerusakan jaringan yang disertai proses inflamasi, terlokalisir, hilang bila inflamasi dan jaringan sembuh. Nyeri klinis termasuk nyeri akut, yaitu reaksi sensoris sistem nosiseptif mendadak yang merupakan sinyal mekanisme pertahanan tubuh. Menurut Mc Cance (1994) nyeri dan cemas secara langsung dapat menimbulkan stres pada sistem imun, atau lewat peptida hipotalamik, pituitari dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis. ^{18,19,20}

Dalam keadaan stres dan nyeri hebat, kadar β -endorfin yang disekresi kelenjar pituitaria meningkat dan mensupresi makrofag, sehingga aktivitas makrofag yang dipengaruhi IFN γ menurun. Penurunan aktivitas makrofag akan berakibat aktivitas sitokin yang dilepaskan makrofag seperti TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, TGF β menurun. Padahal TGF β mempunyai peran meningkatkan matrik ekstraseluler (ECM) dan meningkatkan kolagenasi, sehingga apabila TGF β menurun, sitokin yang mempunyai peran penyembuhan luka kadarnya ikut menurun, sehingga berakibat terjadi hambatan kesembuhan luka.^{3,10,21,23}

Penyembuhan luka adalah proses yang kompleks dan berkesinambungan. Hemostasis atau penghentian perdarahan adalah proses pertama dalam proses penyembuhan luka. Trombosit dan faktor-faktor pembekuan merupakan faktor hemostatik intravaskuler yang utama. Kolagen merupakan agent hemostatik yang sangat efisien, sebab trombosit melekat pada kolagen, membengkak dan melepaskan substansi yang memulai proses hemostasis.^{15,16,17,18}

Kolagen juga dapat membantu agregasi trombosit oleh karena kemampuannya untuk mengikat fibronektin. Mekanisme yang pasti dari interaksi kolagen sepenuhnya belum diketahui secara jelas, tetapi data yang pasti menunjukkan bahwa interaksi kolagen dan trombosit merupakan tahap pertama terjadinya proses penyembuhan yaitu proses hemostasis. Hal yang penting bahwa kemampuan hemostasis kolagen ini ditunjukkan oleh kenyataan bahwa waktu perdarahan akan memanjang pada kasus – kasus dengan kolagen yang abnormal.²⁹

Sintesis dan deposit kolagen merupakan saat yang penting pada fase proliferasi dan penyembuhan luka secara umum. Kolagen disekresi ke ruang ekstraseluler dalam bentuk prokolagen. Bentuk ini kemudian membelah diri pada

segmen terminal dan disebut tropokolagen. Tropokolagen dapat bergabung dengan molekul tropokolagen lainnya membentuk filamen kolagen. Filamen – filamen ini kemudian bergabung membentuk *fibril*. *Fibril-fibril* kolagen ini selanjutnya bergabung membentuk serabut-serabut kolagen. Bentuk filamen, *fibril*, dan serabut terjadi di dalam matrik glikosaminoglikan, asam hialuronidase, chondroitin sulfat, dermatan sulfat dan heparin sulfat yang dihasilkan oleh fibroblas. Sintesa kolagen dimulai hari ke-3 setelah injuri dan berlangsung secara cepat sekitar minggu ke 2 – 4. Sintesis kolagen dikontrol oleh kolagenase dan faktor- faktor lain yang merusak kolagen sebagai kolagen yang baru.^{8,12,29}

Remodeling kolagen selama fase maturasi tergantung pada berlangsungnya sintesis kolagen dan adanya degradasi kolagen. Kolagenase dan metalloproteinase di dalam luka membuang kelebihan kolagen sementara sintesis kolagen yang baru tetap. Selama remodeling, kolagen menjadi lebih terorganisir. Fibronectin secara bertahap menghilang dan asam hialuronidase dan glikosaminoglikan diganti tempatnya oleh proteoglikan. Air diserap dari *scar*. Pada saat ini serabut-serabut kolagen menutup bersama, menyebabkan kolagen *cross-linking* dan akhirnya mengurangi ketebalan *scar*. Kolagen intermolekul dan intramolekul *cross-link* menghasilkan peningkatan kekuatan luka.^{10,29,30}

Dalam penelitian ini variabel yang dipakai untuk menilai proses penyembuhan luka adalah tampilan kolagen, karena kolagen dipandang memegang peranan yang sangat penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronectin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler,

meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis.¹⁵

Pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain di daerah sekitar luka insisi pada tikus *Wistar* ternyata mampu meningkatkan sintesa kolagen yang ditandai dengan meningkatnya gambaran kolagen pada tikus *Wistar* kelompok P2 (kelompok tikus yang diberi perlakuan insisi dan diberikan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) dibanding dengan tikus *Wistar* pada kelompok P1 (kelompok tikus yang diberi perlakuan insisi tanpa diberikan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain). Hal ini dibuktikan dengan analisis data yang menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0.018$) antara kelompok P1 dengan kelompok P2.

Pemberian levobupivakain disini untuk mengurangi intensitas nyeri akut atau nyeri hebat yang diakibatkan insisi pembedahan pada punggung tikus sehingga kadar β -endorfin yang disekresi kelenjar pituitaria tidak meningkat terlalu tinggi dan makrofag akan dirangsang untuk memproduksi sitokin dan faktor pertumbuhan terutama TGF β yang berperan dalam meningkatkan matrik ekstraseluler (ECM) dan meningkatkan kolagenasi. Sementara pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain hanya diberikan dalam 24 jam pertama setelah insisi dimana nyeri akut timbul pada 24 jam pertama. Hal ini dimaksudkan karena nyeri sendiri juga sangat diperlukan dalam proses penyembuhan luka.

Dengan pemberian anestetik lokal levobupivakain ini, fase inflamasi akan dipersingkat sehingga fase proliferasi dan maturasi segera terjadi dan akan mempercepat dimulainya sintesa kolagen. Fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, yang bersamaan dengan

timbulnya kapiler baru tertanam dalam jaringan longgar ekstra seluler dari matriks kolagen, fibronektin dan asam hialuronik. Peningkatan jumlah fibroblas pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi. Fibroblas merupakan elemen utama pada proses perbaikan untuk pembentukan protein struktural yang berperan dalam pembentukan jaringan. Fibroblas juga memproduksi kolagen dalam jumlah besar, kolagen ini berupa glikoprotein berantai tripel, unsur utama matriks luka 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. Penumpukan kolagen pada saat awal terjadi berlebihan kemudian fibril kolagen mengalami reorganisasi sehingga terbentuk jaringan reguler sepanjang luka.^{6,8,29,30}

Hal ini juga didukung oleh beberapa penelitian sebelumnya, Brofeldt dkk melaporkan penggunaan lidokain krim 5 % pada luka bakar parsial dengan konsentrasi yang dinaikkan sampai 2,25 mg/cm² berhubungan dengan berkurangnya nyeri, hilangnya komplikasi infeksi maupun alergi serta proses penyembuhan luka yang baik. Schmidt dan Rosenktanz melaporkan bahwa lidokain 2 % menghambat pertumbuhan semua bakteri patogen kecuali *streptococcus aureus* dan *pseudomonas aeruginosa*. De Amici dkk melaporkan bahwa bupivakain menghambat replikasi virus, sedang Rossenberg PH dkk melaporkan adanya efek bakteristatik dan antimikroba bupivakain. Vintar dkk melaporkan penggunaan anestesi lokal bupivakain lewat kateter pada luka efektif mengurangi nyeri setelah operasi hernia inguinalis dan penyembuhan lukanya lebih baik.^{32,33,34,35}

Dari analisis data tampilan kolagen antara kelompok K (kelompok tikus yang tidak dilakukan insisi dan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) dengan kelompok

P₁ (kelompok tikus yang dilakukan insisi dan tidak diberikan infiltrasi levobupivakain) dan P₂ (kelompok tikus yang dilakukan insisi dan diberikan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain) terdapat perbedaan yang bermakna, yaitu antara kelompok K dan P₁ ($p < 0.001$) dan antara kelompok K dan P₂ ($p = 0.005$) dimana pada kelompok kontrol tampilan kolagen lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok P₁ maupun P₂, hal ini membuktikan bahwa rangsang stres / nyeri dalam penelitian ini berupa perlakuan insisi akan mempengaruhi tampilan kolagen, kejadian ini menurut Ganong,1995 bahwa stres akan meningkatkan kadar kortisol yang akibatnya dapat menghambat sintesa kolagen sehingga tampilan kolagen pada kelompok kontrol akan lebih tinggi.

Hal ini sesuai juga dengan teori bahwa sintesa kolagen dimulai hari ke-3 setelah injuri dan berlangsung secara cepat sekitar minggu ke 2 – 4. Dalam penelitian ini ambilan biopsi jaringan dilakukan pada hari ke-5 sehingga sintesa kolagen belum mencapai puncaknya walaupun proses sintesa ini sudah dimulai yaitu pada hari ke-3. Sintesis kolagen dikontrol oleh kolagenase dan faktor- faktor lain yang merusak kolagen sebagai kolagen yang baru.^{14,18} Kecepatan tinggi sintesis kolagen mengembalikan luka ke jaringan normal dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. Remodeling aktif jaringan parut akan terus berlangsung sampai 1 tahun dan tetap berjalan dengan lambat seumur hidup.^{6,29,30,31} Pencapaian kekuatan tegangan luka berjalan lambat. Sesudah 3 minggu kekuatan penyembuhan luka mencapai 20% dari kekuatan akhir. Bagaimanapun, kekuatan akhir penyembuhan luka tetap kurang dibanding dengan kulit yang tidak pernah terluka, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh.^{6,11,29}

Dalam penelitian ini terbukti bahwa pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada daerah sekitar luka insisi mampu meningkatkan sintesa kolagen dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan infiltrasi levobupivakain.

Namun demikian masih banyak keterbatasan yang dihadapi penulis dalam penelitian ini antara lain dalam menentukan makna kualitatif gambaran kolagen hanya ditentukan dengan membuat range dari hasil terendah sampai tertinggi dan hal ini hanya dapat diketahui setelah ada pembacaan hasil, sehingga tidak dapat dijadikan pedoman untuk penggolongan kualitas secara umum. Disamping itu adanya keterbatasan dana membuat penulis tidak dapat melakukan penelitian dimana waktu pengambilan biopsi jaringan luka menyesuaikan waktu dimana sintesa kolagen mencapai maksimal sehingga dapat mengamati proses penyembuhan luka secara menyeluruh.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

A. SIMPULAN

Hasil analisis tampilan kolagen menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sementara dari hasil analisis tampilan kolagen antar kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan yang bermakna, jadi pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain di daerah sekitar luka insisi pada tikus *Wistar* akan meningkatkan sintesa kolagen yang dibuktikan dengan tampilan kolagen yang meningkat.

B. SARAN

Mengingat masih banyaknya kelemahan dan keterbatasan yang penulis hadapi dalam melakukan penelitian ini, maka dari hasil penelitian ini dapat disarankan sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel lebih besar dan pengambilan jaringan dilakukan pada saat sintesa kolagen berlangsung secara cepat yaitu minggu ke 2- 4 dan juga perlu ditambahkan pengukuran *tensile strength* untuk mengetahui kekuatan luka yang merupakan ekspresi dari jumlah kolagen pada proses penyembuhan luka
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh insisi terhadap sintesa kolagen untuk menjelaskan adanya gambaran kolagen yang lebih tinggi pada jaringan yang tidak dilakukan insisi dibandingkan dengan jaringan yang dilakukan insisi.

3. Perlu dipertimbangkan untuk dilakukan penelitian perbandingan pada manusia untuk mengamati proses penyembuhan luka secara makroskopis sehingga hasilnya dapat dijadikan rekomendasi untuk pemberian infiltrasi levobupivakain pada luka insisi setelah pembedahan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Michell WD and Smith G. The control of acute post operatif pain. British Journal of Anaesthesia 1989 ; 63 : 147 - 158
2. Aitkenhead AR and Smith G. Texbook of Anaesthesia. London Churchill, Livingstone, 1990;98 dan 449
3. Stephen E Abram. Pain pathways and mecanism; The pain clinic manom, 2000;2nd; 19 -20
4. Redjeki S Ike. Pengelolaan nyeri pascabedah.1st National Congress Indonesian PainSociety; 2001;58 - 62
5. Nazarudin U. Acute pain management strategis that work. Kumpulan makalah PIB XI .Medan 2002 : 421
6. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathology basic of disease. 6th ed. W B Saunders Co. Philadelphia. 1999 : 21-201
7. Constantinnides P. General pathobiology. 1st ed. Appleton and Lange. Norwalk connecticut. 1994 : 173-186
8. Mercandetti M, Cohen A. Wound healing, healing and repair. EMedicine. October 7. 2002. <http://www.eMedicine.com.Inc>
9. Wound healing. <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm>
10. Mathew R et al; Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β induced collagen synthesis : down regulation by c AMP. FASEB J. 13;1999; 1774-86

11. Mulyata S ; Analisis imunohistokimia TGF β indikasi hambatan kesembuhan luka operasi episiotomi pada tikus Sprague Dawley; 1st Indonesian simposium on obstetric anesthesia, Bandung ,2002
12. Biocore's collagen by increasing the concentrations of cellular and non cellular elements including fibroblast and growth factor.
<http://www.cyberadsstudio.com/envy/healing.htm>
13. Christie J M, Chen G W. Secondary hyperalgesia is not affected by wound infiltration with bupivacaine. *Can J of An.* 1993 ; 40 : 1034-37
14. Galindo M A, Levobupivacain, a long acting local anaesthetic, with less cardiac and neurotoxicity. <http://www.ndaa.ox.ac.uk/wfsa/html/u14/u1407-01.html>
15. Doctor's guide. Chirocaine anesthetic use to post op pain management Global edition.2000. <http://www.pslgroup.com/dg/195B36.htm>
16. Stoelting R K. Local anesthetics. In : Stoelting R K. *Pharmacology and physiology in anesthetic practice.* 3rd ed. Philadelphia. New York : JB Lippincott ; 1999. 45-67
17. Devor M. Pain mechanism and pain syndrome. In : Champbell J N. *Pain* 1996 an update review. IASP press. Seattle. 1996 : 103-112
18. Pleuvry B J. The chemical modulation of nociceptive responses and pain. In : Healy T E J, Cohen P J. eds. *A practice of anesthesia.* 6th ed. London Edward Arnold. 1995 : 80-8
19. Cervero F. Mechanism of visceral pain, past and present. In : Gebhart G F. Ed. *Visceral pain, progress in pain research and management.* Vol 5. IASP press. Seattle. 1995 : 469-488

20. Field H L. Pain. 1st ed. Mc Graw Hill book Co. New York. 1987 : 1-51
21. Bonica J . Anatomic and physiologic basis of pain and nociception and pain.
In : Bonica J J. ed. The management of pain. Pennsylvania. Lea and Febiger.
London. 1990 : 12-28
22. Pettersson N, 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
23. Melzacks R, Wall P. The gate control theory of pain. In : Melzacks R, Wall P.
The challenge of pain 1st ed. Penguin education. 1984 : 223-261
24. Hollmann , Markus W, Durieux E, Local anesthetics and the inflammatory
response : A new therapeutic indication ?, Anesthesiology. September 2000;
93 : 858-75
25. George W et al. Wound healing.Textbook of surgery; vol IA, New York
Tokyo, Oxford University Press 1994 ; 3 – 23
26. Eileen T .Collagen and the phases of wound healing.
<http://www.woundcare.org/news4/ar2.htm>
27. The scientific basis of wound healing. [http:// www.woundscience.com](http://www.woundscience.com)
28. Sabiston CD. Wound healing : Biologic and Clinical Features. Textbook of
Surgery The Biological Basis of Modern Surgical Practice,15thed
.1997.WBSaundersComp.Philadelphia: 207 – 219.
29. Collagen and the wound healing process.<http://www.woundheal.com>
30. Collagen plays a significant role in all of wound healing.
<http://www.cyberadsstudio.com/envy/collagen.htm>

31. Structure of collagen and wound healing. [http://www.woundcare.org/news
vol 2n3 / ed 2.htm](http://www.woundcare.org/news/vol_2n3/ed2.htm)
32. Rossenberg P H, Renkonen O V. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. *Anesthesiology* 1985 ; 62 : 178-9
33. Vintar N, Pozlep G, Rawal N. Incisional self-administration of bupivacaine or ropivacaine provides effective analgesia after inguinal hernia repair. *CJA* 2002 ; 49: 481-6
34. [http:// medic.med.uth.tmc.edu/edprog/00000192.htm](http://medic.med.uth.tmc.edu/edprog/00000192.htm)
35. Gillian S et al. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol* ,1999.155; 1137 – 1146
36. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993 : 44
37. Wasito R, Imunohistokimia. dalam : Pedoman kuliah imunohistopatologi. Dep Dikbud. Proyek Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas . PAU Bioteknologi – Universitas Gajah mada Yogyakarta. 1991 : 36-80.
38. Sudigdo S, Sofyan I, Dasar dasar metodologi penelitian klinis edisi ke-2, Sagung seto Jakarta. 2002 :247-249.