

**PERBANDINGAN EKSPRESI SEL T CD4<sup>+</sup> DI JARINGAN  
SEKITAR LUKA DENGAN DAN TANPA INFILTRASI  
LEVOBUPIVACAIN PADA NYERI PASCA INSISI  
Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar**

**COMPARISON OF CD4<sup>+</sup> T CELL EXPRESSION BETWEEN  
LEVOBUPIVACAIN AND NON LEVOBUPIVACAIN TREATED  
TISSUE SURROUND WOUND AFTER INCISION PAIN  
*Immunohistochemistry Study on Wistar rat***



Tesis

**Magister Ilmu Biomedik  
Pendidikan Program Dokter Spesialis I Ilmu Anestesi**

**Andri Setiabudi**

**PROGAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK DAN PPDS I  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2005**

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft.	4450/T/PK/C1
Tgl.	15-8-06

TESIS

**PERBANDINGAN EKSPRESI SEL T CD4<sup>+</sup> DI JARINGAN  
SEKITAR LUKA DENGAN DAN TANPA INFILTRASI  
LEVOBUPIVAKAIN PADA NYERI PASCA INSISI  
Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar**

Disusun oleh  
**Andri Setiabudi**

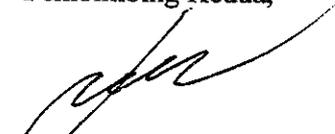
Telah Dipertahankan di Depan Tim Penguji  
Pada Hari Kamis tgl 17 november 2005  
dan Telah Memenuhi Syarat Untuk Diterima

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama,

  
**dr. Witjaksono, SpAn, MKes**  
NIP. 130.529.447

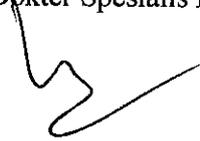
Pembimbing Kedua,

  
**dr. Edi Dharmana, PhD, SpPark**  
NIP. 140.119.299



Mengetahui,  
Ketua Progam Studi  
Magister Ilmu Biomedik  
  
**Prof. dr. H. Soebowo, SpPA**  
NIP. 130.352.549

Mengetahui,  
Ketua Progam Studi  
Pendidikan Progam Dokter Spesialis I Ilmu Anestesi



**dr. Uripno Budiono, SpAn**  
**NIP. 140.098.893**

## **PERNYATAAN**

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

Semarang, November 2005

Penulis

## RIWAYAT HIDUP SINGKAT

### A. Identitas



Nama : dr. Andri Setiabudi

Tempat / Tgl lahir : Surabaya / 2 April 1970

Agama : Islam

Jenis kelamin : Laki-laki

### B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Petrokimia Gresik Jawa Timur : Lulus tahun 1983
2. SMP IV Gresik Jawa Timur : Lulus tahun 1986
3. SMA I Gresik Jawa Timur : Lulus tahun 1989
4. FK UNS Surakarta Jawa Tengah : Lulus tahun 1997
5. Spesialisasi Anestesi UNDIP Semarang Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik UNDIP Semarang Jawa Tengah

### C. Riwayat Pekerjaan

Tahun 1998 – 2001 : Kepala Puskesmas Gaji Kerek Tuban Jawa Timur

### D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang tua Ayah : Chusrin Sarjito, Bsc.  
Ibu : R Nuraeni, Ks.
2. Nama Istri : dr. Sri Anidya Utami
3. Nama Anak : Hernindra Rizaldi Pratama

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNYA kepada kita semua, sehingga saya dapat menyelesaikan tugas saya dalam rangka mengikuti spesialisasi di Bagian / SMF Ilmu Anestesi dan reanimasi FK UNDIP / RSUP Dr. Kariadi serta Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Dalam rangka melengkapi tugas tersebut, maka tesis ini dibuat untuk menyelesaikan pendidikan spesialisasi dan magister yang kami tempuh. Adapun judul tesis saya adalah “ Perbandingan Ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> di Jaringan Sekitar Luka Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain Pada Nyeri Pasca Insisi” Studi Imunohistokimia Pada Tikus Wistar. Dengan tesis ini saya harapkan dapat memberikan sumbangan pengetahuan kepada masyarakat atau rumah sakit mengenai pengaruh anestesi lokal terhadap sel T CD4<sup>+</sup> pada penyembuhan luka.

Pada kesempatan ini, saya ingin menyampaikan terima kasih kepada seluruh guru saya dalam menempuh pendidikan spesialisasi di bidang Anestesi dan Program Ilmu Biomedik.

Pertama-tama ucapan terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada yang terhormat **dr. Hariyo Satoto, SpAn(K)**, sebagai Kepala Bagian / SMF Ilmu Anestesi dan Reanimasi FK UNDIP RSUP Dr. Kariadi Semarang dan **dr. Uripno Budiono, SpAn(K)**, sebagai Ketua Program Studi Ilmu Anestesi dan Reanimasi yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menuntut pendidikan spesialisasi dan program magister.

**dr. Witjaksono, SpAn, Mkes dan dr. Edi Dharmana, PhD, SpPark** selaku pembimbing materi dalam penelitian ini, atas bimbingan dan petunjuk serta wawasan yang sangat berharga dalam menyelesaikan tesis ini.

**Prof.DR.dr.Ign Riwanto, SpBD, dan dr. Widiastuti, SpS (K), MSc.** Selaku pembimbing metodologi dan **Dra. Dyah Ratna Budiani, MSi** staf pengajar PA FK UNS Surakarta, yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing penyelesaian tesis ini.

Guru-guru saya staf pengajar ilmu anestesi dan reanimasi FK UNDIP, **Prof. dr. Soenarjo, SpAn(K),KIC, dr. Marwoto, SpAn(K),KIC, dr. Abdul Lian S, SpAn(K), dr. Eri Leksana, SpAn, KIC, dr. Heru Dj, SpAn,Kj, dr. Sofyan H, SpAn. dan dr. Widya SpAn.** yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan ilmu

**Prof. DR. dr. Soeharjo Hadisaputro, SpPD** selaku direktur Program Pascasarjana UNDIP, **Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)** selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP, **Prof. DR. dr. Tjahjono, SpPA, FIAC** selaku pengelola Program Studi Magister Ilmu Biomedik kelas kusus PPDS Program Pascasarjana UNDIP, atas motivasi yang diberikan untuk menyelesaikan studi ini.

Bapak direktur RSUP Dr. Kariadi dan Dekan FK UNDIP dan Guru-guru Program Sudi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberi pengetahuan, sebagai nara sumber, bimbingan dan motivasi selama mengikuti program pendidikan magister dan penyusunan tesis ini.

**Prof. DR. dr. St. Mulyata, SpAn, KIC** atas bantuan dan bimbingan selama di Surakarta dan semua rekan sejawat residen ilmu anestesi dan reanimasi FK UNDIP, pegawai UPHP UGM Yogya dan PA UNS Surakarta yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

Ucapan terima kasih khususnya kepada kedua orang tua saya serta kedua mertua saya, kakak dan adik saya yang selama ini memberikan dorongan moril maupun materiil untuk keberhasilan studi saya.

Ucapan terkasus dan yang paling dalam untuk istri saya tercinta **dr. Sri Anidya Utami** atas segala-galanya yang penuh dengan pengertian, kesabaran dan cinta kasih yang banyak berkorban, memberi semangat moril maupun materiil untuk keberhasilan saya dalam mencapai cita-cita. Dan kusus buat inspirasiku, yang saya cintai anaku **Hernindra Rizaldi Pratama**.

Saya sadari dalam penulisan tesis ini jauh dari sempurna, untuk itu saya harapkan saran dan kritik dari semua pembaca, agar tesis ini dapat lebih sempurna.

Akhirnya pada kesempatan ini saya minta maaf jika ada kesalahan baik yang saya sengaja maupun tidak saya sengaja. Semoga Allah sang raja alam semesta selalu melindungi kita semua Amin.

Semarang, November 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Levobupivakain.....	6
2.2 Patofisiologi Nyeri.....	8
2.3 Penyembuhan Luka.....	13
2.4 Kegiatan Pembentukan Jaringan Parut .....	25
2.5 Paradigma Psiconeuroimunologi.....	26
2.6 Pengaruh Anestesi Lokal Terhadap Respon Imun Dalam Proses Penyembuhan Luka.....	27
BAB 3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	29
3.1 Kerangka Teori.....	29
3.2 Kerangka Konsep.....	30
3.3 Hipotesis Penelitian.....	30
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	31
4.1 Rancangan Penelitian.....	31
4.2 Sampel Penelitian.....	32
4.3 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	33
4.4 Variabel Penelitian.....	33
4.5 Bahan dan Alat Penelitian.....	34
4.6 Pelaksanaan Penelitian.....	35
4.7 Alur Kerja.....	37
4.8 Prosedur Pemeriksaan.....	38
4.9 Cara Pengumpulan Data.....	39
4.10 Analisa Data.....	39
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS.....	40
5.1 Hasil Penelitian.....	40
5.2 Analisa Data.....	40
BAB 6 PEMBAHASAN.....	44
6.1 Pembahasan.....	44

BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
	7.1 Simpulan.....	47
	7.2 Saran.....	47
	DAFTAR PUSTAKA.....	48

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Ekspresi sel T CD4 <sup>+</sup> dalam jaringan sekitar luka pada penelitian hewan coba.....	40
Tabel 2. Uji normalitas data parameter laboratoris pada kelompok tanpa levobupivakain.....	41
Tabel 3. Uji normalitas data parameter laboratoris pada kelompok levobupivakain.....	41
Tabel 4. Hasil uji berat badan hewan coba.....	41
Tabel 5. Hasil uji beda skor histologi sel T CD4 <sup>+</sup> pada hewan coba...	42

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Fase dari penyembuhan luka : dibagi tiga fase inflamasi, proliferasi dan maturasi.....	18
Gambar 2. Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	20
Gambar 3. Sel T CD4 <sup>+</sup> sebagai perantara antibodi imunitas disebut sebagai sel T helper.....	21
Gambar 4. Grafik histogram nilai rerata skor histologi sel T CD4 <sup>+</sup> pada kelompok tanpa levobupivakain dan kelompok levobupivakain.....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Normalitas Kolomogorov Smirnov Z.....	51
Lampiran 2a. T-Test (uji homogenitas untuk berat badan) .....	52
Lampiran 2b. T-Test (uji skor histologi sel T CD 4 <sup>+</sup> ).....	53
Lampiran 3. Daftar singkatan.....	54
Lampiran 4. Penelitian hewan coba.....	55
Lampiran 5. Skor histologi:.....	56
Lampiran 6. Foto tikus wistar dan infiltrasi levobupivakain.....	58
Lampiran 7. Foto mikroskop Olympus serta seperangkat komputer..	59
Lampiran 8. Foto sel T CD 4 <sup>+</sup> .....	60

## ABSTRAK

### PERBANDINGAN EKSPRESI SEL T CD4<sup>+</sup> DI JARINGAN SEKITAR LUKA DENGAN DAN TANPA INFILTRASI LEVOBUPIVAKAIN PADA NYERI PASCA INSISI Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar

**Latar belakang :** Sel T CD4<sup>+</sup> merupakan salah satu komponen sistem imun yang ikut berperan dalam penyembuhan luka, karena memproduksi sitokin dan faktor pertumbuhan. Nyeri akut pada luka akan menekan sistem imun, sehingga menghambat penyembuhan luka. Untuk menghilangkan nyeri digunakan anestesi lokal levobupivakain yang sangat baik untuk menghilangkan nyeri akut dan mempunyai durasi yang panjang.

**Tujuan :** Membandingkan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan dan tanpa infiltrasi levobupivakain.

**Metode :** Dilakukan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain "*Randomized Post test only control group design*", pada sepuluh ekor tikus Wistar. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua kelompok secara acak masing masing lima ekor, Kelompok 1, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, tanpa diberikan infiltrasi levobupivakain, Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain tiap 8 jam selama 24 jam. Ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> pada sekitar luka insisi dinilai dengan skor histologi dari preparat dengan menggunakan pengecatan secara imunohistokimia, yang diambil dari biopsi jaringan pada hari ke 5. Metode perhitungan statistik menggunakan *independent samples T - test*.

**Hasil :** Pada penelitian menunjukkan pada jaringan insisi hasil rerata skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada kelompok levobupivakain lebih tinggi (12.68±1.58) dibanding kelompok tanpa levobupivakain (9.16±1.01). Perhitungan statistik antara kedua kelompok tanpa levobupivakain dan dengan kelompok levobupivakain berbeda bermakna (p=0.003 ; p<0.05).

**Kesimpulan :** Terdapat perbedaan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan infiltrasi levobupivakain lebih tinggi dibanding tanpa levobupivakain.

**Kata kunci:** Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup>, infiltrasi levobupivakain, nyeri pasca insisi.

## ABSTRACT

### COMPARISON OF CD4<sup>+</sup> T CELL EXPRESSION BETWEEN LEVOPUPIVACAIN AND NON LEVOPUPIVACAIN TREATED TISSUE SURROUND WOUND AFTER INCISION PAIN Immunohistochemistry Study on Wistar rat

**Background :** CD4<sup>+</sup> T cells have a prominent role on the wound healing due to its ability to produce cytokines and growth factors. The acute pain occurs after wound could depress the immune function that leads to the inhibition of the wound healing processes. Local anesthetic which has a long duration effect such as levobupivacain could be used to relief the pain so that protect the depression of immune function.

**Objective :** To compare the CD4<sup>+</sup> T cells expression between levobupivacain and non levobupivacain treated tissue surround the wound.

**Method :** This laboratoric experimental study was design with randomized post test only control group method. Ten female rat were randomly divided in to two groups. 2 cm of skin incision was performed to all rats. After the incision, Levobupivacain infiltration were given every 8 hours for 24 hours to the second group. No levobupivacain was given to the first group. On day 5 the rats were sacrificed and the tissue surround the wound were taken for immunohistochemistry staining. The CD4<sup>+</sup> T cells expression were analyzed for histologic scoring. Independent T-test was used for statistic analysis.

**Result :** It was demonstrated in this study that the histologic score of CD4<sup>+</sup> T cells of the levobupivacain treated group (group 2) was significantly higher than group 1 (without levobupivacain). (mean  $12.68 \pm 1.58$  vs  $9.16 \pm 1.01$  respectively,  $p=0,003$  ;  $p<0,05$ ).

**Conclusion :** The CD4<sup>+</sup> T cells expression were significantly higher in levobupivacain treated group than non levobupivacain group on the tissue surround the wound

**Key word :** CD4<sup>+</sup> T cell expression, Levobupivacain infiltration, after pain incision.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Gangguan proses penyembuhan luka merupakan masalah yang sering dihadapi setelah operasi. Diduga banyak faktor yang dapat menjadi penyebab terganggunya proses kesembuhan luka. Salah satu faktor yang berpengaruh dalam penyembuhan luka adalah sitokin dan faktor pertumbuhan, seperti: *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor* (TGF  $\beta$ 1), *vascular endothelial growth factor* (VeGF), Angiopoetin, *interleukin* (IL)1, *interleukin* (IL) 6, *tumor necrosis factor alfa* (TNF  $\alpha$ ) dan *interferon gamma* (IFN  $\gamma$ ). Sitokin dan faktor pertumbuhan tersebut diproduksi oleh berbagai macam sel pada tahap sintesis kolagen sebagai respons penyembuhan luka secara primer, apabila terjadi penyatuan tepi luka secara sempurna pada luka bersih<sup>1</sup>.

Limfosit T merupakan komponen sel yang berperan utama dalam sistem imun yang berfungsi dalam pertahanan terhadap infeksi melawan organisme dan berperan dalam penyembuhan luka. Limfosit T terbagi menjadi dua populasi yaitu sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>, dimana sel T CD4<sup>+</sup> berperan dalam penyembuhan luka. Pada percobaan oleh Davis PA dan kawan kawan tahun 1997, dilaporkan bahwa dengan tidak adanya limfosit T akan terjadi pemanjangan penyembuhan luka. Pada penelitian tersebut, dilaporkan pula bahwa sel T CD4<sup>+</sup> akan

mempercepat penyembuhan luka sedangkan sel T CD8<sup>+</sup> akan memperlambat penyembuhan luka<sup>2,3</sup>.

Sel T CD4<sup>+</sup> sangat berperan dalam penyembuhan luka karena memproduksi sitokin dan faktor pertumbuhan. Terbukti penelitian oleh Blotnick S dan kawan-kawan tahun 1993, mereka mengisolasi limfosit T terutama sel T CD4<sup>+</sup> dari darah tepi manusia yang menghasilkan dua karakteristik faktor pertumbuhan yaitu *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF)<sup>2</sup>.

Sel T CD4<sup>+</sup> diketahui menginduksi dan mengatur respon imun dengan memproduksi sitokin seperti IL2, IFN  $\gamma$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ ) dan granulosit atau *macrophage-colony-stimulating factor* yang berperan dalam proses penyembuhan luka<sup>2</sup>.

Sel T CD4<sup>+</sup> berperan penting dalam regulasi penyembuhan luka. Percobaan oleh Kohl A dan kawan-kawan tahun 1989 pemberian *dipeptidylpeptidase* intra vena pada tikus yang dapat menurunkan produksi dan fungsi sel T CD4<sup>+</sup> dimana proliferasi sel T CD4<sup>+</sup> menurun dan granulasi jaringan juga menurun dikarenakan sitokin dan faktor pertumbuhan menurun sehingga penyembuhan luka menjadi memanjang. Mereka berkesimpulan bahwa sel T CD4<sup>+</sup> berperan dalam regulasi penyembuhan luka<sup>3</sup>.

Salah satu faktor sistemik yang menghambat penyembuhan luka adalah karena peningkatan hormon glukokortikoid. Nyeri bila tidak dikelola dengan tepat akan berakibat memperpanjang fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin. Nyeri akan merangsang kelenjar pituari

melepaskan *adreno corticotropin hormon* (ACTH) yang selanjutnya akan mengaktifkan kelenjar adrenal sehingga melepas hormon steroid (kortisol) , dimana hormon steroid ini akan menekan sistem imun. Sel limfosit T yang menurun terutama sel T CD4<sup>+</sup> berakibat penyembuhan luka menjadi memanjang.

Infiltrasi anestesi lokal pada sekitar luka insisi diharapkan dapat mengurangi intensitas nyeri akut dengan menghambat jalur transmisi impuls nyeri. Nyeri yang berkurang berakibat sekresi hormon glukokortikoid juga menurun dan menghilangkan salah satu faktor sistemik penghambat penyembuhan luka. Anestesi lokal yang terpilih adalah levobupivakain karena mempunyai durasi yang panjang sekitar 8 jam dengan pemberian tiga kali dalam 24 jam. Pemberian ini diharapkan nyeri akut pada luka insisi yaitu nyeri pada 24 jam pertama dapat dikurangi. Nyeri akut yang dihambat ini diharapkan respons imun meningkat yang salah satunya adalah limfosit T terutama sel T CD4<sup>+</sup> pada luka sehingga proses penyembuhan menjadi lebih baik<sup>1,4</sup>.

Berdasarkan fakta tersebut diatas, pada penelitian ini akan dibandingkan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan infiltrasi levobupivakain dan tanpa levobupivakain pada nyeri pasca insisi.

Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dapat dihitung jumlahnya pada pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi anti sel T CD4<sup>+</sup> dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin. Jumlah sel T CD 4<sup>+</sup> dapat dihitung berdasarkan intensitas warna yang terlihat pada mikroskop dengan menggunakan skor histologi.

## **1.2. Rumusan Masalah**

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

Apakah terjadi perbedaan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan atau tanpa infiltrasi levobupivakain pada nyeri pasca insisi.

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Menganalisis perbedaan pemberian infiltrasi anestesi lokal levobupivakain dengan skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> antara kelompok yang diberi dan kelompok yang tidak diberi anestesi lokal levobupivakain.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

- Menghitung skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada kelompok yang diberi infiltrasi lokal levobupivakain
- Menghitung skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada kelompok yang tidak diberi infiltrasi lokal levobupivakain
- Menganalisis perbedaan antara kedua kelompok.

## **1.4. Manfaat Penelitian :**

### **1.4.1. Aplikasi Klinis**

Apabila penelitian ini terbukti, maka pemberian infiltrasi anestesi lokal levobupivakain dapat digunakan sebagai alternatif meningkatkan respons imun terutama terhadap sel T CD4<sup>+</sup> untuk mempercepat penyembuhan luka.

#### **1.4.2. Pengembangan Ilmu**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan teori untuk mengungkap mekanisme respons imun dalam penyembuhan luka pada pemberian infiltrasi anestesi lokal levobupivakain

#### **1.4.3. Sebagai Dasar Penelitian Selanjutnya**

Sebagai dasar penelitian lebih lanjut baik pada penggunaan infiltrasi anestesi lokal, maupun untuk penelitian proses respons imun dalam penyembuhan luka, juga dapat dijadikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Levobupivakain

##### 2.1.1 Sifat Kimia

Levobupivakain adalah obat anestesi lokal dengan durasi lama. Termasuk golongan amid ( CONH-) yang memiliki atom karbon asimetrik dan isomir 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  $\alpha$  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<sup>5</sup>.

### **2.1.2 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 hepar<sup>5</sup>.

### **2.1.3 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.

### **2.1.4 Efek Toksik**

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%<sup>5</sup>. Levobupivakain menimbulkan depresi kardiak lebih sedikit dibandingkan bupivakain dan ropivakain. Gejala toksisitas sistem saraf pusat pada levobupivakain lebih tinggi rata rata 56,1 mg dibandingkan bupivakain 47,1 mg.

### **2.1.5 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, pengelolaan nyeri akut dan kronis.

Dosis tunggal maksimum yang digunakan 2 mg /kg bb dan 5,7 mg/kg bb (400mg) dalam 24 jam<sup>5</sup>.

#### 2.1.6 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<sup>5</sup>.

#### 2.2. 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 nyeri<sup>6</sup>. Nyeri juga merupakan suatu sensasi tidak nyaman yang dirasakan timbul dari bagian tubuh tertentu, yang disebabkan proses yang merusak atau berpotensi merusak jaringan tubuh<sup>7</sup>. Nyeri berarti pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan yang berhubungan dengan terjadinya kerusakan jaringan atau yang cenderung merusak jaringan<sup>8</sup>. 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. Nyeri akut dipicu oleh kerusakan somatik atau viseral dengan lama berlangsungnya bersamaan dengan penyembuhan luka<sup>9</sup>.

### 2.2.1. Proses Terjadinya Nyeri

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 nosiseptif 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 desendens 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 nosiseptif akan berjalan mengikuti sistem aksi menuju pusat supraspinal untuk dipersepsi di pusat somatosensoris sebagai pengalaman nyeri<sup>10</sup>.

Tahap proses terjadinya nyeri sebagai berikut :

#### 2.2.1.1 Transduksi

Kerusakan jaringan menyebabkan terlepasnya substansi kimiawi endogen berupa bradikinin, substansi P, serotonin, histamin, ion H, ion K, prostaglandin. Zat kimia ini terlepas ke dalam cairan ekstraseluler yang melingkupi nosiseptor. Kerusakan membran sel akan melepaskan senyawa phospholipid yang

mengandung asam arakhidonat dan terjadi aktivasi ujung aferen nosiseptif. Asam arakhidonat atas pengaruh *prostaglandin (PG) endoperoxide synthase* akan membentuk *cyclic endoperoxide* (PGG<sub>2</sub> dan PGH<sub>2</sub>) akan membentuk mediator inflamasi sekaligus mediator nyeri tromboksan (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin (PGE<sub>2</sub>, PG<sub>2</sub>α), prostasiklin (PGI<sub>2</sub>). Terbentuk pula leukotrien (LT) atas pengaruh 5-lipooksigenase. Setelah kerusakan jaringan timbul mediator nyeri atau inflamasi berupa substansi P, PGs, LTs dan bradikinin. Dari sel mast dilepaskan histamin. Kombinasi senyawa ini menimbulkan vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas vaskuler lokal sehingga membantu gerakan cairan ekstrasvasasi ke dalam ruang interstisial jaringan rusak. Proses ini mengawali mekanisme respon inflamasi yang merupakan langkah pertama dalam proses pertahanan jaringan dan reparasi luka. Mediator juga mengaktifkan nosiseptor. PGs dan LTs tidak langsung mengaktifkan melainkan mensensitisasi nosiseptor agar dapat distimuli oleh senyawa lain seperti bradikinin, histamin sehingga terjadi hiperalgesia, yaitu respon stimuli yang meningkat, pada kondisi normal sudah menimbulkan sakit. Pelepasan mediator kimiawi terus menerus dapat menyebabkan stimulasi dan sensitisasi terus menerus pula sehingga terjadi hiperalgesia, alodina dan proses berakhir sesudah terjadi proses penyembuhan. Selanjutnya leukotrien D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) mengaktifkan makrofag dan basofil yang akan menstimuli dan meningkatkan pelepasan eikosanoid, yaitu metabolit yang terlepas akibat terjadinya metabolisme asam arakhidonat. Leukotrien D<sub>4</sub> juga melepas substansi P dan secara tidak langsung bekerja pada neuron sensoris dengan menstimuli sel lain untuk

melepaskan bahan neuron aktif. Lekosit PMN melepaskan leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Keduanya berperan dalam sensitisasi nosiseptor.

Pada inflamasi, sistem imun akan melepaskan sitokin proinflamasi : interleukin IL1 $\beta$ , IL6, TNF, IFN. Sitokin ini dengan cepat akan berinteraksi dengan saraf perifer melalui mediator. IL1 $\beta$  berinteraksi dengan neuron sensoris, mengaktifkan eikosanoid dalam sel seperti fibroblas dan menyebabkan terlepasnya prostaglandin. 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 (AINS)<sup>11</sup>.

#### **2.2.1.2 Transmisi**

Dalam keadaan hiperalgesia intensitas impuls akan membesar yang kemudian ditransmisi oleh serabut aferen nosiseptif primer lewat radiks posterior menuju kornu posterior medula spinalis. Serabut perifer terdiri dari serabut sensoris, motorik somatik, motorik otonomik. Akson dari neuron primer bermielin atau tidak bermielin, dibungkus neurolema. Terbagi atas serabut A,B,C. Serabut A terbagi menjadi A $\alpha$  , A $\beta$  , A $\gamma$  dan A $\delta$ . Akson berakhir pada kulit dan bangunan lain sebagai anyaman rapat, dekat ujung akhir saraf, bungkus perineural terbuka dan sel Schwann menjadi irreguler. Serabut aferen primer nosiseptif khusus menghantarkan impuls nosiseptif, terdapat di kulit, periosteum, sendi, ligamen, otot, visera. Serabut yang menyampaikan impuls nosiseptif hanya A $\delta$  dan C, sehingga serabut tersebut tidak bermielin atau bermielin halus. Stimulus yang dapat direspon adalah mekanik, mekanotermal dan polimodal.

Impuls di neuron aferen primer melewati radiks posterior masuk ke medula spinalis pada berbagai tingkat membentuk sel bodi dalam ganglia radiks posterior. Serabut ini membelah dua, mengirim banyak cabang kolateral. Serabut aferen primer berakhir pada lamina I, substansia gelatinosa (lamina II, III), lamina V, lamina IV. Impuls ditransmisi ke neuron sekunder dan masuk ke traktus spinotalamikus lateralis. Kornu posterior berfungsi sebagai masuk jalur desendens dari otak untuk melakukan modulasi impuls dari perifer. Impuls selanjutnya disalurkan ke daerah somatosensorik di korteks serebri dan diterjemahkan. Proses transmisi ini dapat dihambat oleh obat anestesi lokal<sup>12,13</sup>.

#### 2.2.1.3 Modulasi

Impuls setelah mencapai kornu posterior medula spinalis akan mengalami penyaringan intensitas yang bisa diperbesar atau dihambat. Sistem pengendali modulasi ini adalah sistem gerbang kendali spinal atau *the gate control theory of pain*. Terdiri dari substansia gelatinosa sebagai penghambat sel transmisi T, serabut aferen diameter besar akan menutup gerbang, diameter kecil akan membuka gerbang. Cabang serabut desendens dari otak ke substansia gelatinosa akan menambah hambatan sel transmisi T. Apabila impuls melebihi ambang sel T maka akan melewati sistem kendali gerbang spinal dan diteruskan ke pusat supraspinal di korteks somatosensoris. Impuls akan dipersepsi sebagai pengalaman nyeri. Substansi yang bekerja sebagai modulator nyeri di medula spinalis yaitu dinorfin, enkefalin, noradrenalin, dopamin 5 HT<sub>2</sub>, GABA akan menghambat nyeri. Substansi yang meningkatkan nyeri yaitu substansi P, ATP, asam amino eksitatori<sup>11,14</sup>.

#### **2.2.1.4 Persepsi**

Sel transmisi T didalam sistim gerbang spinal kendali nyeri menerima impuls sensoris yang datang dari perifer. Apabila impuls melebihi atau sama dengan ambang T, impuls nosiseptif tersebut dapat melewati sistim gerbang kendali dan diteruskan ke pusat-pusat supraspinal yang lebih tinggi di korteks somatosensoris, kortek transisional dan sebagainya. Semua impuls nyeri sensoris perifer serta sinyal kognitif pada korteks afeksi dan kognisi akan berintergrasi dan menimbulkan persepsi yang diterima sebagai pengalaman nyeri. Secara sederhana persepsi adalah hasil integrasi dari apa yang ada pada pusat kognisi, pusat afeksi dan sistem sensoris diskriminatif yang dirasakan oleh individu, serta bagaimana cara individu tersebut menghadapinya<sup>14</sup>.

#### **2.3. 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 menjadi sumber nyeri sehingga terjadi proses inflamasi dan penyembuhan luka<sup>1</sup>

Proses penyembuhan luka terjadi pada awal inflamasi, selanjutnya akan bersamaan. Dalam proses inflamasi terjadi perusakan, 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 keduanya <sup>1</sup>.

Penyembuhan luka merupakan fenomena kompleks dan melibatkan berbagai proses dengan urutan sebagai berikut <sup>1,4</sup>:

1. Infiamasi 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.

Penyembuhan luka secara sekunder terjadi bila luka dibiarkan tetap terbuka seperti pada keadaan dimana jaringan rusak atau hilang cukup banyak. Pada keadaan ini penyembuhan primer dihambat. Terjadi pembentukan jaringan parut, jaringan granulasi dan pemendekan jaringan. Waktu yang diperlukan untuk penyembuhan ini menjadi lebih panjang. Terdapat sejumlah faktor sistemik dan faktor lokal yang dapat mengganggu penyembuhan luka <sup>1</sup>. Faktor sistemik yang mempengaruhi penyembuhan luka antara lain :

- a. Nutrisi, pengaruhnya sangat menonjol terutama pada defisiensi protein dan vitamin C akan mengganggu sintesis kolagen dan memperlama penyembuhan luka.
- b. Status metabolik, misalnya diabetes melitus.

- c. Status sirkulasi darah, misalnya arteriosklerosis, tersedianya darah pada tempat luka tidak cukup, begitu juga pada kelainan vena dimana drainase darah tidak lancar.
- d. Hormon glukokortikoid mempunyai pengaruh anti inflamasi, menghambat pembentukan fibroblas, mengganggu sintesis kolagen.

Faktor lokal yang berpengaruh terhadap penyembuhan luka antara lain :

- a. Infeksi, merupakan penyebab tunggal keterlambatan penyembuhan luka.
- b. Faktor mekanik misalnya mobilisasi dini, memperlambat penyembuhan luka.
- c. Benda asing seperti benang jahitan yang tidak teresorpsi, fragmen baja, kaca, pecahan tulang merupakan halangan untuk penyembuhan luka.
- d. Macam, lokasi dan ukuran besarnya luka mempengaruhi penyembuhan.

### **2.3.1. Kejadian Seluler dan Molekuler**

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 adhesi yang dilepaskan oleh endotel karena pengaruh IL 1 yang diproduksi netrofil.

Molekul adhesi 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 <sup>1</sup>.

Aktifitas netrofil sejak intravaskuler, transmigrasi ke tempat tujuan juga terjadi pada eosinofil, basofil, monosit dan limfosit. Di jaringan target sel tersebut aktif mematikan dan menghancurkan mikroba sesuai dengan cara masing-masing. Pada saat yang sama juga terjadi proses penyembuhan <sup>1</sup>.

### **2.3.2 Pembentukan Jaringan Penyembuhan**

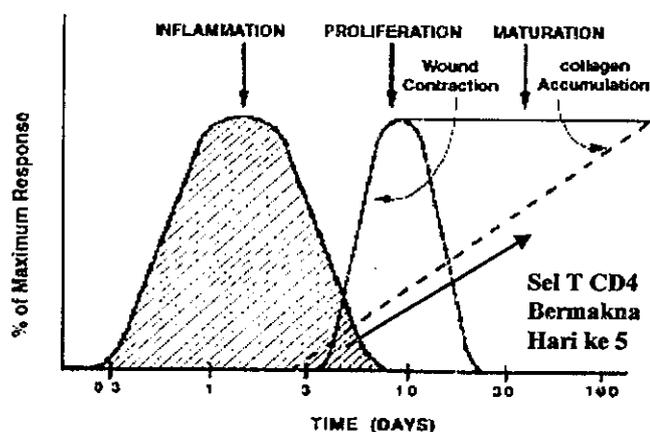
Sitokin bersama faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF aktif berperan melaksanakan proses penyembuhan. Beberapa macam sitokin terlibat dalam proses penyembuhan yaitu : TNF  $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 dan TGF  $\beta$ 1. Sesudah disekresi oleh sel T, sel B, makrofag, platelet, sel endotel, fibroblas, plasenta, tulang dan ginjal segera akan melepas dimer biologis aktif. Fungsinya bisa sebagai faktor inhibitor dan bisa juga sebagai stimulator. Pada konsentrasi rendah akan menginduksi sintesis dan sekresi PDGF, sedangkan pada konsentrasi tinggi merupakan inhibitor pertumbuhan karena menghambat ekspresi reseptor PDGF. TGF  $\beta$  juga menstimulasi daya kemotaksis fibroblas, inhibisi produksi kolagen dan fibronectin, menghambat degradasi kolagen karena peningkatan atau

penurunan inhibitor protease. Pada inflamasi kronis TGF  $\beta$  terlibat dalam pertumbuhan fibrosis<sup>1</sup>.

Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan yaitu PDGF, FGF, TGF  $\beta$  dan sitokin IL1, IL4, IgG1 yang diproduksi oleh leukosit dan limfosit pada saat sintesis kolagen. Pada proses remodeling jaringan faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF  $\beta$ 1 dan sitokin IL1, TNF akan menstimulasi sintesis kolagen serta jaringan ikat lain yang memodulasi sintesis dan aktivasi metaloproteinase. Hasil dari sintesis dan degradasi ECM merupakan remodeling kerangka jaringan ikat, dan struktur ini merupakan gambaran pokok penyembuhan luka pada inflamasi kronis.

Metaloproteinase merupakan suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen ECM, terdiri atas interstitial kolagenase dan gelatinase, diproduksi oleh beberapa macam sel : fibroblas, makrofag, neutrofil, sel sinovial dan beberapa sel epitel. Untuk mensekresikannya perlu stimulus tertentu yaitu PDGF, FGF, IL1, TNF  $\alpha$ , fagosit dan stres fisik<sup>1</sup>.

Proses perbaikan luka berbeda antara jaringan yang satu dengan yang lain tergantung dari jenis luka. Pada proses penyembuhan luka, elemen yang berbeda secara kontinyu dan bersamaan bekerja secara terintegrasi, dapat dibagi menjadi tiga fase yang saling tumpang tindih yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi.



Gambar 1: Fase dari penyembuhan luka : dibagi tiga fase inflamasi, proliferasi dan maturasi <sup>16</sup>.

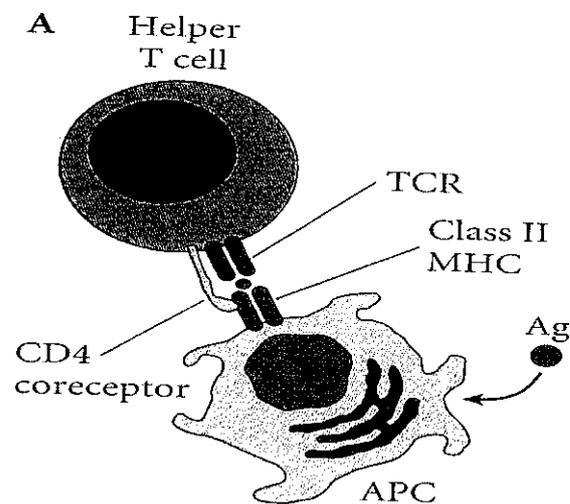
### 2.3.3 Fase Inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada hari 0 – 5 sesudah luka. 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. Polimorfonuklear (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 pada jaringan luka tidak terjadi infeksi, sel-sel PMN berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga.

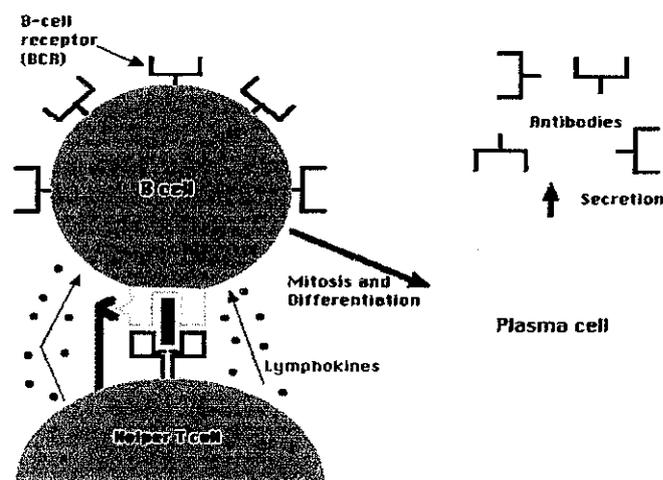
Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Muncul pertama 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3. Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap ada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T (Sel T CD4<sup>+</sup>) dengan jumlah bermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7.

Limfosit T merupakan komponen sel yang berperan utama dalam sistem imun yang berfungsi secara fisiologi termasuk pertahanan terhadap infeksi melawan organisme asing, imun terhadap sel kanker, dan berperan dalam penyembuhan luka. Dibagi menjadi populasi sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>.



**Gambar 2 :** CD adalah molekul antigenik permukaan sel yang diproduksi secara spesifik oleh sel leukosit tertentu dan tidak pada sel tipe jenis lain. Tampak gambar molekul  $CD4^+$  membentuk ikatan tambahan dengan MHC kelas II pada sel penyaji antigen<sup>19</sup>

Sel T  $CD4^+$  adalah petanda sel Th yang meningkatkan aktivasi dan maturasi sel B dan sel T sitotoksik dan mengatur reaksi peradangan menahun yang spesifik terhadap antigen melalui stimulasi makrofag. Molekul  $CD4^+$  membentuk ikatan tambahan dengan MHC kelas II pada sel penyaji antigen. Sel T  $CD8^+$  diketahui sebagai limfosit T sitotoksik karena fungsi utamanya merusak infeksi atau merubah sel dengan mengorganisasi antigen peptida yang dipresentasikan oleh MHC kelas I.



**gambar 3.** Sel T CD4<sup>+</sup> sebagai perantara antibodi imunitas disebut sebagai sel T helper, yang terikat pada antigen yang dipresentasikan oleh sel B. Menghasilkan perkembangan *clones* dari plasma sel yang mensekresi antibodi melawan material antigen<sup>20</sup>.

Limfosit T, makrofag dan PMN penting keberadaanya pada penyembuhan luka normal. Makrofag seperti halnya netrofil, 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 juga melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi yang disebut sitokin, yaitu zat yang berfungsi sebagai transmiter interseluler secara keseluruhan<sup>16,19,20</sup>.

### 2. 3.4 Fase Proliferasi

Fase ini terjadi pada hari ke 3 – 14. Bila tidak ada kontaminasi atau infeksi yang bermakna, fase inflamasi berlangsung pendek. Setelah luka berhasil dibersihkan dari jaringan mati dan sisa material yang tidak berguna, dimulailah fase proliferasi. 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, 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, terutama yang berhubungan dengan lapisan adventisia, pertumbuhannya disebabkan oleh sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit. 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. Fibroblas juga menyebabkan terbentuknya matriks fibronectin, asam hialuronik dan glikosaminoglikan. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia.

Revaskularisasi dari luka terjadi secara bersamaan dengan fibroplasia. Tunas-tunas kapiler tumbuh dari pembuluh darah yang berdekatan dengan luka. Pada hari ke 2 setelah luka sel-sel endotelial dari venulae mulai bermigrasi

sebagai respon stimuli angiogenik. 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 fibroblast growth faktor* (aFGF), TGF  $\beta$  dan *epidermal growth factor* (eFGF). FGF pada percobaan *invivo* merupakan substansi poten dalam neovaskularisasi.

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 $\beta$ , bFGF, PDGF dan *insulin like growth factor* (IGF 1).

### 2.3.5. 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 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 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-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 penyembuhan luka tetap kurang dibanding dengan kulit yang tidak pernah

terluka, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh.

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. 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. Hal ini tampak pada eritema berkurang dan reduksi jaringan parut yang terbentuk. Gambaran tersebut merupakan gambaran normal dari penyembuhan. Pada beberapa kasus terjadi pengerutan jaringan parut yang menyebabkan penurunan mobilitas kulit seperti pada kontraktur. Pengerutan luka yang terjadi karena pergerakan ke dalam dari tepi luka juga merupakan faktor berpengaruh dalam penyembuhan luka dan harus dibedakan dengan kontraktur<sup>16</sup>.

#### **2.4. Kegiatan Pembentukan Jaringan Parut**

Penyembuhan luka pada dasarnya sama di semua jaringan dan relatif tidak tergantung pada bentuk luka, meskipun beberapa variasi dapat terjadi. Produk akhir dari proses penyembuhan adalah jaringan parut. Masa kolagen yang relatif

avaskuler dan aseluler ini berfungsi untuk mengembalikan kontinuitas, kekuatan dan fungsi jaringan. Kelambatan proses penyembuhan dapat disebabkan oleh keberadaan luka yang memanjang, sementara abnormalitas proses penyembuhan dapat menyebabkan pembentukan jaringan parut abnormal<sup>1</sup>.

### 2.5. Paradigma Psikoneuroimunologi

Paradigma ini untuk mengungkap modulasi respon imun akibat stresor nyeri pada luka. Menurut McCance tahun 1994 cemas dan nyeri secara langsung dapat menimbulkan stres pada sistem imun, lewat peptida hipotalamik, pituaria dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis. Subtansi yang merupakan penghubung antara kedua sistem, otak dan sistem imun, adalah CRF, ACTH,  $\beta$  endorfin, subtansi P dan masih banyak lagi. Otak memberikan respon terhadap stres, dengan melepas CRF yang dilakukan oleh PVN (*Paraventricularis Nukleus*) dan diperkirakan berperan sebagai mediator primer dari beberapa perubahan yang diinduksi stres. Perubahan tersebut termasuk aktivasi aksis HPA (*Hipotalamus-Pituitaria-Adrenal*) dan aksis SAM (*sympathetic adrenal medullary*).

Dalam keadaan nyeri  $\beta$  endorfin yang dilepas pituaria kadarnya akan meningkat dan mempunyai sifat supresi makrofag, sehingga aktivitas makrofag yang dipengaruhi IFN  $\gamma$  lebih menurun lagi. Penurunan aktivitas makrofag akan berakibat pada sitokin yang dilepas makrofag seperti TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 TGF  $\beta$  aktifitasnya juga menurun lagi. Sel Th3 yang didiferensiasi dari sel T CD4<sup>+</sup> karena supresi kortisol, aktifitasnya ikut menurun, sehingga TGF  $\beta$  yang diproduksi Th3, jumlah dan aktifitasnya juga menurun sehingga berakibat terjadi hambatan pada proses penyembuhan luka.

## 2.6. Pengaruh Anestesi Lokal Terhadap Respon Imun Dalam Proses Penyembuhan Luka

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 CRF (*Cortitrophin Releasing Factor*), ACTH,  $\beta$  endorfin, substansi P, dan lain-lain. Otak memberikan respon terhadap stres dengan melepas CRF 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 berakibat terjadi penurunan ketahanan tubuh sehingga pada luka akan terjadi pemanjangan penyembuhan luka<sup>1</sup>.

Beberapa penelitian anestesi lokal bupivakain yang dilaporkan terhadap penyembuhan luka adalah :

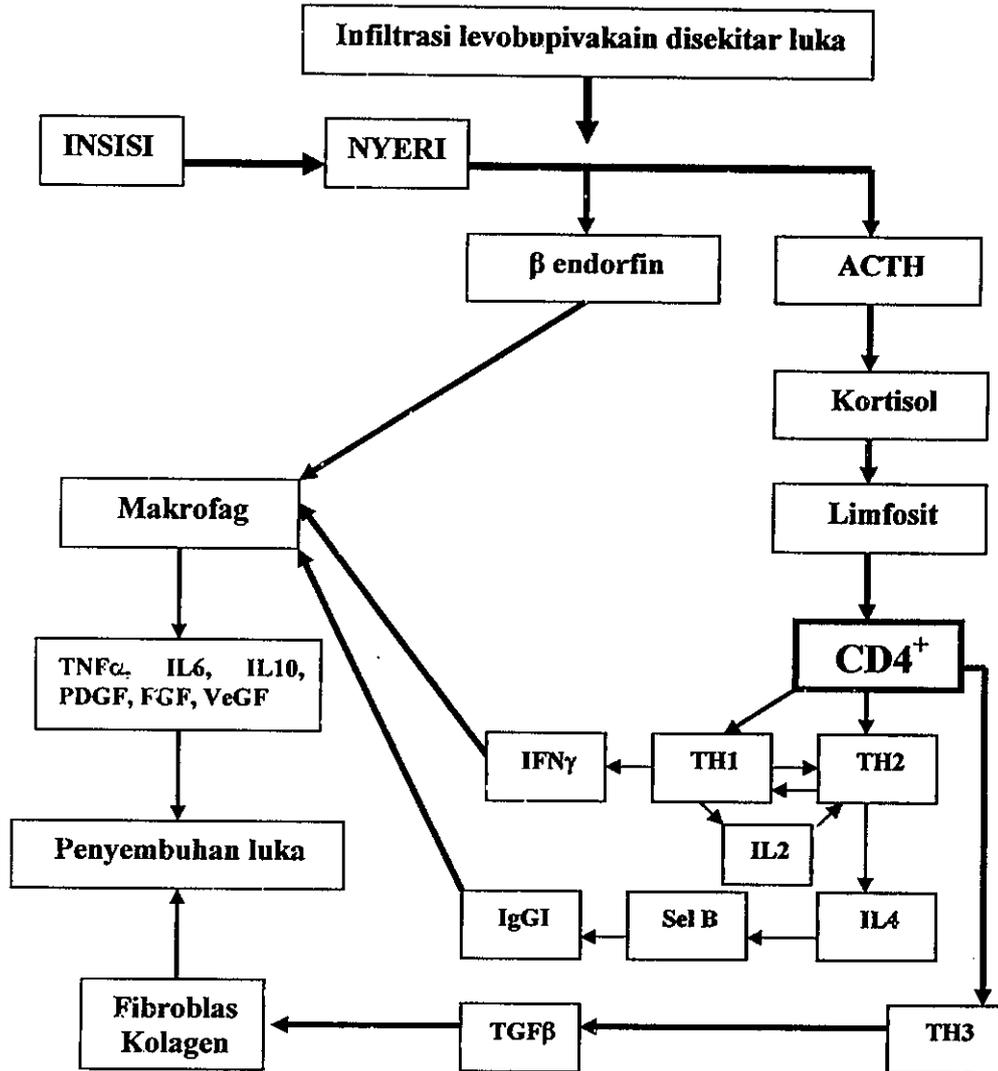
1. Cassuto dan kawan kawan, (2000) melaporkan bahwa pada penggunaan anestesi lokal secara topikal dan sistemik pada luka bakar akan menghambat ekstrasasi plasma pada tikus sehingga penyembuhan luka bakar lebih baik.
2. Rossenberg P H dan kawan kawan, (1985) melaporkan bahwa Bupivakain mempunyai efek bakteriostatik dan antimikroba .

3. Vintar N dan kawan kawan, (2002) melaporkan penggunaan lokal anestesi bupivakain lewat kateter dalam luka akan efektif mengurangi nyeri setelah operasi hernia inguinalis dan penyembuhan luka lebih baik <sup>10,17,18</sup>.

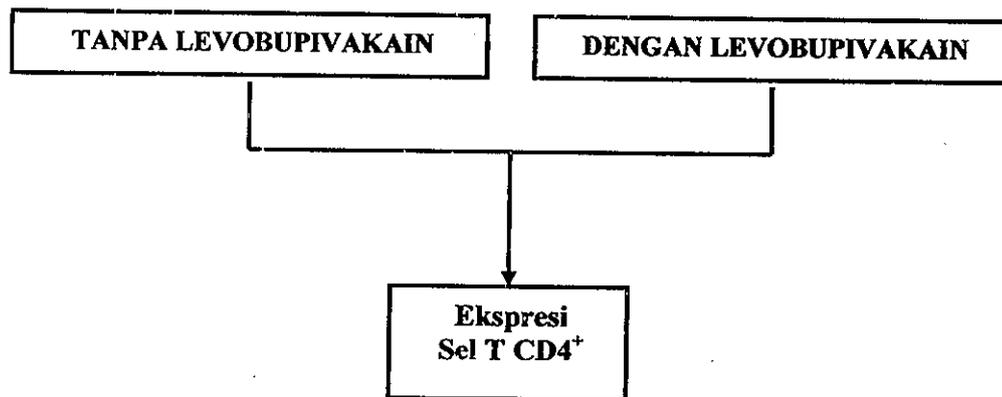
## BAB 3

## KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

## 3.1. Kerangka Teori



### 3.2. Kerangka Konsep



### 3.3. Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan infiltrasi levobupivakain dibanding tanpa infiltrasi levobupivakain.

## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

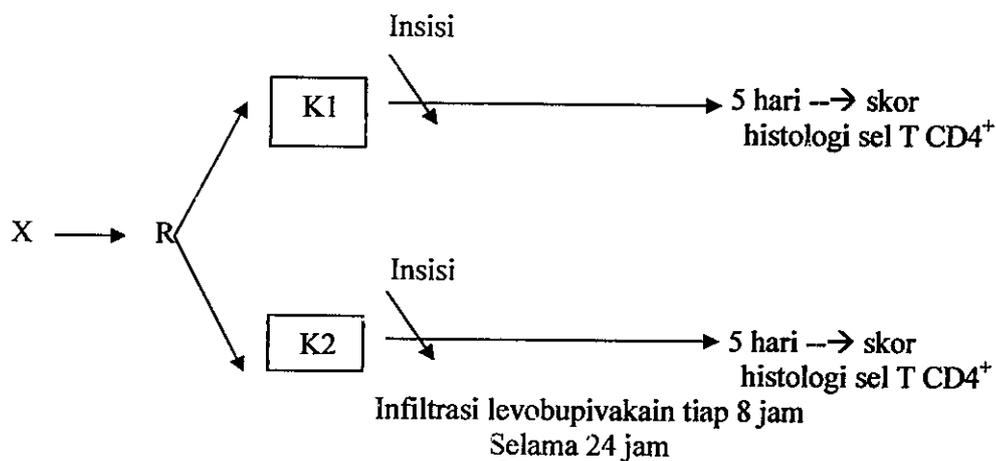
#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*Randomized Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi dua kelompok adalah sebagai berikut:

K1 : Kelompok 1, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, tanpa diberikan infiltrasi levobupivakain .

K2 : Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain tiap 8 jam selama 24 jam.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Keterangan

X = masa adaptasi selama 7 hari

R = randomisasi

K1 = kelompok 1

K2 = kelompok 2

#### **4.2. Sampel Penelitian**

Hewan coba adalah tikus Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta yang berjumlah 10 ekor.

##### **4.2.1 Kriteria Inklusi:**

1. Tikus Wistar keturunan murni.
2. Berjenis kelamin betina
3. Belum pernah digunakan untuk penelitian
4. Umur dua sampai dua setengah bulan
5. Berat badan 250-300 gram.

##### **4.2.2 Kriteria Eksklusi:**

1. Tikus Wistar sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif).
2. Mati selama perlakuan berlangsung
3. Infeksi disekitar tempat yang akan dilakukan insisi

##### **4.2.3 Besar Sampel :**

Menurut WHO penelitian dengan hewan percobaan untuk tiap kelompok minimal 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 10 ekor dengan masing masing kelompok 5 ekor untuk tiap kelompok<sup>23</sup>

#### **4.2.4 Randomisasi :**

10 tikus dikelompokkan secara random menjadi 2 kelompok yaitu:

Kelompok K1 : 5 tikus

Kelompok K2 : 5 tikus

#### **4.3. 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

#### **4.4. Variabel Penelitian**

##### **4.4.1. Variabel Bebas**

Pemberian infiltrasi levobupivakain pada nyeri insisi di sekitar luka

##### **4.4.2. Variabel Terikat**

Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup>.

##### **4.4.3. Definisi Operasional**

1. Infiltrasi levobupivakain merupakan suatu anestesi lokal dengan pemberian levobupivakain. Sediaan berupa larutan 0,5% Chirokain yang diencerkan menjadi larutan 0,25%. Pemberian dengan infiltrasi dalam spuit 1 cc dengan jarum no 25 sekitar 1 cm di sekitar luka irisan.
2. Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dinilai dengan skor histologi merupakan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi anti sel T CD4 dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada preparat eksisi

biopsi jaringan sekitar luka pada hari ke-5 yang bewarna merah kecoklatan. Dengan mikroskop olympus seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 dan memakai *software olysa* dengan seperangkat alat komputer, intensitas warna dapat diketahui sebagai nilai kuantitatif. Masing masing sediaan diteliti sebanyak lima lapang pandang dan nilai dari setiap lapang pandang akan dihitung sebagai nilai histoskor untuk memperoleh ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> secara kuantitas.

Sistem perhitungan skor histologi adalah sebagai berikut<sup>24</sup> :

$$\text{Skor} = (IK \times PK) + (IS \times PS) + (IL \times PL) + (IN \times PN)$$

P = persentase

I = intensitas

K = kuat

S = sedang

L = lemah

N= negatif

## **4.5. Bahan dan Alat Penelitian**

### **4.5.1. Bahan Untuk Perlakuan**

Hewan coba adalah tikus Wistar dengan umur 2,5 sampai 3 bulan dan berat 250-300 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum ad libitum. Sebelum penelitian, tikus menjalani masa adaptasi selama 7 hari.

#### 4.5.2. Bahan Untuk Eksisi-biopsi

- a) Inkubator 56<sup>0</sup> C
- b) Mikrotom
- c) Kaca obyek dan penutup

#### 4.5.3. Bahan Untuk Pemeriksaan Imunohistokimia

- a) Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti CD4<sup>+</sup>*
- b) *Kit universal streptavidin-biotin*
- c) Pensil parafin
- d) *Waterbath*
- e) Tempat pewarnaan dan cucian
- f) Mikropipet 100µl , 1-10 µl ; 40-200 µl ; 200-100 µl. *white tip, yellow tip, blue tip.*
- g) Kertas saring
- h) *Freezer*
- i) *Timer*
- j) Tabung plastik dan pipet

#### 4.6. Pelaksanaan Penelitian

##### 4.6.1. Cara Perlakuan

Sejumlah 10 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar *ad libitum* selama 7 hari. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang ditentukan secara acak.

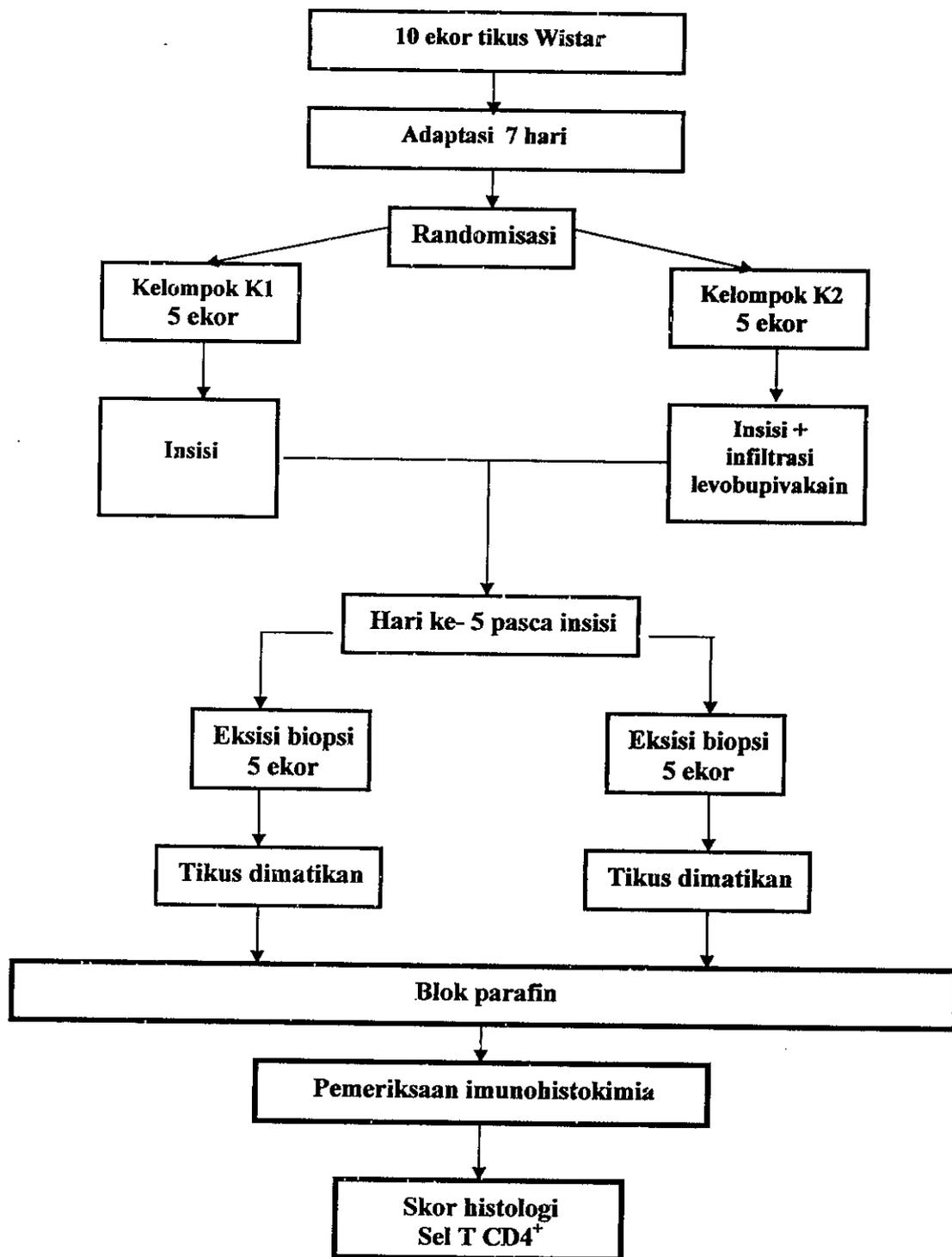
Perlakuan yang diberikan adalah:

- K1 : Kelompok 1, tikus yang setelah dilakukan insisi 2 cm, sampai subkutan tanpa diberikan infiltrasi levobupivakain.( untuk mendapat perlakuan stres yang sama tiap 8 jam selama 24 jam juga dilakukan infiltrasi sekitar luka dengan spuit kosong ).
- K2 : Kelompok 2 , tikus yang setelah dilakukan insisi 2 cm sampai subkutan, diberikan infiltrasi levobupivakain tiap 8 jam selama 24 jam.

Setelah adaptasi selama 7 hari , tikus-tikus dari kelompok perlakuan dibius dengan menggunakan ether. Sesudah terbius, bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan betadin. Selanjutnya dibuat irisan sepanjang 2 cm dan kedalamannya sampai subkutis. Luka irisan dibersihkan dan dioles larutan betadin, kemudian luka ditutup dengan 5 jahitan tunggal sederhana menggunakan benang *nylon* steril nomor 004. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan betadin dan dirawat. Pasca bedah diberikan penicillin oil 15 mg, intra muskular.

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, pada kedua kelompok masing-masing 5 ekor. Dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether. Setelah tikus terbius kemudian dibuat eksisi biopsi pada jaringan bekas irisan kira-kira 0,5 cm persegi melintasi garis irisan. Jaringan biopsi diproses secara imunohistokimia menjadi preparat setelah dibuat dengan blok parafin. Interpretasi hasil dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

## 4.7. Alur Kerja



## **4.8. Prosedur Pemeriksaan**

### **4.8.1. Prosedur Eksisi-biopsi**

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, pada kedua kelompok masing-masing 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. Jaringan biopsi diproses menjadi preparat imunohistokimia setelah dibuat dengan blok parafin.

### **4.8.2. Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia**

#### **4.8.2.A. Deparafinisasi**

Rendam slide yang ditemplei potongan jaringan biopsi dari blok parafin ke dalam xylol I dan xylol II masing masing selama 5 menit, kemudian kedalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II masing masing selama 5 menit, lalu ke dalam alkohol 90% dan alkohol 70% masing masing selama selama 5 menit, dan ke dalam aquabidest I dan aquabidest II masing masing selama 5 menit.

#### **4.8.2.B. *Quenching Endogenous Peroxidase***

Rendam slide dalam metanol ditambah 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 30 menit

#### **4.8.2.C. *Unmasking Antigen***

Membuka kembali epitope antigen yang tertutup selama proses parafinisasi dengan *citrate buffer* PH 6,4 dalam *microwave oven* temperatur *medium* selama 2 menit kemudian dalam temperatur *low* selama 2 menit.

#### **4.8.2.D. *Immunostaning***

Bloking serum albumin ditetaskan diatas potongan jaringan dalam slide selama 30 menit. diberi antibodi primer (dengan *dilution* 1 : 50 sampai dengan 1:

200) di inkubasi selama 1 jam dalam temperatur 25° C, kemudian Cuci dua kali dengan aquadest. Di beri antibodi sekunder *biotinilated* dan di inkubasi selama 30 menit, dan Cuci dua kali dengan aquadest. Diberi ensim SA- HRP (*Streptavidin horse raddish peroxidase*) kemudian Cuci dua kali dengan aquadest. Diberi subtrat ensim DAB (*diaminoben sidin*) dan pewarna tandingan *Hematoxinidin Meyer* lalu diberi canada balsem.

#### 4.9. Cara Pengumpulan Data

Dari masing masing kelompok dilakukan fiksasi dengan blok parafin. Kemudian dilakukan Pemeriksaan Imunohistokimia untuk menentukan skor histologi dari sel T CD4<sup>+</sup>. Untuk skor histologi maka akan dihitung jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan diperbandingkan antar kelompok dengan sistem perhitungan dengan skor histologi yang dilakukan oleh ahli patologi anatomi.

#### 4.10. Analisis Data

Data dikumpulkan dan diolah dengan menggunakan komputer SPSS 11.0 *for windows* dan dinyatakan dalam rerata  $\pm$  simpang baku (*mean  $\pm$  SD*). Kemudian dilakukan uji beda skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> antar kelompok dengan menggunakan uji *independent samples T-test*. dipergunakan untuk menganalisis data dengan data variabel bebas nominal dan variabel terikat yang berskala rasio<sup>25</sup>. Dengan batas derajat kemaknaan  $p < 0.05$  dengan 95 % interval kepercayaan dan penyajian dalam bentuk tabel dan grafik.

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

#### 5.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian hewan coba perbandingan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan dan tanpa infiltrasi levobupivakain pada nyeri pasca insisi. Hewan coba menggunakan 10 ekor tikus Wistar, betina, dewasa umur kurang lebih 3 bulan, dengan berat badan 250 - 300 gram. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta dan pembuatan preparat imunohistokimia dan pembacaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

#### 5.2 Deskripsi Data

Pada penelitian ini dilakukan pengujian efek perlakuan terhadap ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> pada hari ke lima. Hasilnya adalah sebagai berikut.

**Tabel 1.** Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dalam jaringan sekitar luka pada penelitian hewan coba.

No	Ekspresi sel T CD4 <sup>+</sup> pada hari ke-5	
	Tanpa levobupivakain	
1	10	
2	8.2	
3	8	
4	9.4	
5	10.2	
	Dengan levobupivakain	
6	13	
7	10.4	
8	13.4	
9	12	
10	14.6	

Sumber : Data primer 2005

Keterangan : Satuan dalam skor histologi

### 5.3 Uji Normalitas

Uji normalitas ditujukan untuk mengetahui apakah data parameter klinis atau laboratoris terdistribusi normal. Pengujian dilakukan dengan tehnik Kolmogorov Smirnov Z.

**Tabel 2.** Uji normalitas data parameter laboratoris pada kelompok tanpa Levobupivakain

Variabel	Kolmogorov Smirnov Z	P	Keterangan
Skor histologi sel T CD4 <sup>+</sup>	0,510	0,957	Normal

Sumber : data primer 2005

Dari tabel 2 menunjukkan kelompok tanpa levobupivakain jumlah skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> varians datanya normal (  $p=0,957$  ;  $p>0,05$  )

**Tabel 3.** Uji normalitas data parameter laboratoris pada kelompok Levobupivakain

Variabel	Kolmogorov Smirnov Z	P	Keterangan
Skor histologi sel T CD4 <sup>+</sup>	0,403	0,997	Normal

Sumber : data primer 2005

Dari tabel 3 menunjukkan kelompok levobupivakain jumlah skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> varians datanya normal (  $p=0,997$  ;  $p>0,05$  )

### 5.4 Uji Homogenitas

Uji homogenitas (uji beda variansi) ditujukan untuk mengetahui apakah data parameter klinis atau laboratoris dari kedua kelompok berasal dari populasi yang homogen.

**Tabel 4.** Hasil uji berat badan hewan coba.

Variabel	Kelompok	mean	t	df	p	keterangan
Berat badan (gr)	Tanpa levobupivakain	274,62±13.6	-0,670	8	0,522	Tidak bermakna
	Dengan levobupivakain	280,50±14.1				

Sumber : data primer 2005

Dari tabel 4 diatas untuk uji homogenitas variabel yang dapat diukur dari hewan coba hanya berat badan. Didapat bahwa berat badan dari hewan coba dari kelompok tanpa levobupivakain dan kelompok dengan levobupivakain hampir sama atau berbeda tidak bermakna ( $p=0,522$  ;  $p>0,05$ ). Berarti kedua kelompok berasal dari populasi yang homogen.

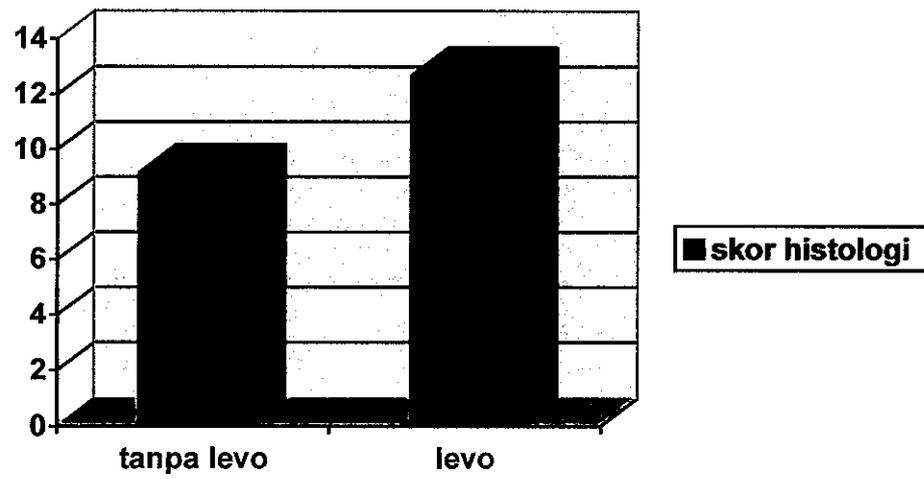
### 5.5 Uji Perbedaan Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup>

Tabel 5. Hasil uji beda skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada hewan coba

Variabel	Kelompok	mean	t	df	p	keterangan
Skor histologi sel T CD4 <sup>+</sup>	Tanpa levobupivakain	9,16±1.01	-4,195	8	0,003	Bermakna
	Dengan levobupivakain	12.68±1.58				

Sumber data primer 2005

Dari tabel 5 di atas menunjukkan skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> antara kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain berbeda bermakna ( $p=0.003$  ;  $p<0.05$ ). Rerata dari kelompok dengan levobupivakain lebih tinggi dari kelompok tanpa levobupivakain. Hal ini menunjukkan bahwa pada luka insisi hewan coba yang diinfiltrasi anestesi lokal levobupivakain ekspresi sel T CD 4<sup>+</sup> secara bermakna lebih banyak di banding pada hewan coba tanpa infiltrasi anestesi lokal levobupivakain.



**Gambar 4.** Grafik histogram nilai rerata skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan

Dalam penelitian ini dilibatkan 10 ekor tikus betina galur Wistar dewasa yang dibuat insisi pada punggung, kemudian dilakukan infiltrasi anestesi lokal levobupivakain pada sekitar luka dan dilihat perbedaannya terhadap skor histologi Sel T CD4<sup>+</sup> setelah hari ke lima.

Untuk uji normalitas menunjukkan kelompok tanpa levobupivakain jumlah skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> varians datanya normal dengan  $p=0,957$  ;  $p>0,05$  (tabel 2) dan kelompok levobupivakain jumlah skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> varians datanya normal dengan  $p=0,997$  ;  $p>0,05$  (tabel 3)

Untuk uji homogenitas kedua kelompok dengan variabel yang dapat diukur yaitu berat badan, dimana didapat hasil statistik berbeda tidak bermakna dengan  $p=0.522$  ;  $p>0.05$  (tabel 4). Berarti kedua kelompok berasal dari populasi yang homogen, pada umumnya tikus berasal dari satu indukan dimana mempunyai karakteristik yang mirip.

Pada penelitian ini pengambilan biopsi jaringan pada luka dilakukan pada hari kelima, karena jumlah sel T CD4<sup>+</sup> bermakna pada hari kelima pada proses penyembuhan luka, sehingga pada pemeriksaan imunohistokimia diharapkan terdapat sel TCD4<sup>+</sup> dalam jumlah yang bermakna untuk dibandingkan antara yang diberi perlakuan dan tidak <sup>16</sup>.

Pada Penelitian ini, bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dengan dan tanpa infiltrasi levobupivakain pada nyeri pasca insisi disekitar luka . Hasil penelitian menunjukkan bahwa skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> pada jaringan sekitar luka dipengaruhi oleh pemberian infiltrasi anestesi lokal levobupivakain, perbedaanya bermakna  $p=0,003$  ;  $p<0.05$  (tabel 5), artinya Terdapat perbedaan skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> dengan infiltrasi levobupivakain dibanding tanpa infiltrasi levobupivakain pada nyeri pasca insisi sekitar luka. Rerata dari kelompok dengan levobupivakain lebih tinggi ( $12.68\pm 1.58$ ) dari kelompok tanpa levobupivakain( $9.16\pm 1.01$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pada luka insisi hewan coba yang diinfiltrasi anestesi lokal levobupivakain jumlah sel T CD 4<sup>+</sup> secara bermakna lebih tinggi di banding pada hewan coba tanpa infiltrasi anestesi lokal levobupivakain.

Hal ini sesuai dengan Contran R, (1999) bahwa dengan menghambat nyeri dengan anestesi lokal diharapkan respon imun meningkat yang salah satunya adalah limfosit T terutama sel T CD4<sup>+</sup> pada luka sehingga proses penyembuhan menjadi lebih baik.

Menurut Constantinnides P, (1994) bahwa luka insisi akan menimbulkan nyeri. Nyeri akut bila tidak dikelola dengan tepat akan berakibat memperpanjang fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin. Nyeri akan merangsang kelenjar pituari melepaskan *adreno corticotropin hormon* (ACTH) yang selanjutnya akan mengaktifkan kelenjar adrenal sehingga melepas hormon steroid (kortisol). Hormon steroid yang tinggi akan menimbulkan

disregulasi sistem imun berakibat terjadi penurunan ketahanan tubuh yang dapat menurunkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>, sehingga menghambat penyembuhan luka.

Menurut Blotnick S, (1994) bahwa Sel T CD4<sup>+</sup> diketahui menginduksi dan mengatur respon imun dengan memproduksi sitokin seperti IL2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  atau *macrophage-colony-stimulating factor* yang berperan dalam proses penyembuhan luka.

Dengan menghambat jalur nyeri menggunakan infiltrasi levobupivakain disekitar luka insisi, diharapkan sistem imun tidak terganggu sehingga skor histologi sel T CD4<sup>+</sup> tidak menurun dan penyembuhan luka dapat lebih baik. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Mulyata S, (2002) stres pada hewan coba menyebabkan hambatan kesembuhan luka pasca episiotomi. Hewan coba tidak stres, kesembuhan lukanya lebih cepat. Vintar N, (2002) melaporkan penggunaan lokal anestesi bupivakain lewat kateter dalam luka akan efektif mengurangi nyeri setelah operasi hernia iunguinalis dan penyembuhan luka lebih baik.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Simpulan

Kesimpulan hasil penelitian dan jawaban hipotesis penelitian adalah:

Terdapat perbedaan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> di jaringan sekitar luka dengan infiltrasi levobupivakain lebih tinggi dibanding tanpa infiltrasi levobupivakain pada nyeri pasca insisi.

#### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disarankan sebagai berikut:

1. Pada luka insisi operasi dapat di pertimbangkan penggunaan infiltrasi anestesi lokal levobupivakain pada sekitar luka karena ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> akan lebih tinggi dibanding tanpa levobupivakain pada jaringan sekitar luka sehingga penyembuhan luka menjadi lebih baik.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap faktor pertumbuhan seperti TGF $\beta$ , FGF, PDGF, VeGF dan lainnya
3. Dilakukan penelitian dengan jangka waktu yang lebih lama untuk melihat kesembuhan luka secara makroskopis.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cotran Ramzi S, Kumar V, Collins T. Pathology basic of disease. 6<sup>th</sup> ed. W B Saunders Co. Philadelphia. 1999 : 21-101
2. Blotnick S, Peoples G E, Freeman M R, Eberlein T J, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: Differential production and release by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, Cell Biology. April 1994 Vol 91: 2890-2894
3. Davis PA, Corless DJ, Aspinall R, Wastell C. Effect of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell depletion on wound healing. Br J Surg. Feb 2001 ; 88: 298-304
4. Constantinnides P. General pathobiology. 1<sup>st</sup> ed. Appleton and Lange. Norwalk connecticut. 1994 : 173-186
5. 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>
6. Field H L. Pain. 1<sup>st</sup> ed. Mc Graw Hill book Co. New York. 1987 : 1-51
7. Devor M. Pain mechanism and pain syndrome. In : Champbell J N. Pain 1996 an update review. IASP press. Seattle. 1996 : 103-112
8. 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

9. Melzacks R, Wall P. The gate control theory of pain. In : Melzacks R, Wall P. The challenge of pain 1<sup>st</sup> ed. Penguin education. 1984 : 223-261
10. Vintar N, Pozlep G, Rawal N, et all. Incisional self-administration of bupivacaine or ropivacaine provides effective analgesia after inguinal hernia repair. CJA 2002 ; 49: 481-486
11. Pleuvry B J. The chemical modulation of nociceptive responses and pain. In : Healy T E J, Cohen P J. eds. A practice of anesthesia. 6<sup>th</sup> ed. London Edward Arnold. 1995 : 80-88
12. Bonica J 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
13. Churchill H C, Davidson. Pain clinical and operative nerve block. In : A practice of anesthesia. 5<sup>th</sup> ed. PG pub. Pte. Ltd. Singapore. 1986 : 893-900
14. Notosoedirjo M, Nyeri dan tatalaksana penangulangannya. Disajikan dalam pertemuan klinik yang diselenggarakan oleh ikatan dokter ahli jiwa cabang Surabaya di Batu, Malang pada tanggal 8 – 9 juni 1996.
15. Kresno Boedina S. Imunologi, diagnosis dan prosedur laboratorium. 4<sup>th</sup> ed. Balai penerbit FK UI. Jakarta. 2003 : 4-32
16. Wound healing. <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm>
17. Rossenberg P H, Renkonen O V. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. Anesthesiology 1985 ; 62 : 178-179

18. Hollmann , Markus W, Durieux E, Local anesthetics and the inflammatory response : A new therapeutic indication ?, *Anesthesiology*. September 2000; 93 : 858-875
19. Roitt I. *Essential immunology*. 8<sup>th</sup> ed. Blackwell science limited, Oxford 1994 : 152-161.
20. B cells and T cells. <http://users.rcn.com/jkimballma.ultranet/biologypages/b/#t-cells>
21. Riberdy J M, Mostaghel E, Doyle C. Disruption of the CD4- major histocompatibility complex class II interaction blocks the development of CD4<sup>+</sup> T cells in vivo, *Immunology*. April 1998 ;95 : 4493-4498
22. 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 : 122-124.
23. World Health Organization. Resarch guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993 : 44.
24. Scheres H.M.E, Goei A.F.P.M, Rousch M.J.m. Quantification of oestrogen receptors in breast cancer: radiochemical assay on cytosols and cryostat sections compared with semiquantitative immunocytochemical analysis. *J Clin Pathol* 1988;41:623-632.
25. Sudigdo S, Sofyan I, *Dasar dasar metoologi penelitian klinis edisi ke-2*, Sagung seto Jakarta. 2002 :247-249.