

**PENGARUH INFILTRASI ANESTETIK LOKAL LEVOBUPIVAKAIN
TERHADAP SKOR HISTOLOGI MHC KELAS I
PADA PENYEMBUHAN LUKA**

*THE INFLUENCE LEVOBUPIVACAINE INFILTRATION OF
CLASS I MHC HISTOLOGIC SCORE ON WOUND HEALING*



Tesis

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar derajat Sarjana S-2
dan PPDS I Anestesiologi

Aria Dian Primatika

**PROGRAM PASCA SARJANA MAGISTER ILMU BIOMEDIK DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I ANESTESIOLOGI
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

Tesis

**PENGARUH INFILTRASI ANESTETIK LOKAL LEVOBUPIVAKAIN
TERHADAP SKOR HISTOLOGI MHC KELAS I
PADA PENYEMBUHAN LUKA**

*THE INFLUENCE LEVOBUPIVACAINE INFILTRATION OF
CLASS I MHC HISTOLOGIC SCORE ON WOUND HEALING*

Disusun oleh :

Aria Dian Primatika

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 13 Maret 2006
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

**Menyetujui,
Komisi Pembimbing**

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Ery Laksana, SpAn.KIC
NIP. 140 135 347

Prof.Dr.dr. Tjahjono SpPA(K) FIAC
NIP. 130 368 076

Mengetahui :

**Ketua
Program Studi PPDS I Anestesiologi
Universitas Diponegoro**

**Ketua
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro**

Dr. Uripno Budiono, SpAn(K)
NIP. 140 098 893

Prof.Dr.H. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 249

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 sumber pustaka hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, yang dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Februari 2006

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. Identitas

Nama : **Dr. Aria Dian Primatika**
NIM Magister Biomedik : G4A002038
NIM PPDS I Anestesiologi : G3F002063

Tempat / Tgl lahir : **Semarang / 11 Nopember 1976**

Agama : **Islam**

Jenis kelamin : **Laki-laki**

B. Riwayat Pendidikan

- 1. SD Siliwangi Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1989**
- 2. SMP 1 Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1992**
- 3. SMA 3 Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1995**
- 4. FK UNDIP Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 2001**
- 5. PPDS I Anestesiologi UNDIP Semarang Jawa Tengah**
- 6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah**

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang tua Ayah : **Dr.H. Marwoto, SpAn. KIC**

Ibu : **Endang Sudarmi**
2. Nama Istri : **Artika Tunjungsari, SE**

KATA PENGANTAR

Rasa syukur dipanjatkan kehadirat Allah Subhannahuwataala atas limpahan rahmat dan anugerahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Pengaruh Infiltrasi Anestetik Lokal Levobupivakain terhadap Skor Histologi MHC Kelas I pada Penyembuhan Luka Tikus Wistar”

Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar derajat sarjana S₂ Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Kepada Dr.Ery Laksana ,SpAn.KIC sebagai dosen pembimbing utama dan Prof.Dr.dr. Tjahjono SpPA(K)FIAC sebagai dosen pembimbing kedua, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran serta dorongan semangat dalam penulisan tesis ini. Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. *Prof.Dr.Kabulrachman,SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran*

Universitas Diponegoro Semarang.

2. *Prof.Dr.H.Soebowo,SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.*

3. *Dr.Hariyo Satoto,SpAn(K), Kepala Bagian Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr Kariadi Semarang.*

4. *Dr.Uripno Budiono, SpAn(K), Ketua Program Studi PPDS I Anestesiologi*

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

5. *Dra. Dyah Retno Budiani,Msi dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.*

6. *Tim penguji dan nara sumber yang telah berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.*
7. *Semua rekan sejawat residen ilmu anestesi dan reanimasi FK UNDIP, pegawai UPHP UGM Yogya dan PA UNS Surakarta.*
8. *Ucapan terima kasih khususnya kepada orang tua saya, mertua saya, dan adik-adik saya yang selama ini memberikan dorongan moril maupun materiil untuk keberhasilan studi saya.*
9. *Tesis ini kupersembahkan untuk istriku tercinta atas dukungannya selama ini yang penuh dengan pengertian, kesabaran dan cinta kasih untuk memberi semangat dalam keberhasilan saya mencapai cita-cita.*

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran demi kesempurnaan penelitian ini akan diterima dengan senang hati. Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu kedokteran.

*Semarang, Pebruari 2006
Penulis*

ABSTRAK

Latar belakang : Nyeri akut pasca pembedahan memicu timbulnya gejala klinis patofisiologis, menekan respons imun, sehingga menyebabkan penurunan sistem imun yang akan menghambat penyembuhan luka. Levobupivakain, anestetik lokal durasi panjang yang efektif mengurangi nyeri akut. MHC kelas I sebagai petanda permukaan sel yang terinfeksi memberi sinyal pada sel T sitotoksik sehingga fungsinya dalam respons imun sangat penting. Kemampuan limfosit T sitotoksik untuk melisis sel merupakan fungsi langsung dari banyaknya MHC kelas I yang diekspresikan.

Tujuan : Membuktikan pengaruh infiltrasi anestetik lokal levobupivakain terhadap ekspresi MHC kelas I.

Metode : Dilakukan penelitian eksperimental pada hewan coba, *randomized post test only control group design*, menggunakan tikus Wistar. Sampel 15 ekor dibagi menjadi 3 kelompok; kelompok I kontrol, kelompok II insisi subkutis tanpa infiltrasi levobupivakain, kelompok III insisi subkutis dan infiltrasi levobupivakain dosis 12,6 mcg/gram BB setiap 8 jam selama 24 jam. Ekspresi MHC kelas I pada sekitar luka insisi dinilai dengan skor histologi dengan menggunakan pengecatan secara imunohistokimia. Biopsi jaringan diambil pada hari kelima karena pada penyembuhan luka normal jumlah limfosit T bermakna pada hari kelima dan mencapai puncak pada hari ketujuh. Data dianalisis dengan uji beda *Kruskal-Wallis*.

Hasil : Penelitian menunjukkan pada kelompok kontrol terdapat ekspresi MHC kelas I dengan hasil rerata skor histologi 4,92. Hasil rerata skor histologi MHC kelas I pada kelompok levobupivakain lebih rendah (8,12) dibanding kelompok tanpa levobupivakain (5,26) dan secara statistik berbeda bermakna ($p=0,011$).

Simpulan : Ekspresi MHC kelas I (skor histologi MHC I) pada kelompok dengan infiltrasi levobupivakain lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tanpa infiltrasi levobupivakain.

Kata kunci : Levobupivakain, MHC kelas I, penyembuhan luka.

ABSTRACT

THE INFLUENCE LEVOBUPIVACAINE INFILTRATION OF CLASS I MHC HISTOLOGIC SCORE ON WOUND HEALING

Background : Post operative acute pain stimulates clinical pathofysiologic symptoms, suppresses immune respons, reduces the activity of the immune system and inhibits wound healing. Levobupivacaine is a long acting local anaesthetic, suitable for pain control. Presenting class I MHC antigens to cytotoxic T lymphocytes, this is important to response immune. The ability of cytotoxic T lymphocytes to kill infected target cells depends on the amount of class I MHC expression.

Objective : To prove the influence of levobupivacaine infiltration on class I MHC expression.

Methods : This study was an animal experimental study with randomized post test only control group design. Randomly 15 Wistar rats were divided into 3 groups. Group I was the group for control without treatment. Group II, rats that got incisions without levobupivacaine infiltration. Group III, rats that got incisions and levobupivacaine infiltration dosed 12.6 mcg/gram BW every 8th hours for 24 hours. The expression class I MHC cell around wound incision was analized with histologic score from samples with immunohistochemistry staining. Samples were taken from tissue biopsy on 5th day because in normal wound healing the amount of lymphocytes T were significant at 5th day and the peak at 7th day. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test.

Results : This study showed that control group have the expression of class I MHC with histologic scor mean 4.92. The incission tissue with levobupivacaine has lower class I MHC histologic score (mean value 5,26) than group without levobupivakain (mean value 8,12). There was a significant difference of class I MHC ($p=0,011$).

Conclusions : The expression of class I MHC (histologic score) in levobupivacaine infiltration group is lower than without levobupivacaine infiltration group.

Key words : Levobupivacaine, class I MHC, wound healing.

DAFTAR ISI

	<i>Halaman</i>	
	<i>HALAMAN JUDUL</i>	<i>i</i>
	<i>LEMBAR PENGESAHAN</i>	<i>ii</i>
	<i>PERNYATAAN</i>	<i>iii</i>
	<i>RIWAYAT HIDUP</i>	<i>iv</i>
	<i>KATA PENGANTAR</i>	<i>v</i>
	<i>DAFTAR ISI</i>	<i>vii</i>
	<i>DAFTAR TABEL</i>	<i>ix</i>
	<i>DAFTAR GAMBAR</i>	<i>x</i>
	<i>DAFTAR LAMPIRAN</i>	<i>xi</i>
	<i>ABSTRAK</i>	<i>xii</i>
	<i>ABSTRACT</i>	<i>xiii</i>
	<i>DAFTAR SINGKATAN</i>	<i>xiv</i>
BAB 1	<i>PENDAHULUAN</i>	<i>1</i>
1.1	<i>Latar Belakang Masalah</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Rumusan Masalah</i>	<i>5</i>
1.3	<i>Tujuan Penelitian</i>	<i>5</i>
1.4	<i>Manfaat Penelitian</i>	<i>6</i>
BAB 2	<i>TINJAUAN PUSTAKA</i>	<i>7</i>
2.1	<i>Levobupivakain</i>	<i>7</i>
2.1.1.	<i>Sifat Kimia</i>	<i>7</i>
2.1.2.	<i>Farmakokinetik</i>	<i>7</i>
2.1.3	<i>Farmakodinamik</i>	<i>8</i>
2.1.4.	<i>Efek Toksik</i>	<i>8</i>
2.1.5.	<i>Aplikasi Klinik</i>	<i>8</i>
2.1.6.	<i>Efek Samping</i>	<i>8</i>
2.2.	<i>Patofisiologi Nyeri</i>	<i>9</i>
2.2.1.	<i>Proses Terjadinya Nyeri</i>	<i>10</i>
2.3.	<i>Penyembuhan Luka</i>	<i>14</i>
2.3.1.	<i>Kejadian Seluler dan Molekuler</i>	<i>16</i>
2.3.2.	<i>Pembentukan Jaringan penyembuhan</i>	<i>17</i>
2.3.3.	<i>Fase Inflamasi</i>	<i>19</i>
2.3.4.	<i>Fase Proliferasi</i>	<i>21</i>
2.3.5.	<i>Fase Maturasi</i>	<i>24</i>
2.4.	<i>Kegiatan Pembentukan Jaringan Parut Penyembuhan</i>	<i>25</i>
2.5.	<i>Pengaruh Anestesi Lokal terhadap Penyembuhan Luka</i>	<i>26</i>

	2.6. Class I Major Histocompatibility Complex	
		27
BAB 3	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	32
	3.1 Kerangka Teori.....	32
	3.2 Kerangka Konsep.....	33
	3.3 Hipotesis Penelitian.....	33
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	34
	4.1 Rancangan Penelitian.....	
		34
	4.2 Sampel Penelitian.....	35
	4.2.1. Kriteria inklusi.....	35
	4.2.2. Kriteria eksklusi.....	35
	4.2.3. Besar sampel.....	35
	4.2.4. Randomisasi.....	36
	4.3. Waktu dan lokasi penelitian.....	36
	4.4. Variabel penelitian.....	36
	4.4.1. Variabel bebas.....	36
	4.4.2. Variabel terikat.....	36
	4.4.3. Definisi operasional.....	37
	4.5. Bahan dan alat penelitian.....	
		38
	4.6. Pelaksanaan penelitian.....	39
	4.6.1. Alur penelitian.....	39
	4.7. Prosedur pemeriksaan.....	42
	4.7.1. Prosedur eksisi-biopsi.....	42
	4.7.2. Prosedur pembuatan preparat imunohistokimia	42
	4.8. Cara pengumpulan data.....	43
	4.9. Analisis data.....	43
BAB 5	HASIL PENELITIAN.....	45
	5.1. Hasil Penelitian.....	45
	5.2. Deskripsi data.....	45
	5.1 Pembahasan.....	50
BAB 6	SIMPULAN DAN SARAN.....	53
	6.1 Simpulan.....	53
	6.2 Saran.....	53
	DAFTAR PUSTAKA.....	54
	LAMPIRAN.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Data berat badan tikus.....	
	46
Tabel 2. Skor histologi MHC kelas I pada hari ke-5.....	
	46
Tabel 3. Nilai rerata MHC kelas I	
	47
Tabel 4. Uji normalitas rerata MHC kelas I	
	48
Tabel 5. Uji beda kelompok MHC kelas I.....	
	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Fase penyembuhan luka.....	19
Gambar 2. Stadium respon inflamasi.....	21
Gambar 3. MHC kelas I.....	31
Gambar 4. Diagram nilai rerata MHC kelas I	48
Gambar 5. Gambar mikroskopik MHC kelas I.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data berat badan dan dosis levobupivakain.....	60
Lampiran 2. Skor histologi MHC kelas I.....	60
Lampiran 3. Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	62
Lampiran 4. Uji beda Uji beda MHC kelas I (<i>Kruskal-Wallis</i>).....	62
Lampiran 5. Gambar mikroskopis MHC kelas I.....	63

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Respons imun merupakan hal penting yang akan membantu tubuh untuk proteksi terhadap agen infeksi. Apabila mikroorganisme masuk ke dalam tubuh terdapat dua cara pertahanan utama yang berperan yaitu efek perusakan oleh bahan kimia yang larut seperti halnya enzim bakterisidal dan mekanisme fagositosis. Pada proses penyembuhan luka respons imun memegang peranan penting. Penurunan sistem imun akan mengakibatkan terjadinya infeksi yang berakibat gangguan penyembuhan luka sehingga penyembuhan luka menjadi memanjang, sedangkan penyembuhan yang baik merupakan faktor penting yang diharapkan terjadi dalam proses penyembuhan luka.^{1,2}

Terjadinya proses penyembuhan luka tidak terlepas dari peran sitokin dan faktor pertumbuhan, seperti: Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Vascular Endothelial Growth Factor (VeGF), Angiopoetin, Interleukin 1 (IL1), IL 6, Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α), Interferon γ (IFN γ), serta makrofag yang diproduksi oleh limfosit dan leukosit pada tahap sintesis kolagen sebagai penyembuhan luka secara primer apabila terjadi penyatuan tepi luka secara sempurna, biasanya terjadi pada luka bersih. Limfosit T selain memproduksi sitokin sebagai sel anti inflamasi juga sebagai sintesis dari faktor pertumbuhan. Penelitian oleh Blotnick S dan kawan kawan th 1993

mengisolasikan limfosit T dari darah tepi manusia yang menghasilkan dua karakteristik faktor pertumbuhan yaitu heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) dan basic fibroblastgrowth factor (bFGF).^{1,2,3}

Suatu tindakan bedah akan menimbulkan respons stres berupa peningkatan sekresi hormon katabolik yaitu glukokortikoid, hipermetabolisme, aktivasi sistem otonom, peningkatan kerja jantung, rasa nyeri, gangguan terhadap paru, saluran cerna, gangguan sistem koagulasi, fibrinolitik dan immunosupresi. Proses penyembuhan luka sangat erat hubungannya dengan proses inflamasi, tanpa adanya inflamasi tidak akan terjadi proses penyembuhan luka, sedangkan organ yang terluka akan tetap menjadi sumber nyeri selama proses inflamasi dan penyembuhan luka terjadi. Nyeri menjadi stresor yang memicu timbulnya gejala klinis patofisiologis, memicu modulasi respons imun, sehingga menyebabkan penurunan sistem imun yang berakibat pemanjangan penyembuhan luka. Salah satu faktor sistemik yang menghambat penyembuhan luka adalah adanya peningkatan hormon glukokortikoid, yaitu akan menghambat pembentukan fibroblas, sebagai anti inflamasi, dan mengganggu sintesis kolagen. Nyeri bila tidak dikelola dengan tepat akan berakibat memperpanjang fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin. Apabila hormon glukokortikoid meningkat akibatnya akan menghambat respons imun. Rasa nyeri yang timbul merupakan salah satu pencetus peningkatan hormon glukokortikoid.^{2,4,5}

Sistem imun didapat terdiri dari sistem imun humoral (sel B) dan sistem imun seluler (sel T). Sel T atau limfosit T terdiri dari T *helper*, T supresor dan T

sitotoksik, masing-masing dibedakan karena mempunyai fungsi yang berbeda dan mengekspresikan antigen permukaan yang karakteristik dan berkorelasi dengan stadium diferensiasi di timus. $CD8^+$ (*Cluster of Differentiation* atau *cluster designation*) merupakan subset sel T sitotoksik.

MHC kelas I (*Class I Major Histocompatibility Complex*) terdapat hampir di semua sel tubuh yang berinti dan merupakan bagian dari kromosom yang selain mengatur ekspresi antigen transplantasi, juga mengandung gen yang mengatur respons imun dan menentukan kepekaan terhadap kelainan imunologik. Fungsi MHC kelas I sebagai petanda permukaan sel yang terinfeksi memberi sinyal pada sel T sitotoksik sehingga fungsinya dalam respons imun sangat penting. MHC kelas I berasosiasi dengan $CD8^+$ sitotoksik ($CD8^+$ sebagai *co-receptor* sel T sitotoksik), maka kemampuan limfosit T sitotoksik untuk melisis sel merupakan fungsi langsung dari banyaknya MHC kelas I yang diekspresikan. Pada beberapa penelitian dalam proses penyembuhan luka, $CD8^+$ turut mengatur proses penyembuhan luka dalam hal *down regulating wound healing*. Dalam hal ini $CD8^+$ akan menghambat penyembuhan luka, sehingga apabila terjadi penyembuhan luka yang baik maka ekspresi $CD8^+$ dan MHC kelas I akan berkurang.^{2,3}

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. Infiltrasi anestetik 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 sehingga akan menghilangkan salah satu faktor sistemik penghambat penyembuhan luka, yaitu glukokortikoid. Anestetik 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. Hambatan terhadap nyeri akut diharapkan akan meningkatkan respons imun sehingga proses penyembuhan menjadi lebih baik.^{1,5,6,7,8}

Beberapa peneliti telah melaporkan pemakaian anestetik lokal lidokain, bupivakain topikal pada luka bakar terbukti menghambat ekstrasvasasi plasma, mengurangi nyeri serta komplikasi infeksi maupun alergi, tidak menyebabkan peradangan lokal, memiliki efek bakteriostatik serta proses penyembuhan luka lebih baik. Penelitian ini akan menerapkan hal baru yaitu penggunaan levobupivakain, obat anestetik lokal dengan depresi jantung dan sistem saraf pusat minimal, lama kerja obat 6-8 jam pada penggunaan secara infiltrasi, efektif untuk mengurangi nyeri akut selama 24 jam pertama pasca pembedahan.^{9,10} Pengaruh penggunaan infiltrasi levobupivakain di sekitar luka terhadap ekspresi MHC kelas I belum pernah dilaporkan sebelumnya. MHC kelas I dipilih dalam penelitian ini bertujuan untuk lebih memastikan respons imun yang terjadi pada sel T sitotoksik dengan jumlah bermakna pada hari ke 5. Pada penyembuhan luka normal, jumlah limfosit T bermakna pada hari kelima dan mencapai puncak pada hari ketujuh.

Ekspresi MHC kelas I (dinilai dengan skor histologi) dapat dihitung jumlahnya pada pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi anti MHC kelas I dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin. Jumlah MHC dapat dihitung berdasarkan intensitas warna yang terlihat pada mikroskop dengan menggunakan skor histologi. Penelitian ini dilakukan pada binatang percobaan tikus karena perlakuan insisi tanpa analgetik serta tindakan biopsi jaringan pada jam ke-24 pasca insisi sehingga tidak etis bila diterapkan pada manusia. Pemilihan tikus Wistar berdasarkan pertimbangan karena tikus ini mudah diperoleh galur murninya.

1.2. Rumusan masalah

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

Apakah infiltrasi anestetik lokal levobupivakain akan mempengaruhi skor histologi MHC kelas I dalam proses penyembuhan luka pada tikus wistar.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Menganalisis perbedaan skor histologi MHC kelas I antara kelompok yang diberi dan kelompok yang tidak diberi anestetik lokal levobupivakain.

1.3.2. Tujuan Khusus

- **Menghitung skor histologi MHC kelas I pada kelompok yang tidak diberi infiltrasi lokal levobupivakain.**
- **Menghitung skor histologi MHC kelas I pada kelompok yang diberi infiltrasi lokal levobupivakain.**
- **Menganalisis perbedaan skor histologi MHC kelas I antara kelompok yang tidak diberi dan kelompok yang diberi infiltrasi lokal levobupivakain.**

1.4. Manfaat penelitian

Apabila anestesi lokal levobupivakain pada penelitian ini terbukti akan meningkatkan respons imun maka :

1. Penelitian ini dapat dijadikan sumbangan teori mengenai pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain terhadap respon imun spesifik MHC kelas I.
2. Hasil dari penelitian ini dalam hal klinis dapat membuktikan bahwa anestetik lokal levobupivakain mampu berperan dalam penyembuhan luka. Hal ini dapat dilihat pengaruhnya terhadap perubahan ekspresi MHC kelas I.
3. Penelitian ini sebagai penelitian dasar pengaruh anestetik lokal levobupivakain terhadap MHC kelas I sehingga dapat digunakan sebagai landasan penelitian selanjutnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Levobupivakain

2.1.1. Sifat Kimia

Levobupivakain merupakan obat anestesi lokal dengan durasi yang lama (sekitar 8 jam). Obat anestesi lokal ini termasuk golongan amid (CONH-) yang memiliki atom karbon asimetrik dan isomer Levo(-). Levobupivakain memiliki pKa 8,1. Peningkatan pH akan meningkatkan molekul basa bebas, molekul bebas melintasi membran akson dengan mudah dan beraksi lebih cepat. Ikatan dengan protein lebih dari 97% terutama pada asam α 1 glikoprotein dibandingkan pada albumin. Pada pasien hipoproteinemi, sindrom nefrotik, kurang kalori protein, bayi baru lahir dengan sedikit kadar protein, menyebabkan kadar obat bebas dalam plasma tinggi sehingga efek toksik terlihat pada dosis rendah.⁹

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.⁹

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. Konsentrasi untuk menimbulkan efek toksik pada jantung dan saraf lebih besar pada levobupivakain dari pada bupivakain. Batas keamanan 1,3 mempunyai arti efek toksik tidak akan terlihat sampai konsentrasi 30%.⁹

2.1.4. Efek Toksik

Levobupivakain menimbulkan depresi kardiak lebih sedikit dibandingkan bupivakain dan ropivakain. Gejala toksisitas sistem saraf pusat pada bupivakain lebih rendah rata rata 47,1 mg dibandingkan levobuvikain 56.1 mg.⁹

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 (400 mg) dalam 24 jam.^{9,10}

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.⁹

2.2. Nyeri

Nyeri akut dipicu oleh kerusakan somatik atau viseral dengan lama berlangsungnya bersamaan dengan penyembuhan luka.^{11,12} 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 nosispetif akan berjalan mengikuti sistem aksi menuju pusat supraspinal untuk dipersepsi di pusat somatosensoris sebagai pengalaman nyeri.^{12,13}

Tahap proses terjadinya nyeri sebagai berikut :

a. 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* (PGG₂ dan PGH₂) akan membentuk mediator inflamasi sekaligus mediator nyeri tromboksan (TXA₂), prostaglandin (PGE₂, PG₂α), prostasiklin (PGI₂). Terbentuk pula lekotrien (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 respons 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

respons 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 lekotrien D4 (LTD4) mengaktifkan makrofag dan basofil yang selanjutnya akan menstimuli dan meningkatkan pelepasan eikosanoids, yaitu metabolit yang terlepas akibat terjadinya metabolisme asam arakhidonat. Lekotrien D4 juga melepas substansi P dan secara tidak langsung bekerja pada neuron sensoris dengan menstimuli sel lain untuk melepaskan bahan neuron aktif. Lekosit PMN melepaskan lekotrien B4 (LTB4). Keduanya berperan dalam sensitisasi nosiseptor.^{12,13,14}

Pada inflamasi, sistem imun akan melepaskan sitokin proinflamasi : interleukin (IL)-1 β , IL-6, TNF, IFN. Sitokin ini dengan cepat akan berinteraksi dengan saraf perifer melalui mediator. IL-1 β 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).^{13,14}

b. Transmisi

Dalam keadaan hiperalgesia intensitas impuls akan membesar 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 nosispetif khusus menghantarkan impuls nosispetif, 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 direspons adalah mekanik, mekanotermal dan polimodal.^{13,14}

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 gelaitnosa (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.^{11,15}

c. 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 transmisi sel 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 HT2, GABA akan menghambat nyeri. Substansi yang meningkatkan nyeri yaitu substansi P, ATP, asam amino eksitatori.^{12,14}

d. Persepsi

Hasil proses integrasi pada pusat kognisi, afeksi dan impuls nyeri yang dirasakan individu dan bagaimana cara individu menghadapinya.¹⁶

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. Proses inflamasi pada penyembuhan luka akan menimbulkan nyeri.¹⁷

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

jaringan pengikat. Termasuk komponen seluler adalah eritrosit, leukosit : neutrofil, eosinofil, basofil, monosit, limfosit, trombosit. Termasuk sel jaringan pengikat adalah sel mast, fibroblast, monosit, makrofag dan limfosit. Elemen ekstra seluler diantaranya kolagen, elastin, glikoprotein adhesif : fibronektin, laminin, kolagen non fibril, tenasin, proteoglikan.^{1,8}

Proses penyembuhan luka terjadi pada awal inflamasi, selanjutnya akan berjalan bersama kemudian inflamasi akan berakhir tetapi penyembuhan luka masih terus berlanjut. 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.^{1,8,17}

Penyembuhan luka merupakan fenomena kompleks dan melibatkan berbagai proses dengan urutan sebagai berikut^{1,2} :

- a. Inflamasi akut menyusul terjadinya kerusakan jaringan.
- b. Regenerasi sel parenkimal.
- c. Migrasi dan proliferasi sel parenkimal.
- d. Sintesis protein *extra cellular matrix* (ECM).
- e. Remodeling jaringan ikat dan komponen parenkimal.
- f. Kolagenasi dan akuisisi kekuatan luka.

g. 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.^{1,2,17}

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 leukosit dalam sirkulasi kapiler. Neutrofil akan tertarik dan terjadi akumulasi mendekati sel endotel dinding venula. Proses ini disebut *marginasi*. Akumulasi neutrofil akan menempel pada permukaan endotel karena adanya molekul adhesi yang dilepaskan oleh endotel karena pengaruh IL 1 yang diproduksi neutrofil.¹

Molekul adhesi tersebut antara lain E-selektin, ICAM 1, ICAM 2. Selanjutnya neutrofil akan bergerak menggelinding pada permukaan endotel akibat daya dorong aliran plasma. Perlekatan neutrofil 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.^{1,17}

Aktifitas neutrofil sejak di intravaskuler akan bergerak ke tempat target, demikian juga terjadi pada eosinofil, basofil, monosit dan limfosit. Di jaringan target, sel tersebut aktif mematikan dan menghancurkan mikroba sesuai dengan cara masing-masing dan pada saat yang sama juga terjadi proses penyembuhan.^{1,17}

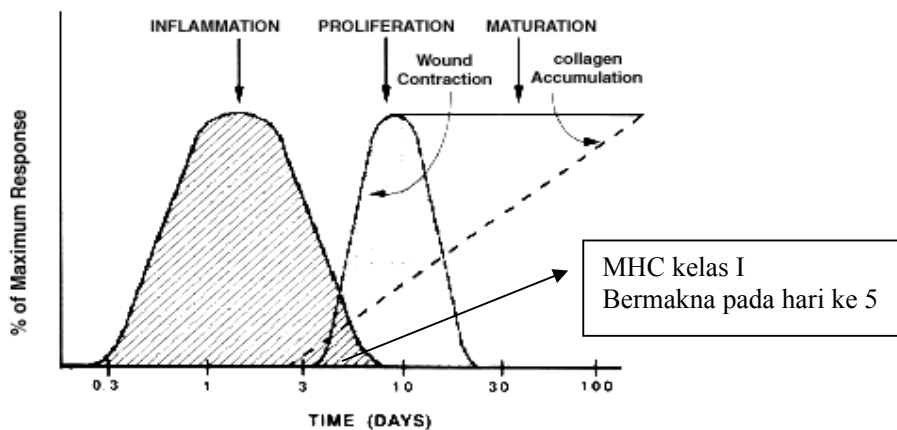
2.3.2. Pembentukan Jaringan Penyembuhan

Sitokin bersama faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF aktif berperan melaksanakan proses penyembuhan. Beberapa macam sitokin terlibat dalam proses penyembuhan yaitu : TNF α , IL 1, IL 6, IL 8 dan TGF β 1. Sesudah disekresi oleh sel T, sel B, makrofag, platelet, sel endotel, fibroblas, plasenta, tulang dan ginjal segera 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 β juga menstimulasi daya kemotaksis fibroblas, inhibisi produksi kolagen dan fibronektin, menghambat degradasi kolagen karena peningkatan atau penurunan inhibitor protease. Pada inflamasi kronis TGF β terlibat dalam pertumbuhan fibrosis. Dalam keseimbangan antara deposisi dan degradasi fibrin fungsi sitokin keseluruhan dapat menggeser keseimbangan tersebut ke arah residu fibrin.^{1,18,19}

Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen akan diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan sitokin antara lain PDGF, FGF, TGF β , IL1, IL 4, dan IgGI yang diproduksi oleh leukosit serta limfosit (pada saat sintesis kolagen). Pada proses remodeling jaringan, faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF β 1 dan IL 1, TNF akan menstimulasi sintesis kolagen serta jaringan ikat lain yang selanjutnya sitokin dan faktor pertumbuhan memodulasi sintesis dan aktivasi

metalloproteinase, 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. Sedangkan proses degradasi kolagen dan protein ECM lain dilaksanakan oleh metalloproteinase. Metalloproteinase terdiri atas interstitial kolagenase dan gelatinase, diproduksi oleh beberapa macam sel : fibroblas, makrofag, netrofil, sel sinovial dan beberapa sel epitel. Untuk mensekresikannya perlu stimulus tertentu yaitu PDGF, FGF, IL1, TNF α , fagosit dan stres fisik.^{1,19}

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, tetapi untuk keperluan deskriptif dapat dibagi menjadi fase-fase yang saling tumpang tindih yakni fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi.¹⁷



Gambar 1: Fase dari penyembuhan luka : dibagi tiga fase inflamasi, proliferasi dan maturasi (*Mast AB*, 2000).²

2.3.3. Fase Inflamasi

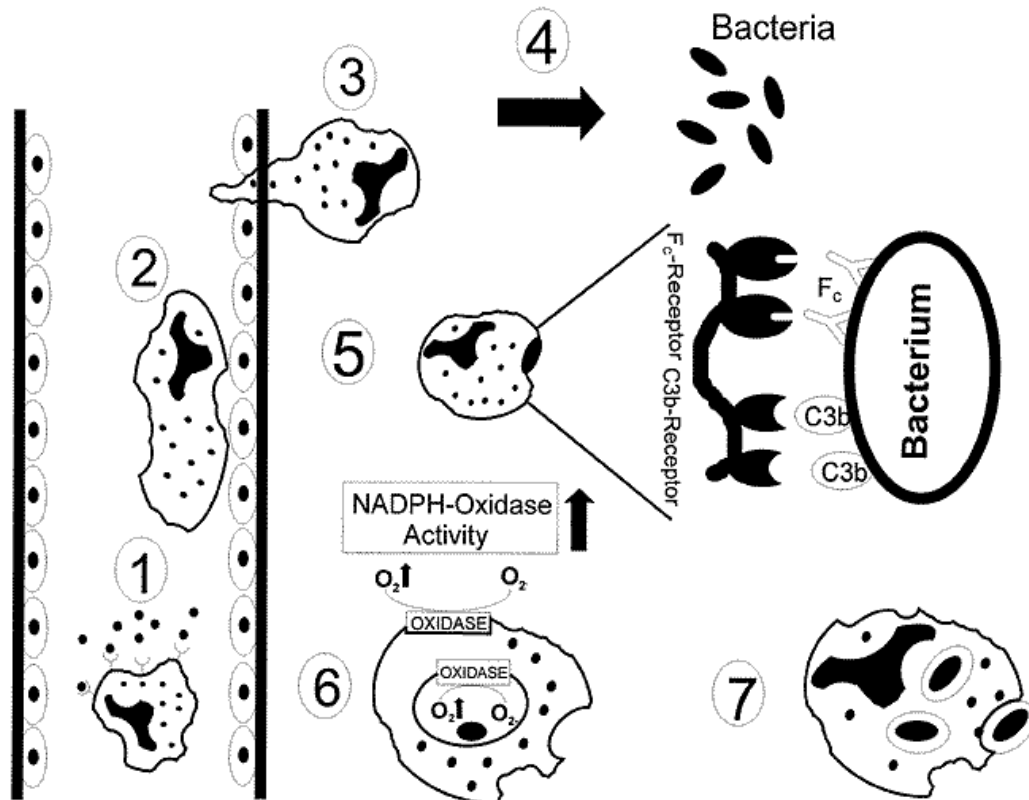
Fase inflamasi terjadi pada hari 0 – 5. Proses penyembuhan terjadi pada saat terjadi luka. Luka karena trauma atau luka karena pembedahan mengakibatkan kerusakan pada struktur jaringan dan mengakibatkan perdarahan. Pada awalnya darah akan mengisi jaringan yang cedera dan terpaparnya darah terhadap kolagen akan mengakibatkan terjadinya degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor Hageman. Hal ini kemudian akan memicu sistem biologis lain seperti aktivasi komplemen kinin, *cascade* 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.¹⁷

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. *Polymorphonuclear* (PMN) adalah sel pertama yang menuju ke tempat terjadinya luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncaknya pada 24 – 48 jam. Fungsi utama PMN adalah melakukan fagositosis bakteri yang masuk. Pada penyembuhan luka normal tampaknya kehadiran sel PMN tidak begitu penting sebab penyembuhan luka dapat terjadi tanpa keberadaan sel PMN. Adanya sel PMN menunjukkan bahwa luka terkontaminasi bakteri. Bila tidak

terjadi infeksi sel-sel PMN berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga.^{1,17}

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 dengan jumlah bermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Sebaliknya dari PMN, makrofag dan limfosit T penting keberadaannya pada penyembuhan luka normal.^{11,17}

Makrofag seperti halnya neutrofil, melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas zat biologis aktif 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. Zat yang berfungsi sebagai transmittor interseluler ini secara keseluruhan disebut sitokin¹¹.



Gambar 2. stadium respon inflamasi , 1. kemotaksis dari PMN, 2. marginasi dan adesi, 3. diapedesis, 4. kemotaksis, 5. obsonisasi, 6. pembentukan metabolik oksigen reaktif, 7. fagositosis. (Diambil dari :Hollmann , Markus W, Durieux E, Local anesthetics and the inflammatory response : A new therapeutic indication ?, Anesthesiology. September 2000; 93 : 858-875)

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 matriks fibronektin, asam hialuronik dan glikosaminoglikan. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia.^{1,17}

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 respons 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 factor* (bFGF), *acidic fibroblast growth faktor* (aFGF), *transforming growth factor β* (TGF β) dan *epidermal growth factor* (eFGF). FGF pada percobaan *in vivo* merupakan substansi poten dalam neovaskularisasi.^{1,2,3,17}

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 kolomner 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 1).^{1,3,17}

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 fibronectin. 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 fibronectin 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.^{1,17}

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. Peran sel limfosit dalam penyembuhan luka yaitu pada fase proliferasi (migrasi/granulasi).¹⁷

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.^{1,2}

2.5. Pengaruh Anestetik Lokal terhadap 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, β endorfin, substansi P, dan lain-lain. Otak memberikan respons 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 sehingga terjadi penurunan ketahanan tubuh. Sinyal tersebut juga melewati aksis SAM, menimbulkan gejala patofisiologis berupa respons otonom, yaitu suatu respons biologis yang diekspresikan dalam bentuk peningkatan tekanan darah, nadi, respirasi, keringat dingin dan spasme otot.^{1,9,11,15}

Efek lokal anestetik yang dilaporkan terhadap penyembuhan luka, antara lain :

1. Cassuto dan kawan kawan melaporkan bahwa pada penggunaan anestetik lokal secara topikal dan sistemik pada luka bakar akan menghambat ekstrasvasi plasma pada tikus.

2. Brofeldt dan kawan kawan melaporkan bahwa penggunaan 5 % lidokain krim digunakan pada pasien luka bakar yang parsial konsentrasinya dinaikan sampai 2.25 mg / cm² dihubungkan dengan : nyeri menjadi berkurang, tidak ada infeksi atau komplikasi alergi dan bagus dalam penyembuhan luka.
3. Anestetik lokal mempunyai efek antibakteri dan antivirus, Schimidt dan Rosenkranz melaporkan lidokain 2% menghambat semua bakteri patogen kecuali *sterptococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* . De Amici dan kawan kawan melaporkan bupivakain (15.5mM) menghambat replikasi virus. Rossenberg PH dan kawan kawan melaporkan bahwa Bupivakain mempunyai efek bakteristatik dan antimikroba .
4. Vintar N dan kawan kawan melaporkan penggunaan anestetik lokal bupivakain lewat kateter dalam luka akan efektif mengurangi nyeri setelah operasi hernia iunguinalis dan penyembuhan luka lebih baik.^{10,19,20}

2.6. Major Histocompatibility Complex Class I (MHC kelas I).

Sistem imun merupakan suatu mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan dari berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Sistem imun terdiri dari sistem imun alamiah (*natural-innate*) dan didapat (*adaptive/acquired*).

Sistem imun alamiah antara lain fisik/mekanik dan seluler. Sistem imun didapat terdiri dari pertahanan humoral (sel B) dan pertahanan seluler (sel T). Selain sel B, sel T merupakan sel imunokompeten yang utama dengan berbagai subsetnya yaitu sel T *helper*, T *supresor* dan T sitotoksik, masing-masing dibedakan karena mempunyai fungsi yang berbeda dan mengekspresikan antigen permukaan yang karakteristik dan berkorelasi dengan stadium diferensiasi di timus. Peristiwa penting yang terjadi selama berdiferensiasi didalam timus yaitu :

- a. Pembentukan berbagai reseptor antigen
- b. Seleksi sel T aktif fungsional yang dapat mengenal antigen yang disajikan bersama molekul *self*-MHC.
- c. Eliminasi selektif sel-sel T autoreaktif.
- d. Diferensiasi populasi sel T yang mengekspresikan CD4 atau CD8.

Sel B berdiferensiasi dalam sumsum tulang dan organ limfoid perifer. 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. Limfosit T dapat dibagi menjadi dua kelompok subset mayor yaitu sel CD4⁺ dan CD8⁺. Sel T CD4⁺ diketahui menginduksi dan mengatur respons imun dengan memproduksi sitokin seperti *interleukin 2* (IL2), *interferon γ* [IFN γ], *tumor necrosis factor α* (TNF α) dan granulosit atau *macrophage-colony-stimulating factor*. Disebut CD8⁺ sitotoksik karena fungsi utamanya merusak sel yang terinfeksi atau merubah sel dengan mengorganisasi antigen peptida yang dipresentasikan oleh MHC kelas I.

MHC selain mengandung gen yang mengatur ekspresi antigen tranplantasi, ternyata juga mengandung gen yang mengatur respons imun dan menentukan kepekaan terhadap kelainan-kelainan imunologik. Sistem MHC yang telah banyak diteliti dan diketahui perannya adalah MHC pada tikus (H-2) dan pada manusia (*Human Leukocyte Antigen*). Pola penyajian antigen oleh MHC kelas I atau kelas II menentukan jenis limfosit T yang akan bereaksi sebagai respons terhadap rangsangan berbagai jenis antigen. Penyajian fragmen antigen yang dibentuk dalam endosom atau lisosom dari protein yang masuk melalui endositosis (umumnya eksogen) dilakukan oleh MHC kelas II. Sebaliknya, peptida yang dibentuk dalam sitosol yang biasanya berasal dari protein yang disintesis endogen ditampilkan oleh MHC kelas I. MHC kelas I berasosiasi dengan CD8⁺ sitotoksik (CD8⁺ sebagai *co-receptor* sel T sitotoksik), sehingga kemampuan limfosit T sitotoksik untuk melisis sel merupakan fungsi langsung dari banyaknya MHC kelas I yang diekspresikan. MHC kelas I terdapat hampir pada semua sel tubuh berinti dan akan memberikan sinyal pada sel T sitotoksik. Molekul MHC tidak hanya memberi sinyal saat berada pada permukaan sel yang mengandung peptida yang menandakan adanya prekursor intrasel, tetapi juga memastikan sel T mengadakan kontak dengan antigen pada permukaan sel yang sesuai.^{2,3,21,22}

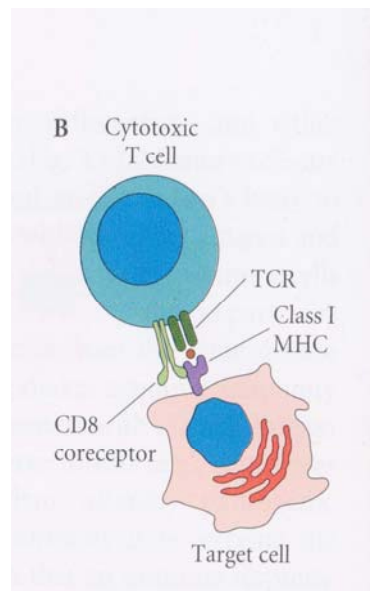
Ekspresi molekul MHC pada jenis sel yang berbeda menentukan apakah limfosit T dapat berinteraksi dengan antigen asing yang terdapat dalam sel bersangkutan. Sel T sitotoksik CD8⁺ dapat mengenali antigen (peptida) apabila terikat pada molekul MHC kelas I. Kemampuan limfosit T sitotoksik untuk

melisisikan sel yang terinfeksi merupakan fungsi langsung dari banyaknya MHC kelas I yang diekspresikan. Sel yang terinfeksi hanya dapat dikenal oleh CD8⁺ kalau antigen ditampilkan pada permukaan sel bersama-sama dengan MHC kelas I. Dengan demikian sel T sitotoksik hanya akan membunuh sel sasaran yang terinfeksi yang pernah mengaktifkannya apabila sel sasaran mempunyai MHC kelas I yang sesuai. Sel T sitotoksik tidak akan membunuh sel sasaran yang menampilkan antigen yang relevan tetapi berbeda MHC, sebaliknya sel sasaran dengan MHC kelas I yang sesuai tidak akan dibunuh oleh sel sitotoksik bila yang ditampilkan adalah antigen yang lain. Dengan demikian MHC kelas I berfungsi sebagai molekul sasaran. Sel T sitotoksik selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung juga menghasilkan gamma-interferon. Gamma interferon berfungsi mencegah penyebaran mikroorganisme ke dalam sel lain dimana sehingga akan memperkecil penyebaran virus ke sel lain yang berdekatan. ^{3,4,21,22}

Limfosit T merupakan komponen yang berperan pada proses inflamasi tahap akhir. Pada penelitian hewan coba yang dilakukan deplesi limfosit T, akan terjadi penghambatan proses penyembuhan luka, sehingga terdapat hubungan yang relevan pada penyembuhan luka hewan coba bahwa CD8⁺ menghambat penyembuhan luka (*down regulating wound healing*) dan CD4⁺ mendorong penyembuhan luka (*up regulating wound healing*). Penelitian pada manusia selama satu minggu setelah pembedahan menemukan peningkatan level sel-sel CD4⁺ dibandingkan dengan kenaikan jumlah sel-sel CD8⁺ ditemukan dengan segera pada penutupan luka.²³ Penelitian lain menunjukkan deplesi limfosit CD4⁺ Penelitian yang lain juga menunjukkan deplesi limfosit CD8⁺ memperlihatkan

kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Sedangkan deplesi limfosit CD4 memperlihatkan penurunan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan, dan kekerasan jaringan luka.^{23,24}

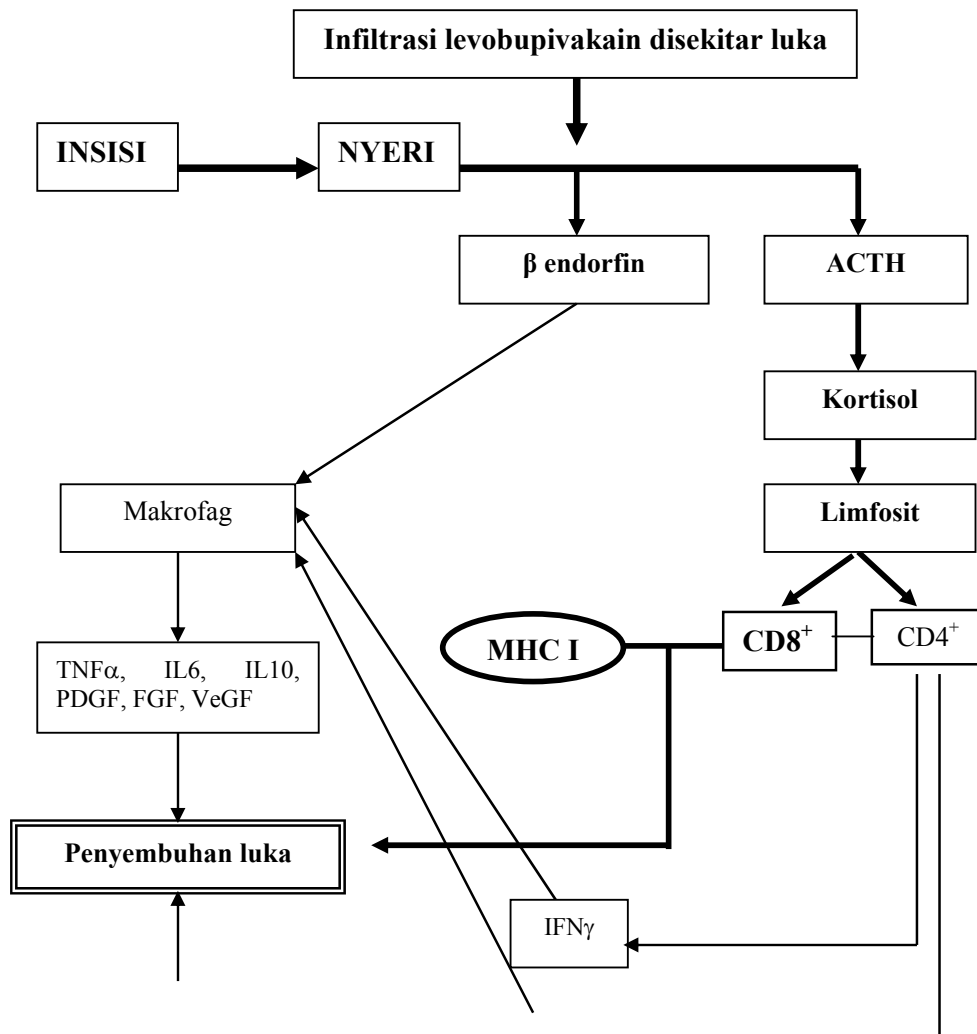
Pada penelitian ini, dengan diberikannya infiltrasi anestetik levobupivakain di sekitar luka akibatnya nyeri akan berkurang sehingga diharapkan respon imun akan meningkat dan penyembuhan luka menjadi lebih baik. Respon imun yang meningkat akan menyebabkan ekspresi MHC kelas I berkurang. Pemeriksaan imunohistokimia dapat mengetahui ekspresi MHC kelas I yang terjadi yaitu dengan menghitung skor histologi dari MHC kelas I.



Gambar 3. MHC kelas I.³

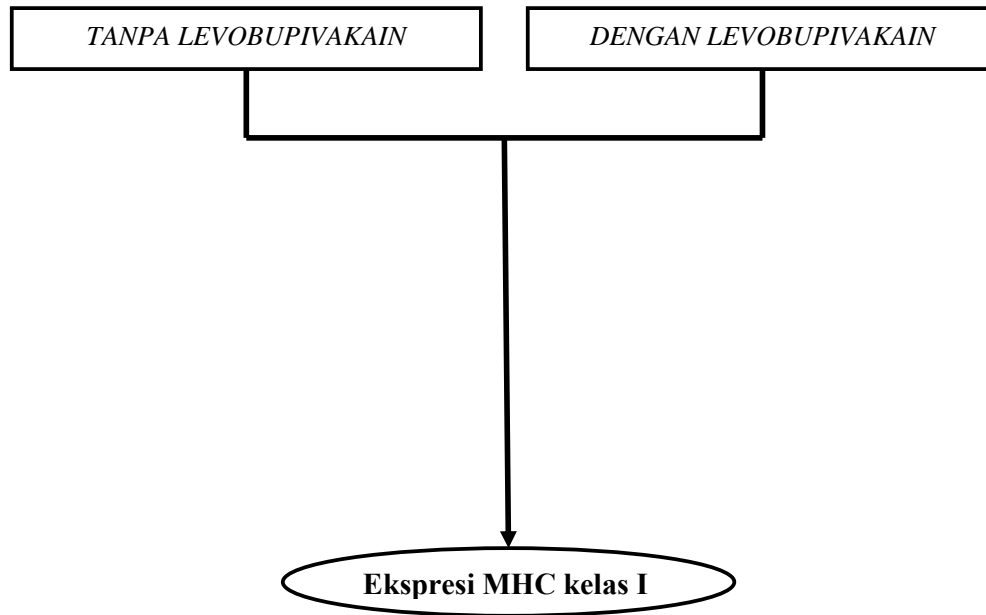
BAB 3
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori





3.2. Kerangka Konsep



3.3. Hipotesis Penelitian

Skor histologi MHC kelas I pada kelompok yang diberi infiltrasi lokal

levobupivakain akan lebih kecil daripada kelompok yang tidak diberi

infiltrasi levobupivakain.

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain “*Randomized Post test only control group design*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi tiga kelompok adalah sebagai berikut:

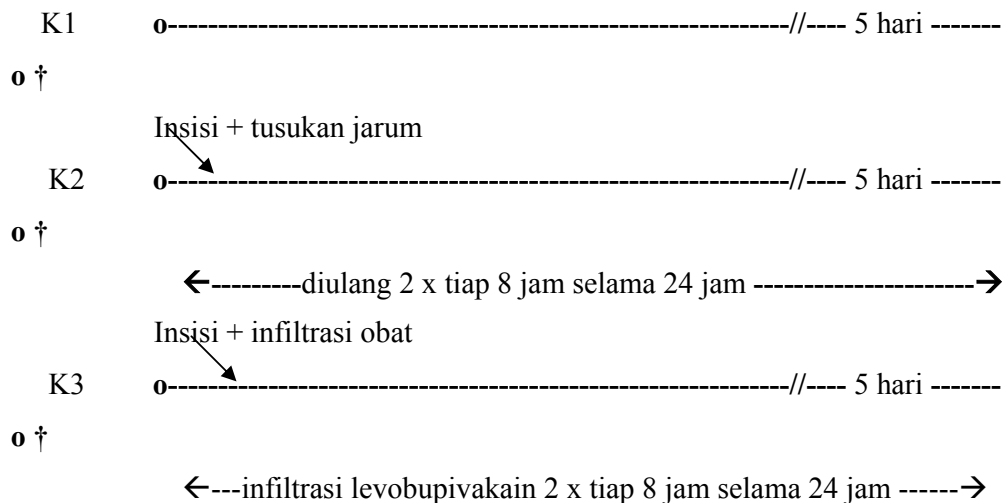
K1 : Kelompok 1, tikus tanpa perlakuan.

K2 : Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi (sprit kosong)

2 x tiap 8 jam selama 24 jam.

K3 : Kelompok 3, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi

levobupivakain 2 x tiap 8 jam selama 24 jam.



Gambar 4. Skema rancangan penelitian

4.2. Sampel penelitian

Hewan coba adalah tikus Wistar yang diperoleh dari fakultas peternakan UGM, Yogyakarta.

4.2.1 Kriteria inklusi:

1. Tikus Wistar betina keturunan murni.
2. Belum pernah digunakan untuk penelitian.
3. Umur 2 sampai 2,5 bulan.
4. Berat badan 250-300 gram.
5. Tidak terdapat kelainan anatomis

4.2.2 Kriteria eksklusi:

1. Tikus sakit selama masa adaptasi.
2. Tikus mati selama masa adaptasi.
3. Tikus mati selama perlakuan.

4.2.3. Besar sampel :

Menurut WHO besar sampel hewan coba untuk penelitian jangka pendek tiap kelompok minimal 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 15 ekor , masing-masing 5 ekor untuk tiap kelompok (pemeriksaan hari ke 5).²⁶

4.2.4. Randomisasi :

15 tikus dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu:

Kelompok 1 (K1 : tanpa perlakuan) : 5 ekor tikus

Kelompok 2 (K2 : infiltrasi tanpa anestetik lokal) : 5 ekor tikus

Kelompok 3 (K3 : dengan infiltrasi anestetik lokal) : 5 ekor tikus

4.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada tikus, proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada, 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 anestetik lokal infiltrasi levobupivakain 0,25% pada sekitar luka.

4.4.2. Variabel terikat

- Skor histologi MHC kelas I.

4.4.3. Definisi operasional

1. Infiltrasi levobupivakain 0,25%, dosis 12,6 mcg/gram BB memakai semprit tuberkulin pada jarak 1 cm dari kedua tepi luka.

2. Skor histologi MHC kelas I adalah metode pemeriksaan pewarnaan jaringan berdasar kerja imunoenzym untuk memeriksa adanya antigen atau mencari lokasi antigen dalam spesimen.

Penilaian ekspresi MHC kelas I berdasarkan presentasi dan intensitas

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

I = intensitas

P = presentase

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 betina dengan umur 2,5 sampai 3 bulan dan berat 250-300 gram. Tikus diperoleh dari Fakultas peternakan UGM. 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

Inkubator 56⁰ C

Mikrotom

Kaca obyektif dan penutup

4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia

- a) Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti MHC class I*
- b) *Kit universal streptavidin-biotin*
- c) Pensil PAP
- 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. Alur penelitian

Sejumlah 15 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar *ad libitum* selama 7 hari. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang ditentukan secara acak.

Perlakuan yang diberikan adalah:

K1 : Kelompok 1, tikus tanpa perlakuan.

K2 : Kelompok 2, tikus yang setelah dilakukan insisi 2 cm, sampai subkutan

tanpa diberikan infiltrasi levobupivakain.(untuk mendapat perlakuan stres yang sama tiap 8 jam dalam 24 jam I juga dilakukan infiltrasi sekitar luka dengan spuit kosong).

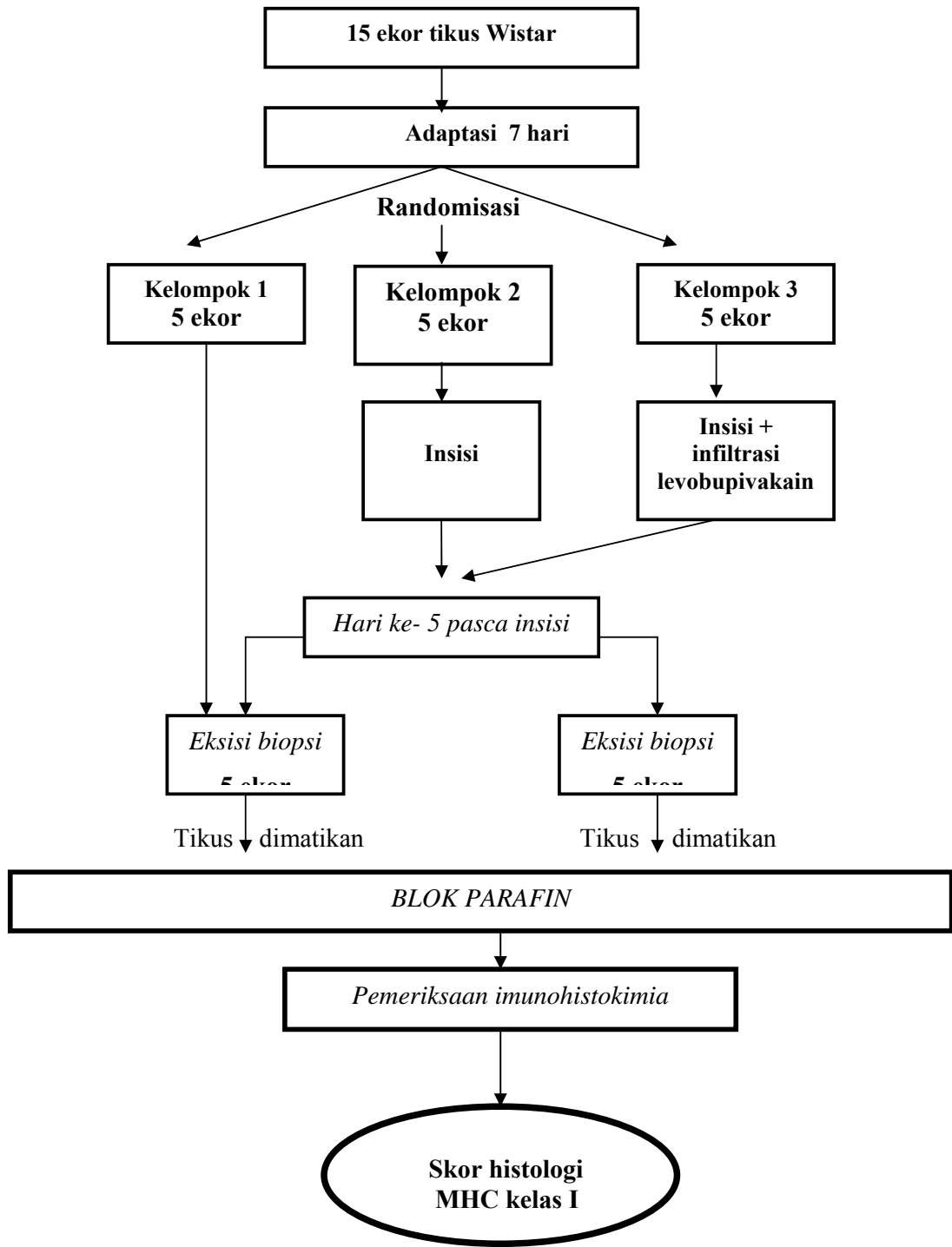
K3 : Kelompok 3 , tikus yang setelah dilakukan insisi 2 cm sampai subkutan, diberikan infiltrasi levobupivakain dengan semprit tuberkulin dosis 12,6 µg/gram BB dengan perlakuan sama tiap 8 jam dalam 24 jam pertama.

Setelah adaptasi selama 7 hari , tikus-tikus dari kelompok perlakuan (K2 dan K3) dibius dengan *ether* dalam kandang tertutup. Sesudah terbius, bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan *betadine*. Selanjutnya dibuat irisan sepanjang 2 cm dan kedalaman sampai subkutis. Luka irisan dibersihkan dan dioles larutan *betadine*, kemudian luka ditutup dengan 5 jahitan tunggal sederhana menggunakan benang monofilamen steril nomor 4-0. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan *betadine* dan dirawat. Pasca bedah diberikan *penicillin oil* 15 mg, intra muskular.

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, pada ketiga kelompok masing-masing 5 ekor. Dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether dalam kandang tertutup. 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, kemudian tikus dimatikan.

Pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi anti MHC kelas I dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar luka pada hari ke-5 yang berwarna

merah kecoklatan. Dengan mikroskop Olympus seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 dengan pembesaran 400 X dan memakai software olysia tahun 2000 yang merupakan satu kesatuan dengan seperangkat alat komputer, intensitas warna dapat diketahui sebagai nilai kuantitatif. Interpretasi hasil dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS.



4.7. Prosedur Pemeriksaan

4.7.1. 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.

4.7.2. Prosedur pembuatan preparat imunohistokimia

4.7.2.1. 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 5 menit, dan ke dalam aquabidest I dan aquabidest II masing masing selama 5 menit.

4.7.2.2. Quenching Endogenous Peroxidase

Rendam slide dalam metanol ditambah 0.3 % H_2O_2 selama 30 menit.

4.7.2.3. 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.

4.7.2.4. Immunostaining

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 dicuci dua kali dengan aquadest. Di beri antibodi sekunder biotinilated dan di inkubasi selama 30 menit, dan dicuuci dua kali dengan aquadest. Diberi ensim SA- HRP (Streptavidin horse raddish peroxidase) kemudian dicuci dua kali dengan aquadest. Diberi substrat ensim DAB (diaminoben sidin) dan pewarna tandingan Hematoxin Meyer lalu diberi canada balsem.

4.8. Cara pengumpulan Data

Dari masing masing kelompok dilakukan fiksasi dengan blok parafin. Kemudian dilakukan pemeriksaan Imunohistokimia untuk menentukan skor histologi MHC kelas I yang dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi.²⁷

4.9. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, Standart Deviasi, median dan grafik dan uji hipotesis. Data dikumpulkan, diolah serta dinyatakan dalam rerata \pm simpang baku (*mean \pm SD*) disertai kisaran (*range*). Dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Distribusi data variabel MHC kelas I diuji

menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sesuai dengan uji non parametrik dan $n < 30$. Selanjutnya dilakukan uji beda non parametrik untuk 3 variabel menggunakan uji *Kruskal Wallis* dengan batas derajat kemaknaan $p \leq 0.05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Penyajian dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data menggunakan program komputer SPSS 11.0 *for windows*.²⁸

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian hewan coba pengaruh infiltrasi levobupivakain terhadap skor histologi MHC kelas I pada penyembuhan luka. Hewan coba menggunakan 15 ekor tikus Wistar, betina, dewasa umur kurang lebih 3 bulan, berat badan 250 - 300 gram dan tanpa kelainan anatomis.

Kelompok perlakuan :

- Kelompok 1 (K1 : tanpa perlakuan) : 5 ekor tikus
- Kelompok 2 (K2 : infiltrasi tanpa anestetik lokal) : 5 ekor tikus
- Kelompok 3 (K3 : dengan infiltrasi anestetik lokal) : 5 ekor tikus

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 MHC kelas I pada hari ke lima. Hasilnya adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Data berat badan tikus

Variabel	Kelompok			<i>p</i>
	I	II	III	
Berat badan MHC I	255,0 ±10,00	255,4± 9,48	257,0± 8,72	0,874*

$p < 0.05$

Data dinyatakan dalam rerata±simpang baku

* Uji homogenitas variansi

Dari tabel 1 untuk uji homogenitas nilai rerata berat badan pada ketiga kelompok MHC I berbeda tak bermakna ($p=0,874$). Berarti ketiga kelompok berasal dari populasi yang homogen sehingga layak untuk dibandingkan.

Tabel 2. Skor histologi MHC kelas I pada hari ke 5

No.	Skor histologi MHC kelas I
-----	----------------------------

	K1	K2	K3
1.	4,8	8,2	4,4
2.	5,2	7,2	5,4
3.	4,6	6,0	4,9
4.	5,2	10,4	6,0
5.	4,8	8,8	5,6

Keterangan : Satuan dalam skor histologi

Tabel 3. Nilai rerata MHC kelas I

variabel	Kel	N	Rerata	Simpang baku	Minimal	Maksimal
MHC kelas I	K1	5	4.920	0.268	4,6	5,2
	K2	5	8.120	1.659	6.0	10.4
	K3	5	5.260	0.623	4.4	6.0

Nilai rerata kelompok kontrol lebih kecil daripada kelompok perlakuan (K1 dan K2). Nilai rerata MHC kelas I pada kelompok dengan infiltrasi levobupivakain (K3) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tanpa infiltrasi obat tersebut (K2).

Tabel 4. Uji normalitas rerata MHC kelas I

Variabel	<i>p</i>			uji	keterangan
	I	II	III		
MHC kelas I	0,096	0,946	0,724	<i>Shapiro-Wilk</i>	Normal

$p > 0,05$

Distribusi data MHC kelas I diuji menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena sesuai untuk uji non parametrik, jumlah sampel kecil < 30 . Hasil uji normalitas MHC kelas I pada ketiga kelompok terdistribusi normal ($p > 0,05$).

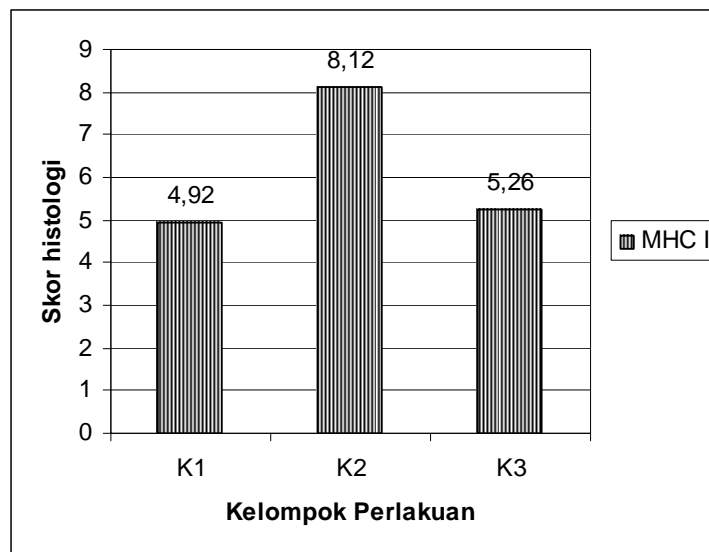
Tabel 5. Uji beda MHC kelas I

Variabel	Kelompok			uji	<i>p</i>
	I (n=5)	II (n=5)	III (n=5)		
MHC kelas I	4,920±0,268	8,120±1,659	5,260 ±0,623	<i>Kruskal-Wallis</i>	0,011

$p < 0.05$
data dinyatakan dalam rerata±simpang baku

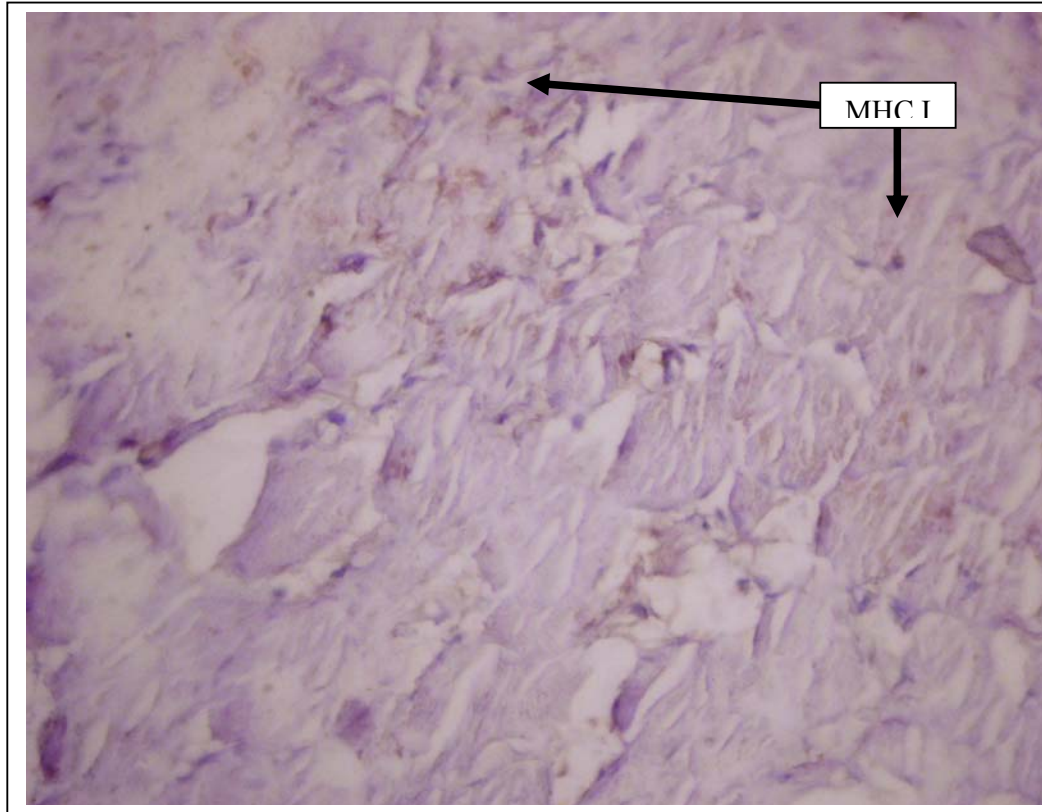
Dari tabel 5 di atas menunjukkan skor histologi MHC kelas I antara kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain berbeda bermakna ($p = 0.011$; $p < 0.05$). Rerata dari kelompok dengan levobupivakain, lebih rendah daripada kelompok tanpa

levobupivakain. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi MHC kelas I pada kelompok yang diberi infiltrasi levobupivakain lebih kecil daripada kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain.



Gambar 4. Diagram nilai rerata MHC kelas I

Dari gambar 4 dapat diketahui nilai rerata MHC kelas I pada kelompok tanpa levobupivakain (K2) lebih besar daripada kelompok dengan levobupivakain (K3), hal ini menunjukkan bahwa ekspresi pada MHC kelas I dengan infiltrasi levobupivakain akan lebih kecil. Pada kelompok kontrol (K1) terdapat ekspresi MHC kelas I meskipun lebih kecil daripada kelompok yang diberi dan yang tidak diberi infiltrasi levobupivakain.



Gambar 5. Gambar mikroskopik MHC kelas I (pembesaran 400x)

5.3. Pembahasan

Dalam penelitian ini 15 ekor tikus betina galur Wistar dewasa dibagi dalam 3 kelompok yang dibuat insisi pada punggung, kemudian dilakukan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada sekitar luka

dan dilihat perbedaannya terhadap skor histologi MHC kelas I setelah hari kelima. Kelompok kontrol pada MHC kelas I bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat ekspresi MHC kelas I pada tikus yang tidak dilakukan insisi pada punggungnya.

Pada penelitian ini dilakukan penilaian terhadap ekspresi MHC I sedangkan ekspresi CD8⁺ juga telah diteliti sebelumnya dan hasilnya bahwa ekspresi CD8⁺ dengan infiltrasi levobupivakain lebih kecil daripada tanpa infiltrasi levobupivakain.²⁹ Penelitian terhadap MHC kelas I bertujuan bahwa untuk membuktikan suatu masalah harus didukung oleh parameter-parameter lain, dalam hal ini MHC I dan CD8⁺. MHC kelas I berasosiasi dengan CD8⁺, sedangkan MHC kelas II berasosiasi dengan CD4⁺. Dalam penyembuhan luka CD8⁺ merupakan *down regulator wound healing* sedangkan CD4⁺ merupakan *up regulator wound healing*.

Pada penelitian ini pengambilan biopsi jaringan pada luka dilakukan pada hari kelima, karena jumlah limfosit T bermakna pada hari kelima sampai dengan hari ketujuh pada proses penyembuhan luka normal.¹¹ Karena diperkirakan proses inflamasi yang terjadi lebih singkat maka ditentukan hari kelima untuk pengambilan biopsi

jaringan. Penelitian mengenai proses inflamasi yang terjadi tidak dilakukan dalam penelitian ini.

Untuk uji homogenitas ketiga kelompok MHC I dengan variabel yang dapat diukur yaitu berat badan, dimana didapat hasil statistik berbeda tidak bermakna. Berarti ketiga kelompok berasal dari populasi yang homogen, pada umumnya tikus berasal dari satu indukan dimana mempunyai karakteristik yang mirip. Dalam hal ini faktor bias pada hewan coba dapat dihindari.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa akibat pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain skor histologi MHC kelas I pada jaringan sekitar luka lebih kecil dibanding kelompok tanpa infiltrasi obat. Ini berarti ekspresi MHC kelas I lebih sedikit terjadi pada kelompok dengan infiltrasi levobupivakain. Ekspresi MHC kelas I yang kecil, sesuai dengan hasil ekspresi pada $CD8^+$ yang juga kecil pada kelompok dengan infiltrasi levobupivakain. Ekspresi $CD8^+$ yang lebih sedikit maka penyembuhan luka menjadi lebih baik, hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa deplesi limfosit $CD8^+$ memperlihatkan kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Dalam hal ini $CD8^+$ merupakan *down regulator wound healing*. Karena dengan infiltrasi

levobupivakain maka nyeri akut akan berkurang sehingga sekresi hormon glukokortikoid (salah satu faktor sistemik penghambat penyembuhan luka) juga menurun maka penyembuhan luka menjadi lebih baik. Hormon glukokortikoid selain menghambat respon imun juga merupakan anti inflamasi, menghambat pembentukan fibroblas serta mengganggu sintesis kolagen sehingga sekresi hormon glukokortikoid yang berlebihan akan mengganggu penyembuhan luka. Dengan berkurangnya nyeri akut maka respon imun akan meningkat, yang ditandai dengan menurunnya ekspresi MHC kelas I dan CD8⁺.

Pada penelitian ini kelompok kontrol MHC I masih terekspresi meskipun tikus tidak diberi insisi dan perlakuan, hal ini membuktikan bahwa meskipun secara fisik tikus tidak terinfeksi tetapi ekspresi MHC kelas I dan CD8⁺ sitotoksik tetap terjadi. Kemungkinan yang dapat terjadi, MHC I yang terdapat pada semua sel yang berinti akan terekspresi bila ada infeksi, jadi tidak menutup kemungkinan terjadi infeksi pada kelompok kontrol meskipun telah diusahakan untuk menghilangkan faktor infeksi.^{3,4,21,22}

Untuk selanjutnya perlu dipertimbangkan penelitian mengenai faktor pertumbuhan (TGF β , FGF, PDGF , dan VeGF) serta faktor inflamasi. Dengan meneliti faktor pertumbuhan, maka proses

penyembuhan luka dengan infiltrasi levobupivakain dapat dianalisis secara spesifik. Tujuan menganalisis faktor inflamasi yaitu untuk mengetahui sampai hari ke berapa proses inflamasi terjadi dengan infiltrasi levobupivakain ini.

Dari hasil penelitian ini maka dalam aplikasi klinis infiltrasi anestetik lokal levobupivakain selain dapat dijadikan alternatif untuk mengendalikan nyeri akut pasca pembedahan serta respons stres juga terjadi penyembuhan luka yang lebih baik.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

Skor histologi MHC kelas I pada kelompok dengan infiltrasi levobupivakain di sekitar luka lebih kecil dibanding kelompok tanpa infiltrasi levobupikain,

6.2. Saran

1. Untuk mengendalikan nyeri akut dan memperbaiki penyembuhan luka dapat dilakukan dengan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain disekitar luka.
2. Dari hasil penelitian kami perlu dilakukan analisis terhadap faktor pertumbuhan lain seperti TGF β , FGF, PDGF, dan VeGF serta analisis mengenai proses inflamasi sehingga dapat diketahui proses penyembuhan

luka secara spesifik dan dapat diketahui sampai hari beberapa proses inflamasi akan terjadi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cotran Ramzi S, Kumar V, Collins T. Pathology basic of disease. 6th ed. Philadelphia : W B Saunders Co, 1999 : p.21-201.
2. Mast AB. Normal wound healing. In : Achauer BM, Eriksson E, eds. Plastic Surgery, Indications, Operations and Outcomes. Mosby : Mosby Inc,2000: p.37-53.
3. Roit I. Immunology. Jakarta : Widya Medika, 2003 : p.67-92.
4. Albert B, Lewis DBJ, Raff M, Roberts K, Watson JD. The immune system. In : Molecular biology of the cell.3rd ed. New York & London : Garland Publishing Inc, 1994 : p.1229-51.
5. Constantinnides P. General pathobiology. 1st ed. Norwalk Connecticut : Appleton and Lange, 1994 : p.173-86.
6. Fileds H L, The peripheral pain sensory system. In : Pain 1st ed. New York: Mc Graw Hill Co. Inc, 1987 :p.13-37.
7. Melzacks R, Wall P. The gate control theory of pain. In : Melzacks R, Wall P. The challenge of pain 1st ed. Penguin education, 1994 : p.223-61
8. Cervero F. Mechanism of visceral pain, past and present. In : Gebhart G F. Ed.

Visceral pain, progress in pain research and management. Seattle : Vol 5.

IASP

press,1995 : 469-88.

9. Galindo M A, Levobupivacain, a long acting local anaesthetic, with less cardiac and neurotoxicity. Available from: URL: <http://www.ndaa.ox.ac.uk/wfsa/html/u14/u1407-01.html>
10. Hollmann , Markus W, Durieux E, Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication ?, Anesthesiology, September 2000; 93 : 858-75.
11. Raymond R G, William G B. Pain management. In : Morgans G E, Mikhail M S. eds. Clinical anesthesiology. 1st ed. New Jersey : Prentice hall int. Inc, 1992 : p.269- 73.
12. Devor M. Pain mechanism and pain syndrome. In : Champbell J N. Pain 1996 an update review. Seattle : IASP press, 1996 : 103-12.
13. 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 : p.80-88.

14. 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 : p.12-28.
15. Churchill H C, Davidson. Pain clinical and operative nerve block. In : A
practice of anesthesia. 5th ed. Singapore : PG pub. Pte. Ltd, 1986 : p.893-
900.
16. 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.
17. Wound healing.2000. Available from: URL:
[http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-
ij33lm/orthwound.htm](http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm)
18. Unanue E R. In : Tizard Ian R. Immunology, an introduction. 4th ed.
Philadelphia
: Saunders college pub. Harcourt college, 1995 : p.75-87.
19. Kresno Boedina S. Immunologi, diagnosis dan prosedur laboratorium. 4th ed.
Jakarta: Balai penerbit FK UI, 2003 : 4-32.
20. 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: 481-6.
21. Oppenheim JJ, Ruscetti. In: Medical Immunology 9th ed. 1997.
22. 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⁺ and CD8⁺ T cells, Cell Biology. April 1994 Vol 91: 2890-94.
23. Boyce DE, Jones WD, Ruge F. The Role of Lymphocytes in Human Dermal Wound Healing. Aidsline national library of medicine 2000 Jul; 143 (1): 59-65.
- Available from:
 URL:<http://www.aegis.com/aidsline/2000/nov/A00B1207.html>
24. Davis PA, Corless DJ, Aspinal R, Wastell C. Effect of CD4(+) and CD8(+) cell depletion on wound healing. Department of Academic Surgery, Imperial College School of Medicine, Chelsea and Westminster Hospital, London, UK.
- peteralexanderdavis@yahoo.com
25. 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.
26. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York, 1993 : 44.

27. Wasito R, Imunohistokimia. dalam : Pedoman kuliah imunohistopatologi dep
Dikbud. Proyek pengembangan pusat fasilitas bersama antar universitas .
PAU
Bioteknologi – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. 1991 : 36-80.
28. Sudigdo S, Sofyan I, Dasar dasar metodologi penelitian klinis edisi ke-2.
Jakarta : Sagung Seto. 2002 :247-49.
29. Sudrajad I, Ekspresi CD8⁺ dan perbandingan ekspresi CD4⁺/CD8⁺
dijaringan sekitar luka dengan dan tanpa infiltrasi levobupivakain pada
nyeri pasca insisi.
Studi imunohistokimia pada tikus wistar. Tesis S2 Universitas Diponegoro
Semarang 2006.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data berat badan dan dosis levobupivakain

Data berat badan dan dosis levobupivakain

Kelompok	Berat badan (gram)	Dosis levobupivakain (mg)
1	256	
1	269	
1	242	
1	258	
1	250	
2	260	
2	270	
2	248	
2	249	
2	250	
3	243	3061.80
3	256	3225.60
3	258	3250.80
3	262	3310.20
3	266	3351.60

Lampiran 2. Skor histologi MHC kelas I pada hari ke 5

No.	Skor histologi MHC kelas I		
	K1	K2	K3
1.	4,8	8,2	4,4
2.	5,2	7,2	5,4
3.	4,6	6,0	4,9
4.	5,2	10,4	6,0
5.	4,8	8,8	5,6

Keterangan : Satuan dalam skor histologi

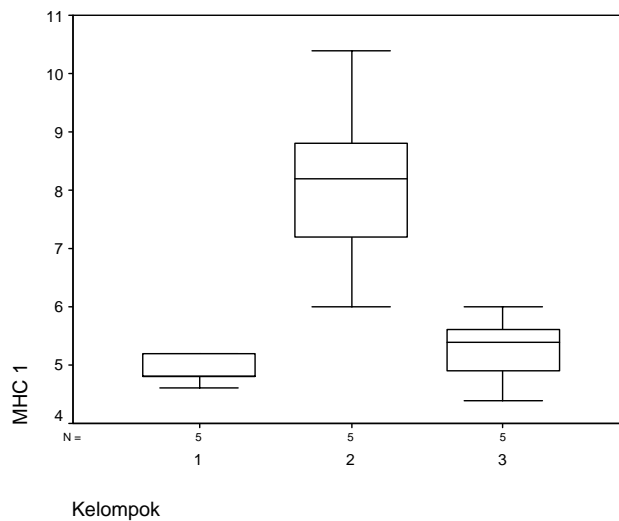
Descriptives

Kelompok		Statistic	Std. Error	
MHC 1	1	Mean	4,920	,120
		95% Confidence Interval for Mean	4,587	
		Lower Bound	5,253	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	4,922	
		Median	4,800	
		Variance	7,200E-02	
		Std. Deviation	,268	
		Minimum	4,6	
		Maximum	5,2	
		Range	,6	
		Interquartile Range	,500	
		Skewness	,166	,913
		Kurtosis	-2,407	2,000
			2	Mean
		95% Confidence Interval for Mean	6,060	
		Lower Bound	10,180	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	8,111	
		Median	8,200	
		Variance	2,752	
		Std. Deviation	1,659	
		Minimum	6,0	
		Maximum	10,4	
		Range	4,4	
		Interquartile Range	3,000	
		Skewness	,170	,913
		Kurtosis	-,052	2,000
	3	Mean	5,260	,279
		95% Confidence Interval for Mean	4,487	
		Lower Bound	6,033	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	5,267	
		Median	5,400	
		Variance	,388	
		Std. Deviation	,623	
		Minimum	4,4	
		Maximum	6,0	
		Range	1,6	
		Interquartile Range	1,150	
		Skewness	-,406	,913
		Kurtosis	-,715	2,000

Lampiran 3. Uji normalitas Shapiro-Wilk

Uji normalitas data MHC I

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MHC 1	1	,273	5	,200*	,802	5	,096
	2	,141	5	,200*	,985	5	,946
	3	,189	5	,200*	,956	5	,724



Lampiran 4. Uji beda MHC kelas I dengan *Kruskal-Wallis*

	Kelompok	N	Mean Rank
MHC 1	1	5	4,40
	2	5	12,90
	3	5	6,70
	Total	15	

Uji beda MHC I

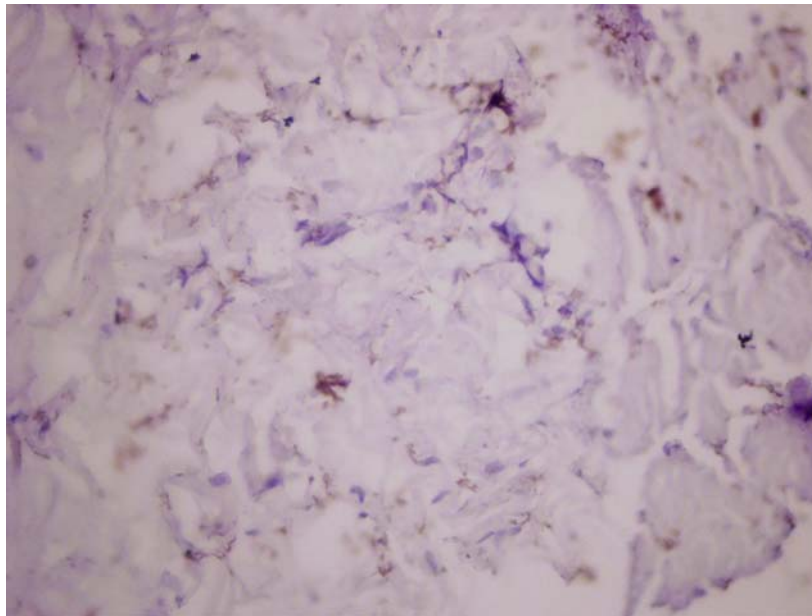
Test Statistics^{a,b}

	MHC 1
Chi-Square	9,717
df	2
Asymp. Sig.	,008

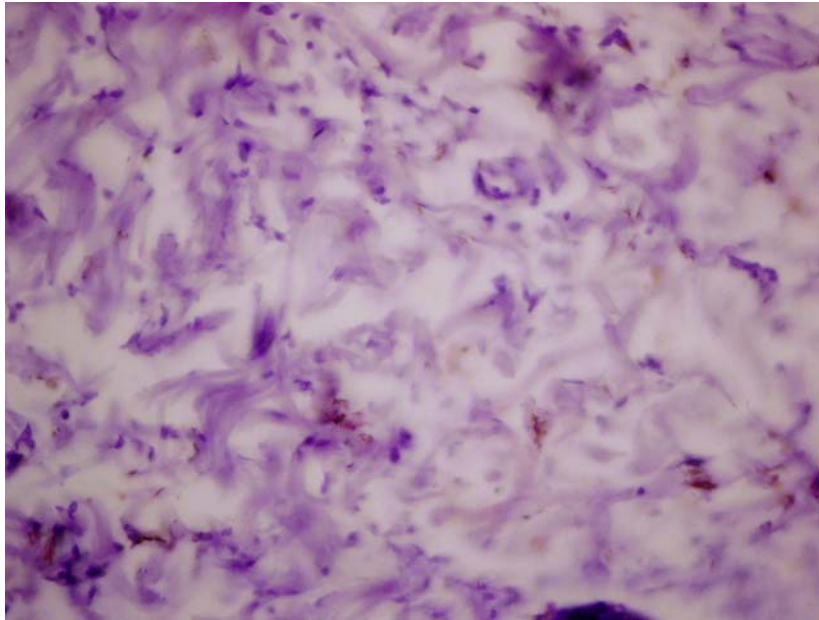
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

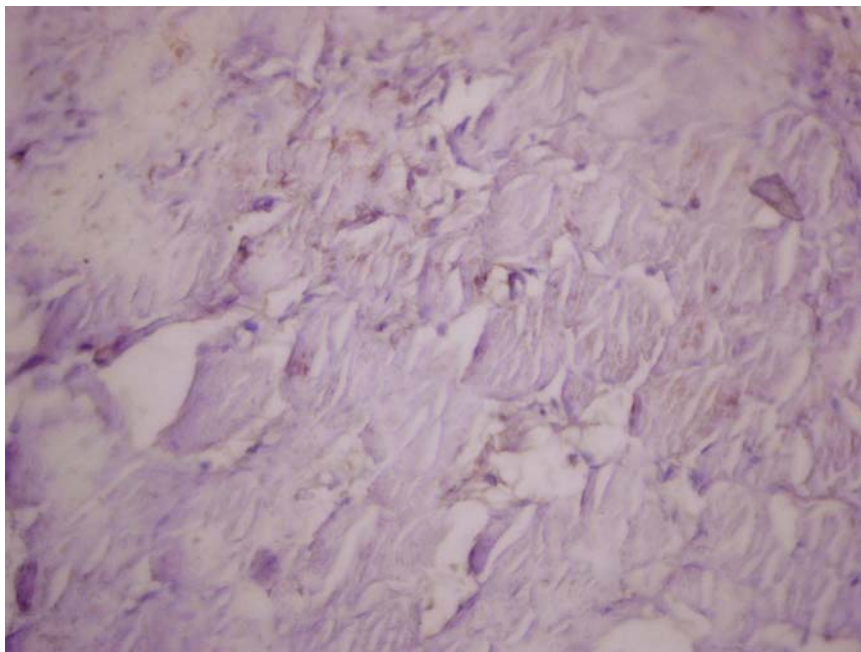
Lampiran 5. Gambar mikroskopis MHC I



Gambar mikroskopis MHC kelas I kelompok kontrol



Gambar mikroskopis MHC kelas I kelompok tanpa infiltrasi levobupivakain



Gambar mikroskopis MHC kelas I kelompok dengan infiltrasi levobupivakain