

**PERBANDINGAN DAN HUBUNGAN SKOR HISTOLOGI CD8⁺ DAN
RASIO SKOR HISTOLOGI CD4⁺/CD8⁺ DI SEKITAR LUKA
DENGAN DAN TANPA INFILTRASI LEVOBUPIVAKAIN
PADA PENYEMBUHAN LUKA PASCA INSISI**
Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar

*COMPARISON AND RELATION OF CD8⁺ HISTOSCORE AND CD4⁺/CD8⁺
HISTOSCORE RATIO AT THE SITE OF THE WOUND BETWEEN
LEVOBUPIVACAINE AND WITHOUT LEVOBUPIVACAINE
INFILTRATION ON POST-INCISION WOUND HEALING*
Immunohistochemistry Study on Wistar rat



Tesis

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar derajat Sarjana S-2

Imam Sudrajat

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

TESIS

**PERBANDINGAN DAN HUBUNGAN SKOR HISTOLOGI CD8⁺ DAN
RASIO SKOR HISTOLOGI CD4⁺/CD8⁺ DI SEKITAR LUKA
DENGAN DAN TANPA INFILTRASI LEVOBUPIVAKAIN
PADA PENYEMBUHAN LUKA PASCA INSISI
Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar**

Disusun
oleh

Imam Sudrajat

telah disetujui dan dipertahankan
di depan Tim Penguji pada 16 Maret 2006

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama,

Tanggal :

Pembimbing Kedua,

Tanggal :

Dr. Abdul Lian, SpAn, KNA

NIP. 140.073.471

Dr. Edi Dharmana, PhD, SpPark

NIP. 140.119.299

Mengetahui:

Ketua

Program Studi PPDS I Anestesiologi
Universitas Diponegoro

Ketua

Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro

Dr. Uripno Budiono, SpAn

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 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, Maret 2006

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. Identitas



Nama : Dr. Imam Sudrajat SpAn

Tempat / Tgl lahir : Jakarta / 4 April 1969

Agama : Islam

Jenis kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN 01 Pagi Jakarta Timur : Lulus tahun 1981
2. SMPN 103 Jakarta Timur : Lulus tahun 1984
3. SMAN 39 Jakarta Timur : Lulus tahun 1987
4. FK UNDIP Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1996
5. PPDS I Anestesiologi UNDIP Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 2006
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

C. Riwayat Pekerjaan

1. Kepala Puskesmas Karanganyar, Kabupaten Trenggalek, Jawa Timur (th.1997-1998)
2. Kepala Puskesmas Munjungan, Kabupaten Trenggalek, Jawa Timur (th.1998-2000)

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang tua. Ayah : H. Mochamad Hursi

Ibu : Hj. Sukarti

2. Nama Istri : Dr. Hartanti Dwi Purwani

3. Nama Anak : - Ajeng Sekar Kirana
- Aisha Re Nastasya
- Fadhillah Raka Pamungkas

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 Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Dalam rangka melengkapi tugas tersebut, maka tesis ini dibuat untuk menyelesaikan pendidikan magister yang saya tempuh. Adapun judul tesis saya adalah “Perbandingan dan hubungan Skor Histologi CD8⁺ dan Rasio Skor Histologi CD4⁺/CD8⁺ di Sekitar Luka Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain pada Penyembuhan Luka Pasca Insisi : Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar”. Dengan tesis ini saya harapkan dapat memberikan sumbangan pengetahuan kepada masyarakat ilmiah dan para praktisi hubungan pengaruh anestesi lokal khususnya levobupivakain terhadap sel CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ pada penyembuhan luka.

Pada kesempatan ini, saya ingin menyampaikan terima kasih kepada seluruh guru saya dalam menempuh pendidikan spesialisasi di bidang Anestesi dan Program Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP. Bapak direktur RSUP Dr. Kariadi dan Dekan FK UNDIP sebagai fasilitator selama saya menyelesaikan pendidikan.

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 Progam Studi Ilmu Anestesi dan Reanimasi yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menuntut pendidikan spesialisasi dan progam magister.

Dr. Abdul Lian, SpAn, KNA 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. Socharjo Hadisaputro, SpPD selaku direktur Progam Pascasarjana UNDIP, **Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)** selaku ketua Progam Studi Magister Ilmu Biomedik Progam Pascasarjana UNDIP, **Prof. DR. dr. Tjahjono, SpPA, FIAC** selaku pengelola Progam Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP, atas motivasi yang diberikan untuk menyelesaikan studi ini.

Semua staf pengajar Anestesi FK. UNS atas bantuan dan bimbingan selama di Surakarta dan semua rekan sejawat residen ilmu anestesi dan reanimasi

FK UNDIP, pegawai UPHP UGM Yogyakarta dan PA UNS Surakarta yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

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

Ucapan terima kasih yang paling dalam untuk istri tercinta **dr. Hartanti Dwi Purwani** yang penuh pengertian, kesabaran dan cinta kasih telah banyak berkorban, memberi semangat moril maupun materiil. Dan khusus buat motivatorku, yang saya cintai anak-anakku **Ajeng, Resya dan Raka**.

Ucapan terima kasih untuk semua orang yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah menolong saya baik dalam keseharian maupun dalam menempuh pendidikan.

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

Akhirnya pada kesempatan ini saya minta maaf jika ada kesalahan baik yang saya sengaja maupun tidak saya sengaja. Semoga Allah SWT selalu melindungi kita semua, amin.

Semarang, Maret 2006

Penulis

ABSTRAK

Latar belakang : Kontrol terhadap nyeri akan meningkatkan respon imun dalam penyembuhan luka sehingga penyembuhan luka lebih baik. Salah satu cara mengontrol nyeri dapat menggunakan infiltrasi anestetik lokal disekitar luka. Levobupivakain merupakan obat anestetik lokal dengan durasi panjang. Sistem imun yang memegang peran penting dalam penyembuhan luka salah satunya adalah CD8⁺. CD8⁺ merupakan *downregulator of wound healing*. Rasio CD4⁺/CD8⁺ juga menunjukkan proses penyembuhan luka. Dalam penelitian ini diharapkan gambaran CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ dapat mencerminkan penyembuhan luka akibat infiltrasi levobupivakain.

Tujuan : Menganalisis hubungan pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain di sekitar luka dengan skor histologi CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺.

Metode : Dilakukan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain “*Randomized post test only control group design*”, pada 10 ekor tikus Wistar. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua kelompok secara acak masing masing 5 ekor. Kelompok 1, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, disuntik tiap 8 jam selama 24 jam tanpa infiltrasi levobupivakain. Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, infiltrasi levobupivakain tiap 8 jam selama 24 jam. Kandungan CD8⁺ pada sekitar luka insisi dinilai dengan skor histologi dari preparat yang dilakukan pengecatan secara imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal, yang diambil dari biopsi jaringan pada hari ke 5. Rasio CD4⁺/CD8⁺ didapatkan dengan membandingkan hasil penelitian CD4⁺ yang dilakukan peneliti lain dengan subyek dan waktu yang sama. Distribusi data variabel diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk* selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan *Mann-Whitney U Test*. Untuk menilai hubungan skor histologi limfosit CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ digunakan uji korelasi *Spearman*.

Hasil : Kandungan sel CD8⁺ antara kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain berbeda bermakna ($p=0,008$). Rasio kandungan sel CD4⁺/CD8⁺ antara kelompok tanpa levobupivakain dan dengan levobupivakain berbeda bermakna ($p= 0,009$). Terdapat hubungan skor histologi limfosit CD8⁺ terhadap rasio CD4⁺/CD8⁺ dengan koefisien korelasi $r= 0,004$. Derajat kemaknaan $p=-0,817$ menunjukkan korelasi negatif kuat, berarti hubungan antara CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ secara statistik bermakna.

Kesimpulan : Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain disekitar luka terbukti dapat mengurangi jumlah skor histologi CD8⁺ dan meningkatkan rasio CD4⁺/CD8⁺, yang mencerminkan perbaikan luka.

Kata kunci : Anestetik lokal, levobupivakain, penyembuhan luka, skor histologi, CD8⁺, rasio CD4⁺/CD8⁺.

ABSTRACT

Background : Pain control will enhance immune responses that leads to a better wound healing process. Infiltration of local anesthetic at the site of the wound is a technique of pain control. Levobupivacaine is a local anesthetic with long acting duration. Lymphocyte CD8⁺ plays an important role as a down-regulator of wound healing. The increased of CD4⁺/CD8⁺ ratio shows the improvement of wound healing process. In this study the profile of CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio expected to reveal the wound healing process with levobupivacaine infiltration.

Objective : The aim of this study was to analyze the relation between infiltration of levobupivacaine as a local anesthetic with CD8⁺ histoscore and CD4⁺/CD8⁺ ratio.

Method : This study was an animal study with “Randomized Post test only control group design” on ten Wistar rats. Randomly, it was divided into two groups, 5 for each. Group 1, was group with 2 cm incision at the back and injected at the site of the wound with empty syringe (without levobupivacain). Group 2, was group with 2 cm incision and infiltrated on the site of the wound with levobupivacain every 8 hours for 24 hours. Detection of CD8⁺ was performed with immunohistochemistry staining on the day 5th tissue biopsy and was scored by histoscore system. CD4⁺/CD8⁺ ratio was obtained from comparing histoscore of CD4⁺ with CD8⁺. The histoscore of CD4⁺ was obtained from another research performed by the same sample. Distribution data were analyzed by Shapiro Wilk Test and followed by Mann-Whitney U Test. The correlation between CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio were performed by Spearman correlation test.

Results : This study showed that CD8⁺ histoscore between 2 groups was significantly different (p=0,008). CD4⁺/CD8⁺ ratio between two group was also different significantly (p=0,009). There was a significant difference in the correlation between the histoscore of CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio (r= -0,817 ; p=0,004). It revealed a negative strong correlation between the histoscore of CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio.

Conclusion : Infiltration of local anesthetic at the site of the wound decreases CD8⁺ histoscore and increases CD4⁺/CD8⁺ ratio which will lead to an improvement of wound healing processes.

Keywords : local anesthetic, levobupivacaine, wound healing, histoscore, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratio

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN -----	ii
PERNYATAAN -----	iii
RIWAYAT HIDUP -----	iv
KATA PENGANTAR -----	v
DAFTAR ISI -----	viii
DAFTAR TABEL -----	x
DAFTAR GAMBAR -----	xi
DAFTAR LAMPIRAN -----	xii
DAFTAR SINGKATAN -----	xiii
ABSTRAK -----	xiv
ABSTRACT -----	xv
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang masalah -----	1
1.2 Rumusan masalah -----	4
1.3 Tujuan penelitian -----	4
1.3.1 Tujuan umum -----	4
1.3.2 Tujuan khusus -----	4
1.4 Manfaat penelitian -----	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Levobupivakain -----	6
II.2 Patofisiologi nyeri -----	7
II.2.2 Transduksi -----	8
II.2.2 Transmisi -----	8
II.2.3 Modulasi -----	9
II.2.4 Persepsi -----	10
II.3 Proses penyembuhan luka -----	10
II.3.1 Fase inflamasi -----	11
II.3.2 Fase proliferasii -----	13
II.3.3 Fase maturasi -----	15
II.4 Pengaruh pemakaian anestetik lokal pada penyembuhan luka ---	16
II.5 Peran limfosit CD4 ⁺ , CD8 ⁺ dan rasio CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -----	20
II.6 Skor histologi -----	23
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
III.1 Kerangka teori -----	24
III.2 Kerangka konsep -----	25
III.3 Hipotesis -----	25
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
IV.1 Rancangan penelitian -----	26

IV.2 Sampel penelitian -----	26
IV.3 Waktu dan lokasi penelitian -----	27
IV.4 Variabel penelitian -----	28
IV.4.1 Variabel bebas -----	28
IV.4.2 Variabel tergantung -----	28
IV.4.3 Definisi operasional -----	28
IV.5 Bahan dan alat penelitian -----	29
IV.5.1 Bahan untuk perlakuan ----	29
IV.5.2 Bahan untuk eksisi-biopsi -----	29
IV.5.1 Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia -----	30
IV.5.1 Alat untuk pembacaan preparat -----	30
IV.6 Pelaksanaan penelitian -----	30
IV.7 Alur kerja -----	31
IV.8 Prosedur pemeriksaan -----	32
IV.8.1 Prosedur eksisi-biopsi -----	32
IV.8.2 Prosedur pembuatan preparat histopatologi -----	32
IV.9 Cara pengumpulan data -----	33
IV.10 Analisis data -----	35
 BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS -----	 36
 BAB VI PEMBAHASAN -----	 41
 BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	
VII.1.Simpulan -----	46
VII.2.Saran -----	46
 DAFTAR PUSTAKA -----	 47
LAMPIRAN -----	51

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Peran sel limfosit pada fase penyembuhan luka	16
Tabel 2. Data berat badan tikus Wistar	36
Tabel 3. Nilai rerata skor histologi CD8 ⁺ dan rasio skor histologi CD4 ⁺ /CD8 ⁺	37
Tabel 4. Uji normalitas rerata skor histologi CD8 ⁺ dan rasio skor histologi CD4 ⁺ /CD8 ⁺	37
Tabel 5. Uji beda skor histologi antar kelompok data CD4 ⁺ , CD8 ⁺ dan rasio skor histologi CD4 ⁺ /CD8 ⁺	38
Tabel 6. Analisis hubungan skor histologi CD8 ⁺ dan rasio skor histologi CD4 ⁺ /CD8 ⁺ antar kelompok	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema fase dari penyembuhan luka	11
Gambar 2. Skema tahap-tahap penyembuhan luka	19
Gambar 3. Diagram rerata skor histologi CD4 ⁺ , CD8 ⁺ dan rasio skor histologi CD4 ⁺ /CD8 ⁺	39
Gambar 4. Gambaran limfosit CD8 ⁺ hasil hasil pewarnaan jaringan berdasar imunohistokimia <i>mouse monoclonal antibody</i> (<i>MoAb</i>) <i>anti CD8⁺</i>	54

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Data berat badan dan dosis levobupivakain
- Lampiran 2. Tabel skor histologi sel limfosit CD4⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima
- Lampiran 3. Tabel skor histologi sel limfosit CD8⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima
- Lampiran 4. Tabel rasio skor histologi sel limfosit CD4⁺/CD8⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima
- Lampiran 5. Uji normalitas Shapiro-Wilk**
- Lampiran 6. Uji beda Mann-Whitney U**
- Lampiran 7. Uji korelasi non parametrik
- Lampiran 8. Campuran bahan-bahan pakan standar buatan laboratorium PAU Pangan dan Gizi UGM
- Lampiran 9. Gambaran limfosit CD8⁺ hasil pewarnaan jaringan berdasar imunohistokimia *mouse monoclonal antibody (MoAb) anti CD8⁺*
- Lampiran 10. *ETHICAL CLEARANCE*

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropin Hormone</i>
ADH	: <i>Antidiuretic Hormone</i>
ANC	: <i>Absolute Neutrophil Count</i>
ATP	: <i>Adhenosine Triphospate</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
CD8 ⁺ /CD4 ⁺	: <i>Cluster Differentiation 8⁺ / 4⁺</i>
CRH	: <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GABA	: <i>Gama Amino Butyric Acid</i>
HPA	: <i>Hipothalamus Pituitary Adrenal</i>
ICAM	: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN- γ	: <i>Interferron-gamma</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
Ig G1	: <i>Immunoglobulin G1</i>
IL-1/-4 /-6/-8	: <i>Interleukin-1 /-4 /-6 /-8</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PVN	: <i>Paraventricular Nucleus</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
SAM	: <i>Sympathetic Adrenomedularis</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TH1/2	: <i>T Helper 1 / 2</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Penyembuhan luka merupakan proses kompleks dan dinamis dari perbaikan struktur sel dan jaringan. Penyembuhan luka melibatkan berbagai proses dengan urutan : hemostasis, inflamasi akut, regenerasi sel parenkim, migrasi dan proliferasi sel parenkim, sintesis protein *extracellular matrix* (ECM), remodeling jaringan ikat dan komponen parenkim, kolagenasi dan akuisisi kekuatan luka.^{1,2} Pembagian secara garis besar meliputi fase inflamasi, proliferasi dan remodeling.³

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

Pembedahan 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.⁶

Pedersen mengurangi respons stres pembedahan dengan teknik pembedahan non invasif, penggunaan analgetik opioid dan blok saraf. Cara ini mampu menurunkan katabolisme protein, gangguan paru, mengurangi pelepasan katekolamin, kortisol dan glukosa.⁶ **Bardram** melaporkan teknik laparoskopi, anestesi ekstradural, nutrisi dini, mobilisasi dini, dan analgetik adekuat yang terbukti mampu mengurangi respon stres.⁷

Penelitian-penelitian diatas menjelaskan bahwa nyeri yang terkendali menghasilkan respon berupa perbaikan proses penyembuhan. Perbaikan proses penyembuhan juga bisa dilihat dari kandungan limfosit pada hari tertentu. Pada beberapa penelitian, dalam proses penyembuhan luka sel limfosit CD8⁺ bersama-sama sel limfosit CD4⁺ turut mengatur proses penyembuhan luka. CD8⁺ merupakan "*downregulator of wound healing*" sedangkan CD4⁺ merupakan "*upregulator of wound healing*".^{8,9} Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rasio CD4⁺/CD8⁺ juga dapat menunjukan proses penyembuhan luka. Peningkatan rasio CD4⁺/CD8⁺ dapat menggambarkan perbaikan proses penyembuhan luka.^{8,9}

Terdapat berbagai cara mengurangi nyeri, salah satunya adalah dengan infiltrasi anestetik lokal di sekitar luka. Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat mengurangi intensitas nyeri, sehingga menurunkan sekresi hormon glukokortikoid.^{1,2} Penggunaan bupivakain 0,25% dosis tunggal dengan

pemberian infiltrasi dapat mengurangi nyeri selama 24 jam pasca operasi.¹⁰ **Bultmann** melaporkan infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal mampu mengurangi nyeri pasca operasi dan mengurangi kebutuhan analgetik opioid. Penggunaan konsentrasi 0,25% lebih efektif dibandingkan 0,5%, namun berbeda tidak bermakna dengan 0,125%.^{11,12} Pemakaian anestetik lokal bupivakain topikal dan sistemik pada luka akan menghambat ekstrasvasasi plasma, mengurangi nyeri, mengurangi komplikasi infeksi, alergi, tanpa peradangan lokal, efek bakteriostatik dan antimikroba dan proses penyembuhan luka yang baik.^{13,14,15}

Beberapa penelitian juga sudah dilakukan untuk membuktikan efek tehnik blok anestesi terhadap perubahan pada limfosit CD4⁺, limfosit CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺. Blok epidural dan blok ganglion stelata pada operasi terbukti meningkatkan jumlah limfosit CD4⁺, menurunkan jumlah limfosit CD8⁺ dan meningkatkan rasio CD4⁺/CD8⁺.^{16,17} Pada penelitian diatas, obat yang digunakan adalah anestetik lokal lidokain. 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. Cara ini lazim digunakan dalam aplikasi klinis anestetik lokal untuk mengurangi nyeri akut. Infiltrasi levobupivakain di sekitar luka dengan tujuan untuk menghambat transmisi rangsang nyeri di jalur saraf. Infiltrasi diulang tiap 8 jam sesuai masa kerja obat selama periode nyeri akut 24 jam pasca insisi. Limfosit CD8⁺ diperiksa 5 hari pasca insisi karena pada hari ke 5-7, kadar limfosit mencapai maksimal. Penelitian ini akan membandingkan skor histologi CD8⁺ dan

rasio $CD4^+/CD8^+$, dimana hasil $CD4^+$ telah dilakukan oleh peneliti lain dengan subyek yang sama. Tikus Wistar dipilih karena tikus cukup besar, mudah diperoleh, mudah diberi perlakuan dan tahan terhadap perlakuan.

1.2. Rumusan masalah

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

- Apakah infiltrasi anestetik lokal levobupivakain menurunkan skor histologi limfosit $CD8^+$ dan meningkatkan rasio skor histologi limfosit $CD4^+/CD8^+$ dalam proses penyembuhan luka pada binatang percobaan.
- Apakah terdapat hubungan antara skor histologi limfosit $CD8^+$ dan rasio skor histologi limfosit $CD4^+/CD8^+$ dalam proses penyembuhan luka pada binatang percobaan.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Umum

Membuktikan efek infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dalam proses penyembuhan luka yang berupa penurunan skor histologi limfosit $CD8^+$ dan peningkatan rasio skor histologi limfosit $CD4^+/CD8^+$ dalam proses penyembuhan luka pada binatang percobaan.

1.3.2. Tujuan khusus

- Mendeskripsikan skor histologi limfosit $CD8^+$ dan rasio skor histologi limfosit $CD4^+/CD8^+$ dalam proses penyembuhan luka binatang percobaan pada kelompok yang diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka dibanding kelompok yang tidak diberikan infiltrasi levobupivakain.

- Menganalisis perbedaan skor histologi limfosit CD8⁺ dan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka binatang percobaan pada kelompok yang diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka dibanding kelompok yang tidak diberikan infiltrasi levobupivakain.
- Menganalisis hubungan skor histologi limfosit CD8⁺ dengan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka binatang percobaan pada kelompok yang diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka dibanding kelompok yang tidak diberikan infiltrasi levobupivakain.

I.4. Manfaat penelitian

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1. Levobupivakain

Levobupivakain adalah obat anestetik lokal golongan amida (CONH-) dengan atom karbon asimetrik dan isomer Levo(-). Levobupivakain memiliki pKa 8,1. Peningkatan pH akan meningkatkan molekul basa bebas, molekul bebas melintasi membran akson dengan mudah dan beraksi lebih cepat. Sebaliknya pada pH rendah sedikit molekul basa bebas melintasi membran akson dengan aksi farmakologis lebih lambat, contoh pada infeksi lokal. Ikatan dengan protein lebih dari 97% terutama pada asam α 1 glikoprotein dibandingkan pada albumin. Pada pasien hipoproteinemi, sindrom nefrotik, kurang kalori protein, bayi baru lahir dengan sedikit kadar protein, menyebabkan kadar obat bebas dalam plasma tinggi sehingga efek toksik terlihat pada dosis rendah.^{12,13} Metabolisme obat terjadi di hepar oleh enzim sitokrom P450. Bersihan obat dalam plasma akan menurun bila terjadi gangguan fungsi hepar.¹⁸

Mekanisme aksi levobupivacain sama dengan bupivakain atau obat anestetik lokal lain. Apabila *minimum local analgesic concentration* (MLAC) tercapai, obat akan melingkupi membran akson, menutup kanal natrium berakibat hambatan permeabilitas kanal natrium, sehingga tidak tercapai ambang aksi potensial dan menghambat depolarisasi. Terjadi hambatan transmisi impuls saraf.^{18,20} Levobupivakain menimbulkan depresi jantung lebih sedikit dibandingkan bupivakain dan ropivakain. Gejala toksisitas sistem saraf pusat pada bupivakain terjadi pada dosis lebih rendah dibandingkan levobupivakain.¹⁹

Levobupivakain dapat digunakan untuk epidural, subaraknoid, blok saraf perifer, infiltrasi lokal, analgesi obstetri dan pengelolaan nyeri setelah operasi.

Lama kerja obat pada pemberian infiltrasi adalah 240-480 menit. Dosis tunggal maksimum yang digunakan 2 mg/kg bb dan 5,7 mg/kg bb (400 mg) dalam 24 jam.^{18,20} Dosis infiltrasi maksimal 175 mg dosis tunggal.²⁴ Efek samping obat diantaranya hipotensi, bradikardi, mual, muntah, gatal, nyeri kepala, pusing, telinga berdenging, gangguan buang air besar dan kejang.²⁰

II. 2. Patofisiologi nyeri

Nyeri merupakan gejala umum dari penyakit, bersifat subyektif dengan gejala psikologis bervariasi. Nyeri merupakan suatu pengalaman hidup kompleks, menyatu dengan emosi dan pikiran yang berproses menghasilkan pengalaman nyeri.²¹ Nyeri merupakan sensasi tidak nyaman, pengalaman sensorik dan emosional tidak menyenangkan akibat terjadinya kerusakan jaringan.^{22,23}

Luka irisan bedah menimbulkan nyeri klinis akibat kerusakan jaringan. Proses inflamasi terlokalisir, serta hilang bila inflamasi jaringan sembuh. Nyeri merupakan reaksi sensoris sistem nosiseptif mendadak dan merupakan sinyal mekanisme pertahanan tubuh.²³ Kerusakan di jaringan kulit atau jaringan perifer menyebabkan terlepasnya mediator kimiawi dan mensensitisasi nosiseptor sehingga terjadi penurunan nilai ambang nyeri. Mediator bradikinin, substansi P turut mempengaruhi dalam proses terjadinya impuls nosiseptif.²⁴ Tahap proses terjadinya nyeri sebagai berikut :

II.2.1 Transduksi

Kerusakan jaringan menyebabkan terlepasnya substansi kimiawi endogen yaitu: bradikinin, substansi P, serotonin, histamin, ion H, ion K dan prostaglandin. Kerusakan membran sel akan melepaskan senyawa phospholipid yang

mengandung asam arakhidonat dan akibat pengaruh *prostaglandin endoperoxide synthase* akan membentuk mediator inflamasi sekaligus mediator nyeri yaitu tromboksan, prostaglandin, prostasiklin. Kombinasi senyawa ini menimbulkan vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler lokal. Stimulasi dan sensitisasi terus menerus menyebabkan hiperalgesia, alodina dan berakhir sesudah terjadi penyembuhan. Lekotrien D4 melepas substansi P, lekosit *polymorphonuclear* (PMN) melepaskan lekotrien B4. Keduanya berperan dalam sensitisasi nosiseptor. Pada inflamasi, sistem imun akan melepaskan sitokin proinflamasi yaitu : IL-1 β , IL-6, TNF α , *Interferon* (IFN) γ , yang akan berinteraksi dengan saraf perifer melalui mediator. Platelet dan sel mast melepas serotonin yang langsung mengaktifkan atau mensensitisasi nosiseptor dan menimbulkan hiperalgesia. Proses transduksi dapat dihambat oleh obat anti inflamasi non steroid.^{25,26,27}

II.2.2. Transmisi

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

radiks posterior. Serabut aferen primer berakhir pada lamina I, substansia gelatinosa (lamina II, III), lamina V dan lamina IV. Impuls ditransmisi ke neuron sekunder dan masuk ke traktus spinothalamikus lateralis. Korno posterior berfungsi sebagai jalur masuk desendens dari otak untuk melakukan modulasi impuls dari perifer. Impuls selanjutnya disalurkan ke daerah somatosensorik di korteks serebri. Proses transmisi dapat dihambat oleh anestetik lokal.^{27,28}

II.2.3. Modulasi

Impuls setelah mencapai korno posterior medula spinalis akan mengalami penyangkutan intensitas. Sistem pengendali modulasi ini adalah sistem gerbang kendali spinal atau *the gate control theory of pain*. Apabila impuls melebihi ambang sel T maka akan melewati sistem kendali gerbang spinal dan diteruskan ke pusat supraspinal di korteks somatosensoris. Substansi yang bekerja sebagai modulator penghambat nyeri di medula spinalis yaitu dinorfin, enkefalin, noradrenalin, dopamin, serotonin dan *gamma amino butyric acid* (GABA). Sedangkan substansi yang meningkatkan nyeri yaitu substansi P, *adenosin triphosphate* (ATP) dan asam amino eksitatori.^{26,27,28}

II.2.4. Persepsi

Hasil proses integrasi pada pusat kognisi, afeksi dan impuls nyeri yang dirasakan individu dan bagaimana cara individu menghadapinya.^{26,27,28} Nyeri sebagai mekanisme protektif bersifat subyektif dalam derajat, kualitas nyeri, individu dan periode.²⁷ Pengelolaan nyeri tidak adekuat akan berakibat penurunan gerak pernapasan, kemampuan batuk, ketakutan mobilisasi, kecemasan, peningkatan pelepasan katekolamin. Katekolamin yang tinggi berefek terutama

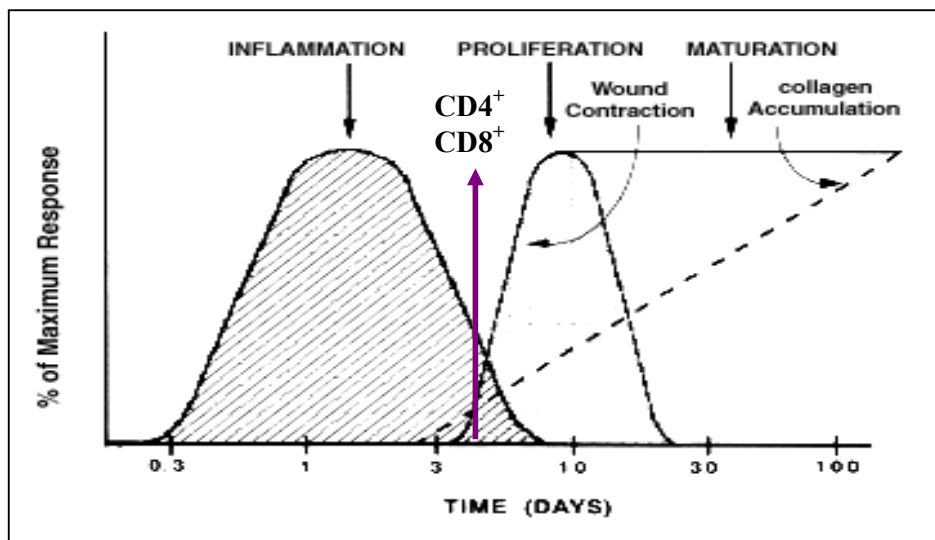
terhadap pemanjangan fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin.²⁹ **Bardram** melaporkan 15 pasien dengan resiko tinggi, usia 81 tahun yang menjalani operasi reseksi kolon dengan teknik laparoskopi, teknik anestesia ekstradural, nutrisi dini, mobilisasi dini dan analgetik opioid mampu mengurangi lama rawat inap di rumah sakit tanpa komplikasi kelainan jantung, tromboemboli, infeksi dan kelelahan.³⁰

II. 3. Proses penyembuhan luka

Sitokin bersama faktor pertumbuhan seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) aktif berperan melaksanakan proses penyembuhan. Beberapa macam sitokin terlibat dalam proses penyembuhan yaitu: TNF α , IL 1, IL 6, IL 8 dan *transforming growth factor* (TGF) β 1. Sesudah disekresi oleh sel T, sel B, makrofag, platelet, sel endotel, fibroblas, plasenta, tulang dan ginjal segera melepas dimer biologis aktif dari komponen molekul laten. TGF β juga menstimulasi kemotaksis fibroblas, inhibisi produksi kolagen dan fibronectin, menghambat degradasi kolagen karena peningkatan atau penurunan inhibitor protease. Pada inflamasi kronis TGF β terlibat dalam pertumbuhan fibrosis.^{1,3}

Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh faktor pertumbuhan dan sitokin yaitu PDGF, FGF, TGF β dan IL1, IL 4, *immunoglobulin G1* (IgG1) yang diproduksi oleh leukosit dan limfosit pada saat sintesis kolagen. Pada proses remodeling jaringan faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF, TGF β 1 dan IL 1, TNF akan menstimulasi sintesis kolagen, memodulasi sintesis dan aktivasi *metalloproteinase*, suatu enzim yang berfungsi

untuk degradasi komponen ECM. Hasil sintesis dan degradasi ECM merupakan remodeling kerangka jaringan ikat. Struktur ini merupakan gambaran pokok penyembuhan luka pada inflamasi kronis. Proses degradasi kolagen dan protein ECM lain dilaksanakan oleh *metalloproteinase* yang terdiri atas kolagenase, gelatinase, yang diproduksi oleh : fibroblas, makrofag, netrofil, sel sinovial dan sel epitel. Untuk melepaskan perlu stimulus tertentu yaitu PDGF, FGF, IL1, TNF α , fagosit dan stres fisik.^{1,3}



Gambar 1 : Skema fase penyembuhan luka (dimodifikasi dari: Wound Healing. <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm>)

II.3.1.Fase inflamasi

Fase inflamasi terjadi pada hari 0 – 5. Kerusakan sel memicu reaksi vaskuler kompleks pada jaringan ikat dengan pembuluh darah. Reaksi ini berguna sebagai proteksi terhadap jaringan yang mengalami kerusakan untuk tidak

mengalami infeksi dan meluas tak terkendali. Proses inflamasi sangat erat berhubungan dengan penyembuhan luka. Inflamasi dan penyembuhan luka cenderung menimbulkan nyeri. Tanpa adanya inflamasi tidak akan terjadi proses penyembuhan dan luka akan tetap menjadi sumber nyeri.¹ Fase inflamasi dimulai segera setelah terjadi luka. Luka mengakibatkan kerusakan struktur jaringan dan perdarahan. Darah akan mengisi jaringan cedera dan terjadi degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor Hageman. Terjadi pengaktifan komplemen kinin, kaskade pembekuan dan pembentukan plasmin. Keadaan ini memperkuat sinyal dari daerah terluka, yang tidak saja mengaktifkan pembentukan bekuan yang menyatukan tepi luka tetapi juga akumulasi dari beberapa mitogen dan menarik zat kimia ke daerah luka. Pembentukan kinin dan prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas dari pembuluh darah. Hal ini menyebabkan edema, menimbulkan pembengkakan dan nyeri. Sel PMN terutama netrofil adalah sel pertama yang menuju ke daerah luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncak pada 24–48 jam. Netrofil memfagositosis dan mencerna organisme patologis dan sisa jaringan. Bila tidak terjadi infeksi, netrofil berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga.^{3,7}

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Muncul pertama 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3. Makrofag berumur dan tetap ada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T dengan jumlah

bermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Makrofag dan limfosit T penting keberadaannya pada penyembuhan luka normal. Makrofag memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas zat biologis aktif. Zat ini mempermudah terbentuknya sel inflamasi tambahan yang membantu makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan. Makrofag melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan jaringan granulasi.³¹

II.3.2.Fase proliferasi

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

sampai minggu ketiga. Kolagen terus menumpuk sampai tiga bulan. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia.^{1,3}

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

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

II.3.3.Fase maturasi

Fase ini berlangsung dari hari ke 7 sampai dengan 1 tahun. Segera setelah matriks ekstrasel terbentuk dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronektin. Terjadi migrasi sel substratum dan pertumbuhan sel ke dalam, penumpukan kolagen oleh fibroblas. Terbentuk asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar berperan dalam pembentukan matriks ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentuk matriks. Serabut kolagen pada permulaan terdistribusi acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel fibril yang secara perlahan menyebabkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan dan kekuatan ketegangan. Sesudah 5 hari periode jeda, dimana saat ini bersesuaian dengan pembentukan jaringan granulasi awal dengan matriks sebagian besar tersusun dari fibronektin dan asam hialuronidase, terjadi peningkatan cepat dari kekuatan tahanan luka karena fibrogenesis kolagen. Pencapaian kekuatan tegangan luka berjalan lambat. Sesudah 3 minggu kekuatan penyembuhan luka mencapai 20% dari kekuatan akhir. Bagaimanapun, kekuatan akhir luka tetap lebih lemah dibanding dengan kulit utuh, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh.^{1,3}

Pengembalian kekuatan tegangan berjalan perlahan karena deposisi jaringan kolagen terus menerus, remodeling serabut kolagen membentuk bundel kolagen lebih besar dan perubahan dari *cross linking* inter molekuler. Remodeling kolagen selama pembentukan jaringan parut tergantung pada proses sintesis dan katabolisme kolagen. Degradasi kolagen pada luka dikendalikan oleh enzim

kolagenase. Kecepatan sintesis kolagen mengembalikan luka ke jaringan normal terjadi dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. Remodeling aktif jaringan parut akan terus berlangsung sampai 1 tahun dan tetap berjalan dengan lambat seumur hidup.^{1,3,7} Pada proses remodeling terjadi reduksi secara perlahan pada vaskularisasi dan selularitas jaringan yang mengalami perbaikan sehingga terbentuk jaringan parut kolagen yang relatif avaskuler dan aseluler.^{1,3}

Tabel 1. Peran sel limfosit pada fase penyembuhan luka

FASE	SEL-SEL YANG BERPERAN
Proses koagulasi	Platelet
Inflamasi	Platelet Netrofil
Migrasi / proliferasi / granulasi	Platelet Makrofag Limfosit Fibroblas Sel epitelial Sel endotel
Maturasi / remodeling	Fibroblas

II. 4. Pengaruh pemakaian anestetik lokal pada penyembuhan luka

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat mengurangi intensitas nyeri dengan menghambat jalur transmisi impuls nyeri. Infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal di sekitar luka irisan dapat mengurangi nyeri pasien yang menjalani seksio sesaria 24 jam pasca operasi.⁷ Infiltrasi bupivakain 0,25% dosis tunggal di sekitar luka telah terbukti mampu mengurangi nyeri pasca operasi dan mengurangi kebutuhan analgetik opioid. Penggunaan konsentrasi 0,25% lebih efektif dibandingkan 0,5%, namun berbeda tidak bermakna dengan 0,125%.^{5,30} Penggunaan infiltrasi bupivakain pada dosis berulang dengan menyisipkan

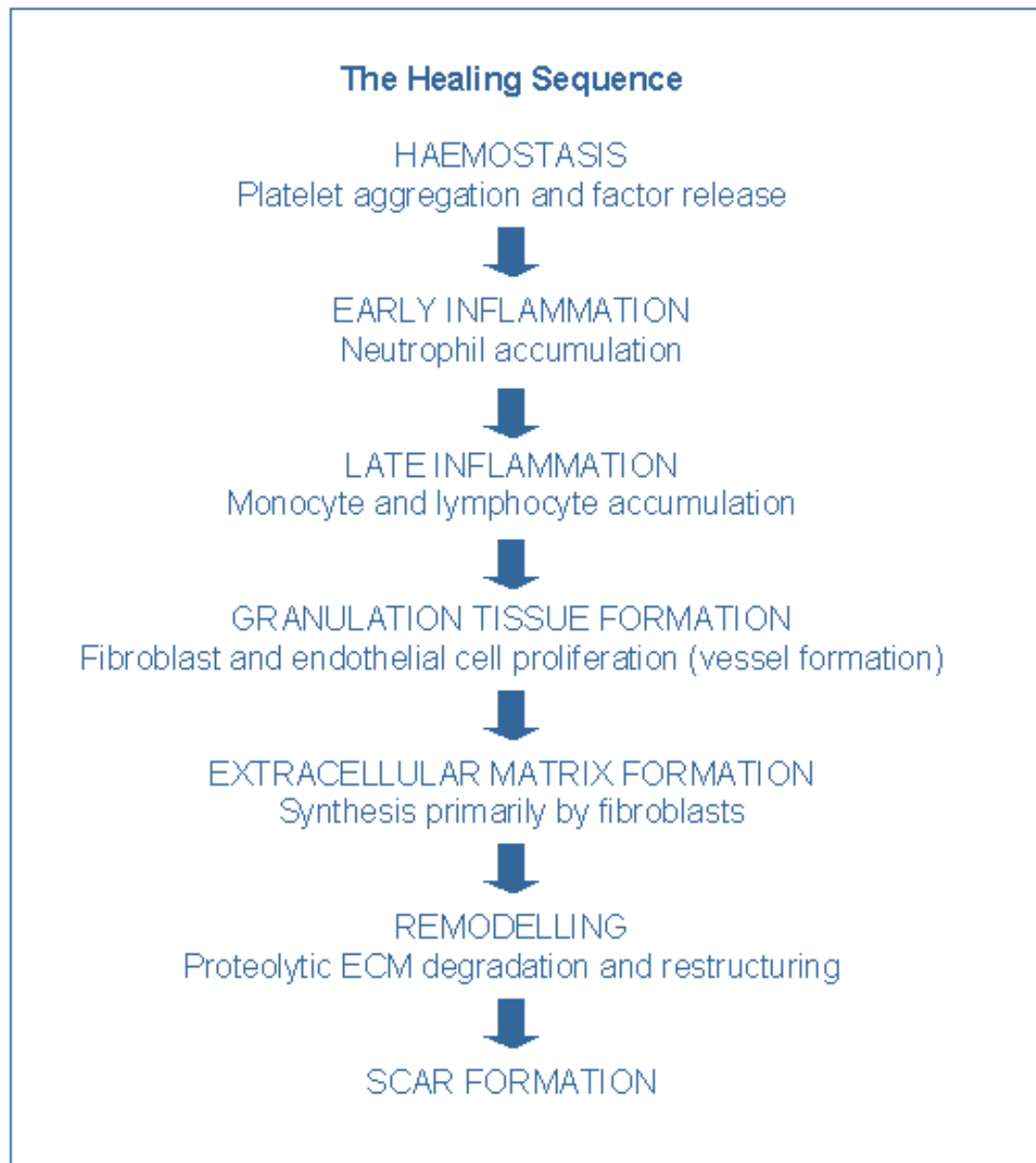
kateter epidural di bawah luka, efektif mengurangi nyeri, tanpa komplikasi infeksi, inflamasi lokal dan efek samping mual muntah.¹⁰

Nyeri secara langsung dapat menimbulkan stres pada sistem imun, atau lewat peptida hipotalamus, pituitaria dan katekolamin sebagai produk cabang simpatis Substansi yang merupakan penghubung antara kedua sistem, otak dan sistem imun, adalah CRH, *Adreno Corticotropine Hormone* (ACTH), β endorfin, substansi P, dan lain-lain. Otak memberikan respon terhadap stres dengan melepas CRH yang dilakukan oleh *Paraventricularis Nukleus* (PVN), dan diperkirakan berperan sebagai mediator primer dari beberapa perubahan yang diinduksi nyeri. Perubahan tersebut termasuk aktivasi aksis HPA (*Hipotalamus-Pituitaria-Adrenal*) dan aksis SAM (*Sympathetic Adrenal Medullary*). Pada nyeri hebat sinyal berjalan melewati aksis HPA, menimbulkan disregulasi sistem imun sehingga terjadi penurunan ketahanan tubuh. Sinyal tersebut juga melewati aksis SAM, menimbulkan gejala patofisiologis berupa respon otonom, yaitu suatu respon biologis yang diekspresikan dalam bentuk peningkatan tekanan darah, nadi, respirasi, keringat dingin dan spasme otot. Respon ini disebut sebagai respon darurat.¹

Impuls nyeri yang dihambat oleh anestetik lokal pada jalur transmisi bersifat lebih terkendali, tidak bersifat darurat. Otak akan memproyeksikan impuls ini dan memberikan sinyal ke hipokampus, amigdala, dan hipotalamus. Dalam sel PVN hipotalamus terjadi aktivasi dan berespon dengan melepaskan CRH yang tidak bersifat darurat. Selanjutnya CRH mengaktifkan kelejar pituitaria untuk melepaskan ACTH dan β endorfin masuk ke sirkulasi darah. Hormon CRH

melalui serabut preganglioner simpatis mengaktifkan medula adrenal untuk melepaskan katekolamin dalam kadar normal sehingga tidak menimbulkan respon stres berlebihan. Hormon ACTH sampai ke adrenal, mengaktifkan korteks adrenal dan melepaskan glukokortikoid (kortisol) dalam dosis tidak tinggi. Kadar kortisol yang tidak tinggi tersebut tidak lagi menimbulkan supresi atau inhibisi tetapi berubah menimbulkan stimulasi atau eksitasi.^{1,33} *Cluster Differentiation* (CD4⁺) akan terstimulasi menjadi lebih banyak dan aktif. Peningkatan aktivitas sel B dibantu juga oleh TH2 yang mendapat stimulasi dari TH1 karena TH2 mempunyai IL-2R dan berekatan dengan IL-2 yang disekresi oleh TH1. *Interferon* γ yang disekresi TH1 jumlah dan aktivitasnya juga meningkat, sitokin ini bekerja dalam sel B dan aktif menginduksi perubahan *imunoglobulin* (Ig) menjadi *imunoglobulin* G1 (IgG1), suatu isotipe Ig yang berikatan erat dengan reseptor dari permukaan makrofag, sehingga dapat bekerja sebagai opsonin yang poten.^{1,35} Peran TH3 selain mengaktifkan pertahanan mukosa, juga lebih menonjol pada peran biologis TGF β dalam meningkatkan ECM, meningkatkan kolagenasi dan mempercepat remodeling untuk penyembuhan luka. Pada saat yang sama makrofag aktif melepaskan beberapa sitokin untuk pertahanan tubuh dan penyembuhan jaringan yang rusak.³³

Gambar 2. Skema tahap-tahap penyembuhan luka³⁴



II.5. Peran limfosit CD4⁺, CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Sistem imun terdiri

dari sistem imun alamiah (*natural/innate*) dan didapat (*adaptive/acquired*). Sistem imun didapat terdiri atas pertahanan humoral/sel B dan pertahanan seluler/sel T. Sel-sel imunokompeten yang utama adalah limfosit T dengan berbagai subsetnya ($CD4^+$ dan $CD8^+$) dan limfosit B, masing-masing dapat dibedakan satu dari yang lain karena mempunyai fungsi yang berbeda dan mengekspresikan antigen permukaan (imunofenotip) yang karakteristik. Antigen permukaan ini mempunyai korelasi dengan stadium diferensiasi, karena itu disebut juga sebagai antigen diferensiasi (*cluster of differentiation / cluster designation* = CD). Sel T berdiferensiasi dalam kelenjar timus sedangkan sel B berdiferensiasi dalam sumsum tulang dan organ limfoid perifer. Adapun yang berperanan dalam sistem imun spesifik seluler adalah limfosit T atau sel T.^{37,39,40}

Sel Th (*Helper*) berperan menolong sel B dalam diferensiasi dan memproduksi antibodi. Untuk membentuk antibodi kebanyakan antigen T dependen harus dikenal lebih dahulu baik oleh sel T maupun oleh sel B. sel Th juga berpengaruh atas sel Tc dalam mengenal sel yang terinfeksi virus dan jaringan cangkok *allogenic*. Istilah sel *Tinducer* dipakai untuk menunjukkan aktivitas sel Th dalam mengaktifkan sel subset limfosit T lainnya. Sel Th juga melepaskan limfokin yang mengaktifkan makrofag sehingga dapat menghancurkan patogen yang dimakannya dan sel-sel lainnya.³⁸

Sel Tc (sitotoksik) adalah limfosit yang berasal dari sel asal dalam sumsum tulang. Sel tersebut matang dalam timus untuk mendapat reseptor spesifik terhadap fragmen antigen. Kebanyakan sel Tc adalah $CD8^+$ dan hanya mengenal antigen yang berhubungan dengan MHC kelas I. Fungsi utamanya ialah

mengelimir sel yang terinfeksi virus. Sel Tc akan juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel seperti halnya pada penolakan pada tranplantasi. Dalam keadaan tertentu dapat pula menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri.^{37,38,39,40}

Selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung, sel Tc juga menghasilkan γ -interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke dalam sel lain dan membantu memperkecil penyebaran virus ke sel-sel lain yang berdekatan (kebal).^{35,36,38}

Limfosit merupakan komponen yang berperan pada akhir inflamasi. Limfosit T merupakan limfosit dominan walau limfosit B juga ditemukan pada jaringan perukaan manusia. Pada hewan percobaan yang dilakukan deplesi limfosit T, terjadi penghambatan proses penyembuhan luka (**Barbul**, 1990). Limfosit CD4⁺ dan limfosit CD8⁺ pembagian fungsinya mengikuti aturan dari keseimbangan respon imun. Terdapat hubungan yang relevan pada proses penyembuhan luka hewan percobaan, bahwa limfosit CD8⁺ menghambat penyembuhan luka dan limfosit CD4⁺ mendorong penyembuhan luka pada penelitian terhadap penyembuhan tikus in vitro.³⁷ Dukungan terhadap percobaan ini berupa penelitian pada manusia selama satu minggu setelah pembedahan, jika terjadi peningkatan jumlah sel-sel limfosit CD4⁺ dibandingkan dengan kenaikan jumlah sel-sel limfosit CD8⁺ (rasio CD4⁺/CD8⁺) maka akan ditemukan dengan segera penutupan pada luka (**Boyce et al**, 2000).³⁵ Penelitian lain menunjukkan deplesi limfosit CD4⁺ memperlihatkan penurunan yang signifikan terhadap kekuatan pokok (*ultimate strength*), kekenyalan (*resilience*) dan kekerasan atau ketahanan (*toughness*) pada jaringan luka. Sedangkan deplesi limfosit CD8⁺

memperlihatkan kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan pokok, kekenyalan dan kekerasan atau keliatan jaringan luka. Penelitian ini menyimpulkan bahwa deplesi limfosit T pada penyembuhan luka pada tingkat subset-subsetnya terdapat pengaturan yang berlawanan, yaitu limfosit CD8⁺ merupakan *downregulator of wound healing* sedangkan limfosit CD4⁺ merupakan *upregulator of wound healing*.^{8,9}

Beberapa penelitian juga sudah dilakukan untuk membuktikan efek tehnik blok anestesi terhadap perubahan pada limfosit CD4⁺, limfosit CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺. Blok epidural dapat mengakibatkan meningkatnya jumlah limfosit CD4⁺, menurunnya limfosit CD8⁺ dan meningkatnya rasio CD4⁺/CD8⁺.¹⁶ Penelitian lain juga mendapatkan hal yang sama dengan melakukan blok terhadap ganglion stelata.¹⁷ Telah diketahui bahwa blok epidural mengakibatkan terjadinya blok terhadap saraf simpatis. Tidak adanya atau berkurangnya nyeri juga mengakibatkan menurunnya respon simpatis. Perubahan terjadi lewat aksis hipotalamus-pituitari-adrenokortikal dan juga lewat aksis simpato-adrenal.^{16,17,40} Kemungkinan meningkatnya jumlah limfosit CD4⁺, menurunnya limfosit CD8⁺ dan meningkatnya rasio CD4⁺/CD8⁺ merupakan akibat langsung pemberian anestetik lokal tidak terbukti. Hal ini dibuktikan dengan pemberian obat anestesi lokal (lidokain) intravena, ternyata tidak terjadi perubahan yang signifikan terhadap jumlah limfosit CD4⁺, limfosit CD8⁺ atau perubahan rasio CD4⁺/CD8⁺.^{16,17,40}

II.5. Skor histologi

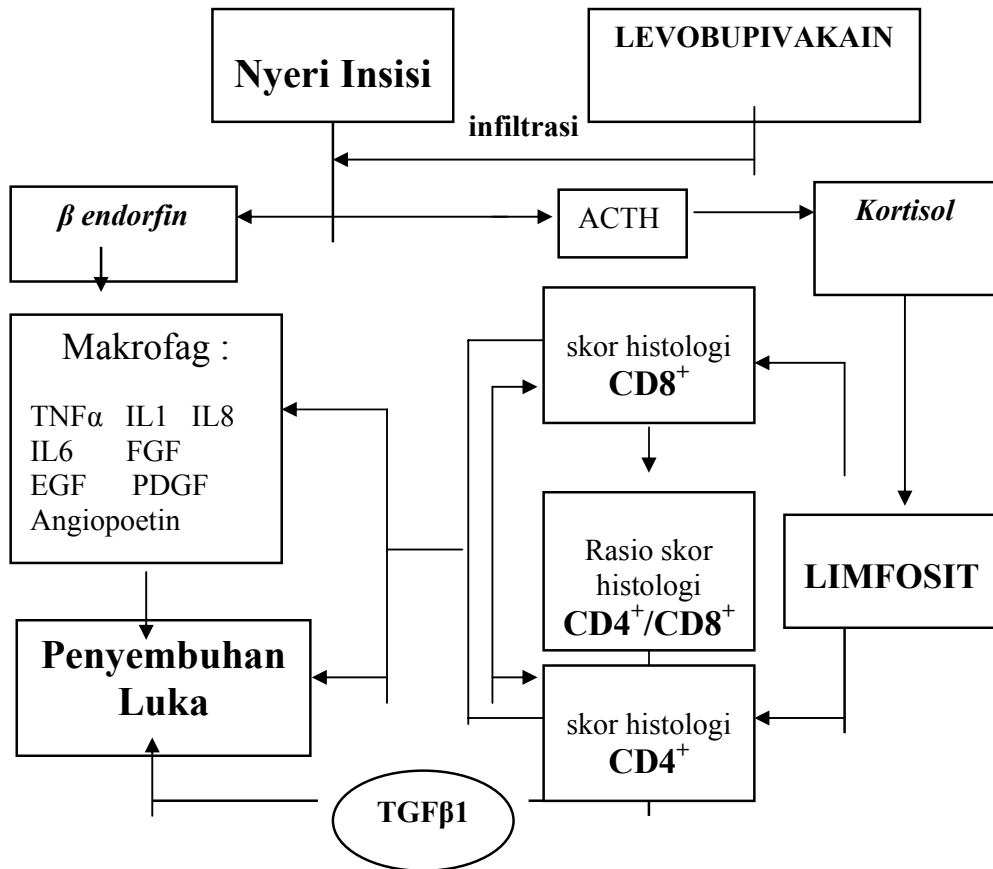
Skor histologi adalah interpretasi berupa perhitungan presentasi sel dan intensitas warna (**Leake**, 2000). Pemeriksaan imunohistokimia merupakan metode pemeriksaan pewarnaan jaringan berdasar kerja imunoenzym untuk memeriksa adanya antigen atau mencari lokasi antigen dalam spesimen (**Warsito** 1991). Imunohistokimia dilaksanakan berdasarkan pada interaksi antigen-antibodi yang terjadi antara marker sel CD8⁺ dengan antibodi primer. Deteksi yang digunakan adalah deteksi kromogenik berdasarkan warna yang timbul sebagai akibat reaksi ensimatis yang terjadi antara enzim HRP dengan substratnya.

Pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal untuk mendapatkan skor histologi telah banyak digunakan. **Gava** dkk mempergunakan pemeriksaan imunohistokimia untuk mendapatkan skor histologi dalam penelitiannya terhadap reseptor progesteron A dan B pada ovarium tikus.⁴¹ Pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal dapat juga digunakan terhadap subset limfosit T. **Sevcikova** dkk menggunakannya untuk penelitiannya tentang jumlah limfosit CD4⁺, limfosit CD8⁺ atau perubahan rasio CD4⁺/CD8⁺ pada penderita kanker payudara.⁴²

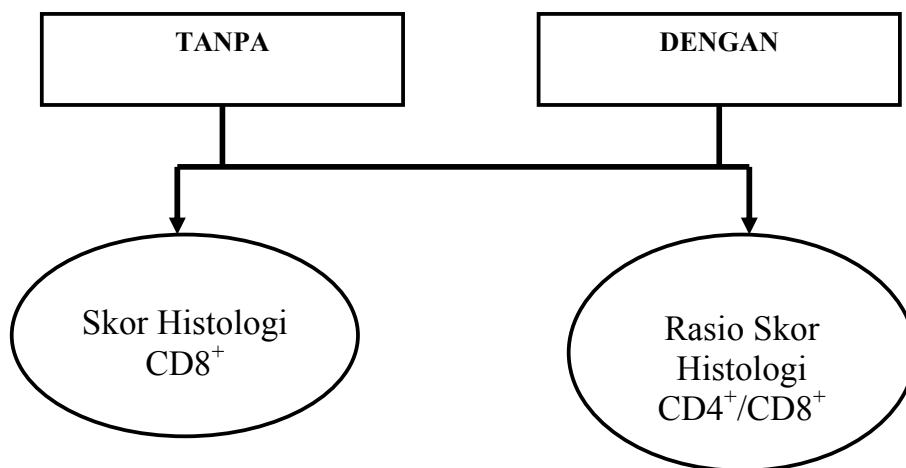
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

III.1. Kerangka teori



III.2. Kerangka konsep



III.3. Hipotesis

Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain menurunkan skor histologi limfosit CD8⁺ dan meningkatkan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka.

Terdapat hubungan antara menurunnya skor histologi limfosit CD8⁺ dan meningkatnya rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ dalam proses penyembuhan luka.

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

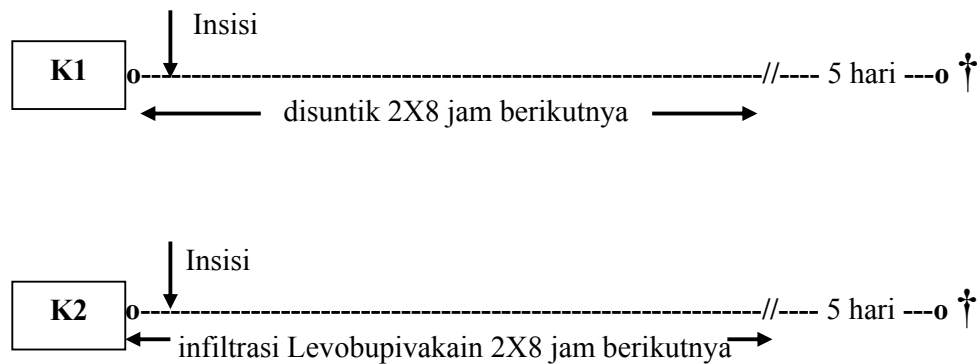
IV.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain “*Randomized post test only control group design*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua yaitu kelompok kontrol (K1), dan perlakuan (K2), penjelasan sebagai berikut :

K1 : Kelompok kontrol, tikus Wistar yang dilakukan insisi sepanjang 2 cm, disuntik disekitar luka, disuntik ulang 2X setiap 8 jam berikutnya.

K2 : Kelompok Perlakuan , tikus Wistar yang dilakukan insisi sepanjang 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain disekitar luka, diinfiltrasi ulang 2X setiap 8 jam berikutnya.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



IV.2. Sampel penelitian

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

Kriteria inklusi:

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

Kriteria eksklusi:

- Sakit (gerakan tidak aktif) selama masa adaptasi 7 hari.
- Terlihat adanya tanda-tanda infeksi disekitar luka.

- Mati selama perlakuan berlangsung.

Besar sampel : menurut WHO untuk penelitian dengan hewan percobaan, tiap kelompok minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 5 ekor tiap kelompok.⁴³

Randomisasi : 10 tikus dikelompokkan secara random menjadi dua kelompok

- yaitu:
- Kelompok kontrol (K1) : 5 ekor
 - Kelompok perlakuan (K2) : 5 ekor

IV.3. Waktu dan lokasi penelitian

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

IV.4. Variabel Penelitian

IV.4.1. Variabel bebas

Anestetik lokal levobupivakain 0,25%.

IV.4.2. Variabel tergantung

- Skor histologi limfosit CD8⁺.
- Rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺.

IV.4.3. Definisi operasional

1. Infiltrasi levobupivakain adalah pemberian suntikan suatu anestetik lokal berupa larutan 0,5% levobupivakain yang telah diencerkan menjadi larutan 0,25%, disuntikan di sekitar luka \pm 0,5 cm dari tepi

luka dengan semprit tuberkulin sepanjang luka insisi sampai kedalaman subkutis.

2. Skor histologi merupakan suatu intepretasi berupa perhitungan presentasi sel dan intensitas warna. Skor terbagi menjadi kuat, sedang dan lemah yang ditampilkan dalam bentuk angka (*Leake*, 2000).
3. Rasio skor histologi $CD4^+/CD8^+$ merupakan suatu nilai yang didapatkan dari perbandingan antara skor histologi $CD4^+$ dan skor histologi $CD8^+$.

IV.5. Bahan dan alat penelitian

IV.5.1. Bahan untuk perlakuan

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

Tikus jenis Wistar diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, Yogyakarta. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan standar dan minum secukupnya.

IV.5.2. Bahan untuk eksisi-biopsi

- Mikrotom
- Kaca obyektif dan penutup

Alat untuk eksisi-biopsi

- Inkubator 56^0 C

IV.5.3. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia

- Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti CD8⁺*
- *Kit universal streptavidin-biotin*
- Kertas saring
- Tabung plastik dan pipet

Alat untuk pemeriksaan imunohistokimia

- Pensil PAP
- *Waterbath*
- Tempat pewarnaan dan cucian
- Pipet serologi
- *Freezer*
- *Timer*
- Epismikrometer seluler

IV.5.4. Alat untuk pembacaan preparat

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

Alat-alat diatas telah dirangkai menjadi satu kesatuan.

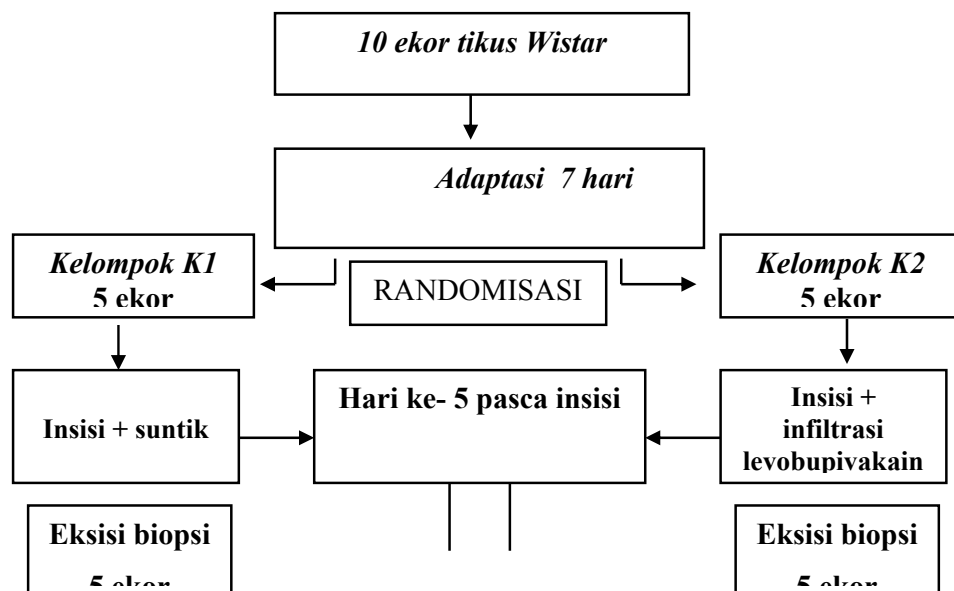
IV.6. Pelaksanaan Penelitian

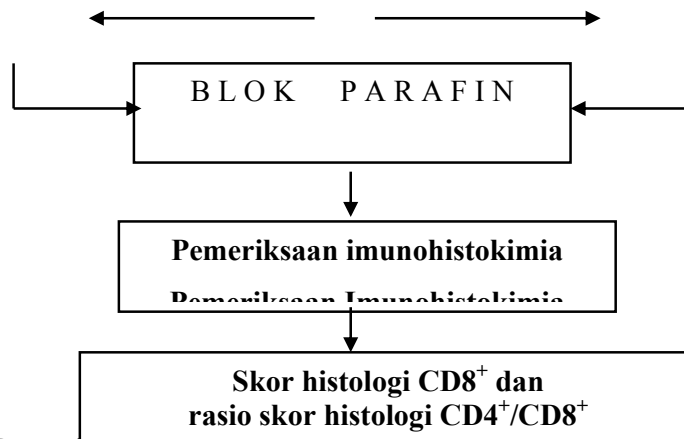
Sejumlah 10 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangan secara individual dan diberi pakan standar secukupnya selama 7

hari. Tikus dibagi menjadi dua kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang ditentukan secara acak.

Sesudah dibius dengan eter, bulu di sekitar punggung dicukur bersih dan didesinfeksi menggunakan betadin. 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 nilon steril nomor 000. Infiltrasi dilakukan pada kelompok perlakuan berupa larutan levobupivakain. Sediaan berupa larutan 0,5% levobupivakain yang diencerkan menjadi larutan 0,25%. Pemberian dengan infiltrasi memakai jarum tuberkulin di sekitar luka irisan. Sedangkan pada kelompok kontrol suntikan dilakukan tanpa obat. Selanjutnya jahitan dibersihkan dan dioles dengan betadin dan dirawat. Pasca bedah diberikan *penicillin oil* 15 mg, intra muskular. Pengulangan penyuntikan baik dengan atau tanpa levobupivacain dilakukan sebanyak dua kali dengan tenggang waktu 8 jam.

IV.7. Alur kerja





IV.8. Prosedur Pemeriksaan

IV.8.1. Prosedur Eksisi-Biopsi

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

IV.8.2. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

a. Deparafinisasi

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

- Xyllol I selama 5 menit
- Xyllol II selama 5 menit
- Alkohol Absolut I selama 5 menit
- Alkohol Absolut II selama 5 menit
- Alkohol 90% selama 5 menit

- Alkohol 70% selama 5 menit
- Aquabides I selama 5 menit
- Aquabides II selama 5 menit

b. *Quenching Endogenous Peroxidase*

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

c. *Unmasking Antigen*

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

d. *Imunostaining*

- Bloking serum albumin diteteskan diatas potongan jaringan dalam *slide* selama 30 menit
- Inkubasi antibodi primer (dengan pengenceran 1:50 sampai 1:200) selama 1 jam dalam temperatur 25⁰ C.
- Cuci 2x dengan aquades
- SA-HRP
- Cuci 2x dengan aquades
- DAB
- *Contterstain HE*
- Canada balsem

IV.9. Cara pengumpulan data

Dari masing masing kelompok pada hari ke 5 dilakukan biopsi pada daerah tengah luka. Hasil biopsi difiksasi dengan blok parafin. Pada Pemeriksaan

Imunohistokimia dimaksudkan untuk menentukan skor histologi CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺.

Skor histologi dilakukan lewat pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada jaringan sekitar luka yang dapat dilihat pada mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Dipilih lapang pandang yang paling banyak sel positifnya dengan pembesaran 400X, selanjutnya dihitung jumlah sel positif pada lima lapang pandang searah jarum jam. Dihitung skor histologi dan dibandingkan antara kontrol dan perlakuan.

Cara perhitungan skor histologi adalah dengan mengalikan intensitas dengan presentase dari pewarnaan.

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

Dimana : I = intensitas

P = presentase

K = intensitas positif kuat

S = intensitas positif sedang

L = intensitas positif lemah

N = intensitas negatif

Presentasi : Skor 0 : tidak ada sel positif

1 : sel positif 1 – 25%

2 : sel positif 26 – 50%

3 : sel positif 51 – 75%

4 : sel positif 76 – 100%

Intensitas : Skor 0 : tidak terwarnai / negatif

1 : positif lemah

2 : positif sedang

3 : positif kuat

IV.10. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi data. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif skor histologi CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median. Distribusi data variabel diuji menggunakan uji ***Shapiro-Wilk*** karena sesuai dengan uji non parametrik dan n<30. Selanjutnya dilakukan uji beda non parametrik untuk 2 variabel menggunakan ***Mann-Whitney U Test***. Untuk menilai hubungan CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ digunakan uji korelasi sesuai dengan uji non parametrik dengan n<30 yaitu uji ***Spearman***. Analisis data menggunakan program komputer SPSS 13.0 *for windows*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

Telah dilakukan penelitian hewan coba mengenai pengaruh infiltrasi anestetik lokal levobupivakain disekitar luka terhadap skor histologi sel CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺. Hasil skor histologi sel CD4⁺ didapatkan dari data penelitian Dr. Andri Setiabudi (tesis telah dipresentasikan dan disetujui November 2005, dimana penelitian menggunakan tikus yang sama). Hasil pemeriksaan adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Data berat badan tikus Wistar

Variabel	Kelompok		<i>p</i>
	I	II	
Berat badan (gram)	274,62 ± 13,62	280,5 ± 14,12	0,857*

p<0.05

Data dinyatakan dalam rerata±simpang baku

* Uji homogenitas variansi

Dari tabel 3 untuk uji homogenitas nilai rerata berat badan kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain (K1) dan kelompok dengan infiltrasi anestetik lokal levobupivakain (K2), berbeda tak bermakna (*p*=0,857). Berarti

kedua kelompok berasal dari populasi yang homogen sehingga layak untuk dibandingkan.

Tabel 3. Nilai rerata skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺

Variabel	Kel.	N	Rerata	Simpang baku	Minimum	Maksimum
CD8 ⁺	I	5	6,040	0,5727	5,60	7,00
	II	5	4,960	0,2191	4,80	5,20
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	I	5	1,518	0,1003	1,43	1,67
	II	5	2,570	0,1700	2,00	3,04

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Dari tabel 4 terlihat rerata skor histologi limfosit CD8⁺ pada kelompok infiltrasi levobupivakain lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi levobupivakain. Nilai rerata rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ pada kelompok infiltrasi levobupivakain lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi levobupivakain.

Tabel 4. Uji normalitas rerata skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺

Variabel	<i>p</i>		Keterangan
	K1 (n = 5)	K2 (n = 5)	
CD8 ⁺	0,08*	0,01*	Tdk Normal
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,20*	0,52*	Normal

Uji Shapiro-Wilk **p*>0,05

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Distribusi data skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ diuji menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena sesuai untuk uji non parametrik dengan jumlah sampel kecil ($n < 30$). Data CD8⁺ pada K1 (tanpa levobupivakain) terdistribusi normal ($p = 0,08$), sedangkan pada K2 (dengan levobupivakain) terdistribusi normal ($p = 0,01$). Data rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ pada kedua kelompok terdistribusi normal (K1, $p = 0,20$ dan K2, $p = 0,52$).

Tabel 5. Uji beda skor histologi antar kelompok data CD4⁺, CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺

Variabel	K1 (n = 5)	K2 (n = 5)	p
	Rerata±Simpang baku	Rerata±Simpang baku	
CD8 ⁺	6,040±0,5727	4,960±0,2191	0,008*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,518±0,1003	2,570±0,1700	0,009*

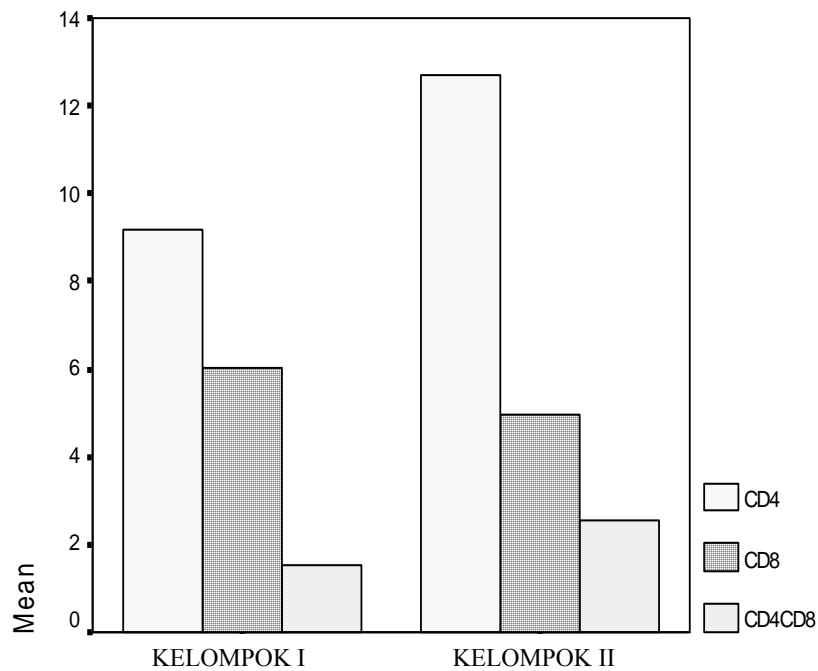
Mann-Whitney U Test ($P < 0,05$). Data dinyatakan dalam rerata±simpang baku.

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ pada kedua kelompok, dilakukan uji beda antar kelompok menggunakan *Mann-Whitney U Test* karena sesuai untuk data non parametrik dengan dua variabel.

Skor histologi CD8⁺ pada kelompok infiltrasi anestetik lokal levobupivakain lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain, secara statistik berbeda bermakna ($p = 0,008$).

Rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ pada kelompok infiltrasi anestetik lokal levobupivakain lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain, secara statistik berbeda bermakna ($p=0,009$).



Gambar 3. Diagram nilai rerata skor histologi CD4⁺, CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ antar kelompok.

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Tabel 6. Analisis hubungan skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ antar kelompok.

Korelasi <i>Spearman</i>	<i>p</i>	[r]
CD8 ⁺ - CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,04	-0,817

* $p < 0,05$

[r] : koefisien korelasi rho

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Dari tabel hubungan skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ diketahui koefisien korelasi $r=-0,817$. Hasil ini berarti hubungan skor histologi CD8⁺ dan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ termasuk hubungan negatif dan terdapat korelasi kuat. Bila terdapat penurunan skor histologi CD8⁺ akan diikuti peningkatan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺. Derajat kemaknaan $p=0,004$, berarti hubungan skor histologi CD8⁺ dengan rasio skor histologi CD4⁺/CD8⁺ secara statistik bermakna.

BAB VI

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa skor histologi sel CD8⁺ pada jaringan sekitar luka dapat dipengaruhi oleh pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain, perbedaan secara statistik bermakna yaitu $p=0,008$, artinya bahwa kandungan sel CD8⁺ pada kelompok perlakuan (levobupivakain) lebih rendah dibanding kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain (kontrol). Rasio skor histologi sel CD4⁺/CD8⁺ juga terdapat peningkatan pada kelompok perlakuan dibanding kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain ($p=0,009$). Penelitian ini menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ dan peningkatan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺.

Nyeri merupakan pencetus stres dan dapat mempengaruhi kondisi imunologi. Beberapa penelitian melaporkan akibat dari stres terhadap jumlah subset limfosit dan fungsinya. Perubahan-perubahan yang konsisten dilaporkan selama stres termasuk didalamnya adalah meningkatnya sel NK perifer, dan sel T supresor dan sitotoksik (CD8⁺), serta menurunnya rasio CD4⁺/CD8⁺. Pada penelitian dengan blok epidural terdapat penurunan jumlah kotekolamin plasma, yang merupakan refleksi dari efek blok terhadap sistem saraf simpatis dan menurunnya stres akibat nyeri.¹⁶ Berkurangnya nyeri karena efek dari infiltrasi levobupivakain dapat menurunkan stres akibat nyeri yang akan tercermin dari

menurunnya skor histologi limfosit CD8⁺ dan meningkatkan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺.

Anestetik lokal diharapkan mampu mengurangi intensitas nyeri dengan menghambat impuls transmisi. Nyeri, terutama pada nyeri hebat, sinyal berjalan melewati aksis HPA (*Hipotalamus-Pituitaria-Adrenal*), menimbulkan disregulasi sistem imun berakibat terjadi penurunan ketahanan tubuh yang dapat menghambat penyembuhan luka. Impuls nyeri yang dihambat oleh anestetik lokal pada jalur transmisi bersifat lebih terkendali, tidak bersifat darurat, sehingga katekolamin dilepas dalam kadar normal dan tidak menimbulkan respon stres berlebihan, dimana jumlah glukokortikoid (kortisol) dalam dosis tidak tinggi. Kadar kortisol yang tidak tinggi tersebut tidak lagi menimbulkan supresi atau inhibisi tetapi berubah menimbulkan stimulasi atau eksitasi terhadap sistem imun.^{1,33}

Pada hewan percobaan yang dilakukan deplesi limfosit T, terjadi penghambatan proses penyembuhan luka (**Barbul**, 1990). Limfosit CD4⁺ (sel Thelper) dan CD8⁺ (sel Tsitotoksik), pembagian fungsinya mengikuti aturan dari keseimbangan respon imun. Terbukti hubungan yang relevan pada proses penyembuhan luka hewan percobaan, bahwa limfosit CD8⁺ menghambat penyembuhan luka dan limfosit CD4⁺ mendorong penyembuhan luka dalam model penyembuhan tikus *in vitro*.³⁴ Dukungan terhadap percobaan ini berupa penelitian pada manusia selama satu minggu setelah pembedahan, bila ditemukan peningkatan level sel-sel CD4⁺ dibandingkan dengan kenaikan jumlah sel-sel CD8⁺, akan terjadi dengan segera penutupan luka (**Boyce et al**, 2000).³⁵ Penelitian

lain menunjukkan depleksi limfosit CD4⁺ memperlihatkan penurunan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Sedangkan depleksi limfosit CD8⁺ memperlihatkan kenaikan yang signifikan terhadap kekuatan, kekenyalan dan kekerasan jaringan luka. Dapat disimpulkan bahwa depleksi limfosit T pada penyembuhan luka pada subset terdapat pengaturan yang berlawanan, yaitu CD8⁺ merupakan *downregulator of wound healing* sedangkan CD4⁺ merupakan *upregulator of wound healing*.^{8,9}

Bukti yang didapat pada penelitian ini sesuai dengan teori maupun penelitian yang pernah dilakukan. Berkurangnya efek dari nyeri karena infiltrasi levobupivakain terbukti menimbulkan perubahan respon imunologi terhadap subset limfosit yaitu penurunan skor histologi sel CD8⁺ dan peningkatan rasio skor histologi sel CD4⁺/CD8⁺ yang juga dapat mencerminkan perbaikan luka.

Skor histologi limfosit CD4⁺ dan CD8⁺ dan rasio skor histologi sel CD4⁺/CD8⁺ tidak selalu mencerminkan perbaikan luka. Pada penderita kanker rasio skor histologi sel CD4⁺/CD8⁺ dapat bervariasi.⁴¹ Tingginya jumlah limfosit CD4⁺ dan CD8⁺ juga dapat dipengaruhi oleh penyakit-penyakit lain seperti pada pasien dengan penyakit infeksi (seperti : *Kawasaki disease, infectious mononucleosis, chronic viral hepatitis, AIDS*), keganasan hematologi (contoh : *hairy cell leukaemia, childhood acute lymphoblastic leukaemia*), kelainan limfoma (contoh : *non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease*) dan kondisi autoimun (contoh : *rheumatoid arthritis, polymyalgia rheumatica, autoimmune hepatitis, systemic lupus erythematosus, insulin-dependent diabetes mellitus*). Biasanya tingginya CD8⁺ berhubungan dengan penyakit yang telah lanjut dan prognosis

yang buruk.⁴⁴ Pada pasien dengan penyakit keganasan lambung yang lanjut, ditemukan menurunnya jumlah limfosit CD4⁺ dan tingginya jumlah limfosit CD8⁺ dan menurunnya rasio limfosit CD4⁺/CD8⁺.⁴⁵ Pada penelitian ini, bias tersebut dicoba dihilangkan dengan kriteria eksklusi berupa adanya kelainan anatomis, sakit dan infeksi pada tikus percobaan saat masa adaptasi sampai sebelum dilakukan biopsi.

Berdasar analisis uji korelasi *Spearman* menunjukkan hubungan yang kuat antara penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ dan peningkatan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺. Dari tabel hubungan skor histologi limfosit CD8⁺ terhadap rasio CD4⁺/CD8⁺ diketahui $p=0,004$. Hasil ini berarti antara CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ terdapat hubungan yang signifikan. Koefisien korelasi $r=-0,817$ menunjukkan korelasi negatif kuat, berarti hubungan antara CD8⁺ dan rasio CD4⁺/CD8⁺ secara statistik bermakna. Hasil korelasi negatif ini berarti hubungan kedua variabel berlawanan, artinya apabila terjadi penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ akan diikuti kenaikan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺.

Rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ merupakan perbandingan antara skor histologi limfosit CD4⁺ dengan skor histologi limfosit CD8⁺. Peran skor histologi limfosit CD4⁺ sangat besar terhadap rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺. Pada tesis ini, skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini. Pada penelitian tersebut, terdapat perbedaan yang signifikan antara skor histologi limfosit CD4⁺ pada kelompok kontrol dan perlakuan ($p=0,003$), dimana pada kelompok kontrol (tanpa levobupivakain) skor histologi lebih rendah dibanding kelompok perlakuan (dengan levobupivakain).

Skor histologi limfosit CD4⁺ yang lebih tinggi disertai skor histologi limfosit CD8⁺ yang lebih rendah pada kelompok dengan levobupivakain dalam penelitian ini membuat rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ berbeda bermakna ($p=0,009$), dibandingkan dengan kelompok tanpa levobupivakain (dimana skor histologi limfosit CD4⁺ lebih rendah dan skor histologi limfosit CD8⁺ lebih tinggi). Kedua hal tersebut juga mempengaruhi hubungan antara skor histologi limfosit CD8⁺ dengan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺, sehingga secara statistik bermakna ($p=0,004$).

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

VII.1 Simpulan

1. Terdapat penurunan skor histologi limfosit CD8⁺ pada kelompok infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain.

2. Terdapat peningkatan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺ pada kelompok infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dibandingkan kelompok tanpa infiltrasi anestetik lokal levobupivakain.
3. Terdapat hubungan negatif antara skor histologi limfosit CD8⁺ dengan rasio skor histologi limfosit CD4⁺/CD8⁺.

VII.2 Saran

1. Infiltrasi anestetik lokal levobupivakain dapat menjadi alternatif untuk perbaikan proses penyembuhan luka.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa pemberian infiltrasi anestetik lokal levobupivakain pada sekitar luka insisi memperbaiki proses penyembuhan luka dengan meneliti komponen-komponen imunologi lain yang berpengaruh terhadap proses penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathology basic of disease. 6th ed. Philadelphia : WB Saunders Co, 1999 : p21-201
2. Constantinnides P. General pathobiology. 1st ed. Norwalk Connecticut : Appleton and Lange, 1994 : p173-86
3. Mast AB. Normal wound healing. In : Achauer BM, Eriksson E, eds. Plastic Surgery, Indications, Operations and Outcomes. Mosby : Mosby Inc, 2000 : p37-53

4. Elenkov IJ, Webster E, Torpy DJ, et al. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response : acute and chronic effects. *Annals of the New York academy of sciences* 1999 ; 876 : 1-13. [on line]: URL. <http://annalsnyas.org/cgi/876/1/1>
5. Webster E, Torpy DJ, Elenkov I, et al. Corticotropin releasing hormone and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998 ; 840 : 21-32
6. Pedersen D. Accelerated surgical stay programme. *Annals of Surgery* 1994 ; 219 : 374-81
7. Bardram L, Funch-Jensen P, Kehlet H. Recovery after laparoscopic colonic surgery with epidural analgesia and early oral nutrition and mobilisation. *Lancet* 1995 ; 345 : 763-4
8. Boyce DE, Jones WD, Ruge F. The Role of Lymphocytes in Human Dermal Wound Healing. *Aidline national library of medicine* 2000 Jul; 143 (1): 59-65. <http://www.aegis.com/aidline/2000/nov/A00B1207.html>
9. Davis PA, Corless DJ, Aspinal R, Wastell C. Effect of CD4(+) and CD8(+) cell depletion on wound healing. *Departement of Academic Surgery, Imperial College School of Medicine, Chelsea and Westminster Hospital, London, UK. Br J Surg.* 2001 Feb;88(2):298-304. peteralexanderdavis@yahoo.com
10. Christie JM, Chen GW. Secondary hyperalgesia is not affected by wound infiltration with bupivacaine. *Can J of An* 1993 ; 40 : 1034-7
11. Pettersson N, Berggren P, Larsson M, et al. Pain relief by wound infiltration with bupivacaine or high dose ropivacaine after inguinal hernia repair. *Reg Anesth Pain Med* 1999 ; 24 : 569-75
12. Bultmann M, Streich R, Risse A, et al. Postoperative analgesia in children after hernioplasty, wound infiltration with different concentrations of bupivacaine : a pilot study (German). *Anaesthesist* 1999 ; 48 : 439-43
13. Vintar N, Pozlep G, Rawal N, et al. Incisional self-administration of bupivacaine or ropivacaine provides effective analgesia after inguinal hernia repair. *Can J Anaesth* 2002 ; 49: 481-6

14. Anonymous. Wound healing. [on line]: URL. <http://www.orthoteers.co.uk/Nrujp-ij33lm/orthwound.htm>
15. Rossenberg PH, Renkonen OV. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. *Anesthesiology* 1985 ; 62 : 178-9
16. Hideki N, Masataka Y. Stellata Ganglion Block Modifies the Distribution of Lymphocyte subsets and Natural-Killer Cell Activity. *Anesthesiology* 2000; 92: 109-15
17. Motomu S, Kikumi H. The Influence of Surgical Stress on T-Cells: Enhancement of Early Phase Lymphocyte activation. *Anesthesia and Analgesia* 1998; 87:1431-5
18. Galindo MA. Levobupivacain, a long acting local anaesthetic, with less cardiac and neurotoxicity. [on line]: URL. <http://www.ndaa.ox.ac.uk/wfsa/html/u14/u1407-01.html>
19. Doctor's guide. Chirocaine anesthetic use to post op pain management. Global edition. 2000. [on line]: URL. <http://www.pslgroup.com/dg/195B36.htm>
20. Stoelting RK. Local Anesthetics. In : Stoelting RK. *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. 3rd ed. Philadelphia : JB Lippincott, 1999 : p45-67
21. Field HL. *Pain*. 1st ed. New York : Mc Graw Hill book Co, 1987 : p1-51
22. Devor M. Pain mechanism and pain syndrome. In : Campbell JN. *Pain* 1996 an update review. Seattle : IASP press, 1996 : p103-12
23. Raymond RG, William GB. Pain management. In : Morgans GE, Mikhail MS, eds. *Clinical anesthesiology*. 1st ed. New Jersey : Prentice hall int. Inc, 1992 : p269-73
24. Melzacks R, Wall P. The gate control theory of pain. In : Melzacks R, Wall P. *The challenge of pain*. 1st ed. Penguin education, 1984 : p223-61
25. Pleuvry BJ. The chemical modulation of nociceptive responses and pain. In : Healy TEJ, Cohen PJ, eds. *A Practice of anesthesia*. 6th ed. London : Edward Arnold, 1995 : p80-8

26. Cervero F. Mechanism of visceral pain, past and present. In : Gebhart GF. ed. Visceral pain, progress in pain research and management. Seattle : IASP press, 1995 ; 5 : p469-88
27. Bonica JJ. Anatomic and physiologic basis of pain, nociception and pain. In : Bonica JJ. ed. The management of pain. Pennsylvania : Lea and Febiger, 1990 : p12-28
28. Notosoedirdjo M. Nyeri dan tatalaksana penanggulangannya. Makalah Pertemuan Klinik Ikatan Ahli Kesehatan Jiwa Cabang Surabaya. Malang, 1996
29. Edward W, Hahn CEW, Adams AP. Principle and practice series patients controlled analgesia. London : BMJ Publ group, 1995 : p1-21
30. Mercandetti M, Cohen A. Wound healing, healing and repair. EMedicine. 2002. [on line]: URL. <http://www.eMedicine.com.Inc>
31. Hollmann, Markus W, Durieux E. Local anesthetics and the inflammatory response : A new therapeutic indication?. Anesthesiology 2000 ; 93 : 858-75
32. Rahardjo E. Analgesia pasca bedah, cara invasif atau non invasif, sebuah tinjauan klinis. Surabaya: Instalasi Anestesi dan Reanimasi RSUD Dr Soetomo,1997 : 2-7
33. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Edisi 2. Jakarta : Sagung seto, 2002 : p247-9
34. Moore K. The Scientific Basis of Wound Healing. <http://www.woundscience.com/Scientific%20Basis%20of%20Wound%20Healing%20-%204.htm>
35. Mulyata S: Paket Penyuluhan Kognitif dan Senam Prapersalinan Pada Primigravida, Mengurangi Cemas dan Nyeri Persalinan, Meningkatkan Skor Apgar Bayi, Serta Mempercepat Penyembuhan Luka Persalinan . Disertasi S3 Universitas Airlangga Surabaya. 2002: 122-4
36. Kresno SB. Imunologi, diagnosis dan prosedur laboratorium. 4th ed. Jakarta : Balai penerbit FK UI, 2003 : p4-32
37. Roitt I, Kekebalan Dapatan Spesifik. Dalam : Imunologi. Edisi 8. Jakarta : Widya Medika, 2002 : p31-2

38. Baratawidjaja KG, Sistem Imun. Dalam : Imunologi Dasar. Edisi 4. Jakarta : FKUI 2000 : p3-21
39. Roitt, Brostoff, Male. Cells, tissue and organ of the immune system. In : Immunology. 6th ed. London : Mosby 2001 : p15-45
40. Masataka Y, Yoshitaro I. The effects of Epidural Block on the Distribution of Lymphocyte subsets an Natural-Killer cell Activity in Patients with and without Pain. Anesthesia and Analgesia 2001; 92:463-9
41. Sevcikova L; Hunakova L. T-lymphocyte subsets (CD4/CD8 ratio) in breast cancer patients. Neoplasma 1992;39(4):219-22
42. Natalie Gava, Christine L. Expression of Progesterone Receptors A and B in the Mouse Ovary during the Estrous Cycle. Endocrinology 2004;145(7):3487-94
43. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York : 1993 : p40-4
44. Grunewald W, Fiedler GM. Soluble CD-4 and CD-8 as markers of immunological activation in renal transplant recipients Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 71-77
<http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/content/full/15/1/71>
45. Chung HW. The activity of immunologic cells from peripheral blood, splenic venous blood and spleen in patients with advanced gastric cancer. A comparative study 1992;30(12):713-77

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data berat badan dan dosis levobupivakain

Data berat badan dan dosis levobupivakain		
Kelompok	Berat badan (gram)	Dosis levobupivakain (mg)
1	260	3276.00

1	270	3402.00
1	248	3124.80
1	249	3137.40
1	250	3150.00
2	243	3061.80
2	256	3225.60
2	258	3250.80
2	262	3310.20
2	266	3351.60

Lampiran 2. Tabel skor histologi sel limfosit CD4⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima

Skor Histologi Sel CD4⁺		
No	Non Levobupivakain	Levobupivakain
1	10	13
2	8.2	10.4
3	8	13.4
4	9.4	12
5	10.2	14.6

Data primer skor histologi CD4⁺ diambil dari penelitian dr. Andri Setiabudi tentang limfosit CD4⁺ memakai hewan coba yang sama dengan penelitian ini.

Lampiran 3. Tabel skor histologi sel limfosit CD8⁺ dalam jaringan sekitar luka pada penelitian tikus Wistar hari kelima

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

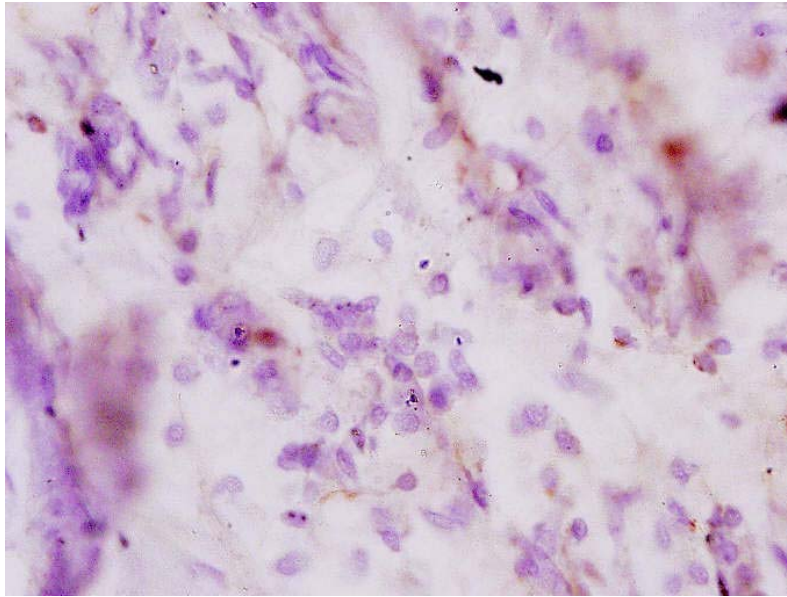
Korelasi			CD8	CD4/CD8
Spearman's rho	CD8	Correlation Coefficient	1.000	-.817
		Sig. (2-tailed)	.	.004
		N	10	10
CD4/CD8	CD4/CD8	Correlation Coefficient	-.817	1.000
		Sig. (2-tailed)	.004	.
		N	10	10

Lampiran 8. Campuran bahan-bahan pakan standar buatan laboratorium

PAU Pangan dan Gizi UGM (Prof. Dr.Hastari,DVM., MSc) :

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

Lampiran 9.



Gambar 3. Gambaran limfosit CD8+ hasil pewarnaan jaringan berdasar imunohistokimia *mouse monoclonal antibody (MoAb) anti CD8+*

