



Tesis - SB185401

**Analisis *In Vivo* Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik
Cellobiose Dehydrogenase sebagai Penyembuh Luka Akut
Terinfeksi *Staphylococcus aureus***

M. AINUL MAHBUBILLAH
NRP. 01311650010001

DOSEN PEMBIMBING
Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si, M. T.
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si, M.Si

**PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

Analisis In Vivo Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik *Cellobiose Dehydrogenase* sebagai Penyembuh Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus*

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh
M. Ainul Mahbubillah
NRP. 01311650010001

Tanggal Ujian: 1 Februari 2019
Periode Wisuda: Maret 2019


Disetujui oleh:

1. **Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M. T.**
NIP. 19731014 200012 1 001
2. **Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si**
NIP. 19700621 199802 2 001
3. **Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, S.Si., M.Sc.**
NIP. 19771224 200801 1 006
4. **Dr. Enny Zulaika, M.P.**
NIP. 19600109 198803 2 000


(Pembimbing I)


(Pembimbing II)


(Penguji I)


(Penguji II)


Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Dekan

Prof. Dr. Agus Rubiyanto, M. Eng Sc
NIP. 196506051989031003

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

Analisis *In Vivo* Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik *Cellobiose Dehydrogenase* sebagai Penyembuh Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus*

Nama Mahasiswa : M. Ainul Mahbubillah, S.Si
ID Mahasiswa : 01311650010001
Pembimbing : Dr.tech. Endry Nugroho Prasetyo, M. T.
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si

ABSTRAK

Luka dapat menyebabkan gangguan pada fungsi dan struktur anatomi tubuh. Luka akut dapat melakukan proses penyembuhan lebih cepat dari pada luka kronis. Luka akut yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menjadi kronis karena mekanisme infeksi dari bakteri tersebut. Hidrogel penutup luka berbasis enzimatik *cellobiose dehydrogenase* (CDH) diusulkan sebagai sistem regenerasi antioksidan yang menangkal *reactive oxygen species* pada luka dan menyuplai hidrogen peroksida untuk menangkal infeksi mikroba dengan reaksi yang dikatalisasi oleh CDH. Enzim CDH, pada penelitian ini, diproduksi oleh kapang *Trametes versicolor* dalam kultur produksi dengan berbagai variasi substrat. Variasi substrat yang paling baik dalam menghasilkan enzim CDH adalah tissue toilet. Hidrogel penutup luka berbasis enzimatis didukung dengan matriks κ -karaginan dan disiapkan dalam 3 lapis mengandung CDH pada lapis 1, laktosa pada lapis 2, dan CDH dan asam galat pada lapis 3. Aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatis CDH pada luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus* tidak memberikan pengaruh yang signifikan dalam penutupan luka dibandingkan dengan kontrol hidrogel asam galat dan hidrogel kosong. Kontrol tanpa hidrogel memiliki penutupan luka yang lebih cepat secara signifikan terhadap perlakuan hidrogel penutup luka. Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada hari ke-12 pada masing-masing perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan namun hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH memiliki kecenderungan penyembuhan dermal dan epidermal yang lebih baik dari perlakuan kontrol.

Kata kunci: *cellobiose dehydrogenase*, hidrogel penutup luka, luka akut, *Staphylococcus aureus*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

In Vivo Analysis of Enzymatic Based Wound Dressing Hydrogel of Cellobiose Dehydrogenase for the Healing of *Staphylococcus aureus* Acute Infected Wound

Student Name : M. Ainul Mahbubillah, S.Si
Student ID : 01311650010001
Supervisor : Dr.tech. Endry Nugroho Prasetyo, M. T.
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si

ABSTRACT

Wounds cause interference on the body's anatomical functions and structures. Acute wounds heal faster than chronic wounds. Acute wounds, that infected by the *Staphylococcus aureus* bacteria, could become chronic due to the mechanism of infection of the bacteria. An enzymatic based wound dressing hydrogel of cellobiose dehydrogenase (CDH) have proposed as an antioxidant regeneration system that counteracts reactive oxygen species in the wounds and supplies hydrogen peroxide to counteract microbial infections with reactions catalyzed by CDH. The CDH enzyme, in this study, was produced by *Trametes versicolor* mold in the production culture with several substrate variations. The best substrate to produces the CDH enzyme is toilet paper. Enzymatic based wound dressing hydrogels supported by κ -carrageenan matrices and prepared in 3 layers containing CDH at layer 1, lactose at layer 2, and CDH and gallic acid at layer 3. The application of enzyme based wound dressing hydrogels of CDH in the acute non-infectious wounds and acute wounds infected with *S. aureus* did not have a significant effect on the wound closure compared to control of gallic acid hydrogels and empty hydrogels. Control without hydrogels had significantly faster wound closure on the wound hydrogel treatment of the wound. Assessment of epidermal and dermal healing on day 12 of each treatment showed no significant difference, but enzymatic-based wound dressing hydrogel CDH had a better tendency of dermal and epidermal healing than control treatment.

Keywords: acute wound, cellobiose dehydrogenase, *Staphylococcus aureus* wound dressing hydrogel.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **Analisis *In Vivo* Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik *Cellobiose Dehydrogenase* sebagai Penyembuh Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus*** di Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Tak lupa penulis sampaikan penghargaan dan rasa terima kasih kepada semua pihak atas saran dan masukannya dalam melaksanakan penyusunan tesis sehingga dapat terselesaikan dengan baik dan tepat waktu, khususnya kepada Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi ITS, Dr. Enny Zulaika, M.P. selaku Ketua Prodi S2 Biologi ITS dan dosen penguji, Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si, M.T. dan Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing, serta Dr.rer.nat. Edwin Setiawan, S.Si., M.Sc. selaku dosen penguji.

Dalam penulisan tesis ini penulis menyadari akan adanya kekurangan-kekurangan akibat dari keterbatasan pengetahuan penulis. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran membangun dari semua pihak untuk dapat lebih baik di masa yang akan datang. Akhirnya kami mengharapkan semoga tesis ini bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, 1 Februari 2019

Penulis

“halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan.....	3
1.3. Batasan Masalah	3
1.4. Tujuan	3
1.5. Manfaat	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	
2.1 Luka.....	5
2.1.1 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	6
2.1.2 Infeksi Bacteri pada Luka.....	8
2.2 Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik CDH.....	9
2.2.1 Enzim <i>Cellobiose Dehydrogenase</i>	11
2.2.2 Imobilisasi Enzim	13
2.2.3 Asam galat	15
BAB III METODA PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alur Penelitian	17
3.3 Produksi Enzim <i>Cellobiose Dehydrogenase</i> (CDH)	17
3.3.1 Peremajaan Isolat Kapang <i>Trametes versicolor</i>	17
3.3.2 Optimasi Produksi Enzim <i>Cellobiose Dehydrogenase</i>	18
3.3.3 Uji Aktivitas <i>Cellobiose Dehydrogenase</i>	19
3.3.4 Uji Kandungan Protein	20
3.3.5 Pengukuran Aktivitas Enzim dengan Berbagai Konsentrasi Substrat	21
3.4 Persiapan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.5 Fabrikasi Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik	22
3.5.1 Pengujian Hidrogel dengan menggunakan larutan DCIP dan NaF	24

3.6	Persiapan Hewan Uji	24
3.7	Pembuatan Luka Akut Non-infeksi dan Luka Akut Terinfeksi	
	<i>S. aureus</i>	25
3.7.1	Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-0.....	26
3.7.2	Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-4 dan ke-8.....	26
3.7.3	Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-12.....	26
3.8	Progresi Luka.....	27
3.9	Analisa Histologi	27
3.10	Desain Penelitian	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Optimasi Produksi Enzim <i>Cellobiose Dehydrogenase</i>	29
4.2	Fabrikasi Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik <i>Cellobiose Dehydrogenase</i>	33
4.3	Luka Akut Non-infeksi dan Luka Akut Terinfeksi <i>Staphylococcus aureus</i> pada Hewan Uji <i>Mus musculus</i>	34
4.4	Penutupan Luka pada Luka Akut Non-infeksi	37
4.4.1	Penilaian Epidermal dan Dermal Luka Akut Non-infeksi.....	39
4.5	Penutupan Luka pada Luka Akut Terinfeksi <i>Staphylococcus aureus</i> ...	42
4.5.1	Penilaian Epidermal dan Dermal Luka Akut Terinfeksi <i>Staphylococcus aureus</i>	44
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan.....	47
5.2	Saran	47
DAFTAR PUSTAKA.....		49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Komposisi Media Produksi	18
Tabel 3.2 Komposisi Larutan <i>trace metal solution</i>	19
Tabel 3.3 Komposisi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH, hidrogel asam galat, dan hidrogel	22
Tabel 3.4 Tabel jenis luka dan perlakuan hidrogel penutup luka.....	25
Tabel 3.5 Penilaian skor untuk penyembuhan dermal dan epidermal.....	27
Tabel 4.1 Konsentrasi protein dan aktivitas spesifik ekstrak enzim kasar CDH pada berbagai variasi substrat pada hari ke 14.....	30
Tabel 4.2 Gambar dan luas luka hari ke-0 pada luka akut non-infeksi	35
Tabel 4.3 Gambar dan luas luka hari ke-0 pada luka akut terinfeksi <i>S. aureus</i>	35

“Halaman sengaja dikosongkan”.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Skema hidrogel penutup luka berbasis enzimatik.....	11
Gambar 2.2 Struktur kimia asam galat	16
Gambar 4.1 Grafik aktivitas ekstrak enzim kasar CDH pada medium produksi setiap hari inkubasi kultur <i>T. versicolor</i>	29
Gambar 4.2 Kecepatan reaksi ekstrak enzim kasar CDH TIS pada berbagai konsentrasi substrat laktosa.....	32
Gambar 4.3 Fabrikasi hidrogel penutup luka.....	33
Gambar 4.4 Kondisi ruang pemeliharaan hewan uji.....	34
Gambar 4.5 Grafik pengukuran berat badan pada masing-masing perlakuan ...	36
Gambar 4.6 Persentase luasan luka akut non-infeksi pada hewan uji yang diamati pada hari ke-0, 4, 8, dan 12.	37
Gambar 4.7 Gambaran jaringan histologis pada luka akut non-infeksi pada hari ke-12	40
Gambar 4.8 Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada luka akut non-infeksi hari ke-12	41
Gambar 4.9 Persentase luasan luka terinfeksi <i>S. aureus</i> pada hewan uji yang diamati pada hari ke 0, 4, 8, dan 12.	42
Gambar 4.10 Gambaran jaringan histologis pada luka akut terinfeksi <i>S. aureus</i> pada hari ke-12	45
Gambar 4.11 Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada luka akut terinfeksi <i>S. aureus</i> hari ke-12	46

“Halaman sengaja dikosongkan”.

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Keterangan kelaikan etik penelitian.....	61
Lampiran 2. Diagram alur penelitian	62
Lampiran 3. Kurva standar <i>2,6-dichlorophenol indophenol</i> (DCIP)	63
Lampiran 4. Perhitungan aktivitas enzim <i>cellobiose dehydrogenase</i> (CDH)	64
Lampiran 5. Kurva standar <i>bovine serum albumin</i> (BSA).....	67
Lampiran 6. Pengukuran konsentrasi protein ekstrak enzim kasar CDH.....	68
Lampiran 7. Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH (substrat TIS) pada berbagai konsentrasi substrat laktosa	69
Lampiran 8. Hidrogel penutup luka	70
Lampiran 9. Pengujian hidrogel pada larutan DCIP	71
Lampiran 10. Konfirmasi jumlah bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	72
Lampiran 11. Perawatan hewan uji	73
Lampiran 12. Berat badan selama aklimatisasi	74
Lampiran 13. Dokumentasi pembuatan luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi <i>S. aureus</i>	75
Lampiran 14. Pengukuran berat badan selama perlakuan	77
Lampiran 15. Uji ANOVA One-way persentase berat badan	79
Lampiran 16. Data gambar pengukuran luas luka.....	81
Lampiran 17. Pengukuran luasan luka akut non-infeksi dan terinfeksi <i>S. aureus</i>	89
Lampiran 18. Uji Tukey persentase luas luka	91
Lampiran 19. Data preparat histologis hari ke 12	92
Lampiran 20. Penilaian epidermal dan dermal.....	96
Lampiran 18. Uji non-parametrik Kruskal-Wallis penilaian epidermal dan dermal	97

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka dapat menyebabkan gangguan pada fungsi dan struktur anatomi tubuh (Morris *et al.*, 2000). Berdasarkan waktu dan proses penyembuhannya, luka dapat diklasifikasikan menjadi luka akut dan kronik. Luka akut merupakan cedera jaringan yang dapat pulih kembali seperti keadaan normal dengan bekas luka yang minimal dalam rentang waktu 8-12 minggu (Baxter, 1990). Sementara luka kronis merupakan luka dengan proses pemulihan yang lambat, dengan waktu penyembuhan lebih dari 12 minggu dan terkadang dapat menyebabkan kecacatan (Kaplan *et al.*, 1984). Proses fisiologis dalam penyembuhan luka melalui empat tahap yang tumpang tindih, yaitu: tahap hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling (Eming *et al.*, 2014). Pada fase inflamasi, sel-sel fagositik seperti neutrofil dan makrofag bekerja secara dominan. Neutrofil melepaskan ROS dan protease yang mencegah kontaminasi bakteri dan membersihkan luka dari puing-puing seluler. Monosit darah tiba di lokasi luka dan berdiferensiasi menjadi makrofag jaringan. Makrofag tidak hanya menghilangkan bakteri dan jaringan non viabel oleh fagositosis namun juga berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin yang merekrut fibroblas, sel endotel, dan keratinosit untuk memperbaiki pembuluh darah yang rusak (Falanga *et al.*, 2005).

Luka yang terinfeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menjadi kronis jika infeksi tersebut dibiarkan terlalu lama sehingga membentuk biofilm (Lister *et al.*, 2014; Wolcott *et al.*, 2008). Toksin α dapat secara langsung melisis sel inang, termasuk makrofag yang berada pada ruang perivaskular (ruang antarsel di sekitar pembuluh darah) kulit, yang berujung pada kegagalan atau penundaan perekrutan sel-sel polimorfonuklear (Abtin *et al.*, 2014). Kegagalan sel-sel polimorfonuklear menuju ruang perivaskular menyebabkan terhambatnya penghasilan hidrogen peroksida untuk menangkal infeksi yang masuk pada luka

(Dunnill *et al.*, 2017). Sedangkan biofilm akan dapat menghindarkan bakteri dari serangan sel imun ataupun dari paparan antibiotik (Wolcott *et al.*, 2008).

Kegagalan dalam fase inflamasi akan menyebabkan luka dalam fase inflamasi berkepanjangan yang membentuk kronisitas luka. Luka yang kronis juga membentuk *reactive oxygen spesies* (ROS) yang merusak protein matriks ekstraselular dan menyebabkan kerusakan sel (Schreml *et al.*, 2010). ROS merupakan molekul O_2 biradikal yang beracun terutama bila diubah menjadi radikal superoksida ($\cdot O_2^-$) yang dianggap sebagai ROS utama dalam sistem biologis. Radikal bebas tersebut merupakan produk sampingan dari metabolisme aerobik normal, namun produksinya relatif meningkat selama infeksi (Schäfer *et al.*, 2008).

Penyembuhan luka kronis dapat berhasil jika tercapai keseimbangan fisiologis yang serupa dengan luka akut yang memiliki kondisi fase penyembuhan normal. Penggabungan sistem pengaisan atau pemadaman secara kontinyu untuk ROS dan RNS ke dalam sistem regenerasi antioksidan telah dilakukan dan penghasilan terus menerus H_2O_2 dari hidrogel penutup luka berbasis enzimatis *cellobiose dehydrogenase* (CDH) telah diteliti (Nyanhongo *et al.*, 2013). Senyawa antioksidan fenolik tumbuhan dapat diregenerasi kembali setelah mengais ROS dari luka dan dapat dikembalikan ke bentuk asal secara terus-menerus dengan bantuan laktosa sebagai elektron donor (Ludwig *et al.*, 2010). Sementara penghasilan terus menerus H_2O_2 dapat berfungsi sebagai antibakteria melalui reaksi fenton dan pembentukan biofilm oleh bakteri (Nyanhongo *et al.*, 2013). Perlu dibuktikan apakah sistem regenerasi antioksidan ini efektif digunakan secara *in vivo*. Penggunaan hewan uji *Mus musculus* yang dilukai secara akut dan diinfeksi dengan *S. aureus* merupakan langkah penting untuk meninjau efektivitas penggunaan sistem regenerasi antioksidan ini.

1.2. Permasalahan

Permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah substrat yang optimum dalam kultur produksi enzim *cellobiose dehydrogenase* oleh kapang *Trametes versicolor*.
2. Apakah aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik dapat menyembuhkan luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus*.
3. Adakah perbedaan jaringan kulit dari masing-masing perlakuan pada luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus* setelah aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik pada hari ke-12.

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini meliputi:

1. Enzim *cellobiose dehydrogenase* diproduksi dari kapang *Trametes versicolor*.
2. Produksi enzim *cellobiose dehydrogenase* dilakukan dengan variasi substrat: karboksi metil selulosa, laktosa, Metolose (metil selulosa), tissue toilet Nice, Vitacel (kristal selulosa), dan kertas saring Whatman No. 1.
3. Jenis luka yang dipakai adalah luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *Staphylococcus aureus*.
4. Kontrol yang digunakan sebagai pembanding dalam perlakuan hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH adalah hidrogel asam galat, hidrogel kosong, dan tanpa hidrogel.

1.4. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui substrat yang optimum dalam kultur produksi enzim *cellobiose dehydrogenase* oleh kapang *Trametes versicolor*.
2. Mengetahui efek aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik dalam menyembuhkan luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus*.
3. Mengetahui perbedaan histologis jaringan kulit dari luka luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus* setelah aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik pada hari ke-12.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan alternatif dalam penanganan dan pengobatan luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *S. aureus* dalam dunia medis dengan menggunakan aplikasi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik *cellobiose dehydrogenase* (CDH).

BAB II

KAJIAN PUSTAKA DAN

DASAR TEORI

2.1. Luka

Luka merupakan suatu bentuk kerusakan jaringan pada kulit yang disebabkan kontak dengan sumber panas (seperti bahan kimia, air panas, api, radiasi, dan listrik), hasil tindakan medis, maupun perubahan kondisi fisiologis. Luka menyebabkan gangguan pada fungsi dan struktur anatomi tubuh (Morris *et al.*, 2000). Berdasarkan waktu dan proses penyembuhannya, luka dapat diklasifikasikan menjadi luka akut dan kronis.

Luka akut merupakan cedera jaringan yang dapat pulih kembali seperti keadaan normal dengan bekas luka yang minimal dalam rentang waktu 8-12 minggu. Penyebab utama dari luka akut adalah cedera mekanikal karena faktor eksternal, dimana terjadi kontak antara kulit dengan permukaan yang keras atau tajam, luka tembak, dan luka pasca operasi. Penyebab lain luka akut adalah luka bakar dan cedera kimiawi, seperti terpapar sinar radiasi, tersengat listrik, terkena cairan kimia yang bersifat korosif, serta terkena sumber panas (Baxter, 1990).

Sementara luka kronis merupakan luka dengan proses pemulihan yang lambat, dengan waktu penyembuhan lebih dari 12 minggu dan terkadang dapat menyebabkan kecacatan. Ketika terjadi luka yang bersifat kronis, neutrofil dilepaskan dan secara signifikan meningkatkan ezim kolagenase yang bertanggung jawab terhadap destruksi dari matriks penghubung jaringan (Kaplan *et al.*, 1984). Salah satu penyebab terjadinya luka kronis adalah kegagalan pemulihan karena kondisi fisiologis (seperti diabetes melitus (DM) dan kanker), infeksi terus-menerus, dan rendahnya tindakan pengobatan yang diberikan (Baxter, 1990).

Proses fisiologis dalam penyembuhan luka melalui empat tahap yang tumpang tindih, yaitu: tahap hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling (Eming *et al.*, 2014). Hemostasis terjadi sesaat setelah cedera dan dikarakterisasi dengan vasokonstriksi dan penggumpalan darah, yang mencegah kehilangan darah dan memberikan matriks sementara untuk migrasi sel. Trombosit mensekresi faktor pertumbuhan sitokin dan menarik sel fibroblast, sel endotel, dan sel imun untuk proses penyembuhan. Fase inflamasi berikutnya berlangsung hingga 7 hari. Sel predominan yang bekerja pada fase ini adalah sel fagositik, seperti neutrofil dan makrofag. Neutrofil melepaskan ROS dan protease yang mencegah kontaminasi bakteri dan membersihkan luka dari puing-puing seluler. Monosit darah tiba di lokasi luka dan berdiferensiasi menjadi makrofag jaringan. Makrofag tidak hanya menghilangkan bakteri dan jaringan non viabel oleh fagositosis namun juga berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin yang merekrut fibroblas, sel endotel, dan keratinosit untuk memperbaiki pembuluh darah yang rusak. Fase proliferasi dimulai karena fase inflamasi mereda dengan apoptosis sel imun. Fase ini dicirikan dengan granulasi jaringan, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan epitelisasi. Luka sudah dalam kondisi tertutup pada fase yang terakhir ini dan bisa berlangsung 1-2 tahun atau lebih. Matriks sementara diubah menjadi kumpulan kolagen yang terorganisir (Falanga *et al.*, 2005).

2.1.1. *Reactive Oxygen Species (ROS)*

Lingkungan hipoksia dan inflamasi luka kronis yang dominan meningkatkan produksi *reactive oxygen species* ROS, yang merusak protein matriks ekstraselular dan menyebabkan kerusakan sel (Schreml *et al.*, 2010). ROS merupakan molekul O_2 biradikal yang beracun terutama bila diubah menjadi radikal superoksida ($\cdot O_2^-$) yang dianggap sebagai ROS utama dalam sistem biologis. Radikal $\cdot O_2^-$ secara spontan terdismutasi menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) pada larutan berair, sementara dengan adanya logam, misalnya tembaga dan besi radikal, H_2O_2 dan $\cdot O_2^-$ menghasilkan radikal hidroksil ($OH\cdot$). $\cdot O_2^-$ juga bereaksi dengan oksida nitrat ($\cdot NO$) untuk menghasilkan *reactive nitrogen species* (RNS) misalnya peroksinitrit ($ONOO^-$), sebuah oksidan kuat

yang mengoksidasi biomolekul. Meskipun radikal bebas (ROS dan RNS) ini merupakan produk sampingan dari metabolisme aerobik normal, dan produksinya relatif meningkat selama infeksi (Schäfer *et al.*, 2008). kelebihan produksi yang secara terus-menerus merupakan faktor utama yang menyebabkan luka dalam keadaan kronis. Hal tersebut karena radikal bebas ini terus mengoksidasi biomolekul yang baru disintesis pada luka kronis dan juga bertindak sebagai promotor respons proinflamasi.

Cedera menyebabkan pembentukan awal ROS dengan adanya *NADH-dependent oxidases* (NOX) yang terikat pada membran vaskular yang diproduksi oleh sel endotel dan fibroblas (Roy *et al.*, 2006). ROS diperlukan untuk pertahanan terhadap patogen yang menyerang dan tingkat ROS yang rendah bertindak sebagai mediator penting sinyal intraselular yang mengarah pada penyembuhan yang tepat (Sen *et al.*, 2008). Namun, produksi ROS yang tidak terkontrol sesaat setelah cedera menyebabkan proses detoksifikasi yang berubah akibat pengurangan produksi dan aktivitas antioksidan (Droge, 2002). Studi telah membuktikan bahwa ulkus yang tidak tersembuhkan pada manusia memiliki stres oksidatif dan stres nitrosatif yang tinggi (Yang *et al.*, 2013). Selanjutnya, hipoksia jaringan serta glikolisis anaerobik, berkontribusi pada produksi laktat dan akumulasinya di bawah kondisi peradangan (Britland *et al.*, 2012), bahkan pada luka yang teroksidasi dengan baik (Hopf *et al.*, 2007), ketika jumlah neutrofil tinggi (Fazli *et al.*, 2011), laktat dan ROS meningkat secara signifikan akibat glikolisis aerobik - yang disebut "efek Warburg" (Warburg, 1956). Lingkungan ini menyebabkan fase inflamasi stagnan. Jika sel-sel inflamasi tidak dikeluarkan dari jaringan luka, sel tersebut dapat meningkatkan kerusakan jaringan lebih lanjut melalui produksi sitokin, protease, dan intermediet oksigen reaktif yang berlebihan, dan peningkatan kematian sel, sehingga mengakibatkan pengembangan jaringan granulasi abnormal dan menyebabkan luka dengan gangguan penyembuhan (McCarty *et al.*, 2012).

Nitrat oksida (NO) juga memainkan peran kunci dalam perbaikan luka (Schäfer *et al.*, 2008). Efek menguntungkan NO pada perbaikan luka berkaitan dengan fungsinya dalam angiogenesis, peradangan, proliferasi sel, deposisi matriks, dan

remodeling. Namun, tingkat NO tinggi yang dihasilkan oleh nitrat oksida sintase inducibel (iNOS) yang dapat menghasilkan peroxynitrite (ONOO₂), spesies nitrogen reaktif (RNS). ONOO₂ menyebabkan kerusakan DNA, lipid dan protein yang selalu menyebabkan apoptosis sel dan/atau nekrosis tergantung pada konsentrasinya pada lokasi cedera (Abd-El-Aleem *et al.*, 2000).

2.1.2. Infeksi Bakteri pada Luka

Bakteri merupakan salah satu penyebab dari infeksi pada luka. Luka dapat terkolonisasi oleh bakteri dari kulit di sekitar luka, lingkungan sekitar, dan sumber endogen dalam tubuh pasien. Kolonisasi didefinisikan sebagai adanya proliferasi bakteri tanpa respon inang yang nyata. Kolonisasi luka dapat meningkatkan atau menghambat penyembuhan luka, tergantung pada jumlah bakteri. Jumlah bakteri yang melebihi 10⁵ organisme/gram jaringan dianggap menghambat penyembuhan luka, walaupun ambang batas ini dapat diubah oleh status sistem imun inang dan jumlah dan jenis spesies bakteri yang ada (Kingsley, 2003). Dalam beberapa kasus, kolonisasi sebenarnya dapat mempercepat penyembuhan luka. Telah diusulkan bahwa inflamasi lokal dapat meningkatkan perfusi dasar luka, yang menyebabkan penyembuhan lebih cepat (Laato *et al.*, 1988).

Staphylococcus aureus diidentifikasi sebagai salah satu bakteri yang menyusun agregat dari luka kronis (Fazli *et al.*, 2009). Luka yang disebabkan oleh *S. aureus* dapat menjadi kronis jika infeksi tersebut dibiarkan terlalu lama sehingga membentuk biofilm (Lister *et al.*, 2014; Wolcott *et al.*, 2008) dan mengeluarkan faktor virulensi berupa toksin α (atau yang biasa diketahui sebagai haemolisin α) yaitu toksin pembentuk pori yang dapat melisiskan sel inang (Berube *et al.*, 2013). Hal ini akan memicu luka untuk menjadi lebih parah (Wardenburg *et al.*, 2007). Toksin α dapat secara langsung melisiskan makrofag yang berada pada ruang perivaskular (ruang antarsel di sekitar pembuluh darah) kulit, yang berujung pada kegagalan atau penundaan perekrutan sel-sel polimorfonuklear (Abtin *et al.*, 2014). Kegagalan sel-sel polimorfonuklear menuju ruang perivaskular menyebabkan terhambatnya penghasilan

hidrogen peroksida untuk menangkal infeksi yang masuk pada luka (Dunnill *et al.*, 2017). Sedangkan biofilm akan dapat menghindarkan bakteri dari serangan sel imun ataupun dari paparan antibiotik (Wolcott *et al.*, 2008).

Biofilm bakteri dalam kesehatan merupakan penyebab lebih dari 65% infeksi nosokomial dan 80% infeksi mikroba (Singh *et al.*, 2011). Keterlibatan mereka di mana-mana dalam peradangan kronis seperti otitis media, infeksi luka, dan infeksi saluran kemih (Ramakrishnan *et al.*, 2013) dan resistensi yang timbul dari infeksi yang persisten ini terhadap agen antimikroba konvensional (Singh *et al.*, 2011) membuat pencarian metode pengobatan baru sangat penting. Pembentukan biofilm pada permukaan selalu mengikuti prosedur lima langkah yaitu:

1. perlekatan reversibel bakteri planktonik pada permukaan,
2. perlekatan irreversibel pada permukaan,
3. pertumbuhan dan pembelahan bakteri,
4. pembentukan matriks eksternal dan pembentukan biofilm, dan
5. biofilm membentuk struktur tiga dimensi (Chen *et al.*, 2008).

2.2. Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik CDH

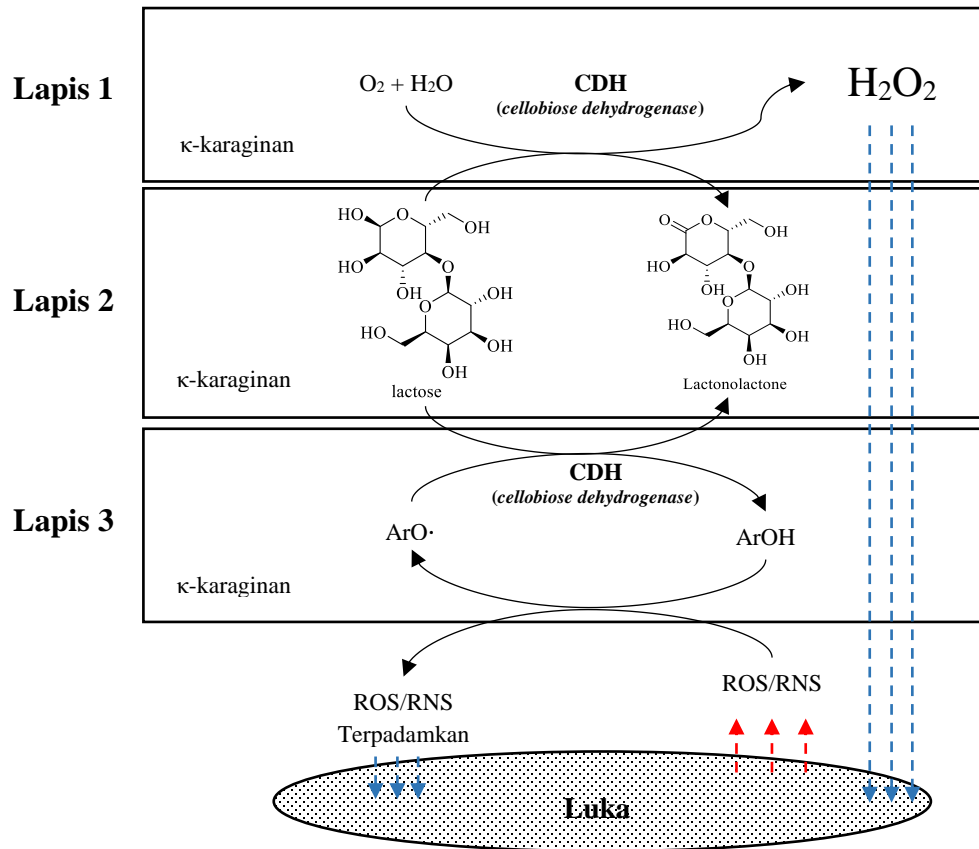
Hidrogel adalah jaringan polimerik tiga dimensi yang saling berikatan yang dibuat dari pengikatan secara fisik maupun kimawi. Hidrogel mampu menyerap dan menahan air dalam jumlah besar tanpa terjadi kebocoran (Singh *et al.*, 2018). Hidrogel memiliki sifat khusus yaitu sensitif terhadap lingkungan fisiologis, bersifat hidrofilik, jaringannya yang lunak, dan memiliki fleksibilitas yang baik. Hal tersebut menjadikan hidrogel sangat baik sebagai kandidat untuk aplikasi biomedis. Hidrogel dapat mengembang dan menyusut secara reversibel, hal tersebut menunjukkan bahwa hidrogel sangat responsif terhadap rangsangan lingkungan tertentu seperti suhu, pH, dan kekuatan ionik. Oleh karena respons fisiologis hidrogel yang bagus terhadap perubahan variabel fisiologis, maka hidrogel dapat bermanfaat jika digunakan dalam aplikasi biomedis (Sood *et al.*, 2014). Hidrogel yang digunakan sebagai penutup luka polimerik dapat memfasilitasi penyembuhan pasien luka tekan dengan

mempromosikan epitelisasi yang lebih cepat (Sood *et al.*, 2014). Sehingga kesembuhan dengan hidrogel sebagai penutup luka dapat mencapai 85%, dibandingkan kesembuhan yang hanya 50% dengan menggunakan pembalut kasa tradisional (Sood *et al.*, 2014; Stashak *et al.*, 2004).

Hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH telah dikembangkan dengan menggabungkan senyawa antioksidan fenolik dan selobiosa ke dalam hidrogel alginat dan/atau gelatin, sehingga menciptakan polimer responsif multifungsi untuk penanganan luka kronis. Hidrogel tersebut mempromosikan penyembuhan luka kronis dari dua sudut, yaitu: CDH yang dimasukkan ke dalam hidrogel secara terus menerus untuk menghasilkan antioksidan setelah mereka memadamkan radikal yang diproduksi dalam luka. Bersamaan dengan itu, produksi H_2O_2 terus menerus mencegah kolonisasi mikroba hidrogel dan akibatnya dari luka. Dalam sistem ini, CDH dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas putida* (Nyanhongo *et al.* 2013a).

Enzim CDH yang dipadukan dengan senyawa antioksidan fenolik tumbuhan menjadi hidrogel penutup luka dapat menjamin pasokan antioksidan yang terus-menerus. Sistem ini dirancang agar molekul antioksidan fenolik dapat memadamkan ROS dan RNS ($\cdot O_2^-$, $\cdot OH$, $\cdot NO$, dll.). Antioksidan fenolik yang teroksidasi kemudian direduksi kembali menjadi senyawa induk aslinya oleh CDH dengan menggunakan selobiosa sebagai donor elektron (Nyanhongo *et al.*, 2013). Pada penelitian ini, asam galat digunakan sebagai antioksidan fenolik yang dapat memadamkan ROS (Trilaksani, 2003) dengan menggunakan laktosa sebagai sebagai donor elektron. Sistem ini didukung dengan menggunakan κ -karaginan sebagai agen imobilisasi enzim pembentuk hidrogel. Hidrogel penutup luka berbasis enzimatik ini akan secara konsisten memadamkan radikal bebas, mencegah oksidasi biomolekul yang baru disintesis, menekan ekspresi respons proinflamasi yang terus-menerus, dan juga mencegah akumulasi fenolik teroksidasi. Hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH dapat menghasilkan H_2O_2 secara terus menerus yang berfungsi sebagai

antibakteri dan penghambat pembentukan biofilm (Gambar 2.1) (Nyanhongo *et al.*, 2013).



Gambar 2.1. Skema hidrogel penutup luka berbasis enzimatik. Senyawa fenolik asam sinapat ($ArOH$) akan memadamkan ROS dan RNOS yang berasal dari eksudat luka kronis sehingga menjadi fenolik radikal ($ArO\cdot$). Senyawa $ArO\cdot$ kemudian dikembalikan menjadi $ArOH$ dengan bantuan CDH menggunakan selulosa sebagai akseptor elektron. Sistem ini didukung pula dengan imobilisasi pada matriks κ -karaginan menjadi hidrogel penutup luka.

2.2.1. Enzim *Cellobiose Dehydrogenase*

Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18, CAZy AA 3.1) adalah flavositokrom ekstraselular yang diproduksi oleh sejumlah jamur pendegradasi kayu, ketika bahan selulosa digunakan sebagai sumber karbon (Cameron *et al.*, 2000). Studi terbaru menunjukkan bahwa fungsi fisiologis CDH adalah mendonorkan elektron ke

litik polisakarida monooksidase terkait Cu (LPMO) (Correa *et al.*, 2016). Sistem oksidatif CDH/LPMO meningkatkan tingkat degradasi kristal selulosa, dan tersebar luas di seluruh kingdom fungi bersamaan dengan sifat hidrolitik terhadap selulosa yang telah dikenal dengan baik (Beeson *et al.*, 2015). CDH adalah enzim monomer yang termasuk dalam familia oksidoreduktase glukosa-metanol-kolin (GMC) (Zamocky *et al.*, 2004). Enzim ini terdiri dari domain katalitik flavodehydrogenase (DH) besar yang mengandung satu ikatan non kovalen flavin adenine dinucleotide (FAD). DH terhubung ke sebuah elektron yang mentransfer domain sitokrom yang mengandung heme b (CYT) oleh sebuah linker panjang dan fleksibel yang diperkaya dengan asam amino hidroksi. Struktur kristal dan cair dari CDH yang baru saja dilaporkan menunjukkan interaksi dinamis antara DH dan CYT. CYT bertindak sebagai domain mobile yang mereduksi sisi aktif tembaga LPMO (Tan *et al.*, 2015).

Struktur yang rumit membuat CDH menjadi enzim yang sulit diproduksi. Analisis filogenetik sekuens CDH dari berbagai sumber fungi menunjukkan pembagian enzim ke dalam tiga kelas yang berbeda: kelas I hanya mewakili CDH basidiomisetata, yang memiliki sekuens lebih pendek dan memiliki sekuens linker yang sangat lestari; kelas II secara eksklusif terdiri dari CDH ascomyceta yang lebih kompleks, baik dengan atau tanpa modul pengikat karbohidrat tipe-1, sesuai dengan kelas IIA dan IIB. Kelas III berisi cabang yang berbeda dari CDH yang tidak dikarakterisasi (Harreither *et al.*, 2011).

CDH adalah satu-satunya flavositokrom ekstraselular yang diketahui saat ini, yang menggunakan berbagai substrat oligosakarida sebagai donor elektron (selobiosa, laktosa, triosa, dan banyak fragmen selulosa) untuk mengurangi radikal fenoksi struktural yang sangat beragam, senyawa radikal atau kuinon (akseptor elektron) (Ludwig *et al.*, 2010). Sifat transfer elektron fleksibel dari CDH dieksploitasi untuk banyak aplikasi bioteknologi termasuk pengembangan biosensor untuk mendeteksi selodekstrin (Hilden *et al.*, 2004), maltosa (Harreither *et al.*, 2007), laktosa (Safina *et al.*, 2010), senyawa difenol (Rabinovich *et al.*, 2007), dan katekolamin (dopamin,

adrenalin dan noradrenalin) (Stoica *et al.*, 2006). CDH telah dilaporkan dapat terus meregenerasi substrat teroksidasi lakase (Ludwig *et al.*, 2004).

CDH telah diisolasi dan dicirikan dari berbagai jamur pembusuk putih, jamur pembusuk lunak, dan jamur pembusuk coklat (Baminger *et al.*, 2001). Sebagian besar penelitian CDH sebelumnya telah dilakukan pada jamur pembusuk putih *Phanerochaete chrysosporium* (Bao *et al.*, 1994). Enzim CDH yang dihasilkan oleh *T. versicolor* memiliki bobot molekul sekitar 79324 Da untuk bentuk kompleks sedangkan domain flavinnya memiliki bobot molekul sekitar 58393 Da (Dumonceaux *et al.*, 1998), pI sebesar 4.2, pH optimum 5 dengan temperatur optimum sebesar 50 °C (Roy *et al.*, 1996). Enzim CDH yang diproduksi oleh *T. versicolor* diketahui efektif mendegradasi senyawa kompleks (selulosa, hemiselulosa, dan lignin) yang banyak terdapat pada tanaman (Eriksson *et al.*, 1990). Secara *in vivo*, fungsi enzim ini tidak terlalu jelas, namun CDH terlibat dalam proses degradasi dua biopolimer, yaitu selulosa dan lignin. CDH dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan bantuan H_2O_2 , menghasilkan hidroksi radikal yang sangat reaktif menyerang lignin dan selulosa (Henriksson *et al.*, 1995).

2.2.2. Imobilisasi Enzim

Dalam komersialisasi enzim, faktor reusabilitas mereka menjadi sangat diperlukan karena dianggap kurang ekonomis. Pemeliharaan stabilitas struktural enzim selama reaksi biokimia sangat diperlukan. Akibatnya, enzim terimobilisasi dengan efisiensi fungsional dan peningkatan reproduktifitas digunakan sebagai alternatif walaupun harganya mahal. Imobilisasi biokatalis dapat berupa enzim atau sel utuh (Kawaguti *et al* 2006). Imobilisasi enzim adalah penahanan enzim ke dalam fase (matriks/pendukung) yang berbeda dari substrat dan produk. Polimer inert dan bahan anorganik biasanya digunakan sebagai matriks pembawa. Selain terjangkau, matriks ideal harus mencakup karakteristik seperti keinertan, kekuatan fisik, stabilitas, kemampuan regenerabilitas, kemampuan untuk meningkatkan spesifisitas/aktivitas

enzim dan mengurangi penghambatan produk, adsorpsi nonspesifik dan kontaminasi mikroba (Singh, 2009).

Imobilisasi menghasilkan operasi ekonomi, otomatisasi, rasio/kapasitas investasi yang berkelanjutan dan pemulihan produk dengan kemurnian yang lebih besar (D'souza, 1999). Metode adsorpsi atau *carrier binding* menggunakan karier yang tidak larut dalam air seperti turunan polisakarida, polimer sintesis dan kaca (Cordeiro *et al.*, 2011). Dalam metode *cross-linking* atau secara kovalen, telah digunakan pereaksi dua fungsi atau multifungsi seperti glutaraldehid, bisdiazobenzidin dan heksametilena diisosianat (Singh, 2009). Polimer seperti kolagen, selulosa dan κ -karaginan dapat digunakan dalam metode jebakan, sedangkan metode jebakan membran meliputi formulasi liposom dan mikrokapsul (Klein *et al.*, 2011). κ -karaginan telah digunakan untuk imobilisasi enzim dan sel dengan menggunakan teknik jebakan.

Karaginan termasuk familia galactan linier hidrofilik yang diekstraksi dari berbagai spesies alga merah laut. κ -karaginan, yang dibedakan oleh struktur utamanya, adalah salah satu karaginan dan terdiri dari α (1-3)-D-galaktosa-4-sulfat dan β (1-4)-3,6-anhidro-D-galaktosa. Zat ini mempunyai satu gugus sulfat per unit disakarida pada karbon nomor 2 yang terhubung dari unit galaktosa. Konstanta $4C^1$ unit 3,6-anhidro-D-galaktosa memungkinkan struktur sekunder helicoidal, yang penting untuk pembentukan gel (Liu *et al.*, 2016).

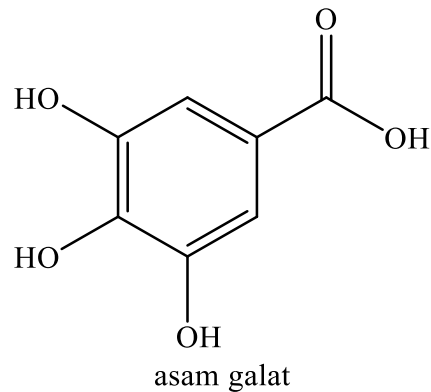
Secara umum, gelasi κ -karaginan akan dicapai dengan dua langkah: transisi coil-helix kemudian diikuti dengan agregasi heliks (Shchipunov, 2003). κ -karaginan adalah polion dan sangat sensitif terhadap keberadaan garam karena kation mempengaruhi transisi coil-helix dan agregasi heliks. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa kation monovalen dapat mengikat heliks, yang akan mendorong agregasi heliks. Misalnya, Michel *et al.*, mengkonfirmasi interaksi antara ion kalium dan κ -karaginan seperti ion potassium dapat mengikat heliks κ -carrageenan untuk mengurangi densitas muatan heliks (Michel *et al.*, 1997). Kehadiran kation monovalen umumnya memfasilitasi transisi coil-helix dan kemudian mendorong agregasi heliks (atau transisi sol-gel). Akibatnya, suhu pembentukan gel dan kekuatan gel pada

keadaan stabil meningkat dengan meningkatnya konsentrasi kation monovalen (Liu *et al.*, 2016).

Sejumlah penelitian juga telah dilakukan untuk menguji pengaruh kation divalen terhadap κ -karaginan dalam larutan berair. Hermansson *et al.*, menemukan bahwa pembentukan dan struktur mikro hidrogel κ -karagenan sangat bergantung pada kation divalen dibandingkan dengan kation monovalen (Hermansson *et al.*, 1991). Baru-baru ini, MacArtain *et al.*, menemukan bahwa penambahan kation kalsium dengan konsentrasi rendah (pada rasio molar stoikiometrik perkiraan ion Ca^{2+} terhadap gugus sulfat) dapat meningkatkan agregasi heliks dimana G' meningkat dengan meningkatnya konsentrasi kalsium kation. Tapi, konsentrasi kalsium kation yang tinggi menyebabkan penurunan G' secara signifikan (MacArtain *et al.*, 2003). Morris dkk. berpikir bahwa penurunan G' dengan adanya kation berlebihan harus dikaitkan dengan pembentukan struktur jaringan yang tidak homogen (Morris *et al.*, 1980). Efek sinergis diamati dengan menambahkan campuran ion K^+ dan ion Ca^{2+} ke dalam larutan κ -karagenan (Nguyen *et al.*, 2014). Semua penelitian ini menunjukkan bahwa gelasi κ -karaginan dalam air dengan adanya kation divalen adalah proses yang rumit.

2.2.3. Asam Galat

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini bersifat multifungsional karena dapat bereaksi sebagai penangkap radikal bebas, pengkelat logam dan peredam terbentuknya singlet oksigen (Trilaksani, 2003). Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang memiliki ciri yang sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1989).



Gambar 2.2. Struktur kimia asam galat (Fukumoto *et al.*, 2000).

Asam galat (3,4,5-asam trihidroksi benzoat) merupakan senyawa fenolik golongan asam fenolat, yaitu senyawa fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil (Gambar 2.2). Asam galat merupakan salah satu senyawa aktif yang banyak dimanfaatkan di bidang medis. Senyawa ini terdapat sebagai metabolit sekunder pada tanaman (Vazirian *et al.*, 2011). Asam galat memiliki aktivitas antijamur, antivirus, memiliki kemampuan sitotoksik melawan sel kanker tanpa merusak sel tubuh lainnya, antioksidan dan agen antikarsinogenik (Sohi *et al.*, 2003; Nutan *et al.*, 2013 dan Chia *et al.*, 2010). Senyawa ini juga merupakan trifenol yang biasa terdapat pada daun teh dalam bentuk teresterifikasi bersama dengan katekin (Ho *et al.*, 1992).

BAB III

METODA PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2018 hingga bulan Januari 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, dan Laboratorium Zoologi dan Bioteknologi Hewan Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Prosedur penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Laik Etik dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga *Animal Care and Use Committee* dengan No. 3.KE.111.07.2018 (Lampiran 1).

3.2. Alur Penelitian

Alur penelitian dibagi menjadi 4 bagian, yaitu:

1. Tahap pra-penelitian
2. Tahap persiapan
3. Tahap penelitian
4. Tahap pasca penelitian

Diagram alur penelitian disajikan pada Lampiran 2.

3.3. Produksi Enzim *Cellobiose Dehydrogenase*

3.3.1. Peremajaan Isolat Kapang *Trametes versicolor*

Isolat kapang *Trametes versicolor* diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Media *potato dextrose agar* (PDA) dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 3,9 gram bubuk *potato dextrose broth* (PDB) dan 1,5 gram agar ke dalam 100 ml akuades. Larutan dipanaskan dengan *hot plate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, selama

15 menit. Media PDA yang telah steril ditambahkan dengan 0,002 gr kloramfenikol dan dicawakan pada cawan Petri hingga memadat. Peremajaan isolat kapang *T. versicolor* dilakukan dengan memindahkan 1 ose isolat pada cawan Petri berisi PDA padat steril dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari (Tien *et al.*, 1988).

3.3.2. Optimasi Produksi Enzim *Cellobiose Dehydrogenase*

Enam buah media produksi dengan 6 jenis substrat yang berbeda disiapkan (Tabel 3.1). Jenis substrat yang dipakai yaitu karboksi metil selulosa, laktosa, metil selulosa (Metolose), tisu toilet Nice (diproduksi oleh PT. The Univenus Cikupa, Tangerang, Banten), kristal selulosa (Vitacel), dan kertas saring Whatman No. 1. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, selama 15 menit. Sebanyak 2×2 cm potongan PDA yang telah ditumbuhi koloni kapang *T. versicolor* diambil dan dimasukkan ke dalam 100 ml media produksi. Diinkubasi dengan *rotary shaker* dengan kecepatan 160 rpm pada suhu ruang (pH 6,5). Kultur dipanen setiap hari sebanyak 1 ml dari hari ke-2 hingga hari ke-14 untuk mendapatkan data aktivitas enzim setiap hari inkubasi kultur. Kultur dipanen dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dengan menggunakan kertas Whatman no. 1 dan digunakan sebagai ekstrak enzim kasar.

Tabel 3.1 Komposisi media produksi (Roy *et al.*, 1996).

Komposisi	Jumlah per 100 ml
KCl	0,05 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
KH ₂ PO ₄	0,10 gr
<i>Yeast extract</i>	0,01 gr
NH ₄ Cl	0,04 gr
Glukosa	0,05 gr
Substrat	0,45 gr
<i>Trace metal solution</i> (Tabel 3.2)	0,10 ml

Tabel 3.2 Komposisi *trace metal solution* (Roy *et al.*, 1996).

Komposisi	Jumlah (gram/20 ml)
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.1081
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0250
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0288
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.0792
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0286
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.0005
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.0124

3.3.3. Uji Aktivitas *Cellobiose Dehydrogenase*

Uji aktivitas CDH ini diketahui dengan mengukur penurunan absorbansi elektron akseptor terkuat yaitu *2,6-dichlorophenol-indophenol* (DCIP) yang diadopsi dari Sulej *et al.*, (2013). Kurva standar DCIP dibuat dengan mengukur absorbansi DCIP 3 mM (dalam 10% etanol) yang diencerkan dalam akuades hingga menjadi konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, dan 250 μ M. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis dengan panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi yang didapat dibuat dalam bentuk kurva dengan persamaan $y = ax+b$, dimana y merupakan nilai absorbansi, x adalah nilai konsentrasi standar DCIP, dan a merupakan slope dari nilai kurva standar DCIP.

Uji aktivitas CDH dilakukan dengan mereaksikan 1 ml campuran (pH 4,5) yang mengandung 50 μ l DCIP 3 mM (dalam 10% etanol), 100 μ l laktosa 300 mM (dalam 100 mM buffer sodium asetat, pH 4,5), dan 50 μ l NaF 80 mM (dalam akuades). Reaksi dimulai dengan menambahkan enzim CDH sebanyak 10 μ l. Penurunan absorbansi dimonitor setiap detik selama 5 menit menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi yang didapat dibuat dalam bentuk kurva dengan persamaan $y = ax+b$, dimana y merupakan nilai absorbansi, x adalah lama inkubasi (detik), dan a merupakan slope dari uji aktivitas enzim. Perhitungan aktivitas enzim dengan satuan akhir μ M/ml/menit atau U/ml/menit atau U/ml dilakukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mg/menit)} = \frac{\text{Slope uji aktivitas enzim}}{\text{Slope kurva standar DCIP}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{1}{\text{menit}}$$

3.3.4. Uji Kandungan Protein

Karakterisasi CDH dilakukan dengan mengukur kadar protein menggunakan larutan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar pengukuran (Roy, 1996). Reagen dibuat berdasarkan metode Bradford (1976) yaitu 100 mg *Coomasie Brilliant Blue G-250* dilarutkan dengan 50 ml etanol 95% dan ditambahkan 100 ml H₃PO₄ 85%. Campuran dilarutkan dengan akuades hingga mencapai volume akhir 1 liter dan disaring dengan menggunakan kertas Whatman No. 1. Larutan BSA pekat dilarutkan dengan H₂O dengan konsentrasi (w/v) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, dan 1 mg/ml. Sebanyak 0,1 ml dari masing-masing konsentrasi BSA diuji dengan ditambahkan 5 ml reagen Bradford, dihomogenkan menggunakan vortex dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm yang berkisar antara 0,2-0,8. Nilai absorbansi yang didapat dibuat dalam bentuk kurva dengan persamaan $y = ax+b$, dimana y merupakan nilai absorbansi, x adalah nilai konsentrasi standar BSA, dan a merupakan slope dari nilai kurva standar BSA.

Pengukuran kadar protein CDH dilakukan berdasarkan kurva standar BSA yang telah dibuat. Sebanyak 0,1 ml CDH ditambahkan reagen Bradford sebanyak 5 ml, dihomogenkan dengan vortex. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm menggunakan Spektrofotometer UV Vis. Perhitungan konsentrasi protein dengan satuan akhir mg/ml dilakukan dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi protein (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbansi ekstrak enzim pada uji Bradford}}{\text{Slope Kurva standar BSA}}$$

Perhitungan aktivitas spesifik enzim dengan satuan U/mg dilakukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Konsentrasi protein (mg/ml)}}$$

3.3.5. Pengukuran Aktivitas Enzim dengan Berbagai Konsentrasi Substrat

Uji aktivitas CDH dilakukan dengan mereaksikan 1 ml campuran (pH 4,5) yang mengandung 50 µl DCIP 3 mM (dalam 10% etanol), 50µl NaF 80 mM (dalam akuades) dan laktosa 300 mM (dalam 100 mM buffer sodium asetat, pH 4,5) yang dilarutkan hingga konsentrasi 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, dan 120 µM. Reaksi dimulai dengan menambahkan enzim CDH sebanyak 10 µl. Penurunan absorbansi dimonitor setiap detik selama 5 menit menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi yang didapat dibuat dalam bentuk kurva dengan persamaan $y = ax+b$, dimana y merupakan nilai absorbansi, x adalah lama inkubasi (detik), dan a merupakan slope dari uji aktivitas enzim. Perhitungan aktivitas enzim dengan satuan akhir µM/ml/menit atau U/ml/menit atau U/ml dilakukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mg/menit)} = \frac{\text{Slope uji aktivitas enzim}}{\text{Slope kurva standar DCIP}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{1}{\text{menit}}$$

3.4. Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Dua buah tabung reaksi berisi 5 ml Nutrient Agar (NA) di sterilisasi dengan autoklaf 121 °C selama 20 menit. Kemudian dibuat dimiringkan hingga memadat. Kultur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 diinokulasikan pada permukaan agar miring secara penuh secara aseptis. Kultur diinkubasi pada 30-35 °C selama 24 jam. Kultur yang tumbuh pada agar miring ditambahkan 7 ml air salin fisiologis (0,9% NaCl) kemudian dirontokkan dengan menggunakan jarum ose hingga terbentuk suspensi pengenceran awal (10^0). Pengenceran awal diencerkan menjadi 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} dengan menggunakan air salin fisiologis. Tiga pengenceran terakhir (10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9}) dilakukan verifikasi jumlah mikroba dengan melakukan pour plate masing-masing 1 ml dengan 20 ml medium NA pada cawan Petri hingga memadat dan diinkubasi pada 30-35 °C selama 2 hari. Kultur yang telah dilakukan pengenceran disimpan pada suhu 2-8 °C hingga digunakan kembali. Koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter* setelah inkubasi 2 hari. Total koloni yang tumbuh dihitung dengan metode *total plate count* (30-300 cfu/ml) dan

dibagi dengan faktor pengenceran sehingga didapatkan jumlah total bakteri. Bakteri yang telah diketahui jumlahnya diencerkan kembali sehingga didapatkan pengenceran berjumlah 10^6 untuk diambil 10 μ l pada saat perlakuan infeksi pada luka (jumlah 10^4).

3.5. Fabrikasi Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik

Pembuatan hidrogel penutup luka berbasis enzimatik dilakukan berdasarkan metode yang dimodifikasi dari Liu *et al.*, 2016 dan Nyanhongo *et al.*, 2013. Sediaan asam galat dibuat 0,51 mg/ml sehingga dapat diambil 1 ml pada tiap 30 ml hidrogel (konsentrasi akhir 100 μ M asam galat untuk 30 ml larutan atau 0,51 mg/30 ml hidrogel). Sediaan asam galat tersebut difiltrasi menggunakan filter steril 0,2 μ m. Komposisi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH, hidrogel asam galat, dan hidrogel kosong pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Komposisi hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH, hidrogel asam galat, dan hidrogel.

Hidrogel	Lapisan	Volume	Komposisi
Hidrogel berbasis enzimatik CDH	1	30 ml	2% karaginan dalam 28 ml akuades + 2,4 U/ml CDH
	2	20 ml	2% karaginan + 400 μ M laktosa dalam 20 ml akuades
	3	30 ml	2% karaginan dalam 27 ml akuades + 1 ml asam galat 0,51 mg/ml (100 μ M asam galat) + 2,4 U/ml CDH
Hidrogel asam galat	-	30 ml	2% karaginan dalam 29 ml akuades + 1 ml asam galat 0,51 mg/ml (100 μ M asam galat)
Hidrogel kosong	-	30 ml	2% karaginan dalam 30 ml akuades

Hidrogel berbasis enzimatik CDH dibuat dengan menyiapkan 28 ml akuades (lapis 1), 20 ml 400 μ M laktosa (lapis 2), dan 27 ml akuades (lapis 3), hidrogel antioksidan dibuat dengan menyiapkan 29 ml akuades, dan hidrogel kosong dibuat dengan menyiapkan 30 ml, masing-masing pada labu Erlenmeyer 50 ml. Larutan tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf 121 $^{\circ}$ C selama 20 menit. Karaginan ditimbang 2 % untuk masing-masing lapisan (600 mg untuk larutan dengan volume 30

ml dan 400 mg untuk larutan dengan volume 20 ml). Karaginan dimasukkan pada masing-masing larutan dan dipanaskan pada *hot plate* dan diaduk secara manual dengan menggoyangkan labu Erlenmeyer secara berkala hingga larut sempurna. Larutan dikondisikan pada waterbath suhu 45 °C.

Larutan hidrogel berbasis enzimatik CDH lapis 3 ditambahkan 1 ml sediaan asam galat (0,51 mg/ml), 2 ml enzim CDH, dan 0,12 ml CaCl₂ 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 30 ml hidrogel), kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri (diameter 15 cm, diameter dalam bagian bawah 13,56 cm) sebelum terjadi penggumpalan. Larutan hidrogel berbasis enzimatik CDH lapis 2 ditambahkan 0,08 ml CaCl₂ 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 20 ml hidrogel) kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri di atas hidrogel lapis 3 sebelum terjadi penggumpalan. Larutan hidrogel berbasis enzimatik CDH lapis 3 ditambahkan dengan 2 ml enzim CDH dan 0,12 ml CaCl₂ 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 30 ml hidrogel), kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri di atas hidrogel berbasis enzimatik CDH lapis 2 sebelum terjadi penggumpalan. Hidrogel berbasis enzimatik CDH dibiarkan mengeras pada suhu kamar. Hidrogel kemudian dicetak menggunakan mulut tabung reaksi (diameter 1 cm) dan dipindahkan dengan pinset pada cawan Petri diameter 5 cm. hidrogel disimpan dalam suhu 4-8 °C.

Larutan hidrogel asam galat ditambahkan dengan 1 ml sediaan asam galat (0,51 mg/ml) dan 0,12 ml CaCl₂ 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 30 ml hidrogel), kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri (diameter 15 cm, atau diameter dalam bagian bawah 13,56 cm) sebelum terjadi penggumpalan. Hidrogel kemudian dicetak menggunakan mulut tabung reaksi (diameter 1 cm) dan dipindahkan dengan pinset pada cawan Petri diameter 5 cm. hidrogel disimpan dalam suhu 4-8 °C.

Larutan hidrogel asam galat ditambahkan dengan 1 ml sediaan asam galat (0,51 mg/ml) dan 0,12 ml CaCl₂ 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 30 ml hidrogel), kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri

(diameter 15 cm, atau diameter dalam bagian bawah 13,56 cm) sebelum terjadi penggumpalan. Hidrogel kemudian dicetak menggunakan mulut tabung reaksi (diameter 1 cm) dan dipindahkan dengan pinset pada cawan Petri diameter 5 cm. hidrogel disimpan dalam suhu 4-8 °C.

Larutan hidrogel kosong ditambahkan dengan 0,12 ml CaCl_2 100 mM steril (konsentrasi akhir 0,4 mM dalam 30 ml hidrogel), kemudian diaduk merata dan segera dilakukan penuangan pada cawan Petri (diameter 15 cm, atau diameter dalam bagian bawah 13,56 cm) sebelum terjadi penggumpalan. Hidrogel kemudian dicetak menggunakan mulut tabung reaksi (diameter 1 cm) dan dipindahkan dengan pinset pada cawan Petri diameter 5 cm. hidrogel disimpan dalam suhu 4-8 °C.

3.5.1. Pengujian hidrogel dengan menggunakan larutan DCIP dan NaF

Pengujian ini dimulai dengan menyiapkan larutan yang setiap miliiter mengandung 50 μl DCIP 3 mM (dalam 10% etanol) dan 50 μl NaF 80 mM (dalam akuades) yang dilarutkan dalam akuades. Hidrogel yang telah dibuat, meliputi hidrogel berbasis enzimatik CDH, hidrogel asam galat, dan hidrogel kosong, ditetesi dengan 500 μl larutan DCIP dan NaF tersebut. Perubahan warna yang terjadi pada masing-masing hidrogel diamati setelah 2 jam. Larutan yang telah ditetaskan pada hidrogel diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan pada tabung Durham dan diamati perubahan warnanya.

3.6. Persiapan hewan uji

Mencit (*Mus musculus*) didapatkan dari PUSVETMA dan ditempatkan masing-masing dalam 1 kandang dan setiap kandang diberi identitas. Mencit dirawat dengan pakan Charoen Phokphand 511, air minum PDAM, dan alas serbuk gergaji. Kandang dengan kondisi ruangan terpapar udara luar dengan pembuangan udara yang selalu aktif. Mencit diaklimatisasi pada lingkungan uji dan kondisi kandang dijaga kebersihannya dengan mengganti *bedding* dan pakan setiap 1 minggu sekali. Untuk

memantau kesehatan mencit selama aklimatisasi, dilakukan penimbangan berat badan setiap 1 minggu sekali.

3.7. Pembuatan Luka Akut Non-infeksi dan Luka Akut Terinfeksi *S. aureus*

Mencit terlebih dahulu dilakukan penggundulan pada bagian dorsal hingga ventral dengan menggunting sebagian rambut hingga ketebalan \pm 3 mm. Rambut yang telah dicukur diolesi dengan krim perontok bulu (Veet) hingga merata dengan menggunakan spatula. Krim dibiarkan hingga tidak lebih dari 6 menit untuk menghindari iritasi (catatan: setelah aplikasi Veet ini tidak boleh dilakukan pengolesan ulang). Krim dibersihkan dengan menggunakan tisu atau lap basah kemudian dikeringkan dengan tisu atau lap kering. Mencit ditimbang berat badan sebelum dilakukan pelukaan.

Mencit diberikan anestesia dengan menggunakan Ketamin 44 mg/kg berat badan secara *intramuscular*. Bagian dorsal mencit dilap dengan alcohol 70%. Kulit ditusuk dengan *biopsy punch* 5 mm kemudian bagian yang tercetak dilakukan eksisi dengan bantuan gunting dan pinset hingga terbentuk luka. Jenis luka dan perlakuan ditunjukkan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4. Tabel jenis luka dan perlakuan hidrogel penutup luka.

No.	Jenis Luka	Perlakuan	Penggantian Hidrogel
1	Non-infeksi	Hidrogel berbasis enzimatik CDH	7 hari
2	Non-infeksi	Hidrogel asam galat	7 hari
3	Non-infeksi	Hidrogel kosong	7 hari
4	Non-infeksi	Tanpa hidrogel	-
5	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel berbasis enzimatik CDH	7 hari
6	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	7 hari
7	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	7 hari
8	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	-

3.7.1. Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-0

Luka diambil gambar untuk pengukuran luas luka dengan skala menggunakan mistar untuk pengukuran luka pada hari ke 0. Perlakuan dengan jenis luka akut terinfeksi *S. aureus* ditambahkan 10 µl suspensi *S. aureus* secara topikal berjumlah 10^6 segera setelah pelukaan. Sedangkan perlakuan dengan jenis luka akut non-infeksi tidak menggunakan perlakuan topikal *S. aureus* (Tabel 3.4). Hidrogel berbasis enzimatis, hidrogel asam galat, atau hidrogel kosong diaplikasikan segera setelah pelukaan dengan menempelkan lapisan hydrogel berdiameter 1 cm pada permukaan luka kemudian ditutup dengan perban yang terdiri dari plester Hypafix, kapas steril, dan plester Leukoplast. Mencit ditandai nomor perlakuan pada perban bagian punggung, ditimbang berat badannya, kemudian ditempatkan pada *heating pad* hingga pulih sebelum dikembalikan pada kandang.

3.7.2. Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-4 dan ke 8

Pengukuran luas luka pada hari ke-4 dan ke-8 dilakukan dengan membuka perban, kemudian diletakkan mistar disamping luka untuk pembandingan ukuran kemudian dilakukan pengambilan gambar yang digunakan untuk mengukur luasan penutupan luka. Hidrogel penutup luka diaplikasikan dan diperban kembali.

3.7.3. Aplikasi Hidrogel Penutup Luka hari ke-12

Pada hari ke-12 mencit dikurbankan dengan kloroform overdosis. Pengukuran luas luka pada hari ke-12 dilakukan dengan membuka perban, kemudian diletakkan mistar disamping luka untuk pembandingan ukuran kemudian dilakukan pengambilan gambar yang digunakan untuk mengukur luasan penutupan luka. Jaringan luka dilakukan eksisi dengan *biopsy punch* pada luka dengan diameter 10 mm hingga jaringan adiposa dan dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% dalam botol sampel. Jaringan diuji dengan membuat preparat histologis dengan pewarnaan Hematoksin Eosin.

3.8. Progresi luka

Pengukuran luasan luka digunakan software ImageJ yang dikembangkan oleh *National Institutes of Health* (NIH) (Collins, 2007) dan diunduh dari <https://imagej.nih.gov/ij/>. Gambar terlebih dahulu dilakukan *set scale* berdasarkan mistar pembanding pada foto, kemudian dilakukan *crop* pada gambar luka saja. Gambar luka dilakukan *freehand selection* pada tepian luka dan pada akhirnya dapat dilakukan *Measure* atau pengukuran luas pada luka. Persentase luas luka dihitung berdasarkan ukuran awal dan akhir penampakan luar luka:

$$\text{persen luas luka (\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A_t}{A_0}\right) \times 100\%$$

Dimana A_0 adalah luasan awal luka dan A_t adalah luasan luka pada hari pengamatan (Lee *et al.*, 2012).

3.9. Analisa Histologi

Preparat diamati secara mikroskopis dan dinilai pada skala 0-4 untuk penyembuhan epidermal dan penyembuhan dermal pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Penilaian skor untuk penyembuhan dermal dan epidermal (Yates *et al.*, 2007).

Parameter	Penilaian
Penyembuhan epidermal	0 = tidak ada migrasi 1 = migrasi parsial 2 = migrasi lengkap dengan keratinisasi parsial 3 = keratinisasi lengkap 4 = hipertrofi epidermis
Penyembuhan dermal	0 = tidak ada penyembuhan 1 = infiltrasi inflamasi 2 = munculnya jaringan granulasi (fibroplasia dan angiogenesis) 3 = deposisi kolagen yang menggantikan jaringan granulasi > 50% 4 = respon hipertrofi fibrosit

3.10. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian luka akut non-nfeksi dan infeksi *S. aureus* adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Banyaknya pengulangan (replikasi) yang dilakukan pada setiap perlakuan adalah:

$$(T-1)(n-1) \geq 15$$

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$n \geq \frac{22}{7}$$

$$n \geq 3,14$$

Keterangan:

T = jumlah perlakuan

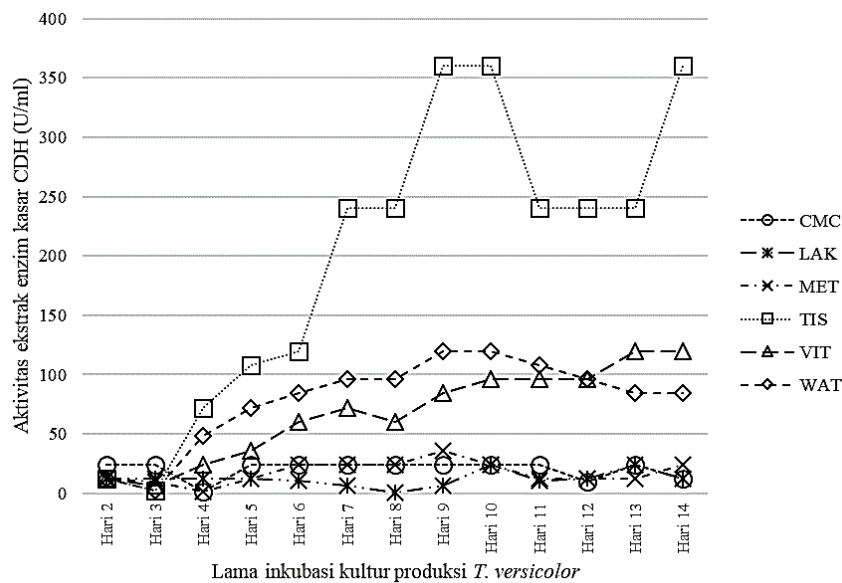
n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan adalah $n \geq 3.14$ sehingga pada penelitian ini dilakukan 4 pengulangan pada setiap perlakuan. Semua nilai dinyatakan sebagai mean \pm SEM. Untuk perbandingan data parametrik, dilakukan analisis ANOVA dengan post-hoc Tukey dengan $p < 0,05$ diakui untuk menunjukkan signifikansi statistik. Untuk data nonparametrik, dilakukan uji Kruskal-Wallis dengan posttest Dunn (Lee *et al.*, 2012).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Optimasi Produksi Enzim *Cellobiose Dehydrogenase*

Ekstrak enzim kasar CDH pada kultur produksi *T. versicolor* dengan enam substrat yang berbeda menunjukkan bahwa pada enzim memiliki aktivitas yang berbeda seiring waktu inkubasi pada kultur (Gambar 4.1). Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH dengan substrat tisu toilet (TIS) memiliki aktivitas tertinggi dengan aktivitas yang terus meningkat dari inkubasi kultur hari ke-2 hingga mencapai maksimum pada hari ke-9 yaitu 360 U/ml. Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH TIS mengalami penurunan aktivitas menjadi 240 U/ml pada hari ke-11. Namun, aktivitas enzim tersebut mengalami peningkatan kembali pada hari ke-14.



Gambar 4.1 Grafik aktivitas ekstrak enzim kasar CDH pada medium produksi setiap hari inkubasi kultur *T. versicolor*. CMC: karboksi metil selulosa, LAK: laktosa, MET: metil selulosa, TIS: tisu toilet, VIT: kristal selulosa, dan WAT: kertas saring Whatman No. 1.

Ekstrak enzim kasar CDH yang memiliki aktivitas yang sedang adalah substrat kertas saring Whatman No. 1 (WAT) dan kristal selulosa (VIT). Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH dengan substrat tersebut juga mengalami peningkatan

seiring waktu inkubasi kultur produksi. Ekstrak enzim kasar CDH-WAT mencapai aktivitas enzim maksimum pada hari ke-9 (120 U/ml) dan mulai mengalami penurunan pada hari ke 11. Sedangkan, ekstrak enzim kasar CDH-VIT terus menunjukkan peningkatan dengan aktivitas yang terus naik hingga hari terakhir inkubasi kultur (120 U/ml). Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH yang memiliki aktivitas rendah adalah pada substrat laktosa (LAK), metil selulosa (MET), dan karboksimetil selulosa (CMC). Substrat-substrat tersebut memiliki aktivitas enzim yang fluktuatif dibawah 36 U/ml.

Pengukuran konsentrasi protein pada ekstrak enzim kasar CDH pada hari ke 14 menunjukkan bahwa ekstrak enzim kasar yang mempunyai aktivitas yang tinggi mempunyai kadar protein yang tinggi pula, yaitu pada ekstrak enzim kasar CDH TIS, WAT, dan VIT. Sedangkan ekstrak enzim kasar yang mempunyai aktivitas rendah juga mempunyai konsentrasi protein yang rendah yaitu LAK, CMC, dan MET (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Konsentrasi protein dan aktivitas spesifik ekstrak enzim kasar CDH pada berbagai variasi substrat pada hari ke 14.

Substrat	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
TIS	360	0,193	1867,221
WAT	84	0,130	647,795
LAK	12	0,029	413,718
VIT	120	0,107	1116,381
CMC	12	0,015	781,467
MET	24	0,024	1004,743

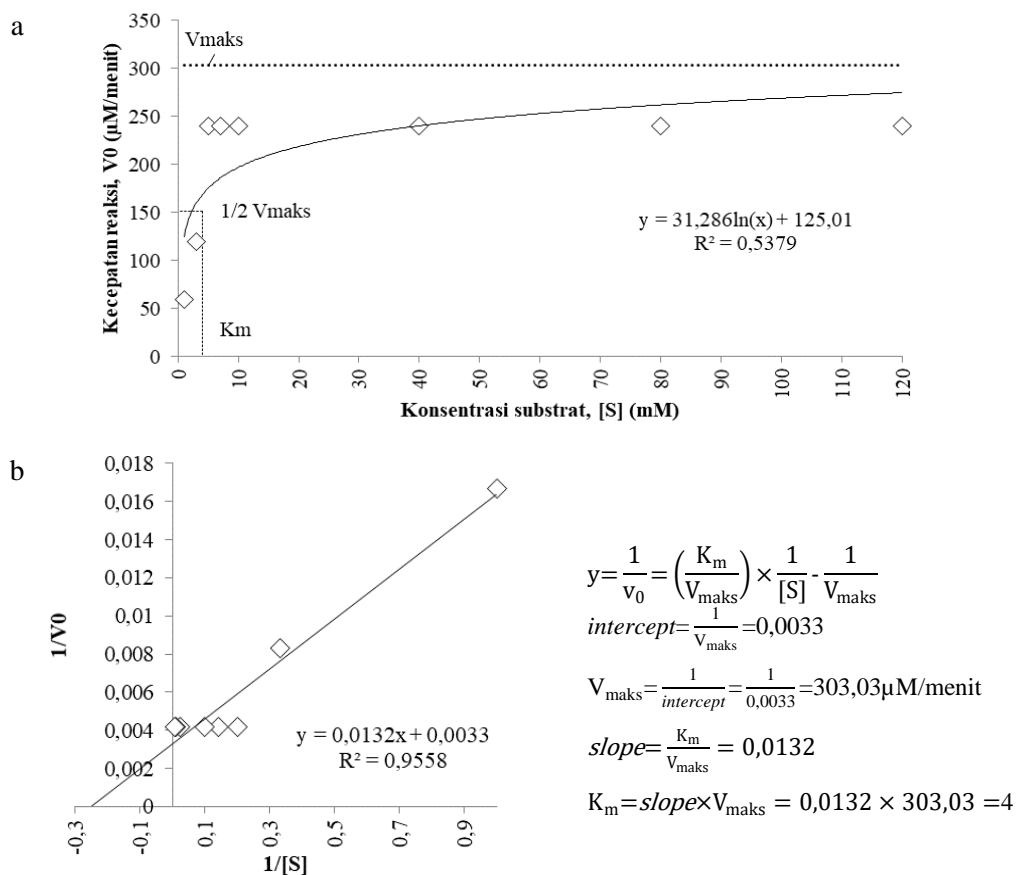
CMC: karboksi metil selulosa, LAK: laktosa, MET: metil selulosa, TIS: tisu toilet, VIT: kristal selulosa, dan WAT: kertas saring Whatman No. 1.

Substrat yang memiliki aktivitas tertinggi adalah tisu toilet. Bahan tisu ini adalah pulp yang berbahan dasar serat tanaman. Serat tanaman dibentuk oleh tiga polimer struktural seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin, serta beberapa komponen kecil non-struktural seperti protein, zat-zat ekstraktif, dan mineral (José *et al.*, 2005). Pembuatan pulp melalui beberapa proses yang dapat mendegradasi komponen dari serat tanaman. Proses pulping meliputi penanganan kayu,

perebusan, pemilihan, delignifikasi, dan pemutihan (Patt *et al.*, 2002). Proses delignifikasi dan pemutihan dapat mengurangi lignin dalam pulp. Pulp sebagai substrat mensuplai selulosa, hemiselulosa, dan lignin untuk nutrisi kultur *T. versicolor*. Hal tersebut akan menginduksi terbentuknya enzim-enzim lain yang berfungsi mendegradasi zat-zat tersebut. *T. versicolor* dapat memproduksi enzim selulase, xilanase (Kobakhidze *et al.*, 2016), lakase, mangan peroksidase, peroksidase *versatile* terkait Mn, peroksidase *versatile* tidak terkait Mn (Kinnunen *et al.*, 2017), maupun enzim CDH (Dumonceaux *et al.*, 2001; Canam *et al.*, 2011). Enzim-enzim tersebut dapat menyederhanakan bentuk polimer dari senyawa-senyawa rantai panjang pada serat tanaman maupun pulp. Senyawa yang sederhana menjadikan senyawa-senyawa dengan polimer panjang dapat berubah menjadi oligomer yang lebih mudah dikenali sebagai substrat yang spesifik pada enzim ekstraselular lain. Enzim selulase dapat menyederhanakan bentuk p-nitrofenil- β -D-selobiosida menjadi selobiosa yang dapat dimanfaatkan oleh enzim CDH untuk mereduksi bentuknya menjadi selobionolakton (Igarashi *et al.*, 1998).

Substrat selulosa merupakan substrat umum digunakan untuk produksi CDH oleh *T. versicolor*. Beberapa penelitian menggunakan selulosa mikrokristal Solka-Floc untuk memproduksi CDH (Roy *et al.*, 1996; Dumonceaux *et al.*, 2001). Alfa selulosa dan kristal selulosa menghasikan ekstrak enzim kasar CDH dengan aktivitas sedang. Penggunaan substrat turunan selulosa yaitu CMC dan metil selulosa tidak memberikan efek yang baik pada aktivitas enzim CDH. Kedua bahan tersebut menghasilkan aktivitas enzim yang rendah. Hal ini menunjukkan bahwa *T. versicolor* tidak dapat menggunakan substrat-substrat turunan dari selulosa sebagai substrat untuk menghasilkan enzim CDH dengan optimal.

Enzim CDH yang dihasilkan oleh *T. versicolor* dapat secara efisien mengkatalisis oksidasi pada disakarida atau oligosakarida yang mempunyai glukosa sebagai unit pereduksi dan unit gula kedua terikat pada gugus pereduksi melalui ikatan 1 \rightarrow 4 beta (Ludwig *et al.*, 2004). Belum ada laporan mengenai penggunaan laktosa dalam kultur produksi CDH pada *T. versicolor*. Penggunaan laktosa pada kultur produksi CDH oleh *T. versicolor* menghasilkan aktivitas enzim yang rendah. Hal ini menunjukkan bahwa laktosa bukanlah substrat yang esensial bagi pertumbuhan *T. versicolor*.

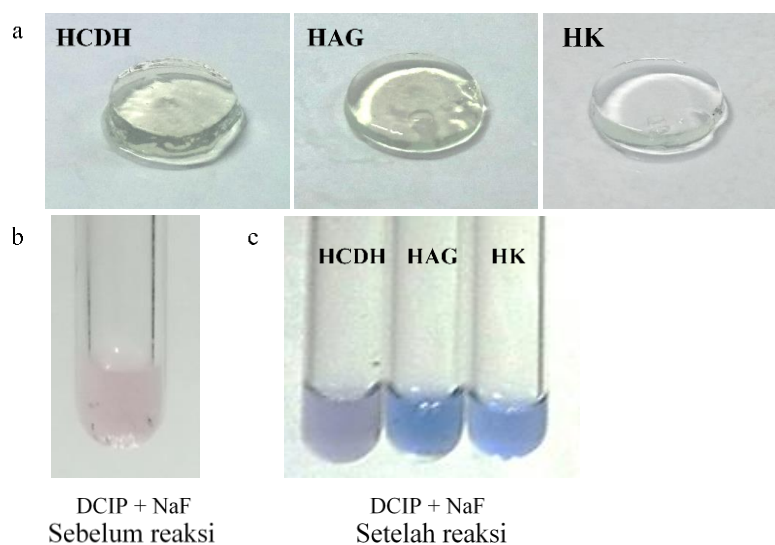


Gambar 4.2 Kecepatan reaksi ekstrak enzim kasar CDH TIS pada berbagai konsentrasi substrat laktosa, a. diagram Michaelis-Menten, b. diagram Lineweaver-Burk dan perhitungan V_{maks} dan K_m .

Faktor kunci yang mempengaruhi aktivitas laju reaksi yang dikatalisasi oleh enzim adalah konsentrasi substrat. Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH TIS pada konsentrasi substrat laktosa 1 mM menunjukkan aktivitas 60 U/ml. Aktivitas meningkat pada konsentrasi substrat laktosa 3 mM menjadi 120 U/ml. Pada konsentrasi 5-120 mM aktivitas meningkat menjadi 240 U/ml dan tidak mengalami penambahan (Gambar 4.2 a). Pada kondisi tersebut kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}) dari ekstrak enzim CDH dapat ditaksir dengan perhitungan dari persamaan pada diagram Lineweaver-Burk yang bernilai 303,03 $\mu\text{M}/\text{menit}$. Sedangkan konstanta Michaelis-Menten (K_m) dari ekstrak enzim CDH adalah 4 dimana K_m bernilai setengah dari kecepatan reaksi maksimum (Gambar 4.2 b) (Lehninger *et al.*, 2004).

4.2. Fabrikasi Hidrogel Penutup Luka

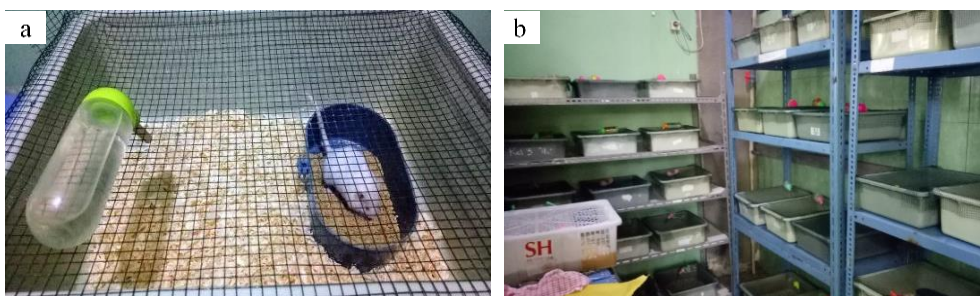
Tiga jenis hidrogel yang dibuat yaitu hidrogel berbasis enzimatik CDH (HCDH), hidrogel asam galat (HAG), hidrogel kosong (HK) dibuat dengan diameter 1 cm dengan bentuk yang disajikan pada Gambar 4.3 a. Ketiga jenis hidrogel tersebut diuji dengan menggunakan larutan *2,6-dichlorophenol indophenol* (DCIP) dan NaF yang berwarna merah muda yang menunjukkan bahwa larutan dalam suasana asam (Gambar 4.3 b). Hidrogel berbasis enzimatik CDH pada inkubasi dengan larutan mengandung DCIP dan NaF dapat mengubah warna DCIP yang diteteskan pada hidrogel menjadi biru pudar yang menandakan bahwa DCIP telah tereduksi. Sedangkan hidrogel asam galat dan hidrogel kosong berubah warna menjadi biru yang menandakan pH larutan menjadi netral atau basa (Gambar 4.3 c) (Horwitz, 1992). Hasil tersebut menunjukkan bahwa hidrogel berbasis enzimatik CDH dapat mereduksi akseptor elektron DCIP yang menunjukkan adanya aktivitas dari enzim CDH. Sedangkan pada hidrogel asam galat dan hidrogel kosong tidak menunjukkan aktivitas enzim reduksi DCIP pada sistem.



Gambar 4.3 Fabrikasi hidrogel penutup luka a. HCDH: hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, dan HK: hidrogel kosong, b. larutan DCIP + NaF sebelum reaksi, c. larutan DCIP + NaF setelah reaksi dengan masing-masing hidrogel penutup luka.

4.3. Luka Akut Non-infeksi dan Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada Hewan Uji *Mus musculus*

Perawatan hewan uji mencit (*Mus musculus*) dilakukan dengan melakukan penyesuaian terhadap kondisi lingkungan pada kandang uji. Kebersihan kandang uji terjaga selama aklimatisasi maupun pengujian dengan *blower* yang selalu menyala untuk membuang bau serta debu yang menumpuk dalam kandang (Gambar 4.4 b). Nutrisi yang diberikan kepada mencit memiliki tekstur yang tidak terlalu keras dan tidak terlalu lembek sehingga ideal bagi hewan uji (Suckow *et al.*, 2000). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pada penyembuhan luka meliputi oksigenasi, infeksi, umur, jenis kelamin dan hormon sex, stress, obesitas, medikasi, dan nutrisi (Guo *et al.*, 2010). Semua faktor tersebut telah diseragamkan pada hewan uji yang akan digunakan pada penelitian ini. Hasil pengukuran berat badan mencit tergolong stabil dengan menunjukkan peningkatan pada setiap minggunya (Lampiran 8).



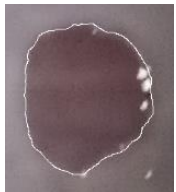
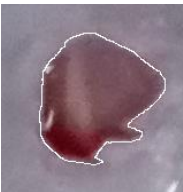


Gambar 4.4. Kondisi ruang pemeliharaan hewan uji. a. kotak kandang mencit, dan b. kondisi ruangan pemeliharaan mencit (*Mus musculus*).

Luas luka pada hewan uji yang dikehendaki adalah berdiameter sebesar 0,5 cm, sesuai dengan ukuran biopsy punch yang dipakai. Namun demikian, luas luka yang dibuat mempunyai variasi yang disebabkan oleh pengguntingan setelah penusukan dengan *biopsy punch* pada jaringan kulit. Rata-rata luasan luka akut non-infeksi pada hari 0 (Tabel 4.2) adalah pada perlakuan hidrogel berbasis enzimatik CDH $0,273 \text{ cm}^2 \pm 0,019 \text{ cm}^2$, pada perlakuan hidrogel asam galat $0,313 \text{ cm}^2 \pm 0,088 \text{ cm}^2$, pada perlakuan hidrogel kosong $0,207 \text{ cm}^2 \pm 0,024 \text{ cm}^2$, dan pada perlakuan tanpa hidrogel $0,161 \text{ cm}^2 \pm 0,005 \text{ cm}^2$. Semua luka menunjukkan rata-rata luasan luka yang tidak berbeda signifikan antar perlakuan ($p \geq 0,05$). Sedangkan rata-rata luasan luka terinfeksi *S. aureus* pada hari 0 (Tabel 4.3) adalah hidrogel berbasis

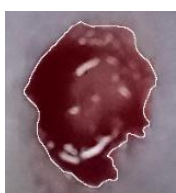
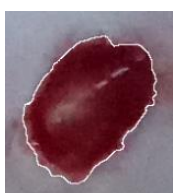


enzimatik CDH $0,247 \text{ cm}^2 \pm 0,050 \text{ cm}^2$, hidrogel asam galat $0,259 \text{ cm}^2 \pm 0,013 \text{ cm}^2$, hidrogel kosong $0,244 \text{ cm}^2 \pm 0,024 \text{ cm}^2$, dan tanpa hidrogel $0,227 \text{ cm}^2 \pm 0,045 \text{ cm}^2$. Semua luka menunjukkan rata-rata luasan luka tidak berbeda nyata antar perlakuan ($p \geq 0,05$).

Tabel 4.2 Gambar dan luas luka hari ke-0 pada luka akut non-infeksi. Gambar diambil dari satu ulangan secara acak pada setiap perlakuan, namun tidak mewakili bentuk luka pada masing-masing ulangan.

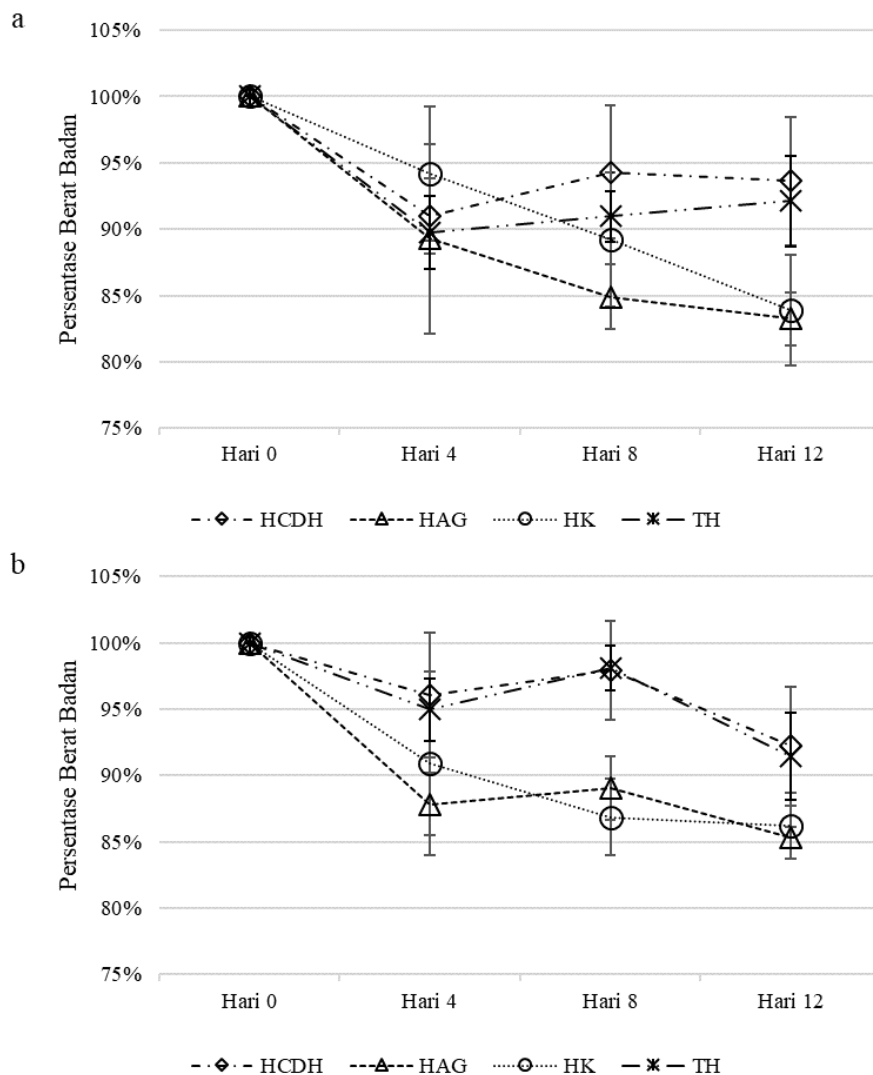
Ulangan	HCDH	HAG	HK	TH
				
1	0,256 cm ²	0,140 cm ²	0,207 cm ²	0,155 cm ²
2	0,307 cm ²	0,429 cm ²	0,263 cm ²	0,153 cm ²
3	0,299 cm ²	0,369 cm ²	0,211 cm ²	0,173 cm ²
4	0,228 cm ²		0,146 cm ²	0,164 cm ²
Rata-rata	0,273 cm²	0,313 cm²	0,207 cm²	0,161 cm²
Standar deviasi	0,019 cm²	0,088 cm²	0,024 cm²	0,005 cm²

HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel.

Tabel 4.3 Gambar dan luas luka hari ke-0 pada luka akut terinfeksi *S. aureus*. Gambar diambil dari satu ulangan secara acak pada setiap perlakuan, namun tidak mewakili bentuk luka pada masing-masing ulangan.

Ulangan	HCDH	HAG	HK	TH
				
1	0,248 cm ²	0,227 cm ²	0,312 cm ²	0,138 cm ²
2	0,379 cm ²	0,254 cm ²	0,219 cm ²	0,228 cm ²
3	0,139 cm ²	0,264 cm ²	0,240 cm ²	0,349 cm ²
4	0,221 cm ²	0,292 cm ²	0,205 cm ²	0,191 cm ²
Rata-rata	0,247 cm²	0,259 cm²	0,244 cm²	0,227 cm²
Standar deviasi	0,050 cm²	0,013 cm²	0,024 cm²	0,045 cm²

HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel.



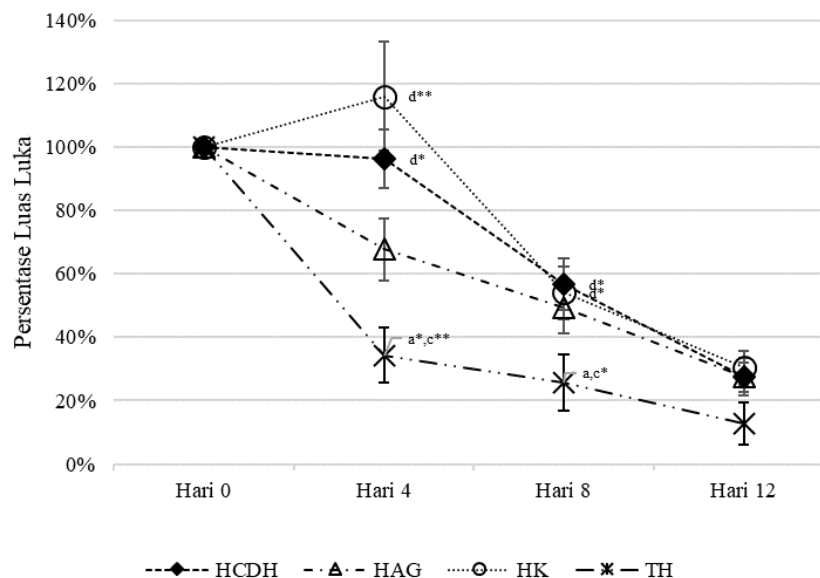
Gambar 4.5. Grafik pengukuran berat badan pada masing-masing perlakuan a. luka akut non-infeksi, dan b. luka akut terinfeksi *S. aureus*. HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel. Data disajikan dalam mean \pm SEM dengan nilai tidak ada signifikansi antar perlakuan.

Kondisi pemerbanan mencit membuat pergerakan mencit mengalami kesulitan, termasuk dalam perilaku makan dan minum. Pengaruh-pengaruh tersebut dapat dilihat jelas dari pengukuran berat badan (Gambar 4.5). Penurunan berat badan terjadi pada hari ke-4 perlakuan. Hal ini disebabkan oleh proses pembiasaan hewan uji dengan perban yang dipasangkan. Terganggunya proses makan dan minum hewan uji membuat penurunan drastis pada seluruh hewan uji pada semua

perlakuan. Kondisi berat badan yang stabil pada hari ke-8 dan ke-12 pada semua perlakuan dengan tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p \geq 0,05$).

4.4. Penutupan Luka pada Luka Akut Non-infeksi

Luka akut non-infeksi adalah luka yang tidak diberikan penambahan bakteri ke dalam luka. Namun demikian, luka akut dapat terinfeksi dari lingkungan sekitar luka meliputi kulit, bulu, dan udara luar maupun sumber endogen dalam tubuh (Kingsley, 2003). Luka akut non-infeksi pada hari ke-4 tanpa hidrogel memiliki persentase luasan $38\% \pm 8\%$ yang berbeda signifikan ($p < 0,01$) terhadap luka akut non-infeksi dengan hidrogel kosong dengan persentase luasan $116\% \pm 17\%$ (Gambar 4.6). Luka akut non-infeksi tanpa hidrogel juga berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap luka akut non-infeksi dengan hidrogel berbasis enzimatik CDH dengan persentase luasan $83\% \pm 4\%$. Luka akut non-infeksi dengan hidrogel berbasis enzimatik CDH tidak berbeda signifikan dengan luka akut non-infeksi dengan perlakuan hidrogel asam galat ($68\% \pm 10\%$) maupun luka akut non infeksi dengan perlakuan hidrogel kosong ($116\% \pm 17\%$).



Gambar 4.6 Persentase luasan luka akut non-infeksi pada hewan uji yang diamati pada hari ke-0, 4, 8, dan 12. HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel. Data disajikan dalam mean \pm SEM dengan nilai signifikansi $p < 0.001 = ***$, $p < 0.01 = **$ dan $p < 0.05 = *$; simbol huruf menunjukkan perbandingan signifikansi terhadap: c = hidrogel kosong, dan d = tanpa hidrogel.

Pada hari ke-8, luka tanpa hidrogel mengalami penurunan persentase luasan luka menjadi $25\% \pm 3\%$ yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap luka dengan hidrogel kosong yang memiliki persentase luasan luka $54\% \pm 8\%$ dan hidrogel berbasis enzimatik CDH yang memiliki persentase luasan luka $46\% \pm 5\%$, namun tidak signifikan terhadap hidrogel asam galat yang memiliki persentase luasan luka $49\% \pm 8\%$.

Pada hari ke-12, persentase luasan luka pada masing-masing perlakuan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hidrogel berbasis enzimatik CDH memiliki persentase luasan luka sebesar $28\% \pm 6\%$, hidrogel asam galat mempunyai persentase luasan luka sebesar $27\% \pm 5\%$, hidrogel kosong mempunyai persentase luasan luka sebesar $32\% \pm 4\%$, dan tanpa hidrogel mempunyai persentase luasan luka sebesar $14\% \pm 5\%$.

Luka memasuki fase inflamasi dan terjadi proliferasi dan migrasi fibroblast pada hari ke-4 (Clark, 1993). Peran hidrogel berbasis enzimatik CDH sangat penting pada fase inflamasi. Pada fase tersebut, sel-sel imun akan direkrut dengan pensinyalan H_2O_2 yang dilepaskan oleh neutrofil (Falanga *et al.*, 2005). H_2O_2 yang dihasilkan oleh hidrogel berbasis enzimatis CDH pada luka akut non-infeksi tidak memberikan banyak pengaruh dalam penutupan luas luka pada luka akut non-infeksi. Sedangkan kandungan ROS yang rendah pada luka akut non-infeksi (Schreml *et al.*, 2010) tidak memberikan dampak pada pengaisan ROS oleh hidrogel asam galat. Hidrogel kosong mengalami penambahan luas luka yang dimungkinkan karena kondisi luka yang masih dalam fase inflamasi (Pramono *et al.*, 2016). Hidrogel penutup luka dapat menahan air untuk menjaga kondisi luka tetap lembab atau basah (Kamoun *et al.*, 2017).

Pada luka akut non-infeksi tanpa hidrogel memiliki lingkungan luka yang berbeda dengan luka non-infeksi dengan hidrogel penutup luka. Perlakuan tanpa hidrogel tidak memiliki penahan untuk menjaga kelembaban pada luka yang menjadikan luka menjadi kering. Luka yang kering dapat menyebabkan terbentuknya *scab* atau kerak luka yang merupakan penutup luka yang alami. *Scab* merupakan kerak yang dibentuk oleh serum yang kering dengan eritrosit yang terperangkap di dalamnya. *Scab* dapat memberikan fungsi seperti pada penutup

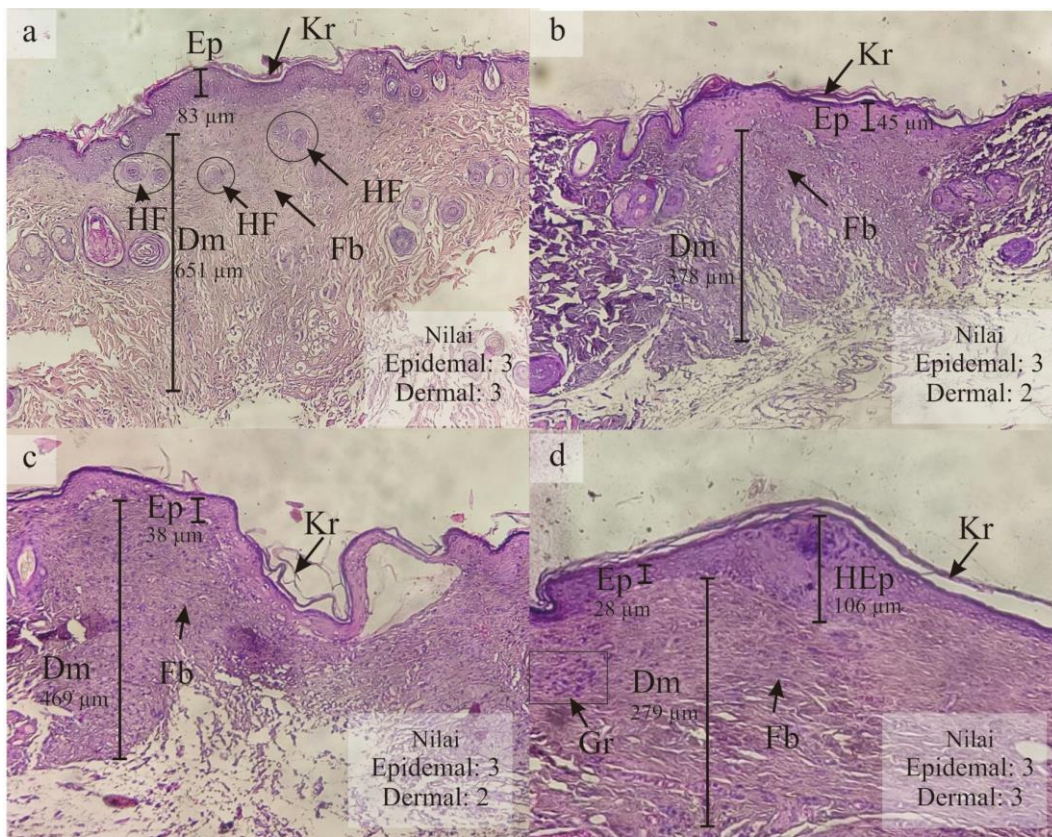
luka yang meliputi perlindungan terhadap benda asing, mengurangi rasa sakit, menahan tepian luka, memfasilitasi kontraksi luka, dan meminimalisasi kehilangan cairan dan protein (Lionelli *et al.*, 2003). Luka akut non infeksi tanpa hidrogel mengalami penutupan luka yang cepat dan berbeda signifikan dibandingkan dengan ketiga perlakuan hidrogel penutup luka. Hal tersebut disebabkan oleh kontraksi luka yang difasilitasi oleh *scab* yang dapat mempercepat penutupan luka (Swaim *et al.*, 2001). Meskipun *scab* memiliki keunggulan dalam penutupan luka, namun hal tersebut bukanlah merupakan suatu hal yang ideal. *Scab* dapat memperlambat epitelialisasi dan dapat menahan bakteri pada permukaan luka (Lionelli *et al.*, 2003). Selain itu pembentukan *scab* dapat menyebabkan terjadinya bekas luka (Fonder *et al.*, 2007).

Pada hari ke 8 dan 12, perlakuan dengan hidrogel penutup luka tidak memberikan perbedaan yang signifikan satu sama lain. Hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH tidak disebutkan dapat membantu dalam proses proliferasi sel (Nyanhongo *et al.*, 2013a). Pada fase proliferasi ini luka tidak mengeluarkan eksudat yang dapat masuk pada sistem regenerasi antioksidan hidrogel berbasis enzimatik CDH maupun pengaisan ROS oleh hidrogel asam galat. Namun support hidrogel karaginan akan mampu memberikan kompatibilitas jaringan dan mampu memberikan kondisi luka yang lembab dan menghindarkan dari iritasi yang menjamin sel-sel untuk berproliferasi dengan baik (Roy *et al.*, 2010). Sedangkan perlakuan tanpa hidrogel mempunyai luasan luka yang lebih kecil dan berbeda secara signifikan dengan perlakuan-perlakuan dengan hidrogel penutup luka. Penutupan yang cepat ini disebabkan karena pembentukan keropeng yang mempercepat proses penyembuhan luka.

4.4.1. Penilaian Epidermal dan Dermal Luka Akut Non-infeksi

Pengamatan histologis jaringan epidermis dari luka akut non-infeksi pada hari ke-12 menunjukkan bahwa seluruh perlakuan yaitu hidrogel berbasis enzimatik CDH, hidrogel asam galat, hidrogel kosong, dan tanpa hidrogel tidak menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan. Jaringan epidermis telah mengalami migrasi lengkap dengan keratinisasi yang lengkap dengan penilaian epidermal 3,00 (Gambar 4.7 dan 4.8) (Yates *et al.*, 2007). Perlakuan dengan hidrogel dapat

mempercepat proses epitelialisasi yang ditunjukkan pada Gambar 4.7 a, b, dan c. Perlakuan hidrogel penutup luka dapat memberikan kompatibilitas yang baik untuk proliferasi jaringan epidermis (Roy *et al.*, 2010). Sedangkan perlakuan tanpa hidrogel menyebabkan adanya hiperplasia pada jaringan epidermis yang merupakan tanda terbentuknya bekas luka yang ditunjukkan pada Gambar 4.7 c (Galili, 2017).

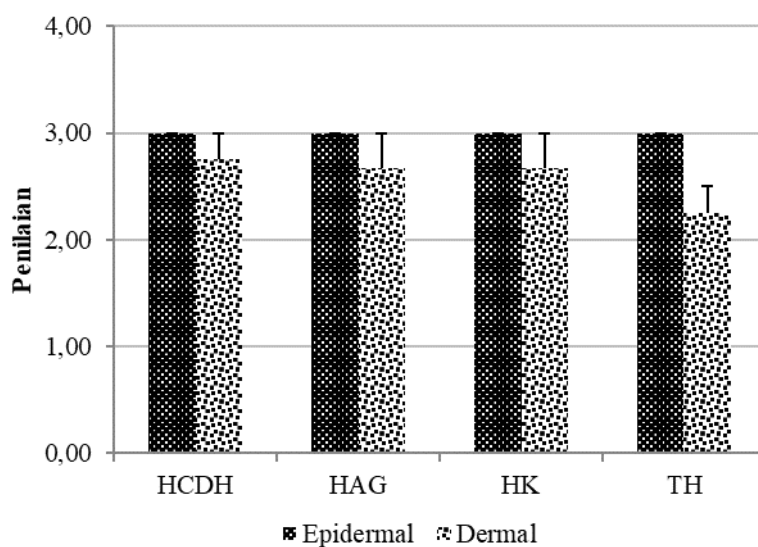


Dm: dermis, **Ep:** epidermis, **Fb:** fibroblast, **Gr:** jaringan granulasi, **HEp:** hiperplasia epidermis, **HF:** folikel rambut, **Kr:** keratin

Gambar 4.7. Gambaran jaringan histologis pada luka akut non-infeksi pada hari ke-12. a. hidrogel berbasis enzimatik CDH, b. hidrogel asam galat, c. hidrogel kosong, dan d. tanpa hidrogel. Jaringan diwarnai dengan pewarnaan Hematoxilin & Eosin dan diamati dengan mikroskop perbesaran 100x.

Pengamatan jaringan dermis luka akut non-infeksi pada hari kementerian menunjukkan bahwa pada hidrogel berbasis enzimatik CDH memiliki penilaian dermal $2,75 \pm 0,25$, hidrogel asam galat dan hidrogel kosong memiliki penilaian epidermal $2,67 \pm 0,33$, dan tanpa hidrogel memiliki penilaian $2,25 \pm 0,25$. Penilaian

dermal pada luka akut non-infeksi tidak mempunyai perbedaan yang signifikan antar perlakuan pada uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis, namun hidrogel berbasis enzimatik CDH cenderung memiliki penyembuhan dermal yang lebih baik dari pada kontrol dengan adanya pertumbuhan folikel rambut (Gambar 4.7 a). pertumbuhan folikel rambut merupakan salah satu tanda pematangan jaringan luka yang akan meningkatkan penyembuhan luka dan mengurangi pembentukan bekas luka (Jahoda *et al.*, 2001). Perlakuan tanpa hidrogel memiliki penilaian dermal yang paling rendah dibandingkan perlakuan dengan hidrogel penutup luka. Hal tersebut menunjukkan bahwa meskipun penutupan luka yang baik pada perlakuan tanpa hidrogel, namun dalam penyembuhan dermal tidak lebih baik dibandingkan dengan perlakuan dengan hidrogel penutup luka. Pembentukan *scab* pada perlakuan tanpa hidrogel dapat menyebabkan jaringan granulasi meningkat dan tertundanya remodeling (Mann *et al.*, 2006).

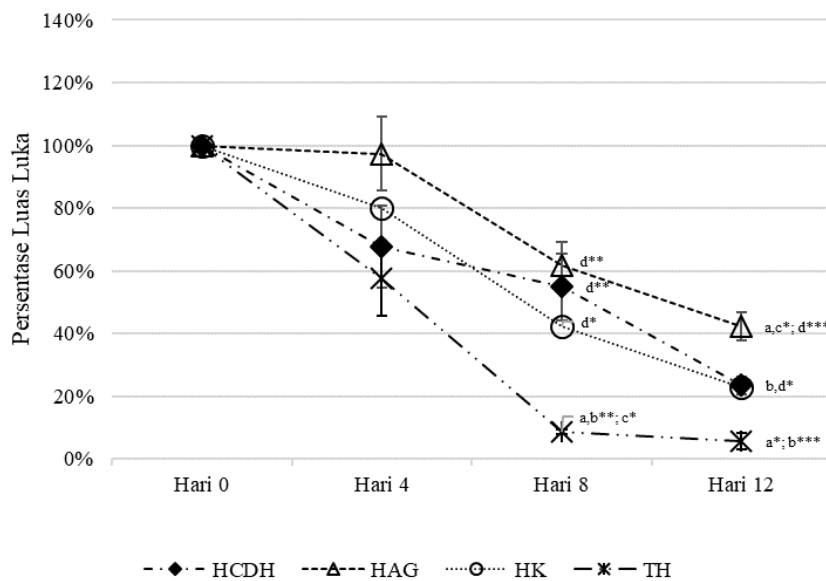


Gambar 4.8 Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada luka akut non-infeksi hari ke-12. HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel. Data disajikan dalam mean \pm SEM dengan data tidak menunjukkan signifikansi antar perlakuan dengan uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis.

4.5. Penutupan Luka pada Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus*

Jumlah bakteri *S. aureus* yang digunakan pada luka akut terinfeksi *S. aureus* adalah $1,6 \times 10^4$ cfu/ml (Lampiran 6). Persentase luas luka hari ke-4 pada masing-masing perlakuan tidak mempunyai perbedaan yang signifikan satu dengan yang lain ($p < 0,05$) (Gambar 4.9). Hidrogel berbasis enzimatik CDH memiliki persentase luasan luka sebesar $68\% \pm 13\%$, hidrogel asam galat mempunyai persentase luasan luka sebesar $97\% \pm 12\%$, hidrogel kosong mempunyai persentase luasan luka sebesar $42\% \pm 8\%$, dan tanpa hidrogel mempunyai persentase luasan luka sebesar $60\% \pm 10\%$.

Persentase luasan luka hari ke 8 pada luka tanpa hidrogel yaitu $9\% \pm 1\%$ memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,01$) terhadap hidrogel asam galat yang memiliki persentase luasan luka $62\% \pm 8\%$, dan signifikan ($p < 0,05$) terhadap hidrogel berbasis enzimatik CDH yang memiliki persentase luasan luka $55\% \pm 11\%$ maupun hidrogel kosong yang memiliki persentase luasan luka $42\% \pm 8\%$.



Gambar 4.9 Persentase luasan luka terinfeksi *S. aureus* pada hewan uji yang diamati pada hari ke 0, 4, 8, dan 12. HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK, hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel. Data disajikan dalam mean \pm SEM dengan nilai signifikansi $p < 0,001 = ***$, $p < 0,01 = **$ dan $p < 0,05 = *$; simbol huruf menunjukkan perbandingan signifikansi terhadap: a = hidrogel berbasis enzimatik CDH, b = hidrogel asam galat, c = hidrogel kosong, dan d = tanpa hidrogel.

Pada hari ke 12, luka tanpa hidrogel memiliki persentase luasan luka sebesar $6\% \pm 3\%$ yang signifikan ($p < 0,05$) dengan luka dengan hidrogel berbasis enzimatik CDH yang memiliki persentase luasan luka $23\% \pm 3\%$ dan berbeda signifikan ($p < 0,01$) dengan hidrogel asam galat yang mempunyai persentase luasan luka $42\% \pm 5\%$. Sedangkan luka dengan hidrogel kosong yang memiliki persentase luasan luka $23\% \pm 6\%$ tidak signifikan dengan luka tanpa hidrogel. Luka dengan hidrogel berbasis enzimatik CDH maupun luka dengan hidrogel berbeda signifikan dengan luka dengan hidrogel asam galat.

Staphylococcus aureus diidentifikasi sebagai salah satu bakteri yang menyusun agregat dari luka kronis (Fazli *et al.*, 2009). Luka yang disebabkan oleh *S. aureus* dapat menjadi kronis jika infeksi tersebut dibiarkan terlalu lama sehingga membentuk biofilm (Lister *et al.*, 2014; Wolcott *et al.*, 2008) dan mengeluarkan faktor virulensi berupa toksin α (atau yang biasa diketahui sebagai haemolisin α) yaitu toksin pembentuk pori yang dapat melisiskan sel inang (Berube *et al.*, 2013). Hal ini akan memicu luka untuk menjadi lebih parah (Wardenburg *et al.*, 2007). Luka yang terinfeksi oleh bakteri dapat menyebabkan kadar ROS menjadi tinggi karena pengaruh inflamasi (Schreml *et al.*, 2010). Hidrogel berbasis enzimatik CDH dapat mengais ROS yang ditimbulkan oleh jaringan luka yang terinfeksi sehingga tidak memperparah kondisi luka karena terjadinya oksidasi biomolekul (Schäfer *et al.*, 2008). Selain itu hidrogel berbasis enzimatik CDH membantu menyuplai peroksida sebagai agen antibakteria dan pencegah biofilm yang kemungkinan dihasilkan oleh *S. aureus*. Peroksida juga dapat berfungsi sebagai perekrut sel-sel polimorfonuklear yang penting dalam proses inflamasi (Dunnill *et al.*, 2017).

Kandungan ROS yang tinggi pada luka terinfeksi *S. aureus* menyebabkan hidrogel asam galat menjadi radikal antioksidan (Nyanhongo *et al.*, 2013). Pada hidrogel asam galat tersebut tidak memiliki sistem regenerasi antioksidan seperti pada hidrogel berbasis enzimatik CDH. Radikal antioksidan tersebut dapat menyebabkan luka sulit sembuh yang ditunjukkan dengan penyembuhan yang kurang dengan tetap menunjukkan luasan luka yg masih lebar pada hari ke-12. Luasan luka ini berbeda signifikan dengan perlakuan hidrogel berbasis enzimatik CDH, hidrogel kosong maupun tanpa hidrogel. Hal tersebut disebabkan karena

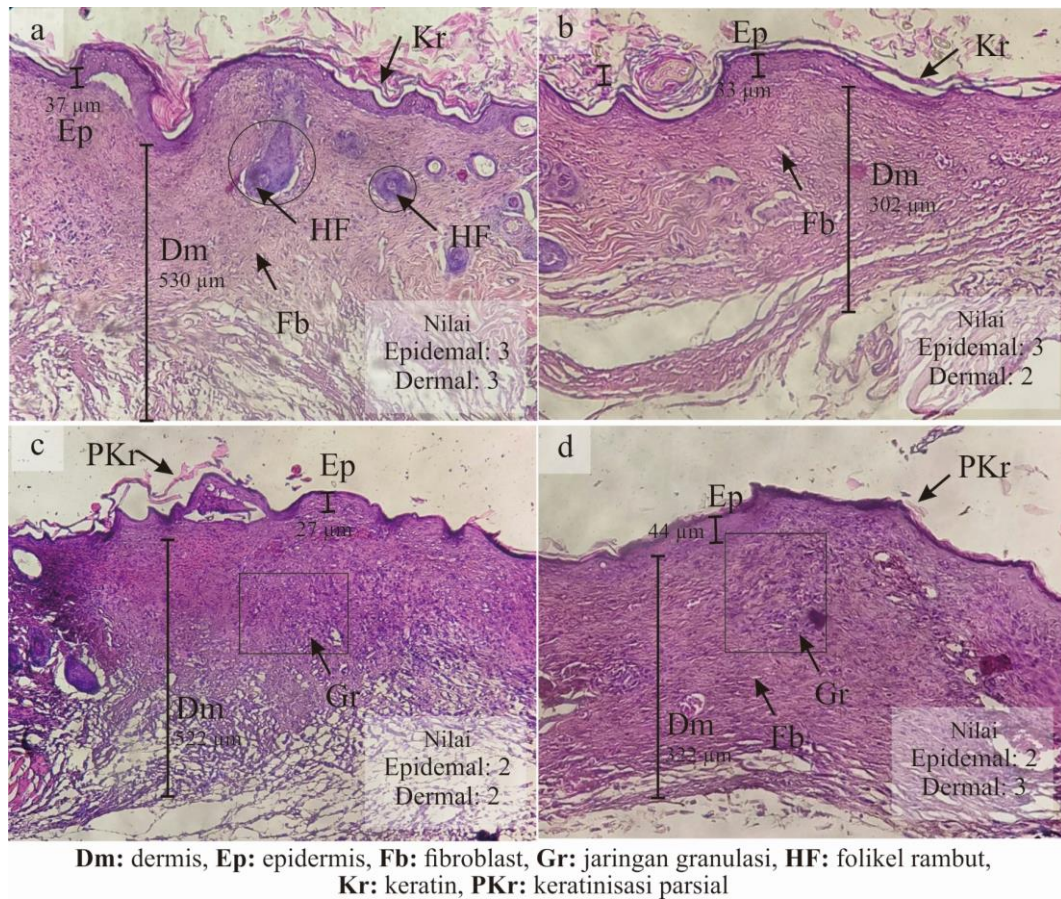
radikal antioksidan fenolik dapat menyebabkan stres oksidatif seiring waktu dan juga meningkatkan oksidasi biomolekul, sehingga menghambat penyembuhan luka (Halliwell *et al.*, 1992).

Hidrogel kosong memberikan kompatibilitas yg baik bagi jaringan luka dan tidak berpengaruh secara negatif. Hidrogel diketahui mampu sebagai pendorong kesembuhan luka dengan menjaga permeabilitas dalam menjaga kadar air dalam luka, menjadi penghalang bagi masuknya bakteri dari lingkungan, dan menghindari iritasi (Roy *et al.*, 2010). Luka akut terinfeksi *S. aureus* tanpa hidrogel menunjukkan penutupan yang cepat karena luka yang kering tersebut menyebabkan pembentukan *scab* yang dapat membantu dalam kontraksi luka (Swaim *et al.*, 2001). *Scab* dapat menahan bakteri pada permukaan luka (Lionelli *et al.*, 2003), namun pada luka yang diberikan infeksi *S. aureus* tidak memberikan dampak berarti pada penyembuhan luka. Bakteri dalam jumlah 10^4 belum dapat menginfeksi luka dengan baik. Jumlah bakteri yang dapat menyebabkan penghambatan pada penyembuhan luka adalah lebih dari 10^5 organisme/gram jaringan. Jumlah ini tidak tentu tergantung pada status sistem imun inang dan jumlah dan spesies bakteri yang menginfeksi (Kingsley, 2003).

4.5.1. Penilaian Epidermal dan Dermal Luka Akut Terinfeksi *Staphylococcus aureus*

Pengamatan jaringan epidermis pada luka akut terinfeksi *S. aureus* pada hari ke-12 menunjukkan bahwa pada hidrogel berbasis enzimatik CDH dan hidrogel asam galat memiliki penilaian epidermal 3,00, hidrogel kosong memiliki penilaian epidermal $2,75 \pm 0,25$, dan tanpa hidrogel memiliki penilaian epidermal $2,67 \pm 0,33$ (Gambar 4.11). Penilaian epidermal pada luka akut terinfeksi *S. aureus* tidak mempunyai perbedaan yang signifikan antar perlakuan pada uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis namun pada perlakuan hidrogel berbasis enzimatik CDH dan hidrogel asam galat mengalami migrasi epidermis secara lengkap dan keratinisasi secara lengkap (Gambar 4.10 a dan b). Hal tersebut menunjukkan adanya hubungan antara penanganan ROS yang dihasilkan dan penanganan infeksi *S. aureus* dengan keratinisasi pada jaringan epidermis. Sedangkan migrasi lengkap dan keratinisasi parsial pada perlakuan hidrogel kosong dan tanpa hidrogel yang ditunjukkan pada

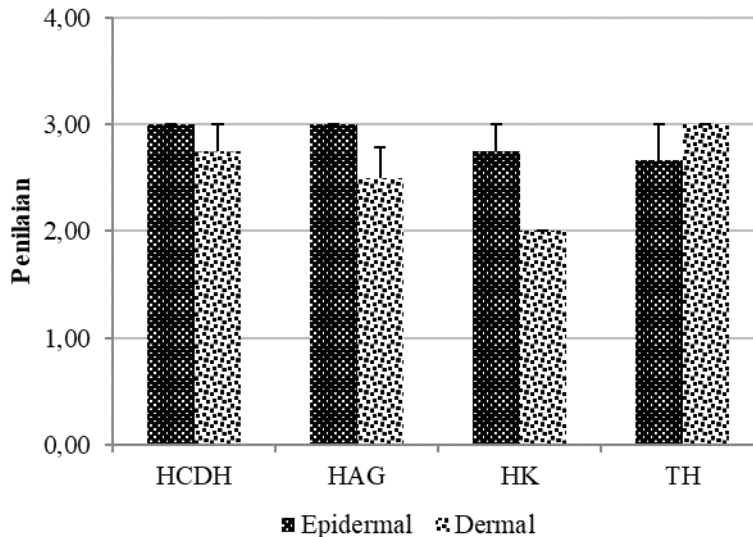
Gambar 4.10 b dan c. Sel keratinosit, yang merupakan penyusun utama dalam sel epidermis, akan berapoptosis jika kandungan ROS meningkat. Penggunaan antioksidan dapat menanggulangi proses apoptosis yang dapat terjadi pada sel keratinosit (Bito *et al.*, 2012).



Gambar 4.10. Gambaran jaringan histologis pada luka akut terinfeksi *S. aureus* pada hari ke-12. a. hidrogel berbasis enzimatik CDH, b. hidrogel asam galat, c. hidrogel kosong, dan d. tanpa hidrogel. Jaringan diwarnai dengan pewarnaan Hematoxilin & Eosin dan diamati dengan mikroskop perbesaran 100x.

Pengamatan jaringan dermis luka akut terinfeksi *S. aureus* menunjukkan bahwa pada hidrogel berbasis enzimatik CDH memiliki penilaian dermal $2,75 \pm 0,25$, hidrogel asam galat memiliki penilaian epidermal $2,50 \pm 0,29$, hidrogel kosong memiliki penilaian epidermal 2,00 dan tanpa hidrogel memiliki penilaian 3,00. Penilaian dermal pada luka akut terinfeksi *S. aureus* tidak mempunyai

perbedaan yang signifikan antar perlakuan pada uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis.



Gambar 4.11. Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada luka akut terinfeksi *S. aureus* hari ke-12. HCDH: hidrogel berbasis enzimatik CDH, HAG: hidrogel asam galat, HK: hidrogel kosong, dan TH: tanpa hidrogel. Data disajikan dalam mean \pm SEM dengan data tidak menunjukkan signifikansi antar perlakuan dengan uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis.

Penilaian dermal pada hidrogel berbasis enzimatik CDH menunjukkan nilai yang lebih rendah namun terlihat pendewasaan pada jaringan dermis luka dengan adanya folikel rambut (Gambar 4.10 a). Tumbuhnya folikel rambut dapat mereduksi pembentukan bekas luka (Jahoda *et al.*, 2001). Pada hidrogel asam galat tidak ditemukan pertumbuhan folikel rambut (Gambar 4.10 b). Penilaian yang lebih rendah ada pada penggunaan hidrogel kosong yang tidak menunjukkan adanya deposisi kolagen pada jaringan granulasi (Gambar 4.10 c). Pada perlakuan tanpa hidrogel memiliki penilaian penyembuhan dermal yang paling tinggi dibanding semua perlakuan dengan adanya deposisi kolagen namun masih menunjukkan adanya kumpulan dari jaringan granulasi (Gambar 4.10 d). Jaringan granulasi yang lebih lama ada pada jaringan menunjukkan pelambatan dalam penyembuhan dermal (Mann *et al.*, 2006).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

1. Penggunaan substrat tissue toilet sangat baik dalam kultur produksi enzim *cellobiose dehydrogenase* (CDH) oleh kapang *Trametes versicolor*.
2. Penyembuhan luka pada hidrogel penutup luka berbasis enzimatis CDH tidak memberikan pengaruh yang signifikan dalam penutupan luka dibandingkan dengan kontrol hidrogel asam galat dan hidrogel kosong. Perlakuan tanpa hidrogel memiliki penutupan luka yang lebih cepat secara signifikan terhadap perlakuan hidrogel penutup luka.
3. Penilaian penyembuhan epidermal dan dermal pada hari ke-12 pada masing-masing perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan namun mempunyai kecenderungan bahwa hidrogel penutup luka berbasis enzimatis CDH memiliki penyembuhan yang lebih baik dari perlakuan kontrol.

5.2. Saran

Saran yang diusulkan dari penelitian ini untuk penelitian lanjutan adalah:

1. Penelitian tentang pengaruh aplikasi hidrogel ini perlu dilakukan dengan hewan uji yang lebih besar (misal: Ratus, Kelinci, dll.) untuk kondisi uji yang lebih representatif. Penggunaan hewan uji mencit (*Mus musculus*) sangat sulit dilakukan karena ukurannya yang kecil dan kesulitan dalam proses pemerbanan. Proses pemerbanan yang dilakukan pada penelitian ini memberikan dampak yang negatif bagi pergerakan mencit sehingga berpengaruh pada berat badan.
2. Penggunaan enzim CDH yang dimurnikan diharapkan dapat memberikan efek yang lebih baik pada luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi *Staphylococcus aureus*.

3. Perlu dilakukan penelitian aplikasi *in vivo* hidrogel penutup luka berbasis enzimatik CDH pada luka kronis. Aplikasi pada luka kronis diharapkan mampu memberikan efek yang berbeda dengan luka akut, karena hidrogel ini pada awalnya ditujukan untuk penyembuhan pada luka kronis yang mengandung sejumlah besar *reactive oxygen species*, infeksi bakteri, dan biofilm.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-El-Aleem, S.A., Ferguson, M.W., Appleton, I., Kairsingh, S., Jude, E.B., Jones, K., McCollum, C.N. dan Ireland, G.W. (2000), "Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms and Arginase in Normal Human Skin and Chronic Venous Leg Ulcers", *The Journal of pathology*, Vol. 191, hal. 434-442.
- Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A.J., Roediger, B., Brzoska, A.J., Tikoo, S., Cheng, Q., Ng, L.G., Cavanagh, L.L., Von Andrian, U.H. and Hickey, M.J. (2014), "Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection", *Nature immunology*, Vol. 15(1), hal. 45.
- Baminger, U., Subramaniam, S.S., Renganathan, V. dan Haltrich, D. (2001), "Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenase from The Plant Pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 41, hal. 766-774.
- Bao, W., Lyman, E. dan Renganathan, V. (1994), "Optimization of Cellobiose Dehydrogenase and β -glucosidase Production by Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 42, hal. 642-646.
- Baxter, C. (1990), *The normal healing process-New Directions in Wound Healing*, NJ: ER Squibb & Sons, Inc., Princeton.
- Beeson, W.T., Vu, V.V., Span, E.A., Phillips, C.M. dan Marletta, M.A. (2015), "Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases", *Annu Rev Biochem*, Vol. 84, hal. 923-946.
- Berube, B.J. and Wardenburg, J.B. (2013), "Staphylococcus aureus α -toxin: nearly a century of intrigue", *Toxins*, Vol. 5(6), hal. 1140-1166.
- Bito, T., & Nishigori, C. (2012), "Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways", *Journal of dermatological science*, Vol. 68(1), hal. 3-8.

- Bradford, M.M. (1976), "A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microorganisms Quantities of Protein in Utilizing the Principle of Protein-dye Binding", *Anal. Biochem*, Vol. 72 hal. 248-254.
- Britland, S., Ross-Smith, O., Jamil, H., Smith, A.G., Vowden, K. dan Vowden, P. (2012), "The Lactate Conundrum in Wound Healing: Clinical and Experimental Findings Indicate the Requirement for A Rapid Point of Care Diagnostic", *Biotechnol Prog*, Vol. 28, hal. 917-924.
- Cameron, M.D., Timofeevski, S. dan Aust, S.D. (2000), "Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* With Respect to The Degradation of Recalcitrant Compounds and Xenobiotics", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 54, hal. 751-758.
- Canam, T., Town, J.R., Tsang, A., McAllister, T.A. and Dumonceaux, T.J. (2011), "Biological pretreatment with a cellobiose dehydrogenase-deficient strain of *Trametes versicolor* enhances the biofuel potential of canola straw", *Bioresource technology*, Vol. 102(21), hal.10020-10027.
- Chen, J. P., Chang, G. Y., & Chen, J. K. (2008), "Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 313, hal. 183-188.
- Chia, Y. C., Rajbanshi, R., Calhoun, C., & Chiu, R. H. (2010), "Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells". *Molecules*, Vol. 15(11), hal. 8377-8389.
- Clark, R. A. (1993), "Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair", *The American journal of the medical sciences*, Vol. 306(1), hal. 42-48.
- Collins, T. J. (2007), "ImageJ for microscopy", *Biotechniques*, Vol. 43(1 Suppl), hal. 25-30.
- Cordeiro, A. L., Lenk, T., dan Werner, C. (2011). "Immobilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase onto reactive polymer films". *Journal of biotechnology*, Vol. 154(4), hal. 216-221.
- Correa, T.L.R., Dos-Santos, L.V. dan Pereira, G.A.G. (2016), "AA9 and AA10: from Enigmatic to Essential Enzymes", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 100, hal. 9-16.

- D'souza, S. F. (1999). "Immobilized enzymes in bioprocess". *Current Science*, hal. 69-79.
- Dumonceaux, T., Bartholomew, K., Valeanu, L., Charles, T. and Archibald, F. (2001), "Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 29(8-9), hal. 478-489.
- Dumonceaux, T.J., Bartholomew, K.A., Charles, T.C., Moukha, S.M. and Archibald, F.S., (1998). "Cloning and sequenching of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*". *Gene* Vol. 210, hal. 211-219.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D. and Georgopoulos, N.T. (2017), "Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process", *International wound journal*, Vol. 14(1), hal. 89-96.
- Eming, S.A., Martin, P. dan Tomic-Canic, M. (2014), "Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation", *Sci Transl Med*, Vol. 6, hal. 265-266.
- Eriksson, KE., Blanchettete, RA., dan Ander, P. (1990). *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Springer Verlag, Berlin.
- Falanga, V. (2005), "Wound Healing and Its Impairment in The Diabetic Foot", *Lancet*, Vol. 366, hal. 1736-1743.
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, A., Andersen, C.B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2011), "Quantitative Analysis of The Cellular Inflammatory Response Against Biofilm Bacteria in Chronic Wounds", *Wound Repair Regen*, Vol. 19, hal. 387-391.
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A.S., Kroghfelt, K.A., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2009), "Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 47(12), hal. 4084-4089.

- Fonder, M. A., Mamelak, A. J., Lazarus, G. S., & Chanmugam, A. (2007), "Occlusive wound dressings in emergency medicine and acute care", *Emergency medicine clinics of North America*, Vol. 25(1), hal. 235-242.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000), "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of agricultural and food chemistry", Vol. 48(8), hal. 3597-3604.
- Galili, U. (2017), *The Natural Anti-Gal Antibody as Foe Turned Friend in Medicine*, Academic Press.
- Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010), "Factors affecting wound healing", *Journal of dental research*, Vol. 89(3), hal. 219-229.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. dan Cross, C. (1992), "Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are We Now?", *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 119, hal. 598-620.
- Harborne, J. B. (1989), "General procedures and measurement of total phenolics", *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1, hal. 1-28.
- Harreither, W., Coman, V., Ludwig, R., Haltrich, D. dan Gorton, L. (2007), "Investigation of Graphite Electrodes Modified with Cellobiose Dehydrogenase from The Ascomycete *Myriococcum thermophilum*", *Electroanalysis*, Vol. 19, hal. 172-180.
- Harreither, W., Sygmund, C., Augustin, M., Narciso, M., Rabinovich, M.L., Gorton, L., Haltrich, D. dan Ludwig, R. (2011), "Catalytic Properties and Classification of Cellobiose Dehydrogenases from Ascomycetes", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 77(5), hal. 1804-1815.
- Henriksson, G., Ander, P., Petersson, B., Petersson, G. (1995). "Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as wood-degrading enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 42, hal. 792-796.
- Hermansson, A. M., Eriksson, E., dan Jordansson, E. (1991). "Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels". *Carbohydrate Polymers*, Vol. 16(3), hal. 297-320.

- Hilden, L. dan Johansson, G. (2004), "Recent Developments on Cellulases and Carbohydrate-binding Modules with Cellulose Affinity", *Biotechnol. Lett.*, Vol. 26, hal. 1683-1693.
- Ho, C. T., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K. Q., & Rosen, R. T. (1992), "Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas", *Preventive medicine*, Vol. 21(4), hal. 520-525.
- Hopf, H.W. dan Rollins, M.D. (2007), "Wounds: An Overview of the Role of Oxygen", *Antioxid Redox Signal*, Vol. 9, hal. 1183-1192.
- Horwitz, W. (1992), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists-16th ed*, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Igarashi, K., Samejima, M. and Eriksson, K. E. L. (1998), "Cellobiose dehydrogenase enhances Phanerochaete chrysosporium cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition", *European journal of biochemistry*, Vol. 253(1), hal. 101-106.
- Jahoda, C. A., & Reynolds, A. J. (2001), "Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing", *The Lancet*, Vol. 358(9291), hal. 1445-1448.
- José, C., Gutiérrez, A., Hernando, M., Landín, P., Romero, J. and Martínez, Á. T. (2005), "Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Vol. 74(1-2), hal. 110-115.
- Kamoun, E.A., Kenawy, E.R.S. and Chen, X. (2017), "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings", *Journal of advanced research*, Vol. 8(3), hal. 217-233.
- Kaplan, E. N., & Hentz, V. R. (1984). *Emergency management of skin and soft tissue wounds: an illustrated guide*. Little, Brown.
- Kawaguti, H. Y., Manrich, E., dan Sato, H. H. (2006). "Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate". *Biochemical engineering journal*, Vol. 29(3), hal. 270-277.

- Kingsley, A. (2003), "The Wound Infection Continuum and Its Application to Clinical Practice", *Ostomy Wound Manage*, Vol. 49, 7A Suppl, hal. 1-7.
- Kinnunen, A., Maijala, P., JArvinen, P. and Hatakka, A. (2017). "Improved efficiency in screening for lignin-modifying peroxidases and laccases of basidiomycetes". *Current Biotechnology*, Vol. 6(2), hal 105-115.
- Klein, M. P., Scheeren, C. W., Lorenzoni, A. S. G., Dupont, J., Frazzon, J., dan Hertz, P. F. (2011). "Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization". *Process biochemistry*, Vol. 46(6), hal. 1375-1379.
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E. and Elisashvili, V. (2016). "Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes". *Annals of Agrarian Science*, Vol. 14(3), hal. 169-176.
- Laato, M., Niinikoski, J., Lundberg, C. dan Gerdin, B. (1988), "Inflammatory Reaction and Blood Flow in Experimental Wounds Inoculated with *Staphylococcus aureus*", *Eur Surg Res*, Vol. 20(1), hal. 33-38.
- Lee, Y. H., Chang, J. J., Chien, C. T., Yang, M. C., dan Chien, H. F. (2012). "Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats". *Experimental diabetes research*, 2012.
- Lehninger, A.L. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry: David L. Nelson, Michael M. Cox*, Recording for the Blind & Dyslexic, New York.
- Lionelli, G. T., & Lawrence, W. T. (2003), "Wound dressings", *Surgical Clinics*, Vol. 83(3), hal. 617-638.
- Lister, J.L. and Horswill, A.R. (2014). "Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal". *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Vol. 4, hal. 178.
- Liu, S., dan Li, L. (2016). "Thermoreversible gelation and scaling behavior of Ca²⁺-induced κ-carrageenan hydrogels". *Food Hydrocolloids*, Vol. 61, hal. 793-800.
- Ludwig, R., Harreither, W., Tasca, F. dan Gorton, L. (2010) "Cellobiose Dehydrogenase: A Versatile Catalyst for Electrochemical Applications", *Chem. Phys. Chem.*, Vol. 11, hal. 2674-2697.

- Ludwig, R., Salamon, A., Varga, J., Zamocky, M., Peterbauer, C.K., Kulbe, K.D. dan Haltrich, D. (2004), "Characterisation of cellobiose dehydrogenases from the white-rot fungi *Trametes pubescens* and *Trametes villosa*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 64, hal. 213-222.
- MacArtain, P., Jacquier, J. C., dan Dawson, K. A. (2003). "Physical characteristics of calcium induced κ -carrageenan networks". *Carbohydrate Polymers*, Vol. 53(4), hal. 395-400.
- Mann, A., Niekisch, K., Schirmacher, P., & Blessing, M. (2006), "Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing". *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Vol. 11(1), hal. 87-92.
- McCarty, S.M., Cochrane, C.A., Clegg, P.D. dan Percival, S.L. (2012), "The Role of Endogenous and Exogenous Enzymes in Chronic Wounds: a Focus on The Implications of Aberrant Levels of Both Host and Bacterial Proteases in Wound Healing", *Wound Repair Regen*, Vol. 20, hal. 125-136.
- Michel, A. S., Mestdagh, M. M., dan Axelos, M. A. V. (1997). "Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations". *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 21(1), hal. 195-200.
- Morris, E. R., Rees, D. A., Norton, I. T., dan Goodall, D. M. (1980). "Calorimetric and chiroptical evidence of aggregate-driven helix formation in carrageenan systems". *Carbohydrate Research*, Vol. 80(2), hal. 317-323.
- Morris, P. J., & Wood, W. C. (2000), *Oxford Textbook of Surgery (3-Volume Set)*, Oxford University Press, Oxford.
- Nazir (2003), *Metode Penelitian*, Ghalia Indonesia, Jakarta.
- Nguyen, B. T., Nicolai, T., Benyahia, L., dan Chassenieux, C. (2014). "Synergistic effects of mixed salt on the gelation of κ -carrageenan". *Carbohydrate polymers*, Vol. 112, hal. 10-15.
- Nutan, M. M., Goel, T., Das, T., Malik, S., Suri, S., Rawat, A. K. S., Srivastava, S.K., Tuli, R., Malhotra, S. & Gupta, S. K. (2013), "Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through

- inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity”, *The Indian journal of medical research*, Vol. 137(3), 540.
- Nyanhongo, G. S., Sygmund, C., Ludwig, R., Prasetyo, E. N., & Guebitz, G. M. (2013a), “Synthesis of multifunctional bioresponsive polymers for the management of chronic wounds”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 101(5), hal. 882-891.
- Nyanhongo, G.S., Sygmund, C., Ludwig, R., Prasetyo, E.N. dan Guebitz, G.M., (2013), “An Antioxidant Regenerating System for Continuous Quenching of Free Radicals in Chronic Wounds”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharaceutics*, Vol. 83(3), hal 396-404.
- Patt, R., Kordsachia, O. and Süttinger, R. (2002). *Pulp in Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley Online Library, Germany.
- Pramono, B. H., Husein, R. A. J., & Tasminatun, S. (2016), “Pengaruh Kitosan secara Topikal terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimiawi pada Kulit Rattus norvegicus”, *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, Vol. 12(3), 177-187.
- Rabinovich, M.L., Vasil’chenko, L.G., Karapetyan, K.N., Shumakovich, G.P., Yershevich, O.P., Ludwig, R., Haltrich, D., Hadar, Y., Kozlov, Y.P. dan Yaropolov, A.I. (2007), “Application of Cellulose-based Self Assembled Tri-enzyme System in a Pseudo-reagent-less Biosensor for Biogenic Catecholamine Detection”, *Biotechnol. J.*, Vol. 2, hal. 546-558.
- Ramakrishnan, K. M., Babu, M., Mathivanan, V. J., & Shankar, J. (2013), “Advantages of collagen based biological dressings in the management of superficial and superficial partial thickness burns in children”, *Annals of burns and fire disasters*, Vol. 26(2), hal. 98.
- Roy, B. P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A. A., dan Archibald, F. S. (1996). “Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*”. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 62(12), hal. 4417-4427.
- Roy, N., Saha, N., Humpolicek, P., & Saha, P. (2010), “Permeability and biocompatibility of novel medicated hydrogel wound dressings”, *Soft Materials*, Vol. 8(4), hal. 338-357.

- Roy, S., Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T.K. dan Sen, C.K. (2006), “Dermal Wound Healing is Subject to Redox Control”, *Mol Ther*, Vol. 13, hal. 211-220.
- Safina, G., Ludwig, R. dan Gorton, L. (2010), “A Simple and Sensitive Method for Lactose Detection Based on Direct Electron Transfer Between Immobilised Cellobiose Dehydrogenase and Screen-printed Carbon Electrodes”, *Electrochim. Acta*, Vol. 55, hal. 7690-7695.
- Schäfer, M., dan Werner, S. (2008). “Oxidative stress in normal and impaired wound repair”. *Pharmacological Research*, 58(2), 165-171.
- Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M. dan Babilas, P. (2010), “Oxygen in Acute and Chronic Wound Healing”, *Br J Dermatol*, Vol. 163, hal. 257-268.
- Sen, C.K. dan Roy, S. (2008), “Redox Signals in Wound Healing”, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1780, hal. 1348-1361.
- Shchipunov, Y. A. (2003). “Sol–gel-derived biomaterials of silica and carrageenans”. *Journal of colloid and interface science*, Vol. 268(1), hal. 68-76.
- Singh, B. D. (2009), *Biotechnology expanding horizons*, Kalyani, India.
- Singh, O., Gupta, S. S., Soni, M., Moses, S., Shukla, S., & Mathur, R. K. (2011), “Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: a retrospective study”, *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, Vol. 4(1), hal. 12.
- Singh, T.R.R., Laverty G., and Donnelly, R.F., (2018), *Hydrogels – Design, Synthesis and Application in Drug Delivery and Regenerative Medicine*, CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Sohi, K. K., Mittal, N., Hundal, M. K., & Khanduja, K. L. (2003), “Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism”, *Journal of nutritional science and vitaminology*, Vol. 49(4), hal. 221-227.
- Sood, A., Granick, M. S., & Tomaselli, N. L. (2014), “Wound dressings and comparative effectiveness data”, *Advances in wound care*, Vol. 3(8), hal. 511-529.

- Stashak, T. S., Farstvedt, E., & Othic, A. (2004), "Update on wound dressings: indications and best use", *Clinical Techniques in Equine Practice*, Vol. 3(2), hal. 148-163.
- Stoica, L., Ludwig, R., Haltrich, D. dan Gorton, L. (2006), "Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase", *Anal. Chem*, Vol. 78, hal. 393-398.
- Suckow, M.A., Brayton, C. and Danneman, P. (2000), *The laboratory mouse*, CRC press, Boca Raton.
- Sulej, J., Janusz, G., Osińska-Jaroszuk, M., Małek, P., Mazur, A., Komanińska, I., Choma, A. dan Rogalski, J. (2013). "Characterization of Cellobiose Dehydrogenase and its FAD-Domain from Ligninolytic Basidiomycete *Pycnoporus sanguineus*". *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 53, hal. 427-437.
- Swaim, S. F., Bradley, D. M., & Hinkle, S. H. (2001), "Wound contraction: basic and clinical factors". *Compendium on Continuing Education or The Practising Veterinarian-North American Edition*, Vol. 23(1), hal. 20-35.
- Tan, T.C., Kracher D., Gandini, R., Sygmond, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hallberg, B.M., Ludwig, R. dan Divne, C. (2015), "Structural Basis for Cellobiose Dehydrogenase Action During Oxidative Cellulose Degradation", *Nat Commun*, Vol. 6, hal. 542.
- Trilaksani, W. (2003), *Antioksidan: jenis, sumber, mekanisme kerja dan peran terhadap kesehatan*, Graduate Program S3, Term Paper Introductory Science Philosophy (PPS702).
- Vazirian, M., Khanavi, M., Amanzadeh, Y., & Hajimehdipour, H. (2011), "Quantification of gallic acid in fruits of three medicinal plants", *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, Vol. 10(2), hal. 233.
- Warburg, O. (1956), "On the Origin of Cancer Cells", *Science (80-)*, Vol. 123, hal. 309-314.
- Wardenburg, J.B., Bae, T., Otto, M., DeLeo, F.R. and Schneewind, O. (2007), "Poring over pores: α -hemolysin and Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia", *Nature medicine*, Vol. 13(12), hal. 1405.

- Wolcott, R.D., Rhoads, D.D. and Dowd, S.E. (2008), “Biofilms and chronic wound inflammation”, *Journal of wound care*, Vol. 17(8), hal. 333-341.
- Yang, Q., Phillips, P.L., Sampson, E.M., Progulske-Fox, A., Jin, S., Antonelli, P. dan Schultz, G.S. (2013), “Development of a Novel ex vivo Porcine Skin Explant Model for the Assessment of Mature Bacterial Biofilms”, *Wound Repair Regen*, Vol. 21, hal. 704-714.
- Yates, C.C., Whaley, D., Babu, R., Zhang, J., Krishna, P., Beckman, E., Pasculle, A.W. dan Wells, A. (2007), “The Effect of Multifunctional Polymer-based Gels on Wound Healing in Full Thickness Bacteria-Contaminated Mouse Skin Wound Models”, *Biomaterials*, Vol. 28, No. 27, hal. 3977-3986.
- Zamocky, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C. dan Haltrich, D. (2004), “Ancestral Gene Fusion in Cellobiose Dehydrogenases Reflects a Specific Evolution of GMC Oxidoreductases in Fungi”, *Gene*, Vol.338, hal. 1-14.

“halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 1. Keterangan kelaikan etik penelitian.



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 3.KE.111.07.2018

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Analisis *In Vivo* Hidrogel Penutup Luka Berbasis Enzimatik Sebagai Penyembuh Luka Kronis Pada Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan

PENELITI UTAMA : M. Ainul Mahbubillah

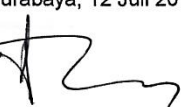
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Magister Biologi
Fakultas MIPA
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

DINYATAKAN : LAIK ETIK

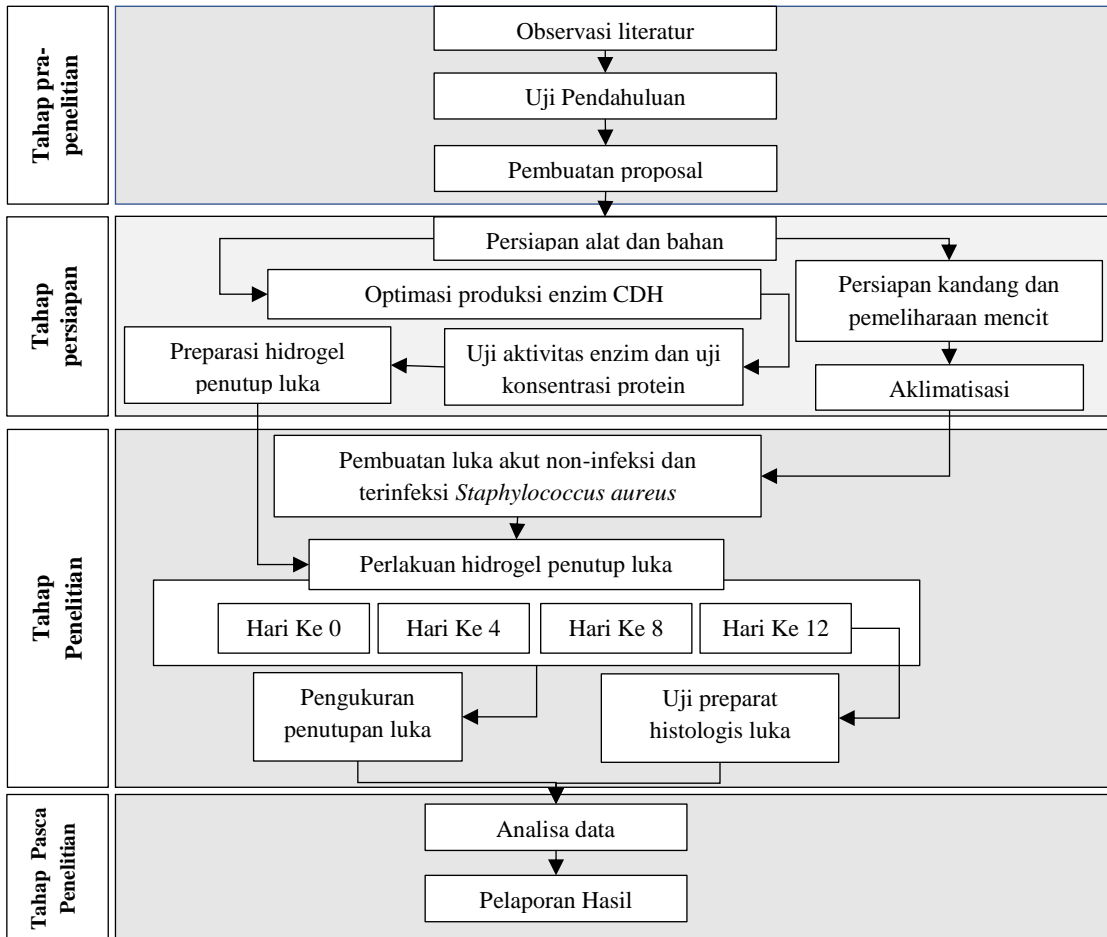
Surabaya, 12 Juli 2018

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,

Prof. Dr. Pujji Sianto, M.Kes., Drh.
NIP. 195301051986011001

Ketua

Dr. Nusdianto Triakoso, M.P., Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 2. Diagram alur penelitian

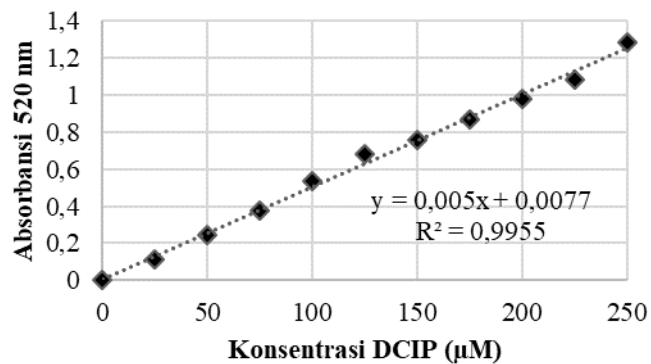


Lampiran 3. Kurva standar 2,6-dichlorophenol indophenol (DCIP)

A. Hasil pengukuran absorbansi DCIP pada panjang gelombang 520 nm.

Konsentrasi DCIP (μM)	Absorbansi $\lambda = 520 \text{ nm}$
0	0
25	0,117
50	0,243
75	0,378
100	0,532
125	0,681
150	0,756
175	0,865
200	0,979
225	1,079
250	1,279

B. Kurva standar DCIP.



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan linear $y = 0,005x$ dengan $R^2 = 0,9954$.

Slope untuk kurva standar DCIP adalah 0,005.

Lampiran 4. Perhitungan aktivitas enzim *cellobiose dehydrogenase* (CDH)

Hari	Substrat	Persamaan linear (Y)	R ²	Slope Uji aktivitas	Slope DCIP	Faktor pengenceran	Waktu inkubasi (menit)	Aktivitas enzim (U/ml)
2	TIS	-1E-05x + 0.5021	0,6486	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
2	WAT	-1E-05x + 0.4927	0,8414	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
2	LAK	-1E-05x + 0.5065	0,5341	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
2	VIT	-1E-05x + 0.5095	0,4996	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
2	CMC	-2E-05x + 0.5093	0,5544	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
2	MET	-1E-05x + 0.5059	0,5111	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
3	TIS	-2E-06x + 0.5073	0,1525	0,000002	0,005	0,01	0,01667	2.4
3	WAT	-2E-06x + 0.3639	0,0989	0,000002	0,005	0,01	0,01667	2.4
3	LAK	-1E-05x + 0.5209	0,5059	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
3	VIT	-5E-06x + 0.371	0,4084	0,000005	0,005	0,01	0,01667	6
3	CMC	-2E-05x + 0.5142	0,772	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
3	MET	-8E-06x + 0.3746	0,5407	0,000008	0,005	0,01	0,01667	9.6
4	TIS	-6E-05x + 0.5935	0,9669	0,00006	0,005	0,01	0,01667	72
4	WAT	-4E-05x + 0.5896	0,9689	0,00004	0,005	0,01	0,01667	48
4	LAK	-1E-05x + 0.3855	0,4716	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
4	VIT	-2E-05x + 0.5926	0,92	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
4	CMC	1E-06x + 0.3976	0,0508	0,000001	0,005	0,01	0,01667	1.2
4	MET	1E-06x + 0.4091	0,0482	0,000001	0,005	0,01	0,01667	1.2
5	TIS	-9E-05x + 0.6132	0,974	0,00009	0,005	0,01	0,01667	108
5	WAT	-6E-05x + 0.6038	0,9385	0,00006	0,005	0,01	0,01667	72
5	LAK	-1E-05x + 0.6154	0,5845	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
5	VIT	-3E-05x + 0.6164	0,8597	0,00003	0,005	0,01	0,01667	36
5	CMC	-2E-05x + 0.5984	0,8116	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
5	MET	-1E-05x + 0.6038	0,4473	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
6	TIS	-0.0001x + 0.5834	0,9923	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120
6	WAT	-7E-05x + 0.5684	0,9602	0,00007	0,005	0,01	0,01667	84
6	LAK	-9E-06x + 0.5779	0,6819	0,000009	0,005	0,01	0,01667	10.8
6	VIT	-5E-05x + 0.576	0,972	0,00005	0,005	0,01	0,01667	60
6	CMC	-2E-05x + 0.5751	0,8427	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
6	MET	-2E-05x + 0.5869	0,6995	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
7	TIS	-0.0002x + 0.5833	0,9975	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240
7	WAT	-8E-05x + 0.5832	0,9733	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
7	LAK	-5E-06x + 0.5892	0,3341	0,000005	0,005	0,01	0,01667	6
7	VIT	-6E-05x + 0.5901	0,9894	0,00006	0,005	0,01	0,01667	72
7	CMC	-2E-05x + 0.578	0,8612	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24

Hari	Substrat	Persamaan linear (Y)	R ²	Slope Uji aktivitas	Slope DCIP	Faktor pengenceran	Waktu inkubasi (menit)	Aktivitas enzim (U/ml)
7	MET	-2E-05x + 0.5825	0,8758	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
8	TIS	-0.0002x + 0.5745	0,9992	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240
8	WAT	-8E-05x + 0.5962	0,9917	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
8	LAK	-5E-07x + 0.5721	0,0053	0,0000005	0,005	0,01	0,01667	0.6
8	VIT	-5E-05x + 0.5739	0,983	0,00005	0,005	0,01	0,01667	60
8	CMC	-2E-05x + 0.5801	0,8382	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
8	MET	-2E-05x + 0.59	0,9184	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
9	TIS	-0.0003x + 0.6218	0,9958	0,0003	0,005	0,01	0,01667	360
9	WAT	-1E-04x + 0.6247	0,9882	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120
9	LAK	-5E-06x + 0.6398	0,0671	0,000005	0,005	0,01	0,01667	6
9	VIT	-7E-05x + 0.588	0,996	0,00007	0,005	0,01	0,01667	84
9	CMC	-2E-05x + 0.5867	0,8876	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
9	MET	-3E-05x + 0.6194	0,7642	0,00003	0,005	0,01	0,01667	36
10	TIS	-0.0003x + 0.5191	0,9987	0,0003	0,005	0,01	0,01667	360
10	WAT	-0.0001x + 0.5454	0,9925	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120
10	LAK	-2E-05x + 0.5713	0,9925	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
10	VIT	-8E-05x + 0.5442	0,9848	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
10	CMC	-2E-05x + 0.6461	0,737	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
10	MET	-2E-05x + 0.5386	0,7878	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
11	TIS	-0.0002x + 0.416	0,9976	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240
11	WAT	-9E-05x + 0.4004	0,9912	0,00009	0,005	0,01	0,01667	108
11	LAK	-9E-06x + 0.4314	0,4301	0,000009	0,005	0,01	0,01667	10.8
11	VIT	-8E-05x + 0.4096	0,9203	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
11	CMC	-2E-05x + 0.4159	0,7053	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
11	MET	-1E-05x + 0.4218	0,6961	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
12	TIS	-0.0002x + 0.3945	0,9994	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240
12	WAT	-8E-05x + 0.4127	0,953	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
12	LAK	-1E-05x + 0.3991	0,842	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
12	VIT	-8E-05x + 0.3836	0,9971	0,00008	0,005	0,01	0,01667	96
12	CMC	-8E-06x + 0.3942	0,7447	0,000008	0,005	0,01	0,01667	9.6
12	MET	-1E-05x + 0.3949	0,873	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
13	TIS	-0.0002x + 0.4055	0,9936	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240
13	WAT	-7E-05x + 0.4094	0,9203	0,00007	0,005	0,01	0,01667	84
13	LAK	-2E-05x + 0.4076	0,5819	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24
13	VIT	-0.0001x + 0.3997	0,9837	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120
13	CMC	-2E-05x + 0.4183	0,6008	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24

Hari	Substrat	Persamaan linear (Y)	R ²	Slope Uji aktivitas	Slope DCIP	Faktor pengenceran	Waktu inkubasi (menit)	Aktivitas enzim (U/ml)
13	MET	-1E-05x + 0.3996	0,2066	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
14	TIS	-0.0003x + 0.383	0,9971	0,0003	0,005	0,01	0,01667	360
14	WAT	-7E-05x + 0.3932	0,957	0,00007	0,005	0,01	0,01667	84
14	LAK	-1E-05x + 0.4147	0,3635	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
14	VIT	-0.0001x + 0.3774	0,9978	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120
14	CMC	-1E-05x + 0.4158	0,3853	0,00001	0,005	0,01	0,01667	12
14	MET	-2E-05x + 0.4607	0,7663	0,00002	0,005	0,01	0,01667	24

Keterangan:

CMC = karboksi metil selulosa

LAK = laktosa

MET = Metolose (metil selulosa)

TIS = tissue toilet Nice

VIT = Vitacel (kristal selulosa)

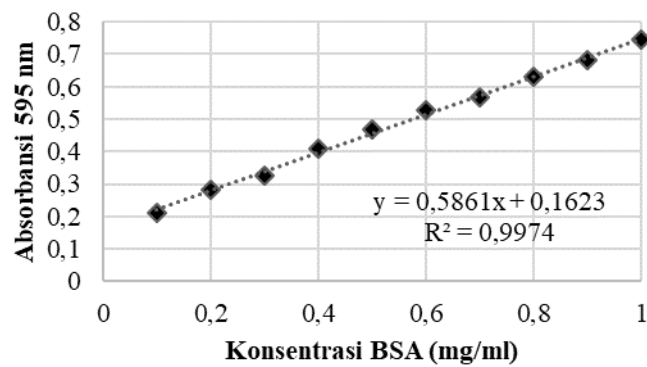
WAT = kertas saring Whatman No. 1

Lampiran 5. Kurva standar *bovine serum albumin* (BSA)

A. Hasil pengukuran absorbansi BSA pada panjang gelombang 595 nm.

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi $\lambda = 595 \text{ nm}$
0,1	0,212
0,2	0,281
0,3	0,326
0,4	0,408
0,5	0,467
0,6	0,526
0,7	0,567
0,8	0,632
0,9	0,682
1	0,745

B. Kurva standar BSA



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan linear $y = 0,5861x + 0,1623$ dengan $R^2 = 0,9974$. Slope untuk kurva standar BSA adalah 0.5861.

Lampiran 6. Pengukuran konsentrasi protein ekstrak enzim kasar CDH

A. Pengukuran konsentrasi protein pada ekstrak enzim kasar CDH hari ke 14

Substrat	Absorbansi $\lambda = 595 \text{ nm}$	Slope kurva standar BSA	Konsentrasi protein (mg/ml)
TIS	0,113	0,5861	0,1928
WAT	0,076	0,5861	0,129671
LAK	0,017	0,5861	0,029005
VIT	0,063	0,5861	0,10749
CMC	0,009	0,5861	0,015356
MET	0,014	0,5861	0,023887

B. Aktivitas spesifik ekstrak enzim kasar CDH

Substrat	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
TIS	360	0,193	1867,221
WAT	84	0,130	647,795
LAK	12	0,029	413,718
VIT	120	0,107	1116,381
CMC	12	0,015	781,467
MET	24	0,024	1004,743

Keterangan:

CMC = karboksi metil selulosa

LAK = laktosa

MET = Metolose (metil selulosa)

TIS = tissue toilet Nice

VIT = Vitacel (kristal selulosa)

WAT = kertas saring Whatman No. 1

Lampiran 7. Aktivitas ekstrak enzim kasar CDH (substrat TIS) pada berbagai konsentrasi substrat laktosa

A. Aktivitas enzim

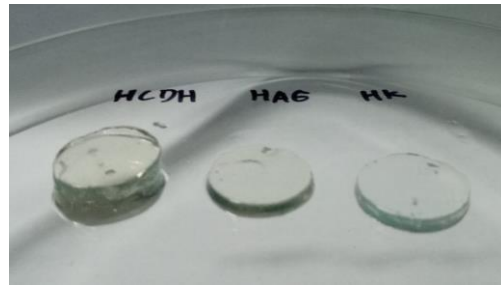
Konsentrasi substrat, [S] (mM)	Y	R ²	Slope	Slope DCIP	Faktor pengenceran	Waktu inkubasi (menit)	Kecepatan reaksi, V ₀ (μM/menit)	1/[S]	1/V ₀
1	-5E-05x + 0.4398	0,9572	0,00005	0,005	0,01	0,01667	60	1,000	0,017
3	-0.0001x + 0.4466	0,9831	0,0001	0,005	0,01	0,01667	120	0,333	0,008
5	-0.0002x + 0.4380	0,9945	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,200	0,004
7	-0.0002x + 0.4736	0,9926	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,143	0,004
10	-0.0002x + 0.4786	0,9964	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,100	0,004
40	-0.0002x + 0.4308	0,9955	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,025	0,004
80	-0.0002x + 0.4531	0,9907	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,013	0,004
120	-0.0002x + 0.4492	0,9972	0,0002	0,005	0,01	0,01667	240	0,008	0,004

Lampiran 8. Hidrogel penutup luka

A. Hidrogel tampak atas



B. Hidrogel tampak samping



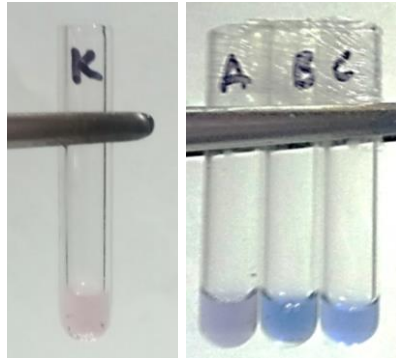
Keterangan

HCDH = Hidrogel berbasis enzimatis CDH

HAG = Hidrogel asam galat

HK = Hidrogel kosong

Lampiran 9. Pengujian hidrogel pada larutan DCIP



Keterangan:

K = Larutan DCIP dan NaF

A = Hidrogel berbasis enzimatis CDH

B = Hidrogel asam galat

C = Hidrogel kosong

Lampiran 10. Konfirmasi jumlah bakteri *Staphylococcus aureus*

A. Konfirmasi jumlah bakteri *S. aureus* pada media *nutrient agar* (NA)

Pengenceran	Jumlah koloni		Rata-rata	Perkiraan Jumlah bakteri (cfu/ml)
	Cawan 1	Cawan 2		
10^{-7}	155	164	159,5	$1,6 \times 10^9$
10^{-8}	18	16	17	$1,7 \times 10^9$
10^{-9}	0	1	0,5	5×10^8

Perkiraan jumlah bakteri diambil dari pengenceran yang mempunyai jumlah koloni antara 30-300 yaitu pada pengenceran 10^{-7} . Sehingga perkiraan jumlah bakteri *S. aureus* adalah **$1,6 \times 10^9$ cfu/ml**.

B. Jumlah bakteri yang digunakan pada saat infeksi luka

Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi luka adalah sebanyak 10 μ l pada pengenceran 10^{-3} (Jumlah bakteri $1,6 \times 10^6$). Sehingga perkiraan jumlah bakteri yang ada pada luka adalah **$1,6 \times 10^4$ cfu/ml**.

Lampiran 11. Perawatan hewan uji

A. Hewan uji



B. Kondisi kandang perawatan hewan uji



C. Kotak kandang perawatan mencit



D. Kandungan pakan Phokphand 511





Kandungan	Kadar
Air	11 – 12 %
Protein kasar	21 – 23 %
Lemak	5 – 8 %
Serat kasar	3 – 5 %
Abu	4 – 7 %
Kalori	2.800 – 3.100 %



Lampiran 12. Berat badan selama aklimatisasi

Kode	Tanggal penimbangan									Penggunaan	
	10/6/2019	10/13/2019	10/21/2019	10/26/2019	11/4/2019	11/12/2019	11/17/2019	11/24/2019	12/5/2019	Jenis luka	Perlakuan
F3	35	38	41	38	37	39	40	41	42	Non-infeksi	Hidrogel CDH
C8	36	37	31	38	33	33	36	35	37	Non-infeksi	Hidrogel CDH
B4	36	38	36	41	41	41	42	41	43	Non-infeksi	Hidrogel CDH
A3	35	36	35	38	37	39	39	40	40	Non-infeksi	Hidrogel CDH
C5	42	43	44	45	44	44	43	44	44	Non-infeksi	Hidrogel asam galat
D6	40	41	45	42	45	44	42	41	41	Non-infeksi	Hidrogel asam galat
A1	34	35	37	36	42	39	40	39	39	Non-infeksi	Hidrogel asam galat
E8	28	32	35	30	34	37	38	39	41	Non-infeksi	Hidrogel asam galat
D4	38	38	40	40	38	44	42	42	40	Non-infeksi	Tanpa hidrogel
B6	30	30	29	31	32	37	36	36	36	Non-infeksi	Tanpa hidrogel
C7	32	33	32	34	38	38	38	41	41	Non-infeksi	Tanpa hidrogel
B2	27	30	27	33	33	37	38	39	40	Non-infeksi	Tanpa hidrogel
D3	31	36	42	34	33	36	36	35	35	Non-infeksi	Hidrogel kosong
D5	27	30	31	32	32	43	42	41	41	Non-infeksi	Hidrogel kosong
D7	35	37	38	39	36	36	38	40	41	Non-infeksi	Hidrogel kosong
E2	37	31	36	41	34	42	42	41	40	Non-infeksi	Hidrogel kosong
E4	32	34	36	32	36	37	38	37	38	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH
A6	31	31	35	34	32	31	34	36	36	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH
A5	31	36	37	38	38	37	38	37	40	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH
C2	28	31	33	34	37	37	36	38	40	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH
C4	34	35	37	37	35	33	36	38	39	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat
B3	31	34	40	38	39	42	42	41	43	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat
B1	34	36	37	40	37	42	41	42	43	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat
D8	27	28	32	33	33	33	34	35	38	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat
E3	24	30	35	34	34	37	36	37	37	Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel
B5	26	28	29	36	39	41	39	40	41	Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel
E1	38	37	39	44	40	43	41	43	43	Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel
D1	32	37	40	39	40	42	41	40	39	Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel
A4	35	37	38	36	36	38	39	41	42	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong
A8	30	32	35	33	32	32	36	36	38	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong
B7	30	31	33	37	32	34	37	41	43	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong
C1	33	39	37	34	38	36	40	41	42	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong
Mean	32	34	36	37	36	38	39	39	40		
SEM	0.7	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.5	0.4	0.4		

Lampiran 13. Dokumentasi pembuatan luka akut non-infeksi dan luka akut terinfeksi

S. aureus

No.	Dokumentasi Kegiatan
1	<p>Pencukuran mencit</p> 
2	<p>Pelukaan mencit</p> 
3	<p>Pemberian bakteri <i>Staphylococcus aureus</i></p> 
4	<p>Penempelan hidrogel penutup luka</p> 

No.	Dokumentasi Kegiatan
5	<p data-bbox="347 310 597 340">Proses pemerbanan</p> 
6	<p data-bbox="347 840 701 869">Recovery pada <i>heating pad</i></p> 

Lampiran 14. Pengukuran berat badan selama perlakuan

Jenis Luka	Perlakuan	Hari	Berat badan (gram)				Mean	SEM	Persen berat badan				Mean	SEM
			1	2	3	4			1	2	3	4		
Non-infeksi	Hidrogel CDH	0	42	37	43	40	40,50	1,32	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	4	38	36	36	37	36,75	0,48	90%	97%	84%	93%	91%	3%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	8	36	40	38	38	38,00	0,82	86%	108%	88%	95%	94%	5%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	12	37	40	38	36	37,75	0,85	88%	108%	88%	90%	94%	5%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	0	39	-	39	41	39,67	0,67	100%	-	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	4	40	-	34	32	35,33	2,40	103%	-	87%	78%	89%	7%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	8	32	-	35	34	33,67	0,88	82%	-	90%	83%	85%	2%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	12	32	-	34	33	33,00	0,58	82%	-	87%	80%	83%	2%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	0	35	41	41	40	39,25	1,44	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	4	32	44	34	38	37,00	2,65	91%	107%	83%	95%	94%	5%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	8	32	41	31	36	35,00	2,27	91%	100%	76%	90%	89%	5%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	12	31	-	31	35	32,33	1,33	89%	-	76%	88%	84%	4%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	0	40	36	41	40	39,25	1,11	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	4	36	31	35	39	35,25	1,65	90%	86%	85%	98%	90%	3%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	8	38	31	37	37	35,75	1,60	95%	86%	90%	93%	91%	2%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	12	40	30	38	37	36,25	2,17	100%	83%	93%	93%	92%	3%

Jenis Luka	Perlakuan	Hari	Berat badan (gram)				Mean	SEM	Persen berat badan				Mean	SEM
			1	2	3	4			1	2	3	4		
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	0	39	36	40	40	31,00	0,95	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	4	33	35	38	43	37,25	2,17	85%	97%	95%	108%	96%	5%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	8	39	33	37	43	38,00	2,08	100%	92%	93%	108%	98%	4%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	12	33	33	35	42	35,75	2,14	85%	92%	88%	105%	92%	5%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	0	39	43	43	38	40,75	1,31	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	4	34	35	39	35	35,75	1,11	87%	81%	91%	92%	88%	2%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	8	37	36	39	33	36,25	1,25	95%	84%	91%	87%	89%	2%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	12	34	36	37	32	34,75	1,11	87%	84%	86%	84%	85%	1%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	0	42	38	43	42	41,25	1,11	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	4	32	34	38	46	37,50	3,10	76%	89%	88%	110%	91%	7%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	8	34	36	37	36	35,75	0,63	81%	95%	86%	86%	87%	3%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	12	34	35	38	35	35,50	0,87	81%	92%	88%	83%	86%	3%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	0	37	41	43	39	40,00	1,29	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	4	34	37	42	39	38,00	1,68	92%	90%	98%	100%	95%	2%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	8	35	40	42	40	39,25	1,49	95%	98%	98%	103%	98%	2%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	12	32	37	42	-	37,00	2,89	86%	90%	98%	-	91%	3%

Lampiran 15. Uji ANOVA One-way persentase berat badan

Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0,957	3	12	0,444

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

ANOVA^a

Persen berat badan
hari ke-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,017	3	0,006	0,710	0,564
Within Groups	0,097	12	0,008		
Total	0,114	15			

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0,918	3	11	0,464

a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

ANOVA^a

Persen berat badan
hari ke-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,005	3	0,002	0,249	0,861
Within Groups	0,080	11	0,007		
Total	0,086	14			

a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-8

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,136	3	12	0,374

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

ANOVA^a

Persen berat badan
hari ke-8

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,042	3	0,014	4,558	0,024
Within Groups	0,037	12	0,003		
Total	0,078	15			

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

Jenis Luka = Luka akut non-infeksi
Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-8

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,398	3	12	0,119

a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

ANOVA^a

Persen berat badan
hari ke-8

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,021	3	0,007	0,996	0,428
Within Groups	0,083	12	0,007		
Total	0,104	15			

a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

**Jenis Luka = Luka
akut terinfeksi S.
aureus**

Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-12

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,828	3	11	0,200

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

ANOVA^a

Persen berat badan
hari ke-12

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,014	3	0,005	1,345	0,310
Within Groups	0,039	11	0,004		
Total	0,054	14			

a. Jenis Luka = Luka akut terinfeksi S. aureus

Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

Test of Homogeneity of Variances^a

Persen berat badan
hari ke-12

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0,844	3	11	0,498

a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi


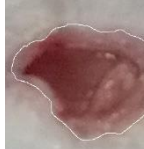







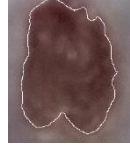



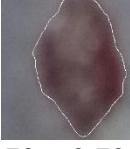


ANOVA^a











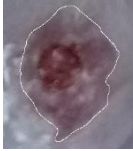

Persen berat badan
hari ke-12


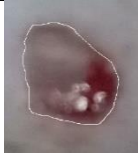


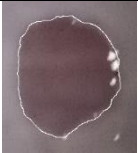


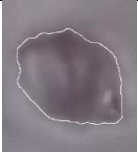




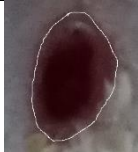


	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,029	3	0,010	1,930	0,183
Within Groups	0,056	11	0,005		
Total	0,085	14			





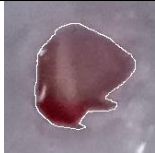




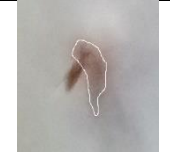






a. Jenis Luka = Luka akut non-infeksi

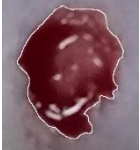



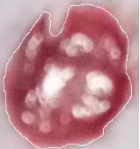
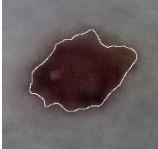


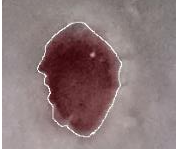
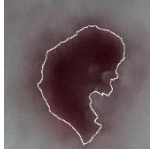



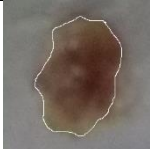


Lampiran 16. Data gambar pengukuran luas luka

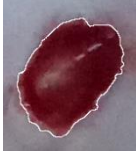
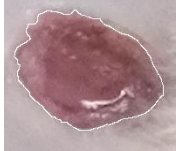



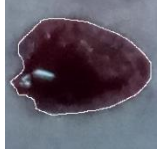
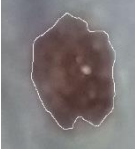





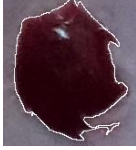

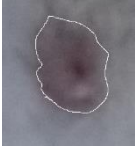

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Non-infeksi	Hidrogel berbasis enzimatik CDH	1	 0,71 × 0,80 cm	 0,90 × 0,78 cm	 0,70 × 0,70 cm	 0,80 × 0,70 cm
		2	 0,70 × 0,84 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,67 × 0,70 cm	 0,47 × 0,52 cm
		3	 0,73 × 0,80 cm	 0,65 × 0,80 cm	 0,82 × 0,90 cm	 0,80 × 0,70 cm
		4	 0,68 × 0,65 cm	 0,70 × 0,70 cm	 0,57 × 0,53	 0,80 × 0,70 cm

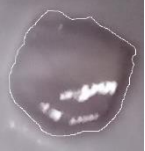



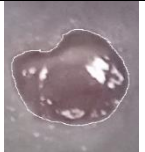











Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	1	 0,70 × 0,75 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,69 × 0,71 cm	 0,70 × 0,70 cm
		3	 0,80 × 1,00 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,73 × 0,70 cm	 0,80 × 0,70 cm
		4	 0,80 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,80 × 0,70 cm

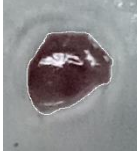







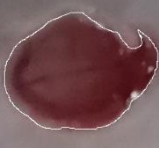






Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Non-infeksi	Hidrogel	1	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,66 × 0,70 cm	 0,68 × 0,70 cm
		2	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,90 × 0,97 cm	Hewan uji mati
		3	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,95 cm	 0,76 × 0,83 cm	 0,80 × 0,70 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,71 × 0,75 cm	 0,70 × 0,80 cm

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Non-infeksi	Tanpa Hidrogel	1	 0,78 × 0,80 cm	 0,70 × 0,66 cm	 0,44 × 0,45 cm	 0,70 × 0,62 cm
		2	 0,70 × 0,70 cm	 0,58 × 0,52 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,65 cm
		3	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,60 × 0,70 cm	 0,66 × 0,71 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,53 × 0,59 cm	 0,51 × 0,55 cm

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel berbasis enzimatik CDH	1	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,78 cm	 0,70 × 0,55 cm	 0,70 × 0,80 cm
		2	 0,72 × 0,80 cm	 0,70 × 0,70 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm
		3	 0,70 × 0,80 cm	 0,55 × 0,58 cm	 0,57 × 0,60 cm	 0,70 × 0,70 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,73 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	1	 0,70 × 0,80 cm	 0,81 × 0,72 cm	 0,55 × 0,76 cm	 0,70 × 0,75 cm
		2	 0,70 × 0,80 cm	 0,80 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm
		3	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,70 cm	 0,70 × 0,80 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,64 × 0,74 cm	 0,70 × 0,80 cm

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel	1	 0,74 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,84 × 0,87 cm	 0,70 × 0,80 cm
		2	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,81 × 0,86 cm	 0,70 × 0,70 cm
		3	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,65 × 0,70 cm	 0,67 × 0,60 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,83 cm	 0,61 × 0,76 cm	 0,70 × 0,80 cm

Jenis luka	Perlakuan	Ulangan	Gambar luka (Dimensi: panjang × lebar)			
			Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa Hidrogel	1	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,56 × 0,42 cm	 0,70 × 0,80 cm
		2	 0,70 × 0,68 cm	 0,70 × 0,80 cm	 0,70 × 0,54 cm	 0,70 × 0,80 cm
		3	 0,84 × 0,8 cm	 0,86 × 0,74 cm	 0,64 × 0,56 cm	 0,80 × 0,70 cm
		4	 0,70 × 0,80 cm	 0,80 × 0,61 cm	 0,70 × 0,49 cm	Hewan Uji Mati

Lampiran 17. Pengukuran luasan luka akut non-infeksi dan terinfeksi *S. aureus*

Jenis Luka	Perlakuan	Hari	Luas luka (cm ²)				Mean	SEM	Persen luas luka				Mean	SEM
			1	2	3	4			1	2	3	4		
Non-infeksi	Hidrogel CDH	0	0,256	0,307	0,299	0,228	0,273	0,019	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	4	0,316	0,277	0,270	0,185	0,262	0,028	123%	90%	90%	81%	96%	9%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	8	0,108	0,142	0,235	0,136	0,155	0,028	42%	46%	79%	60%	57%	8%
Non-infeksi	Hidrogel CDH	12	0,095	0,030	0,096	0,071	0,073	0,015	37%	10%	32%	31%	28%	6%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	0	0,140	-	0,429	0,369	0,313	0,088	100%	-	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	4	0,103	-	0,208	0,299	0,203	0,057	74%	-	48%	81%	68%	10%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	8	0,068	-	0,152	0,236	0,152	0,048	49%	-	35%	64%	49%	8%
Non-infeksi	Hidrogel asam galat	12	0,032	-	0,096	0,136	0,088	0,030	23%	-	22%	37%	27%	5%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	0	0,207	0,263	0,211	0,146	0,207	0,024	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	4	0,200	0,203	0,300	0,216	0,230	0,024	97%	77%	142%	148%	116%	17%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	8	0,106	0,194	0,122	0,049	0,118	0,030	51%	74%	58%	34%	54%	8%
Non-infeksi	Hidrogel kosong	12	0,085	-	0,05	0,039	0,058	0,014	41%	-	24%	27%	30%	5%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	0	0,155	0,153	0,173	0,164	0,161	0,005	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	4	0,090	0,033	0,040	0,057	0,055	0,013	58%	22%	23%	35%	34%	8%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	8	0,046	0,035	0,029	0,055	0,041	0,006	30%	23%	17%	34%	26%	4%
Non-infeksi	Tanpa hidrogel	12	0,037	0,033	0,01	0,000	0,020	0,009	24%	22%	6%	0%	13%	6%

Jenis Luka	Perlakuan	Hari	Luas luka (cm ²)				Mean	SEM	Persen luas luka				Mean	SEM
			1	2	3	4			1	2	3	4		
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	0	0,248	0,379	0,139	0,221	0,197	0,050	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	4	0,202	0,110	0,119	0,166	0,149	0,021	81%	29%	86%	75%	68%	13%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	8	0,126	0,102	0,105	0,146	0,120	0,010	51%	27%	76%	66%	55%	11%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	12	0,075	0,093	0,023	0,050	0,060	0,015	30%	25%	17%	23%	23%	3%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	0	0,227	0,254	0,264	0,292	0,259	0,013	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	4	0,277	0,270	0,251	0,193	0,248	0,019	122%	106%	95%	66%	97%	12%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	8	0,161	0,193	0,151	0,124	0,157	0,014	71%	76%	57%	42%	62%	8%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel asam galat	12	0,124	0,099	0,112	0,096	0,108	0,006	55%	39%	42%	33%	42%	5%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	0	0,312	0,219	0,240	0,205	0,244	0,024	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	4	0,251	0,166	0,160	0,199	0,194	0,021	80%	76%	67%	97%	80%	6%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	8	0,198	0,056	0,078	0,097	0,107	0,031	63%	26%	33%	47%	42%	8%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel kosong	12	0,124	0,023	0,056	0,037	0,060	0,022	40%	11%	23%	18%	23%	6%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	0	0,138	0,228	0,349	0,191	0,227	0,045	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	4	0,105	0,178	0,098	0,093	0,119	0,020	76%	78%	28%	49%	58%	12%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	8	0,010	0,018	0,038	0,017	0,021	0,006	7%	8%	11%	9%	9%	1%
Infeksi <i>S. aureus</i>	Tanpa hidrogel	12	0,005	0,006	0,038	-	0,016	0,011	4%	3%	11%	-	6%	3%

Lampiran 18. Uji Tukey persentase luas luka

Hari	Jenis Luka	Perlakuan	Hidrogel asam galat		Tanpa Hidrogel		Hidrogel Kosong	
			Signifikansi	Lambang	Signifikansi	Lambang	Signifikansi	Lambang
Persentase luas luka hari ke-4	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	0,295	ns	0,814	ns	0,913	ns
		Hidrogel asam galat			0,091	ns	0,675	ns
		Tanpa Hidrogel					0,490	ns
	Non-Infeksi	Hidrogel CDH	0,361	ns	0,011	*	0,945	ns
		Hidrogel asam galat			0,247	ns	0,210	ns
		Tanpa Hidrogel					0,007	**
Persentase luas luka hari ke-8	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	0,870	ns	0,003	**	0,651	ns
		Hidrogel asam galat			0,001	**	0,300	ns
		Tanpa Hidrogel					0,033	*
	Non-Infeksi	Hidrogel CDH	0,875	ns	0,029	*	0,971	ns
		Hidrogel asam galat			0,139	ns	0,694	ns
		Tanpa Hidrogel					0,022	*
Persentase luas luka hari ke-12	Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	0,045	*	0,044	*	0,986	ns
		Hidrogel asam galat			0,001	***	0,034	*
		Tanpa Hidrogel					0,091	ns
	Non-Infeksi	Hidrogel CDH	1,000	ns	0,309	ns	0,960	ns
		Hidrogel asam galat			0,381	ns	0,960	ns
		Tanpa Hidrogel					0,255	ns

Keterangan:

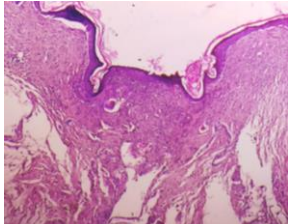
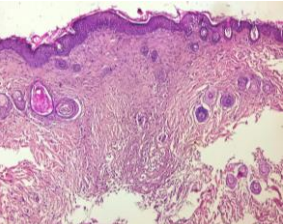
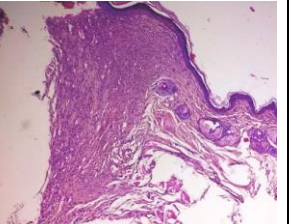
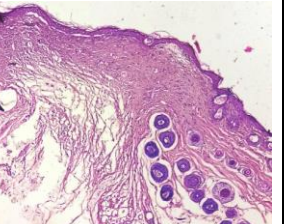
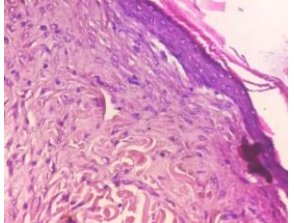
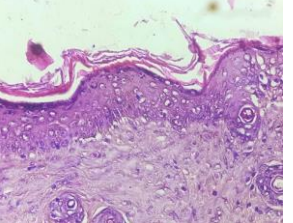
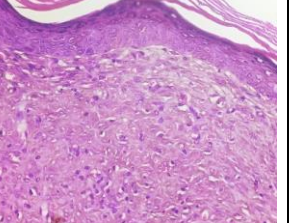
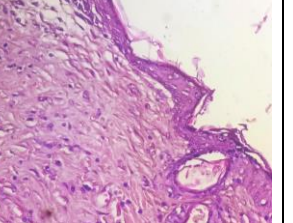
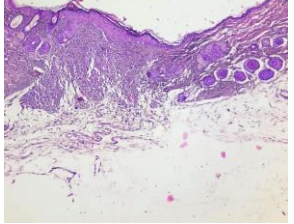
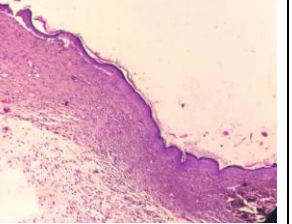
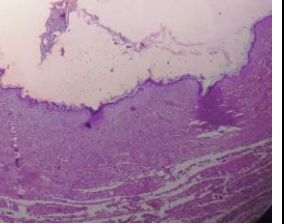
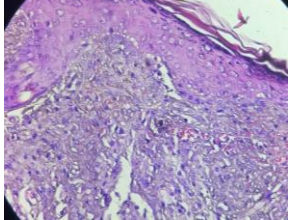
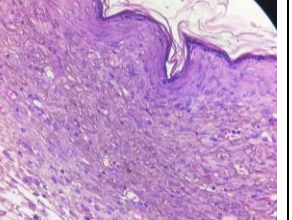
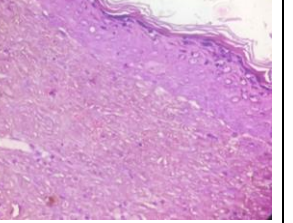
p<0,001 = ***

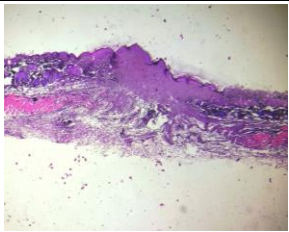
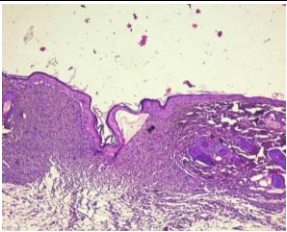
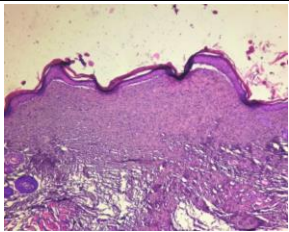
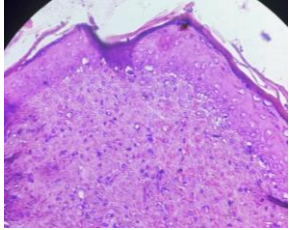
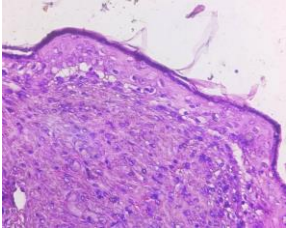
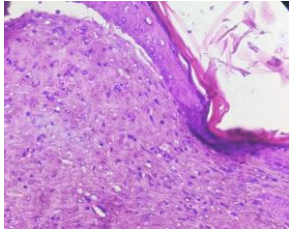
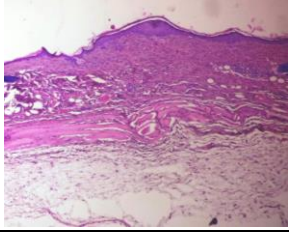
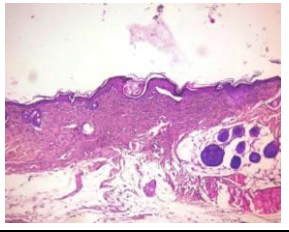
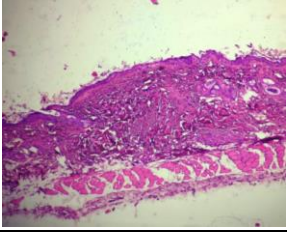
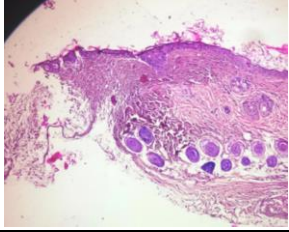
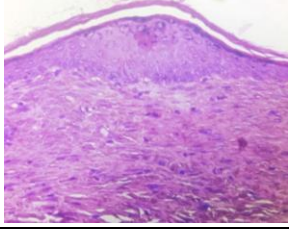
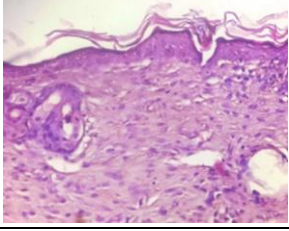
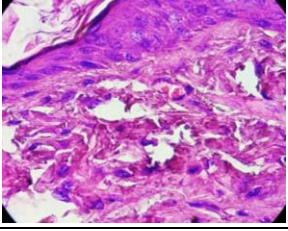
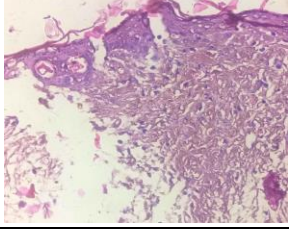
p<0,01 = **

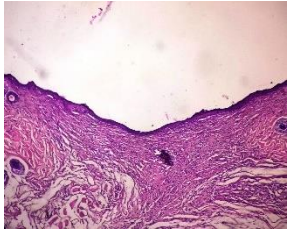
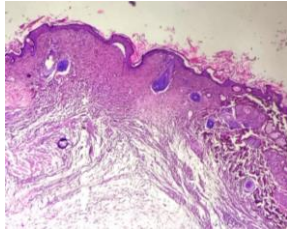
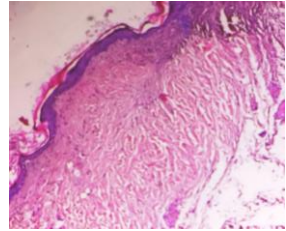
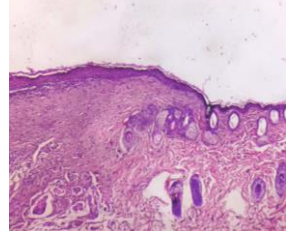
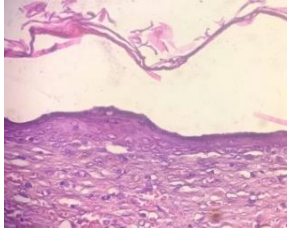
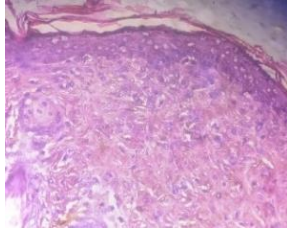
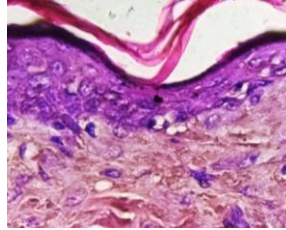
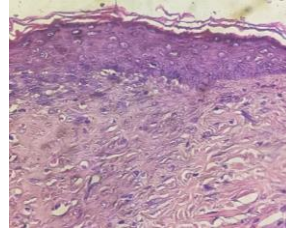
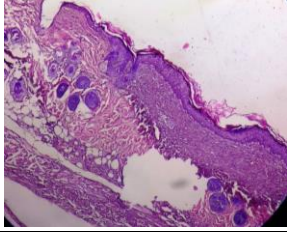
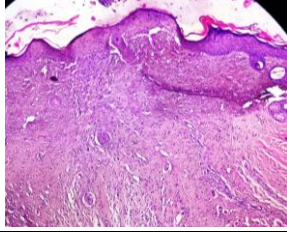
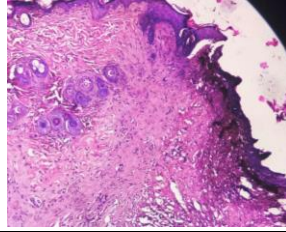
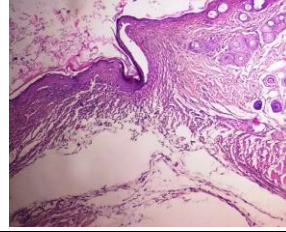
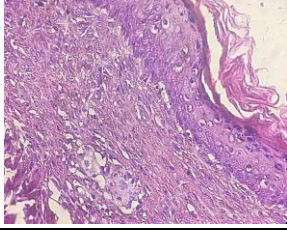
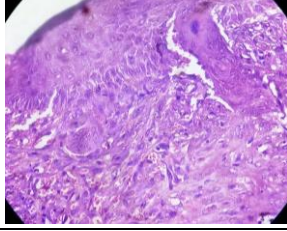
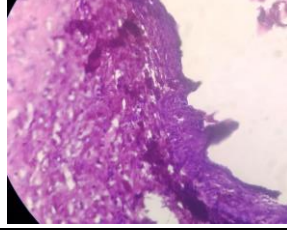
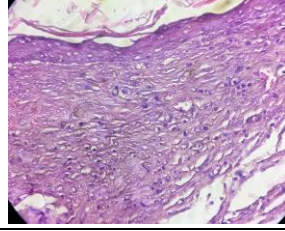
p<0,05 = *

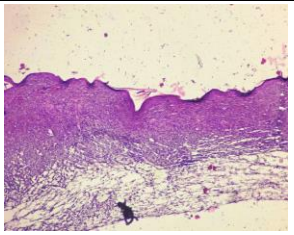
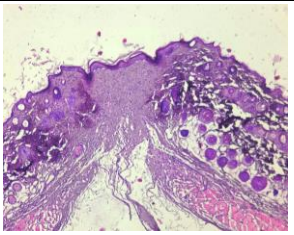
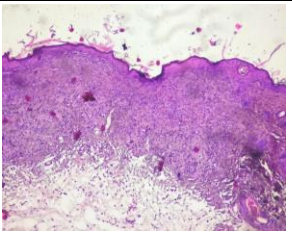
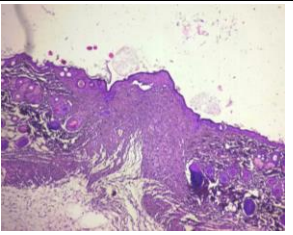
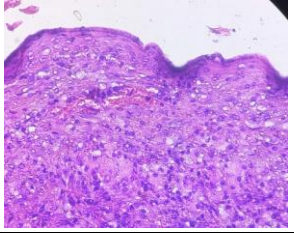
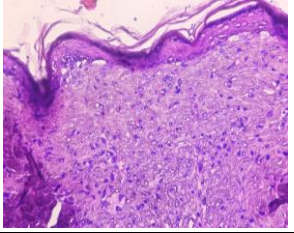
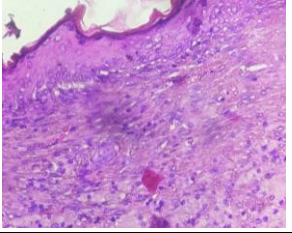
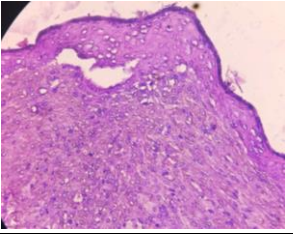
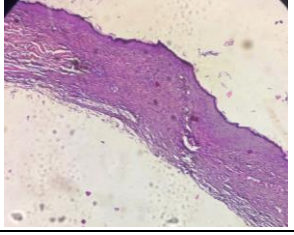
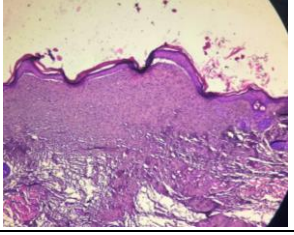
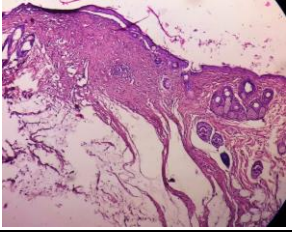
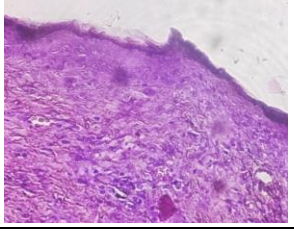
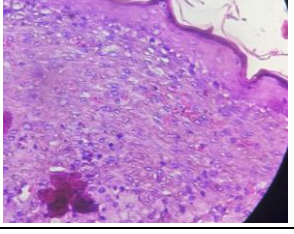
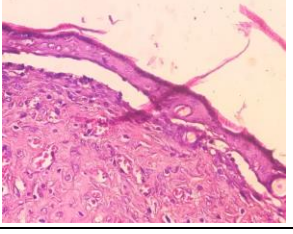
p≥0,05 = ns

Lampiran 19. Data preparat histologis hari ke 12

Jenis luka	Perlakuan	Perbesaran	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
Non-infeksi	Hidrogel berbasis enzimatik CDH	100x				
		400x				
	Hidrogel asam galat	100x		Tidak ada data		
		400x		Tidak ada data		

Jenis luka	Perlakuan	Perbesaran	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
Non-infeksi	Hidrojel kosong	100x		Tidak ada data		
		400x		Tidak ada data		
	Tanpa hidrojel	100x				
		400x				

Jenis luka	Perlakuan	Perbesaran	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrojel berbasis enzimatik CDH	100x				
		400x				
	Hidrojel asam galat	100x				
		400x				

Jenis luka	Perlakuan	Perbesaran	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
Infeksi <i>S. aureus</i>	Hidrojel kosong	100x				
		400x				
	Tanpa hidrojel	100x				Tidak ada data
		400x				Tidak ada data

Lampiran 20. Penilaian epidermal dan dermal

A. Tabel penilaian epidermal dan dermal

Penilaian	Jenis luka	Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Mean	SEM
Epidermal	Non-infeksi	Hidrogel CDH	3	3	3	3	3,00	0,00
		Hidrogel asam galat	3	-	3	3	3,00	0,00
		Hidrogel kosong	3	-	3	3	3,00	0,00
		Tanpa hidrogel	3	3	3	3	3,00	0,00
	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	3	3	3	3	3,00	0,00
		Hidrogel asam galat	3	3	3	3	3,00	0,00
		Hidrogel kosong	2	3	3	3	2,75	0,25
		Tanpa hidrogel	2	3	3	-	2,67	0,33
Dermal	Non-infeksi	Hidrogel CDH	3	3	3	2	2,75	0,25
		Hidrogel asam galat	2	-	3	3	2,67	0,33
		Hidrogel kosong	3	-	2	3	2,67	0,33
		Tanpa hidrogel	3	2	2	2	2,25	0,25
	Terinfeksi <i>S. aureus</i>	Hidrogel CDH	2	3	3	3	2,75	0,25
		Hidrogel asam galat	2	3	3	2	2,50	0,29
		Hidrogel kosong	2	2	2	2	2,00	0,00
		Tanpa hidrogel	3	3	3	-	3,00	0,00

Lampiran 18. Uji non-parametrik Kruskal-Wallis penilaian epidermal dan dermal

A. Penilaian epidermal

NPar Tests

Jenis Luka = Infeksi S. aureus

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a

	Perlakuan	N	Mean Rank
Penyembuhan Epidermal	Hidrogel CDH	4	8,00
	Hidrogel asam galat	4	8,00
	Tanpa Hidrogel	3	8,00
	Hidrogel	4	8,00
	Total	15	

a. Jenis Luka = Infeksi S. aureus

Test Statistics^{a,b,c}

	Penyembuhan Epidermal
Chi-Square	,000
Df	3
Asymp. Sig.	1,000

a. Jenis Luka = Infeksi S. aureus

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: Perlakuan

Jenis Luka = Non-infeksi

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a

	Perlakuan	N	Mean Rank
Penyembuhan Epidermal	Hidrogel CDH	4	8,50
	Hidrogel asam galat	3	8,50
	Tanpa Hidrogel	4	6,75
	Hidrogel	3	6,17
	Total	14	

a. Jenis Luka = Non-infeksi

Test Statistics^{a,b,c}

	Penyembuhan Epidermal
Chi-Square	2,257
df	3
Asymp. Sig.	,521

a. Jenis Luka = Non-infeksi

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: Perlakuan

B. Penilaian dermal

NPar Tests

Jenis Luka = Infeksi S. aureus

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a

	Perlakuan	N	Mean Rank
Penyembuhan Dermal	Hidrogel CDH	4	9,63
	Hidrogel asam galat	4	9,63
	Tanpa Hidrogel	3	4,00
	Hidrogel	4	7,75
	Total	15	

a. Jenis Luka = Infeksi S. aureus

Test Statistics^{a,b,c}

	Penyembuhan Dermal
Chi-Square	4,625
df	3
Asymp. Sig.	,201

a. Jenis Luka = Infeksi S. aureus

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: Perlakuan

Jenis Luka = Non-infeksi

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a

	Perlakuan	N	Mean Rank
Penyembuhan Dermal	Hidrogel CDH	4	8,75
	Hidrogel asam galat	3	8,17
	Tanpa Hidrogel	4	8,75
	Hidrogel	3	3,50
	Total	14	

a. Jenis Luka = Non-infeksi

Test Statistics^{a,b,c}

	Penyembuhan Dermal
Chi-Square	4,785
df	3
Asymp. Sig.	,188

a. Jenis Luka = Non-infeksi

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: Perlakuan