

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah. Salah satu penyebab tingginya kadar glukosa darah adalah kurangnya produksi insulin atau tubuh tidak mampu menggunakan insulin dengan efektif. Biasanya keadaan DM baru diketahui setelah timbul komplikasi lanjut pada organ tubuh (Khalid *et al*, 2013; Misnadiarly, 2006). Menurut WHO (2006), dikatakan diabetes jika memenuhi kriteria kadar glukosa plasma puasa $\geq 7,0$ milimol/liter (126 mg/dl) atau kadar glukosa plasma 2 jam setelah makan $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl).

Pada penyakit DM dapat terjadi beberapa penyulit yaitu : penyulit akut (berupa hipoglikemia dengan gejala berdebar, banyak keringat, gemetar dan rasa lapar), penyulit menahun seperti makroangiopati (penyempitan pembuluh darah besar) seperti pada penyakit jantung koroner, stroke dan mikroangiopati (penyempitan pembuluh darah kapiler) jika pada retina mata disebut retinopati diabetik dan jika pada ginjal disebut nefropati diabetik, jika sampai terjadi kelainan urat saraf akibat DM (neuropati diabetik) serta rentan infeksi (TB paru, infeksi saluran kemih), dan kaki diabetes. Penyulit lainnya lagi adalah rentan infeksi. (Misnadiarly, 2006)

Diperkirakan 170 juta penduduk dunia menderita diabetes melitus dan jika diproyeksikan pada tahun 2030 akan meningkat dua kali lipat. Komplikasi yang paling sering dijumpai adalah kaki ulkus diabetik (Mekala *et al*, 2014). DM sering disebut *the great imitator* karena penyakit ini dapat mengenai semua organ tubuh dan menimbulkan berbagai macam keluhan yang bervariasi (Misnadiarly, 2006).

2.1.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus

Klasifikasi menurut ADA (2010) ada empat yang diidentifikasi, yaitu : DM tipe 1 (Insulin Dependent Diabetes Mellitus), DM tipe 2 (Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus), DM tipe lain dan Diabetes Gestasional.

A. Diabetes Mellitus Tipe 1

DM tipe 1 atau IDDM mempunyai karakteristik pada kerusakan sel beta pankreas yang disebabkan oleh proses autoimun, biasanya terjadi kekurangan insulin secara absolute. DM tipe 1 juga ditandai dengan ditemukannya asam anti-glutamin decarboxylase (AGD), sel islet atau antibody insulin. Proses autoimun yang dapat teridentifikasi pada beberapa kasus DM tipe 1 tidak berdampak pada kerusakan sel beta pankreas, maka dari itu juga sering disebut idopatik. Terapi insulin merupakan pilihan terapi yang digunakan untuk gula darah tetap stabil.

B. Diabetes Mellitus Tipe 2

DM tipe 2 atau NIDDM sering dikaitkan dengan istilah *adult-onset* mempunyai karakteristik terjadinya resistensi insulin di jaringan perifer dan kelainan sekresi pada sel beta pankreas. DM tipe 2 paling sering ditemukan pada orang yang mengalami kelebihan berat badan, khususnya terjadi

penumpukan lemak pada daerah perut dan menyebabkan resistensi insulin. Pada beberapa kasus, hipertensi dan dyslipidemia juga memiliki resiko tinggi terkena DM tipe 2. DM tipe 2 juga sering dihubungkan dengan riwayat keluarga, usia lanjut obesitas dan kurang olahraga.

C. Diabetes Mellitus Tipe lain

1) Defek genetik fungsi sel beta

Beberapa bentuk diabetes dihubungkan dengan defek monogen pada fungsi sel beta, dicirikan dengan onset hiperglikemia pada usia yang relatif muda (<25 tahun) atau disebut *maturity-onset diabetes of the young* (MODY). Terjadi gangguan sekresi insulin namun kerja insulin di jaringan tetap normal. Saat ini telah diketahui abnormalitas pada 6 lokus di beberapa kromosom, yang paling sering adalah mutasi kromosom 12, juga mutasi di kromosom 7p yang mengkode glukokinase. Selain itu juga telah diidentifikasi kelainan genetik yang mengakibatkan ketidakmampuan mengubah proinsulin menjadi insulin.

2) Defek genetik kerja insulin

Terdapat mutasi pada reseptor insulin, yang mengakibatkan hiperinsulinemia, hiperglikemia dan diabetes. Beberapa individu dengan kelainan ini juga dapat mengalami akantosis nigricans, pada wanita mengalami virilisasi dan pembesaran ovarium.

3) Penyakit eksokrin pankreas

Meliputi pankreatitis, trauma, pankreatektomi, dan carcinoma pankreas.

- Endokrinopati

Beberapa hormon seperti GH, kortisol, glukagon dan epinefrin bekerja mengantagonis aktivitas insulin. Kelebihan hormon-hormon ini, seperti pada sindroma Cushing, glukagonoma, feokromositoma dapat menyebabkan diabetes. Umumnya terjadi pada orang yang sebelumnya mengalami defek sekresi insulin, dan hiperglikemia dapat diperbaiki bila kelebihan hormon-hormon tersebut dikurangi.

- Karena obat/zat

Beberapa obat dapat mengganggu sekresi dan kerja insulin. Vacor (racun tikus) dan pentamidin dapat merusak sel beta. Asam nikotinat dan glukokortikoid mengganggu kerja insulin.

- Infeksi

Virus tertentu dihubungkan dengan kerusakan sel beta, seperti rubella, coxsackievirus B, CMV, adenovirus, dan mumps.

- Imunologi

Ada dua kelainan imunologi yang diketahui, yaitu sindrom stiffman dan antibodi antiinsulin reseptor. Pada sindrom stiffman terjadi peninggian kadar autoantibodi GAD di sel beta pankreas

- Sindroma genetik lain

4) Down's syndrome, Klinefelter syndrome, Turner syndrome, dll

D. Diabetes Mellitus Gestasional

Diabetes mellitus gestasional adalah klasifikasi operasional daripada kondisi pathofisiologi yang diidentifikasi pada perempuan selama kehamilan.

Selama kehamilan DM tipe 1 bisa berkembang dengan asimtomatik DM tipe 2

yang tidak terdiagnosis. Kebanyakan kasus diabetes mellitus Gestasioanl ditemukan pada trimester ke-tiga. (Patidar *et al*, 2012).

Tipe	Karakteristik	Etiologi	Terapi
Tipe 1	Ketiadaan absolut insulin	Autoimun	Insulin
Tipe 2	Insensivitas insulin dan defisiensi sekresi insulin	Obesitas, genetik	Diet Olahraga Agen hipoglikemik Obat penstimulasi-transporter
Tipe 3	Penyebab spesifik lain	Bergantung	Bergantung Penyebab
Tipe 4	Diabetes Gestasional	Peningkatan kebutuhan metabolik	Diet Agen hipoglikemik

Tabel 2.1. Diabetes Mellitus : Klasifikasi (Corwin, 2009)

2.1.3 Etiologi Diabetes Mellitus

A. Diabetes Mellitus tipe 1

Diabetes tipe 1 diperkirakan terjadi akibat destruksi otoimun sel – sel beta pulau langerhans. Individu yang memiliki kecenderungan genetik penyakit ini tampaknya menerima factor pemicu dari lingkungan yang menginisiasi proses

otoimun. Sebagai contoh faktor pencetus yang mungkin antara lain infeksi virus seperti gondongan (*mumps*), rubela, atau sitomegalovirus (CMV) kronis. Paparan terhadap obat atau toksin tertentu juga diduga dapat memicu serangan otoimun ini. Karena proses penyakit diabetes 1 terjadi dalam beberapa tahun, sering kali tidak ada faktor pencetus yang pasti. Pada saat diagnosis diabetes tipe 1 ditegakkan, ditemukan antibodi terhadap sel – sel pulau Langerhans pada sebagian besar pasien (Corwin, 2009).

Terjadinya individu membentuk antibodi terhadap sel – sel pulau Langerhans sebagai respons terhadap faktor pencetus tidak diketahui. Salah satu mekanisme yang kemungkinan adalah bahwa terdapat agens lingkungan yang secara antigenis mengubah sel – sel pankreas sehingga menstimulasi pembentukan autoantibodi. Kemungkinan lain bahwa para individu yang mengidap diabetes tipe I memiliki kesamaan antigen antara sel – sel beta pankreas mereka dan mikroorganisme atau obat tertentu. Sewaktu berespons terhadap virus atau obat, sistem imun mungkin gagal mengenali bahwa sel pankreas adalah “diri”, mereka sendiri (Corwin, 2009).

Beberapa teori ilmiah yang menjelaskan penyebab diabetes melitus tipe 1 sebagai berikut :

- 1) Hipotesis sinar matahari

Teori yang terakhir ini menyatakan waktu yang lama dihabiskan di dalam ruangan, mengakibatkan kurangnya paparan sinar matahari pada anak-anak menyebabkan berkurangnya sintesis vitamin D. Dibuktikan vitamin D mempunyai hubungan yang integral terhadap pembentukan

dan resistensi insulin. Kurangnya paparan sinar matahari meningkatkan resiko terjadinya DM tipe 1.

2) Hipotesis kebersihan

Teori ini menyatakan bahwa kurangnya paparan terhadap prevalensi pathogen, dimana menjaga anak terlalu bersih, dapat menyebabkan hipersensivitas autoimun, yaitu kehancuran sel beta yang memproduksi insulin di dalam tubuh oleh leukosit. Penelitian telah membuktikan bahwa lebih banyak eksposur untuk mikroba dan virus kepada anak-anak, semakin sedikit resiko menderita penyakit hipersensitivitas seperti alergi.

3) Hipotesis susu sapi

Teori ini menjelaskan bahwa ekspopur terhadap susu sapi dalam susu formula pada 6 bulan pertama pada bayi dapat menyebabkan kekacauan pada sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan risiko untuk mengembangkan diabetes melitus tipe 1 di kemudian hari. Dimana protein susu sapi hampir identik dengan protein pada permukaan sel beta pankreas yang memproduksi insulin, sehingga mereka yang rentan dan peka terhadap susu sapi maka akan direspon oleh leukosit, dan selanjutnya akan menyerang sel sendiri yang menyebabkan kerusakan beta pankreas sehingga terjadi diabetes mellitus tipe 1.

4) Hipotesis POP

Hipotesis ini menjelaskan bahwa eksposur terhadap polutan organik yang persisten (POP) meningkatkan risiko kedua jenis diabetes.

Publikasi jurnal oleh Institut Nasional Ilmu Kesehatan Lingkungan menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik dalam tingkat rawat inap untuk diabetes dari populasi yang berada di tempat Kode ZIP yang mengandung limbah beracun.

5) Hipotesis akselerator

Sebuah teori yang menunjukkan bahwa diabetes tipe 1 merupakan bagian dari kontinum yang sama dari tipe 2, tetapi muncul lebih dulu. Hipotesis akselerator menyatakan bahwa peningkatan berat dan tinggi anak-anak pada abad terakhir ini telah “dipercepat”, sehingga kecenderungan mereka untuk mengembangkan tipe 1 dengan menyebabkan sel beta di pankreas pada tekanan untuk produksi insulin.

(Homenta, 2012)

B. Diabetes Mellitus tipe 2

Untuk kebanyakan individu, diabetes mellitus tipe 2 tampaknya berkaitan dengan kegemukan. Selain itu, kecenderungan pengaruh genetik, yang menentukan kemungkinan individu mengidap penyakit ini, cukup kuat. Diperkirakan bahwa terdapat sifat genetik yang belum teridentifikasi yang menyebabkan pankreas mengeluarkan insulin yang berbeda, atau menyebabkan reseptor insulin atau perantara kedua tidak dapat berespons secara adekuat terhadap insulin. Terdapat kemungkinan lain bahwa kaitan rangkai genetik antara yang dihubungkan dengan kegemukan dan rangsangan berkepanjangan reseptor reseptor insulin. Rangsangan berkepanjangan atas reseptor reseptor tersebut dapat menyebabkan penurunan

jumlah reseptor insulin yang terdapat di sel tubuh. Penurunan ini disebut *downregulation*. Mungkin pula bahwa individu yang menderita diabetes tipe 2 menghasilkan autoantibodi insulin yang berikatan dengan reseptor insulin, menghambat akses insulin ke reseptor, tetapi tidak merangsang hormon leptin, akibat kekurangan gen penghasil leptin atau tidak berfungsi, mungkin bertanggung jawab untuk diabetes melitus tipe 2 pada beberapa individu. Tanpa gen leptin, yang sering disebut gen obesitas pada hewan, mungkin termasuk manusia, gagal berespons terhadap tanda kenyang, dan itulah mengapa menjadi gemuk dan menyebabkan insensivitas insulin (Corwin, 2009).

Meskipun obesitas merupakan resiko utama untuk diabetes melitus tipe 2, ada beberapa individu yang mengidap diabetes tipe 2 di usia muda dan individu yang kurus atau dengan berat badan normal. Salah satu contoh tipe penyakit ini adalah MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), suatu kondisi yang dihubungkan dengan defek genetik pada sel beta pankreas yang tidak mampu menghasilkan insulin. Pada keadaan seperti ini dan beberapa kondisi lainnya, berkaitan erat dengan rangkai genetik suatu sifat yang diwariskan (Corwin, 2009).

Masih ada banyak faktor-faktor lain yang menyebabkan timbulnya DM tipe 2, yaitu :

- 1) Riwayat diabetes pada kehamilan

Mendapatkan diabetes selama kehamilan atau melahirkan bayi lebih dari 4,5 kg dapat meningkatkan resiko diabetes mellitus tipe 2

2) Riwayat keluarga

Seorang anak dapat mewarisi gen penyebab diabetes mellitus orang tua. Biasanya seseorang yang menderita diabetes mellitus mempunyai anggota keluarga yang terkena penyakit tersebut.

3) Kelompok etnik

Resiko diabetes mellitus tipe 2 lebih besar pada hispanik, kulit hitam, penduduk asli Amerika dan Asia dibandingkan dengan golongan Afro-Amerika

4) Usia

Resistensi insulin cenderung meningkat pada usia di atas 65 tahun.

5) Pola makan

Makan secara berlebihan dan melebihi jumlah kadar kalori yang dibutuhkan oleh tubuh dapat memicu timbulnya diabetes mellitus tipe 2, hal ini pankreas mempunyai kapasitas disebabkan jumlah atau kadar insulin oleh sel maksimum untuk diekskresikan. Oleh karena itu, mengonsumsi makanann secara berlebihan dan tidak diimbangi oleh sekresi insulin dalam jumlah memadai dapat menyebabkan kadar dalam darah meningkat dan menyebabkan diabetes mellitus tipe 2.

6) Gaya hidup

Makanan cepat saji dan olah raga yang tidak teratur merupakan salah satu gaya hidup di jaman sekarang yang dapat menyebabkan diabetes mellitus.

7) Obesites

Seseorang dikatakan obesitas apabila indeks massa tubuh (BMI) lebih besar dari 25. HDL di bawah 35 mg/dl dan /atau tingkat trigliserida lebih dari 250 mg/dl dapat meningkatkan resiko diabetes mellitus tipe 2.

8) Hipertensi

Tekanan darah >140/90 mmHg dapat menimbulkan diabetes mellitus tipe 2.

9) Dislipidemia

Keadaan yang ditandai dengan kenaikan lemak darah (Trigliserida >250 mg/dl). Terdapat hubungan antara kenaikan plasma insulin dengan rendahnya HDL (<35 mg/dl) sering didapat pada pasien diabetes.

(Smeltzer dan Bare, 2002).

C. Diabetes Gestasional

Penyebab diabetes gestasional dianggap berkaitan dengan peningkatan kebutuhan energi dan kadar estrogen serta hormon pertumbuhan yang terus – menerus tinggi selama kehamilan. Hormon pertumbuhan dan estrogen menstimulasi pelepasan insulin yang berlebihan mengakibatkan penurunan responsivitas seluler. Hormon pertumbuhan juga memiliki beberapa efek anti – insulin, misalnya sebagai contoh perangsangan glikogenolisis (penguraian glikogen) dan stimulasi jaringan lemak adiposa. Adinonektin, derivat protein plasma dari jaringan adiposa, berperan penting dalam pengaturan konsentrasi insulin terhadap perubahan metabolisme glukosa dan hiperglikemia yang terlihat pada diabetes gestasional. Semua faktor ini mungkin berperan menyebabkan hiperglikemia pada diabetes gestasional. Wanita

yang mengidap diabetes gestasional mungkin sudah memiliki gangguan subklinis pengendalian glukosa bahkan sebelum diabetesnya muncul (Corwin, 2009).

Hiperglikemia terjadi selama kehamilan dikarenakan oleh sekresi hormone-hormon plasenta. Sesudah melahirkan bayi, kadar glukosa dalam darah akan kembali normal (Smeltzer dan Bare, 2002).

2.1.4 Patofisiologi Diabetes Mellitus

Patofisiologi diabetes mellitus berdasarkan klasifikasi, sebagai berikut :

A. Diabetes Mellitus Tipe 1

DM tipe 1 terjadi karena adanya interaksi antara genetik, lingkungan dan faktor imunologi yang mendasari terjadinya destruksi pada sel beta pankreas. Hal ini akhirnya menyebabkan defisiensi insulin. Pada DM tipe 1, hampir semua pasien terbukti mengalami mekanisme autoimun pada pulau langerhans pankreas (powers, 2006). Marker sistem imun pada destruksi sel beta ini terdiri dari autoantibodi sel pulau langerhans, autoantibodi insulin, autoantibodi GAD65 serta autoantibodi tirosin posfatase IA-2 dan IA-2 beta. Satu atau lebih dari autoantibodi tersebut ditemukan pada 85-90% saat kondisi hiperglikemia puasa terdeteksi. DM tipe 1 juga berkaitan erat dengan HLA yang tersambung dengan gen DQA dan DQB serta dipengaruhi oleh gen DRB (ADA, 2012).

Pada DM tipe 1 proses destruksi sel beta bervariasi, dapat timbul cepat (saat anak-anak dan remaja) yang merupakan paling umum terjadi, namun juga dapat terjadi lambat (saat dewasa) (ADA, 2012). Mekanisme autoimun pada DM tipe 1 dapat dipicu oleh adanya infeksi atau stimulus lingkungan lain. Sel beta dapat mulai berkurang jumlahnya dan sekresi insulin menurun secara progresif meskipun

kadar gula darah masih dapat dipertahankan. Hal ini terjadi karena gambaran diabetes tidak akan terlihat sampai sebanyak 80% dari sel beta dihancurkan. Namun, pada saat kebutuhan insulin meningkat (masa pubertitas dan infeksi), serta proses destruksi yang terus-menerus berlanjut mengakibatkan jumlah insulin semakin sedikit dan tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan sehingga gejala DM akan semakin nyata (Powers, 2006).

B. Diabetes Mellitus Tipe 2

Mekanisme yang terjadi pada DM tipe 2 antara lain adalah resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas. Mekanisme mayor resistensi insulin pada otot skeletal meliputi gangguan aktivitas sintase glikogen, disfungsi regulator metabolis, reseptor *down-regulating*, dan abnormalitas transporter glukosa. Mengakibatkan penurunan ambilan glukosa selular yang dimediasi oleh insulin. Hepar juga menjadi resistensi terhadap insulin, yang biasanya berespon terhadap hiperglikemia dengan menurunkan produksi glukosa. Pada DM tipe 2, produksi glukosa hepar terus berlangsung meskipun terjadi hiperglikemia, mengakibatkan peningkatan keluaran glukosa hepar basal secara tidak tepat (Brasher, 2007).

Disfungsi sel beta pankreas mengakibatkan ketidakmampuan sel islet pankreas menghasilkan insulin yang memadai untuk mengompensasi resistensi insulin dan untuk menyediakan insulin yang cukup setelah sekresi insulin dipergunakan. Disimpulkan bahwa hiperglikemia dapat membuat sel beta semakin tidak responsif terhadap glukosa karena toksisitas glukosa (Brasher, 2007).

C. Diabetes Mellitus Gestasional

Terjadi pada wanita yang tidak menderita diabetes sebelum kehamilannya. Hiperglikemia terjadi selama kehamilan akibat sekresi hormon plasenta (Smelter & Bare, 2002).

2.1.5 Metode Pembuatan Hewan Coba Diabetes Mellitus

Hewan percobaan diabetes mellitus yang pertama kali digunakan adalah hewan hiperglikemia. Kondisi hiperglikemia pada hewan pertama kali dilakukan dengan cara pengambilan organ pankreas secara menyeluruh atau sebagian, cara ini kemudian dikenal dengan nama pankreatektomi. (Marraffino, 1950). Pada penelitian berikutnya, metode tersebut sudah jarang digunakan karena secara menyeluruh kondisi patologi yang dihasilkan tidak secara kuat mencerminkan kondisi patologi pada manusia. Meskipun demikian, dengan tujuan penelitian tertentu beberapa peneliti sampai sekarang masih menggunakan metode tersebut (Fernandez *et al.*, 2006; Ani *et al.*, 2006).

Metode tanpa pembedahan (*non-surgical methods*) dalam menghasilkan hewan percobaan hiperglikemia. Metode tanpa pembedahan pertama kali dikenalkan adalah pemberian diabetogenik. Beberapa diabetogenik yang sering digunakan adalah streptozotosin, alloxan, vacor, dithizone, 8-hidroksikuinolon (Covington *et al.*, 1993; Rees dan Alcolado, 2005). Obat hipertensi dengan mekanisme vasodilator yaitu diakosid yang mempunyai efek samping diabetes mellitus, oleh beberapa peneliti juga digunakan sebagai diabetogenik (Ferner, 1992). Perusakan pankreas yang diinduksi senyawa toksin, dapat menghasilkan beberapa

kondisi komplikasi seperti pada manusia. Pada tikus betina dapat digunakan untuk menghasilkan kondisi diabetes gestational.

Patogenesis pada DM tipe 1 yaitu kerusakan spesifik pada sel β Langerhans yang mengakibatkan terjadinya penurunan drastis pada sekresi insulin, biasanya kerusakan tersebut diperantarai imunologi. Senyawa toksin seperti streptozotosin, aloksan, asam urat, asam dehidroaskorbat, asam dialurat, asam ksanturenat dapat mengakibatkan kerusakan sel β Langerhans. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan untuk membuat hewan uji DM tipe 1 (Wilson dan LeDoux, 1989; Rowland dan Bellush; 1989).

Streptozotosin merupakan derivat nitrosuria yang diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* yang mempunyai aktivitas anti-neoplasma dan antibiotik spektrum luas. Streptozotosin dapat secara langsung merusak masa kritis sel β Langerhans atau menimbulkan proses autoimun terhadap sel β sehingga lebih banyak digunakan dalam pembuatan hewan uji DM. DM tipe 1 juga dapat dirancang pada hewan uji melalui pankreatektomi total ataupun secara genetik sehingga mengakibatkan disfungsi pankreas dalam mensekresi insulin (Rowland dan Bellush; 1989; Rees dan Alcolado, 2005).

Spontaneous animal models atau model tikus DM tipe 1 secara genetik antara lain tikus LETL (Long Evans Tokushima Lean), tikus tipe C57 BL/6J, tikus Wistar tipe *bio-breeding* (BB), mencit atau tikus diabetes *non-obese* (NOD), kelinci New Zealand putih, anjing tipe *keeshond* dan hamster Cina (Huijberts, 1994; Rowland dan Bellush, 1989; Rees dan Alcolado, 2005). Pada tikus diabetes *non-obese* (NOD), kondisi sel-sel Langerhans pankreas mengalami kerusakan (nekrosis,

vakuolisasi) apabila dibandingkan tikus kontrol (normal). Kerusakan sel tersebut menunjukkan terjadi kerusakan/degradasi pada sel β Langerhans pankreas. Pada kondisi tersebut, limfosit dapat merembes ke Langerhans pankreas. Hal itu mengindikasikan bahwa telah terjadi proses autoimun pada sel β Langerhans pankreas tersebut. Kejadian terakhir tersebut mirip dengan patofisiologi DM 1 pada manusia.

DM tipe 2 merupakan kelompok penyakit dengan karakteristik terjadinya resistensi insulin dan gangguan sel β Langerhans pankreas dalam mensekresi insulin. Hewan uji DM tipe 2 dapat dibuat dengan beberapa cara yaitu : pemberian nutrisi yang dapat menstimulasi resistensi insulin, pankreatektomi parsial, pemberian senyawa diabetogenik, ataupun secara genetik. Dengan perlakuan tersebut mengakibatkan terjadinya penurunan respon jaringan perifer terhadap aksi insulin atau malfungsi dari reseptor insulin, penurunan kemampuan sel β Langerhans pankreas dalam menstimulasi insulin. Kedua hal tersebut mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah seperti pada kondisi DM tipe 2. Contoh hewan uji DM tipe II adalah tikus Ob/Ob (defisiensi leptin), tikus db/db (defisiensi leptin), tikus Zucker (fa/fa) *obese*, tikus *Diabetic Torri*, tikus gurun *obese*, mencit tipe C57 BKs db, mencit tipe C57 BL ob, mencit tipe KK & KKay, tikus tipe Goto-Kakizaki (GK), tikus Nagoya–Shibata–Yasuda (NSY) dan *Psammomomys gerbils*. Pemberian makanan kaya akan fruktosa pada tikus selama lebih dari 2 bulan akan menginduksi resistensi insulin. Dengan diabetogenik, pemberian senyawa toksin streptozotosin dosis 90 mg/kg BB secara i.p. pada tikus neonatal akan menginduksi DM tipe 2 pada usia 6

minggu atau lebih. (Shafrir dan Mosthaf, 1999; Harvey dan Ashford, 1998; Huijberts, 1994; Rowland dan Bellush, 1989).

Obesitas maupun resistensi insulin sebagai kompensasinya merupakan tanda-tanda yang dapat mengarah pada kondisi diabetes mellitus tipe 2. Pada kondisi tersebut sekresi insulin adalah normal bahkan cenderung meningkat (hiperinsulinemia). Kondisi tersebut mengakibatkan desensitisasi reseptor insulin pada tahap postreseptor lebih lanjut mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Tikus Ob/Ob dan tikus Zucker (*fa/fa*) *obese* merupakan contoh untuk percobaan dengan kondisi di atas. Sedangkan pada tikus db/db dan tikus *Psammomomys gerbils*, kondisi obesitas berkembang secara cepat kondisi hiperglikemia sehingga mengakibatkan sel β Langerhans pankreas dalam menstimulasi tidak mampu mencukupi kebutuhan terhadap kondisi hiperglikemia tersebut (Shafrir dan Mosthaf, 1999; Harvey dan Ashford, 1998; Rees dan Alcolado, 2005).

Pada tikus tipe Goto-Kakizaki (GK), pada kondisi dewasa diperoleh kondisi hiperglikemia yang stabil yang disebabkan karena baik gangguan sekresi insulin maupun resistensi insulin. Pada kondisi beberapa setelah lahir, tikus GK mempunyai jumlah sel Langerhans yang kurang. Beberapa komplikasi yang mirip pada manusia juga dijumpai pada tikus GK dewasa antara lain : terjadi lesi pada ginjal, perubahan struktur syaraf perifer, dan abnormalitas retina mata. Mirip dengan tikus GK, tikus Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) juga mengalami kondisi resistensi tapi kondisinya lebih lunak (toleransi glukosa). Kondisi seperti ini cocok untuk percobaan uji aktivitas obat dalam mencegah kondisi diabetes pada tahap toleransi glukosa (Rees dan Alcolado, 2005).

Streptozotosin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-*D*-glukopiranosel] diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* dapat digunakan untuk menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 untuk intravena adalah 40-60 mg/kg, sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ juga dapat diberikan secara berulang, untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8-10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Selain itu, sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotosin pada neonatal tersebut sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada DM tipe II (Bonner-Weir *et al.*, 1981; Szkudelski, 2001; Jackerott *et al.*, 2006; Tormo *et al.*, 2006). STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasikan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas. STZ merupakan donor NO (*nitric oxide*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan sewaktu STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase.

Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas (Akpan *et al.*, 1987; Szkudelski, 2001).

2.2 Ulkus Diabetik

2.2.1 Definisi Ulkus Diabetes

Ulkus diabetik adalah berupa luka terbuka pada permukaan kulit yang disertai dengan kematian jaringan setempat yang terjadi akibat dari komplikasi kronis diabetes mellitus (Hastuti, 2008). Keadaan ulkus diabetik ini merupakan salah satu penyebab berkurangnya kualitas hidup pada penderita diabetes dan menjadi penyebab utama morbiditas pada diabetes melitus (Mekala *et al.*, 2014). Penyebab utamanya adalah neuropathi jaringan pifer dan ischemia pada pembuluh darah perifer (Clayton *et al.*, 2009). Diperkirakan sekitar 15% penderita diabetes melitus mengalami ulkus diabetikum terutama pada kaki.

2.2.2 Klasifikasi Ulkus Diabetes

Klasifikasi ulkus yang sering digunakan, yaitu sistem klasifikasi Wagner. Sistem klasifikasi Wagner terdiri dari 6 tingkatan, yaitu (Clayton *et al.*, 2009) :

- 0 = Tidak ada luka terbuka, kulit utuh.
- 1 = Ulkus Superfisial, terbatas pada kulit.
- 2 = Ulkus lebih dalam sering dikaitkan dengan inflamasi jaringan.
- 3 = Ulkus dalam yang melibatkan tulang, sendi dan formasi abses.

4 = Ulkus dengan kematian jaringan tubuh terlokalisir seperti pada ibu jari kaki, bagian depan kaki atau tumit.

5 = Ulkus dengan kematian jaringan tubuh pada seluruh kaki.

Sistem klasifikasi Universitas Texas berdasarkan tahapan dan derajat.

Berdasarkan tahapannya, sebagai berikut (Clayton *et al*, 2009) :

Stage A : Luka bersih

Stage B : Luka infeksi tidak iskemia

Stage C : Luka iskemia tidak infeksi

Stage D : Luka infeksi dan iskemia

Berdasarkan derajatnya, sebagai berikut (Clayton *et al*, 2009) :

Grade 0 : Ulserasi pre-atau post-sudah terepitelisasi

Grade 1 : Luka superfisial tidak termasuk tendon, kapsul sendi, atau tulang

Grade 2 : Luka penetrasi ke tendon atau kapsul sendi

Grade 3 : Luka penetrasi ke tulang atau sendi

2.2.3 Patofisiologi Ulkus Diabetik

Gangguan penyembuhan luka pada diabetes mellitus merupakan penyebab penderita jatuh pada kondisi ulkus diabetik (Singh *et al*, 2014). Ada tiga masalah yang biasanya terjadi pada ulkus diabetik, yang disebut trias : iskemik, neuropathy dan infeksi (Hastuti, 2008). Neurophaty yang diawali oleh iskemik merupakan akibat terjadinya stress oksidativ intra sel (Clayton *et al*, 2009).

Pada keadaan hiperglikemi kronis terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan ROS melebihi antioksidan yang tersedia dapat menyebabkan reaksi *cytotoxicity* yang dapat memperlambat penyembuhan luka

diabetik. ROS juga memicu terjadinya stress oksidatif. (Singh *et al*, 2014). Dimana stress oksidatif merupakan faktor patogenesis penting pada komplikasi ulkus diabetik terkait replikasi dan siklus sel pada penyembuhan luka (Badr, 2013). Stress oksidatif juga memicu terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah, sehingga terjadi iskemik dan kematian jaringan meningkat (Clayton, 2009)

Hiperglikemia dan ROS juga berkontribusi dalam aktifasi abnormal *Glycation* pada sel saraf yang mengakibatkan aktifasi dari protein kinase-C tidak sempurna yang menghasilkan disfungsi sel saraf atau neuropati. Neuropati dapat mempengaruhi serabut saraf motorik, sensorik, dan autonomy. Adanya gangguan pada serabut saraf motorik yaitu kehilangan suplai sel saraf ke otot intrinsik kaki menyebabkan ketidakseimbangan panjang tendon fleksor dan ekstensor. Kekuatan kontraksi fleksor pada kaki menyebabkan terjadinya *classic high-arched foot* dan deformitas *claw toe*. Deformitas pada kaki dikombinasikan dengan gangguan hubungan tulang distal kaki akan mengakibatkan pelebaran dan penebalan pada kaki. Jika diabetisi menggunakan alas kaki yang tidak sesuai ukuran akan menyebabkan trauma lokal yang berakhir pada ulkus diabetes. Gangguan pada saraf autonom juga menyebabkan hilangnya fungsi kelenjar keringat dan minyak. Kondisi ini menyebabkan kulit kering sehingga memudahkan masuknya bakteri (Clayton, 2009).

Gangguan proliferasi sel dan penutupan luka dipengaruhi oleh ROS melalui mekanisme merusak cytokine yang mengakibatkan disregulasi *cytokine* yang memicu peningkatan produksi proinflamasi salah satunya adalah *Tumor Necrosis*

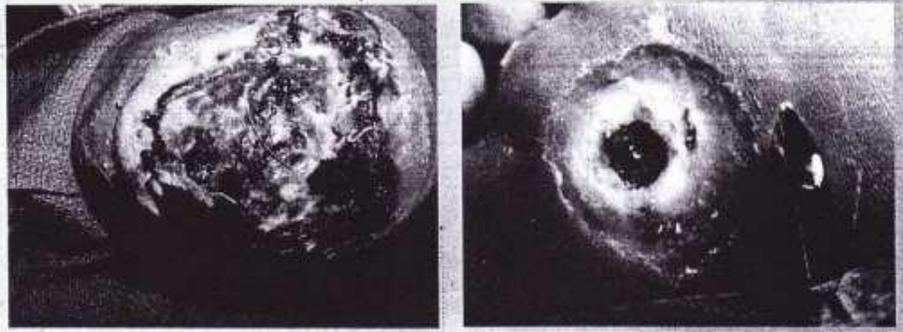
Factor α (TNF- α) (Singh *et al*, 2014). *TNF- α* memegang peran penting dalam perbaikan luka, melalui stimulasi *keratinocyte* dan proliferasi *fibroblast*. Penelitian terkini menemukan disregulasi *TNF- α* menghambat penyembuhan ulkus diabetik terkait peningkatan *apoptosis* dan penurunan proliferasi *fibroblast* (Badr, 2013). Hasil penelitian Gamal Badr (2013), melaporkan bahwa dengan memperbaiki peningkatan *cytokine* proinflamasi (*TNF- α*) pada jaringan luka dapat mengurangi pemanjangan fase inflamasi.

2.2.4 Perawatan Ulkus Diabetes

Perawatan ulkus diabetes yang paling sering dilakukan dan yang menjadi standar baku adalah : debridement, *offloading*, penanganan infeksi dan *dressing* (Alexiadou, 2012).

A. Debridement

Debridement menjadi salah satu tindakan yang terpenting dalam perawatan luka. Debridement adalah suatu tindakan untuk membuang jaringan nekrosis, callus dan jaringan fibrotik. Jaringan mati yang dibuang sekitar 2-3 mm dari tepi luka ke jaringan sehat. Debridement meningkatkan pengeluaran faktor pertumbuhan yang membantu proses penyembuhan luka. Metode debridement yang sering dilakukan yaitu surgical (sharp), autolitik, enzimatik, kimia, mekanis dan biologis. Metode surgical, autolitik dan kimia hanya membuang jaringan nekrosis (debridement selektif), sedangkan metode mekanis membuang jaringan nekrosis dan jaringan hidup (debridement non selektif).



Gambar 7. Ulkus dalam pada tumit ditandai dengan adanya jaringan fibrosis dan nekrosis pada tepi luka. *Debridement* perlu dilakukan untuk membuang jaringan avaskuler sehingga membantu proses penyembuhan (kiri). *Debridement* ulkus neuropatik dengan penjepit jaringan. Berbagai alat dapat digunakan dalam *debridement*, dengan tujuan membuang semua jaringan hiperkeratotik, jaringan mati sehingga didapatkan dasar luka yang merah dan sehat. (Diambil dari: Doupis J, Veves A. Classification, Diagnosis, and Treatment of Diabetic Foot Ulkuss. Wound. May 2008;20:117-126)

Gambar 2.1. Ulkus pada tumit

Surgical debridement merupakan standar baku pada ulkus diabetes dan metode yang paling efisien, khususnya pada luka yang banyak terdapat jaringan nekrosis atau terinfeksi. Pada kasus dimana infeksi telah merusak fungsi kaki atau membahayakan jiwa pasien, amputasi diperlukan untuk memungkinkan kontrol infeksi dan penutupan luka selanjutnya.

Debridement enzimatis menggunakan agen topikal yang akan merusak jaringan nekrotik dengan enzim proteolitik seperti papain, kolagenase, fibrinolisin-Dnase, papainurea, streptokinase, streptodornase dan tripsin. Agen topikal diberikan pada luka sehari sekali, kemudian dibungkus dengan balutan tertutup. Penggunaan agen topikal tersebut tidak memberikan keuntungan tambahan dibanding dengan perawatan terapi standar. Oleh karena itu, penggunaannya terbatas dan secara umum diindikasikan untuk memperlambat ulserasi dekubitus pada kaki dan pada luka dengan perfusi arteri terbatas.

Debridement mekanis mengurangi dan membuang jaringan nekrotik pada dasar luka. Teknik debridement mekanis yang sederhana adalah pada aplikasi kasa basah-kering (wet-to-dry saline gauze). Setelah kain kasa basah dilekatkan pada dasar luka dan dibiarkan sampai mengering, debris nekrotik menempel pada kasa dan secara mekanis akan terkelupas dari dasar luka ketika kasa dilepaskan.

B. Offloading

Offloading adalah pengurangan tekanan pada ulkus, menjadi salah satu komponen penanganan ulkus diabetes. Ulserasi biasanya terjadi pada area telapak kaki yang mendapat tekanan tinggi. Bed rest merupakan satu cara yang ideal untuk mengurangi tekanan tetapi sulit untuk dilakukan. *Total Contact Casting* (TCC) merupakan metode offloading yang paling efektif. TCC dibuat dari gips yang dibentuk secara khusus untuk menyebarkan beban pasien keluar dari area ulkus. Metode ini memungkinkan penderita untuk berjalan selama perawatan dan bermanfaat untuk mengontrol adanya edema yang dapat mengganggu penyembuhan luka. Meskipun sukar dan lama, TCC dapat mengurangi tekanan pada luka dan itu ditunjukkan oleh penyembuhan 73-100%. Kerugian TCC antara lain membutuhkan ketrampilan dan waktu, iritasi dari gips dapat menimbulkan luka baru, kesulitan untuk menilai luka setiap harinya. Karena beberapa kerugian TCC tersebut, lebih banyak digunakan *Cam Walker*, *removable cast walker*, sehingga memungkinkan untuk inspeksi luka setiap hari, spenggantian balutan, dan deteksi infeksi dini.

C. Penanganan Infeksi

Ulkus diabetes memungkinkan masuknya bakteri, serta menimbulkan infeksi pada luka. Karena angka kejadian infeksi yang tinggi pada ulkus diabetes, maka diperlukan pendekatan sistemik untuk penilaian yang lengkap. Diagnosis infeksi terutama berdasarkan keadaan klinis seperti eritema, edema, nyeri, lunak, hangat dan keluarnya nanah dari luka.

Penentuan derajat infeksi menjadi sangat penting. Menurut *The Infectious Diseases Society of America* membagi infeksi menjadi 3 kategori, yaitu :

- Infeksi ringan : apabila didapatkan eritema < 2 cm
- Infeksi sedang: apabila didapatkan eritema > 2 cm
- Infeksi berat : apabila didapatkan gejala infeksi sistemik.

Ulkus diabetes yang terinfeksi dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu:

- *Non-limb threatening* : selulitis < 2 cm dan tidak meluas sampai tulang atau sendi.
- *Limb threatening* : selulitis > 2 cm dan telah meacapai tulang atau sendi, serta adanya infeksi sistemik.

D. Dressing

Penyembuhan ulkus lebih cepat dan komplikasi infeksi berkurang bila dalam keadaan lembab dengan pengecualian ganggren kering, dimana area nekrosis harus tetap kering untuk menghindari infeksi. Dengan adanya kelembaban pada luka akan meningkatkan granulasi dan proses autolisis. *Dressing* yang ideal harus bebas dari kontaminasi, dapat membuang

kelebihan eksudat dan racun, mempertahankan lingkungan lembab, tidak dapat ditembus oleh mikroorganisme, memungkinkan pertukaran udara, mudah diangkat, dan hemat biaya.

2.3 Proses Fisiologis Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan proses kompleks dan dinamis yang menghasilkan pengembalian kontinuitas secara anatomi dan fungsi. Penyembuhan luka yang ideal adalah luka yang kembali normal baik secara struktur anatomi, fungsi dan penampilan. Penyembuhan seperti ini dapat terjadi hanya di jaringan epidermis, membrane mukus dan tulang. Untuk luka yang mengenai hingga jaringan dermis, penyembuhan luka tidak dapat sampai penampilan normal karena jaringan luka akan ditempatkan pada dermis dan epidermis yang hilang (Black dikutip dalam Medical-Surgical Nursing, 2009).

Menurut Black (2009) proses penyembuhan luka terdiri dari 4 fase, yaitu:

a. Fase respon vaskuler

Setelah terjadinya luka, pembuluh darah akan mengalami konstiksi untuk menghentikan perdarahan dan mengurangi paparan terhadap bakteri. Proses pembekuan akan berlangsung, platelet membentuk bekuan. Disaat yang bersamaan plasma protein mulai membuat kolagen. Saat platelet kontak dengan kolagen pada pembuluh darah yang terbuka, akan terjadi agregasi platelet yang membentuk sumbatan untuk mencegah perdarahan yang lebih banyak dan kehilangan plasma. Selain itu platelet akan melepas berbagai protein dan *growth factors* untuk menstimulasi penyembuhan.

Pembuluh darah kapiler akan mengalami dilatasi selama 10-30 menit setelah terjadi luka dan tetap dilatasi selama beberapa waktu karena pelepasan serotonin pada platelet. Plasma dapat mengalir ke luka untuk mengencerkan toksin organism, transportasi oksigen dan memberikan nutrisi untuk keperluan perbaikan serta membawa fagosit pada area luka. Pada proses ini luka akan memasuki fase inflamasi (Black dikutip dalam Medical-Surgical Nursing, 2009).

b. Fase inflamasi

Fase inflamasi merupakan fase kedua pada proses penyembuhan dan fase yang penting. Fase ini dimulai setelah terjadi luka dan berlanjut hingga 4 sampai 6 hari, tergantung dari luasnya luka. Tujuan dari inflamasi adalah membatasi efek bahaya bakteri atau luka dengan menghancurkan atau menetralkan organisme dan membatasi penyebarannya. Efek walling of merupakan efek pencegahan penyebaran agen luka ke jaringan lainnya dengan cara bekuan fibrinogen yang memblokir jalan limfe dan ruangan pada jaringan tersebut sehingga cairan tidak dapat melewati area tersebut.

Pada fase ini diaktifkan komponen sel darah putih untuk membersihkan luka dan memulai penyembuhan luka lebih lanjut. Neutrofil merupakan pertahanan utama melawan organism karena mereka yang akan tiba pertama pada area luka untuk fagositosis bakteri, sel mati dan debris. Jumlah oksigen pada luka juga mempengaruhi keefektifan fagositosis. Makrofag dan neutrofil dapat berfungsi di lingkungan anaerob, tetapi kemampuan mereka untuk mencerna baktore kurang efektif. Makrofag tidak

aktif pada jaringan dengan jumlah oksigen dibawah 30 mmHg (jumlah oksigen normal pada jaringan 30mmHg atau lebih). Pada sel darah putih lainnya seperti eosinofil, basofil dan limfosit juga migrasi ke area luka. Eosinofil membantu mengontrol respon inflamasi dengan mensekresi anti histamine, basofil mensekresi histamine dan limfosit membantu makrofag untuk lebih efektif kinerjanya di area luka.

Selain pengaktifan sel darah putih, pada inflamasi juga mengaktifkan mediator seperti sel mast, kinin, sitokin dan sistem komplemen. Sel mast merupakan sel penting dalam inflamasi. Sel mast dapat melepas histamine dan serotonin untuk membuat pembuluh darah kapiler tetap dilatasi. Selain itu sel mast juga mensintesis leukotrin dan prostaglandin. Kedua bahan kimia ini mempunyai efek yang sama dengan histamine namun lebih lama. Pada awal perlukaan, kinin berfungsi untuk meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan membiarkan leukosit untuk memasuki jaringan. Kemudian pada proses inflamasi, kinin bersama prostaglandin menyebabkan nyeri dan kontraksi otot polos serta meningkatkan kemotaksis leukosit. *Cytokinin* berfungsi untuk meregulasi mobilitas, diferensiasi dan pertumbuhan leukosit. Pengaktifan sistem komplemen akan menyebabkan peningkatan inflamasi dan menginduksi pergerakan leukosit ke area luka. Selain itu, sistem komplemen akan membuat mikroba menjadi gumpalan untuk mempermudah fagositosis (Black dikutip dalam Medical-Surgical Nursing, 2009).

c. Fase proliferasi

Fase proliferasi atau fase resolusi melakukan perbaikan luka melalui angiogenesis, fibroplasia dan epitelisasi. Fase ini terdiri dari proses deposisi kolagen, angiogenesis, granulasi dan kontraksi luka. Fase proliferasi ditandai dengan adanya pembentukan jaringan granulasi yang terdiri dari pembuluh kapiler, fibroblas, makrofag dan susunan longgar kolagen, fibronectin dan asam hialuronat. Fase ini dimulai dari hari ke-3 atau ke-4 hingga hari ke-21 setelah perlukaan, tetapi pada proses penyembuhan yang tidak lengkap dapat berlangsung hingga 1 sampai 2 tahun.

Fibroblas merupakan sel penting pada fase ini. Fibroblas mensintesis kolagen dan jaringan granulasi. Kolagen merupakan zat protein berwarna keputihan yang dapat meningkatkan kekuatan regangan pada luka. Semakin banyak jumlah kolagen, semakin meningkat pula kekuatan luka sehingga kemungkinan luka untuk terbuka semakin berkurang. Kolagen seringkali dapat terlihat pada luka yang tidak mengalami penyatuan.

Pada fase ini makrofag mensekresi angiogenesis factor (AGF) yang menstimulasi pembentukan pembuluh darah baru. Selain itu makrofag juga mensekresi sitokin lainnya seperti platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF), interleukin-1 (IL-1) dan basic fibroblast growth factor (bFGF). Growth factor tersebut sangat membantu dalam penyembuhan luka. Luka yang gagal untuk sembuh, salah satu penyebabnya karena kurangnya growth factor.

Pembuluh darah kapiler akan tumbuh melewati luka dan meningkatkan aliran darah. Fibroblast bergerak dari aliran darah ke dalam luka dan menyimpan benang-benang fibrin dalam luka. Saat jaringan pembuluh darah terbentuk, jaringan terlihat merah cerah. Jaringan ini disebut jaringan granulasi yang rapuh dan mudah berdarah.

Apabila tepi luka tidak rapat, area tersebut akan terisi oleh jaringan granulasi. Saat jaringan matang, sel epitel yang berasal dari bagian tepi luka akan bergerak masuk ke jaringan granulasi yang telah matang dan berproliferasi di atas lapisan jaringan ikat ini. Proses ini disebut epitelisasi. Selanjutnya proses ini akan berlanjut ke proses kontraksi luka. Myofibroblas pada luka menyebabkan terjadinya kontraksi luka. Jika luka akut tidak terjadi kontraksi, maka infeksi dapat menjadi komplikasi letal pada luka (Black dikutip dalam Medical-Surgical Nursing, 2009; Kozier, et al., 2010).

d. Fase maturasi

Fase maturasi atau fase rekonstruksi merupakan fase terakhir pada penyembuhan luka ditandai dengan perombakan pada luka. Fase ini terjadi selama setahun atau lebih setelah luka tertutup. Selama fase maturasi, luka dirombak, pembuluh kapiler menghilang, dan jaringan parut mendapatkan kembali kekuatannya 2 kali lipat dari sebelumnya. Perombakan adalah proses sintesis kolagen dan lisis. Perombakan memberikan gaya tarik pada jaringan parut. Kekuatan gaya tarik pada jaringan parut tidak pernah mencapai lebih dari 80% (Black dikutip dalam Medical-Surgical Nursing, 2009).

2.4 Kontraksi Luka

2.4.1 Konsep Kontraksi Luka

Kontraksi luka adalah proses terjadinya penyempitan ukuran luka atau berkurangnya luas area luka sehingga kontaminasi luka oleh daerah sekitar luka berkurang (Vermolen & Olmer, 2012). Kulit yang masih sehat tertarik menutupi defek sebagai proses kontraksi luka. Terjadi gerakan centripetal kulit. Secara umum kontraksi luka menguntungkan karena mengurangi area jaringan parut yang menutupi defek. (Prabakti, 2005).

Kontraksi luka merupakan proses yang terjadi pada fase proliferasi penyembuhan luka. Pada fase proliferasi terjadi beberapa proses yang saling mempengaruhi satu sama lain sehingga terjadi proses kontraksi luka. Fase proliferasi diawali dengan pembentukan jaringan granulasi pada defek luka yang terdiri dari jaringan kapiler, fibroblast dan makrofag yang semuanya akan mendukung struktur pembentukan jaringan baru. Disamping terjadi proses granulasi juga terjadi pembentukan kolagen, angiogenesis dan epitelisasi. Fase proliferasi akan dimulai seiring dengan berkurangnya fase inflamasi pada luka (Prasetyono, 2009).

Proses angiogenesis mulai ditandai dengan migrasi sel endotel dan pembentukan kapiler, ini merupakan respon alami penyembuhan luka untuk menggantikan mikrosirkulasi luka yang merespon gelombang faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan fibroblast akan dilepaskan untuk mengikat jaringan ikat, sehingga pembuluh darah baru akan tumbuh pada matrik kolagen yang dihasilkan

oleh fibroblast. Selanjutnya fibroblast akan bermigrasi ke area sekitar tepi luka dan berubah fenotif menjadi myofibroblast (Prasetyono, 2009).

Proses kontraksi luka sangat bergantung pada myofibroblast. Myofibroblast adalah sel mesenkim dengan fungsi dan karakteristik struktur fibroblast dan otot polos. Sel tersebut merupakan komponen seluler jaringan granulasi atau jaringan perut yang membangkitkan tenaga kontraktil melibatkan aktivitas kontraksi muskuler aktin-miosin sitoplasma (Prabakti, 2005).

Myofibroblast berasal dari fibroblast luka. Berawal dari proliferasi fibroblast dan memproduksi ekstraseluler matriks berubah menjadi jaringan fibrous. Akibat paparan regangan yang kuat dari luka, fibroblast berubah menjadi myofibroblast dan membentuk sel otot polos. Myofibroblast dapat meningkatkan kekuatan kontraksi luka (Vermolen & Olmer, 2012).

Tanda dari fenotip myofibroblast adalah ekspresi aktin otot halus-alpha, bentuk aktin serupa dengan sel-sel otot polos vaskuler. Mikrofilamen aktin tersusun sepanjang axis panjang fibroblast dan berhubungan dengan dense boodies untuk tambahan pada sekeliling matriks seluler. Myofibroblast juga memiliki tambahan fungsi unik yang menghubungkan sitoskeleton ke matriks ekstraseluler yang disebut *fibronexus*. *Fibronexus* dibutuhkan untuk koneksi yang menjembatani membrane sel antara mikrofilamen intraseluler dan fibrinectin akstraseluler. Sehingga, kekuatan kontraksi luka mungkin disebabkan oleh kumparan aktin dalam myofibroblast, dan hal tersebut diteruskan ke tepi luka oleh ikatan sel-sel dan sel matriks (Prabakti,2005).

2.4.2 Perhitungan Kontraksi Luka

Penyembuhan ulkus diabetes pada hewan coba dinilai dari parameter fisik, yaitu periode kontraksi luka. Kontraksi luka dicatat berdasarkan perubahan progresif pada area luka, tidak termasuk hari pembuatan luka. Yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Bairy, 2012) :

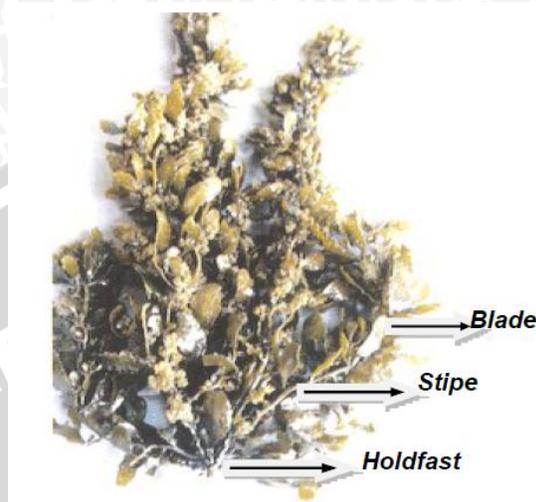
$$\% \text{ Kontraksi luka} = \frac{\text{Luka awal} - \text{luka pada hari ke-x}}{\text{Luka awal}} \times 100 \%$$

Luka awal

2.5 Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

2.5.1 Deskripsi Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

Alga *Sargassum* merupakan salah satu marga *Sargassum* yang termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. *Sargassum* tumbuh di perairan dengan kedalaman 0,5 – 10 m. Di perairan Indonesia terdapat lebih dari 15 jenis alga *Sargassum*. *Sargassum* hidup di daerah perairan yang jernih yang mempunyai substrat dasar batu karang. *Sargassum* dapat tumbuh subur pada daerah tropis, suhu perairan 27,25°C – 29,30°C dan salinitas 32 – 33,5%. Alga *Sargassum* tumbuh berumpun dengan untaian cabang – cabang. Panjang thalli utama mencapai 1 – 3 m dan tiap-tiap percabangan terdapat gelembung udara berbentuk bulat yang disebut “bladder”, berguna untuk menopang cabang – cabang thalli terapung ke arah permukaan air untuk mendapatkan intensitas cahaya matahari (Kadi, 2008).



Gambar 2.2 Rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*)
(Sumber : Unej, 2009)

2.5.2 Taksonomi Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

Taksonomi Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisio : Phaeophyta

Class : Phaeophyceae

Order : Fucales

Family : Sargassaceae

Genus : Sargassum

Species : *Sargassum duplicatum*

(Putranti, 2013)

2.5.3 Morfologi Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

Ciri-ciri umum dari rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) ini adalah bentuk thallus umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon di darat, bentuk daun melebar, oval, atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, ukuran panjang umumnya mencapai 3-7 meter, warna thallus umumnya coklat (Aslan, 1991). *Sargassum* biasanya dicirikan oleh 3 sifat yaitu adanya pigmen coklat yang menutupi warna hijau, hasil fotosintesis disimpan dalam bentuk laminaran dan algin serta adanya flagel. Terdiri dari *holdfast*, *stipe*, dan *blade*. Spesies ini memiliki buah/pundi yang berisi udara yang bertugas mengapungkan daun agar dapat berfotosintesis. Tekstur yang kasar dan bergetah, tubuh yang kuat tapi fleksibel, yang dapat digunakan untuk mempertahankan diri dari ombak yang besa. *Sargassum duplicatum* memiliki thalli bulat pada batang utama dan agak datar pada percabangan, permukaan halus atau licin. Percabangan dichotomous dengan daun bulat lonjong, pinggir bergerigi, tebal dan duplikasi (*double edged*). *Vesicle* melekat pada batang daun, bulat telur atau elip (Dawes, 1981; Tjitrosoepomo, 2005).

2.5.4 Persebaran Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

Sargassum duplicatum merupakan salah satu jenis rumput laut coklat di Indonesia yang bernilai ekonomis, memiliki umur panen yang relatif singkat, tersebar luas di perairan Indonesia dengan potensi produksinya cukup tinggi namun produksinya masih banyak berasal dari hasil panen persediaan dari alami (Saputra *et al.*, 2012).

Sargassum tersebar luas di Indonesia, tumbuh di perairan yang terlindung maupun yang berombak besar pada habitat batu, pada daerah intertidal maupun subtidal (Aslan, 1991; Kadi, 2005). Zat yang dapat diekstraksi dari *Sargassum* berupa alginat yaitu suatu garam dari asam alginik yang mengandung ion sodium, kalsium dan barium. Pada umumnya *Sargassum* tumbuh di daerah terumbu karang (*coral reef*) seperti di Kepulauan Seribu, terutama di daerah rata pasir (*sand flat*) (Aslan, 1991 ; Kadi, 2005).

Sargassum duplicatum penyebarannya ada pada daerah Jawa, Sulawesi, P.kei, Sumatera Utara, Lombok, Kep.Aru, Irian (Sumber : Indriati dan Sumiarsih, 1992)

2.5.5 Kandungan Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*)

Rumput laut coklat mempunyai kandungan serat pangan tinggi sekitar 33-50g/100g berat kering. Kandungan serat pangan ini lebih tinggi dibandingkan dengan buah-buahan dan sayur-sayuran. Konsumsi serat dapat mencegah penyakit kanker, kardiovaskuler dan obesitas (Dawczynski *et al.*, 2006). Rumput laut coklat juga mempunyai asam lemak essensial tak jenuh ganda dari golongan Omega-3 seperti asam eikosapentaenoat yang dapat mencegah penyakit hati, trombiosis dan aterosklerosis (Ortiz *et al.*, 2005).

Salah satu fungsi utama dari rumput laut coklat adalah sebagai serat pangan, karena rumput laut memiliki kandungan polisakarida yang tinggi. Serat pangan adalah komponen yang terdapat pada dinding sel tumbuhan, strukturnya kompleks yang terdiri dari polisakarida. Dinding sel pada alga tersusun dari dua lapis senyawa selulosa, di antara kedua lapisan selulosa terdapat rongga yang

dinamakan lamel tengah (*Middle Lamel*) yang dapat terisi oleh zat-zat penguat seperti lignin, kitin, pektin dan lain-lain (Venugopal, 2009). Alga coklat merupakan sumber serat pangan yang terdiri dari serat larut air dan serat tidak larut air (Ortiz *et al.*, 2006).

Asam lemak pada rumput laut coklat diproduksi di kloroplas. Rumput laut coklat merupakan organisme yang kaya akan kandungan bioaktif dan asam lemak tidak jenuh, dimana diperlukan untuk kebutuhan nutrisi dari beberapa organisme. Selebihnya, spesies dari *Sargassum* dapat menyediakan sumber asam lemak (Kulimkova dan Khotimchenko, 1999).

Rumput laut coklat memiliki kandungan nutrisi protein yang bervariasi dan nilainya tergantung pada berbagai faktor seperti musim dan kondisi lingkungan. Kisaran nilai protein rumput laut coklat adalah sebesar 7–16 gram / 100 gram berat kering. Protein rumput laut mempunyai semua jenis asam amino esensial (AAE) (Dawczynski *et al.*, 2007). Rumput laut mengandung protein yang terdiri dari asam amino esensial yaitu lisin, fenilalanin, metionin, leusin and valin (Ortiz *et al.*, 2006).

Rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*) juga mengandung *fucoidan* dan komponen *fenolik*. Komponen fenolik yang paling banyak banyak ditemukan dalam rumput laut *S. duplicatum* adalah phlorotanin yang berkisar antara 0,74% - 5,06%. Disamping itu, uji analisis kualitatif menunjukkan bahwa rumput laut *S. duplicatum* mengandung flavonoid, saponin, tannin dan terpenoid (Septiana *et al*, 2012).

2.5.6 Manfaat Kandungan Rumput laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Terhadap Derajat Kontraksi Luka

Phlorotanin sudah banyak dibuktikan sebagai antidiabetik. Melalui mekanisme inhibisi pada α -glucosidase dan α -amylase, phlorotanin mampu menurunkan kadar glukosa darah. Phlorotanin juga mampu meningkatkan sensitivitas insulin sehingga memberikan efek *uptake* glukosa pada otot rangka pada tikus yang diinduksi diabetes (Lee & Jeon, 2013).

Kandungan *fenolik* rumput laut *S. duplicatum*, seperti flavonoid memiliki aktivitas untuk mengurangi radikal bebas. Saponin memiliki efek antioksidan dan sebagai antimikroba. Peran tannin untuk meningkatkan proses penyembuhan luka bisa melalui beberapa mekanisme sel seperti, peningkatan *fibroblast*, meningkatkan *angiogenesis* dan peningkatan kontraksi luka (Singh *et al*, 2014). Tannin juga berfungsi sebagai antiinflamasi melalui pengendalian ROS yang berefek pada pengendalian produksi *cytokine* lokal (Soaza *et al*, 2007).

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 genus pada tumbuhan. Glikosida adalah suatu kompleks antara gula pereduksi (glikon) dan bukan gula (aglikon). Banyak saponin yang mempunyai satuan gula sampai 5 dan komponen yang umum ialah asam glukuronat. Adanya saponin dalam tumbuhan ditunjukkan dengan pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau memekatkan ekstrak (Harborne, 1987).

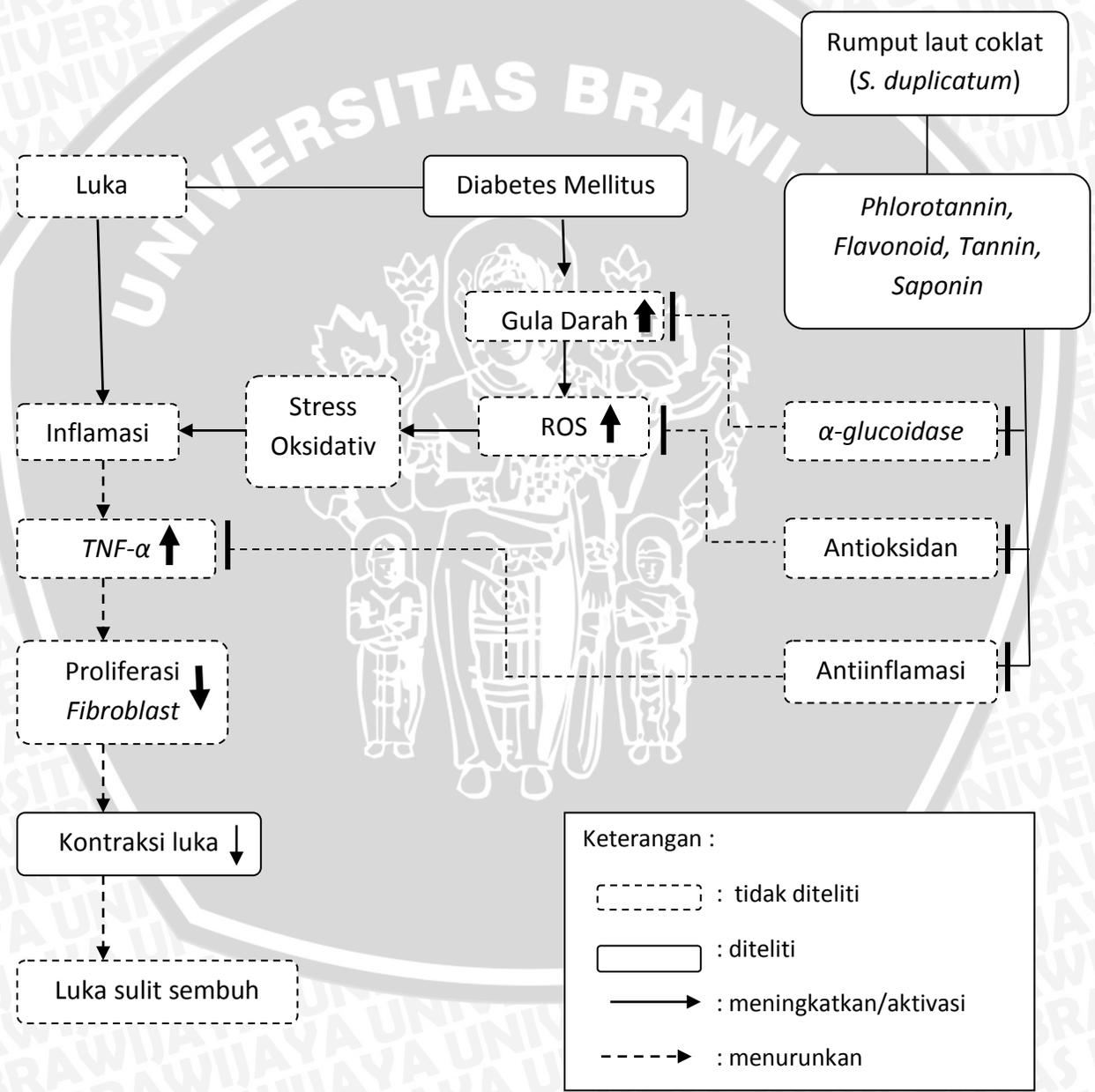
Saponin memiliki efek antioksidan dan sebagai antimikroba. Saponin juga berperan langsung pada fase proliferasi, melalui mekanisme peningkatan produksi kolagen yang merupakan ekstraseluler yang berperan meningkatkan regenerasi sel pada fase proliferasi. Sehingga terjadi proses penyembuhan luka. Kandungan antioksidan yang tinggi dapat mereduksi radikal bebas yang dihasilkan oleh ROS sehingga fase inflamasi dapat terkontrol (Singh *et al*, 2014).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Skema 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Skema 3.1 menguraikan bahwa DM adalah suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, fungsi kerja insulin, atau kedua-duanya. Hiperglikemia adalah peningkatan kadar glukosa didalam plasma darah. Hiperglikemia terjadi disebabkan oleh karena tubuh tidak memiliki cukup insulin atau insulin tidak dapat merubah glukosa menjadi energi. Keadaan hiperglikemia dapat memberi indikasi bahwa diabetes tersebut tidak terkontrol. Hiperglikemia mengakibatkan kerusakan pada mitokondria yang selanjutnya akan memicu timbulnya berbagai jenis ROS (Reactive oxygen species) yang dikenal dengan radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu molekul yang kehilangan satu buah elektron dari pasangan elektron bebasnya. Contoh dari radikal bebas seperti Superoxide (O_2^-), Hydroxyl (OH), Peroxyl (RO_2), Nitric oxide (NO) dan Nitrogen dioxide (NO_2^-). Peningkatan ROS dapat mengakibatkan kerusakan makromolekul seperti lipid berupa lipid peroksidasi, protein osidasi dan juga kerusakan DNA yang merupakan kunci terhadap patogenesis dari terjadinya kerusakan pada berbagai jaringan tubuh yang merupakan komplikasi dari DM. Peningkatan radikal bebas dapat menimbulkan stress oksidatif yaitu suatu keadaan dimana antioksidan endogen tubuh tidak dapat meredam radikal bebas. Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas. Proses kerusakan pada umumnya berawal dari adanya kelainan pada pembuluh darah baik mikrovaskuler dan makrovaskuler. Komplikasi mikrovaskular akibat DM meliputi nephropathy dan retinopathy. Sedangkan komplikasi makrovaskular akibat diabetes melitus meliputi penyakit jantung iskemik, stroke dan penyakit vaskular perifer.

Salah satu komplikasi yang terjadi adalah ulkus diabetik. Pada keadaan ini karena ROS meningkat maka meningkatkan juga faktor inflamasi, salah satunya adalah TNF- α yang mengakibatkan fase inflamasi tidak terkontrol. Kemudian akan menghambat fase proliferasi, dimana salah satu parameter yang dapat dilihat adalah derajat kontraksi luka. Dengan demikian akan menghambat proses penyembuhan ulkus diabetes.

Rumput laut coklat (*S. duplicatum*) mengandung *fenolik*, seperti flavonoid yang dapat menurunkan radikal bebas yang dihasilkan oleh ROS. Apabila inflamasi dapat terkontrol maka fase proliferasi akan cepat terjadi, yang dapat dilihat dengan peningkatan progresifitas kontraksi luka. Phlorotanin mampu menurunkan kadar glukosa darah melalui mekanisme inhibisi pada α -glucosidase dan α -amylase dan mampu meningkatkan sensitivitas insulin.

Saponin yang memiliki efek antioksidan dan sebagai antimikroba berperan langsung pada fase proliferasi, melalui mekanisme peningkatan produksi kolagen yang merupakan ekstraseluler yang berperan meningkatkan regenerasi sel pada fase proliferasi. Sehingga terjadi proses penyembuhan luka. Tannin untuk meningkatkan proses penyembuhan luka bisa melalui beberapa mekanisme sel seperti, peningkatan *fibroblast*, meningkatkan *angiogenesis* dan peningkatan kontraksi luka.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*) secara oral dapat meningkatkan prosentase kontraksi luka pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar kondisi hiperglikemia.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

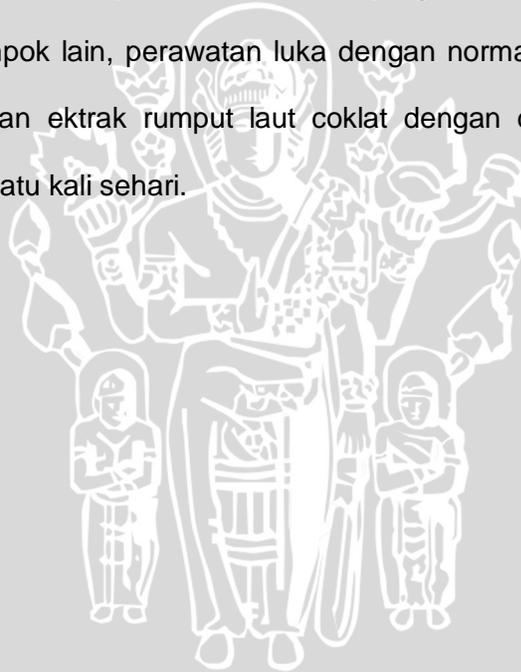
Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*.

(Nursalam, 2008). Pada *true eksperimen*, peneliti mengontrol secara penuh semua eksperimen seperti; *who, what, when, where, dan how*. Kontrol atas *who* pada eksperimen, mengartikan bahwa peneliti dapat menetapkan subjek secara acak. Sedangkan kontrol atas *what, when, where, dan how* pada eksperimen berarti bahwa peneliti memiliki kontrol penuh atas cara percobaan yang dilakukan (McBurney dan White, 2009). Pada desain penelitian ini menggunakan dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak dimanipulasi atau dimanipulasi dengan perlakuan standar sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang dimanipulasi oleh peneliti. Adapun pembagian kelompok ini, yaitu :

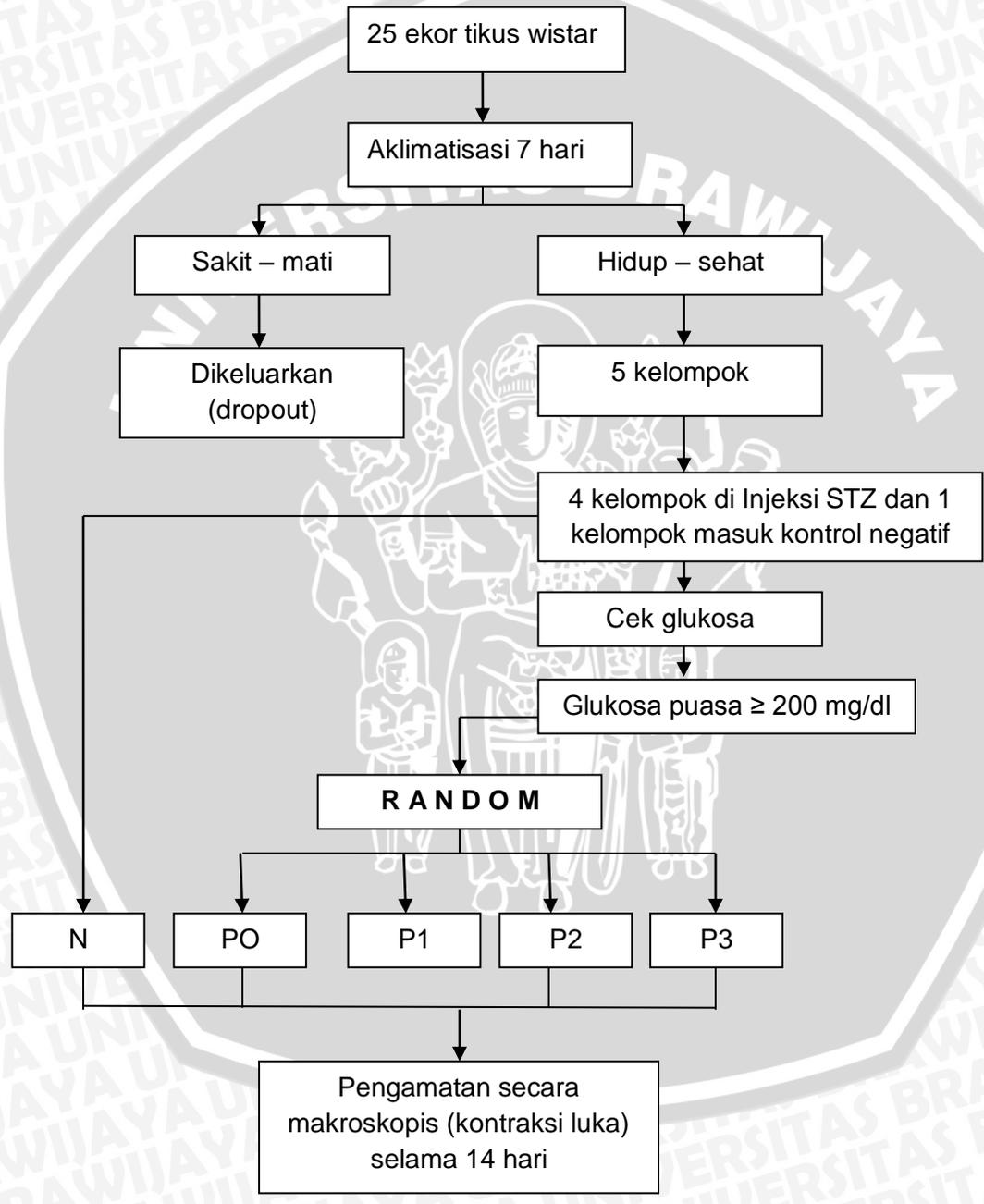
- a. Kelompok KN (Kontrol Negatif) : Tikus normal, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline
- b. Kelompok KP (Kontrol Positif) : Tikus hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline.
- c. Kelompok P1 (Perlakuan 1) : Tikus hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara

oral (sonde) diberikan ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 100 mg/kgBB dengan pemberian satu kali sehari.

- d. Kelompok P2 (Perlakuan 2) : Tikus hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara oral (sonde) diberikan ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 200 mg/kgBB dengan pemberian satu kali sehari.
- e. Kelompok P3 (Perlakuan 3) : Tikus hiperglikemia, memiliki luka yang sama dengan kelompok lain, perawatan luka dengan normal saline dan secara oral (sonde) diberikan ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kgBB dengan pemberian satu kali sehari.



Skema rancangan penelitian :



Gambar 4.1 Skema rancangan Penelitian

4.2 Sampel

4.2.1 Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat-sifat respons biologis yang mendekati manusia.

A. Inklusi

- Jenis tikus adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*).
- Jenis kelamin jantan
- Umur 2,5 – 3 bulan (usia pertumbuhan) karena proliferasi sel pada fase pertumbuhan lebih cepat sehingga mendukung penyembuhan luka.
- Berat badan 200-300 gram.
- Tidak mendapatkan pengobatan sebelumnya.
- Kadar glukosa darah awal ≤ 110 mg/dL
- Kadar glukosa darah puasa setelah pemberian STZ ≥ 200 m g/dL.
- Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, jinak, berbulu licin, mengkilat, dan bersih, rambut tebal dan tidak kusam, badan tegap, tidak ada luka, tidak keluar lendir, nanah, atau darah dari mata atau telinga, tidak terlalu banyak ludah, tidak diare dan pernapasan tenang.

B. Eksklusi

- Tikus sakit atau mati selama aklimitasi

C. Cara perlakuan sampel

- Tikus tidak dilakukan pengekangan (*restrain*) dan dipelihara dengan ukuran kandang 45 cm x 35,3 cm x 14,5 cm dalam ruang hewan coba Laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang dengan ventilasi yang cukup.
- Tikus diberi makanan dan air minum yang sama. Makanan tikus berbentuk serbuk yang komposisinya terdiri dari jagung, katul, pollard, DDGS, rape seed, copra meal, biji batu, CPO, vitamin dan mineral dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 2:1. Makanan dibentuk bulatan padat seberat 40 gram.

4.2.2 Cara penghitungan jumlah sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku dalam penetapan jumlah sampel yang menggunakan hewan coba (tikus putih) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus menurut Hidayat (2009) :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = banyak perlakuan

r = banyak sampel pada tiap kelompok

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (t) adalah 5 (1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan) sehingga didapat nilai r sebagai berikut :

$$4(r-1) \geq 15 ;$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan 25 ekor.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama 3 bulan 1 minggu

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Pemberian ekstrak rumput laut *S.duplicatum* 100 mg/kg BB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB (Roosdiana *et al*, 2011).

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penyembuhan ulkus diabetes mellitus. Indikator untuk penyembuhan luka adalah prosentase kontraksi luka

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Penelitian			
Variabel	Ekstrak Rumput laut coklat dalam bentuk basah kemudian dikeringkan yang dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96% dan diberikan satu hari sekali dengan dosis 100 miligram/pemberian oral/200 gram BB (Botituhe, 2010),200 miligram/pemberian oral/200 gram BB, dan 400 miligram/pemberian oral/200 gram BB.Prosedur ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	Miligram	Rasio
Independen :			
Ekstrak Rumput laut coklat (<i>Sargassum duplicatum</i>)			
Variabel	Dengan kriteria adanya luka terbuka pada permukaan kulit pada Luka pada kondisi hiperglikemia	mm ²	nominal
Dependen:	kondisi hiperglikemik. Dikatakan hiperglikemia jika kadar glukosa		

darah puasa ≥ 200 mg/dl dan dirawat dengan NaCl 0,9%

Variabel	Prosentase kontraksi luka diukur	%	Rasio
Dependen: Prosentase kontraksi luka	<p>menggunakan penggaris sebagai skala ukur dan difoto dengan kamera D-SLR Canon EOS 1100D, lensa 18-55 mm dan resolusi 12,2 megapixel dengan jarak pemotretan 10 cm dari permukaan area luka. Dilaksanakan pada hari pertama dan hari ke 14 untuk membandingkan luas area luka. Foto dianalisa menggunakan <i>software</i> AutoCAD 2010 untuk mendapatkan luas luka (Wibawani, 2014). Kemudian dihitung dengan rumus prosentase kontraksi luka yaitu ukuran luka awal dikurangi ukuran luka sesuai hari X dibagi ukuran luka awal kemudian dikalikan 100 % (Mekala <i>et al</i>, 2014).</p>		



4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan bahan untuk pembuatan ekstraksi

- A. Rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*)
- B. Oven (1 buah)
- C. Timbangan (1 buah)
- D. Gelas erlenmeyer (2 buah)
- E. Corong gelas (1 buah)
- F. Kertas saring (1 buah)
- G. Labu evaporator (1 buah)
- H. Pendingin spiral/*rotary evaporator* (1 buah)
- I. Labu penampung methanol (1 buah)
- J. *Water pump*
- K. *Water bath*
- L. *Vacum pump* (1 buah)
- M. Ethanol 96%
- N. Aquades (1 botol)
- O. Botol hasil ekstrak (1 botol)
- P. Sonde.

4.6.2 Alat dan bahan untuk pembuatan luka

- A. Gunting bedah
- B. *Mezt*

- C. Underpad
- D. Sarung tangan
- E. Pinset anatomis 2 buah
- F. Eter
- G. Kassa
- H. Sput
- I. Ketamine hydrochloride
- J. alat cukur
- K. air steril
- L. Alkohol 70 %
- M. Penggaris
- N. Alat tulis
- O. Bengkok.

4.6.3 Alat dan bahan untuk perawatan luka

- A. Sarung tangan
- B. Jas laboratorium
- C. Bak instrument
- D. Pinset anatomis
- E. Kom
- F. Korentang dan tempatnya
- G. Kassa steril
- H. Kassa+normal saline



- I. Bengkok
- J. Perlak
- K. Gunting kassa
- L. Gunting jaringan nekrotik
- M. Spuit 3 cc
- N. Normal saline

4.6.4 Alat dan bahan sonde

- A. Syringe
- B. Sarung tangan
- C. Kain untuk memegang tikus.

4.6.5 Alat dan bahan pengukuran glukosa darah tikus

- A. *Glucose meter*
- B. *Stick glucosure*

4.6.6 Alat dan dan bahan untuk pengukuran kontraksi luka

- A. Kamera
- B. Penggaris
- C. Tabel

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan ekstrak Rumput laut coklat

A. Proses Pengeringan

Rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*) didapatkan dari petani rumput laut langsung dari perairan Lombok, Nusa Tenggara Barat. Rumput laut dibersihkan dan dipotong kecil lalu dikering anginkan hingga mengandung kadar air antara 20 – 30 %. Setelah rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*) kering akan dilakukan proses penghalusan menggunakan *blender* sehingga menjadi bentuk serbuk.

B. Proses Ekstraksi

Sebanyak 10 gram bubuk rumput laut *S.duplicatum* dilarutkan dalam 150 ml ethanol (1:15 b/v). Kemudian dikocok menggunakan sheker 150 rpm selama 24 jam dan disaring sehingga akan didapatkan ekstrak dan ampas. Ekstrak yang masih mengandung pelarut dipisahkan dengan pelarutnya dengan cara penguapan pelarutnya menggunakan rotary evaporator. Sisa pelarut dihilangkan dengan gas nitrogen sehingga didapat ekstrak kental (Aisyah *et al*, 2012).

C. Proses Evaporasi

1. Pengambilan lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif
2. Rumput laut coklat dimasukkan dalam labu evaporasi
3. Labu evaporasi dipasang pada evaporator
4. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh

5. Semua rangkaian alat dipasangkan, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur suhu pada 70°C-80°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.
6. Agar larutan etanol mendidih didiamkan terlebih dahulu lalu dipisahkan ke dalam labu penampung
7. Tunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ jam hingga 2 jam)
8. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol hasil ekstrak
9. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam *freezer*/kulkas

4.7.2 Dosis

Ekstrak rumput laut coklat

Kandungan antioksidan polifenol (flavonoid) ekstrak etanol 85% *Sargassum duplicatum* Bory dengan dosis 100 mg/kg berat badan tikus terbukti mampu menurunkan kadar MDA tikus jantan yang secara tidak langsung mencerminkan penurunan kadar radikal bebas (Botutihe, 2010). Florotanin kasar hasil ekstrak etanol dan etil asetat *Sargassum* sp. selain memiliki aktivitas antioksidan juga memiliki aktivitas anti alergi (Samee, *et al.*, 2009).

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada tikus adalah 5 ml (Rosalind Franklin University, 2012). Pada penelitian ini hasil ekstrak rumput laut berupa pasta sebanyak 150 gram. Dosis kg/bb tikus = $1000/200 = 5$ mg/kg. Dosis yang dibutuhkan dalam sehari adalah sebagai berikut : Kelompok perlakuan 1 dengan dosis pemberian ekstrak rumput laut coklat 100mg/kgBB = $1/5 \times 100 = 20$

mg/cc, Kelompok perlakuan 2 dengan dosis pemberian ekstrak rumput laut coklat 200mg/kgBB = $1/5 \times 100 = 40$ mg/cc dan Kelompok perlakuan 1 dengan dosis pemberian ekstrak rumput laut coklat 400mg/kgBB = $1/5 \times 100 = 80$ mg/cc

4.7.3 Persiapan hewan coba

A. Sebelum penelitian

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji tikus galur wistar, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama 7 hari.

B. Selama penelitian

1. Prosedur induksi diabetes

Sebelum diinduksi diabetes, tikus dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi air minum. Hal ini dilakukan karena disesuaikan dengan protokol percobaan yang menyebutkan bahwa hewan uji yang dipuasakan selama 8-12 jam lebih rentan mengalami hiperglikemia dibandingkan hewan uji coba yang tidak dipuasakan. Dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa terlebih dahulu untuk mengetahui kadar darah puasa sebelum induksi STZ (Srinivasan dan Ramarao, 2007; Mendes,2012)

STZ (Streptozotocin) dimasukkan kedalam 0,05M-*citric acid buffer* dan Nicotinamide dileburkan ke dalam *normal saline* lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal 45 mg/kgBB 15 menit setelah injeksi 240 mg/kg nicotinamide. Kerusakan Beta Pankreas ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemi pada hari ke-2 pasca induksi (Roosdiana *et al*, 2011).

Untuk injeksi STZ, tikus dipegang dengan satu tangan posisi dorsal, bagian yang diinjeksi kemudian diusap dengan povidone iodine. Injeksi STZ dilakukan masuk ke ruang abdomen bagian kaudal menggunakan spuit 3 cc dan *needle* 23-G. Pada hari pertama berikan pakan secara normal dan air yang mengandung sukrosa 10 %. Pada hari kedua ganti dengan air biasa. Tanda diabetes akan terlihat pada tikus dalam 3 hari setelah pemberian injeksi intraperitoneal dari STZ melalui pengukuran gula darah yang dilakukan dengan pengambilan darah vena di ekor tikus menggunakan glukometer (Frode dan Medeiros, 2008; Zangiabadi *et al*, 2011; Ramzy *et al*, 2014; Pak *et al*, 2010).

2. Prosedur pembuatan luka

Luka insisi ini dilakukan 4 hari setelah tikus dinyatakan hiperglikemia. Tikus yang sudah mengalami hiperglikemia dan kelompok tikus yang tanpa diabetes dianastesi dengan injeksi *ketamine* 25 mg/kg, dan rambut bagian dorsal dipangkas, kemudian dibilas dengan 10 % cairan povidone iodine dan dikeringkan serta dibersihkan.

- a. Siapkan alat dan bahan : eter, gunting, pinset cirurgis, silet, kasa steril, kasa gulung, pencukur bulu, dan NaCl 90 %
- b. Gunakan sarung tangan

- c. Ambil tikus dari kandang
- d. Berikan induksi *ketamine hydrochloride* (25 mg/kg) pada intraperitoneal
- e. Diamkan tikus sejenak
- f. Setelah tikus mengalami paralisis, buat pola dengan bentuk persegi sebesar 15 x 15 mm dengan kedalaman \pm 2 mm (hingga epidermis dan dermis, tidak sampai otot)
- g. Gunakan gunting elektrik untuk memotong kulit bagian dorsal
- h. Buatlah perlakuan mengikuti pola yang telah dibuat menggunakan silet
- i. Setelah selesai, bersihkan luka menggunakan normal saline 0,9% dan kasa steril
- j. Semua tikus kontrol maupun perlakuan dilakukan perawatan standar luka dengan normal saline dan dibalut kasa steril
- k. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian perlakuan sesuai dengan kelompoknya masing-masing.

3. Perawatan Luka

Pakai sarung tangan terlebih dahulu, buka balutan dan mulai perawatan. Semua kelompok perawatan luka dengan menggunakan normal saline 0,9 %.

- 1) Bersihkan luka dengan normal saline 0,9 %
- 2) Berikan 0,5 cc normal saline pada area luka
- 3) Tutup luka dengan kassa steril dan plester

4. Prosedur Sonde Tikus

Dimulai dengan sonde yang ujungnya terbuat dari karet, kemudian mengambil ekstrak rumput laut coklat. Mulut tikus dihadapkan ke atas dengan cara memegang tikus pada kulit bagian kepala kemudian sonde dimasukkan melalui mulut dan ekstrak rumput laut coklat disemprotkan.

4.8 Prosedur pengumpulan data

4.8.1 Teknik pengumpulan data

Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok. Pengumpulan data dilakukan selama perawatan luka dari hari pertama setelah diinduksi ulkus diabetes sampai hari ke 15.

4.8.2 Metode pengumpulan data

Dengan mendokumentasikan ulkus diabetes dalam bentuk foto pada hari ke 1 dan ke 14. Saat mengambil gambar dengan dengan kamera D-SLR Canon EOS 1100D, lensa 18-55 mm dan resolusi 12,2 megapixel dengan pencahayaan yang sama dan jarak 10 cm dari area luka kemudian diukur panjang luka dengan menggunakan penggaris untuk mengetahui ukuran luka, selanjutnya besar ukuran luka dianalisis menggunakan software AuntoCAD 2010 yang hasilnya akan dihitung menggunakan rumus penghitungan kontraksi luka.

Persentase kontraksi luka dihitung dengan rumus (Mekala *et al*, 2014) :

$$\% \text{ Kontraksi luka} = \frac{\text{ukuran luka awal} - \text{ukuran luka sesuai hari}}{\text{Ukuran luka awal}} \times 100\%$$

4.8.3 Identifikasi Kontraksi Luka

Identifikasi kontraksi luka dengan kamera D-SLR Canon EOS 1100D, lensa 18-55 mm dan resolusi 12,2 megapixel dengan pencahayaan yang sama dan jarak 10 cm dari area luka kemudian diukur panjang luka dengan menggunakan penggaris sebagai skala ukur 1:100, 1 cm pada penggaris dibandingkan dengan 100 pada garis yang dibuat pada software AutoCAD 2010. Software Auto CAD digunakan untuk menghitung luas area luka karena lebih presisi guna memperoleh data kuantitatif (Ashkani *et al*, 2012; Wibawai, 2014).

Prosedur penghitungan luas area luka dengan software AutoCAD

2010, yaitu :

1. Buka software AutoCAD 2010
2. Masukkan gambar :

Klik *insert* kemudian pilih *Raster image reference*, *select image file* dan *open*, akan muncul *image* kemudian tekan OK, kemudian *enter* dan klik pada layar model AutoCAD 2010. Gambar bisa diperkecil dan diperbesar menggunakan *mouse pointer*.

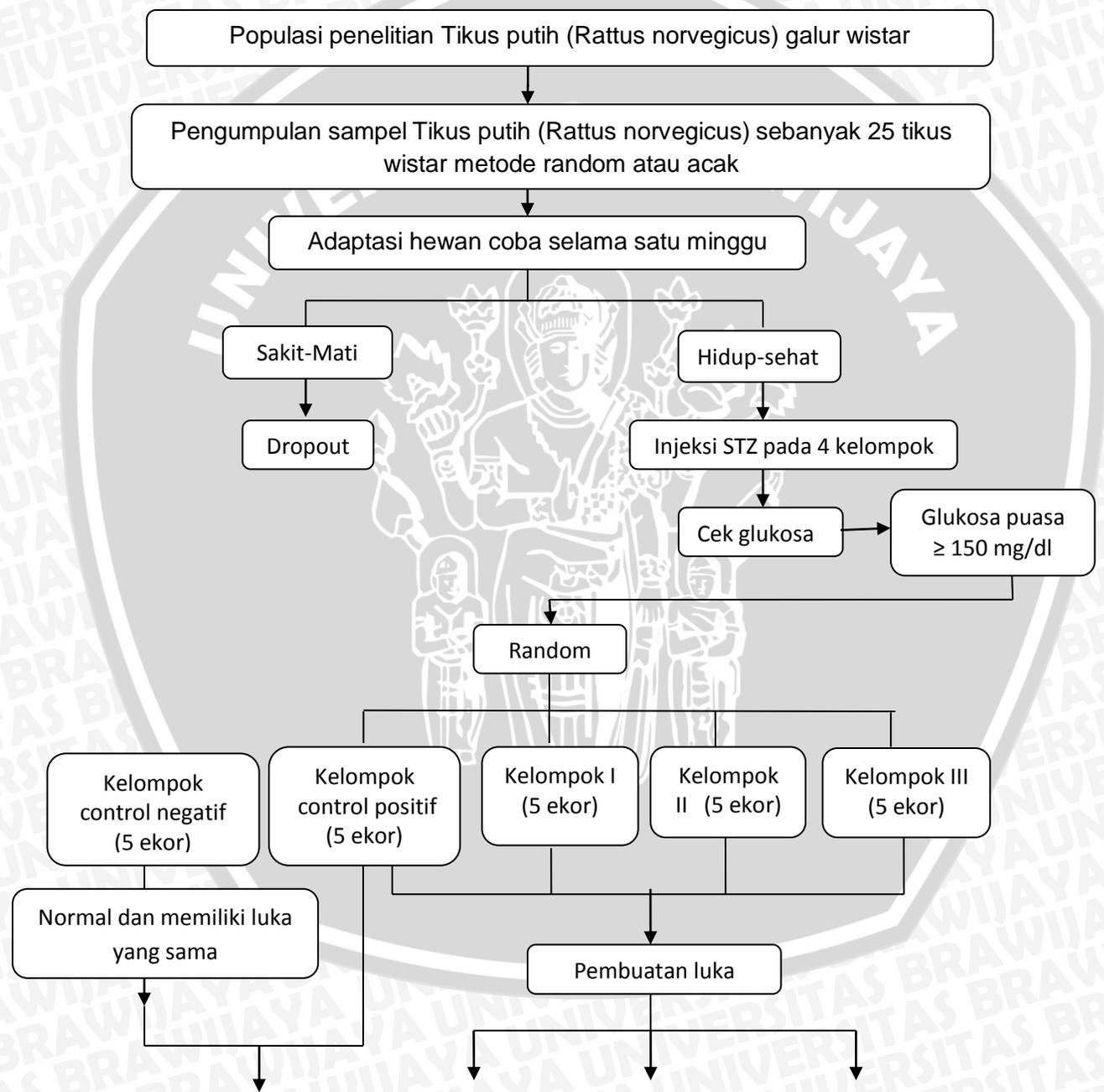
3. Klik *line* kemudian diletakkan pada layar model AutoCAD 2010, tarik garis lurus pada sudut 0° dan ketik angka 100 *enter* dan *ESC*.
4. Garis lurus sepanjang 100 dipindahkan ke dalam gambar sejajar penggaris 1 cm dengan cara klik garis lurus, klik *move*, tarik garis lurus dan klik pada penggaris. Garis disesuaikan dengan panjang penggaris 1 cm. Jika garisnya terlalu panjang, gambar dapat dikecilkan dan sebaliknya. Apabila garis tidak sejajar dengan penggaris dapat dilakukan *rotate* pada gambar untuk menyesuaikan garis sepanjang 100 pada penggaris 1 cm.
5. Luas luka dihitung dengan cara klik *polyline* kemudian membuat garis sesuai luas area luka, tekan *enter* dan *ESC*, klik pada salah satu titik garis, klik kanan dan pilih properti akan muncul hasil luas area luka dalam satuan mm².

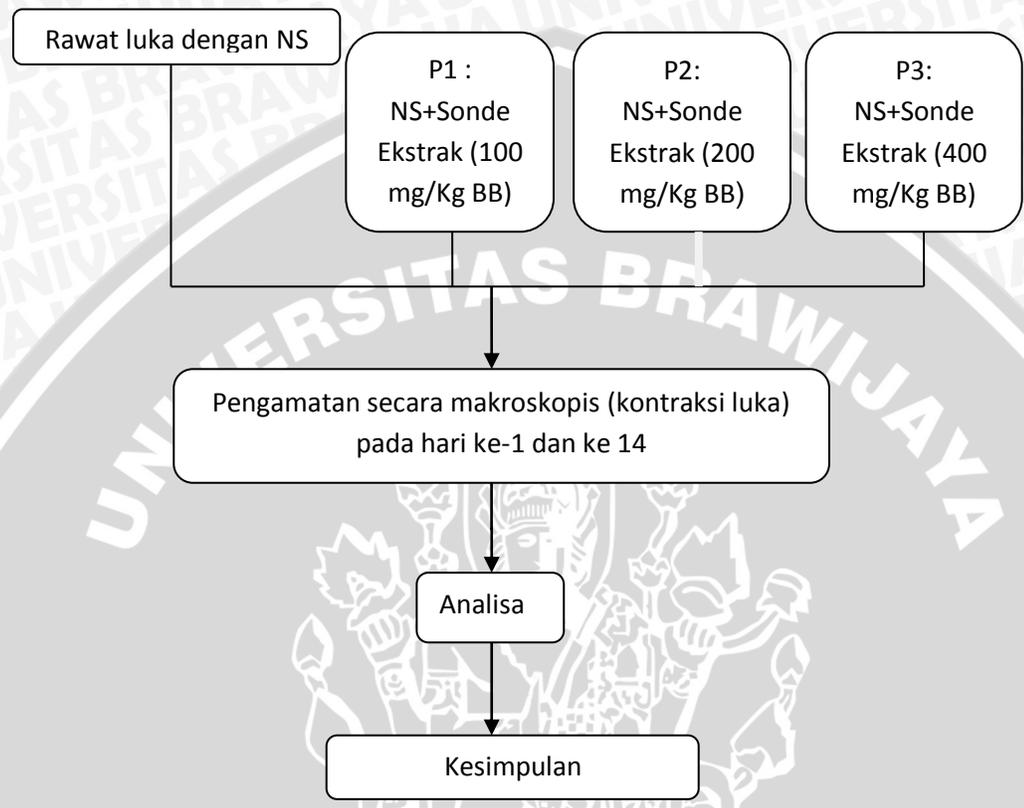
(Wibawani, 2014)

Kemudian data ukuran luka dihitung dengan menggunakan rumus perhitungan kontraksi luka menurut (Mekala *et al*, 2014) :

$$\% \text{ Kontraksi luka} = \frac{\text{ukuran luka awal} - \text{ukuran luka sesuai hari}}{\text{ukuran luka awal}} \times 100\%$$

4.8.4 Alur Penelitian





Gambar 4.2. Alur Penelitian



4.9 Analisa Data

4.9.1 Tahap Pre-analisa Data

Data hasil penelitian yang telah diperoleh, tidak bisa langsung diolah melainkan harus melewati tahap persiapan sebelum dilakukan analisis. Pada tahap ini adalah Editing dan koding. Tahap Editing, data yang telah dikumpulkan dipilah dan dipilih data-data penting yang nantinya perlu untuk dilakukan analisis. Tahap Koding, data yang telah dipilah dan dipilih diberi kode berupa angka-angka dan selanjutnya dilakukan tahap tabulasi dengan tujuan untuk mempermudah proses analisa data yang dilakukan.

4.9.2 Uji Normalitas dan Homogenitas

Hasil analisa terhadap prosentase kontraksi luka pada masing-masing sampel pada setiap perlakuan dilakukan uji statistik SPSS version 20 dengan cara uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena sampel kecil (≤ 50) dengan $\alpha = 0,05$. Jika didapatkan data menunjukkan p value $> 0,05$, maka data berdistribusi normal (Dahlan,2009). Kemudian pada uji homogenitas atau keragaman data menggunakan uji *test of hogeneity of variances* dengan $\alpha = 0,05$. Jika data melakukan p value $> 0,05$ maka data dinyatakan homogeneity, sehingga dapat dilakukan uji parametric lebih lanjut menggunakan *One way ANOVA* (Dahlan,2009).

4.9.3 Uji one way ANOVA

Data hasil penelitian dianalisis dengan *One way ANOVA SPSS version 20* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok uji coba. Jika signifikansi $< \alpha$ (0,05), maka terdapat perbedaan yang signifikan terhadap prosentase kontraksi luka antar kelompok uji.

4.9.4 Uji Perbandingan Berganda (Post Hoc Test)

Uji perbandingan berganda (*Post Hoc Test*) merupakan metode pengujian lanjutan apabila hasil pengujian dari *One way ANOVA* terdapat nilai beda atau ketidaksamaan nilai tengah pada data yang diujikan. Metode berfungsi untuk mengetahui nilai tengah mana yang memiliki perbedaan signifikan. Kelompok dengan nilai signifikansi paling kecil, mempunyai nilai signifikansi paling bermakna dalam kelompok-kelompok uji coba.

Hasil pengukuran persentase kontraksi luka perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 20.0 for Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji One-way ANOVA dan Post hoc test (uji Least Significant Difference).

4.9.5 Justifikasi Etik

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai sampel sehingga dalam pelaksanaan penelitian, peneliti akan menerapkan prinsip 3R yaitu Replacement, Reduction dan Refinement .

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh sel atau biakan jaringan (Ridwan, 2013).
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Pengurangan jumlah penggunaan hewan coba dilakukan sampai pada batas jumlah yang masih bisa dianalisis secara statistik. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Hidayat (2009) yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, dengan r adalah banyak sample pada setiap kelompok dan t adalah banyak perlakuan (Ridwan, 2013). Pada penelitian ini dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor tikus tiap kelompok dengan total 25 ekor tikus yang dibutuhkan
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi (Ridwan, 2013).
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara ad libitum.

- b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan.
- d. Bebas dari stres, dengan memberikan waktu adaptasi selama 1 minggu sebelum dilakukan perlakuan. Prosedur pemeliharaan, perlakuan dan pengambilan data selama penelitian mempertimbangkan tindakan manusiawi dan pada akhir penelitian akan dilakukan tindakan dislokasi servikal untuk menewaskan hewan coba. Kemudian, tubuh kadaver tikus dibersihkan dan dilakukan tindakan aseptik dengan pemberian alcohol 70% kemudian diautoklaf. Setelah itu tikus dikubur dengan baik.

Sedangkan 5F yaitu:

1. *Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus). Tikus diberi makan 1 x sehari dengan makanan dan minuman yang diberikan secara *da libitum*. Makanan tikus terdiri dari jagung, katul, *pollard*, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral dicampur

dengan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 dan dibentuk bulatan dengan masing-masing tikus mendapat gram makanan. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Pakan dan minum diberikan dengan jumlah dan waktu yang sama secara adil.

2. *Freedom from discomfort* (bebas dari ketidaknyamanan). Rasa tidak nyaman karena ditempatkan di dalam kandang diatasi dengan membersihkan kandang dengan mengganti sekam setiap tiga hari sekali agar tetap kering dan lembab.
3. *Freedom from pain, injury, and disease* (bebas dari rasa sakit, trauma, dan penyakit).
4. Rasa sakit pada hewan coba karena diberikan perlakuan luka insisi setelah induksi DM untuk mengatasinya dilakukan pemberian anestesi sebelum prosedur berupa obat *Ketamine* 25 mg/kg intraperitoneal, disinfeksi area pada tikus yang akan dibuat luka insisi dan penggunaan alat yang sudah di sterilisasi untuk mencegah kemungkinan infeksi.
5. Rasa sakit yang dirasakan pada saat pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar gula darah pada tikus diminimalisir dengan cara pengambilan darah dilakukan di ekor tikus
6. Infeksi karena pembuatan luka diminimalisir dengan cara sebelum dilakukan prosedur tikus dianestesi, kemudian tempat injeksi di bersihkan dengan *povidone iodine*, dan setelah dibuatkan luka, luka tersebut di bersihkan dengan normal saline dan ditutup dengan kasa steril

7. Saat dilakukan terminasi (*sacrificed*) tikus dieutanasia dengan klorofom. Sebelum dilakukan pembedahan tikus dipastikan benar-benar mati dengan tanda tidak bernafas, tidak ada denyut jantung, dan tidak ada reflek palpebral dan kornea.
8. Setelah dilakukan pembedahan, tubuh tikus dibersihkan dan dilakukan tindakan aseptik dengan alkohol 70% kemudian dan dikubur dengan baik
9. Pada tikus yang mengalami infeksi atau luka melebar karena tergigit atau terkena benda lainnya, tetap diberikan makanan dan minuman standar tikus dan dilakukan perawatan luka menggunakan normal salin serta dibalut dengan teknik steril. Pada tikus dengan luka yang terinfeksi, selain diberikan balutan steril juga diberikan antibiotik topikal. Perawatan dilakukan hingga waktu terminasi yaitu hari ke-15 bersama dengan kelompok yang masih termasuk di dalam penelitian.
10. *Freedom from fear and distress* (bebas dari ketakutan dan stress jangka panjang).
11. Stress yang dirasakan tikus diminimalisasi dengan cara tikus diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan baru dan ditempatkan dalam kandang dengan masing-masing kandang berisi 1 tikus.
12. Kandang berbentuk balok berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan bagian atas terbuka dan ditutup dengan jaring kawat berbentuk kotak. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38°C (sedang).

13. *Freedom to express natural behavior* (bebas mengekspresikan tingkah laku alami).
14. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan baru. Kandang berbentuk balok berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan bagian atas terbuka dan ditutup dengan jaring kawat berbentuk kotak. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38°C (sedang).
15. Kandang dijaga agar selalu dalam keadaan bersih dan tidak lembab dengan mengganti sekam setiap 3 hari sekali.

