

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK  
MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL  
TERHADAP EKSPRESI IL-1 $\beta$  DAN JUMLAH SEL  
POLIMORFONUKLEAR PADA PENYEMBUHAN  
LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES  
HASIL INDUKSI STREPTOZOTOCIN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**IVANA AGINTA**

**135130100111046**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS (*Citrus sinensis*)  
SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI IL-1B DAN  
JUMLAH SEL POLIMORFONUKLEAR PADA PENYEMBUHAN  
LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES  
HASIL INDUKSI STREPTOZOTOCIN**

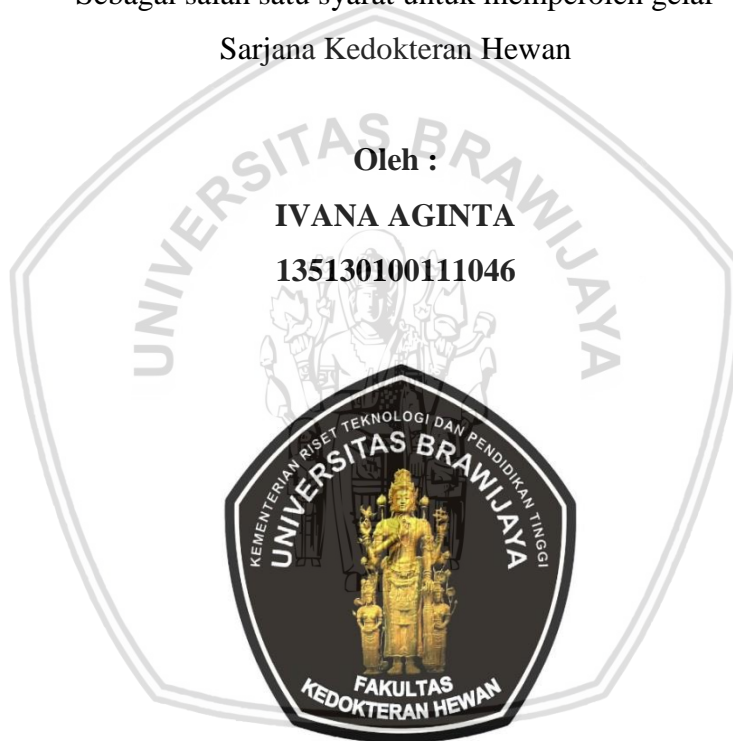
**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**IVANA AGINTA**

**135130100111046**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$  dan Jumlah Sel Polimorfonuklear pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi Streptozotocin**

Oleh :

**IVANA AGINTA**  
**135130100111046**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 17 Januari 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**drh. Herlina Pratiwi, M. Si**  
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ivana Aginta  
NIM : 135130100111046  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$  dan Jumlah Sel Polimorfonuklear pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi Streptozotocin

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
  2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.
- Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Januari 2018

Yang menyatakan,

(Ivana Aginta)  
NIM. 135130100111046

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$  dan Jumlah Sel Polimorfonuklear pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi Streptozotocin**

**ABSTRAK**

Luka pada penderita DM mengalami fase inflamasi berkepanjangan karena tingginya produksi sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  sehingga meningkatkan faktor adhesi sel polimorfonuklear untuk infiltrasi pada area luka. Kulit jeruk manis memiliki kandungan vitamin C dan flavonoid yang bersifat antiinflamasi, sehingga diyakini dapat mempercepat kesembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel polimorfonuklear pada luka insisi yang telah diterapi menggunakan salep dan *effervescent* kulit jeruk manis. Tikus yang dipakai adalah tikus jantan berat 150-200 g, dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 4 ekor. Kontrol negatif adalah kelompok insisi tanpa DM. Kontrol positif adalah kelompok insisi kondisi DM. Terapi 1 adalah kelompok insisi kondisi DM diterapi *effervescent* 500 mg/kgBB. Terapi 2 adalah kelompok insisi kondisi DM diterapi salep 5%. Terapi 3 adalah kelompok insisi kondisi DM diterapi kombinasi salep dan *effervescent*. Tikus model DM diperoleh dengan menginjeksikan streptozotocin dengan dosis 20 mg/kgBB/hari selama lima hari. Salep dibuat dengan mencampurkan ekstrak dengan vaselin albumin dan *effervescent* dibuat dengan mencampurkan ekstrak, dekstrin, asam sitrat, asam tartrat dan natrium bikarbonat. Pengobatan dilakukan 10 hari kemudian dilakukan pengamatan histologis kulit. Ekspresi IL-1 $\beta$  diamati dengan pewarnaan imunohistokimia dan sel polimorfonuklear menggunakan hematoksilin eosin. Analisis data menggunakan uji one way ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil menunjukkan terapi oral, salep dan kombinasi berbeda signifikan dibandingkan tikus DM tanpa terapi. Penurunan tertinggi pada terapi kombinasi dimana penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  hingga 47% dan PMN 90,6%. Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak kulit jeruk manis kombinasi oral dan topikal dapat digunakan sebagai terapi luka insisi penderita DM.

Kata Kunci : Diabetes melitus, Luka, Kulit Jeruk Manis, IL-1 $\beta$ , PMN

**Therapeutic Effect of Sweet Orange Peel Extract (*Citrus sinensis*) Orally and Topically in Expression IL-1 $\beta$  and Polimorphonuclear Cell Total of Wound Healing on Diabetic Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Streptozotocin**

**ABSTRACT**

The prolonged inflammation in diabetic patients is caused by the abundant pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  that increased the adhesion factor of wound-infiltrating polymorphonuclear cell. Sweet orange peel had high vitamin C and flavonoids which possessed anti-inflammatory effects, thus accelerate the wound healing process. The aim of this research is to understand the expression of IL-1 $\beta$  and polymorphonuclear cell total in incision wound which was treated by using effervescent and ointment from the sweet orange peel. This research was using 5 group with 4 male rats (weighed 150-200 gram) in each group. The negative control is the incised non-diabetic group. The positive control is the incised diabetic group. Therapy 1 is the incised diabetic group with effervescent treatment (combination of extract, dextrin, citric acid, tartaric acid, and sodium bicarbonate) at 500 mg/kgBW. Therapy 2 is the incised diabetic group with 5% ointment treatment (combination of extract and vaselin album). Therapy 3 is the incised diabetic group with both effervescent and ointment treatment. The diabetic rats were induced by streptozotocin 20 mg/kgBW/day for five day. Histological observation was taken from samples with 10 days treatment. Observation of IL-1 $\beta$  expression was using immunohistochemistry and polymorphonuclear cells with Hematoxilin-Eosin staining. The data analyzed using one way ANOVA and Tukey test (95% confidence rate). The result showed that oral, topical and combination treatment had significant changes compared to the control group. The most significant reduction was noted on Therapy 3 where IL-1 $\beta$  reduced to 47% and polymorphonuclear cells reduced to 90,6%. The conclusion of this research is that sweet orange peel extract with the combination treatment approach can be used towards the incision wound healing on diabetic patients.

Key Words: Diabetes melitus, Wound, Sweet Orange Peel, IL-1 $\beta$ , PMN

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas kasih karunia yang diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-1 $\beta$  dan Jumlah Sel Polimorfonuklear pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi Streptozotocin” ini dibuat sebagai persyaratan untuk lulus Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan dan dosen pembimbing pertama yang memberikan bimbingan, kesabaran, motivasi dan bantuan yang diberikan dalam penulisan skripsi ini.
2. drh. Herlina Pratiwi, M.Si selaku dosen pembimbing kedua atas bimbingan, kesabaran, motivasi dan bantuan yang diberikan dalam penulisan skripsi ini.
3. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku penguji pertama dan drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku penguji kedua yang telah memberikan kritik dan saran demi perbaikan penulisan skripsi ini.
4. Seluruh Civitas (dosen dan karyawan) Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu memfasilitasi penulisan skripsi ini.
5. Kedua orang tua penulis, Herman Ginting dan Maria Warti Tarigan yang senantiasa mendoakan, memberi dukungan moral dan materi.



6. Abang tercinta Meykel Vidonta dan Julhari Gunanta yang tak henti memberi semangat dan motivasi.
7. Teman kos tercinta kak Yulay, kak Nolly, kak Acil, kak Vania, Gimbul, Willy dan Kiko atas semangat, motivasi dan perhatiannya.
8. Teman-teman seperjuangan Kolega FKH UB, khususnya Dexa, Jalan Berenam, PMK Veteriner dan kakak dan adik tingkat yang selalu memberikan bantuan tenaga dan pikiran.
9. Teman-teman PERMATA Perpulungan Malang yang selalu ada memberi semangat dan penghiburan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak.

Malang, 24 Januari 2018

Penulis





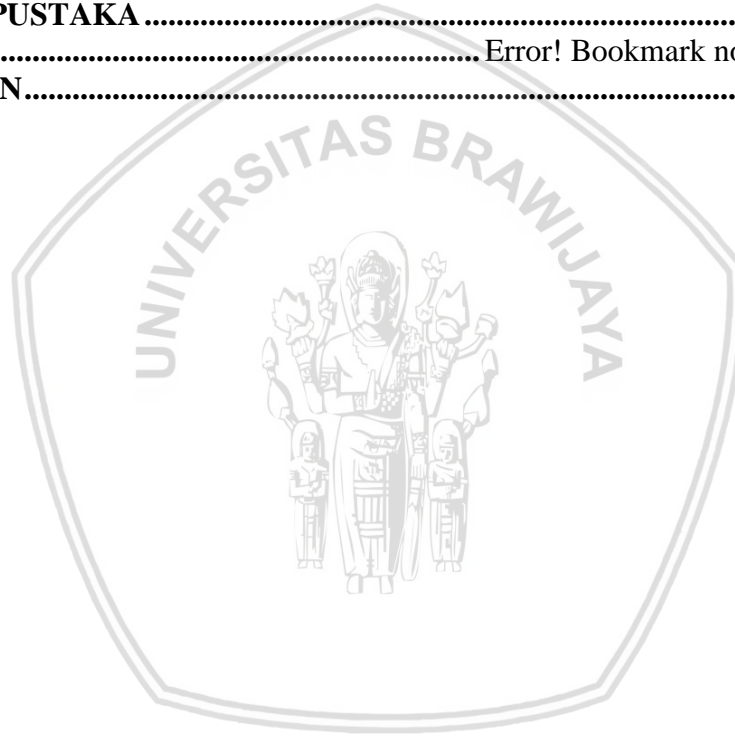
DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ivi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....</b>	<b>liii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	
.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang .....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Batasan Masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.4. Tujuan Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
1.5. Manfaat Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	
.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Diabetes Melitus.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Defenisi Diabetes Melitus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.3 Komplikasi Diabetes Melitus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 Streptozotocin .....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Hewan Coba Tikus.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Kulit.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Luka.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.1 Penyembuhan Luka .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.2 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.3 Gangguan Kesembuhan Luka pada Penderita Diabetes Melitus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6 Interleukin-1 $\beta$ .....	Error! Bookmark not defined.

2.7 Sel Polimorfonuklear (PMN) .....	Error! Bookmark not defined.
2.8 Kulit Jeruk Manis ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	Error! Bookmark not defined.
2.8.1 Taksonomi dan Morfologi Citrus sinensis.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.8.2 Efek Kulit Jeruk terhadap Diabetes Melitus dan Luka.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.9 Salep sebagai Sediaan Topikal.....	Error! Bookmark not defined.
2.10 Serbuk <i>Effervescent</i> sebagai Sediaan Oral.....	Error! Bookmark not defined.
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
.....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
.....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.2 Alat dan Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
4.3 Sampel Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.4 Rancangan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Variabel Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.6 Tahapan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.7 Prosedur Kerja.....	Error! Bookmark not defined.
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.3 Induksi MLD-STZ ( <i>Multiple Low Dose Streptozotocin</i> ) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.4 Pembuatan Salep dan Serbuk <i>Effervescent</i> Jeruk Manis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.5 Pembuatan Luka Insisi.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.6 Terapi Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.7 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Kulit .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.8 Pewarnaan Hematoksilin Eosin.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.9 Pewarnaan IL-1 $\beta$ dengan Imunohistokimia (IHK).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.10 Analisis Data.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
.....	Error! Bookmark not defined.

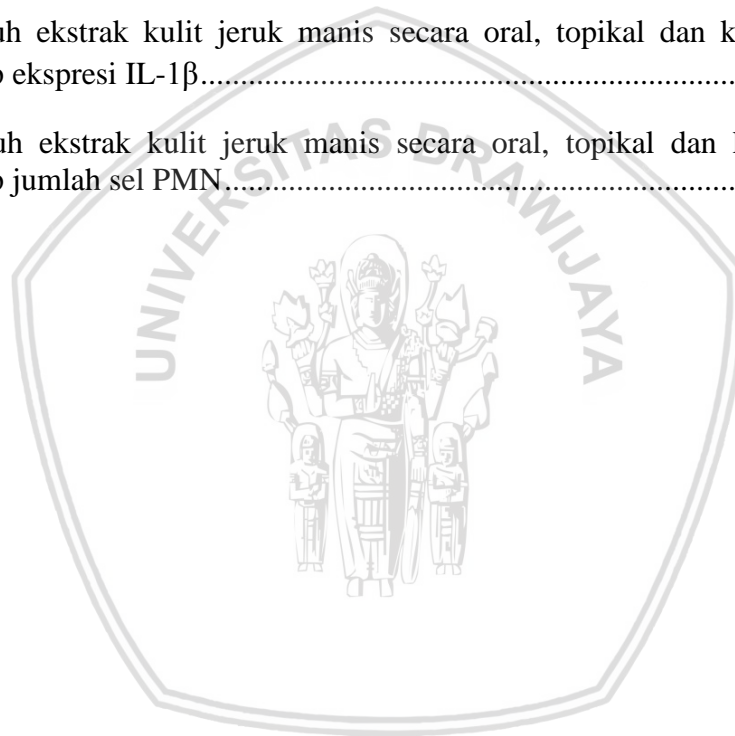


5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis ( <i>Citrus sinensis</i> ) terhadap Ekspresi Interleukin 1 $\beta$ pada Luka Insisi Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	<b>Error! Bookmark no</b>
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis ( <i>Citrus sinensis</i> ) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear (PMN) pada Luka Insisi Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	<b>Error! Bookmark no</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	
..... Error! Bookmark not defined.	
6.1 Kesimpulan .....	<b>Error! Bookmark no</b>
6.2 Saran.....	<b>Error! Bookmark no</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	
..... Error! Bookmark not defined.	
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>82</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian .....	45
5.1 Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap ekspresi IL-1 $\beta$ .....	60
5.2 Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap jumlah sel PMN.....	66



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur kimia Streptozotocin .....	13
2.2 Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) strain Wistar .....	15
2.3 Histologi kulit pengecatan HE .....	17
2.4 Susunan kulit jeruk manis .....	31
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	39
4.1 Gambaran histologi leukosit polimorfonuklear pada jaringan kulit menggunakan pewarnaan HE .....	53
5.1 Gambaran makroskopis kesembuhan luka insisi pada tikus hari ke-10.....	56
5.2 Ekspresi Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) (perbesaran 400x) pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia (perbesaran 400x) .....	59
5.3 Gambaran mikroskopis sel PMN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoxililn eosin (HE) (perbesaran 400x) .....	66

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	82
2. Determinasi Tanaman Jeruk Manis.....	83
3. Uji Fitokimia Kulit Jeruk Manis.....	84
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	85
5. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis.....	87
6. Perhitungan Dosis Induksi Streptozotocin (STZ).....	88
7. Perhitungan Pembuatan Sediaan Terapi.....	89
8. Pembuatan Preparat Histologi.....	90
9. Pewarnaan <i>Hematoxyline Eosin</i> (HE).....	91
10. Ekspresi Interleukin-1 $\beta$ menggunakan Imunohistokimia.....	92
11. Hasil Uji Statistika IL-1 $\beta$ .....	94
12. Hasil Uji Statistika Sel Polimorfonuklear.....	98
13. Dokumentasi Kegiatan.....	102

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
$^{\circ}\text{C}$	: Derajat Celsius
%	: Persen
$\mu$	: Mikron
$\beta$	: Beta
ADP	: Adenosin Difosfat
AGE	: <i>Advanced Glycation End-product</i>
ANOVA	: Analysis of Variance
ATP	: Adenosin Trifosfat
BB	: Berat badan
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
cm	: Centimeter
DAB	: Diaminobenzidine
dL	: Desiliter
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
GLUT2	: <i>Glucose Transporter 2</i>
HE	: Hematoksilin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
IL-1 $\beta$	: Interleukin-1 $\beta$
kg	: Kilogram
L	: Liter
m	: Meter
mg	: Miligram
MLD	: <i>Multiple Low Dose</i>
MMP	: Matrix Metalloproteinase
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide –Hydrogen</i>
NADPH	: Nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen fospat
NBF	: <i>Neutral-buffered Formalin</i>
NIDDM	: <i>Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
NO	: Nitrit Oksida
PARP	: <i>Poly ADP-Ribose Polymerase</i>
PMN	: Polimorfonuklear
SDH	: Sorbitol dehidrogena



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pada era globalisasi saat ini pola hidup yang tidak sehat dapat meningkatkan berbagai macam penyakit, salah satunya adalah Diabetes Melitus (DM). Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan kondisi gula darah diatas nilai normal atau hiperglikemia akibat terganggunya sekresi insulin, kerja insulin maupun kombinasi keduanya. Pada kondisi hiperglikemia kronis akan terjadi gangguan metabolisme dan meningkatkan produksi radikal bebas sehingga dapat merusak sel sel dalam tubuh dan menyebabkan komplikasi pada organ lain seperti pada hepar, jantung, ginjal, mata, saraf, dan pembuluh darah (Baqarizky, 2015).

Menurut data *World Health Organisation* (2016), prevalensi penderita DM mencapai 8.5% dari total jumlah orang dewasa di dunia atau sekitar 422 juta orang. Diabetes melitus tidak hanya terjadi pada manusia namun juga pada hewan. Beberapa jenis anjing yang lebih sering terkena diabetes antara lain ras Keeshonds, Malamutes, Finnish Spitzes, Miniature Schnauzers, Miniature Poodles, dan English Springer Spaniels, sedangkan pada kucing yaitu ras Burmese. Kasus diabetes lebih tinggi pada hewan yang sudah distrelisasi, mengalami obesitas dan berusia tua (Hoenig, 2003). Pada tahun 2015 dilakukan penelitian terhadap 10.000 anjing dan kucing dan ditemukan 24 kasus DM pada anjing, dan 68 kasus DM pada kucing (Aja, 2016). Hewan model diabetes dapat diperoleh dengan menggunakan agen diabetogenik yaitu

Streptozotocin, yang bekerja dengan cara merusak DNA sel  $\beta$  pankreas. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas akan mengakibatkan terjadi gangguan produksi insulin sehingga glukosa tidak bisa dimetabolisme dan terjadi hiperglikemia.

Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis normal jaringan akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal. Pada jaringan yang rusak selanjutnya terjadi penyembuhan luka yang terdiri atas 4 fase yaitu hemostasis inflamasi, proliferasi, dan maturasi (*remodelling*). Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes terjadi lebih lama dibandingkan kondisi luka tanpa DM. Luka penderita diabetes menunjukkan proses penyembuhan yang abnormal ditandai dengan inflamasi persisten, infeksi bakteri dan penumpukan eksudat (Falanga, 2005). Terhambatnya proses kesembuhan luka juga dipengaruhi oleh keberadaan sitokin proinflamasi dalam jangka waktu yang lama. Inflamasi dibutuhkan dalam proses penyembuhan luka, namun fase inflamasi yang berkepanjangan juga berdampak terhadap lama waktu penyembuhan luka. Faktor proinflamasi tersebut salah satunya adalah Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), sitokin ini dihasilkan oleh makrofag, monosit, sel natural killer (NK) dan neutrofil. IL- $1\beta$  dapat menginduksi migrasi dari sel-sel inflamasi, keratinosit, proliferasi fibroblas, sintesis fibronektin, kolagen, dan juga mempromosi produksi sitokin profibrotik (TGF-  $\beta$  dan IL-6) (Alan, 2009).

Pada fase inflamasi juga terdapat peningkatan jumlah sel radang seperti sel polimorfonuklear (PMN). Jumlah sel PMN akan bertambah di daerah luka dan mencapai puncaknya dalam 24-48 jam. Pada luka tanpa infeksi, jumlah sel PMN akan mengalami penurunan pada hari ketiga dan dilanjutkan dengan peningkatan sel

makrofag dan limfosit T. Hiperglikemia kronis pada DM dapat mempengaruhi kerja dari fungsi fagositosis dari PMN (Bhattacharya, *et al.*, 2014). Terganggunya proses fagositosis bakteri dan jaringan sisa oleh PMN dapat meningkatkan resiko infeksi pada luka dan menghambat proses kesembuhan luka. Lamanya proses kesembuhan luka pada penderita DM juga diakibatkan oleh produksi *advance glycosylation end products* (AGE) yang dapat berikatan dengan reseptor makrofag spesifik kemudian mengakibatkan sintesis sitokin proinflamasi secara terus menerus serta peningkatan stres oksidatif pada area luka.

Disamping melakukan kontrol gula darah, luka diabetes harus mendapat terapi agar tidak menjadi gangren. Lamanya kesembuhan luka pada penderita diabetes menyebabkan luka rentan terinfeksi bakteri sehingga sering digunakan antibiotik, namun pemberian antibiotik dalam jangka waktu yang panjang dapat menimbulkan resistensi bakteri pada luka. Perawatan luka dengan balutan luka secara modern menggunakan hidrogel dapat mempercepat kesembuhan luka pada penderita DM namun perawatan ini membutuhkan biaya yang tinggi (Ismail, 2009). Maka dari itu dibutuhkan terapi alternatif untuk mempercepat kesembuhan luka dari penderita diabetes salah satunya menggunakan obat herbal kulit jeruk manis.

Selain menjadi selai dan manisan, ternyata kulit jeruk yang merupakan limbah buah jeruk ini dapat menjadi terapi alternatif luka pada penderita DM. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kandungan antioksidan pada kulit jeruk manis memiliki efek antidiabetik dan meningkatkan aktivitas penyembuhan luka pada tikus (Ahmad, *et al.*, 2013; Muhtadi, dkk., 2013; Ramasamy and Bhaskar, 2016).

Kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) memiliki kandungan asam askorbat dan flavonoid yang dapat membantu mempercepat kesembuhan luka pada penderita DM. Asam askorbat mampu menekan glikasi protein pada kondisi hiperglikemia sehingga produksi AGE. Senyawa flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin mampu menekan produksi enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga mempercepat selesainya fase inflamasi pada luka DM. Flavonoid juga dapat mencegah hambatan kesembuhan luka dengan menekan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) (Safari, *et al.*, 2006; Cunningham, 2013; Kartikaningtyas, 2015).

Berbagai kandungan yang dimiliki kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*), diketahui memiliki potensi sebagai antiinflamasi dan dapat menekan komplikasi yang menghambat kesembuhan luka sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif luka pada penderita DM. Terapi DM menggunakan ekstrak kulit jeruk manis dibuat dalam bentuk sediaan serbuk *effervescent* dan salep. Serbuk *effervescent* digunakan sebagai sediaan terapi per oral karena membutuhkan waktu absorpsi yang lebih cepat dibanding sediaan tablet. Sediaan ini juga lebih mudah diberikan terhadap pasien yang kesulitan menelan obat tablet konvensional. Salep sebagai sediaan topikal memiliki kelebihan menjaga kelembapan kulit dan dapat bertahan lama pada permukaan kulit sehingga diharapkan memperpanjang efek terapi. Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini akan mengkaji jumlah sel polimorfonuklear (PMN) dan ekspresi sitokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi terapi serbuk *effervescent* per oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal dapat mempengaruhi penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus?
2. Apakah pemberian serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal dapat mempengaruhi penurunan jumlah sel PMN pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan diatas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Penggunaan tikus telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian UB no:761-KEP-UB (Lampiran 1).
2. *Multi low dose* Streptozotocin yang digunakan diinduksikan secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB sekali sehari selama 5 hari berturut-turut (Aulani'am, 2005) diinkubasi selama 14 hari dan penentuan kondisi diabetes diukur menggunakan Glukometer digital dan dinyatakan Diabetes jika glukosa darah >200 mg/dl (Hussein, 2010)
3. Luka insisi *full thickness* dibuat menggunakan scalpel steril sepanjang 2 cm diantara regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis* (1 cm di lateral vertebral

columna, 5 cm dibelakang garis intraaural) pada tikus teranastesi *xylazin ketamin* (Alizadeh, 2010).

4. Tanaman kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) yang digunakan berasal dari kota Batu dan diuji determinasi di UPT Materica Medica kota Batu. Kulit jeruk manis diekstrak menggunakan etanol 96%.
5. Ekstrak kulit jeruk dibuat menjadi salep dengan penambahan basis Vaseline album sehingga didapatkan salep dengan konsentrasi 5%. Salep diberikan pada luka sebanyak  $\pm 0,1$  g, 1 kali sehari selama 10 hari (Ramasamy and Bhaskar, 2016).
6. Serbuk *effervescent* kulit jeruk manis diberikan sekali sehari sebanyak 500 mg/kgBB ditambahkan asam sitrat, asam tartrat dan natrium bikarbonat (perbandingan 3,5:1:1,5:3) (Novidiyanto dan Astuti, 2008; Muhtadi, dkk., 2013).
7. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi IL-1 $\beta$  dengan imunohistokimia dan penghitungan jumlah sel PMN menggunakan pewarnaan *Hematoxyllin Eosin* (HE) dengan bantuan *software Image Raster*.

#### 1.4. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal terhadap penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes melitus.

2. Mengetahui pengaruh serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal terhadap penurunan jumlah sel PMN pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.

### 1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi dan bukti mengenai terapi ekstrak kulit jeruk manis dalam sediaan *effervescent* per oral dan salep secara topikal memiliki pengaruh terhadap ekspresi sitokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dan jumlah sel polimorfonuklear (PMN) pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus. Pemberian serbuk *effervescent* dan salep kulit jeruk manis diharapkan dapat dijadikan sebagai terapi alternatif dalam proses penyembuhan luka insisi penderita diabetes melitus.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diabetes Melitus

#### 2.1.1 Defenisi Diabetes Melitus

Diabetes Melitus adalah penyakit kelainan metabolik yang dikarakteristikan dengan *hiperglikemia* kronis serta kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein diakibatkan oleh kelainan sekresi *insulin*, kerja *insulin* maupun keduanya. *Hiperglikemia* kronis pada diabetes melitus akan disertai dengan kerusakan, gangguan fungsi beberapa organ tubuh khususnya mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah. Walaupun pada diabetes melitus ditemukan gangguan metabolisme semua sumber makanan, kelainan metabolisme yang paling utama ialah kelainan metabolisme karbohidrat (glukosa) (Irawan, 2009).

Glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) merupakan monosakarida yang memiliki peranan penting sebagai sumber energi bagi tubuh. Dalam respirasi selular, sel-sel mengekstraksi energi yang tersimpan dalam molekul glukosa. Metabolisme glukosa di dalam tubuh dipengaruhi oleh hormon insulin. Hormon insulin adalah protein kecil dengan berat molekul 5700, terdiri atas dua rantai polipeptida yang saling berhubungan. Insulin disintesis oleh sel  $\beta$  pankreas di pulau langerhans pankreas. Pulau-pulau langerhans merupakan kumpulan sel-sel endokrin sel  $\beta$  pankreas (menghasilkan hormon insulin) dan sel-sel alfa (mensekresikan hormon peptida glukagon). Insulin dan glukagon bekerja antagonis untuk mengatur glukosa di dalam darah. Pengaturan berfungsi sebagai bioenergetik dan homeostasis, karena glukosa merupakan bahan utama untuk

respirasi seluler dan sumber kunci kerangka karbon untuk sintesis senyawa organik lainnya. Dalam kondisi DM terjadi defisiensi insulin atau hilangnya respon insulin terhadap jaringan target sehingga glukosa tidak dapat dibawa masuk ke dalam sel sehingga terjadi hiperglikemia (Campbell, 2004). Oleh karena itu diagnosis diabetes melitus selalu berdasarkan tingginya kadar glukosa dalam plasma darah (John, 2006). Gejala klinis diabetes melitus pada anjing dan kucing meliputi *polyuria*, *polydipsia*, *polyphagia*, dan kekurusan. Gejala klinis tersebut akan tampak apabila kadar gula darah mencapai 180-220 mg/dl pada anjing, dan 220-270 mg/dl pada kucing (Nelson and Claudia, 2014).

## **2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus**

### **2.1.2.1 Diabetes Melitus Tipe-1**

Diabetes Melitus Tipe-1 disebabkan oleh defisiensi hormon insulin karena kerusakan sel  $\beta$  pankreas, yang disebabkan adanya reaksi autoimun. Destruksi sel  $\beta$  pankreas tersebut menyebabkan kadar insulin menjadi sangat rendah, atau bahkan tidak ada sama sekali. Penderita Diabetes Melitus Tipe-1 bergantung pada insulin dari luar untuk bisa bertahan. Oleh karena itu, diabetes tipe ini biasa disebut juga dengan Insulin Dependent Diabetes Melitus (IDDM). Kasus DM Tipe-1 merupakan 5-10% dari keseluruhan kasus diabetes pada manusia (Irawan, 2009).

Diabetes melitus tipe-1 lebih sering dilaporkan terjadi di anjing dibandingkan diabetes melitus tipe-2. Diabetes biasanya menyerang anjing berusia 8 tahun atau lebih dan ras anjing yang rentan antara lain ras Keeshonds, Malamutes, Finnish Spitzes, Miniature Schnauzers, Miniature Poodles, dan English Springer Spaniels.

Diabetes pada anjing dihubungkan dengan gen histokompatibilitas kompleks kelas II (*dog leucocyte antigen (DLA)*) yang memiliki haplotip dan genotip yang sama dari ras rentan tersebut. Gen tersebut mengendalikan pengenalan antigen oleh sistem imun. Pada anjing yang terinfeksi tampak infiltrasi limfosit pada pulau langerhans dan tampak antibodi yang merusak sel pulau langerhans, insulin, proinsulin, asam glutamik intraselular 65 dan antigen insulinoma 2 (Nelson and Claudia, 2014).

#### **2.1.2.2 Diabetes Melitus Tipe-2**

Sebanyak 80%-90% kasus Diabetes Melitus pada manusia tergolong ke dalam Diabetes Melitus Tipe-2 atau Non Insulin Dependent Diabetes Melitus (NIDDM). Diabetes tipe ini terjadi karena kurangnya sekresi insulin atau resistensi insulin. NIDDM dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun faktor gaya hidup atau lingkungan (Goldstein, *et al.*, 2008). Pada hewan peliharaan kucing, penyakit diabetes melitus tipe-2 merupakan yang paling sering terjadi. Sekitar 80% kucing penderita diabetes merupakan DM tipe-2. Faktor resiko perkembangan diabetes pada kucing yaitu obesitas, jenis kelamin (jantan lebih rentan) dan peningkatan usia. Peningkatan berat badan 3,9 kg pada kucing menunjukkan hubungan dengan pengurangan sensitivitas insulin lebih dari 50%. Kucing jantan lebih rentan terkena DM karena memiliki sensitivitas insulin yang lebih rendah dibandingkan betina, selain itu berat badan kucing jantan cenderung lebih cepat meningkat dibandingkan betina (Nelson and Claudia, 2014).

Desensitasi atau penurunan reseptor glukosa pada kelenjar pankreas akan menyebabkan insulin yang dihasilkan oleh sel  $\beta$  pankreas tidak dapat memenuhi jumlah yang dibutuhkan sehingga menimbulkan kondisi hiperglikemia. Diabetes Melitus Tipe-2 juga dapat terjadi karena kurangnya reseptor insulin di jaringan perifer sehingga meskipun jumlah insulin yang dihasilkan cukup, namun sel tidak dapat mengangkut cukup glukosa dalam darah sehingga kadar glukosa darah tetap tinggi. Pada penderita diabetes melitus tipe 2 tidak terjadi pengrusakan sel-sel  $\beta$  pankreas secara autoimun seperti diabetes melitus tipe 1. Defisiensi fungsi insulin pada penderita diabetes melitus tipe 2 hanya bersifat relatif dan tidak absolut (Irawan, 2009).

### **2.1.3 Komplikasi Diabetes Melitus**

Komplikasi diabetes melitus dapat bersifat akut atau kronis. Komplikasi akut terjadi apabila kadar glikemi meningkat dalam waktu yang relatif singkat akibat pola makan yang tidak terkontrol sehingga menyebabkan komplikasi akut seperti ketoasidosis diabetikum dan peningkatan senyawa oksigen reaktif akibat hiperglikemi (Susilowati, 2006). Keadaan hiperglikemia pada diabetes melitus juga dapat memicu autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol sehingga terbentuk senyawa oksigen reaktif (ROS) (Rahma, dkk., 2014). Pada penderita diabetes melitus ditemukan penurunan glutathion eritrosit, glutathion total,  $\alpha$ -tokoferol plasma, dan  $\beta$  karoten plasma. Penurunan antioksidan tersebut menandakan adanya

pembentukan senyawa stres oksidatif seperti lipid hidroperoksida, DNA terkonjugasi, dan protein karbonil (Robertson, 2004).

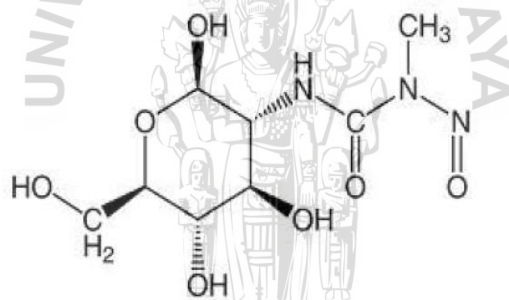
Komplikasi kronis pada penderita DM meliputi kelainan pembuluh darah yang dapat menyebabkan serangan jantung dan stroke. Kerusakan pembuluh-pembuluh darah perifer biasanya mempengaruhi ginjal (nefropati), kerusakan saraf (neuropati) yang dapat menyebabkan paralisa dan gangguan organ hepar akibat peningkatan stres oksidatif. Kelainan pada pembuluh darah akibat hiperglikemia kronis dapat mengakibatkan terganggunya neovaskularisasi oleh sel endotel sehingga terjadi *ischemia peripheral* dan ketidaksempurnaan kesembuhan luka (Syeda, *et al.*, 2012).

## 2.2 Streptozotocin

Streptozotocin merupakan antimikroba yang disintesis dari mikroorganisme tanah yaitu *Streptomyces achromogenes*. Streptozotocin (STZ) atau *2-Deoxy-2-[[[(methylnitrosoamino)-carbonyl]amino]-D-glucofuranose]* adalah salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat menghancurkan sel  $\beta$  pankreas. Streptozotocin secara selektif toksik terhadap sel  $\beta$  (beta) pankreas namun tidak menyebabkan kerusakan pada sel endokrin lain maupun pada parenkim eksokrin (Aulanni'am, 2012). STZ bekerja dengan cara masuk ke dalam sel  $\beta$  pankreas dengan bantuan GLUT-2 untuk merusak DNA sel tersebut.

Streptozotocin memiliki gugus metil yang akan berpindah ke DNA sel  $\beta$  pankreas sehingga menyebabkan kerusakan pada DNA tersebut. Streptozotocin

memiliki gugus nitrosoamino (**Gambar 2.1**) yang dapat bekerja sebagai donor nitrit oksida yang kemudian menekan kerja mitokondria dalam menghasilkan ATP. Terjadinya defosforilasi ATP meningkatkan substrat xantin oksidase dimana sel  $\beta$  sangat peka terhadap enzim ini. Xantin oksidase akan memproduksi hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Akhirnya gabungan antara penambahan metil dan macam-macam zat oksigen reaktif tersebut mengakibatkan fragmentasi DNA (Szkudelski, 2001). Diabetes melitus pada tikus (*Rattus norvegicus*) ditandai dengan kadar gula darah puasa yaitu  $\geq 200$  mg/dl (Anwer, 2014). Kadar gula darah normal pada tikus adalah  $\leq 126$  mg/dL (Barik, *et al.*, 2008).



**Gambar 2.1** Struktur kimia Streptozotocin (Lenzen, 2008)

### 2.3 Hewan Coba Tikus

Pembuatan hewan model diabetes melitus awalnya dilakukan dengan cara pengambilan pankreas secara menyeluruh atau sebagian yang disebut pankreotomi sudah jarang digunakan karena tidak mencerminkan kondisi patologi pada manusia (Kusriningrum, 2008). Selain pankreotomi juga dapat digunakan agen diabetogenik untuk menghasilkan kondisi hiperglikemia pada hewan coba, agen diabetogenik

tersebut antara lain *Streptozotocin*, *Alloxan*, *Vacor*, *Dithizone*, *8-hidroksikuinolon* (John, 2006).

Salah satu hewan coba yang dapat digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*). Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.2**) antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004). Tikus putih memiliki beberapa galur dari hasil perkembangbiakan dan persilangan antar tikus yaitu *Wistar*, *Sprague*, *Dawley*, *Madison*, *Wicaoustin*, dan *Long Evans*.

Menurut Rukmanasari (2010), tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>





**Gambar 2.2** Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar (Agita, 2016)

## 2.4 Kulit

Kulit merupakan barier protektif yang memiliki fungsi vital seperti perlindungan terhadap kondisi luar lingkungan baik dari pengaruh fisik maupun pengaruh kimia, serta mencegah kelebihan kehilangan air dari tubuh dan berperan sebagai termoregulasi. Kulit bersifat lentur dan elastis yang menutupi seluruh permukaan tubuh dan merupakan 15% dari total berat tubuh. Fungsi proteksi kulit adalah melindungi tubuh dari kehilangan cairan elektrolit, trauma mekanik dan radiasi ultraviolet, sebagai barier dari invasi mikroorganisme patogen, merespon rangsangan sentuhan, rasa sakit dan panas karena terdapat banyak ujung saraf, tempat penyimpanan nutrisi dan air yang dapat digunakan apabila terjadi penurunan volume darah dan tempat terjadinya metabolisme vitamin D (Luluk, 2009).

Kulit terdiri atas dua lapisan utama, epitel permukaan disebut epidermis dan lapisan jaringan ikat di bawahnya, dermis (korium) (**Gambar 2.3**).

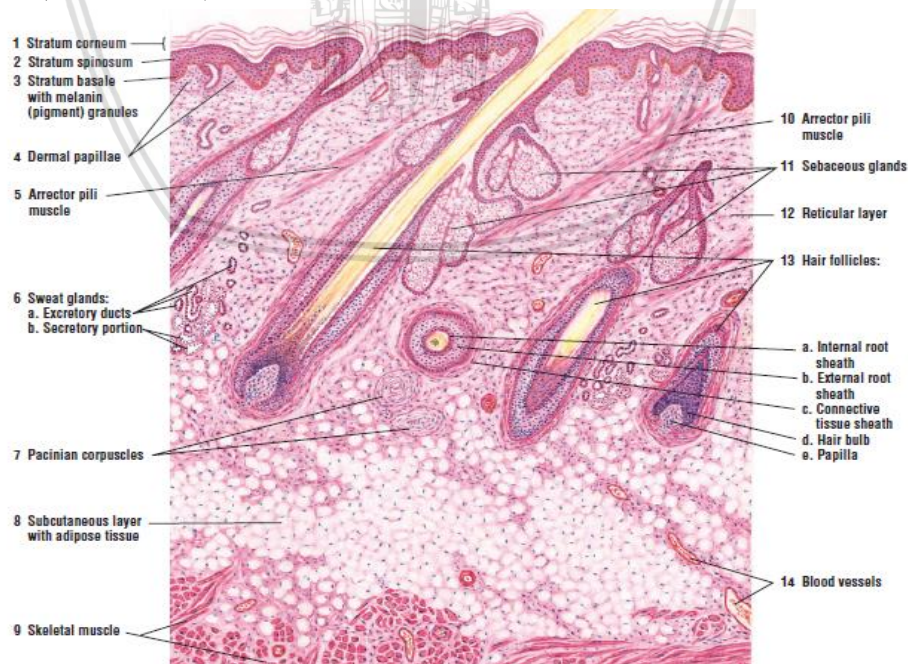
1. Lapisan Epidermis (kutikel). Merupakan lapisan yang terdiri dari epitel skuamus kompleks berkeratin. Epidermis terdiri dari 5 lapisan dari atas ke bawah yaitu :

- a) Stratum korneum (lapisan tanduk) merupakan lapisan terluar dan terdiri atas 15 – 20 lapisan sel. Keratin tersusun tidak teratur sedangkan serabut elastis dan retikulernya lebih sedikit.
- b) Stratum lusidum terdapat langsung di bawah lapisan korneum. Tidak jelas terlihat dan bila terlihat berupa lapisan tipis yang homogen, terang, jernih, dan afinitasnya terhadap bahan warna kecil, inti dan batas sel tak terlihat.
- c) Stratum Granulosum (lapisan keratohialin) terdiri dari 2 – 4 lapis sel skuamus yang rapat dan berbentuk polihedral rendah atau belah ketupat pipih, dan sejajar sumbu panjang permukaan kulit. Sitoplasma berbutir kasar keratohialin (skleroprotein) dan terdapat inti diantaranya.
- d) Stratum Spinosum (stratum Malphigi) tersusun beberapa lapis sel di atas stratum basale. Sel lapisan ini berbentuk polihedral dengan inti bulat atau lonjong. Pada pemeriksaan mikroskopis tampak mempunyai tonjolan sehingga tampak seperti duri yang disebut “prickle cell/spina” dan terlihat saling berhubungan dan di dalamnya terdapat fibril sebagai *intercellular bridge*.
- e) Stratum Basale (stratum germinativum/stratum silindrikum/stratum pigmentosum) tersusun dari selapis sel–sel pigmen basal, berbentuk silindris, batas kurang jelas, inti berbentuk lonjong dan dalam sitoplasmanya terdapat melanin. Pada lapisan basale ini terdapat sel–sel mitosis dan berfungsi reproduktif. Lapisan ini terdiri atas dua jenis sel yaitu berbentuk kolumnar dengan protoplasma basofilik inti lonjong dan besar dan sel pembentuk melanin (melanosit) atau *clear cell* merupakan sel-sel

berwarna muda, dengan sitoplasma basofilik dan inti gelap dan mengandung butir pigmen (*melanosomes*).

2. Lapisan dermis. Lapisan ini terdiri atas 2 lapisan, yaitu :

- a) Stratum Papillare (*stratum Spongiosum*) merupakan bagian yang menonjol ke epidermis, berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah. Lapisan ini terdiri atas fibroblas dan jenis sel jaringan ikat lain, tersebar luas antara berkas – berkas serat kolagen halus terutama kolagen tipe III.
- b) Stratum Retikulare (*stratum kompakturn*) merupakan bagian yang menonjol ke arah subkutan. Lapisan ini terdiri atas serabut-serabut penunjang misalnya serabut kolagen, elastin, dan retikulin. Dasar (*matriks*) lapisan ini terdiri atas cairan kental asam hialuronat dan kondroitin sulfat, di bagian ini terdapat pula fibroblas (Luluk, 2009).



**Gambar 2.3** Histologi kulit pengecatan HE (Eroschenko, 2008)

## 2.5 Luka

Luka merupakan kerusakan jaringan tubuh yang disebabkan oleh faktor-faktor fisik, kimia, listrik, dan suhu yang disertai diskontinuitas jaringan (Barbul and Efron, 2010). Menurut Fletcher (2008), terdapat dua jenis luka berdasarkan waktu penyembuhan yaitu jenis luka akut dan luka kronik. Luka akut merupakan kondisi luka yang membutuhkan sedikit waktu dalam pemulihannya, seperti pada luka bedah, luka bakar, dan luka akibat trauma yang tidak mengalami komplikasi. Luka kronis merupakan kondisi luka yang membutuhkan waktu penyembuhan lebih lama dari jangka waktu penyembuhan normal (4 minggu), akibat dari terganggunya satu atau lebih fase penyembuhan luka. Luka kronis dikaitkan dengan adanya faktor intrinsik dan ekstrinsik termasuk obat-obatan, gizi buruk, penyakit penyerta seperti autoimun dan diabetes.

Luka dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan keutuhan kulit yaitu luka terbuka dan luka tertutup. Luka terbuka adalah luka yang mengalami kerusakan pada seluruh lapisan kulitnya contohnya luka insisi, luka gigitan, laserasi dan luka tusuk. Pada luka tertutup terjadi kerusakan pada jaringan namun tidak pada kulit, biasanya diakibatkan trauma benda tumpul. Luka insisi merupakan luka terbuka yang diakibatkan oleh benda tajam seperti pisau bedah. Tepi luka insisi berbentuk rata dan diikuti dengan *haemorrhagi* (Wombeogo and Kuubiere, 2014).

### 2.5.1 Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai tipe sel, termasuk sel yang berada pada luka atau sel yang ditarik dari sirkulasi menuju luka untuk bekerja sama untuk menimbulkan respon kesembuhan. Sel-sel ini berkomunikasi menggunakan sitokin yang melekat pada reseptor seluler, menginduksi signal intraseluler sehingga terjadi peningkatan dalam respon kesembuhan. Prinsip dasar kesembuhan luka ada dua yaitu perbaikan dan regenerasi. Regenerasi adalah kembalinya kondisi jaringan sama seperti keadaan semula sebelum terjadi perlukaan sedangkan perbaikan adalah kondisi terjadinya jaringan parut atau berkurangnya fungsi atau perubahan bentuk dan komposisi dari jaringan yang sembuh. Fase penyembuhan luka terdapat empat fase yang saling tumpang tindih yaitu fase hemostasis inflamasi, fase proliferasi dan fase *remodelling* (Lorentz and Longaker, 2006).

#### 2.5.1.1 Fase Hemostasis

Pada fase awal setelah terjadi luka, terjadi fase hemostasis dimana pembuluh darah yang terputus pada luka akan mengalami reaksi vasokonstriksi untuk memulihkan aliran darah serta inflamasi untuk membuang jaringan rusak dan mencegah infeksi bakteri. Tahap ini dimulai seketika saat terjadi luka, platelet akan berusaha menjaga hemostasis tubuh dengan cara saling berikatan satu dengan yang lain untuk menutupi luka sehingga aliran darah terhenti. Platelet juga melepaskan fibrinogen yang akan membentuk benang-benang fibrin. Selama proses ini platelet



akan degranulasi dan melepaskan sinyal kimiawi yang disebut sitokin seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). *Platelet-derived growth factor* adalah sitokin yang potent dengan berbagai macam fungsi, termasuk sebagai kemotraktan untuk neutrofil yang merupakan salah satu sel dominan pada fase inflamasi. Keberadaan neutrofil pada area luka menandai bahwa proses penyembuhan luka memasuki tahap selanjutnya, yaitu tahap inflamasi (Diegelmann and Evans, 2004; Lorentz and Longaker, 2006)

### 2.5.2.1 Fase Inflamasi

Berbagai mediator inflamasi yakni prostaglandin, *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), *tumor necrotizing factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$  dan produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) akan menarik lebih banyak neutrofil untuk menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka. Neutrofil akan memasuki area luka dan membersihkannya dari benda asing, bakteri dan sel mati melalui proses fagositosis. Neutrofil pada umumnya ditemukan pada 2 hari pertama dari luka, keberadaan neutrofil yang berkepanjangan menyebabkan konversi luka akut menjadi luka kronis yang tak kunjung sembuh. Sel mast merupakan sel lain yang berperan dalam fase ini dimana sel mast akan melepas granul berisi enzim, histamin dan amin aktif lain untuk membuat pembuluh darah sekitar menjadi vasodilatasi sehingga dapat dilalui sel mononuklear untuk masuk ke area luka (Velnar, 2013).

Setelah 48 jam sejak terjadinya luka, makrofag akan masuk ke area luka dan melepaskan faktor pertumbuhan dan sitokin yang menstimulasi proliferasi fibroblas,

sekresi kolagen dan neovaskularisasi sehingga mempercepat formasi jaringan granulasi. Sel makrofag ini memiliki kemampuan fagositosis yang sangat tinggi untuk memfagositosis sel yang rusak, neutrofil berisi bakteri, matriks yang rusak, debris asing dan bakteri yang masih terdapat pada area luka. Kehadiran makrofag merupakan penanda akan berakhirnya fase inflamasi dan mendekati awal fase proliferasi (Velnar, 2013).

#### **2.5.2.2 Fase Proliferasi**

Setelah luka berhasil dibersihkan dari jaringan mati dan tidak terjadi infeksi bermakna maka dimulailah fase proliferasi. Fibroblas akan mengelilingi jaringan dan distimulasi untuk proliferasi pada 3 hari pertama, sel ini kemudian migrasi ke area luka akibat dari pelepasan TGF- $\beta$  dan PDGF oleh sel inflamasi dan platelet. Fibroblas muncul secara bermakna di area luka pada hari ke-3 sampai 19 dan mencapai puncaknya pada hari ke-7 (Flanagan, 2000).

Di area luka fibroblas berproliferasi dan menghasilkan protein matriks hyaluronic, fibronectin, proteoglikan dan prokolagen tipe 1 dan tipe 3. Fibroblas juga mensintesis kolagen sebagai dasar formasi matriks ekstraseluler. Regulasi sintesis kolagen dikendalikan pada beberapa tingkatan. Sejumlah faktor pertumbuhan termasuk TGF- $\beta$  dan FGF memiliki pengaruh yang besar pada ekspresi gen kolagen. Desposisi dan remodelling kolagen juga dikendalikan oleh berbagai proteinase yang mendegradasi kolagen. Pada fase inflamasi, makrofag yang teraktivasi menghasilkan TNF- $\alpha$  kemudian menginduksi makrofag untuk menghasilkan IL-1 $\beta$  yang berperan



sebagai mitogenik fibroblas dan ekspresi MMP-9 untuk degradasi kolagen. Degradasi kolagen tersebut juga berperan untuk menstimulasi peningkatan proliferasi fibroblas.

Kolagen dan elastin akan menutupi luka dengan membentuk matriks/ikatan jaringan baru atau proses granulasi yang menghasilkan jaringan granulasi. Jaringan granulasi merupakan jaringan pengganti matriks sementara yang pada awalnya terdiri dari fibroblas dan sel darah merah, diikuti dengan perkembangan matriks sementara dan kapiler baru yang dikelilingi oleh sel fibroblas dan sel inflamasi (Rubin, 2008).

Sel endotel menghasilkan faktor angiogenik termasuk *fibroblas growth factor* (FGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), PDGF, angiogenin, TGF- $\alpha$  dan TGF- $\beta$ . Agen stimulus tersebut akan bekerja pada proliferasi sel endotel dengan cara mengaktifkan mitosis, promosi lokomosi dan stimulasi sel host untuk melepaskan faktor pertumbuhan endotel sehingga terbentuk kapiler baru. Setelah jaringan granulasi terbentuk dalam waktu 4-6 hari maka dilanjutkan dengan proses epitelisasi. Sebenarnya epitelisasi dimulai segera setelah terjadi perlukaan distimulasi oleh IL-1 $\beta$  dan TGF- $\alpha$  dan ditingkatkan oleh *keratinocyte growth factor* (KGF). Pada proses ini fibroblas akan mengeluarkan KGF yang berfungsi sebagai stimulasi mitosis sel epidermal. Sel basal akan mengisi permukaan luka, tempat sel basal yang kosong kemudian diisi sel baru yang terbentuk dari proses mitosis. Proses ini berhenti apabila epitel telah saling menyentuh dan menutupi seluruh permukaan luka. Epitelisasi berguna sebagai pertahanan terhadap infeksi dan kehilangan cairan pada area luka (Prasetyono, 2009).

### 2.5.2.3 Fase Maturasi atau Remodelling

Fase akhir dari kesembuhan luka dimulai dari 20 hari setelah terjadi perlukaan dan dapat berjalan sampai beberapa bulan bahkan sampai bertahun-tahun. Karakteristik penting dari fase ini yaitu deposisi dari kolagen dan kontraksi jaringan parut. Perpindahan fibroblas mendorong kolagen dan mengakibatkan kontraksi jaringan jaringan parut. Kolagen tipe 3 diproduksi dan di deposisi fibroblas ketika fase proliferasi yang akan digantikan oleh kolagen tipe 1 beberapa bulan kemudian setelah degradasi kolagen tipe 3. Degradasi ini dimediasi sekresi MMP oleh makrofag, fibroblas dan sel endotel. Kekuatan jaringan parut tersebut meningkat perlahan sebagai dampak perubahan kolagen dan peningkatan persilangan kolagen (Velnar, 2013).

Fase akhir ditunjukkan oleh keseimbangan antara deposisi kolagen dan degradasinya. Ketika deposisi kolagen atau sintesis gagal, maka akan mempengaruhi kekuaran jaringan parut. Mengecilnya jaringan parut merupakan hasil dari komplitanya fase maturasi, sebaliknya ketika terjadi kegagalan degradasi kolagen atau sintesis berlebihan, maka jaringan jaringan parut akan hipertropi atau menjadi keloid. Keseimbangan antara degradasi dan sintesis kolagen menghasilkan jaringan parut yang normal (Prasetyono, 2009).

### 2.5.2 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks dan dinamis karena merupakan suatu kegiatan bioseluler dan biokimia yang terjadi saling

berkesinambungan. Proses penyembuhan luka tidak hanya terbatas pada proses regenerasi yang bersifat lokal saja pada luka, namun dipengaruhi pula oleh faktor intrinsik dan faktor ekstrinsik (Pradipta, 2010). Faktor instrinsik adalah faktor dari penderita yang dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan meliputi usia, status nutrisi dan hidrasi, oksigenasi dan perfusi jaringan, status imunologi, dan penyakit penyerta (hipertensi, DM, athereosclerosis). Faktor ekstrinsik adalah faktor yang didapat dari luar penderita yang dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan luka meliputi pengobatan, radiasi, stres psikologis, infeksi, iskemia dan trauma jaringan (Pradipta, 2010).

### **2.5.3 Gangguan Kesembuhan Luka pada Penderita Diabetes Melitus**

Pada penelitian Bhattacharya (2002), menunjukkan bahwa penderita diabetes melitus mengalami hambatan penyembuhan luka. Hal ini terjadi karena hiperglikemia kronis mengakibatkan gangguan fungsi leukosit PMN, penebalan kapiler, malnutrisi dan dehidrasi. Hiperglikemia menyebabkan jejas fungsi fagositosis PMN sehingga terjadi peningkatan frekuensi infeksi karena gangguan kemotaksis, fagositosis pelepasan super oksida. Peningkatan kadar HbA<sub>1c</sub> akan menurunkan aktivitas PMN yang berfungsi sebagai antimikrobial dengan cara fagositosis (Syaifi, 2012).

Penurunan aktivitas fagositosis PMN tersebut diakibatkan terjadinya gangguan pada fungsi *intracellular killing* pada proses fagositosis. Pada kondisi hiperglikemia gula dalam darah diubah menjadi sorbitol melalui jalur poliol yang membutuhkan banyak nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen fosfat

(NADPH). Proses *intracellular killing* membutuhkan banyak energi untuk membentuk radikal bebas dan hidrogen peroksidase namun apabila terjadi kekurangan energi maka kemampuan fagositosis PMN juga berkurang (Syaifi, 2012).

Pada kondisi hiperglikemia, 30% glukosa yang tidak mengalami fosforilasi oleh enzim heksokinase memasuki jalur poliol untuk diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR). Enzim ini menggunakan NADPH untuk mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduksi gugus aldehyd glukosa. Konversi ini menyebabkan penurunan level antioksidan *glutathion* (GSH). Dengan bantuan enzim sorbitol dehidrogenase (SDH), sorbitol akan diubah menjadi fruktosa-3-phosphate dan 3-deoxyglucosone, hasil ini kemudian masuk glikasi non-enzimatik. Pada pembentukan fruktosa ini co-faktor nikotinamida adenosin dinukleotida ( $NAD^+$ ) dikonversi menjadi nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen (NADH) oleh SDH. Nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen merupakan substrat untuk oksidasi NADH sehingga terjadi produksi ROS (Tang, *et al.*, 2012). Hiperglikemia pada penderita DM dapat meningkatkan stres oksidatif, tingginya kadar glukosa dalam darah dapat mengganggu transport elektron pada mitokondria sehingga terjadi produksi superoksida anion. Tingginya kadar gula dalam darah juga memicu stres oksidatif melalui auto-oksidasi dari glukosa melalui glikasi non-enzimatik. Glukosa dapat bereaksi secara non enzimatis dengan gugus-gugus amino protein. Proses ini menghasilkan *advanced glycosylation end product* (AGE) yang terakumulasi pada dinding pembuluh darah. Produk ini merupakan salah satu penanda modifikasi

protein akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino (Setiawan dan Suhartono, 2005).

Akumulasi AGE di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas, selain itu AGE akan berikatan terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) sehingga mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan seperti IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan ini berdampak pada panjangnya fase inflamasi pada luka penderita DM. Kondisi hiperglikemia mengakibatkan akumulasi ROS pada jaringan. Radikal bebas ini memiliki reaktivitas yang tinggi karena dapat menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal (Santoso, *et al.*, 2006).

## 2.6 Interleukin-1 $\beta$

Interleukin-1 $\beta$  merupakan salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses kesembuhan luka terutama fase inflamasi. Sitokin merupakan polipeptida yang diproduksi sebagai respon pada reaksi imun dan inflamasi. Sitokin memiliki sifat *pleiotropic* yaitu bekerja pada beberapa sel target sekaligus dan *redundants* dimana beberapa sitokin dapat memiliki kerja yang sama pada sel target. Interleukin-1 $\beta$  berperan sebagai imunitas nonspesifik dan spesifik. Interleukin-1 $\beta$  disintesis dari pro-IL-1 $\beta$  berukuran 31 kDa yang berada di sitosol sampai kemudian dikonversi menjadi IL-1 $\beta$  matang berukuran 17,5 kDa karena pembelahan proteolitik oleh caspase-1.

Penghasil utama sitokin IL-1 $\beta$  yaitu monosit dan makrofag (Giraldo, 2013). Sitokin ini berperan sebagai sitokin proinflamasi yang diproduksi sebagai respon dari

kerusakan jaringan. Reaksi tersebut antara lain infiltrasi neutrofil ke jaringan, migrasi makrofag, dan produksi sitokin proinflamasi lain (Patel, *et al.*, 2003). Interleukin-1 $\beta$  bekerja pada endotel dengan menginduksi ekspresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Neutrofil, monosit dan limfosit kemudian mengenali molekul adhesi tersebut dan bergerak ke dinding pembuluh darah yang terputus selanjutnya ke jaringan luka (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Interleukin juga berperan dalam fase proliferasi dan maturasi dalam penyembuhan luka. Selain TGF- $\beta$  dan FGF, desposisi dan remodelling kolagen juga dikendalikan oleh berbagai proteinase yang mendegradasi kolagen. Pada fase inflamasi, makrofag yang teraktivasi menghasilkan TNF- $\alpha$  kemudian menginduksi makrofag untuk menghasilkan IL-1 $\beta$  yang berperan sebagai mitogenik fibroblas dan ekspresi MMP-9 untuk degradasi kolagen. Degradasi kolagen tersebut juga berperan untuk menstimulasi peningkatan proliferasi fibroblas (Mittal, *et al.*, 2008).

## 2.7 Sel Polimorfonuklear (PMN)

Leukosit atau sel darah putih merupakan sel darah yang mengandung inti. Rata-rata jumlah normal leukosit dalam darah tikus dewasa berkisar 4.000-10.000/mm<sup>3</sup>. Leukosit terdiri dari dua golongan utama, yaitu agranular (mononuklear) dan granular (polimorfonuklear). Leukosit agranular memiliki sitoplasma homogen sedangkan leukosit granular mengandung granula spesifik dalam

sitoplasmanya dan memiliki bentuk inti yang bervariasi. Leukosit granular antara lain neutrofil, basofil, dan eosinofil (Amanda, 2012).

### 2.7.1 Neutrofil

Salah satu sel polimorfonuklear yang berperan penting dalam penyembuhan luka adalah neutrofil. Neutrofil merupakan komponen terbanyak dari leukosit dengan jumlah bervariasi pada setiap spesies hewan. Jumlah neutrofil pada anjing dan kucing dapat mencapai 40% hingga 70% dari total leukosit. Nama neutrofil berasal dari bahasa Latin (*neuter=neither*) dan bahasa Yunani (*Philein=to love*) yang berarti bahwa granul neutrofil tidak bersifat asidofilik maupun basofilik. Jika dilihat pada preparat ulas darah, inti sel neutrofil bersifat heterokromatik, banyak segmen (2-5 segmen), lobulasi jelas yang dipisahkan oleh benang kromatin tipis dan nukleoplasma. Neutrofil memiliki diameter 9-15  $\mu\text{m}$ , lebih kecil dari eosinofil dan hampir sama dengan basofil (Samuelson, 2007).

Saat terjadi perlukaan dan infiltrasi agen asing, makrofag akan memulai proses fagositosis kemudian menghasilkan sitokin IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Sitokin ini kemudian menstimuli sel endotel untuk memproduksi molekul adhesi yaitu selektin, integrin, ICAM dan VCAM. Neutrofil yang berada dalam pembuluh darah kemudian mengenali molekul adhesi ini dan masuk ke dalam area luka saat terjadi vasodilatasi pembuluh darah. Neutrofil akan menginvasi area luka untuk membersihkan jaringan dari agen infeksi. Beberapa jam sesudah dimulai inflamasi akut, terjadi kenaikan jumlah neutrofil empat kali hingga lima kali dari jumlah normal, dari 4.000-5.000



menjadi 15.000-25.000 sel/mikroliter. Kondisi neutrofilia ini terjadi karena produk peradangan memasuki aliran darah, kemudian ditransport ke sumsum tulang sehingga neutrofil yang tersimpan segera masuk ke sirkulasi darah (Pradipta, 2010).

### 2.7.2 Eosinofil

Eosinofil merupakan leukosit granular yang memiliki diameter 10-15  $\mu\text{m}$  dimana pada sitoplasmanya terdapat granula yang bersifat asidofilik. Jumlah eosinofil dalam sirkulasi berkisar 3-9% dari jumlah total leukosit. Inti sel eosinofil memiliki 2-3 segmen. Eosinofil bermigrasi dari aliran darah ke jaringan dan tetap berada di jaringan sampai 12 hari. Membran sel eosinofil dapat berikatan dengan leukotrin, histamin dan *eosinophil chemotactic factor* (ECF) kemudian eosinofil akan menuju ke lokasi peradangan, infeksi parasit dan reaksi alergi. Ketika sampai ke lokasi, eosinofil akan melepaskan protein kationik yang akan membunuh cacing, atau memakan kompleks antigen-antibodi dan melepaskan substansi yang dapat mengontrol respon peradangan (Samuelson, 2007). Penurunan jumlah eosinofil dapat mengindikasikan terjadinya infeksi parasit darah. Peningkatan eosinofil dapat terjadi pada kondisi *helminthiasis*, peradangan atau alergi.

### 2.7.3 Basofil

Di dalam darah basofil merupakan jenis leukosit granular yang paling sedikit ditemukan yaitu sekitar 0-3% dari jumlah total leukosit. Basofil memiliki nukleus yang bervariasi dari segmen yang jelas atau dua lobus yang sederhana. Pada sitoplasma basofil terdapat granula yang bersifat basofilik dan seringkali menutupi

nukleus. Granul basofil mensekresi histamin dan heparin yang berfungsi serupa dengan sel mast pada reaksi alergi yang berkaitan dengan IgE (Samuelson, 2007).

## 2.8 Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*)

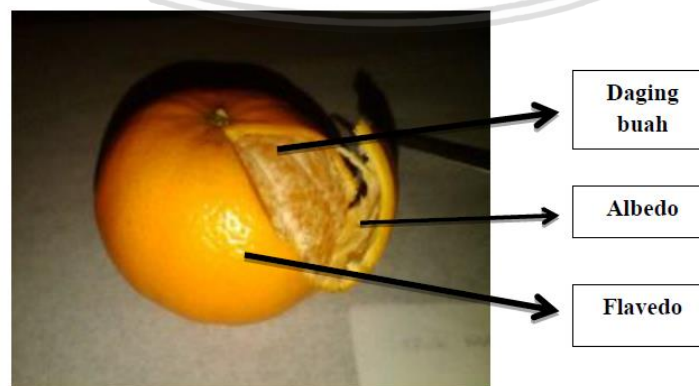
### 2.8.1 Taksonomi dan Morfologi *Citrus sinensis*

Tanaman jeruk manis memiliki morfologi tinggi batang 3-10 m, tangkai daun 0,5-3,5 cm. Helaian daun berbentuk elips atau bulat telur memanjang, dengan ujung tumpul atau meruncing tumpul. Buah jeruk berbentuk bulat atau bulat rata dan memiliki kulit buah yang tebal (sekitar 0,3–0,5 cm), daging buah kuning, jingga atau kemerah-merahan. Daging buah terbagi-bagi atas 8-13 segmen yang mengelilingi sumbu buah. Biji jeruk berbentuk bulat telur dan berwarna putih atau putih keabuan. Di Indonesia terdapat beberapa varietas jeruk manis yaitu jeruk manis pacitan, jeruk manis sunkis lau kawar, jeruk manis medan, dan jeruk manis sunkis atau washington orange (WNO). Jeruk yang digunakan pada penelitian ini yaitu jeruk manis pacitan. Ciri khas jeruk pacitan yaitu kandungan air dalam buah yang banyak dan rasa buah yang manis dengan kulit tebal (Simanjuntak, 2015). Kedudukan taksonomi jeruk manis menurut Milind and Caturvedi (2012) yaitu:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Dikotiledon
Sub Kelas	: Sapindales
Ordo	: Rosidae
Keluarga	: Rutaceae
Sub-Keluarga	: Aurantoideae

Genus	: <i>Citrus</i>
Sub Genus	: <i>Papeda</i>
Spesies	: <i>Sinensis</i>

Bagian utama buah jeruk dari luar sampai ke dalam adalah kulit (tersusun atas flavedo, kelenjar minyak, albedo dan ikatan pembuluh), segmen-segmen (dinding segmen, rongga cairan, biji), *core* (bagian tengah yang terdiri dari ikatan pembuluh dan jaringan parenkim). Kulit jeruk secara fisik dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu flavedo dan albedo (**Gambar 2.4**). Albedo merupakan jaringan seperti spon berwarna putih yang berhubungan dengan *core* ditengah-tengah buah. Bagian albedo mengandung banyak selulosa, hemiselulosa, lignin, senyawa pektat dan fenol. Albedo banyak mengandung senyawa flavon hesperidines seperti hesperidin dan naringin serta senyawa-senyawa limonin. Flavedo dicirikan dengan adanya warna hijau, kuning atau orange. Pigmen yang terdapat pada flavedo adalah kloroplas dan karetenoid (Simanjuntak, 2015).



**Gambar 2.4** Susunan kulit jeruk manis (Simanjuntak, 2015)

### 2.8.2 Efek Kulit Jeruk terhadap Diabetes Melitus dan Luka

Pada penelitian Ahmad, *et al.* (2013) pemberian ekstrak kulit *Citrus sinensis* dosis 400mg/kgBB secara oral pada tikus model diabetes dengan luka eksisi *full thickness* mempercepat kesembuhan luka lebih baik dibandingkan dengan terapi ekstrak kulit *Citrus lemonen* dan *Citrus paradise*. Pada penelitian Ramasamy dan Bhaskar (2016) terapi salep ekstrak *Citrus sinensis* 5% menunjukkan kesembuhan luka *full thickness* yang lebih cepat dibandingkan dengan salep 10% dan tikus kontrol tanpa terapi.

Kulit jeruk memiliki komposisi kimia seperti asam askorbat dan flavonoid. Sebagai antioksidan, flavonoid menghambat radikal bebas yang berperan penting dalam patogenesis inflamasi baik pada inflamasi akut maupun kronis. Menurut penelitian Nogata, *et al.* (2005), kandungan flavonoid dalam kulit jeruk manis lebih tinggi dibanding bagian jeruk lainnya dimana kulit jeruk mengandung flavonoid sebanyak 2391mg/100g berat kulit segar dibandingkan buah jeruk yang mengandung flavonoid sebanyak 865,8mg/100g berat buah segar. Hesperidin merupakan kandungan flavonoid terbanyak pada kulit jeruk manis yaitu sekitar 2070mg/100g berat basah. Hesperidin dapat membantu mempercepat proses kesembuhan luka karena memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat kerja enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga reaksi inflamasi dapat ditekan (Kumar, 2013; Sakata, *et al.*, 2003; Ribeiro, *et al.*, 2014).

Selain senyawa flavonoid, pada kulit jeruk manis terdapat vitamin C (asam askorbat) yang mampu menekan hambatan kesembuhan luka yang ditimbulkan oleh

kondisi hiperglikemia. Kandungan vitamin C pada kulit jeruk yaitu sekitar 66,5 mg/100g berat kulit. Grup karbonil pada vitamin ini dapat berikatan dengan kuat dengan grup asam amino pada protein. Mekanisme ini mampu berkompetisi dengan glukosa untuk melakukan glikasi pada protein sehingga keberadaan vitamin C dapat menekan glikasi protein oleh glukosa pada kondisi hiperglikemia. Asam askorbat juga berperan sebagai kofaktor dari hidroksilasi dari prolin dan lisin untuk formasi prokolagen (Safari, *et al.*, 2006; Cunningham, 2013).

Kondisi hiperglikemia mengakibatkan berkurangnya kemampuan fagositosis oleh sel PMN sehingga meningkatkan kemungkinan terjadinya infeksi bakteri pada luka. Pada penelitian Kiruba, *et al.* (2016), menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk manis memiliki efek antimikrobal terhadap luka *foot ulcer* pada pasien diabetes. Bakteri tersebut antara lain *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kandungan limonen pada kulit jeruk manis menunjukkan zona inhibisi lebih tinggi pada bakteri gram positif dibanding gram negatif.

Selain mempercepat kesembuhan luka, ekstrak kulit jeruk manis bersifat antidiabetes sehingga mampu memperbaiki kondisi hiperglikemia pada tikus DM dan mencegah komplikasi penyembuhan luka terjadi. Flavonoid dapat meregenerasi sel  $\beta$  pankreas yang telah rusak akibat induksi STZ, sehingga hormon insulin dapat diproduksi dan kadar glukosa dalam darah dapat diturunkan. Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai antioksidan dengan mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi stres oksidatif. Jika stres oksidatif berkurang maka dapat mencegah perkembangan disfungsi dan kerusakan sel  $\beta$  pankreas (Muhtadi, dkk., 2013).

## 2.9 Salep sebagai Sediaan Topikal

Salep (Unguenta) adalah sediaan semisolid yang mudah dioleskan dan digunakan sebagai obat luar. Salep pada prinsipnya digunakan sebagai terapi lokal untuk melindungi kulit atau untuk mengobati penyakit kulit yang akut maupun kronis. Pada sediaan ini diharapkan adanya penetrasi obat ke dalam lapisan kulit teratas sehingga memberikan efek penyembuhan. Karakteristik salep harus homogen yang ditentukan dengan mengoles salep pada sekeping kaca atau bahan transparan lain untuk menunjukkan susunan yang homogen (Anief, 2005).

Salep terdiri dari bahan pembawa dan zat aktif obat yang diharapkan dapat menjaga pengobatan dalam memperpanjang lama kontak dengan kulit. Zat aktif obat merupakan komponen bahan topikal yang memiliki efek terapeutik, sedangkan bahan pembawa adalah bagian inaktif dari sediaan salep yang berfungsi sebagai pembawa untuk bahan aktif berkontak dengan kulit. Zat pembawa yang baik memiliki ciri mudah dioleskan, mudah dibersihkan dan tidak mengiritasi. Vaselin album merupakan salah satu bahan pembawa hidrokarbon yang memiliki sifat dominan minyak. Vaselin album adalah golongan lemak mineral diperoleh dari minyak bumi. titik cair sekitar 10-50°C, mengikat 30% air, tidak berbau, transparan, konsistensi lunak. Basis ini digunakan dalam formulasi sediaan salep dengan fungsi utama sebagai emolien. Vaselin putih berupa massa lunak putih, tembus cahaya, tidak berbau, dan tidak berasa. Vaselin praktis tidak larut dalam air, gliserin, etanol, dan aseton (Rowe, 2009), larut dalam kloroform, eter, eter minyak tanah. Vaselin



merupakan bahan yang inert sehingga jarang dijumpai adanya inkompatibilitas (Rowe, 2009).

Farmako kinetik sediaan topikal secara umum menggambarkan perjalanan bahan aktif dalam konsentrasi tertentu yang diaplikasikan pada kulit dan kemudian diserap lapisan kulit yang kemudian didistribusi secara sistemik. Secara umum perjalanan sediaan topikal setelah diaplikasikan melewati tiga kompartemen yaitu permukaan kulit, stratum korneum, epidermis dan dermis. Stratum korneum berperan sebagai reservoir bagi bahan pembawa, kemudian unsur zat pembawa akan evaporasi, selanjutnya zat aktif berikatan pada lapisan yang dilewati. Pada kondisi tertentu sediaan obat dapat membawa bahan aktif menembus hipodermis. Sementara itu, zat aktif pada sediaan topikal akan diserap oleh vaskular kulit pada dermis dan hipodermis (Schaefer, *et al.*, 2008).

### **2.10 Serbuk *Effervescent* sebagai Sediaan Oral**

*Effervescent* merupakan sediaan obat yang lebih mudah diabsorpsi dibandingkan sediaan tablet konvensional. Absorpsi sediaan *effervescent* membutuhkan waktu 15 menit. Sediaan *effervescent* juga memudahkan pemberian obat bagi pasien yang sulit menelan tablet. Hal ini dikarenakan serbuk *effervescent* dilarutkan terlebih dahulu di air sehingga meningkatkan daya penyerapan obat pada saluran pencernaan.

Komposisi utama *effervescent* yaitu asam sitrat, asam tartarat, dan natrium bikarbonat. Penggunaan kombinasi asam sitrat dan asam tartarat untuk mencegah



timbulnya kesukaran membentuk serbuk, karena penggunaan asam tunggal akan menghasilkan cairan yang lengket. Asam sitrat juga berfungsi sebagai penegas rasa serta menyelubungi *after taste* obat yang biasanya tidak disukai. Natrium bikarbonat merupakan serbuk kristal putih yang menghasilkan gas karbondioksida. Natrium bikarbonat bersifat non higroskopis dan mampu menghasilkan 52% gas karbondioksida. Komposisi asam basa ini dibutuhkan untuk menimbulkan reaksi *effervescent*. Pada penambahan air, asam tartarat dan asam sitrat akan terhidrolisis kemudian akan melepaskan asam yang dalam proses selanjutnya akan bereaksi dengan bahan karbonat dan terbentuk gas CO<sub>2</sub> dan menimbulkan buih (Purwandari, 2007)

Reaksi karbon dioksida yang dihasilkan dapat meningkatkan permeabilitas paraseluler sehingga meningkatkan absorpsi terhadap zat aktif yang terdapat di dalam larutan *effervescent*. Jalur paraseluler merupakan rute absorpsi bahan aktif hidrofilik yang berdifusi kedalam interseluler diantara sel epitel. Peningkatan kemampuan absorpsi tersebut terjadi karena partisi molekul karbon dioksida masuk kedalam membran sel, yang meningkatkan kondisi hidrofobik pada lingkungan, sehingga mengijinkan senyawa aktif hidrofobik untuk diabsorpsi. Efek karbon dioksida ini tidak menimbulkan reaksi toksik pada sel, dan epitel akan kembali normal setelah 20 menit (Palasinamy, *et al.*, 2011).

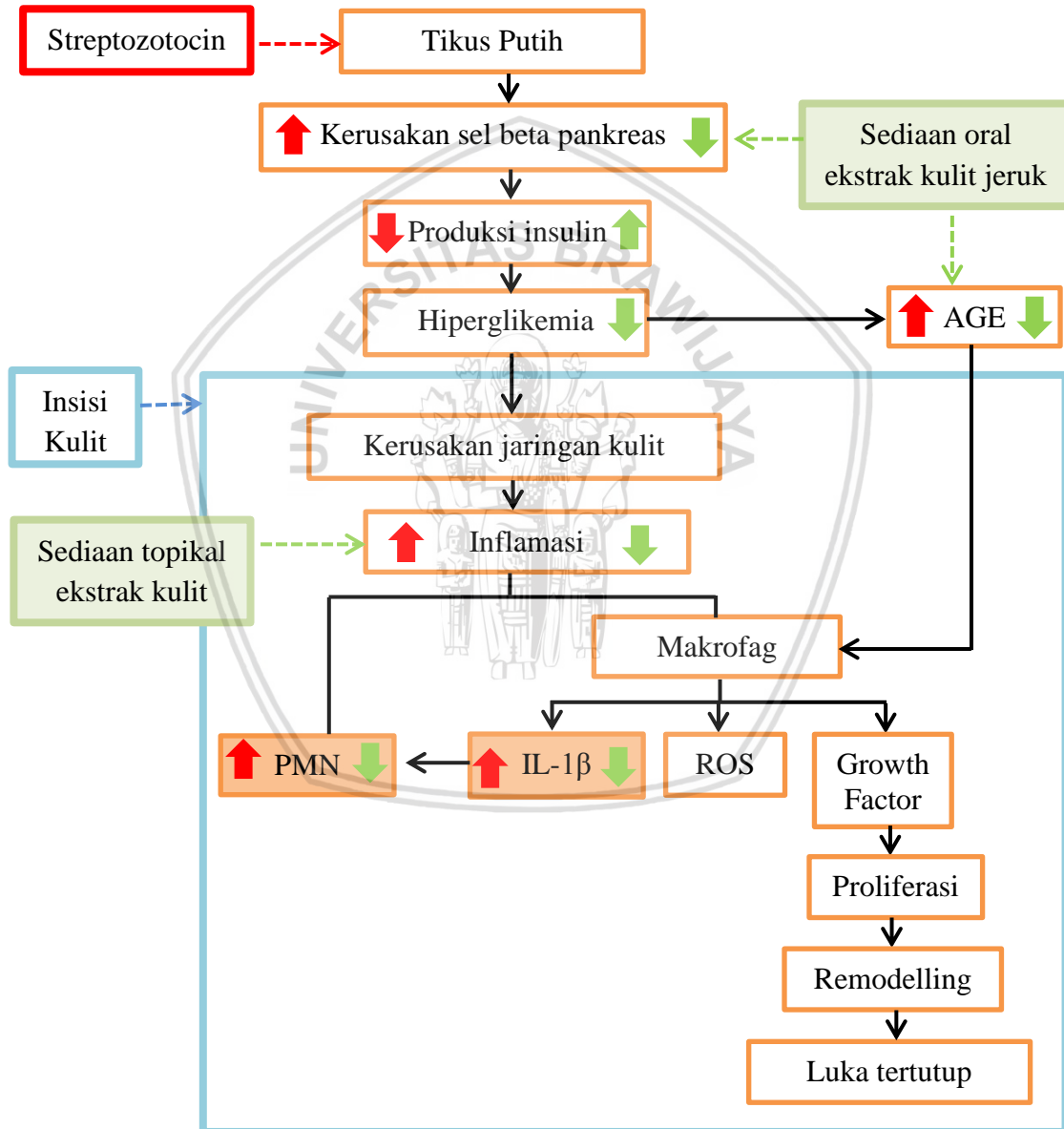
Pembuatan granul *effervescent* harus memerhatikan kelembaban ruangan untuk mencegah reaksi *effervescent* yang prematur. Ruangan yang baik untuk membuat serbuk *effervescent* adalah ruangan dengan kelembaban maksimal 25% dan

suhu maksimal 25<sup>0</sup>C. Menurut Lieberman, *et al.* (1994) suhu dan kelembapan yang rendah merupakan faktor yang sangat penting dalam pembuatan serbuk *effervescent* untuk mencegah penyerapan uap air yang dapat menyebabkan penurunan stabilitas serbuk.















### BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

## Keterangan:

	: Pembuatan Luka		: Perlakuan	
	: Pemberian STZ		: Perlakuan	
	: Pemberian Terapi		: Perlakuan	
	: Variabel yang diteliti		: Kondisi Tikus	
				: Efek Streptozotocin
				: Efek Terapi

Pemberian streptozotocin (STZ) secara *multi low dose* (MLD) bekerja dengan cara membentuk *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribose-nucleic acid* (DNA) pada pulau langerhans pankreas. Streptozotocin masuk ke sel pankreas melalui transpor glukosa dan menghasilkan perubahan DNA sel  $\beta$  akibat alkilasi DNA. Kerusakan DNA akan mengaktifasi poly *ADP-ribose polymerase* (PARP) yang kemudian mengakibatkan penekanan *nicotinamide adenine dinucleoyide* (NAD) sehingga terjadi penurunan ATP dan akhirnya terjadi nekrosis sel beta pankreas. Nekrosis sel  $\beta$  mengakibatkan gangguan produksi insulin sehingga terjadi berbagai gangguan metabolisme seperti metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Gangguan metabolisme karbohidrat tersebut mengakibatkan tingginya kadar gula dalam darah sehingga terjadi kondisi diabetes melitus (DM).

Hiperglikemia pada tikus DM ditandai dengan kadar gula darah puasa  $> 200$  mg/dl. Pada hewan DM yang mengalami kondisi luka, terjadi hambatan penyembuhan luka yang diakibatkan oleh tingginya kadar gula dalam darah tersebut. Pada kondisi diabetes melitus terjadi peningkatan *advance glycosylation end products*

(AGE) melalui jalur glikasi non enzimatis. Hasil produksi ini akan berikatan dengan reseptor makrofag spesifik sehingga meningkatkan sintesis sitokin IL-1 $\beta$  dan memperpanjang fase inflamasi. Sitokin IL-1 $\beta$  menstimulasi endotel untuk menghasilkan faktor adhesi untuk dikenali oleh sel PMN sehingga terjadi peningkatan infiltrasi sel ini pada area luka. Kondisi meningkatnya sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  dan peningkatan sel PMN akan memperlama kesembuhan luka karena luka berada pada fase inflamasi yang lebih lama. Reaksi inflamasi yang terus-menerus dapat mengakibatkan penurunan proliferasi fibroblas dan produksi kolagen dalam proses kesembuhan luka sehingga dibutuhkan waktu yang lebih lama dalam kesembuhan luka diabetes.

Pemberian terapi kulit jeruk secara oral bertujuan untuk mengontrol kadar gula dalam darah sehingga tidak terjadi gangguan kesembuhan luka pada penderita DM. Kandungan flavonoid pada kulit jeruk mampu mengurangi stres oksidatif pada sel  $\beta$  pankreas dan dapat meregenerasi sel yang rusak untuk memproduksi insulin kembali, sehingga kadar gula dalam darah dapat diturunkan. Kandungan asam askorbat dalam kulit jeruk mampu mencegah glikasi non enzimatis pada protein sehingga pembentukan AGE dapat ditekan dan tidak terjadi gangguan kinerja makrofag dalam produksi sitokin proinflamasi. Terapi secara oral bekerja secara sistemik dan didukung dengan terapi topikal yang bekerja secara lokal pada area luka untuk mempercepat kesembuhan luka.

Pemberian terapi secara topikal bertujuan untuk mempersingkat fase inflamasi dalam kesembuhan luka. Senyawa flavonoid hesperidin yang terkandung dalam kulit

jeruk manis bekerja dengan cara menekan produksi enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga mengurangi stimuli terhadap makrofag untuk menghasilkan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$ . Penurunan produksi sitokin ini akan mengurangi produksi faktor adhesi terhadap PMN untuk infiltrasi ke dalam area luka. Terapi ekstrak kulit jeruk manis diharapkan mampu menekan sitokin proinflamasi dan jumlah sel PMN sehingga mempercepat selesainya fase inflamasi agar dapat dilanjutkan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan peningkatan fibroblas, kemudian fase remodelling yang ditandai dengan sintesis kolagen dan degradasi kolagen sehingga proses kesembuhan luka telah selesai.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal mampu menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.
2. Serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal mampu menurunkan jumlah sel PMN pada penyembuhan luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan dimulai dari 10 April 2017 hingga Agustus 2017. Penelitian dilaksanakan di beberapa laboratorium, yaitu di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Ilmu dan Teknologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah evaporator, *waterbath*, oven, *sput* 1 mL, sentrifugator, mortar, ice box, falcon 15 ml, pot penyimpanan organ, cawan petri, *scalpel*, pinset, glukometer, gloves, sonde, aluminium foil, *microtome*, *cover glass*, *object glass*, mikroskop, penggaris, kamera, timbangan, gelas ukur, *software* Optilab viewer, mikroskop (Olympus BX51) dan kandang tikus.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), kulit jeruk manis, vaselin albumin, dextrin, asam sitrat, asam tartrat, natrium bikarbonat, povidone iodine, NaCl fisiologis, formalin 10%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, ethanol 70%, ethanol, 80%, ethanol 90%, ethanol 96%, ethanol 100%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Bovine Serum*



*Albumin* (BSA) 1%, antibodi primer *rabbit polyclonal IL-1 $\beta$* , antibodi sekunder *rabbit polyclonal IgG* berlabel biotin, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diaminobenzidine* (DAB), *Mayer Hematoxylin*, Entellan, akuades, streptozotocin, ketamine, xylazine, formalin, alkohol 70%, parafin, xylol, pewarna hematoxylin eosin (HE), pakan standar tikus, sekam.

### 4.3 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur 8-12 minggu dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut maka setiap kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 761-KEP-UB (Lampiran 1).

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana yang mana subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain adalah (**Tabel 4.1**) :

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
K- (Kontrol Negatif)	Luka insisi + Tanpa Streptozotocin + Tanpa terapi
K+ (Kontrol Positif)	Luka insisi + Streptozotocin + Tanpa terapi
T1 (Oral <i>Effervescent</i> 500mg/KgBB)	Luka insisi + Streptozotocin + Terapi <i>effervescent</i> ekstrak kulit jeruk manis
T2 (Topikal Salep 5%)	Luka insisi + Streptozotocin + Terapi Salep ekstrak kulit jeruk manis
T3 (Kombinasi <i>Effervescent</i> + Salep)	Luka insisi + Streptozotocin + Terapi <i>effervescent</i> dan salep kulit jeruk manis

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Ekstrak kulit jeruk, luka insisi dan streptozotocin

Variabel terikat : Ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel PMN.

Variabel kontrol : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu, pakan, minum, dan kandang.

#### 4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba
2. Pembuatan ekstrak kulit jeruk manis
3. Induksi MLD-STZ
4. Pembuatan salep dan serbuk ekstrak jeruk manis
5. Pembuatan luka insisi
6. Terapi salep dan serbuk ekstrak kulit jeruk manis
7. Euthanasi dan pengambilan jaringan kulit
8. Pembuatan preparat kulit
9. Pengamatan jumlah sel Polimorfonuklear
10. Pengamatan ekspresi IL-1 $\beta$  dengan Imunohistokimia (IHK)
11. Analisis data

#### 4.7 Prosedur Kerja

##### 4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Pada percobaan ini terdapat 20 ekor tikus sebagai hewan coba. Tikus ini didapat dari peternakan tikus “Wistar Farm Dau”. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan berat badan 150-200 gram dan berada dalam kondisi sehat. Tikus diadaptasikan selama tujuh hari dengan kandang terpisah dan diberi pakan yang sama pada semua tikus. Tikus dibagi 5 kelompok perlakuan dan dalam masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus ditempatkan pada kandang individu untuk mencegah tikus saling

menggigit selama masa terapi. Kandang terbuat dari bahan plastik dan berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Tikus diadaptasikan selama 7 hari dan diberi diet standar dan air biasa untuk minum. Pemberian makanan dan minuman secara *ad libitum*.

#### 4.7.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis

Kulit jeruk manis disiapkan dan dilakukan pemisahan antara vesikel buah dan kulit. Kulit yang sudah dipisahkan kemudian dibersihkan hingga tidak ada bekas vesikel buah yang tertinggal. Kulit jeruk dikeringkan dengan cara dilakukan penjemuran di dalam ruangan selama 7 hari. Kulit yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk dan kemudian ditimbang sebanyak 500 g. Pembasahan pada serbuk kulit jeruk dilakukan dengan memberi sedikit etanol 96%. Serbuk yang telah dibasahi kemudian dipindahkan ke dalam wadah yang memiliki tutup dan diratakan pada dasar wadah. Ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2 L dan dilakukan penutupan pada wadah hingga tertutup rapat. Wadah tempat menampung larutan ekstrak kulit jeruk diberi perlakuan *shaking* dengan menggunakan *shaker* digital selama 24 jam dengan kecepatan 50 rpm. Hasil perendaman selama 24 jam disaring menggunakan kain saring menuju labu erlenmeyer. Hasil penyaringan diuapkan pada *rotary evaporator* selama 3 jam. Larutan sisa penguapan, dipanaskan pada permukaan waterbath selama 2 jam sehingga didapatkan ekstrak cair kulit jeruk manis. Dari 500 gram kulit jeruk didapat 40 gram ekstrak cair.

#### 4.7.3 Induksi MLD-STZ (*Multiple Low Dose Streptozotocin*)

Tikus DM diperoleh dengan cara injeksi MLD-STZ (dosis 20 mg/kg BB) secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am, *et al.*, 2005). Masa inkubasi STZ dilakukan selama 14 hari dan pemeriksaan kadar gula darah dilakukan pada hari terakhir masa inkubasi. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer digital. Pengukuran kadar gula dilakukan dengan memberi perlukaan pada vena coccygea tikus dengan cara ditusuk menggunakan *sprit* 1 ml. Tetesan darah diposisikan pada rangkaian glukometer dan stik sehingga memunculkan kadar glukosa darah pada layar glukometer. Tikus dengan kadar gula darah puasa lebih dari 200 mg/dL menandakan bahwa tikus tersebut mengalami diabetes (Anwer, 2014).

#### 4.7.4 Pembuatan Salep dan Serbuk *Effervescent* Jeruk Manis

Sediaan salep dibuat menggunakan metode *geometric dilution* dengan mencampurkan vaselin album sebagai bahan dasar dan ekstrak kulit jeruk manis. Pembuatan salep dengan konsentrasi 5% dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak kulit jeruk manis sebanyak 1 gram ditambahkan dengan vaselin album sehingga diperoleh campuran sebanyak 20 gram. Salep kemudian dibungkus dalam aluminium foil. Metode pencampuran *geometric dilution* dimulai dengan memasukkan 1 gram ekstrak kulit jeruk dan 1 gram basis vaselin albumin kedalam mortar kemudian dihomogenkan. Setelah itu ditambahkan lagi vaselin albumin seberat campuran sebelumnya dan dihomogenkan, cara ini berlanjut sampai 19 gram vaselin albumin

tergabung didalam salep. Metode pencampuran ini membutuhkan waktu yang lama namun dapat menghasilkan salep yang homogen (Barbara and Sakai, 2012).

Sediaan *effervescent* dibuat menggunakan metode granulasi kering. Ekstrak kering untuk pembuatan *effervescent* didapat dengan cara mencampur ekstrak kulit jeruk manis dengan dekstrin (1:1), kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 10 jam (Rahman, 2014). Hasil oven dihaluskan menggunakan mortar sehingga didapatkan ekstrak sediaan serbuk. *Effervescent* dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak serbuk dengan asam sitrat, asam tartrat, dan natrium bikarbonat (3,5:1:1,5:3) (Novidiyanto dan Setyowati, 2008). Serbuk *effervescent* kemudian dilarutkan dalam akuades sebanyak 2 mL untuk sekali pemberian terapi. Semua bahan dicampur menggunakan mortar sampai homogen, kemudian disimpan dalam wadah tertutup.

#### 4.7.5 Pembuatan Luka Insisi

Seluruh tikus (20 ekor) yang sudah diadaptasikan, pada hari pertama penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Masing-masing tikus diberi tanda atau label pada ekornya dengan menggunakan spidol tahan air sesuai kelompoknya. Setelah itu, tikus dianestesi secara intra peritoneal menggunakan campuran ketamine (dosis 80 mg/kg BB) dan xylazine (dosis 10 mg/kg BB). Setelah tikus teranestesi, dilakukan pencukuran rambut didaerah regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis*. Kemudian dilakukan disinfeksi menggunakan alkohol 70% dan povidon iodine 10% pada punggung tikus

yang telah dicukur. Sayatan dilakukan pada punggung tikus di kulit daerah tulang belakang menggunakan scalpel steril sepanjang 2 cm diantara regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis* (1 cm di lateral vertebral column, 5 cm dibelakang garis intraaural) (Alizadeh, 2010). Luka dibuat dengan kedalaman 0.2 cm dan dibiarkan terbuka tanpa perban (Das, 2013). Tikus dikembalikan ke kandang masing-masing sesuai kelompok setelah mendapat luka sayat. Selama penelitian tikus diusahakan tidak lapar, tidak haus, dan bebas stres. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*. Kandang ditempatkan di ruangan yang tenang, tidak bising, diatur suhu, kelembaban dan cukup cahaya. Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan sekam diganti setiap 1 hari sekali.

#### **4.7.6 Terapi Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis**

Pemberian ekstrak kulit jeruk manis dilakukan secara oral dan topikal. Terapi diberikan sekali sehari selama 10 hari. Kelompok C diberi terapi secara peroral menggunakan sonde dengan 500 mg/kg BB. Kelompok D diberi terapi topikal dengan mengoleskan salep sebanyak  $\pm 0,1$  gram pada daerah luka. Kelompok E diberi terapi kombinasi secara oral dan topikal.

#### **4.7.7 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Kulit**

Euthanasi dan pengambilan jaringan kulit dari epidermis sampai hipodermis pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-11 terapi. Hewan coba dieuthanasi dengan melakukan dislokasi pada bagian leher. Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan untuk pemeriksaan histologi secara aseptik



menggunakan gunting dengan cara mengeksisi pada bagian luka yang paling luas dengan mengikutsertakan jaringan kulit normal kira-kira 0,5 cm dari tepi luka dengan luas sekitar 2,5 x 2,5 cm. Jaringan dibersihkan terlebih dahulu menggunakan NaCl fisiologis kemudian dilakukan fiksasi pada jaringan yang telah diambil menggunakan *neutral-buffered* formalin (NBF) 10% (Webster, *et al.*, 2009). Jaringan yang telah difiksasi disimpan dalam wadah spesimen yang tertutup rapat dan berada dalam suhu ruang.

Pembuatan preparat dilakukan dengan cara jaringan kulit yang telah difiksasi menggunakan larutan formalin 10% selama 2 jam, kemudian dilakukan *trimming* organ dan dimasukkan dalam *cassette tissue* dari plastik. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan Xylol II. Proses pencetakan menggunakan parafin I, parafin II, dan parafin III. Sediaan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sediaan diletakkan ke arah vertikal dan horizontal sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 5 mikron dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat bersuhu 46<sup>0</sup>C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan diatas *object glass*

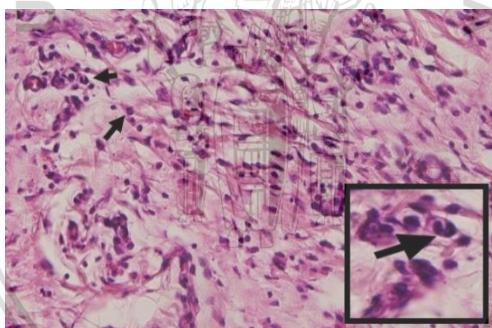
dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60<sup>0</sup>C. Kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk pemeriksaan mikroskopik (Balqis, 2014).

#### 4.7.8 Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan Hematoksilin–Eosin dilakukan menggunakan zat pewarna hematoksilin. Zat pewarna hematoksilin berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik). Eosin merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda (eosinofilik) (Commack, 2001). Tahapan pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol bertingkat I-III lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Sediaan dicuci dengan aquades selama 5 menit, setelah itu diwarnai dengan pewarna *hematoxyline eosin* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan bilas menggunakan air selama 10 menit dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit, setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 2 menit dan ditutup dengan gelas penutup.

#### 4.7.8.1 Tahap Penghitungan Jumlah Sel Polimorfonuklear

Pengamatan histopatologi menggunakan metode penghitungan menurut cara Priosoeryanto, *et al.* (2006) dan Low, *et al.* (2001), dengan menghitung jumlah sel yang diamati dari preparat histopatologi kulit menggunakan pewarnaan HE. Parameter yang digunakan adalah sel-sel Polimorfonuklear (PMN) yang segmen atau lobus dari inti berkisar 2-4 buah (**Gambar 4.1**). Inti terisi penuh oleh butir-butir khromatin padat sehingga sangat mengikat zat warna basa menjadi biru atau ungu. Pengamatan histopatologi dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus seri BX51) perbesaran 400x pada 5 lapang pandang dengan bantuan *Optilab viewer* kemudian jumlah sel PMN dihitung menggunakan *software imageRaster*.



**Gambar 4.1** Gambaran histologi leukosit polimorfonuklear pada jaringan kulit tikus menggunakan pewarnaan HE dengan perbesaran 400x (Anggita, 2016)

#### 4.7.9 Pewarnaan IL-1 $\beta$ dengan Imunohistokimia (IHK)

Langkah pewarnaan Imunohistokimia diawali dengan deparafin dan rehidrasi preparat jaringan. Proses deparafin dilakukan dengan cara preparat jaringan direndam selama 10 menit dalam xylol dan masing-masing 5 menit dalam etanol bertingkat (90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Slide kemudian direndam pada chamber

berisi buffer sitrat pH 6 dan dipanaskan selama 20 menit dengan suhu 95°C lalu ditunggu sampai suhu ruang setelah itu dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 5 menit sebanyak 3 kali. Slide kemudian ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit lalu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *rabbit polyclonal IL-1β* (pengenceran 1:100) selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel *biotin (rabbit polyclonal IgG)* selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP)* selama 40 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali lalu dibilas dengan aquades. Ditetesi dengan kromogen Diaminobenzidine (DAB) selama 1-10 menit pada suhu ruang lalu dicuci dengan aquades. Presipitasi menggunakan DAB akan menunjukkan hasil berwarna coklat (BIO-RAD, 2016). Dicuci kembali dengan aquades selama 5 menit 3 kali selanjutnya *counterstaining* menggunakan kromogen *Mayer Hematoxylin* selama 1-10 menit. *Mayer Hematoxylin* akan menjadi *counterstain* nukleus sehingga terwarnai biru (BIO-RAD, 2016). Preparat dicuci dengan aquades lalu dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil berupa preparat IHK diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan lima bidang pandang

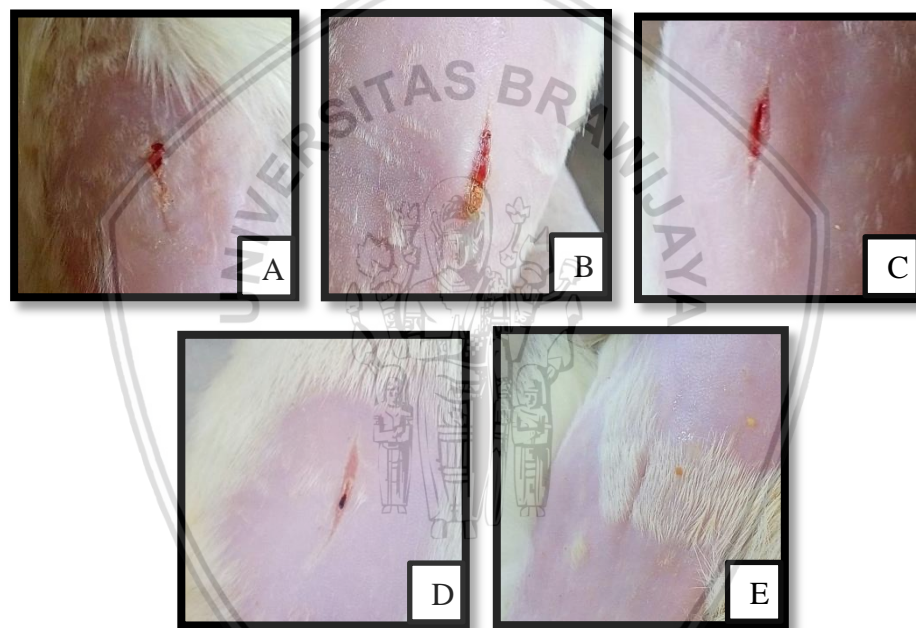
pengamatan kemudian difoto. Setelah itu dilakukan pengukuran presentase area ekspresi IL-1 $\beta$  dengan menggunakan *software ImmunoRatio* untuk mengamati peningkatan konsentrasi IL-1 $\beta$  yang ditandai dengan peningkatan presentasi luas daerah yang terwarnai.

#### 4.7.10 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah sel Polimorfonuklear (PMN) dan ekspresi IL-1 $\beta$ . Parameter dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *SPSS for Windows* dan selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan tujuan untuk melihat signifikansi pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis terhadap luka. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 5\%$ ) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi yang diberikan.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan kesembuhan luka insisi kulit tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model diabetes melitus yang diberikan terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi menunjukkan adanya perbedaan secara makroskopis (**Gambar 5.1**) antara kelompok perlakuan dengan kontrol.



**Gambar 5.1** Gambaran makroskopis kesembuhan luka insisi pada tikus hari ke-10

- Keterangan: (A) Kontrol negatif (luka tanpa DM dan tanpa terapi)  
(B) Kontrol positif (luka dengan DM dan tanpa terapi)  
(C) Terapi 1 (luka dengan DM dan terapi *effervescent* kulit jeruk manis 500mg/kgBB)  
(D) Terapi 2 (luka dengan DM dan terapi salep kulit jeruk manis konsentrasi 5%)  
(E) Terapi 3 (luka dengan DM, terapi kombinasi *effervescent* dan salep)

Gambaran kesembuhan luka insisi pada kelompok kontrol negatif **Gambar 5.1** (A) yaitu tikus nondiabetes yang dilukai dan tanpa terapi berada pada fase



proliferasi dimana sebagian besar tepi insisi sudah saling tertaut namun masih terlihat keropeng pada sebagian sisi luka insisi. Pada kelompok kontrol positif **Gambar 5.1 (B)** yaitu tikus diabetes dengan luka namun tanpa terapi ditemukan keropeng yang menutupi permukaan luka, tepi luka insisi yang belum menyatu dan terlihat adanya pembengkakan disekitar area luka menandakan fase penyembuhan luka berada pada fase inflamasi. Keropeng merupakan kumpulan dari sel darah merah, sel darah putih, platelet, fibrin dan plasma yang mengering. Keropeng dapat melindungi permukaan luka dari kontaminasi bakteri dan benda asing dari lingkungan luar namun dapat memperpanjang waktu kesembuhan luka karena menghambat proses epitelisasi (Flanagan, 2000; Han, 2016).

Pada kelompok terapi 1 **Gambar 5.1 (C)** dengan pemberian serbuk *effervescent* kulit jeruk manis secara oral dosis 500mg/kgBB selama 10 hari tampak tepi luka insisi belum tertaut sempurna namun tidak terdapat keropeng dan pembengkakan di area luka. Pertumbuhan jaringan kulit terlihat dari berkurangnya diameter luka yang diakibatkan dari kontraksi luka pada fase proliferasi. Pada kelompok terapi 2 **Gambar 5.1 (D)** dengan pemberian salep kulit jeruk manis 5% secara topikal selama 10 hari menunjukkan luka sudah menutup namun belum sempurna dan berada pada fase proliferasi.

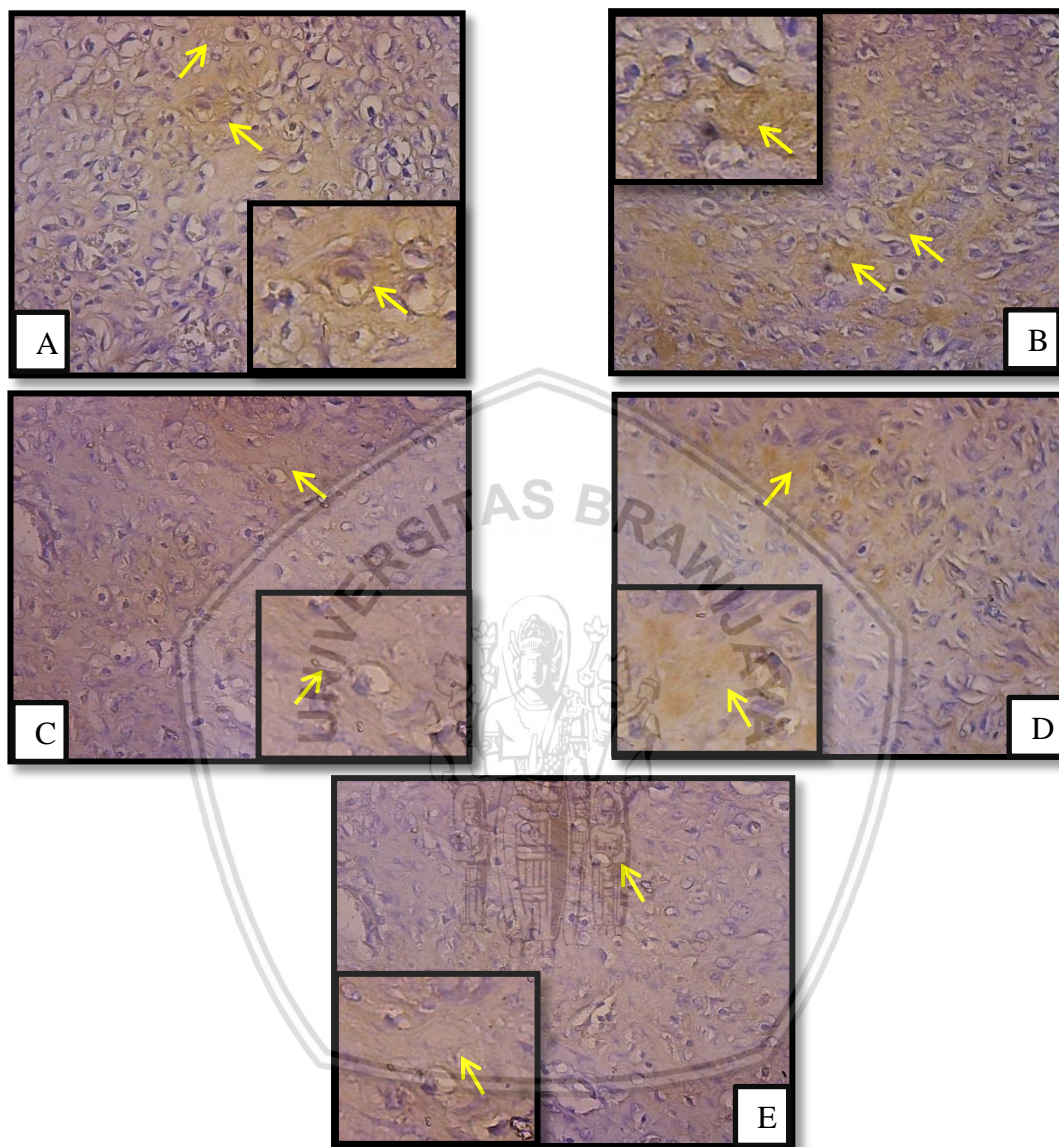
Pada kelompok terapi 3 **Gambar 5.1 (E)** dengan pemberian terapi kombinasi dari *effervescent* dosis 500mg/kgBB dan salep kulit jeruk manis 5% secara topikal terlihat tepi luka insisi yang sudah bertaut sempurna, pertumbuhan rambut disekitar area luka, tidak terdapat keropeng dan pembengkakan. Rambut yang tumbuh disekitar



area luka tersebut menunjukkan terjadinya proses regenerasi dan kondisi kulit sudah mulai kembali normal (Listyanti 2006). Pada kelompok terapi ini terlihat proses kesembuhan luka yang mencapai fase *remodelling* atau maturasi dimana terdapat jaringan ikat atau *scar* yang telah matang dengan ciri tidak berwarna merah dan tidak ditumbuhi rambut (Flanagan, 2000). Pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal maupun kombinasi dapat diamati perbedaannya secara mikroskopis dengan mengamati ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel PMN.

### **5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) terhadap Ekspresi Interleukin 1 $\beta$ pada Luka Insisi Tikus (*Rattus norvegicus*)**

Pemeriksaan ekspresi Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) menggunakan metode imunohistokimia (IHK), pewarnaan ini dapat mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel menggunakan antibodi spesifik. Warna coklat menunjukkan adanya interaksi antara IL-1 $\beta$  pada jaringan kulit dengan antibodi primer *rabbit polyclonal* IL-1 $\beta$  dan antibodi sekunder *rabbit polyclonal* IgG yang ditambahkan (**Gambar 5.2**). Sitokin IL-1 $\beta$  dalam fase inflamasi pada proses kesembuhan luka merupakan kemotraktan sel radang, dimana pada fase akhir inflamasi sel radang akan menghasilkan *growth factor* yang diperlukan pada fase proliferasi dalam penyembuhan luka (Velnar, *et al.*, 2009). Penghasil utama sitokin IL-1 $\beta$  yaitu monosit dan makrofag (Giraldo, 2013). Pada penelitian Mirza dan Koh (2011) menunjukkan bahwa pada luka eksisi tikus diabetes terjadi gangguan fungsi makrofag, dimana sel ini menghasilkan sitokin proinflamasi secara persisten dan menekan produksi sitokin antiinflamasi.



**Gambar 5.2** Ekspresi Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (perbesaran 400x) pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia (perbesaran 400x)

Keterangan : (A) K- Kontrol negatif (luka tanpa DM dan tanpa terapi)

(B) K+ Kontrol positif (luka dengan DM dan tanpa terapi)

(C) T1 Oral Effervescent 500mg/kgBB (luka dengan DM dan terapi *effervescent*)

(D) T2 Topikal salep 5% (luka dengan DM dan terapi salep)

(E) T3 Kombinasi *effervescent* dan salep (luka dengan DM dan terapi kombinasi)

Tanda panah berwarna kuning menunjukkan ekspresi IL-1 $\beta$

Presentase ekspresi IL-1 $\beta$  dilihat menggunakan *software ImmunoRatio* pada lima lapang pandang untuk masing-masing sampel. Cara kerja *software* ini yaitu menggunakan algoritma dekonvolusi warna yang dapat memisahkan lebih dari satu pewarnaan melalui analisa spektrum absorpsi dan area pewarnaan yang tumpang tindih sehingga dapat mengenali DAB dan nukleus yang terwarnai pewarnaan hematoxylin kemudian dihitung persentasi area terwarnai DAB dari total area yang dilabel (Tuominen, *et al.*, 2010). Kualitas pewarnaan sangat penting untuk menentukan analisa gambar ini. Pada penelitian Yeo, *et al.* (2017) menunjukkan bahwa perhitungan menggunakan *immunoRatio* pada Ki-67 kanker payudara berkorelasi tinggi dengan perhitungan secara manual.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software IBM SPSS Statistics*. Berdasarkan statistika deskriptif didapat bahwa semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar deviasi yang lebih kecil dari *mean*. Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Berdasarkan uji tersebut didapat bahwa data ekspresi IL-1 $\beta$  homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *one way ANOVA*. Pada uji *one way ANOVA* didapat hasil nilai Signifikan  $<0,05$  yang menunjukkan  $H_0$  ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Setelah itu dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata signifikan. Hasil dari uji BNJ tersebut disajikan pada **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap ekspresi IL-1 $\beta$

Kelompok	Ekspresi IL 1 $\beta$		
	Rata-rata (ekspresi) $\pm$ S D	Peningkatan terhadap K- (%)	Penurunan Terhadap K+ (%)
K- (Kontrol negatif)	36,02 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	-	-
K+ (Kontrol positif)	48,21 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	33,8%	-
T1 (Oral <i>Effervescent</i> 500mg/KgBB)	36,12 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	-	25,08%
T2 (Topikal Salep 5%)	27,41 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	-	43,1%
T3 (Kombinasi <i>Effervescent</i> + Salep)	25,55 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	-	47%

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan

Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok kontrol negatif (K-) sebesar 36,02  $\pm$  0,4 yang digunakan sebagai indikator ekspresi IL-1 $\beta$  pada luka normal dan sebagai pembanding dengan kelompok kontrol positif (K+). Ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok K- berbeda secara signifikan dengan kelompok K+. Sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  pada luka tikus normal akan menurun pada hari ketujuh pasca terbetuknya luka, namun apabila ekspresi sitokin proinflamasi yang masih tinggi pada hari kedelapan dapat menunjukkan arah perkembangan luka menjadi infeksi kronis (Cornelissen, 2004). Fungsi sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  yaitu menginduksi endotel untuk eksresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) agar dapat dikenali oleh sel radang untuk kemudian infiltrasi ke area luka (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Pada kondisi kulit normal tanpa luka, sitokin IL-1 $\beta$  terdapat di epidermis kulit dengan ekspresi yang rendah (Baliwag, *et al.*, 2014).

Pada kelompok K+ rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  yaitu 48,21  $\pm$  0,5 sehingga terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K- dengan persentase

peningkatan sebesar 33,8%. Peningkatan ekspresi IL-1 $\beta$  pada kondisi DM (kontrol positif) ini terjadi karena kondisi hiperglikemia menyebabkan peningkatan glikasi non enzimatis terhadap protein sehingga dihasilkan *advanced glycosylation end product* (AGE). *Advanced glycosylation end product* (AGE) ini kemudian berikatan dengan reseptor (RAGE) pada makrofag sehingga mengaktifkan NF- $\kappa$ B yang kemudian dapat mengaktifkan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  (Jin, *et al.*, 2015). Produksi sitokin proinflamasi secara terus menerus dapat mengakibatkan fase inflamasi yang berkepanjangan dan memperpanjang waktu kesembuhan luka.

Pada kelompok T1 (terapi oral *effervescent*) rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  yaitu  $36,12 \pm 0,2$  dengan persentase penurunan sebesar 25,08% terhadap kelompok K+. Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi oral menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  lebih baik dibandingkan kelompok luka tikus DM namun tidak lebih baik dibandingkan dengan luka tikus normal. Terapi oral mempengaruhi tubuh secara sistemik dan memperbaiki gangguan kesembuhan luka akibat hiperglikemia.

Penurunan rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok T1 dibandingkan kelompok K+ dikarenakan terapi oral *effervescent* kulit jeruk manis dapat mencegah interaksi AGE dengan makrofag sehingga mencegah produksi sitokin proinflamasi secara terus-menerus. Kandungan vitamin C pada ekstrak kulit jeruk manis dapat berkompetisi dengan glukosa dalam ikatannya dengan protein sehingga menekan pembentukan AGE dan gangguan kesembuhan luka dapat dicegah. Selain manfaat



terhadap kesembuhan luka, terapi secara oral juga berdampak secara sistemik. Menurut penelitian Ahmad, *et al.* (2013) kandungan flavonoid dari kulit jeruk manis mampu menurunkan hiperglikemia pada tikus DM. Flavonoid kulit jeruk manis dapat menekan radikal bebas dan meregenerasi sel  $\beta$  pankreas sehingga hormon insulin dapat diproduksi kembali dan kadar gula darah dapat dikontrol sehingga mencegah gangguan kesembuhan luka seperti AGE (*advanced glycoylation end product*) terbentuk (Muhtadi, dkk., 2013). Pada penelitian Verma, *et al.* (2013) menyatakan bahwa flavonoid rutin dapat menginduksi sel duktus pankreas sehingga terbentuk formasi baru sel  $\beta$  pada pankreas dan terjadi neogenesis pada pulau langerhans pada tikus yang sudah diinjeksi STZ.

Pada kelompok T2 (terapi salep) didapatkan rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  yaitu  $27,41 \pm 0,3$  dengan persentase penurunan sebesar 43,1% terhadap kelompok K+. Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi salep menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  lebih baik dibandingkan kelompok luka tikus DM namun tidak lebih baik dibandingkan dengan luka tikus normal. Penurunan rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok T1 dibandingkan kelompok K+ dikarenakan kandungan flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin bersifat antiinflamasi dengan cara menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B yang dapat menginisiasi produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$  dan TNF $\alpha$  (Felipe, *et al.*, 2015). Pada penelitian Rhamasamy dan Bhaskar (2016)

menunjukkan bahwa salep kulit jeruk manis 5% mempercepat proses kesembuhan luka paling baik dibandingkan dengan dosis 10% dan terapi salep nitrofurazone.

Pada kelompok T3 (kombinasi *effervescent* dan salep) didapatkan rata rata ekspresi IL-1 $\beta$  yaitu  $25,55 \pm 0,1$  dengan persentase penurunan sebesar 47%. Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok terapi kombinasi oral *effervescent* dosis 500mg/kgBB dan topikal salep 5% terlihat ekspresi sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  pada luka yang paling sedikit dibandingkan semua kelompok terapi. Hal ini terjadi karena kombinasi terapi *effervescent* dan salep *Citrus sinensis* dapat menekan produksi AGE sehingga hambatan kesembuhan luka secara sistemik dapat dikurangi dan secara lokal dapat mencegah aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B sehingga dapat menekan produksi sitokin proinflamasi sehingga perbaikan kesembuhan luka pada T3 lebih baik dibandingkan K- dimana luka tikus tanpa diabetes namun tidak diterapi (Cunningham, 2013; Felipe, *et al.*, 2015; Safari, *et al.*, 2006). Rendahnya ekspresi IL-1 $\beta$  pada luka menandakan proses peradangan sudah selesai dan proses kesembuhan luka dilanjutkan ke fase proliferasi.

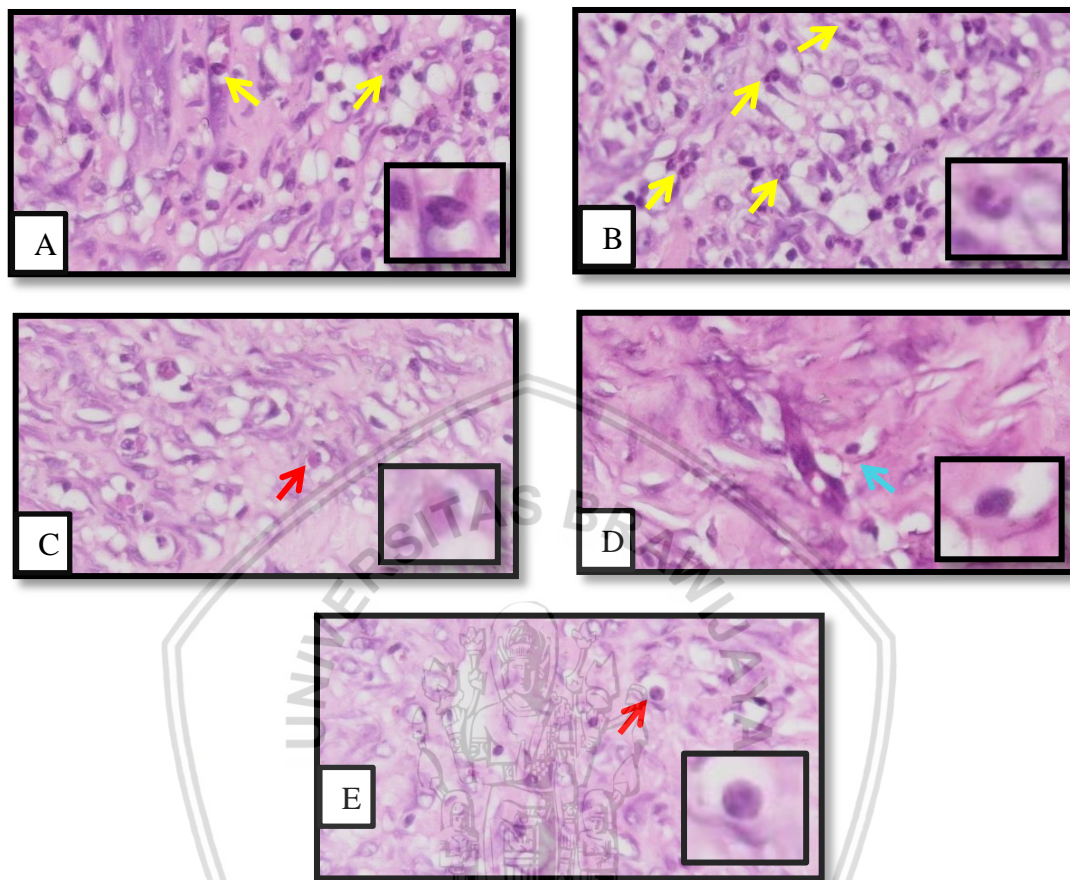
## **5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear (PMN) pada Luka Insisi Tikus (*Rattus norvegicus*)**

Tahap awal kesembuhan luka yaitu fase inflamasi akut yang ditandai dengan peningkatan sel polimorfonuklear terutama neutrofil. Sel ini dibutuhkan untuk membersihkan area luka dari masuknya benda asing, infeksi mikroorganisme serta



membersihkan jaringan yang rusak. Setelah itu pada hari yang ketiga fungsi fagositosis PMN akan digantikan oleh sel mononuklear yang menandakan tahap kesembuhan luka memasuki fase proliferasi (Komesu, *et al.*, 2004).

Sel Polimorfonuklear merupakan leukosit granular antara lain neutrofil, eosinofil dan basofil. Neutrofil memiliki ciri berdiameter 9-15  $\mu\text{m}$ , inti bersegmen 2-5 dan granul yang tidak bersifat asidofilik dan basofilik. Eosinofil memiliki ciri berdiameter 10-15  $\mu\text{m}$ , nukleus bersegmen 2-3 dan terdapat granula yang bersifat asidofilik sehingga terwarnai merah dengan pewarnaan HE. Basofil berdiameter 10-12  $\mu\text{m}$  memiliki nukleus yang bervariasi dari segmen yang jelas atau dua lobus yang sederhana dan terdapat granul yang bersifat basofilik sehingga terwarnai ungu dengan pewarnaan HE (Samuelson, 2007). Pengamatan jumlah PMN dilakukan menggunakan *software* Optilab viewer® dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang untuk masing-masing sampel seperti pada **Gambar 5.3**. Setelah itu dilakukan penghitungan jumlah sel dilakukan menggunakan program *ImageRaster*.



**Gambar 5.3** Gambaran mikroskopis sel PMN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoxilin eosin (HE) (perbesaran 400x)

- Keterangan :
- (A) K- Kontrol negatif (luka tanpa DM dan tanpa terapi)
  - (B) K+ Kontrol positif (luka dengan DM dan tanpa terapi)
  - (C) T1 Oral Effervescent 500mg/kgBB (luka dengan DM dan terapi *effervescent*)
  - (D) T2 Topikal salep 5% (luka dengan DM dan terapi salep)
  - (E) T3 Kombinasi *effervescent* dan salep (luka dengan DM dan terapi kombinasi)
- panah kuning : neutrofil  
 panah merah : eosinofil  
 panah biru : basofil

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *software* IBM SPSS *Statistics* untuk dilakukan uji homogenitas, uji normalitas kemudian dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Setelah itu dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata signifikan. Hasil dari uji BNJ tersebut disajikan pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap jumlah sel PMN

Kelompok	Jumlah Sel PMN	Jumlah Sel PMN	
	Rata-rata (sel)±SD	Peningkatan terhadap K- %	Penurunan Terhadap K+ %
K- (Kontrol negatif)	2,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	-	-
K+ (Kontrol positif)	5,3 ± 0,5 <sup>c</sup>	120,8	-
T1 (Oral <i>Effervescent</i> 500mg/KgBB)	2,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	-	60,4
T2 (Topikal Salep 5%)	0,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	-	86,8
T3 (Kombinasi <i>Effervescent</i> + Salep)	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	-	90,6

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Nilai rata-rata sel PMN pada kelompok K- (kontrol negatif) sebesar  $2,4 \pm 0,3$  yang digunakan sebagai indikator jumlah sel PMN luka tanpa diabetes dan tanpa terapi yang kemudian dibandingkan dengan kelompok K+ (kontrol positif). Rata-rata jumlah sel PMN pada kelompok K- menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K+ dan terlihat persentase peningkatan sebesar 120,8%. Pada luka tikus kontrol negatif tanpa diabetes (K-) berbagai mediator inflamasi seperti prostaglandin, sitokin proinflamasi dan produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) akan menarik neutrofil untuk menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka. Pada

umumnya neutrofil ditemukan dua hari pertama untuk melakukan fungsi fagositosis dan membersihkan luka dari benda asing, bakteri dan sel mati (Velnar, 2013).

Pada kelompok K<sup>+</sup> rata-rata jumlah PMN yaitu  $5,3 \pm 0,5$  sehingga terdapat perbedaan secara signifikan dengan kelompok K<sup>-</sup> dengan persentase peningkatan sebesar 120,8%. Pada kelompok K<sup>+</sup> tikus mengalami kondisi diabetes melitus dimana fase inflamasi pada luka insisi terlambat terjadi dan bertahan lebih lama dibanding kondisi luka tanpa DM sehingga memperpanjang proses kesembuhan luka (Komesu, *et al.*, 2003). Gangguan kesembuhan luka juga diakibatkan oleh kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita DM sehingga memicu terjadinya glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan *advanced glycosylation end product* (AGE). Pada kondisi hiperglikemia pembentukan AGE dapat terjadi dalam beberapa hari sampai berminggu-minggu dan bersifat irreversibel (Hafizur, *et al.*, 2017). Produk glikasi ini dapat mengakibatkan berbagai gangguan secara sistemik dalam tubuh, salah satunya adalah sel PMN dimana perlekatan AGE dapat menginduksi sel ini untuk menghasilkan ROS (Wong, *et al.*, 2002). *Reactive oxygen species* (ROS) dalam jumlah yang berlebih akan mengaktifasi dan mempertahankan kaskade asam arakidonat yang akan memicu ulang berbagai mediator inflamasi pada luka seperti prostaglandin dan leukotrien. Peningkatan mediator inflamasi ini berdampak pada infiltrasi sel PMN pada area luka sehingga dapat memperlama fase inflamasi (Anggita, 2017).

Pada kelompok T1 (terapi oral *effervescent*) didapatkan rata-rata jumlah sel PMN yaitu  $2,1 \pm 0,3$  dan terlihat presentase penurunan jumlah rata rata PMN

terhadap kelompok K+ sebesar 60,4%. Rata-rata jumlah sel PMN pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi oral menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  lebih baik dibandingkan kelompok luka tikus DM namun tidak lebih baik dibandingkan dengan luka tikus tanpa DM. Pada pemberian terapi oral kandungan ekstrak kulit jeruk menekan gangguan kesembuhan luka secara sistemik. Kandungan asam askorbat memiliki gugus karbonil yang dapat berkompetisi dengan glukosa dalam ikatannya dengan protein sehingga pembentukan AGE dapat dihambat. Penurunan produksi AGE akan mencegah ikatannya dengan berbagai protein yang dapat menyebabkan gangguan dalam kesembuhan luka seperti produksi ROS dan sitokin proinflamasi yang kemudian diikuti dengan infiltrasi sel PMN (Cunningham, 2013; Safari, *et al.*, 2006).

Pada kelompok T2 (terapi topikal salep) didapatkan rata-rata jumlah PMN 0,7  $\pm$  0,2 dan terlihat penurunan presentase jumlah rata-rata PMN terhadap kelompok K+ sebesar 86,8%. Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi salep 5% dapat menurunkan jumlah sel PMN pada luka tikus DM lebih baik dibandingkan dengan luka tikus tanpa DM. Kandungan hesperidin pada ekstrak kulit *Citrus sinensis* dapat menekan produksi sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  sehingga dapat menekan adhesi PMN pada sel endotel (Felipe, *et al.*, 2015). Adhesi PMN pada dinding pembuluh darah merupakan awal dari gerakan



PMN masuk ke dalam jaringan. Penghambatan adhesi PMN pada dinding pembuluh darah mengakibatkan infiltrasi PMN kedalam jaringan turun sehingga inflamasi akan berkurang (Robbins dan Kumar, 1995). Luka dengan jumlah PMN lebih sedikit menunjukkan kesembuhan luka yang lebih cepat. Hal ini disebabkan PMN menghasilkan PMN protease elastase dan proteinase-3 yang mempunyai kemampuan memecah elastin dan matriks ekstra seluler. Gangguan pada matriks ekstra seluler ini dapat menyebabkan terganggunya perbaikan epitel sehingga proses penyembuhan luka dapat terhambat (Kumar, *et al.*, 2010).

Pada kelompok T3 (kombinasi *effervescent* dan salep ekstrak kulit jeruk)  $0,5 \pm 0,1$  dan terlihat presentase penurunan rata-rata PMN terhadap kelompok K+ sebesar 90,6%. Rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok terapi kombinasi oral *effervescent* dosis 500mg/kgBB dan salep 5% terlihat jumlah sel PMN pada luka yang paling sedikit dibandingkan semua kelompok terapi. Hal ini terjadi karena terapi salep ekstrak *Citrus sinensis* dapat mempercepat selesainya fase inflamasi pada luka dan terapi *effervescent Citrus sinensis* dapat menekan produksi AGE sehingga hambatan kesembuhan luka dapat ditekan, sehingga perbaikan kesembuhan luka pada T3 lebih baik dibandingkan K- dimana luka tikus tanpa diabetes namun tidak diterapi (Cunningham, 2013; Felipe, *et al.*, 2015; Safari, *et al.*, 2006). Penurunan jumlah PMN pada luka menandakan proses peradangan sudah selesai dan proses kesembuhan luka dilanjutkan ke fase berikutnya.

Semua terapi menunjukkan penurunan rata-rata ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel PMN pada luka insisi tikus DM. Hasil ini menunjukkan bahwa tikus pada kelompok terapi telah melewati fase inflamasi kemudian dilanjutkan dengan fase proliferasi (Morison, 2004). Hal ini didukung oleh kandungan ekstrak kulit jeruk manis yaitu hesperidin yang bersifat antiinflamasi dan vitamin C yang dapat menekan pembentukan AGE sehingga gangguan kesembuhan luka dapat ditekan. Selain dari kandungan ekstrak jeruk manis, rute pemberian terapi juga mempengaruhi kesembuhan luka.

Terapi topikal menggunakan salep dengan basis vaselin album dapat memperpanjang waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi pada kulit sehingga mendukung aktivitas senyawa aktif dalam penyembuhan luka (Naibaho, dkk., 2013). Salep setelah diabsorpsi di kulit tidak melalui sirkulasi sistemik melainkan terlokalisir di tempat kerjanya untuk menimbulkan efek, sehingga belum mampu mencegah gangguan kesembuhan luka yang disebabkan oleh kondisi hiperglikemia secara sistemik (Cholis, dkk., 2013). Terapi oral menggunakan serbuk *effervescent* dapat menghasilkan reaksi karbon dioksida yang meningkatkan permeabilitas paraseluler sehingga meningkatkan absorpsi terhadap zat aktif kulit jeruk manis yang terdapat di dalam larutan *effervescent* (Palasinamy, *et al.*, 2011). Kandungan kulit jeruk manis didistribusikan melalui sirkulasi sistemik ke seluruh tubuh, sehingga terapi lebih banyak memperbaiki gangguan kesembuhan luka yang diakibatkan DM secara sistemik (Cholis, dkk., 2013).



Hasil menunjukkan bahwa pada penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel PMN lebih baik ditunjukkan dari terapi salep apabila dibandingkan dengan terapi oral. Pada penelitian Swamy, *et al.* (2007) terapi ekstrak secara topikal mempercepat kesembuhan luka lebih baik dibandingkan dengan terapi ekstrak secara oral. Perbedaan ini dapat dikarenakan terapi oral berefek secara sistemik dan berdampak ke organ lain sedangkan terapi topikal secara lokal terfokus pada area luka saja, sehingga kerja flavonoid lebih maksimal dalam mempercepat kesembuhan luka. Kombinasi dari terapi oral dan topikal merupakan terapi paling efektif dalam menekan ekspresi IL-1 $\beta$  dan jumlah sel PMN sehingga fase inflamasi dapat segera berakhir dan dilanjutkan ke fase proliferasi. Kerja sama dari terapi oral dalam menekan gangguan kesembuhan luka secara sistemik akibat hiperglikemia dan terapi salep dalam mempercepat selesainya fase inflamasi secara lokal dapat mempercepat kesembuhan luka paling efektif pada penelitian ini.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal mampu menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  paling baik yaitu sebesar 47% pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes melitus
2. Pemberian serbuk *effervescent* secara oral dan salep kulit jeruk manis secara topikal mampu menurunkan jumlah sel PMN paling baik yaitu sebesar 90,6% pada penyembuhan luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes melitus

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat efek perbaikan yang diberikan oleh ekstrak kulit jeruk manis pada setiap fase kesembuhan luka yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi secara bertahap dan dibandingkan dengan kelompok tanpa terapi sehingga dapat terlihat perbedaan dari setiap fase kesembuhan luka insisi yang diterapi dan tidak diterapi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agita, V.S. 2016. Studi Ekspresi IL-1 pada Histopatologi Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus yang Diterapi Ekstrak Daun Krokot (*Portulaca oleracea*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Ahmad, M., M. N. Ansari, A. Alam and T. H. Khan. 2013. Oral Dose of Citrus Peel Extracts Promotes Wound Repair in Diabetic Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16 (20): 1086-1094
- Aja, D.S. 2016. Section One Diabetes Mellitus. In : *State of Pet Health 2016 Report*. Banfielt Pet Hospital., California
- Alan, A. 2009. Disruption of Interleukin-1 Signaling Improves the Quality of Wound Healing. *The American Journal of Pathology* Vol. 174, No. 6
- Alizadeh, A.M. 2010. The Effect of *Teucrium Polium* Honey on the Wound Healing dan Tensile Strength in Rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* Vol. 14, No. 6: 499-505
- Amanda, S.A. 2012. Diferensial Leukosit dan Rasio Neutrofil/Limfosit (N/L) pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Betina [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Anggita, O.Y.F. 2017. Pengaruh Salep Kefir Susu Sapi Kombinasi Lidah Buaya (*Aloe vera*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear dan Jumlah Kapiler Sebagai Terapi Luka Insisi pada Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- Anief, M. 2005. *Farmasetika*. Cetakan III. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Anwer, T. 2014. Melatonin Ameliorates Hyperinsulinemia, Glucose Intolerance and Insulin Resistance in STZ-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* Vol 6(2)
- Armitage, D. 2004, *Rattus norvegicus*, *Animal Diversity Web*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_norvegicus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html) yang diakses pada tanggal 25 Juni 2017

- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, dan B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 Auto Antibodies of Type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen  
*Detection of GAD65 auto-antibodies* Vol 14 (4)
- Baliwag, J., D.H. Barnes, A. Johnston. 2014. Cytokines in Psoriasis. *Cytokine* 73 (2)
- Baqarizky, F. 2015. Studi Awal: Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar dan Ginjal Tikus Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotocin dengan Pewarnaan Hemaktosilin Eosin [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatulla
- Baratawidjaja, K. dan I. Rengganis. *Imunologi Dasar*. Edisi Kedelapan. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia. Jakarta
- Barbara, E.L. and J.B. Sakai. 2012. *Standards of Practice for The Pharmacy Technician*. 2<sup>nd</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA
- Barbul, A and D. Efron. 2010. *Wound Healing in Schwartz Principle of Surgery*. 9th ed. McGrawHill. New York. 210 – 219
- Barbul, A. and G. Efron. 2010. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery*. 90 (2)
- Barik, R., S. Jain, D. Qwatra, A. Joshi, G.S. Tripathi and R. Goyal. 2008. Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Ichnocarpus frutescent* in streptozotocinnicotinamide induced type-II diabetes in rats. *Indian J. Pharmacol* 40: 19-22
- Bhattacharya, S. K., S. Sunita and M. Prabha. 2002. Polymorphonuclear leukocyte function in type -2 diabetes mellitus patients and its correlation with glycaemic control [Thesis]. Department of Clinical Pharmacology. Koirala Institute of Health Sciences
- BIO-RAD. 2016. Immunohistochemistry: Tips and Tricks for your IHC-Paraffin Experiments. *Immunohistochemistry* 1-8
- Bratawidjaja, K. dan Rengganis. 2009. *Imunologi Dasar*. Edisi 1. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Campbell, A. 2004. *Biology*. Edisi Kelima Jilid 3. Erlangga. Jakarta

- Cholis, M., T. Hidayat, S.H.W. Tantari. 2013. *Terapi Dalam Dermatologi*. Edisi 1. UB Press. Malang
- Commack, D.H. 2001. *Essential Histology*. Second Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Canada
- Cornellissen, L.H. 2004. *Which molecules of the initial phase of wound healing may be used as markers for early detection of skin damage?*. 1<sup>st</sup> edition. Elsevier Saunders Inc. Belanda
- Cunningham, J.J. 2013. The Glucose/Insulin System and Vitamin C: Implication in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of the American College of Nutrition* 17:2, 105-108
- Das, K. 2013. Wound Healing potential of aqueous crude extract of *Stevia rebaudiana* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacology* 23(2)
- Diegelmann, R. F and M.C. Evans. 2004. Wound Healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 9: 283-289
- Eroschenko, V. P. 2008. *Atlas of Histology with Functional Correlations*. Eleventh edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366(9498):1736-4.
- Felipe, A.P., S.N.H. Miriam and M.B. Sergio. 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. *Chemico-Biological Interactions*. Volume 228, 88-99
- Flanagan, M. 2000. The Physiology of Wound Healing. *Journal of Wound Care* Vol 9, No 6
- Fletcher, J. 2008. Differences between acute and chronic wounds and the role of wound bed preparation. *Nursing Standard* 22: 62-68.
- Ghasemi, K., Y. Ghasemi and M.A. Ebrahimzadeh. 2009. Antioxidant activity, Phenol and Flavonoid Contents of 13 Citrus Species Peels and Tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.22, No.3, July 2009, pp.277-281

- Giraldo, S. IL 1- $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematology. <http://AtlasGenetCytogenetOncol.org/Genes/IL1BID40950ch2q13.html>. Diakses pada 17 Juli 2017
- Goldstein, J. Barry and W.D. Wieland. 2008. *Type-2 Diabetes: Principles and Practice*. Edisi 2. Informa Healthcare. New York
- Hadi, A.R. 2007. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management* 3(6) 853–876
- Han, Seung. 2016. *Innovations and Advances in Wound Healing*. Second Edition. Springer. New York.
- Hafizur, R.M., S. Momin, N. Fatima. 2017. Prevention of Advanced Glycation Endproducts Formation in Diabetic Rats through Beta-cell Modulation by Aegle Marmelos. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17:227.
- Hoening, M. 2003. Diabetes in pets. *Diabetes Voice*. *Mol Cell Endocrinol* 29;197(1-2):221-9.
- Ismail, D.D.S.L. 2009. Penggunaan Balutan Modern Memperbaiki Proses Penyembuhan Luka Diabetik. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. XXV, No. 1
- Irawan, R. 2009. Hubungan Perilaku dengan Prevalensi Diabetes Melitus pada Masyarakat Kota Ternate Tahun 2008 [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia
- Jin, X., T. Yao, Z. Zhou and C. Shen. 2015. Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- $\kappa$ B Pathway. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 732450
- John, M. F. 2006. Klasifikasi dan Kriteria Diagnosis Diabetes Melitus yang Baru. *Cermin Dunia Kedokteran* 127:37-40.
- Kartikaningtyas, A. T. 2015. Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit *Citrus Sinensis* terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus *Sprague Dawley*. *Maj Ked Gi Ind* 1(1): 86 – 93
- Kiruba, K. K., T.J. Joel, S. Lalitha, S. Merrin, R.J. Rajikumar and R. Vijayaraj. 2016. Efficacy and Comparative Evaluation of Antimicrobial Properties from the



- Peel of Citrus Fruits used to Treat Diabetic Foot Ulcer. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* 6: 2231-2560
- Komesu, M.C., M.B. Tanga, K.R. Buttros, C. Nakao. 2004. Effects of Acute Diabetes on Rat Cutaneous Wound Healing. *Elsevier Pathophysiology 11 (2004) 63–67*
- Kumar, S. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci world j* 2013; 12.
- Kumar, V., A.K. Abbas, M. Fausto, R. Mitchell and Robbins. 2010. *Basic Pathology*. 8<sup>th</sup> edition. Elsevier Saunders Inc. China
- Kusriningrum, R. 2008. Perancangan Percobaan. *Airlangga University Press*. Surabaya
- Li, Y., J. Yao, C. Han, J. Yang, M.T. Chaundry, S. Wang, H. Liu and Y. Yin. 2016. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* 8, 167
- Lieberman, L.H.A. Lachman dan Kanig. 1994. *Teori dan Praktik Farmasi Industri*. Edisi ketiga. UI Press. Jakarta
- Listyanti AR. 2006. *Pengaruh Pemberian Getah Batang Pohon Pisang Ambon (Musa parasidiaca var. Sapientum) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (Mus musculus albinus)*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Lorentz, H. P and M.T. Longaker. 2006. *Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. Plastic surgery*. 2nd ed. Saunders Elsevier. Philadelphia
- Low, Q.E., I.A. Drugea, L.A. Duffner, D.G. and Quinn. 2001. Wound Healing in MIP-1alpha and MCP-1 Mice. *Am J Pathol* 159(2)
- Luluk, N. 2009. Perbedaan Kerusakan Kulit Tikus *Wistar* Akibat Paparan Arus Listrik Secara Langsung dan Melalui Media Air [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro
- Mackay, D. and A.L. Miller. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. *Alternative Medicine Review* 8(4)
- Milind, P and D. Chaturvedi. 2012. Orange: Range of Benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. *International Research Journal of Pharmacy* 2012, 3 (7)



- Mirza, R. and T.J. Koh. Dysregulation of monocyte/ macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 56 256–264
- Mittal, R.D., K.B. Hermant, K.M. Parmeet. 2008. Predisposition of Genetic Polymorphism With The Risk of Urolithiasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* Vol 23 (2) :106-116
- Montgomery, D and S. Kowalsky. 2011. Design and Analysis of Experiments. Edisi kesembilan. John Wiley and Sains. USA
- Morison, M.J. 2004. *Manajemen Luka*. EGC. Jakarta
- Muhtadi, E. Setyowati, dan T. Azizah, 2014. Aktivitas Antidiabetes Melitus Ekstrak Kulit Buah Jeruk Manis (*Citrus Sinensis*) dan Kulit Buah Kelengkeng (*Euphoria longan* (Lour.) Studi Terhadap Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Aloksan [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Naibaho, O.H., V.Y.Y. Paulina, Y. Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Omicum sanctum L*) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT* 2(2)
- Nelson, R. W and Claudia. 2014. Classification and Etiology of Diabetes in Dogs and Cats. *Journal of Endocrinology* (2014) 222, T1-T9.
- Novidiyanto dan Astuti. 2008. Formulasi Serbuk Effervescent Sari Wortel (*Daucus carota*). *AGRITECH* Vol. 28, No. 4
- Palasinamy, P., R. Abhishekh, D. Yogana. 2011. Formulation and Evaluation of Effervescent Tablets of Aceclofenac. *IRJP* 2 (12)
- Patel, H.C., H. Boutin and Allan. 2003. Interleukin-1 in The Brain Mechanism of Action in Acute Neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol 992:39-47
- Pradipta, I.G.N.D.O. 2010. Pengaruh Pemberian Propolis secara Topikal Terhadap Migrasi Sel Poliformonuklear pada Luka Sayat Tikus [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember.
- Prasetyono, T.O.H. 2009. General Concept of Wound Healing, revisited. *Med J Journal* Vol. 188, No. 3

- Priosoeryanto, B.P. 2006. Aktifitas Getah Batang Pohon Pisang dalam Proses Persembuhan Luka dan Efek Kosmetikanya pada Hewan. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat. Institut Pertanian Bogor
- Purwandari, L.E. 2007. Optimasi Campuran Asam Sitrat-Asam Tartrat dan Natrium Bikarbonat sebagai Eksipien dalam Pembuatan Granul Effervescent Ekstrak Rimpang Temulawak secara Granulasi Basah dengan Metode Desain Faktorial [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma
- Rahma, K., Aulanni'am, dan M. Chanif. 2014. Pengaruh Pengobatan Herbal Spray Berbasis Bioaktif dan Spirulina (*Spirulina Sp.*) Terhadap Profil Protein Luka dan Histologi Pankreas Tikus (*Rattus Norvegicus*) Terpapar *Multiple Low Dose Streptozotocin* (MLD-STZ). *Kimia Student Journal* Vol. 1, No 1, pp 71-77
- Rahman, E. 2014 Formulasi Tablet Mengandung Ekstrak Daun Sirsak, Ekstrak kulit Buah Manggis dan Ekstrak Jamur Ling Zhi serta Uji Aktivitas sebagai Antioksidan dan Imunomodulator. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* Vol 12 (1)
- Ramasamy, S. S. and A. Bhaskar. 2016. Evaluation of the Wound-Healing Potency of Citrus sinensis in Wistar albino Rats. *Der Pharmacia Lettre* 8 (1): 161- 168
- Ribeiro, D., F. Marisa, M.T. Sara and M.S. Artur. 2014. Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Chemokine Production in Human Whole Blood. *Inflammation* 1(0)
- Robbins dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi 1*. Edisi 4. EGC. Jakarta.
- Robertson, R.P. 2004. B-cell Glucose toxicity, lipotoxicity, and Cronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetic. *Diabetes* 53:S119-S124
- Rowe, R. C. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press. London
- Rubin, E. 2008. *Clinicopathologic Foundations of Medicine, Chapter 3 Repair, Regeneration and Fibrosis*. Edition: 6<sup>th</sup>. Lippincott, Williams & Wilkins Baltimore
- Rukmanasari, R. 2010. Efek Ekstrak Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena L.*) terhadap Kadar LDL dan HDL Darah Tikus Putih [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret Surakarta

- Safari, M.R., N. Sheik and K.M. Khosro. 2006. Study on the Efferct of Vitamin C on the In Vitro Albumin Glycation Reaction. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4: 275-279
- Sakata, K., Y. Hirose, Q. Zheng, T. Takuji, M. Hideki. 2003. Inhibition of Inducible Isoforms of Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase by Flavonoid Hesperidin in Mouse Macrophage Cell Line. *Cancer Letters* 199
- Samuelson, D.A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Edisi 2. Elsevier Inc. China
- Santoso, O., S.W. Prayitno dan S. Waspadji. 2006. Perubahan Pola Kadar Interleukin-1 $\beta$ , Fungsi Fagositosis dan Status Periodontium pada Penyandang Diabetes Melitus Tipe 2. *Journal of Dentistry Indonesia*. Vol 13, No 3
- Schaefer, H., T.E. Redelmeier, G.J. Ohynek and J. Lademann. 2008. *Pharmacokinetics and topical application of drugs*. In: Wolf K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leff el DJ, Fitzpatrick, eds. *Dermatology in general medicine*. 7th ed. New York
- Setiawan, B dan E. Suhartono. 2005. Oxidative Stress and The Roles of Antioxidant in Diabetes Mellitus. *Maj Kedokt Indon* Vol 55: 2
- Setyowati, E. 2014. Aktivitas Antidiabetes Melitus Ekstrak Kulit Buah Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) dan Kulit Buah Kelengkeng (*Euphoria longan* (lour.) steud) terhadap Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Aloksan [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Simanjuntak, R. D. 2015. Uji Daya Terima Selai Kulit Jeruk Manis (*Citrus Sinensis* L) dan Nilai Gizinya [Skripsi]. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara
- Skudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546
- Susilowati, R. 2006. Diabetes Melitus, Komplikasi dan Pencegahannya. *Jurnal Saitika* Vol 3(1)
- Swamy, H.M.K., V. Krishna, K. Shankarmurthy, B.A. Rahiman. 2007. Wound Healing Activity of Embelin isolated from the Ethanol Extract of Leaves of *Embelia ribes* Burm. *Journal of Ethnopharmacology* 109
- Syaifi, A. 2012. Pengaruh Level HbA<sub>1C</sub> terhadap Fungsi Fagositosis Neutrofil (PMN) pada Penderita Periodontitis Diabetika. *Maj Ked Gi* 19(2): 93-97

- Syeda, M., J. Xiaohong and H. Raihan. Prostaglandin Transporter Modulates Wound Healing in Diabetes by Regulating Prostaglandin-Induced Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* Vol. 181:1
- Tang, W. H., A. Kathleen and H. John, 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Frontiers in Pharmacology* Vol 3 Article 87
- Touminen, V.J., S. Routuistenmaki, A.Viitanen, M. Jumppanen. 2010. ImmunoRatio: A Publicly Available Web Application for Quantitative Image Analysis of Estrogen Receptor (Er), Progesterone Receptor (Pr), And Ki-67. *Breast Cancer Research* 12:R56
- Velnar, T. 2013. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research* 37: 1528
- Velnar, T., T. Bailey and V. Smrkolj. 2009. The wound healing process an overview of cellular and molecular mechanism. *J Int Med Res* 37(5):1528-42
- Verma, P.R., P.R. Intakar, S.K. Arora. 2013. Evaluation of Antidiabetic Antihyperlipidemic and Pancreatic Regeneration, Potential of Aerial Parts of *Clitoria ternatea*. *Rev Bras Farmacogn* 23: 819-829
- Webster, J. D., M.A. Miller and DuSold. 2009. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57(8)
- Wijaya, Y.A., S.J.R. Kalangi dan M.M. Kaseka. 2015. Gambaran Reaksi Radang Luka Postmortem Pada Hewan Coba. *Jurnal e-Biomedik* Vol 3 (1)
- Wombeogo and Kuubiére. 2014. *Trauma and Emergency Health Care Manual*. Author House. Cetakan Pertama. USA
- Wong, R.K.M., A.I. Pettit., J.E. Davies., L.L. Ng. 2002. Augmentation of the Neutrophil Respiratory Burst Through the Action of Advanced Glycation End Products. *Diabetes*. VOL. 51, SEPTEMBER 2002
- World Health Organization. 2016. Global Report on Diabetes. *WHO Press*. Switzerland
- Yeo, M.K., H.E. Kim, S.H. Kim, B.J. Chae. 2017. Clinical Usefulness Of The Free Web-Based Image Analysis Application ImmunoRatio For Assessment Of Ki-67 Labelling Index In Breast Cancer. *J Clin Pathol* 70:715-719.