

**PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN SALEP  
EKSTRAK BIJI PINANG (*Areca catechu*) DENGAN  
SALEP LUKA KOMERSIAL TERHADAP EKSPRESI  
IL-10 DAN JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA  
LUKA TERBUKA TIKUS JANTAN  
(*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ABDUL MUFID**  
**125130107111044**



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

**PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN SALEP  
EKSTRAK BIJI PINANG (*Areca catechu*) DENGAN  
SALEP LUKA KOMERSIAL TERHADAP EKSPRESI  
IL-10 DAN JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA  
LUKA TERBUKA TIKUS JANTAN  
(*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Perbandingan Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) dengan Salep Luka Komersial Terhadap Ekspresi IL-10 dan Jumlah Sel Fibroblas pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)**

Oleh :  
**ABDUL MUFID**  
**NIM : 125130107111044**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 9 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana

Pembimbing I

Pembimbing II

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

**drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech**  
NIP. 198705012015041001

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 : Abdul Mufid

NIM : 125130107111044

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul :

Perbandingan Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) dengan Salep Luka Komersial Terhadap Ekspresi IL-10 dan Jumlah Sel Fibroblas pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)

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, 9 Januari 2018

Yang menyatakan

(Abdul Mufid)  
NIM. 125130107111044

**PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK BIJI  
PINANG (*Areca catechu*) DENGAN SALEP LUKA KOMERSIAL  
TERHADAP EKSPRESI IL-10 DAN JUMLAH SEL FIBROBLAS  
PADA LUKA TERBUKA TIKUS JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRAK**

Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis kulit normal akibat proses patologis yang berasal dari internal dan eksternal. Biji pinang (*Areca catechu*) merupakan salah satu tanaman obat yang banyak mengandung tanin dan flavonoid. Flavonoid dan tanin dapat bekerja sebagai antiinflamasi dan merangsang pertumbuhan sel baru pada luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) dan jumlah sel fibroblas. Tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang dibagi dalam 4 kelompok masing-masing 5 ekor. Pemberian terapi dilakukan selama 4 hari. Kelompok kontrol adalah kelompok yang diberikan terapi salep antibiotik komersial (Gentamicin). Kelompok P1 adalah kelompok tikus dengan terapi ekstrak biji pinang konsentrasi 2,5 %. Kelompok P2 adalah kelompok tikus dengan terapi ekstrak biji pinang konsentrasi 5 %. Kelompok P3 adalah kelompok tikus dengan terapi ekstrak biji pinang konsentrasi 7,5 %. Pengamatan ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) menggunakan metode Imunohistokimia (IHK) yang diamati secara kuantitatif dan jumlah sel fibroblas menggunakan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE). Analisa data ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) dan jumlah sel fibroblas menggunakan uji *One Way ANOVA* ( $\alpha=5\%$ ) dan dilakukan uji lanjutan dengan uji *Tukey*  $\alpha= 0,05$ . Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi salep ekstrak biji pinang secara signifikan ( $p<0,05$ ) dapat meningkatkan ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) dan jumlah sel fibroblas dibandingkan salep luka gentamicin. Terapi salep ekstrak biji pinang konsentrasi 2,5% merupakan dosis paling efektif yang dapat meningkatkan area ekspresi IL-10 sebesar 45,5% dan meningkatkan jumlah sel fibroblas sebesar 61,5% dibandingkan salep luka gentamicin. Kesimpulan dari penelitian ini adalah salep ekstrak biji pinang dapat digunakan sebagai alternatif terapi luka terbuka.

**Kata kunci** : Luka, Biji Pinang (*Areca catechu*), ekspresi (IL-10), sel fibroblas.

**COMPARISON OF EFFECT ARECA SEED EXTRACT OINTMENT  
(*Areca catechu*) WITH COMMERCIAL OINTMENT TO IL-10  
EXPRESSION AND QUANTITY OF FIBROBLAST CELLS  
OF ONE WOUND IN MALE RATS (*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRACT**

Wound is the breakdown of normal skin anatomical structure and function due to pathological processes originating from internal and external. Nutmeg seed (*Areca catechu*) is one of the medicinal plants that contain many tannins and flavonoids. Flavonoids and tannins can work as anti-inflammatory and stimulate the growth of new cells in the wound. This study aims to determine the effect of giving areca seed extract (*Areca catechu*) to Interleukin-10 (IL-10) expression and the number of fibroblast cells. The mice used in this study were male rats (*Rattus norvegicus*) divided into 4 groups of 5 each. Giving therapy performed for 4 days. The control group was a group given commercial antibiotic ointment therapy (Gentamicin). Group P1 is a group of mice with areca nut intake concentration 2.5%. Group P2 is a group of mice with 5% concentration of areca seed extract. P3 group is a group of mice with areca therapy concentration of 7.5%. *Interleukin-10* (IL-10) expression observations used the quantitative method of *Immunohistochemistry* (IHC) and the number of fibroblasts using *Hematoxylin Eosin* (HE) staining. Interleukin-10 (IL-10) expression analysis and fibroblast cell counts using One Way ANOVA ( $\alpha = 5\%$ ) and continued test with Tukey  $\alpha = 0,05$ . The results of this study showed that the treatment of betel nut extract significantly ( $p < 0.05$ ) increased *Interleukin-10* (IL-10) expression and the number of fibroblast cells compared to gentamicin wound ointment. Areca extract concentration therapy 2,5% is the most effective dose that can increase the expression area of IL-10 by 45.5% and increase the number of fibroblast cells by 61.5% compared to gentamicin wound ointment. The conclusion of this study is the ointment extract areca seeds can be used as an alternative for therapy of one wound.

**Keywords :** wound, areca seed (*Areca catechu*), expression *Interleukin-10* (IL-10), fibroblast cells.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi yang berjudul “**Perbandingan Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) dengan Salep Luka Komersial Terhadap Ekspresi IL-10 dan Jumlah Sel Fibroblas Pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)**”.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang membantu membimbing, memotivasi, dan memperlancar dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini, secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang membimbing dalam pelaksanaan skripsi dan memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah berkenan memberikan waktu, bimbingan, motivasi, dan bantuan dalam penulisan skripsi.
3. drh. Ajeng Aeka, M.Sc, dan drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji yang telah berkenan memberikan tanggapan, masukan, kritik, dan saran kepada penulis.
4. Keluarga penulis, Bapak H.Isma'il, Ibu Hj.Maftuhah, kakak tercinta Nurul Imamah, Wardi Ahmad dan kakak Habibus Shalihin, S.H yang senantiasa

- memberikan semangat, motivasi, waktu, bimbingan, dan doa yang tiada henti demi keberhasilan penulis.
5. Teman-teman sekelompok penelitian “Wulan Dwi Sekarwangi, S.KH, Urwatul Dzumirah, S.KH (Oval), Larasati C, S.KH, dan Ahmad Muzakki” yang telah banyak membantu dan berjuang bersama-sama untuk penelitian ini.
  6. Teman-teman dan sahabat penulis “Anna Fanada Aflah, S.E, Akbar Thohir, S.M, Ikromi Abbas, S.E, Didik Afif S,S.KH, Endang Rosidayanti, S.KH, Fadal, Amar, Irvan, Faisol dan teman-teman organisasi APEK yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan motivasi yang tiada henti kepada penulis.
  7. Keluarga besar mahasiswa Kedokteran Hewan khususnya angkatan 2012 D yang senantiasa memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis.
  8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dan dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan bagi penulis juga bagi pembaca. Kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi menyempurnakan penulisan selanjutnya.

Malang, 9 Januari 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Luka Pada Kulit .....	6
2.2.1 Macam-macam Luka .....	6
2.2.2 Proses Penyembuhan Luka.....	9
2.3 Interleukin-10 (IL-10).....	15
2.4 Sel Fibroblas.....	16
2.4.1 Struktur Mikroskopik Sel Fibroblas .....	18
2.4.2 Peran Sel Fibroblas Pada Penyembuhan Luka .....	20
2.5 Pinang .....	23
2.5.1 Klarifikasi Pinang .....	23
2.5.2 Morfologi .....	24
2.5.3 Kandungan dan Manfaat .....	25
2.6 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	26
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konseptual.....	29
3.2 Hipotesis Penelitian .....	33
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	34
4.2 Rancangan Penelitian.....	34
4.3 Alat dan Bahan .....	35
4.4 Tahapan Penelitian.....	36
4.5 Prosedur Kerja .....	36
4.6 Analisis Data .....	44
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang Terhadap Ekspresi IL-10 pada Luka Terbuka Tikus Jantan .....	46
5.1.1 Hasil Ekspresi IL-10 Hari Kedua pada Luka Terbuka Tikus Jantan Setelah Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang.....	46



5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang Terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Luka Terbuka Tikus Jantan .....	51
<b>BAB 6 PENUTUP</b>	
6.1 Kesimpulan .....	57
6.2 Saran .....	57
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	58
<b>LAMPIRAN</b> .....	61



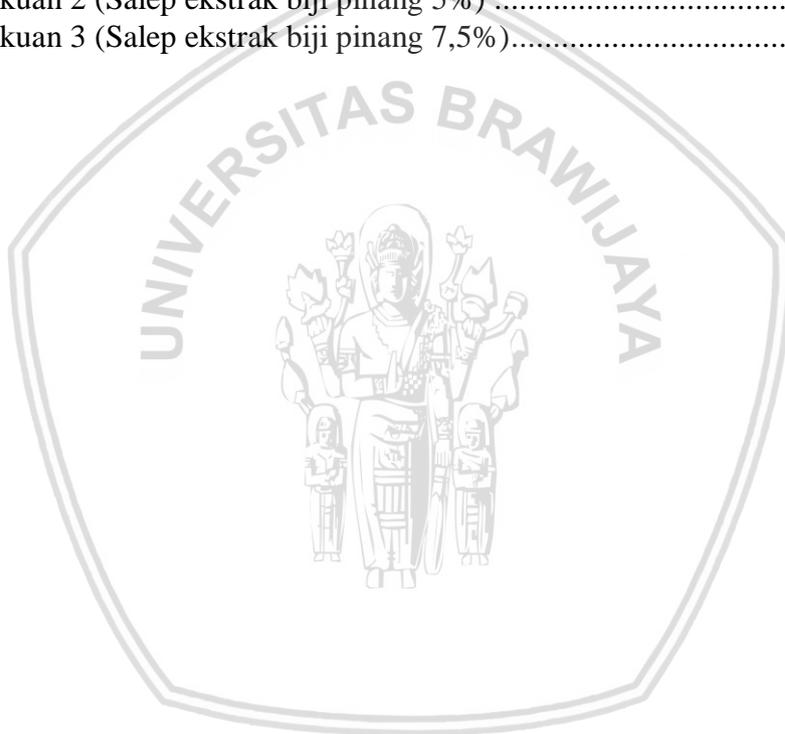
**DAFTAR TABEL**

2.1 Peran Sel Pada Fase Penyembuhan Luka.....	14
4.1 Rancangan Penelitian .....	35
5.1 Rata-rata Ekspresi IL-10 Hari Keempat pada Kulit Tikus .....	47
5.2 Pengaruh Salep Ekstrak Biji Pinang pada Luka Terbuka Terhadap Jumlah Sel Fibroblas .....	53



**DAFTAR GAMBAR**

2.1 Waktu Penyembuhan Luka.....	9
2.2 Penampang Sel Fibroblas dan Fibrosit.....	18
2.3 Sel Fibroblas Secara Histologi.....	19
2.4 Tumbuhan Pinang .....	24
2.5 Tikus.....	27
4.1 Sel Fibroblas .....	42
5.1 Ekspresi IL-10 Hari Keempat pada Jaringan Kulit Tikus dengan Pewarnaan.....	46
5.2 Konrol Positif Sel Fibroblas .....	50
5.3 Perlakuan 1 (Salep ekstrak biji pinang 2,5%).....	50
5.4 Perlakuan 2 (Salep ekstrak biji pinang 5%) .....	51
5.5 Perlakuan 3 (Salep ekstrak biji pinang 7,5%).....	51



**DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG**

IL-10	: <i>Interleukin 10</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-4	: <i>Interleukin 4</i>
IL-5	: <i>Interleukin 5</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
PMN	: <i>Polymorfo Nucleat</i>
a-FGF	: <i>asidic fibroblast growth factor</i>
e-FGF	: <i>epidermal fibroblast growth factor</i>
TGF- $\beta$	: <i>Transforming growth factor beta</i>
CD40	: <i>Cluster of Differentiation 40</i>
REK	: <i>Retikulum endoplasma kasar</i>
CSIF	: <i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
ECM	: <i>Extracelular Matrix</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
HE	: <i>Hematoksin Eosin</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NS	: <i>Normal saline</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
DAB	: <i>Diamano Benzidine</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis kulit normal akibat proses patologis yang berasal dari internal dan eksternal dan mengenai organ tertentu (Potter and Perry, 2006). Luka juga dapat didefinisikan sebagai kerusakan kontinuitas kulit, mukosa membran dan tulang atau organ tubuh lainnya. Ketika luka muncul, beberapa efek akan muncul seperti hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ, respon stress simpatis, perdarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri, dan kematian sel (Ammusen and Solner, 2000).

Luka terbuka adalah luka dimana kulit atau jaringan di bawahnya mengalami kerusakan. Penyebab luka ini adalah benda tajam, tembakan, benturan benda keras dan lain-lain. Macam-macam luka terbuka antara lain yaitu luka lecet (*abrsiekskoriasi*), luka gigitan (*vulnus marsum*), luka iris/insisi (*vulnus scisum*), luka bacok (*vulnus caesum*), luka robek (laserasi atau *vulnus laceratum*), luka tembak (*vulnus sclopetinum*), luka tusuk (*vulnus punctum*) dan luka bakar (*combustio*) (Dorland, 2006).

Proses penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks, selain memerlukan efek antimikroba dan antiinflamasi, juga memerlukan mekanisme antioksidatif dan pendukung regenerasi serta proliferasi sel dalam sintesis protein dan kolagen. Fase proliferasi merupakan proses kegiatan seluler yang penting pada fase ini karena dapat memperbaiki dan menyembuhkan luka ditandai dengan proliferasi sel. Peran fibroblas sangat besar pada proses perbaikan yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang

akan digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Setelah terjadi luka fibroblas akan aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke dalam daerah luka, kemudian akan berkembang (proliferasi) serta mengeluarkan beberapa substansi (kolagen, elastin, *hyaluronic acid*, *fibronectin*, dan *proteoglycans*) yang berperan dalam membangun (rekonstruksi) jaringan baru (Shukla *et al.*, 2008).

Terjadinya proses penyembuhan luka tidak terlepas dari peran faktor pertumbuhan dan sitokin, salah satunya yaitu *Interleukin 10* (IL-10). IL-10 adalah salah satu sitokin anti inflamasi yang berfungsi menghambat atau menekan produksi sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam timbulnya nyeri patologis (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-6) dengan mengaktifkan makrofag. Selain itu juga menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hasil akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi imun non spesifik maupun spesifik yang diperantarai oleh sel T.

Pengobatan luka terbuka umumnya menggunakan obat antibiotik komersial seperti salep gentamicin. Penggunaan antibiotik yang lama akan menimbulkan resistensi terhadap infeksi luka. Oleh karena itu, untuk menghindari lamanya proses penyembuhan luka dan timbulnya resistensi dapat diberikan terapi lain untuk pengobatan luka terbuka, yaitu menggunakan bahan-bahan alam yang bersifat antiinflamasi, antibakteri dan vasodilatasi. Salah satu bahan alam tersebut adalah biji pinang (*Areca catechu*) (Sudarsono, 2001).

Biji pinang mengandung *Arecoline*, yaitu senyawa alkaloid aktif. Selain *Arecoline*, pinang juga mengandung *arekaidin*, *arekain*, *guvacin*, *arekolidin*, *guvakolin*, *isoguvakolin* dan *kolin*. Senyawa alkaloid arekolin dan arekaidin

diduga berkhasiat sebagai agen hemostatik. Biji pinang mengandung senyawa flavonoid dan saponin yang berguna sebagai antimikroba, selain sebagai antimikroba flavonoid berupa katekin berfungsi sebagai antiinflamasi (Sa'roni dan Adjirni, 2005). Menurut Fine (2000) biji pinang mengandung senyawa proantosianidin. Proantosianidin berupa tanin terkondensasi yang tergolong flavonoid yang berkhasiat sebagai antibakteri, antivirus, antikarsinogenik, antiinflamasi, antialergi, dan agen vasodilator. Senyawa tanin dari biji pinang diduga memiliki efek sebagai astringen. Astringen berfungsi menciutkan jaringan kulit yang terbuka sehingga perdarahan dapat terhenti dan penyembuhan luka dapat terjadi.

Penelitian mengenai ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap penyembuhan luka sebelumnya telah dilakukan oleh Rairisti dkk (2014) yang diujikan pada luka sayat tikus putih jantan galur wistar. Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji pinang dengan konsentrasi 1%, 2% dan 4% memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif sementara ekstrak 2% dan 4% tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif ( $p < 0,05$ ). Penutupan luka paling cepat dari ekstrak etanol biji pinang ialah konsentrasi 2%.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap proses kesembuhan luka terbuka yang dilihat pada ekspresi IL-10 yang berperan sebagai antiinflamasi dan jumlah sel fibroblas.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perumusan masalah sebagai berikut :

- a. Apakah pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) meningkatkan ekspresi IL-10 pada luka terbuka tikus jantan (*Rattus norvegicus*)?
- b. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap jumlah sel fibroblas pada luka terbuka tikus jantan (*Rattus norvegicus*)?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada :

- a. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 150-200 gram dengan umur 8-12. Penggunaan hewan coba telah memperoleh laik etik dari KEP UB No : 751-KEP-UB
- b. Pembuatan luka terbuka dilakukan pada daerah punggung dengan ukuran  $\pm 1 \times 1$  cm.
- c. Pada kelompok perlakuan diberikan salep ekstrak biji pinang konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5%. Kelompok kontrol luka terbuka diberikan salep luka komersial (gentamicin).
- d. Pemberian salep dilakukan dua kali sehari sebanyak  $\pm 50$  mg setiap kali pemberian pada daerah luka terbuka.
- e. Jaringan kulit diambil pada hari ke empat pasca luka.

- f. Pengamatan ekspresi IL-10 dilakukan menggunakan metode Imunohistokimia (IHK) untuk melihat persentase area ekspresi IL-10 yang dianalisa menggunakan *software Immunoratio*.
- g. Pengamatan jumlah sel fibroblas luka terbuka dilakukan menggunakan preparat histopatologi pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) yang dianalisa menggunakan *software ImageRaster*.
- h. Persentase area ekspresi IL-10 dan jumlah sel fibroblas antar kelompok dianalisa menggunakan One Way ANOVA, kemudian dilanjutkan uji BNP dengan angka kepercayaan 95%.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan salep ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) dengan salep antibiotik (Gentamicin) sebagai terapi luka terbuka dengan melihat peningkatan ekspresi IL-10 dan jumlah sel fibroblas pada awal fase proliferasi atau fase akhir inflamasi pada luka terbuka tikus jantan.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan flavonoid dan tanin dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) dalam mempengaruhi ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) dan jumlah sel fibroblas pada luka terbuka tikus jantan.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Luka Pada Kulit

Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis kulit normal akibat proses patologis yang berasal dari internal dan eksternal dan mengenai organ tertentu (Potter and Perry, 2006). Luka juga dapat didefinisikan sebagai kerusakan kontinuitas kulit, mukosa membran dan tulang atau organ tubuh lainnya. Ketika luka muncul, beberapa efek akan muncul seperti hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ, respon stress simpatis, perdarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri, dan kematian sel (Ammusen and Solner, 2000).

#### 2.2.1 Macam-macam Luka

Menurut Banaroski dan Ayello (2004) macam-macam luka berdasarkan lama waktu penyembuhannya, luka dibagi menjadi 2 jenis, yaitu :

##### a. Luka Akut

Luka akut adalah luka trauma yang biasa segera mendapat penanganan dan biasanya dapat sembuh dengan baik bila tidak terjadi komplikasi. Kriteria luka akut adalah luka baru, mendadak dan penyembuhannya sesuai dengan waktu yang diperkirakan. Contohnya adalah luka sayat, luka bakar dan luka tusuk.

##### b. Luka Kronik

Luka kronik adalah luka yang berlangsung lama atau sering timbul kembali atau terjadi gangguan pada proses penyembuhan yang biasanya disebabkan oleh masalah multi faktor dari penderita. Contohnya adalah ulkus tungkai, ulkus vena, ulkus arteri (iskemi), penyakit vaskular perifer ulkus dekubitus, neuropati perifer ulkus dekubitus.

Menurut Suriadi (2004) jenis-jenis luka berdasarkan derajat kontaminasi adalah sebagai berikut :

a. Luka Bersih

Luka bersih adalah luka yang tidak terdapat inflamasi dan infeksi, yang merupakan luka sayat selektif dan steril dimana luka tersebut berpotensi untuk terinfeksi. Luka tidak ada kontak dengan orofaring, traktus respiratorius maupun traktus genitourinarius. Dengan demikian kondisi luka tetap dalam keadaan bersih. Kemungkinan terjadinya infeksi luka sekitar 1-5%.

b. Luka Bersih Terkontaminasi

Luka bersih terkontaminasi adalah luka pembedahan dimana saluran pernafasan, saluran pencernaan dan saluran perkemihan dalam kondisi terkontrol. Proses penyembuhan luka akan lebih lama namun luka tidak menunjukkan tanda infeksi. Kemungkinan timbulnya infeksi luka sekitar 3-11%.

c. Luka Terkontaminasi

Luka terkontaminasi adalah luka yang berpotensi terinfeksi saluran pernafasan, saluran pencernaan dan saluran kemih. Luka menunjukkan tanda infeksi. Luka ini dapat ditemukan pada luka terbuka karena trauma atau kecelakaan (luka laserasi), fraktur terbuka maupun luka penetrasi. Kemungkinan infeksi luka 10-17%.

d. Luka Kotor

Luka kotor adalah luka lama, luka kecelakaan yang mengandung jaringan mati dan luka dengan tanda infeksi seperti cairan purulen. Luka ini bisa sebagai

akibat pembedahan yang sangat terkontaminasi. Bentuk luka seperti perforasi visera, abses dan trauma lama.

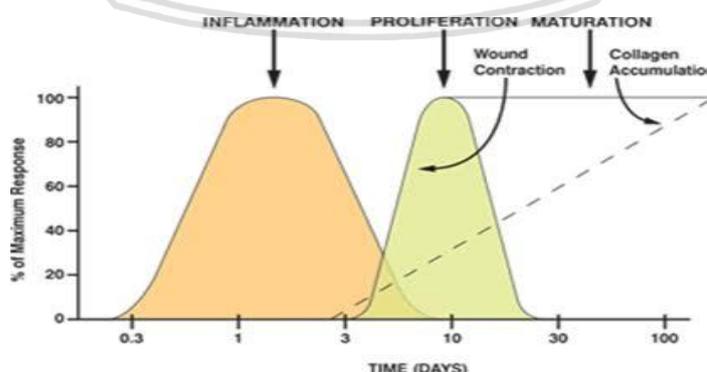
Menurut Suriadi (2004) macam-macam luka berdasarkan penyebabnya adalah sebagai berikut :

- a. *Vulnus ekskoriiasi* atau luka lecet/gores adalah cedera pada permukaan epidermis akibat bersentuhan dengan benda berpermukaan kasar atau runcing. Luka ini banyak dijumpai pada kejadian traumatik seperti kecelakaan lalu lintas, terjatuh maupun benturan benda tajam atau tumpul.
- b. *Vulnus scissum* adalah luka sayat atau iris yang ditandai dengan tepi luka berupa galis lurus dan beraturan. *Vulnus scissum* biasanya dijumpai pada aktivitas sehari-hari terkena pisau dapur, sayatan benda tajam (seng, kaca), dimana bentuk luka teratur.
- c. *Vulnus laseratum* atau luka robek adalah luka dengan tepi yang tidak beraturan atau compang-camping biasanya karena tarikan atau goresan benda tumpul. Luka ini dapat kita jumpai pada kejadian kecelakaan lalu lintas dimana bentuk luka tidak beraturan dan kotor, kedalaman luka bisa menembus lapisan muskulus .
- d. *Vulnus morsum* adalah luka karena gigitan binatang. Luka gigitan hewan memiliki bentuk permukaan luka yang mengikuti gigi hewan yang menggigit. Dengan kedalaman luka juga menyesuaikan hewan tersebut.
- e. *Vulnus combutio* adalah luka karena terbakar oleh api atau cairan panas maupun sengatan arus listrik. *Vulnus combutio* memiliki bentuk luka yang tidak beraturan dengan permukaan luka yang lebar dan warna kulit yang

menghitam. Biasanya juga disertai pula karena kerusakan epitel kulit dan mukosa.

### 2.2.2 Proses Penyembuhan Luka

Tubuh secara normal akan merespon atas terjadinya cedera dengan serangkaian proses yang disebut dengan peradangan, yang dikarakteristikan dengan lima tanda utama, yaitu rubor (kemerahan), tumor (pembengkakan), calor (panas setempat yang berlebihan), dolor (rasa nyeri), dan functiolaesa (gangguan fungsi jaringan yang terkena). Proses penyembuhan luka merupakan proses biologis yang dinamis dengan tujuan akhir pemulihan fungsi dan integritas jaringan serta meliputi berbagai mekanisme yang kompleks yaitu proses pembekuan darah, proses inflamasi, proliferasi sel, koagulasi, fibroplasia, epitelisasi, kontraksi, pembekuan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan rekonstruksi matrik ekstrasel atau repair dan remodelling (**Gambar 2.1**). Penilaian proses penyembuhan luka dapat juga dilakukan dengan pengukuran luas permukaan, kedalaman, volume dan tampilan klinis seperti granulasi dan eksudat luka (Ammusen, 2000).



**Gambar 2.1** Waktu penyembuhan luka

Proses kesembuhan luka adalah suatu bentuk proses usaha untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi. Komponen utama dalam proses penyembuhan luka adalah kolagen dan sel epitel. Fibroblas adalah sel yang bertanggung jawab untuk sintesis kolagen. Fase-fase proses kesembuhan luka seperti penjelasan dibawah ini :

#### **a. Fase Inflamasi**

Fase inflamasi terjadi pada hari ke 0 – 5. Kerusakan sel akan memicu reaksi vaskuler kompleks pada jaringan ikat dengan pembuluh darah. Reaksi ini berguna sebagai mekanisme proteksi terhadap jaringan yang mengalami kerusakan agar tidak mengalami infeksi dan meluas tak terkendali. Proses inflamasi sangat erat berhubungan dengan penyembuhan luka. Inflamasi dan penyembuhan luka cenderung menimbulkan nyeri. Tanpa adanya inflamasi tidak akan terjadi proses penyembuhan dan luka akan tetap menjadi sumber nyeri (Cotran *et, al.* 1999).

Fase inflamasi dimulai segera setelah terjadi luka. Luka mengakibatkan kerusakan struktur jaringan dan perdarahan. Darah akan mengisi jaringan cedera dan terjadi degranulasi trombosit dan pengaktifan faktor Hageman. Terjadi pengaktifan komplemen kinin, kaskade pembekuan dan pembentukan plasmin. Keadaan ini memperkuat sinyal dari daerah yang terluka, danhal ini tidak saja mengaktifkan pembentukan bekuan yang menyatukan tepi luka tetapi juga akumulasi dari beberapa mitogen dan akan menarik zat kimia ke daerah luka. Pembentukan kinin dan prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas dari pembuluh darah. Hal ini menyebabkan edema dan menimbulkan pembengkakan dan nyeri. Sel PMN terutama netrofil adalah

sel pertama yang menuju ke daerah luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncak pada 24–48 jam. Netrofil akan melakukan fagositosis dan mencerna organisme patologis dan sisa jaringan (Kresno, 2001).

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Muncul pertama 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3. Makrofag berumur lebih panjang dan tetap ada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T dengan jumlah bermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Makrofag dan limfosit T penting keberadaannya pada penyembuhan luka normal. Makrofag melakukan fagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas zat biologis aktif yang akan mempermudah makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa-sisa jaringan. Makrofag melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan jaringan granulasi (Kresno, 2001).

#### **b.Fase Proliferasi**

Fase ini terjadi pada hari ke 3 – 14. Fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, bersamaan dengan timbulnya kapiler baru yang tertanam dalam jaringan longgar ekstra seluler dari matriks kolagen, fibronektin dan asam hialuronik. Fibroblas muncul pertama kali secara bermakna pada hari ke 3 dan mencapai puncak pada hari ke 7.

Peningkatan jumlah fibroblas pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi (Kresno, 2001).

Menurut Mast (2000) bahwa fibroblas ini berasal dari sel-sel mesenkimal lokal yang berhubungan dengan lapisan adventisia, pertumbuhannya dipacu oleh sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit. Fibroblas merupakan elemen utama pada proses perbaikan untuk pembentukan protein struktural. Fibroblas juga memproduksi kolagen dalam jumlah besar, kolagen ini berupa glikoprotein berantai tripel, yang merupakan unsur utama matriks ekstraseluler dan berguna untuk membentuk kekuatan pada jaringan parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke 3 setelah luka, meningkat sampai minggu ke 3. Kolagen terus menumpuk sampai tiga bulan. Proses proliferasi fibroblas dan aktivasi sintetik ini dikenal dengan fibroplasia.

Revaskularisasi dari luka terjadi secara bersamaan dengan fibroplasia. Tunas kapiler tumbuh dari pembuluh darah yang berdekatan dengan luka. Pada hari ke 2 sel endotelial pembuluh darah mulai bermigrasi sebagai respon stimuli angiogenik. Proses ini terjadi dari kombinasi proliferasi dan migrasi. Sitokin merupakan stimulan potensial pada neovaskularisasi, termasuk *acidic Fibroblast Growth Factor* ( a-FGF ), TGF- $\beta$  dan *epidermal FGF* ( e-FGF ) (Mast, 2000; Kresno, 2001).

Pada permukaan luka juga terjadi pembentukan epitel beberapa jam setelah luka. Sel epitel tumbuh dari tepi luka, bermigrasi ke jaringan ikat yang masih hidup. Epidermis segera mendekati tepi luka dan menebal dalam 24 jam setelah luka. Ikatan sel basal dari dermis di dekatnya menjadi longgar. Sel basal

membesar dan bermigrasi ke permukaan luka. Sel basal membelah cepat dan bermigrasi dengan pergerakan menyilang satu dengan yang lain sampai defek yang terjadi tertutup semua. Ketika sudah terbentuk jembatan, sel epitel berubah bentuk menjadi lebih kolumnar dan meningkat aktifitas mitotiknya. Proses reepitelisasi sempurna terjadi kurang dari 48 jam pada luka sayat yang tepinya saling berdekatan dan memerlukan waktu lebih panjang pada luka dengan defek lebar. Stimulator reepitelisasi ini belum diketahui secara lengkap (Kresno, 2001).

### **c. Fase Maturasi atau *Remodelling***

Fase ini berlangsung dari hari ke 7 sampai dengan 1 tahun. Segera setelah matriks ekstrasel terbentuk dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronektin. Terjadi migrasi dan pertumbuhan sel ke dalam, penumpukan kolagen oleh fibroblas. Terbentuk asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar yang berperandalam pembentukan matriks ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentuk matriks. Serabut kolagen pada permulaan terdistribusi acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel fibril yang secara perlahan menyebabkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan dan kekuatan ketegangan.

Sesudah 5 hari periode jeda, dimana saat ini bersesuaian dengan pembentukan jaringan granulasi awal dengan matriks yang sebagian besar tersusun dari fibronektin dan asam hialuronidase, terjadi peningkatan cepat dari kekuatan tahanan luka karena fibrogenesis kolagen. Pencapaian kekuatan tegangan luka berjalan lambat. Sesudah 3 minggu kekuatan penyembuhan luka

mencapai 20% dari kekuatan akhir. Bagaimanapun, kekuatan akhir luka tetap lebih lemah dibanding dengan kulit utuh, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh (Mast, 2000).

Pengembalian kekuatan tegangan berjalan perlahan karena deposisi jaringan kolagen terus menerus, remodelling serabut kolagen membentuk bundel kolagen lebih besar dan perubahan dari *cross linking* intermolekuler. *Remodelling* kolagen selama pembentukan jaringan parut tergantung pada proses sintesis dan katabolisme kolagen. Degradasi kolagen pada luka dikendalikan oleh enzim kolagenase. Kecepatan sintesis kolagen untuk mengembalikan luka menjadi jaringan normal terjadi dalam waktu 6 bulan sampai 1 tahun. Remodeling aktif jaringan parut akan terus berlangsung sampai 1 tahun dan tetap berjalan dengan lambat seumur hidup. Pada proses *remodelling* terjadi reduksi secara perlahan pada vaskularisasi dan selularitas jaringan yang mengalami perbaikan sehingga terbentuk jaringan parut kolagen yang relatif avaskuler dan aseluler (Cotran *et, al.* 1999; Mast, 2000)

**Tabel 2.1.** Peran sel pada fase penyembuhan luka

<b>Fase</b>	<b>Sel-sel yang berperan</b>
Proses Koagulasi	Platelet
Inflamasi	Platelet Neutrofil
Migrasi/proliferasi/granulasi	Makrofag Limfosit Fibroblas Sel epitelial Sel endotel
Maturasi/ <i>remodelling</i>	Fibroblas

### 2.3 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin 10 atau *cytokines synthesis inhibitory factor*, merupakan protein yang larut dan terdiri dari 160 asam amino dengan berat molekul sekitar 18 kD. IL-10 terdiri dari dua ikatan disulfide intra molekul dan bersifat labil. Struktur IL-10 lebih didominasi oleh  $\alpha$ -helix, serta diduga berasal dari bagian IL-2, IL-4, dan IFN- $\gamma$ . Sekresi sitokin ini berasal dari sel T, sel B, monosit, makrofag, sel mast, sel eosinofil, keratinosit, hepatosit, sel epitel, sel atrosit dan lain-lain (Abbas *et al.* 1994). IL-10 tidaklah merupakan sitokin yang khusus/senyawa berasal dari TH2 dan gambaran ekspresinya lebih menyerupai IL-6 dari pada IL-4 atau IL-5. Hampir pada sebagian besar proses inflamasi, golongan sel monosit merupakan sumber terbesar dari IL-10 (Abbas and Lichtman, 2005).

IL-10 menunjukkan aktivitas imunostimulator, dimulai sejak IL-10 meningkatkan proliferasi dan aktivitas sitosolik sel limfosit T, serta merangsang kemoatraktan. Secara bersamaan dikatakan, bahwa IL-10 dapat merangsang aktivasi sel NK, dan meningkatkan rangsangan IL-2 terhadap proliferasi sel NK, serta sitotoksisitas dan pengeluaran sitokin lain. Akhirnya IL-10 merupakan sitokin yang potensial terhadap proliferasi dan faktor diferensiasi terhadap sel limfosit B dalam mempromosikan sintesa dari IgM, IgG, dan IgA. Semua peran tersebut merupakan tugas IL-10 dalam meningkatkan regulasi reseptor ekspresi dalam monosit, di samping mempertinggi *antibody mediated cellular cytotoxicity* (Petrolani *et al.*, 2003).

IL-10 juga diduga berfungsi sebagai pengontrol proses inflamasi, proses alergi. Dugaan ini berdasarkan observasi yang menunjukkan bahwa IL-10 dapat

menurunkan regulasi produksi IL-5 oleh sel T. Sementara itu, IL-5 merupakan sitokin yang berperan dalam diferensiasi dan aktivasi fungsi eosinofil, yaitu dengan mengontrol akumulasi eosinofil dalam jaringan yang meradang. Saat ini dinyatakan bahwa eosinofil mengekspresi fungsional CD40 pada permukaannya dan mengikatnya dengan antibodi yang spesifik (*natural ligand*) untuk memperpanjang kehidupannya (Petrolani *et al.*, 2003).

#### 2.4 Sel Fibroblas

Sel fibroblas (*L. fibra*, serat: Yunani. *blatos*, benih: Latin) merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler (kolagen, elastin, retikuler), beberapa makromolekul anionik (glikosaminoglikans, proteoglikans) serta glikoprotein multiadhesiv, laminin, dan fibronectin) yang dapat mendorong perlekatan sel pada substrat. Di samping itu, sel fibroblas mensekresikan sitokin dan beberapa faktor pertumbuhan (*growth factors*) diantaranya dapat menstimulasi proliferasi sel dan menghambat proses diferensiasi (Juwita dkk, 2010). Menurut Tambayong (2007) bahwa fibroblas merupakan sel induk yang berperan membentuk dan meletakkan serat-serat dalam matriks, terutama serat kolagen. Sel ini mensekresi molekul tropokolagen kecil yang bergabung dalam substansi dasar membentuk serat kolagen. Kolagen akan memberikan kekuatan dan integritas pada semua luka sehingga menyembuh dengan baik.

Menurut Junqueira dan Carneiro (2005) secara struktural jaringan ikat terdiri dari 3 komponen yaitu sel-sel jaringan ikat (salah satunya fibroblas), serabut jaringan ikat, dan bahan dasar. Sel-sel pembentuk jaringan ikat ialah

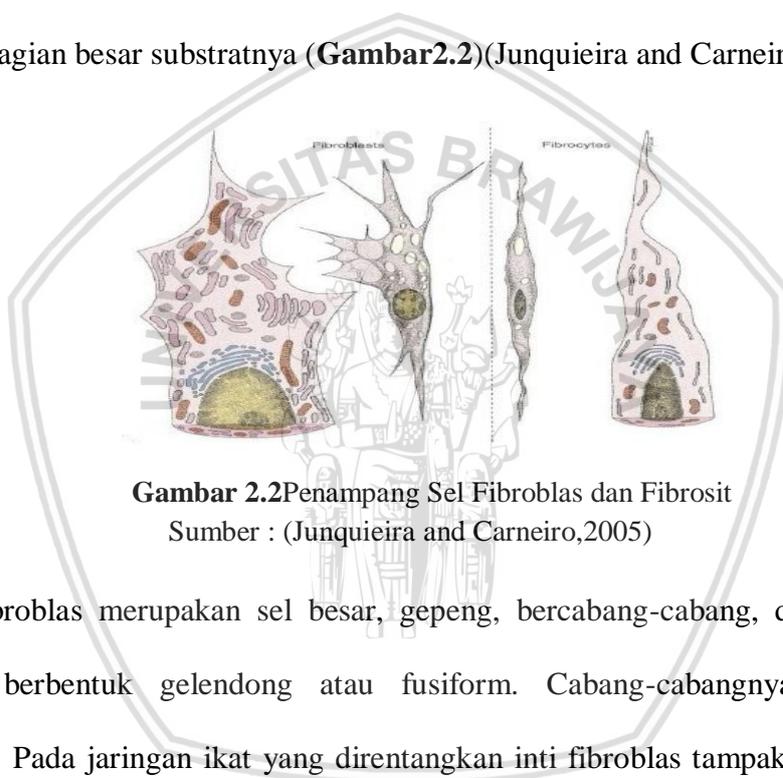
fibroblas, makrofag, sel mast, leukosit, sel plasma, sel lemak, sel pigmen, dan sel mesenkim. Fungsi utama fibroblas adalah pembentuk substansi dasar dan serabut kolagen. Serabut jaringan ikat tersusun dari matriks-matriks, serat-serat yang dihasilkan oleh fibroblas dan di temukan di dalam matriks ialah :

1. Serat Kolagen, terdiri dari sejumlah berkas fibril paralel. Secara kimia serat ini tersusun dari protein kolagen. Serat yang segar berwarna putih, lebar, dan kuat.
2. Serat Elastik, Serat elastik terbentuk secara tunggal dan secara kimia tersusun dari protein elastin. Warnanya kuning, lebih besar namun jauh lebih tipis dari serat kolagen, dan tidak terlalu kuat namun memiliki tingkat elastisitas yang besar.
3. Serat Retikular, Serat retikular terdiri dari kolagen, tetapi berbeda jumlah, diameter, dan susunan fibrilnya. Serat ini tipis, tidak elastis, dan bercabang untuk membentuk suatu jaringan yang baik, atau retikulum, untuk menyangga organ lunak seperti hati dan limpa. Oleh karena itu sel fibroblas sangat berperan dalam pembentukan jaringan ikat.

Sel jaringan ikat yang menyusun dan membentuk jaringan ikat memiliki 2 tipe yaitu tipe tetap (*resident type/ fixed cells*) dan tipe transient (*wandering cells*). Sel fibroblas termasuk kedalam tipe tetap, dikarenakan fibroblas berperan penting dalam pembentukan serabut jaringan ikat seperti yang telah dikatakan sebelumnya, dan memproduksi makro molekul (*glycosaminoglycan dan proteoglycan*) yang juga merupakan komponen bahan dasar jaringan ikat. Alasan lain yang membuat fibroblas menjadi tipe tetap ialah, sel tersebut relatif stabil dan jarang mengalami pergerakan (Junqueira and Carneiro, 2005).

### 2.4.1 Struktur Mikroskopik Sel Fibroblas

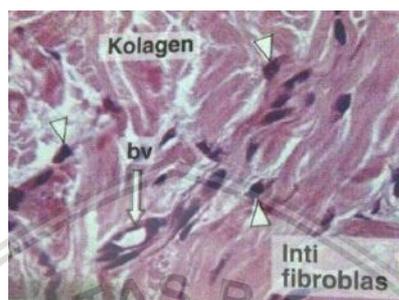
Fibroblas adalah sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang berkembang. Bila mereka menjadi relatif tidak aktif dalam membuat serat, ahli histologi menyebutnya sebagai *fibrosit*. Namun, karena sel-sel ini berpotensi untuk fibrogenesis dalam jaringan ikat diam dewasa selama perkembangannya maka digunakanlah istilah fibroblas. Bentuk sel ini tergantung pada sebagian besar substratnya (**Gambar 2.2**)(Junqueira and Carneiro,2005).



**Gambar 2.2** Penampang Sel Fibroblas dan Fibrosit  
Sumber : (Junqueira and Carneiro,2005)

Fibroblas merupakan sel besar, gepeng, bercabang-cabang, dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform. Cabang-cabangnya berbentuk langsing. Pada jaringan ikat yang direntangkan inti fibroblas tampak pucat; pada sajian irisan, fibroblas terlihat mengkerut dan terpulas gelap dengan pewarnaan basa. Pada kebanyakan sediaan histologi, batas sel tidak nyata dan ciri inti merupakan pedoman untuk pengenalannya. Inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti jelas, dan sedikit granula kromatin halus. Sel biasanya tersebar sepanjang berkas serat kolagen dan tampak dalam sediaan sebagai sel fusiform dengan ujung-ujung meruncing. Dalam beberapa situasi, fibroblas ditemukan dalam bentuk stelata gepeng dengan

beberapa cabang langsing. Inti panjangnya terlihat jelas, namun garis bentuk selnya mungkin sukar dilihat pada sediaan histologis karena bila relatif tidak aktif, sitoplasmanya eosinofilik seperti serat kolagen di sebelahnya (**Gambar 2.3**) (Fawcett. 2002)



**Gambar 2.3.** Sel Fibroblas Secara Histologi  
Sumber : (Taqwim, 2011)

Sel Fibrosit merupakan sel yang paling sering di temui pada jaringan ikat. Sel Fibrosit bersifat heterokhromatik dan hanya di kelilingi oleh sedikit sitoplasma berwarna pucat. Pengamatan sel fibrosit dengan menggunakan mikroskop elektron memperlihatkan jumlah retikulum endoplasma kasar (REK) yang sedikit, dengan kompleks golgi yang kecil. Sedangkan sel fibroblas berukuran sedikit lebih besar di bandingkan sel fibrosit dengan inti yang bersifat *eukhromatik*. Sitoplasmanya berbentuk irregular dengan beberapa penjururan. Pada pengamatan dengan mikroskop elektron akan terlihat REK dalam jumlah banyak dan kopleks golgi yang besar pada sitoplasma. Struktur ini mengindikasikan produksi matriks jaringan ikat lebih banyak di banding fibrosit. Sel fibroblas dapat berkembang langsung dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi atau dapat juga berasal dari sel fibrosit tergantung pada pengaruh faktor lingkungan. Sel fibroblas juga mampu mensintesis protein seperti kolagen

dan elastin yang akan membentuk serat yang dibutuhkan dalam pembentukan serabut ikat (Junqueira and Carneiro,2005).

#### **2.4.2 Peran Fibroblas pada Penyembuhan Luka**

Luka merupakan keadaan rusaknya jaringan tubuh. Setelah terbentuk luka, akan terjadi proses yang sangat kompleks. Proses tersebut terdiri dari fase homeostasis dan inflamasi, proliferasi dan maturasi. Pada fase proliferasi akan terlihat peningkatan jumlah sel dan faktor-faktor penyembuhan luka, salah satunya yaitu terjadi proliferasi fibroblas. Proliferasi dari fibroblas menentukan hasil akhir dari penyembuhan luka. Fibroblas akan menghasilkan kolagen yang akan menautkan luka, dan fibroblas juga akan mempengaruhi proses reepitelisasi yang akan menutup luka (Taqwim, 2011).

Pada keadaan normal, aktivitas pembelahan fibroblast sangat jarang terlihat, namun ketika terjadi perlukaan sel ini terlihat lebih aktif dalam memproduksi matriks ekstraseluler. Proliferasi fibroblast dalam proses penyembuhan luka secara alami distimulasi oleh *Interleukin-1b* (IL-1b), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Selain itu, Kanzaki dkk (1998) mengungkapkan bahwa migrasi fibroblast pada area perlukaan distimulasi oleh *Transforming Growth Factor* (TGF), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Proses penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh peranan migrasi dan proliferasi fibroblas pada area perlukaan (Taqwim, 2011).

Fungsi kolagen yang lebih spesifik adalah membentuk cikal bakal jaringan baru (*connective tissue matrix*) dan dengan dikeluarkannya substrat oleh

fibroblas, memberikan tanda bahwa makrofag, pembuluh darah baru dan juga fibroblas sebagai satu kesatuan unit dapat memasuki area luka (Yusuf, 2014).

Proses penyembuhan luka (*wound healing*) dari awal trauma hingga tercapainya penyembuhan melalui tahapan yang kompleks. Proses ini terdiri dari beberapa fase, yaitu fase homeostasis dan inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi. Pada fase proliferasi, fibroblas memegang peranan yang penting. Fibroblas berasal dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi. Fibroblas akan menghasilkan bahan dasar serat kolagen yang akan mempertautkan tepi luka. Fibroblas juga akan membentuk jaringan ikat yang baru dan memberikan kekuatan serta integritas pada semua luka sehingga menghasilkan proses penyembuhan yang baik. Meningkatnya jumlah sel fibroblas akan meningkatkan jumlah serat kolagen yang akan mempercepat proses penyembuhan luka (Putra dkk, 2013).

Menurut Putri (2012) bahwa fibroblas berperan dalam proses penyembuhan luka pada tahap proliferasi dan terbagi atas beberapa rangkaian yaitu:

a. Epitelisasi

Beberapa menit setelah terjadinya luka terjadi perubahan-perubahan morfologi pada keratinosit pada tepi luka. Pada kulit yang luka, epidermis menebal, dan sel-sel basal marginal melebar dan bermigrasi memenuhi defek pada luka. Satu kali sel bermigrasi, sel tersebut tidak akan berbelah hingga kontinuitas epidermis diperbaiki. Sel-sel basal yang telah diperbaiki pada area dekat potongan luka terus membelah, dan sel-sel yang dihasilkan merata dan bermigrasi ke seluruh matriks luka.

### b. Fibroplasia

Fibroplasia adalah suatu proses proliferasi fibroblas, migrasi *fibrin clot* ke daerah luka, dan produksi dari kolagen baru dan matriks protein lainnya, yang terlibat dalam pembentukan jaringan granulasi. Hasil proses penyembuhan luka yang dapat terlihat adalah pembentukan jaringan parut. Morfologi jaringan parut terbentuk akibat kurangnya susunan jaringan dibandingkan susunan jaringan normal disekitarnya. Deposisi kolagen yang tak teratur memainkan peranan menonjol pada pembentukan jaringan parut. Serat-serat kolagen baru disekresi oleh fibroblas yang mulai dihasilkan pada hari ke-3 setelah terjadinya luka. Saat matriks kolagenosa terbentuk, serabut padat kolagen akan mengisi area luka. Ketika proses penyembuhan mengalami kemajuan, jumlah fibroblas yang berproliferasi dan pembuluh darah baru akan berkurang; namun secara progresif fibroblas akan lebih mengambil fenotipe sintesis sehingga terjadi peningkatan deposisi ekstraseluler matriks. Secara khusus, sintesis kolagen sangat penting untuk pengembangan kekuatan pada tempat penyembuhan luka. Sintesis kolagen oleh fibroblas dimulai sejak awal proses penyembuhan luka (hari ke-3 sampai hari ke-5) dan berlanjut selama beberapa minggu, bergantung pada ukuran lukanya.

### c. Kontraksi

Sel yang bertanggung jawab pada kontraksi luka adalah miofibroblas. Miofibroblas merupakan sel mesenkim dengan fungsi dan karakteristik struktur seperti fibroblas dan sel otot polos. Sel tersebut merupakan komponen seluler jaringan granulasi atau jaringan parut yang membangkitkan tenaga kontraktile. Miofibroblas berasal dari fibroblas luka. Mikrofilamen aktin tersusun sepanjang

aksis panjang fibroblas dan berhubungan dengan *dense bodies* untuk tambahan pada sekeliling matriks seluler. Miofibroblas juga memiliki tambahan fungsi unik yang menghubungkan sitoskeleton ke matriks ekstraseluler yang disebut fibroneksus. Fibroneksus dibutuhkan untuk koneksi yang menjembatani membran sel antara mikrofilamen interseluler dan fibronektin ekstraseluler. Jadi, kekuatan kontraksi luka mungkin disebabkan oleh kumparan aktin dalam myofibroblas, dan hal tersebut diteruskan ke tepi luka oleh ikatan sel-sel dan sel matriks.

Proses akhir dari penyembuhan luka adalah pembentukan jaringan parut, yaitu jaringan granulasi yang berbentuk spindel, kolagen, fragmen dari jaringan elastik dan berbagai komponen matriks ekstraseluler. Jaringan yang mengalami perlukaan/ peradangan, maka fibroblas akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen dalam jumlah besar yang akan membantu mengisolasi dan memperbaiki jaringan yang rusak (Taqwim, 2011).

## 2.5 Pinang

### 2.5.1 Klasifikasi

Tanaman pinang diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyte
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Arecales
Suku	: Arecaceae/palmae
Marga	: <i>Areca</i>
Jenis	: <i>Areca catechu</i> L.



**Gambar 2.4** Tumbuhan Pinang  
(Sumber : Chamima, 2012)

### 2.5.2 Morfologi

Pinang (*Areca catechu* L.) merupakan tanaman famili *Areaceae* yang dapat mencapai tinggi 15-20 m dengan batang tegak lurus bergaris tengah 15 cm. Buahnya berkecambah setelah 1,5 bulan dan 4 bulan kemudian mempunyai jambul daun-daun kecil yang belum terbuka. Pembentukan batang baru terjadi setelah 2 tahun dan berbuah pada umur 5-8 tahun tergantung keadaan tanah (Chamima, 2012).

Bagian-bagian dari tanaman pinang antara lain: (a). Akar: berakar serabut, putih kotor. (b). Batang: tegak lurus dengan tinggi 10-30 meter, bergaris tengah 15cm, tidak bercabang dengan bekas daun yang lepas. (c). Daun: majemuk menyirip tumbuh berkumpul di ujung batang membentuk roset batang. (d). Bunga: tongkol bunga dengan seludang panjang yang mudah rontok, keluar dari bawah roset daun, panjang sekitar 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap. (e). Biji: biji satu, bentuknya seperti kerucut pendek dengan ujung membulat, pangkal agak datar dengan suatu lekukan dangkal, panjang 15-30 mm, permukaan luar berwarna kecoklatan sampe coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk menyerupai jala dengan warna yang lebih muda. Pada bidang irisan biji

tampak perisperm berwarna coklat tua dengan lipatan tidak beraturan (Chamima, 2012). Pinang memiliki nama daerah seperti pineng, pineung (Aceh), pinang (Gayo), batang mayang (Karo), pining (Toba), batang pinang (Minangkabau), dan jambe (Sunda, Jawa). Tanaman ini berbunga pada awal dan akhir musim hujan dan memiliki masa hidup 25-30 tahun. Biji buah berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk dengan warna yang lebih muda (Chamima, 2012).

#### **2.4.3 Kandungan dan Manfaat**

Pinang (*Areca Catechu*), merupakan salah satu tanaman obat yang banyak dimanfaatkan untuk tujuan komersial karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi dalam berbagai bidang, hanya belum banyak dikelola. Tanaman ini dikatakan sebagai tanaman serbaguna karena mulai dari daun, batang, serabut, dan biji dapat dimanfaatkan. Daun tanaman tersebut, banyak mengandung minyak atsiri, biji buahnya banyak mengandung tanin dan alkaloid sebagai obat dan penyamak pada industri kulit. Serabut buahnya digunakan sebagai obat gangguan pencernaan, sembelit, aderma dan beri- beri. Sedangkan batangnya dapat di gunakan sebagai bahan bangunan, jembatan, saluran air dan sebagainya (Sulastri, 2009).

Pinang memiliki efek antioksidan dan antimutagenik, astringent, dan obat cacing. Biji buah pinang mengandung alkaloid, seperti Arekolin ( $C_8 H_{13} NO_2$ ), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Ekstrak etanolik biji buah pinang mengandung tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, flavan, dan senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin, minyak menguap dan tidak menguap, serta garam (Meiyanto dkk, 2008).

Biji pinang banyak mengandung beberapa komponen senyawa kimia yang sangat penting yaitu: Tanin, alkaloid, lemak, minyak atsiri, air dan sedikit gula. Tanin adalah salah satu senyawa yang terkandung dalam buah pinang yang kadarnya cukup tinggi. Tanin diperoleh dengan cara ekstraksi dengan pelarut air dan etanol karena tanin dapat larut dalam pelarut tersebut. Tanin merupakan senyawa yang sangat penting penggunaannya dalam bidang kesehatan dan bidang industri (Sulastri, 2009). Senyawa saponin, flavonoid, dan tanin dapat bekerja sebagai antimikroba dan merangsang pertumbuhan sel baru pada luka. Senyawa flavonoid mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Hamzah dkk, 2013). Menurut Mappa dkk (2013), tanin dan flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antiseptik dan antibakteri.

#### **2.6. Tikus (*Rattus norvegicus*)**

Tikus (*Rattus sp*) termasuk binatang pengerat yang merugikan dan termasuk hama terhadap tanaman petani. Selain menjadi hama yang merugikan, hewan ini juga membahayakan kehidupan manusia. Sebagai pembawa penyakit yang berbahaya, hewan ini dapat menularkan penyakit seperti wabah pes dan leptospirosis. Hewan ini, hidup bergerombol dalam sebuah lubang. Satu gerombol dapat mencapai 200 ekor. Di alam tikus ini dijumpai di perkebunan kelapa, selokan dan padang rumput. Tikus ini mempunyai indera pembau yang sangat tajam (Akbar, 2010).

Perkembangbiakan tikus sangat luar biasa. Sekali beranak tikus dapat menghasilkan sampai 15 ekor, namun rata-rata 9 ekor. Nama lain hewan ini

diberbagai daerah di Indonesia, antara lain di Minangkabau orang menyebutnya mencit, sedangkan orang Sunda menyebutnya beurit. Tikus yang paling terkenal ialah tikus berwarna coklat, yang menjadi hama pada usaha-usaha pertanian dan pangan yang disimpan di gudang. Tikus albino (tikus putih) banyak digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium.

Adapun klasifikasi tikus putih menurut Akbar (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
 Filum : Chordata  
 Kelas : Mammalia  
 Ordo : Rodentia  
 Subordo : Odontoceti  
 Familia : Muridae  
 Genus : *Rattus*  
 Spesies : *Rattus norvegicus*



**Gambar 2.5.**Tikus (*Rattus norvegicus*)  
 (Sumber : Akbar, 2010)

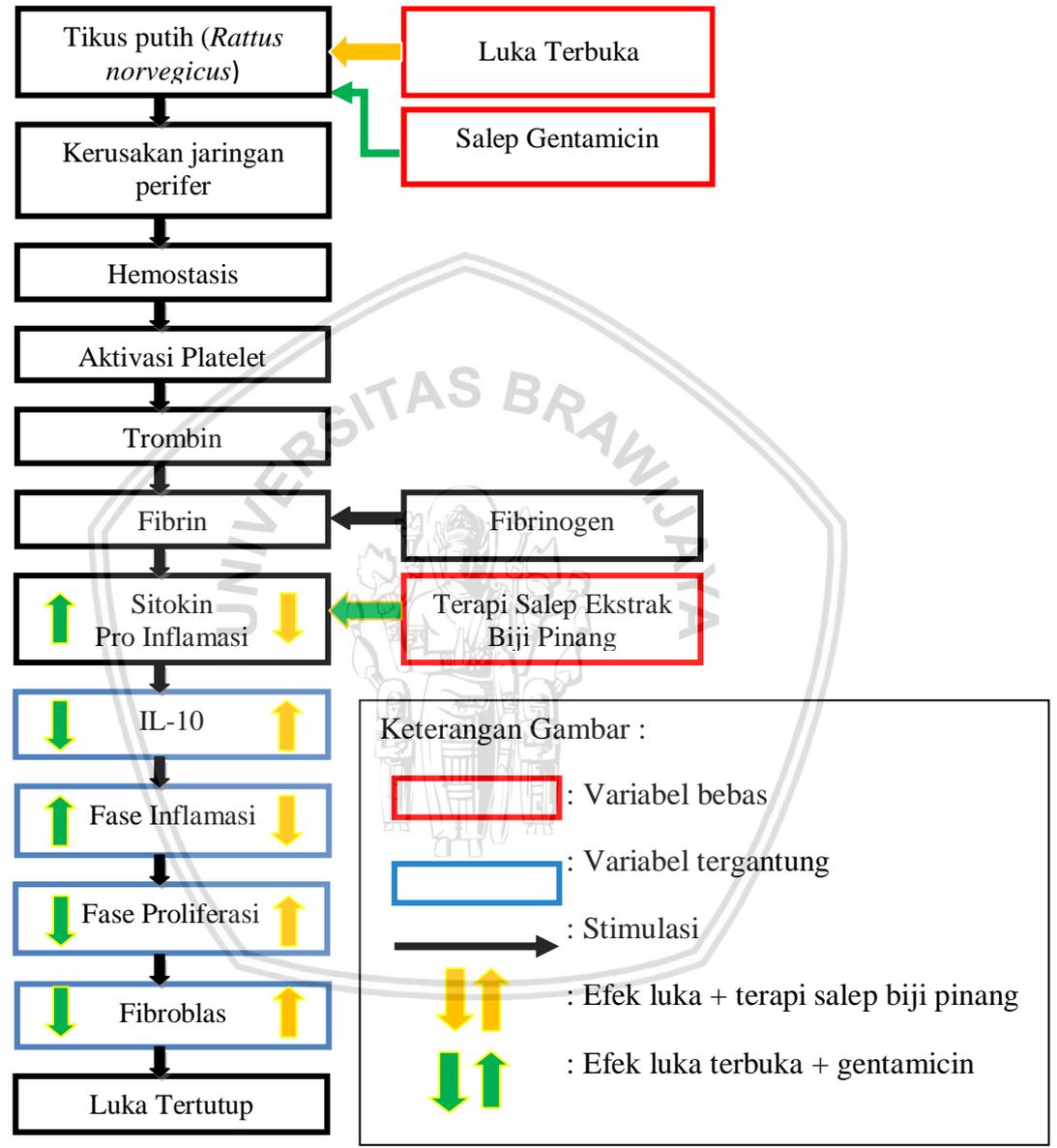
Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih

besar dari mencit, mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhannya cepat, temperamennya baik, kemampuan laktasi tinggi, dan tahan terhadap arsenik tiroksid (Akbar, 2010).



**BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1.** Kerangka Konsep Penelitian.

Luka terbuka pada tikus akan menyebabkan tikus mengalami kerusakan jaringan perifer dan fase inflamasi dimulai. Sesaat setelah terjadi luka, akan terjadi hemostasis dimana platelet akan teraktivasi dan akan menghentikan proses perdarahan. Platelet yang keluar dari pembuluh darah akan mengeluarkan trombokinase. Trombokinase akan mengubah protrombin menjadi trombin dan trombin akan mengubah fibrinogen menjadi benang-benang fibrin. Terbentuknya benang-benang fibrin akan menyebabkan luka menjadi tertutup sehingga darah tidak mengalir keluar. Terjadinya luka juga akan menyebabkan platelet memproduksi beberapa sitokin seperti *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ).

*Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) akan merangsang kemotaksis dari neutrofil, makrofag, dan fibroblas. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) akan menarik makrofag dan memberikan stimulasi untuk mensekresikan sitokin lain, seperti FGF (*Fibroblast Growth Factor*), PDGF, TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) dan IL-1 (*Interleukin-1*). *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) juga merangsang kemotaksis fibroblas serta memodulasi ekspresi kolagen dan kolagenase.

Teraktivasinya sitokin PDGF dan TGF- $\beta$  akan menyebabkan migrasi monosit dari pembuluh darah menuju daerah luka. Jumlah dari neutrofil akan meningkat untuk memfagositosis dan sebagai bentuk pertahanan terhadap mikroba. Monosit akan berubah menjadi makrofag di dalam jaringan dan akan memfagositosis neutrofil yang apoptosis. Jumlah makrofag akan meningkat di sekitar luka 48-72 jam setelah terjadi luka. Makrofag juga akan menghasilkan

beberapa growth factor seperti *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF) untuk merangsang proliferasi dan migrasi dari fibroblas sehingga akan terbentuk jaringan granulasi.

Fase proliferasi dari luka ditandai dengan terbentuknya jaringan granulasi. Proses proliferasi dan migrasi fibroblas menunjukkan luka mulai memasuki fase proliferasi. Fibroblas akan menghasilkan sitokin (IL-6) yang akan menstimulus migrasi dan proliferasi dari keratinosit dan akan memulai proses epitelisasi. Kolagen akan disintesis oleh fibroblas dengan dirangsang oleh *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ). Kolagen akan memberikan kekuatan dan integritas pada luka.

Adanya sitokin juga akan menstimulus terbentuknya *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) memiliki peranan meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel dan membantu pembentukan struktur pembuluh darah (angiogenesis). Sel endotel akan teraktivasi dan berproliferasi yang akan membentuk tunas kapiler yang akan menjadi pembuluh darah baru. Terbentuknya pembuluh darah baru, epitelisasi, dan terbentuknya kolagen menunjukkan luka akan memasuki fase *remodelling*.

Penggunaan salep komersial gentamicin untuk membandingkan terhadap salep ekstrak biji pinang sebagai penyembuhan luka terbuka dengan melihat peningkatan ekspresi area IL-10 dan jumlah sel fibroblas. Salep komersial gentamicin berfungsi sebagai antibiotika. Gentamicin tidak dapat menghambat inflamasi atau meningkatkan proliferasi sel sehingga penyembuhan akan berlangsung lebih lama.

Salep ekstrak biji pinang diberikan pada daerah luka terbuka dengan tujuan sebagai terapi penyembuhan luka. Biji pinang mengandung senyawa tanin dan flavanoid. Adanya kandungan senyawa flavanoid dalam biji pinang, kandungan *catechin* yang merupakan subkelas dari flavonoid pada biji pinang berperan sebagai antiinflamasi, dengan cara menghambat aktivitas *Cyclooxygenase* (COX) sehingga menghambat sekresi mediator inflamasi seperti prostaglandin. Penurunan prostaglandin akan menurunkan inflamasi. Senyawa flavonoid diduga juga dapat memicu peningkatan sitokin antiinflamasi *Interleukin-10* (IL-10) sehingga dapat menghambat atau menekan sekresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-1 dengan mengaktifkan makrofag. Hal ini akan mempercepat fase inflamasi luka dan segera memasuki fase selanjutnya yaitu fase proliferasi.

Pada fase proliferasi akan terlihat peningkatan jumlah sel dan faktor-faktor penyembuhan luka, salah satunya yaitu terjadi proliferasi fibroblas. Proliferasi fibroblas distimulasi oleh *Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Fibroblas akan menghasilkan kolagen yang akan menautkan luka dan akan mempengaruhi proses reepitelisasi yang akan menutup luka. Fibroblas juga akan membentuk jaringan ikat yang baru dan memberikan kekuatan serta integritas pada luka sehingga menghasilkan proses penyembuhan yang baik.

Kandungan polifenol ekstrak biji pinang berfungsi dalam meningkatkan rangsangan untuk pembentukan kolagen. Senyawa alkaloid arekolin dan polifenol dapat mempercepat tahapan epitelisasi sehingga memperkuat jaringan granulasi (Amudhan *et al.*, 2012). Meningkatnya jumlah sel fibroblas akan meningkatkan

jumlah serat kolagen yang akan mempercepat proses penyembuhan luka. Kandungan senyawa tanin dalam biji pinang memiliki efek sebagai astringen yang dapat mengerutkan dan menciutkan jaringan kulit sehingga perdarahan pada luka berhenti dengan cepat dan luka akan lebih cepat mengering.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

1. Salep ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dibandingkan salep gentamicin pada luka terbuka tikus jantan (*Rattus norvegicus*).
2. Salep ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas dibandingkan salep gentamicin pada luka terbuka tikus jantan (*Rattus norvegicus*).

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2016 yang bertempat di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing kelompok lima ulang berdasarkan rumus menurut Kusmaningrum (2008) :

$$(np - 1) - (p - 1) \geq p^2$$

$$(n4 - 1) - (4 - 1) \geq 4^2$$

$$(n4 - 1) - 3 \geq 16$$

$$4n - 1 \geq 16 + 3$$

$$4n - 1 \leq 19$$

$$4n \leq 20$$

$$n \leq 5$$

Keterangan :

p = kelompok hewan percobaan

n = jumlah hewan ulangan

Empat perlakuan yakni K (Gentamicin), P (+) 1, 2, dan 3. K (Gentamicin) merupakan kelompok kontrol sakit yakni tikus hanya diberikan antibiotik gentamicin. P (1) merupakan kelompok kontrol sakit yang diberi perlakuan salep ekstrak biji pinang 2,5 %. P (2) merupakan kelompok kontrol sakit yang diberi perlakuan salep ekstrak biji pinang 5 %. Dan P (3) merupakan kelompok kontrol sakit yang diberi perlakuan salep ekstrak biji pinang 7,5 %.

**Tabel 4.1** Rancangan penelitian

<b>Kelompok Perlakuan</b>	<b>Perlakuan</b>
<b>Salep Gentamicin</b>	Tikus luka terbuka + salep antibiotik gentamicin
<b>Terapi (P1)</b>	Tikus luka terbuka + diterapi salep ekstrak biji pinang 2,5%
<b>Terapi (P2)</b>	Tikus luka terbuka + diterapi salep ekstrak biji pinang 5%
<b>Terapi (P3)</b>	Tikus luka terbuka + diterapi salep ekstrak biji pinang 7,5%

#### 4.3 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, botol minum tikus, spuit 1 cc, pot sampel, scalpel, blade, gunting tajam, gunting tajam tumpul, pinset, timbangan digital, blender, gelas ukur, *rotary evaporator*, shaker digital, *beaker glass*, alkoholmeter, gelas ukur, corong gelas, oven, tabung erlenmeyer, penangas air, mikroskop cahaya, mikropipet 10-100  $\mu\text{L}$  dan 100-1000  $\mu\text{L}$ , *blue tip*, *yellow tip*, *cover glass*, *object glass*, lemari pendingin, inkubator, plastik klip, mikrotom, pot organ, glukometer digital, dan cawan petri.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 150-200 gram dengan umur 8-12 minggu, salep gentamisin, *normal saline* (NS), NaCl fisiologis, ketamin, herbal biji pinang,

makanan pellet, kertas saring, strip gula darah, akuades, vaselin album, formalin 10%, alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 100%, larutan xylol, larutan fenol 4%, etanol 96%, parafin cair, etanol absolut, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, aquades steril, PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Blocking Buffer, antibodi primer, antibodi sekunder (Biotin Conjugate), SA-HRP, DAB, Mayer's Hematoxilen dan entellan.

#### **4.4 Tahapan Penelitian**

1. Persiapan hewan coba.
2. Pembuatan ekstrak biji pinang
3. Pembuatan salep ekstrak biji pinang
4. Perlakuan luka terbuka pada hewan coba.
5. Terapi salep ekstrak biji pinang
6. Pengambilan preparat kulit.
7. Ekspresi IL-10 dengan metode Imunohistokimia
8. Pewarnaan preparat histopatologi kulit dengan pewarna HE
9. Analisis data

#### **4.5 Prosedur Kerja**

##### **4.5.1 Persiapan Hewan Coba**

Pada percobaan ini terdapat 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sehat dengan berat  $\pm$  150-200 gram berumur 8-12 minggu. Tikus putih diadaptasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan basal pada semua tikus. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dengan setiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus.

Kandang tikus berukuran 17,5x 23,75 x 17,5. Kandang terbuat dari bahan plastik dengan tutup terbuat dari rangka kawat. Kandang tikus putih berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk mencit adalah 22-24°C dan memiliki kelembapan udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

#### 4.5.2 Pembuatan Ekstrak Biji Pinang

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu L.*) yang diambil dari Laboratorium Materia Medika, Batu, Jawa Timur. Buah pinang yang telah dikumpulkan, dikupas kulit buahnya dan bijinya ditimbang sebagai berat basah, disortasi basah kemudian dicuci dengan air bersih, ditiriskan dan dirajang untuk memperluas permukaan biji, kemudian dikeringkan dalam suhu ruangan selama 1 minggu. Berat biji pinang mengalami penurunan dari 700 gram menjadi 500 gram. Selengkapnya pembuatan ekstrak biji pinang dapat dilihat di **Lampiran 3**.

Pembuatan ekstrak biji pinang dapat dilakukan dengan cara menimbang serbuk biji pinang sebanyak 500 gram dan kemudian dilakukan pembasahan dengan pelarut etanol 96% secukupnya. Serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut kemudian dimasukkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam. Untuk serbuk sebanyak 500 gram ditambahkan pelarut sebanyak 1.000 mL. Toples ditutup dengan rapat selama 24 jam. Setelah 24 jam, dishaker di atas shaker dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak cair kemudian disaring dengan kain dan ditampung di tabung *erlenmeyer*. Hasil ekstrak kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Waktu yang

dibutuhkan sekitar satu jam 30 menit untuk proses evaporasi dan didapatkan 10 gram ekstrak.

#### 4.5.3 Pembuatan Salep Ekstrak Biji Pinang

Salep adalah sediaan setengah padat yang mudah dioleskan dan digunakan sebagai obat luar. Salep dipilih sebagai bentuk sediaan karena stabilitasnya baik, berupa sediaan halus, mudah digunakan, mampu menjaga kelembapan kulit, tidak mengiritasi kulit dan mempunyai tampilan yang lebih menarik. Salep terdiri dari bahan obat yang terlarut ataupun terdispersi di dalam basis atau basis salep sebagai pembawa zat aktif. Basis salep yang digunakan dalam sebuah formulasi obat harus bersifat inert dengan kata lain tidak merusak ataupun mengurangi efek terapi dari obat yang dikandungnya. Salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi dibandingkan dengan basis salep lainnya (Naibaho, 2013).

Pada penelitian ini akan dibuat salep biji pinang dimana biji pinang telah dijadikan pasta dengan konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5% masing-masing sebanyak  $\pm 10$  gram. Berat ini disesuaikan dengan perhitungan penggunaan salep setiap kali pemberian membutuhkan  $\pm 50$  mg untuk kelompok terapi selama 4 hari dilakukan terapi. Salep dengan konsentrasi 2,5% didapatkan ekstrak sebanyak 0,25 gram dan dibutuhkan vaselin albumin sebanyak 9,75 gram dari  $\pm 10$  gram salep ekstrak biji pinang. Salep dengan konsentrasi 5% didapatkan ekstrak sebanyak 0,5 gram sedangkan salep dengan konsentrasi 7,5% didapatkan ekstrak sebanyak 0,75 gram. Perhitungan pembuatan konsentrasi salep dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Bahan dasar salep yang akan digunakan adalah senyawa hidrokarbon dengan tujuan untuk melunakkan kulit, dan untuk pelindung atau pengobatan pada permukaan kulit. Salah satu senyawa hidrokarbon yang digunakan sebagai bahan dasar salep yaitu vaselin (Anggraeni, 2008). Masing-masing bahan kemudian ditimbang untuk membuat salep biji pinang dengan konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5%. Basis salep dan ekstrak biji pinang yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik dan dicampur hingga rata dengan bantuan spatula. Sediaan salep kemudian disimpan di dalam wadah plastik tertutup rapat, terhindar dari sinar matahari, dan disimpan di tempat yang kering.

#### **4.5.4 Pembuatan Luka Terbuka pada Hewan Coba**

Hewan coba yang akan diberikan perlakuan dianestesi terlebih dahulu. Pembuatan luka terbuka dilakukan di daerah punggung dengan ukuran  $\pm 1 \times 1$  cm. Pembuatan luka terbuka dilakukan hanya sampai lapisan subkutan sehingga tidak menembus muskulus. Kemudian diberikan salep ekstrak biji pinang dan ditutup dengan hypafix.

#### **4.5.5 Terapi Salep Ekstrak Biji Pinang dan Salep Gentamicin**

Terapi salep ekstrak biji pinang dan salep gentamicin dilakukan dua kali sehari dengan cara mengoleskan salep di area luka terbuka selama 4 hari  $\pm 50$  mg setiap kali pemberian. Pemberian salep dioleskan tipis sampai merata pada area luka terbuka.

#### **4.5.6 Pengambilan Preparat Kulit**

Pengambilan sampel kulit pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-4. Langkah awal yang dilakukan yaitu euthanasi dengan

cara dislokasi leher, hewan coba diposisikan secara rebah dorsal, sehingga bagian punggung terletak dibagian dorsal untuk mempermudah pengambilan sampel. Bagian kulit tempat insisi diisolasi dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%. Kulit dipotong menjadi dua bagian lalu masing-masing bagian dimasukkan dalam pot yang berisi larutan formalin 10% untuk selanjutnya dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoksin eosin (HE) dan Imunohistokimia IL-10.

Kulit direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam. Setelah dilakukan perendaman, kulit dikeluarkan dari larutan fiksatif lalu dicuci sebentar dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fenol 4% dalam akuades selama 1-3 hari. Tahap selanjutnya yaitu dehidrasi, yakni merendam jaringan kulit ke dalam larutan alkohol secara bertahap, yaitu alkohol 70%, alkohol 80% dan alkohol 90% masing masing selama 1 hari. Kulit kemudian direndam dengan alkohol 100% selama 2 hari yang diganti setiap harinya. Kulit yang sudah melalui tahap dehidrasi direndam ke dalam cairan xylol I selama 15 menit dan xylol II selama 15 menit. Agar jaringan kulit mudah dipotong, maka jaringan harus dipadatkan menggunakan parafin. Kulit dibenam ke dalam parafin/paraplast I selama 2 jam, kemudian dipindahkan ke dalam parafin/paraplast II selama 1 jam dan kemudian ke dalam parafin/paraplast III selama 2 jam. Tahap selanjutnya adalah *bloking* yaitu *histoplate* diletakkan di atas piringan logam. Cairan parafin dituangkan sedikit ke dalam cetakan tersebut dan secepatnya jaringan dimasukkan ke dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituangkan kembali hingga menutupi cetakan tersebut.

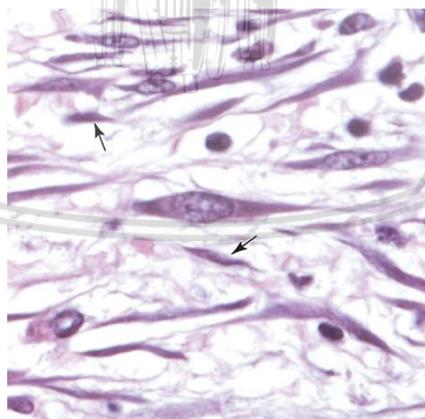
Tahap pemotongan jaringan dilakukan dengan menggunakan mikrotom. Pisau pada mikrotom diletakkan pada sudut tertentu. Blok parafin yang akan dipotong direkatkan pada holder dengan menggunakan spatula. Blok preparat kemudian diletakkan pada tempatnya di mikrotom dan diatur jarak preparat ke arah pisau sedekat mungkin. Ketebalan irisan  $\pm 5 \mu\text{m}$ . Rotor mikrotom kemudian diputar secara ritmis. Pita-pita parafin awal yang tanpa jaringan dibuang dan setelah potongan mengenai jaringan, jaringan dipindahkan secara hati-hati dengan sengkeli ke atas air di dalam waterbath yang diatur pada suhu  $55^{\circ}\text{C}$ , tujuannya agar lembaran/pita parafin berkembang dengan baik. Setelah pita parafin berkembang dengan baik, parafin ditempelkan di kaca objek yang telah diolesi albumin. Kaca objek kemudian disimpan selama 12 jam agar benar-benar kering (Setiabudi, 2005).

#### **4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)**

Pewarnaan HE dilakukan dengan cara meletakkan preparat yang akan diwarnai pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan. Larutan tersebut antara lain : xylol (3 menit) sebanyak dua kali, etanol absolut (3 menit) sebanyak dua kali, etanol 90% (3 menit), etanol 80% (menit), kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya ditetaskan larutan hematoksilin 6-7 menit, bilas dengan air (1 menit). Lalu ditetaskan larutan pembiru (1 menit) dan dibilas dengan air keran (1 menit). Kemudian dicelupkan ke dalam etanol 80% sebanyak 10 celupan, dan dilanjutkan ke dalam etanol 90% sebanyak 10 celupan, dan etanol absolut sebanyak 10 celupan, kemudian direndam dalam xylol sebanyak 3x3

menit. Kemudian preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan pereat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dilihat dibawah mikroskop.

Pengamatan preparat histopatologi sel fibroblas pada daerah luka menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x10. Perhitungan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang. Sel fibroblas dihitung dengan menggunakan *software ImageRaster*. Morfologi fibroblas adalah sel besar, gepeng, bercabang-cabang, dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform. Cabang-cabangnya berbentuk langsing. Pada jaringan ikat yang direntangkan inti fibroblas tampak pucat; pada sajian irisan, fibroblas terlihat mengkerut dan terpulas gelap dengan pewarnaan basa. Inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti jelas, dan sedikit granula kromatin halus.



**Gambar 4.1** Sel Fibroblas (Junqueira, 2012)

#### **4.5.7 Pewarnaan Imunohistokimia (IHK) Ekspresi IL-10**

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat pada xilol 1, xilol 2, dan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%).

Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit selanjutnya ditetesi dengan 3%  $H_2O_2$  selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Kemudian, slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selama 1 jam pada suhu ruang.

Preparat ditetesi dengan antibodi sekunder (Biotin Conjugate), diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS 3x5 menit. Selanjutnya slide preparat ditetesi dengan Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan *Diamano Benzidine* (DAB) yang dicampur dengan substrat selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya counterstaining menggunakan Mayer Hematoxylen selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Terakhir, slide di mounting dengan entellan dan ditutup dengan cover glass.

Pengamatan ekspresi IL-10 dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x dengan delapan bidang pandang pengamatan. Setelah itu hasil pengamatan difoto. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan *software ImmunoRatio* untuk mengamati persentase area.

#### 4.5.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisis kuantitatif statistik untuk ekspresi IL-10 dan jumlah sel fibroblas dengan uji *One Way ANOVA* ( $\alpha=5\%$ ) untuk mengetahui apakah terapi yang diberikan memberikan pengaruh terhadap parameter yang diamati dan dilakukan uji lanjutan dengan uji *Tukey*  $\alpha = 0,05$ .



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini mengamati peningkatan kadar ekspresi IL-10 dan jumlah sel fibroblas pada luka terbuka yang diberikan terapi dengan salep ekstrak biji pinang (*Areca catechu*). Metode pemeriksaan dari ekspresi kadar IL-10 menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Penggunaan teknik imunohistokimia yang ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna coklat pada bagian sitoplasma sel endotel. Adanya warna coklat tersebut menunjukkan bahwa adanya interaksi antara IL-10 pada jaringan kulit terhadap antibodi yang di tambahkan (antibodi primer *rat anti IL-10* dan atibodi sekunder *rabbit anti rat IgG biotin labeled*). Pemberian antibodi sekunder diikuti dengan penambahan enzim berupa SA-HRP (*Strepta Avidin Horseradish Peroxidase*) dan substratnya berupa kromogen DAB. Kromogen DAB tersebut merupakan substrat dari peroksidase yang dapat menghasilkan warna coklat, sehingga akan terbentuk yang yang lebih jelas pada jaringan (Elias *et al.*, 1989).

Identifikasi jumlah sel fibroblas dengan preparat kulit menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE) untuk mengetahui distribusi sel fibroblas pada luka tikus putih. Inti sel dari jaringan akan berwarna biru akibat adanya ikatan antara *hematoxylin* bermuatan positif dengan asam nukleat DNA (*Deoxyribose Nuclec Acid*) yang bermuatan negatif. Pewarna eosin akan berikatan dengan sitoplasma dan matriks sel yang mengakibatkan warna merah pada bagian tersebut (Junquiera L.C, 1999). Penghitungan jumlah sel fibroblas menggunakan aplikasi *Image Raster 3*, untuk dapat dikonfirmasi secara statistik mengenai adanya peningkatan ataupun penurunan jumlah sel fibroblas terhadap variabel bebas

jumlah konsentrasi salep ekstrak biji pinang yang dijadikan terapi pada luka terbuka tikus jantan.

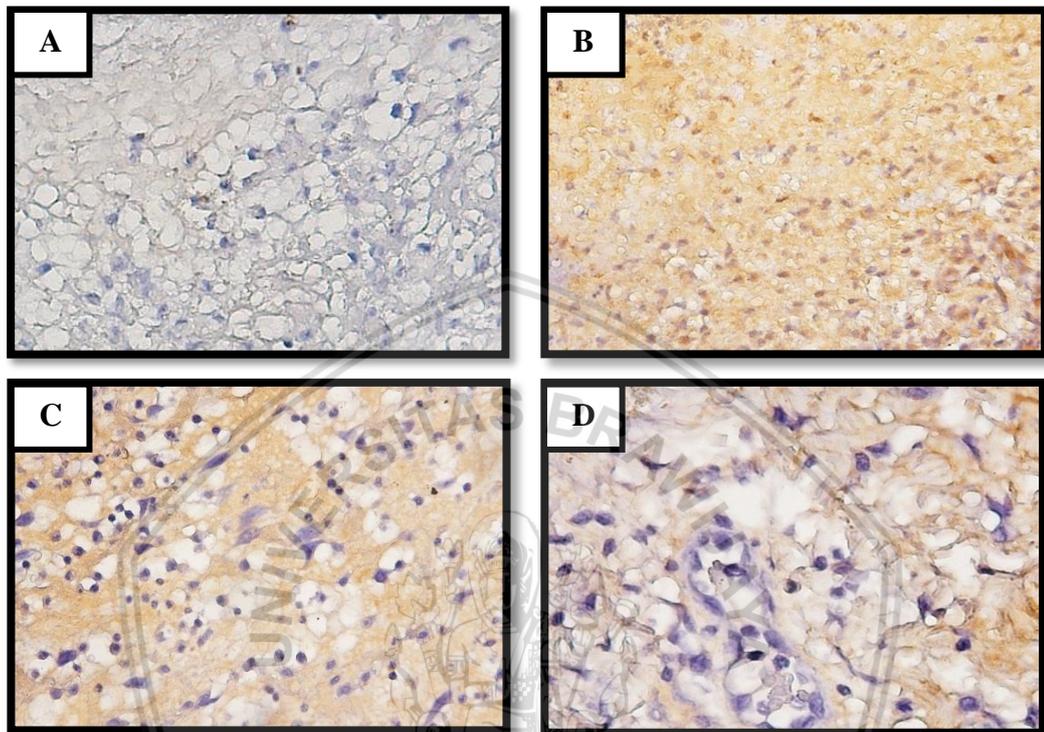
### **5.1 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) terhadap Ekspresi IL-10 pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)**

Penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks dan dinamis untuk mengembalikan struktur sel dan lapisan jaringan. Penyembuhan luka bukanlah proses linear yang sederhana dimana faktor-faktor pertumbuhan secara simultan mencetuskan pertumbuhan sel tetapi merupakan suatu integrasi dari proses interaktif yang dinamik, melibatkan banyak sel, matrik ekstraseluler dan mediator-mediator terlarut. Terjadinya proses penyembuhan luka tidak terlepas dari peran faktor pertumbuhan dan sitokin, salah satunya yaitu *Interleukin-10* (IL-10). IL-10 adalah salah satu sitokin anti inflamasi yang berfungsi menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain atau sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, chemokine, dan IL-12 sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

#### **5.1.1 Hasil Ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) Hari Keempat pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca Catechu*)**

Pada penelitian ini, pengaruh pemberian salep ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap ekspresi *Interleukin-10* (IL-10) pada hari keempat diamati menggunakan metode *Imunohistokimia* (IHK). Hasil ditunjukkan dengan munculnya bercak berwarna coklat pada preparat histopatologi. Munculnya

bercak berwarna coklat menunjukkan adanya interaksi antara IL-10 pada jaringan kulit dengan antibodi IL-10 (**Gambar 5.1**)



**Gambar 5.1** Ekspresi IL-10 jaringan dermis kulit tikus dengan pewarnaan imunohistokimia (perbesaran 400x) pada hari keempat.  
Keterangan : (A) Salep gentamicin ; (B) terapi salep ekstrak biji pinang 2,5%; (C) terapi salep ekstrak biji pinang 5%; (D) terapi salep ekstrak biji pinang 7,5%.

Pengukuran persentase area ekspresi IL-10 dilakukan dengan menggunakan *software ImmunoRatio* dan didapatkan jumlah rata-rata terhadap ekspresi IL-10 pada Tabel 5.1. Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik dengan menggunakan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji lanjutan Beda Nyata Jujur dengan  $\alpha=5\%$  dengan hasil uji statistik pada **Lampiran 8**.

**Tabel 5.1** Rata-rata Ekspresi IL-10 hari keempat pada kulit tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Rata-rata Ekspresi IL-10 (Luas area) (%) (Rata-rata $\pm$ SD)	Peningkatan terhadap kelompok kontrol (Salep Gentamicin)%
Salep Gentamicin	50,92 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	-
P1 (Salep 2,5%)	74,11 $\pm$ 6,49 <sup>c</sup>	45,5
P2 (Salep 5%)	60,18 $\pm$ 6,06 <sup>b</sup>	18,1
P3 (Salep 7,5%)	54,72 $\pm$ 3,10 <sup>a</sup>	7,4

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

Terapi luka terbuka dengan memberikan salep ekstrak biji pinang pada kulit tikus jantan (*Rattus norvegicus*) mampu mempengaruhi ekspresi IL-10 secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Hasil statistika menunjukkan kadar IL-10 pada kelompok kontrol (Salep Gentamicin) memiliki rata-rata 50,92  $\pm$ 1,44<sup>a</sup> yang digunakan sebagai pembanding terhadap kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1 memiliki rata-rata 74,11 dan kelompok perlakuan 2 dengan rata-rata 60,18 sehingga terjadi perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol salep gentamicin. Pada kelompok perlakuan 3 memiliki rata-rata 54,72 dan tidak berbeda nyata terhadap kelompok kontrol salep gentamicin.

Pada kelompok salep gentamicin memiliki rata-rata paling rendah yaitu 50,92. Hal ini membuktikan bahwa salep komersial gentamicin tidak memiliki efek antiinflamasi namun hanya sebagai antibiotik saja sehingga inflamasi pada kelompok kontrol salep gentamicin masih tinggi. Kandungan salep gentamicin dapat dilihat di **Lampiran 8**. Mekanisme kerja gentamicin adalah dengan menghambat sintesis protein bakteri. Hal ini antibiotik gentamicin terikat secara ireversibel pada sub unit ribosom 30S dari yang akan mengakibatkan kode

genetika pada mRNA tidak terbaca dengan baik sehingga tidak terbentuk sub unit 70 S, akibatnya biosintesis protein bakteri dikacaukan (Tjay dan Rahardja, 2007).

Kelompok perlakuan 1 mengalami peningkatan kadar IL-10 yang signifikan dengan rata-rata melebihi dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yang diterapi dengan salep gentamisin. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh kandungan senyawa flavonoid *catechin* sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat aktivitas *Cyclooxygenase* (COX) sehingga menghambat sekresi mediator inflamasi seperti prostaglandin. Penurunan prostaglandin akan menurunkan peradangan atau inflamasi. Senyawa flavonoid diduga juga dapat memicu peningkatan sitokin antiinflamasi *Interleukin-10* (IL-10) sehingga dapat menghambat atau menekan sekresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-1 dengan mengaktifkan makrofag. Hal ini akan mempercepat fase inflamasi luka (Rofi, 2006).

Kelompok perlakuan 2 dengan terapi salep konsentrasi 5% juga menunjukkan peningkatan kadar IL-10 yang signifikan dengan melebihi rata-rata pada kelompok kontrol dengan salep gentamicin. Hal ini juga menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dalam biji pinang dapat meningkatkan kadar IL-10 sehingga dapat menekan dan menghambat sekresi mediator sitokin proinflamasi (IL-1, TNF- $\alpha$ ) oleh makrofag. Oleh karena itu fase inflamasi akan berlangsung lebih cepat. Namun jika dibandingkan nilai rata-rata perlakuan 2 dengan nilai rata-rata perlakuan 1 maka lebih tinggi perlakuan 1 sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan 1 dengan salep biji pinang konsentrasi 2,5% merupakan dosis efektif

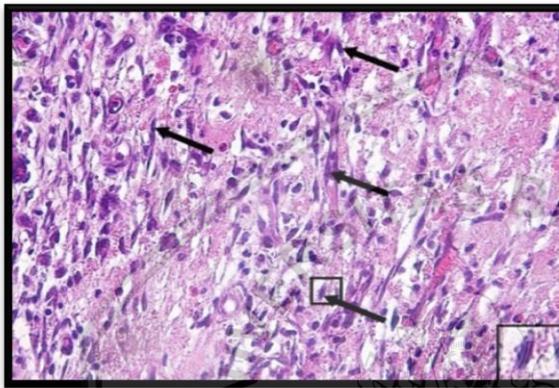
karena dapat meningkatkan kadar IL-10 sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Pada kelompok perlakuan 3 mengalami penurunan kadar IL-10 terhadap perlakuan 1 dan 2, serta tidak berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol dengan salep gentamicin. Hal ini kemungkinan IL-10 belum bisa menekan dan menghambat sekresi mediator proinflamasi secara baik sehingga fase inflamasi berlangsung lama, hal ini dapat disebabkan karena beberapa faktor. Salah satunya karena tingginya konsentrasi dosis dari salep yang diberikan untuk terapi yang menyebabkan kelebihan oksidasi (*pro oksidan*) dan di dalam pro oksidan terdapat OH yang bisa menyebabkan kerusakan sel yang berujung pada kematian sel, sehingga proses kesembuhan luka menjadi terhambat (Mayes, 2003). Pada dosis antioksidan yang diberikan dapat mempengaruhi pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivasi antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa laju oksidasi dipengaruhi oleh adanya konsentrasi antioksidan yang ditambahkan (Imam,2006).

Salep ekstrak biji pinang memiliki kandungan flavonoid *arecoline* sebagai antiinflamasi pada luka, sehingga dapat menurunkan mediator inflamasi dan proses penyembuhan luka segera memasuki fase proliferasi. Selain itu adanya sifat antioksidan yang terdapat pada biji pinang dapat mencegah kerusakan endotel yang menyebabkan hipoksia. Karena adanya aktivasi dari sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10 yang berfungsi untuk mempercepat fase inflamasi sehingga

dapat segera memasuki fase proliferasi dari limfosit B, serta menghambat aktivasi dari sitokin proinflamasi sebagai proses penyembuhan luka lebih cepat memasuki fase proliferasi.

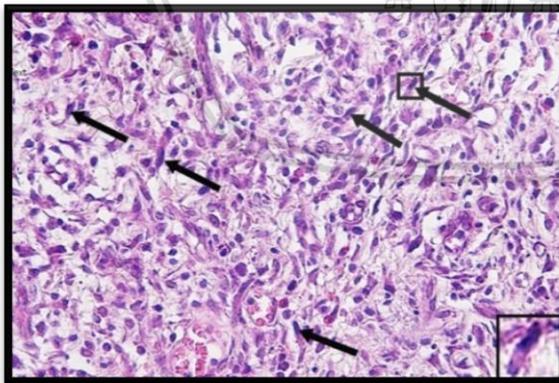
## 5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Luka Terbuka Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)



**Gambar 5.3.** Kontrol Salep Gentamicin

Keterangan : Gambaran histopatologi infiltrasi sel fibroblas kesembuhan luka terbuka pada jaringan kulit tikus jantan dengan pewarnaan *hematoksilin eosin*. Perbesaran 400x.

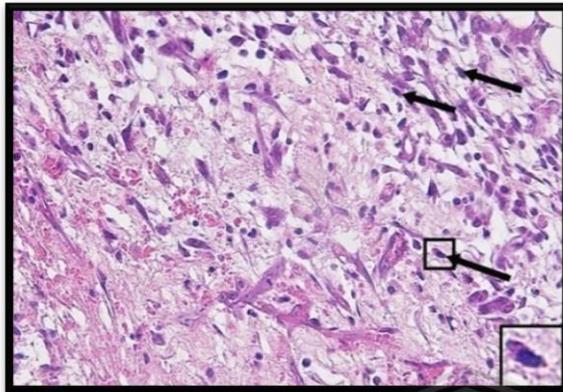
(↑) sel fibroblas.



**Gambar 5.4.** Perlakuan 1 (Salep ekstrak biji pinang 2,5%)

Keterangan : Gambaran histopatologi infiltrasi sel fibroblas kesembuhan luka terbuka pada jaringan kulit tikus jantan dengan pewarnaan *hematoksilin eosin*. Perbesaran 400x.

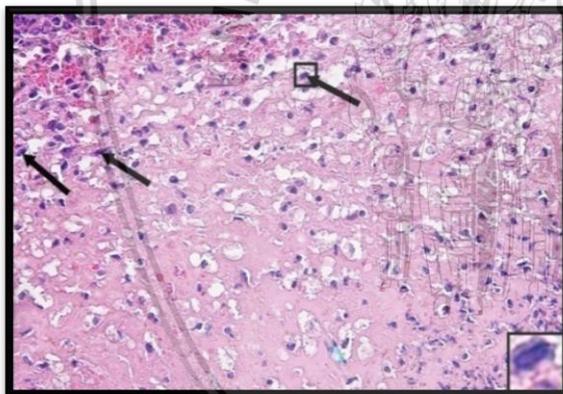
(↑) sel fibroblas.



**Gambar 5.5.** Perlakuan 2 (Salep ekstrak biji pinang 5%)

Keterangan : Gambaran histopatologi infiltrasi sel fibroblas kesembuhan luka terbuka pada jaringan kulit tikus jantan dengan pewarnaan *hematoksilin eosin*. Perbesaran 400x.

( ↑ ) sel fibroblas.



**Gambar 5.6.** Perlakuan 3 (Salep ekstrak biji pinang 7,5%)

Keterangan : Gambaran histopatologi infiltrasi sel fibroblas kesembuhan luka terbuka pada jaringan kulit tikus jantan dengan pewarnaan *hematoksilin eosin*. Perbesaran 400x.

( ↑ ) sel fibroblas.

Perhitungan jumlah sel fibroblas diamati menggunakan Optilab® perbesaran 400x dengan program *ImageRaster 3* dengan 5 lapang pandang dan didapatkan rata-rata jumlah sel fibroblas. Setelah rata-rata gambaran histologi fibroblas pada jaringan kulit setiap kelompok didapatkan, selanjutnya dilakukan uji statistika diantaranya adalah uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way* ANOVA serta uji lanjutan *Tukey*.

Hasil uji normalitas dan homogenitas nilai sel fibroblas pada semua kelompok perlakuan menunjukkan bahwa semua data tersebut terdistribusi normal dan data berasal dari kelompok-kelompok yang homogen (lambiran 6), sehingga dapat di lanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA. Uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan menggunakan salep ekstrak biji pinang pada luka terbuka memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap jumlah sel fibroblas (Lampiran 9) dengan pewarnaan HE. Fibroblas ditandai dengan sitoplasma berbentuk elips berwarna kemerahan. Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kesalahan  $\alpha = 5\%$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang diberikan. Hasil jumlah sel fibroblas pada tikus kontrol positif, salep ekstrak biji pinang 2,5%, salep ekstrak biji pinang 5% dan salep ekstrak biji pinang 7,5% disajikan dalam Tabel 5.2 sebagai berikut :

**Tabel 5.2** Pengaruh Salep Ekstrak Biji Pinang pada Luka Terbuka Terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Hari Keempat

Kelompok	Jumlah Fibroblas Rata-rata (sel) $\pm$ SD	Peningkatan terhadap kontrol (Salep Gentamicin)%	Penurunan terhadap kontrol (Salep Gentamicin)%
K (Gentamicin)	15,60 $\pm$ 3,43 <sup>b</sup>	-	-
P1 (Salep 2,5%)	25,20 $\pm$ 2,28 <sup>c</sup>	61,5	-
P2 (Salep 5%)	9,60 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	-	38,4
P3 (Salep 7,5%)	5,40 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	-	65,3

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

Kelompok kontrol salep gentamicin memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok P1, P2, dan perlakuan P3. Kelompok P1 berbeda nyata terhadap kelompok kontrol salep gentamicin, P2 dan P3. Sedangkan P2 tidak berbeda nyata terhadap P3 dan berbeda nyata terhadap kelompok kontrol salep gentamicin dan P1.

Pada kelompok kontrol salep gentamicin memiliki rata-rata jumlah sel fibroblas yaitu sebesar 15,60  $\pm$  3,43 sehingga kelompok kontrol salep gentamicin dijadikan sebagai pembanding terhadap kelompok perlakuan. Kelompok kontrol salep gentamicin menunjukkan sekresi sel fibroblas yang masih rendah. Hal ini karena kandungan dalam salep gentamicin tidak dapat menstimulasi proliferasi fibroblas. Namun hanya berfungsi sebagai antibiotik saja. Kandungan salep gentamicin dapat dilihat di **Lampiran 8**.

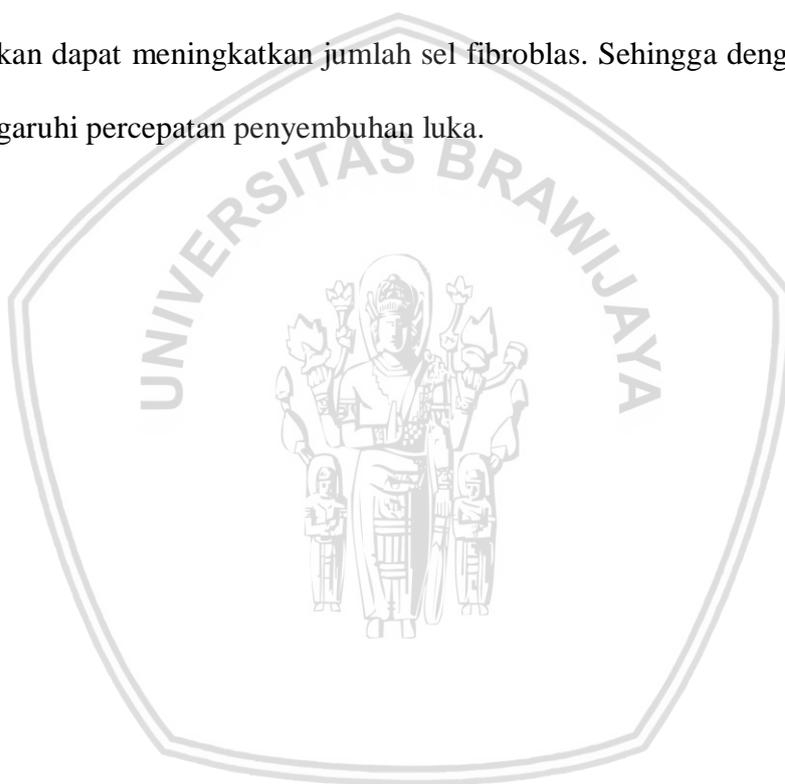
Kelompok P1 memiliki rata-rata jumlah fibroblas sebesar 25,20  $\pm$  2,28 dan terjadi peningkatan jumlah sel fibroblas dibandingkan kelompok kontrol. Adanya

peningkatan jumlah fibroblas pada P1 dengan pemberian salep ekstrak biji pinang 2,5% dipengaruhi oleh kandungan senyawa flavonoid dalam biji pinang. Senyawa flavonoid berperan mengaktifkan makrofag (Aurelia, 2006). Peningkatan aktivasi makrofag akan meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) karena TGF-β diproduksi oleh semua sel, terutama platelet, neutrofil, dan makrofag (monosit). Migrasi dan proliferasi fibroblas terutama dipacu oleh *transforming growth factor-β* (TGF-β), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Peningkatan TGF-β akan meningkatkan proliferasi fibroblas yang pada akhirnya akan meningkatkan jumlah sel fibroblas (Taqwim, 2011). Meningkatnya jumlah sel fibroblas akan meningkatkan jumlah serat kolagen yang akan mempercepat proses penyembuhan luka.

Kelompok P2 dan kelompok P3 memiliki nilai rata-rata jumlah sel fibroblas sebesar ( $9,60 \pm 1,81$ ;  $5,40 \pm 1,67$ ) atau mengalami penurunan jumlah sel fibroblas dibanding kelompok kontrol salep gentamicin. Kelompok P2 dan P3 merupakan dosis toksik pada penelitian ini karena jumlah fibroblas lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol salep gentamicin, hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satunya karena tingginya konsentrasi dosis dari salep yang diberikan untuk terapi yang menyebabkan kelebihan oksidasi (*pro oksidan*) dan di dalam pro oksidan terdapat OH yang bisa menyebabkan kerusakan sel yang berujung pada kematian sel, sehingga proses kesembuhan luka menjadi terhambat (Mayes, 2003). Pada dosis antioksidan yang diberikan dapat mempengaruhi pada laju

oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivasi antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa laju oksidasi dipengaruhi oleh adanya konsentrasi antioksidan yang ditambahkan (Imam,2006).

Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian salep ekstrak biji pinang konsentrasi 2,5% merupakan dosis efektif dalam penelitian ini. Hal ini dikarenakan dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas. Sehingga dengan demikian mempengaruhi percepatan penyembuhan luka.



## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwan :

1. Terapi salep ekstrak biji pinang konsentrasi 2,5% merupakan dosis paling efektif untuk meningkatkan kadar IL-10 dibandingkan salep komersial gentamicin pada luka terbuka.
2. Terapi salep ekstrak biji pinang dengan konsentrasi 2,5% merupakan dosis paling efektif untuk meningkatkan jumlah sel fibroblas dibandingkan salep komersial gentamicin pada luka terbuka.

### 6.2 Saran

Terapi salep ekstrak biji pinang perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan frekuensi pemberian yang berbeda. Agar mendapatkan dosis optimal untuk meningkatkan IL-10 dan jumlah sel fibroblas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., and A.H. Licthman. 2005. *Immunity To Tumours In : Cellular and Molecular Immunology*. WB Saunders Co. 5th Edition. Philladelphia. p.391-410
- Akbar B, 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Edisi 1-7. Adabia Press Jakarta.
- Anggraeni, C.A. 2008. *Pengaruh Bentuk Sediaan Krim, Gel, Dan Salep Terhadap Penetrasi Aminofilin Sebagai Antiselulit Secara In Vitro Menggunakan Sel Difusi Franz*[Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Aprillia, F., dan S. Tahoma. 2013.*Uji Aktivitas Stimulan Sistem Syaraf Pusat Ekstrak Biji Pinang (Areca Catechu L.) Terhadap Mencit Putih (Mus Musculus L.) Dan Penentuan ED50 Yang Diberikan Secara Oral*. Prosiding Seminar Nasional Matematika, Sains, dan Teknologi Vol 4 : 51-58.
- Arundhina, E., C.J. Soegihardjo, dan B.B. R. Sidharta. 2014. *Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Alamanda (Allamanda cathartica L.) Sebagai Antijamur Terhadap Candida albicans dan Pityrosporum ovale Secara In Vitro* [Skripsi]. Fakultas Teknobiologi Atma Jaya Yogyakarta.
- Asmussen, P.D., B. Sollner. 2000. *Wound Care. Wound Management Principles and Practice*. Hamburg: Beiersdorf medical Bibliothek, pp. 9-14.
- Bakkara, C. 2012. *Pengaruh Perawatan Luka Bersih*. <http://repository.usu.ac.id>. Chapter 20, II. Diakses tanggal 14 Agustus 2016.
- Banaroski, A., E.A. Ayello. 2004. *Skin : An essential organ*. In (Banaroski S, Ayello EA, ed). *Wound Care Essentials Practise Principles*. Philadelphia : Lippencott Williams & Wilkins, pp. 47-60.
- Chamima, A.R. 2012. *Inhibisi Ekstrak Biji Pinang ( Areca Catechu L.) Terhadap Pelepasan Ion Fosfor Pada Proses Demineralisasi Gigi Yang Distimulasi Streptococcus Mutans* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember
- Cotran RS, V.Kumar, T. Collins. 1999. *Pathology basic of disease. 6th ed*. Philadelphia : WB Saunders Co : p21-201.
- Fine, A.M. 2000. Oligomeric Proanthocyanidine Complex, History, Structure and Phytopharmaceutical Application. *Altern Med Rev*.5 (2) : 144-151.

- Junquiera LC, J. Carneiro. 2005. *Basic Histology 11th ed.* USA: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Junqueira AI, Mesher. 2012. *Histologi Dasar Junqueira 12th ed.* Penerbit Buku Kedokteran. EGC
- Juwita, Harlystiarini, T. Widyaputri, A. Effendi, E.M Kaiin, Nurhidayat. 2010. *Tingkat pertumbuhan dan analisa protein sel-sel fibroblas fetal tikus hasil kultur in vitro.* Diunduh dari: *journal.ipb.ac.id. Home. Vol 1. No 2*
- Kresno SB, 2001. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium.* FKUI 2001; ed.4: p7-12.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mast AB. 2000. *Normal wound healing.* In : Achauer BM, Eriksson E, eds. *Plastic Surgery, Indications, Operations and Outcomes.* Mosby : Mosby Inc : p37- 53
- Meiyanto, E., A.S. Ratna, H. Sri, R. Fitria. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu L.*) Mampu Menghambat Proliferasi Dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia* 19 (1): 12-19
- Perdanakusuma, D.S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka.* Surabaya. 1-8
- Petrolani M, Stordeur P, Goldman M .2003. *Interleukin-10 in The Cytokine network And Immune Functions* by Theze. J. Oxford University Press, New York, p. 45-50
- Potter and Perry. 2006. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan Edisi 4.* Jakarta: EGC
- Putra ATW, W. Ade & M.Y. Hamidy. 2013. *Tingkat Kepadatan Fibroblas Pada Luka Sayat Mencit Dengan Pemberian Gel Lidah Buaya.* Nasional Fakultas Kedokteran Universitas Riau.
- Putri, S.S. 2012. *Potensi perasan daun pepaya (carica papaya l.) terhadap jumlah sel fibroblas pasca gingivektomi pada tikus wistar jantan.* Skripsi S1. Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Rairisti, A. 2014. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang (Areca Catechu L.) Terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan Galur Wistar.* Skripsi. Universitas Tanjungpura.

- Sa'roni dan Adjirni, 2005. *Spesifikasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Biji Pinang (Areca Catechu L) Asal Tawangmangu serta Toksisitas Akut dan Khasiat hemostatiknya pada Hewan Coba. Media Litbang Kesehatan . 15 (1) : 1-5.*
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R. 1998. In Vitro and In Vivo Wound Healing Activity of Asiaticoside Isolated from *Cantella Asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 1-11.
- Sulastrri, T. 2009. Analisis Kadar Tanin Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol pada Biji Pinang Sirih(Areca catechu. L). *Jurnal Chemica* 10(1) : 59-63
- Suriadi. *Perawatan Luka*. Jakarta: Sa-gung Seto. 2004.
- Taqwim A. 2011. *Peran fibroblas pada proses penyembuhan luka*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tjay dan Rahardja. 2007. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya, Edisi V*. PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia. Jakarta
- Yusuf, M.S. 2014. *Efektivitas penggunaan jintan hitam (Nigella sativa) dalam proses percepatan penyembuhan luka setelah pencabutan gigi*. Bagian Ilmu Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanuddin, Makassar.