

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK  
MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL  
TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN KETEBALAN  
EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES HASIL  
INDUKSI STZ (STREPTOZOTOCIN)**

**SKRIPSI**

Oleh :

**DAMAR ALAM PURWASTOKO**

**135130100111047**



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

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN KETEBALAN EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES HASIL INDUKSI STZ (STREPTOZOTOCIN)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**DAMAR ALAM PURWASTOKO**

**135130100111047**



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



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN KETEBALAN EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES HASIL INDUKSI STZ (STREPTOZOTOCIN)**

**Oleh:**  
**DAMAR ALAM PURWASTOKO**  
 135130100111047

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
 Pada tanggal 7 Agustus 2018  
 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
 gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II




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

**drh. Viski-Fitri Hendrawan, M. Vet**  
 NIK. 19880518 201504 1 003

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 : Damar Alam Purwastoko

NIM : 135130100111047

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-6 dan Ketebalan Epidermis pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi STZ (Streptozotocin)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 Agustus 2018

enyatakan,



(Damar Alam Purwastoko)  
NIM. 135130100111047

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-6 dan Ketebalan Epidermis Pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi STZ (Streptozotocin)**

**ABSTRAK**

Kondisi hiperglikemia pada penyakit diabetes mellitus (DM) dapat meningkatkan stres oksidatif dalam tubuh. Peningkatan stres oksidatif dapat mengganggu aktivitas IL-6 yang mempengaruhi keratinosit, fibroblas, dan metabolisme kolagen sehingga terjadi gangguan penyembuhan luka. Kulit jeruk manis diketahui sebagai salah satu sumber flavonoid dan antioksidan yang memiliki sifat antidiabetik dan antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas potensi kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dalam membantu penyembuhan luka pada kasus diabetes. Kelompok penelitian terbagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, kelompok terapi oral, kelompok terapi topikal, dan kelompok terapi kombinasi. Terapi dilakukan pada luka insisi tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB sekali sehari selama 10 hari menggunakan 0,1 gram salep dan sediaan oral dosis 500 mg/kg BB. Ekstrak kulit jeruk manis didapatkan dengan metode maserasi menggunakan ethanol 96%. Ekspresi IL-6 diamati dengan pewarnaan imunohistokimia dan tebal epidermis menggunakan pewarnaan hematoksilin-eosin. Analisa data menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa melalui pemberian terapi oral, salep, dan kombinasi berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) pada luka tikus DM terhadap ekspresi IL-6 dan ketebalan epidermis. Perlakuan kombinasi menurunkan ekspresi IL-6 sebesar 33,40% dan meningkatkan ketebalan epidermis hingga 26,35%. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk manis dengan pemberian secara oral dan topikal dapat digunakan pada terapi luka insisi DM.

**Kata kunci:** Diabetes Melitus, *Citrus sinensis*, Luka Insisi, IL-6, Epidermis

## Effect of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Peel Extract Orally and Topically towards IL-6 Expression and Epidermal Thickness on Wound Healing of STZ (Streptozotocin) Induced Diabetic Rat (*Rattus norvegicus*) Model

### ABSTRACT

Hyperglycemic condition in diabetes mellitus disease can raise the oxidative stress in the body. The elevation of oxidative stress will disrupt the activity of IL-6 that affects keratinocytes, fibroblast, and collagen metabolism which causing the wound healing impairment. Sweet orange peel was known as one of the source of flavonoids and antioxidants which have antidiabetic and antiinflammation properties. This research was conducted to understand the potential effectivity of sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on helping the wound healing process on diabetic condition. The observed group is divided into 5 groups which are negative control, positive control, oral group, topical group, and combination group. The treatment was applied to incision wound of diabetic rats that induced by MLD-STZ 20 mg/kg BW once a day for 10 days straight with 0,1 gram ointment and oral medication with the dose of 500 mg/kg BW. Interleukin-6 expression was observed on immunohistochemistry staining and epidermal thickness observed on hematoxilyn-eosin stain. Data analysis was conducted by performing *one way* ANOVA with post-hoc Tukey test (95% confidence rate). The result revealed that oral, topical, and combination treatment have significant difference ( $p < 0,05$ ) towards the diabetic wound's IL-6 expression and epidermal thickness. Combination treatment reduced the expression of IL-6 by 33,40% and increased the epidermal thickness by 26,35%. This research shows that oral and topical application of sweet orange peel extract can be used on diabetic incised wound.

**Keyword:** Diabetes mellitus, *Citrus sinensis*, Incised wound, IL-6, Epidermis

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah SKRIPSI ini yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) secara Oral dan Topikal terhadap Ekspresi IL-6 dan Ketebalan Epidermis Pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Hasil Induksi STZ (Streptozotocin)”. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Besar Muhammad SAW.

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, dalam penulisannya melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan dosen pembimbing pertama yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
2. drh. Viski Fitri Hendrawan, M. Vet dan drh. Herlina Pratiwi, M. Si selaku dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, kesempatan, nasehat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. drh. Ajeng Aeka, M. Sc dan drh. Galuh Chandra Agustina, M. Si selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
4. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada orang tua penulis Ibu Devi dan Bapak Purwadi yang penulis banggakan dimana telah

- banyak memberikan dukungan, doa dan pengorbanan baik secara moril maupun materil sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
5. Kelompok penelitian Badak Jerman yaitu Dwiyana, Ivana, Giovanni, Fuad dan Hazra yang melaksanakan penelitian, terimakasih atas segala dukungan, semangat dan motivasi.
  6. Teman-teman penulis yang memberi dukungan meskipun berbeda institusi, Ziyad, Andi, William, Firdous, Naufal, Andria, & Ikhwan.
  7. Terimakasih kepada Ardhi Negara karena telah meminjamkan motor dan Rumenega Nugraha yang meminjamkan printer yang sangat membantu proses revisi.
  8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya.

Malang, 8 Agustus 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Batasan Masalah.....	5
1.4 Tujuan Masalah .....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Diabetes Mellitus.....	8
2.1.1 Etiologi dan Patofisiologi Penyakit Diabetes Mellitus .....	9
2.1.2 Diabetes Mellitus pada Hewan.....	11
2.2 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Diabetes Mellitus	13
2.2.1 Streptozotocin.....	15
2.2.2 Luka dan Proses Penyembuhan Luka.....	17
2.2.3 Hambatan Penyembuhan Luka Diabetes.....	23
2.3 Kulit.....	24
2.4 Sediaan Obat .....	27
2.4.1 Sediaan Topikal.....	27
2.4.2 Sediaan Oral .....	29
2.5 Jeruk Manis .....	33
2.6 Interleukin-6 (IL-6) .....	38
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	41
3.2 Hipotesis Penelitian.....	44



**BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN**

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian ..... 45

4.2 Alat dan Bahan Penelitian ..... 45

    4.2.1 Alat Penelitian ..... 45

    4.2.2 Bahan Penelitian ..... 45

4.3 Rancangan Penelitian ..... 46

4.4 Variabel Penelitian ..... 48

4.5 Tahapan Penelitian ..... 48

4.6 Prosedur Kerja ..... 49

    4.6.1 Persiapan Hewan Coba ..... 49

    4.6.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis ..... 49

    4.6.3 Induksi MLD-STZ (*Multiple Low Dose Streptozotocin*) .. 50

    4.6.4 Pembuatan Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis ..... 51

    4.6.5 Pembuatan Luka Insisi ..... 52

    4.6.6 Terapi Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis ..... 53

    4.6.7 Euthanasi dan Pengambilan Jaringan Kulit ..... 54

    4.6.8 Pembuatan Preparat Kulit ..... 54

    4.6.9 Pengamatan Ketebalan Epidermis pada Jaringan Kulit .... 55

    4.6.10 Pengamatan Ekspresi IL-6 dengan Imunohistokimia (IHK) 56

    4.6.11 Analisis Data ..... 57

**BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN**

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ekspresi IL-6 Pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes ..... 60

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ketebalan Epidermis Pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes ..... 68

**BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

6.1 Kesimpulan ..... 76

6.2 Saran ..... 76

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 77

**LAMPIRAN** ..... 92



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Kandungan Fitokimia Kulit Jeruk Manis.....	36
2.2 Kandungan Gizi Kulit Jeruk Manis .....	37
4.1 Rancangan Penelitian .....	47
5.1 Rata-rata Hasil Uji BNJ Ekspresi IL-6 pada Kelompok Tikus Perlakuan.....	63
5.2 Rata-rata Hasil Uji BNJ Ketebalan Epidermis pada Kelompok Tikus Perlakuan.....	70



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	14
2.2 Struktur Kimia Streptozotocin .....	16
2.3 Lapisan-Lapisan Epidermis Kulit .....	26
2.4 Buah Jeruk Manis .....	34
2.5 Anatomi Buah Jeruk .....	35
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	41
4.1 Lokasi Insisi .....	52
5.1 Gambaran Makroskopis Perkembangan Kesembuhan Jaringan Kulit Tikus setelah 10 Hari Terapi .....	58
5.2 Ekspresi IL-6 dengan Pewarnaan Imunohistokimia pada Bagian Dermis Luka Insisi Tikus Model Diabetes .....	61
5.3 Gambaran Histopatologi Epidermis dengan Pewarnaan Hematoksin- Eosin (HE) pada Luka Insisi Tikus Model Diabetes .....	69

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	: Persen
°C	: Derajat Celsius
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometer
ADP	: Adenosin Difosfat
AGE	: <i>Advanced Glycation End-product</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ATP	: Adenosin Trifosfat
BB	: Berat badan
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
cm	: Centimeter
COX	: siklooksigenase
CRP	: <i>C-reactive Protein</i>
DAB	: Diaminobenzidine
dL	: Desiliter
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GLUT-2	: <i>Glucose Transporter-2</i>
GLUT-4	: <i>Glucose Transporter-4</i>
HE	: Hematoksilin Eosin
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IHK	: Imunohistokimia
IL-2	: Interleukin-2
IL-4	: Interleukin-4
IL-5	: Interleukin-5
IL-6	: Interleukin-6
IL-8	: Interleukin-8
IL-10	: Interleukin-10
IRS-1	: <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
kg/BB	: Kilogram Per Berat Badan
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
kJ	: Kilojoule
L	: Liter
m	: Meter

MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
mg	: <i>Miligram</i>
MLD	: <i>Multiple Low Dose</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MMP-1	: <i>Matrix Metalloproteinase-1</i>
MMP-2	: <i>Matrix Metalloproteinase-2</i>
NAD+	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Hydrogen</i>
NBF	: <i>Neutral-buffered Formalin</i>
NIDDM	: <i>Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
NO	: <i>Nitrit Oksida</i>
PARP	: <i>Poly ADP-Ribose Polymerase</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP <sub>3</sub>	: <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-kinase</i>
PPAR	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAA	: <i>Serum Amyloid A</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
SOD	: <i>Superoxidase Dismutase</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	: <i>Tumour Necrosis Factor</i>
UGT	: <i>Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase</i>
UPT	: <i>Unit Pelayanan Teknis</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian .....	93
2. Sertifikasi Laik Etik .....	94
3. Determinasi Tanaman Jeruk Manis .....	95
4. Uji Fitokimia Kulit Jeruk Manis .....	96
5. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis.....	97
6. Penghitungan Dosis Induksi Streptozotocin (STZ) .....	98
7. Perhitungan Pembuatan Effervescent .....	99
8. Pembuatan Preparat Histopatologi.....	100
9. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) .....	101
10. Ekspresi IL-6 dengan Immunohistokimia.....	102
11. Hasil Uji Statistika IHK terhadap Ekspresi IL-6 pada Luka Insisi Tikus Model Diabetes.....	103
12. Hasil Uji Statistika Ketebalan Epidermis pada Luka Insisi Tikus Model Diabetes .....	106
13. Dokumentasi Kegiatan.....	109

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes merupakan penyakit yang termasuk dalam golongan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat terjadinya defek pada sekresi insulin, aktivitas insulin, maupun keduanya (American Diabetes Association, 2012). Menurut World Health Organization (2006), diabetes dapat meningkatkan risiko terjadinya komplikasi mikrovaskular (retinopati, nefropati, dan neuropati) dan risiko terjadinya komplikasi makrovaskuler (*Ischemic Heart Disease*, stroke, dan penyakit vaskuler perifer). Terdapat dua jenis utama yaitu diabetes tipe 1 dan diabetes tipe 2 (Siddiqui *et al.*, 2013). Diabetes tipe 1 merupakan diabetes yang ditandai dengan kerusakan sel beta pankreas dan diabetes tipe 2 yang ditandai dengan terjadinya defek pada sekresi insulin atau fungsi dari insulin (Baynest, 2015).

Menurut data Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (2013), prevalensi terjadinya diabetes mengalami peningkatan dari 1,1% pada tahun 2007 menjadi 2,1% pada tahun 2013. Kasus diabetes mellitus tidak hanya terjadi pada manusia, diabetes juga terjadi pada primata liar, kucing, anjing, sapi, dan kuda (Oguntibeju, 2013). Diabetes pada anjing terjadi pada satu ekor setiap 308 anjing dan pada kucing satu ekor setiap 230 kucing (Catchpole *et al.*, 2005; McCann *et al.*, 2007).

Diabetes mellitus pada anjing dan kucing merupakan penyakit yang umum dijumpai dengan tingkat prevalensi di rumah sakit berkisar antara 0.4 hingga

1.2% (Nelson *and* Reusch, 2014). Anjing yang mengidap diabetes mellitus kebanyakan memiliki umur lebih dari 5 tahun (Fall *et al.*, 2007). Pada kucing, kejadian diabetes mellitus terjadi pada kucing dengan umur lebih dari 6 tahun (Henson *and* O'Brien, 2006). Pada anjing gejala diabetes yang muncul menyerupai diabetes tipe 1 pada manusia dan pada kucing 80% kejadian diabetes menunjukkan gejala menyerupai diabetes tipe 2 pada manusia (Hoenig, 2014; Nelson *and* Reusch, 2014). Ras anjing yang rentan mengidap diabetes adalah Keeshond, Malamute, Finnish Spitze, Miniature Schnauzers, Miniature Poodle, Schanuzer, Australian Terrier, Samoyed, dan English Springer Spaniels (Hoenig, 2003; Nelson *and* Reusch, 2014). Ras kucing yang rentan terkena diabetes adalah Burmese dan seluruh pejantan neuter (Hoenig, 2003). Faktor penyebab terjadinya diabetes pada anjing dan kucing meliputi genetik, obesitas, pankreatitis, penyakit hormonal, penyakit pada ginjal, penyakit pada jantung, dan efek samping obat (Nelson *and* Reusch, 2014).

Luka merupakan gangguan dari struktur anatomis dan gangguan pada fungsi yang terbagi menjadi akut dan kronis (Baranoski *and* Ayello, 2012). Penyembuhan luka pada kulit terdiri dari empat tahapan yang meliputi hemostasis, inflamasi, proliferasi dan resolusi (Guo *and* DiPietro, 2010). Sitokin adalah istilah umum yang meliputi berbagai molekul seperti *growth factor*, interleukin, *tumour necrosis factor*, dan interferon. Sitokin memiliki peran dalam terjadinya proses penyembuhan luka dan terbagi atas dua jenis yaitu sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi (Baranoski *and* Ayello, 2012).

Interleukin 6 (IL-6) merupakan sitokin pleiotropik yang berfungsi menghasilkan respon fase akut, inflamasi, dan diferensiasi limfosit (McFarlan-Mancini *et al.*, 2010). IL-6 dapat memberi stimulus migrasi fibroblas pada tikus (Shen *et al.*, 2017). Dalam penyembuhan luka, IL-6 memiliki peran dalam meningkatkan produksi VEGF yang berperan dalam angiogenesis dan permeabilitas vaskuler. IL-6 juga diketahui membantu dalam proliferasi keratinosit dan pembentukan kolagen (Tanaka *et al.*, 2014). Peningkatan jumlah radikal bebas dapat meningkatkan jumlah sitokin pro-inflamasi yang akan menyebabkan kondisi inflamasi akut (Reis *et al.*, 2012).

Pada kondisi diabetes, proses penyembuhan luka mengalami perlambatan (Altavilla *et al.*, 2001). Hiperglikemia yang terjadi pada kasus diabetes akan meningkatkan jumlah radikal bebas dalam tubuh (Raza *et al.*, 2011). Radikal bebas akan menyebabkan gangguan tingginya jumlah sitokin pro-inflamasi sehingga mengganggu proses sintesis kolagen dan proliferasi keratinosit (Altavilla *et al.*, 2001; Tsourdi *et al.*, 2013). Peningkatan sitokin pro-inflamasi akan memperpanjang fase inflamasi luka (Guo and DiPietro, 2010). Pada kondisi diabetes, Interleukin-6 (IL-6) tidak dapat menginduksi terjadinya migrasi fibroblas yang seharusnya terkumpul pada fase inflamasi sehingga menghambat pembentukan kolagen (Orsted *et al.*, 2011; Prasetyono, 2009; Shen *et al.*, 2017).

Pengobatan pada luka telah dilakukan sejak jaman dahulu dan salah satu obat yang digunakan adalah iodine. Iodin mampu melakukan penetrasi pada mikroorganisme dan menyerang nukleotida, asam lemak, dan sulfida amino bebas yaitu sistein dan metionin. Larutan cair atau larutan alkohol dari iodine

bersifat racun terhadap jaringan dan menyebabkan perubahan warna kulit, nyeri, iritasi, dan inflamasi. Povidon-iodine menyebabkan kerusakan paling parah terhadap endotel dan thrombosis pada pembersihan luka. Penggunaan povidon-iodin menyebabkan terjadinya perlambatan epitelialisasi pada luka (Angel *et al.*, 2008).

Jeruk manis (*Citrus sinensis*) merupakan kultivar jeruk terbesar yang dibudidayakan di seluruh dunia dan memenuhi sekitar 70% dari produksi jeruk tahunan (Favela-Hernandez *et al.*, 2016). Jeruk mengandung berbagai senyawa flavonoid, kumarin, psoralen, dan karotenoid (Al-Snafi, 2016). Penelitian oleh Nogata *et al.* (2014) menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid pada kulit jeruk lebih banyak dibandingkan dengan kandungan pada daging buah jeruk. Flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk misalnya hesperidin dan naringenin memiliki sifat anti-diabetes (Vinayagam *and* Xu, 2015). Ramasamy *and* Bhaskar (2016) telah menunjukkan bahwa kulit jeruk manis memiliki potensi penyembuhan luka dimana terjadi peningkatan kecepatan penutupan luka, kekuatan regang, dan makin cepatnya periode epitelisasi pada luka.

Pasien yang mengalami gangguan kesembuhan luka dapat diobati baik menggunakan sediaan oral maupun topikal (Rohmawati, 2008). Berdasarkan kandungan yang dimiliki oleh kulit jeruk yang memiliki potensi pengobatan luka dengan sifat anti-diabetes, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi terapi dengan sediaan oral dan topikal pada kesembuhan luka diabetik. Kesembuhan luka akan ditinjau dari ekspresi IL-6 dan

ketebalan epidermis pada luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin (STZ).

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian kombinasi sediaan oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dapat mempengaruhi ekspresi IL-6 pada penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus?
2. Apakah pemberian sediaan oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dapat mempengaruhi ketebalan epidermis pada penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus?

### 1.3 Batasan Masalah

Pencegahan terjadinya perluasan masalah dalam penelitian dilakukan dengan cara membatasi topik pada beberapa topik sebagai berikut:

1. Objek penelitian yang digunakan adalah sekelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang berumur 2 bulan dengan berat tubuh sekitar 150 gram yang didapatkan dari Wistar Farm Dau. Penggunaan tikus telah mendapat persetujuan dari Komisis Etik Penelitian Universitas Brawijaya nomor 716-KEP-UB (Lampiran 2).

2. Induksi diabetes dilakukan dengan cara administrasi intraperitoneal streptozotocin menggunakan metode *multiple low dose* (MLD) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (Soeatmadji *et al.*, 2005). Tikus telah mengalami diabetes jika kadar glukosa darah melebihi 200 mg/dL (Gina dkk., 2014).
3. Luka dibuat pada daerah punggung tikus sepanjang 2 cm dan sejajar dengan regio *vertebrae lumbalis* sekitar 1 cm serta dilakukan insisi hingga memotong subkutan dengan menggunakan scalpel dan berada di bawah pengaruh anesthesia.
4. Kulit jeruk yang digunakan berasal dari kota Malang dan diproses di UPT Materia Medica kota Batu dengan metode maserasi. Ekstrak dibuat menjadi salep dengan basis vaselin album dengan konsentrasi 5% (Ramasamy *and* Bhaskar, 2016).
5. Ekstrak dibuat menjadi serbuk effervescent larut air yang diminumkan dengan dosis 500 mg/kg BB (Setyowati, 2014) menggunakan sonde menuju lambung tikus.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-6 dengan metode IHK dan ketebalan epidermis secara histopatologi dengan menggunakan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

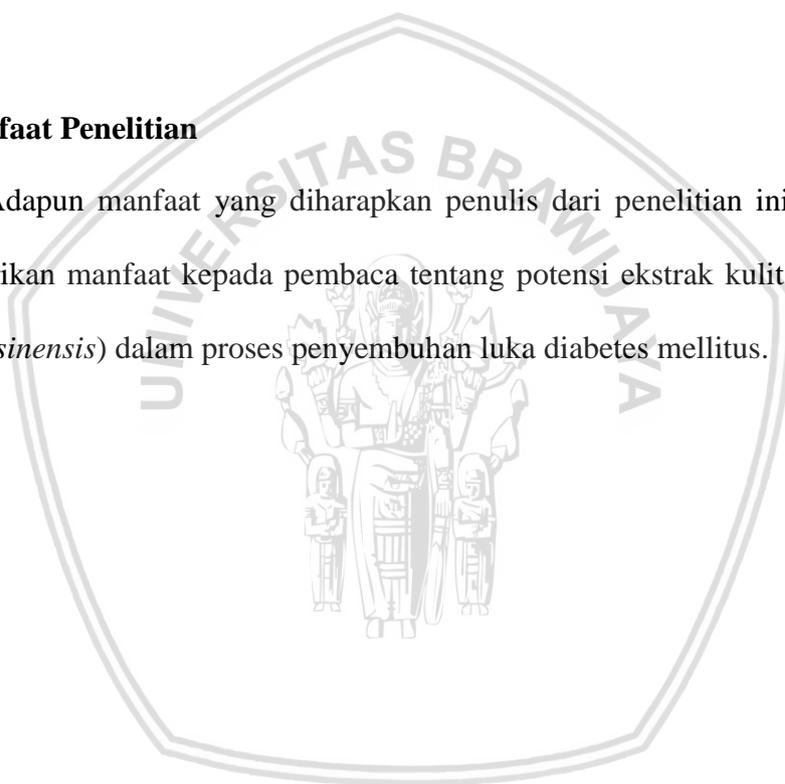
1. Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi sediaan oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dapat mempengaruhi ekspresi

IL-6 pada penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus.

2. Mengetahui pengaruh pemberian sediaan oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dapat mempengaruhi ketebalan epidermis pada penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat yang diharapkan penulis dari penelitian ini yaitu dapat memberikan manfaat kepada pembaca tentang potensi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dalam proses penyembuhan luka diabetes mellitus.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan tingginya kadar gula darah yang disertai gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein akibat gangguan fungsi insulin (Fall *et al.*, 2007). Diabetes ditandai dengan terjadinya defisiensi insulin atau resistensi insulin (Unal *et al.*, 2012). Pada diabetes tipe 1, sel beta pankreas tidak mampu memenuhi kebutuhan insulin sehingga kadar gula darah meningkat dan sel kekurangan energi (Siddiqui, 2013). Pada diabetes tipe 2 atau *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM), jaringan tubuh tidak mampu merespon insulin endogen yang dihasilkan dalam tubuh dengan baik (Oguntibeju, 2013).

Insulin merupakan hormon yang dihasilkan oleh sel beta pankreas akibat berbagai stimuli terutama glukosa (Joshi *et al.*, 2007). Insulin memiliki peran dalam meningkatkan difusi terfasilitasi glukosa ke dalam sel (Unal *et al.*, 2012). Pada kondisi diabetes, tubuh tidak dapat mengatur jumlah gula yang beredar di dalam darah (Siddiqui, 2013).

Insulin melekat pada reseptor subunit alfa yang menyebabkan autofosforilasi subunit beta dan membentuk reseptor terhadap IRS-1 (*Insuline Receptor Substrate-1*). Aktivasi IRS-1 akan menimbulkan aktivasi PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) dan mengkatalis pembentukan PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) yang menginduksi aktivasi *Phosphatidylinositol-dependant kinase* sebagai *messenger* sekunder. Enzim yang

teraktivasi tersebut akan mengaktifkan protein kinase B yang akan menyebabkan translokasi reseptor GLUT-4 yang membantu difusi glukosa ke dalam sel (Berg *et al.*, 2002).

Penyakit diabetes muncul dengan berbagai komplikasi dalam jangka panjang. Komplikasi tersebut meliputi retinopati dengan potensi hilangnya kemampuan untuk melihat, nefropati dengan potensi terjadinya gagal ginjal, neuropati perifer dan neuropati otonom yang menyebabkan disfungsi seksual, gejala pada sistem kardiovaskular, gastrointestinal, dan genitourinaria. Pasien dengan penyakit diabetes meningkatkan risiko terjadinya aterosklerosis kardiovaskular, penyakit arteri perifer, gangguan serebrovaskular, hipertensi dan kelainan pada metabolisme lipoprotein (American Diabetes Association, 2012).

### **2.1.1 Etiologi dan Patofisiologi penyakit Diabetes Mellitus**

Diabetes dapat disebabkan oleh berbagai penyebab oleh karena itu dilakukan klasifikasi etiologi terhadap penyakit diabetes dengan 4 golongan besar yaitu diabetes mellitus tipe 1, diabetes mellitus tipe 2, diabetes mellitus spesifik, dan diabetes mellitus gestasional. Diabetes mellitus tipe 1 dapat disebabkan oleh aktivitas autoimun dan penyebab yang tidak diketahui atau bersifat idiopatik. Diabetes tipe 2 dapat disebabkan oleh terjadinya defisiensi insulin, gangguan sekresi insulin, dan resistensi insulin. Diabetes mellitus spesifik dapat disebabkan oleh terjadinya defek pada fungsi sel beta pankreas, defek pada fungsi insulin, penyakit pada pankreas, endokrinopati, efek zat kimia, infeksi, gejala autoimun spesifik, dan sindrom yang biasanya terkait dengan diabetes.

Diabetes mellitus gestasional dapat terjadi pada perempuan yang sedang menjalani masa gestasi (Baynest, 2015).

Patofisiologi dari diabetes mellitus tipe 1 ditandai dengan penghancuran sel penghasil insulin di pankreas oleh sel T dan makrofag yang memasuki pulau langerhans (Baynest, 2015). Aktivitas ini merupakan progresi dari terjadinya insulinitis karena terjadi gangguan pada sel T regulator (Lukic *et al.*, 2014). Kehancuran sel beta pankreas memicu terjadinya defisiensi sekresi insulin sehingga terjadinya gangguan metabolisme dan diikuti dengan gangguan pada sel alfa pankreas dengan sekresi glukagon yang berlebih. Defisiensi insulin menyebabkan terjadinya lipolisis dan peningkatan asam lemak bebas di dalam plasma darah sehingga menekan metabolisme glukosa di jaringan perifer (Baynest, 2015).

Pada diabetes tipe 2, penyakit dimulai dengan terjadinya gangguan pada sekresi insulin akibat disfungsi sel beta pankreas atau terjadi resistensi insulin. Ketika resistensi insulin mendominasi, kebanyakan sel beta pankreas akan mengalami transformasi sehingga memungkinkan dalam memenuhi kebutuhan insulin abnormal. Konsentrasi plasma insulin akan mengalami peningkatan tetapi konsentrasi tersebut tidak cukup untuk mencapai kondisi homeostasis. Resistensi insulin dan hiperinsulinemia akan mengakibatkan terjadinya kegagalan toleransi glukosa (Baynest, 2015).

### 2.1.2 Diabetes Mellitus pada Hewan

Diabetes mellitus pada hewan dapat menjangkit berbagai jenis baik dari golongan hewan peliharaan, hewan ternak, dan satwa liar. Penyakit diabetes mellitus pada hewan memiliki gejala klinis paling umum yang sering ditemui yaitu polifagi, poliuria, dan polidipsia. Hewan yang menunjukkan kondisi hiperglikemia persisten disebabkan akibat lambatnya penyerapan glukosa seluler, peningkatan glikogenolisis dan glukoneogenesis yang berasal dari asam amino (Oguntibeju, 2013).

Kondisi hiperglikemia disebabkan oleh tingginya kadar lipida pada serum serta penurunan pembentukan asam lemak menjadi sel adiposit menyebabkan terjadinya pembentukan lipoprotein pada hepar dan terjadi hepatomegali. Perpanjangan kondisi hiperglikemia akan menyebabkan terjadinya peningkatan kadar gula pada urin primer dan tidak dapat dilakukan resorpsi sehingga terjadi glucosuria, diuresis, dan polidipsi kompensatori. Meskipun mengalami hiperglikemia, hewan akan mengalami peningkatan jumlah konsumsi makanan akibat kegagalan neuron pada hipotalamus untuk memberi stimulus dalam melakukan penyerapan glukosa ke dalam sel (Oguntibeju, 2013).

Hewan peternakan yang pernah dilaporkan mengidap diabetes mellitus adalah Kuda dan Sapi. Diabetes mellitus pada kuda dapat berupa diabetes tipe 1, diabetes tipe 2, maupun diabetes spesifik. Kuda biasa maupun kuda poni dapat mengalami diabetes dengan etiologi utama akibat terjadinya pankreatitis atau tumor pituitari pars intermedia.

Diabetes mellitus pada sapi cenderung mengarah ke jenis diabetes tipe 1 dengan etiologi penyakit yang diperkirakan berasal dari infeksi virus, gangguan metabolik, parturisi, dan insulinitis kronis. Jenis sapi yang pernah dilaporkan mengalami diabetes adalah sapi ras Friesian Holstein, Hereford, Aberden Angus, Jersey, Brangus, Charolais, Japanese Brown, dan Japanese Black (Oguntibeju, 2013).

Diabetes mellitus pada anjing dan kucing sering dilaporkan dan dianggap sebagai gangguan metabolisme yang sering terjadi (Oguntibeju, 2013). Gejala diabetes pada anjing dan kucing memiliki kemiripan dengan diabetes pada manusia (Hoenig, 2003). Diabetes tipe 1 sering dijumpai pada anjing dan jarang ditemui pada kucing (Nelson *and* Reusch, 2014).

Diabetes pada anjing memiliki ciri-ciri terjadinya hipoinsulinemia permanen sehingga tidak mengalami peningkatan serum insulin endogen. Ras anjing yang paling sering terjangkit penyakit diabetes adalah Australian terrier. Pada kucing, jenis diabetes yang paling sering ditemukan adalah diabetes tipe 2 yang mencapai sekitar 80% kasus dari keseluruhan kucing yang mengidap diabetes. Penyakit diabetes pada kucing ditandai dengan kombinasi kegagalan fungsi insulin pada hepar, otot, dan jaringan adiposa akibat resistensi insulin dan kegagalan sel beta pankreas. Ras kucing yang paling sering terjangkit dengan penyakit diabetes adalah Burmese (Nelson *and* Reusch, 2014).

Diabetes mellitus dapat terjadi secara spontan pada primata mirip manusia dan primata tidak mirip manusia dengan kemiripan pada kondisi diabetes tipe 2 pada manusia. Gejala klinis yang muncul adalah resistensi insulin, status prediabetik yang persisten, dan kegagalan fungsi sel beta pankreas dalam menjalankan fungsinya. Jenis primata yang dilaporkan pernah mengidap diabetes mellitus adalah Rhesus, monyet Tupai, Babun, monyet Mandrill, Makaka, Orangutan, dan Simpanse (Oguntibeju, 2013).

## **2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus**

Tikus digunakan dalam penelitian karena mudah dipelihara dan berkembang biak sehingga cepat mendapatkan hewan coba yang seragam dan mudah dikelola di laboratorium (Berata dkk., 2010). Tikus merupakan salah satu hewan yang sensitif terhadap efek sitotoksik STZ pada sel beta pankreas sehingga tikus sering digunakan dalam penelitian mengenai diabetes (Furman, 2015). Rodensia seperti tikus (*Rattus norvegicus*) sering dijadikan hewan model karena memiliki sistem faal yang mirip dengan manusia (Fitria dan Sarto, 2014). Klasifikasi taksonomi Tikus putih (*Rattus norvegicus*) berdasarkan Maula (2014), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia

Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genera	: Rattus
Spesies	: Norvegicus



**Gambar 2.1** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Hubrecht and Kirkwood, 2010).

Tikus (*Rattus norvegicus*) merupakan jenis tikus yang lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan lebih cepat berkembang biak hingga 7 kali per tahun (Dewi, 2010). Berat badan tikus laboratorium lebih ringan dibandingkan berat badan tikus liar. Biasanya pada umur empat minggu beratnya 35-40 gram, dan berat dewasa rata-rata 200-250 gram dimana tikus liar memiliki berat 140-500 gram dengan berat rata-rata 400 gram (Dewi, 2010; Maula, 2014).

Tikus sering digunakan sebagai hewan model luka diabetes karena tidak begitu mahal, mudah dipegang, membutuhkan sedikit ruang, dan memiliki daya sembuh yang relatif cepat dibandingkan manusia sehingga dapat dilakukan pembacaan hasil dengan segera (Mendes *et al.*, 2012). Diabetes akut pada tikus berlangsung diantara hari ke-8 hingga hari ke-21 dan diabetes kronis terjadi setelah lebih dari 21 hari setelah dilakukan injeksi streptozotocin (Ozdemir *et al.*,

2009). Kadar gula menjadi indikator terjadinya diabetes terhadap tikus sebagai hewan model, dimana Braslasu *et al.* (2007) menyebutkan bahwa rentang normal kadar gula darah tikus adalah 85 – 132 mg/dL dengan rata-rata 117.06 mg/dL.

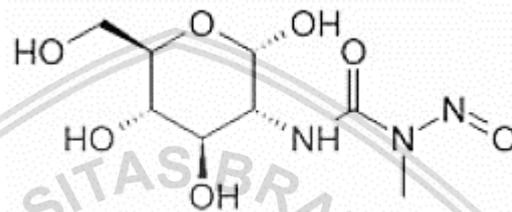
Sun *et al.* (2016) menjelaskan bahwa pengambilan data gula darah sebaiknya dilakukan pada siang hari karena tikus lebih aktif pada malam hari sehingga dapat menimbulkan variasi data yang lebih besar. Tikus yang dipuaskan memiliki rentang kadar gula darah antara 100 hingga 199 mg/dL (Fajardo *et al.*, 2014) dimana kadar gula darah yang telah melebihi 150 mg/dL termasuk kategori hiperglikemia (Saha *et al.*, 2006). Penetapan kondisi diabetes tikus dilakukan apabila pengujian kadar gula darah tikus telah menunjukkan hasil lebih dari 200 mg/dL (Riyanti dkk., 2014).

### 2.2.1 Streptozotocin

Streptozotocin merupakan obat yang dapat menyebabkan diabetes secara permanen. Obat ini didapatkan dari sintesis bakteri tanah gram positif yaitu *Streptomyces achromogenes*. Streptozotocin adalah aminoglikosida yang tidak biasa karena memiliki gugus nitrosoamino sehingga dapat menjadi donor nitrit oksida (NO) (Goud *et al.*, 2015). Nitrit oksida merupakan salah satu radikal bebas yang dapat bereaksi dengan anion superoksida menjadi peroksinitrit (Bhattacharya, 2015).

Streptozotocin (STZ) dapat larut dalam air, keton, dan alkohol, tetapi sedikit larut dalam pelarut organik polar. STZ bersifat stabil pada pH 4 dan menjadi tidak stabil seiring dengan terjadinya penurunan pH menjadi asam. Streptozotocin yang dilarutkan dalam buffer sitrat atau buffer asetat

dengan pH 4.5 dapat meningkatkan kecepatan rilis nitrit oksida. STZ yang sudah dilarutkan harus segera digunakan dalam 15-20 menit karena dapat mengalami dekomposisi dan berubah warna menjadi kuning atau coklat (Goud *et al.*, 2015).



**Gambar 2.2** Struktur kimia Streptozotocin (Soltesova *and* Herichova, 2011).

Streptozotocin (STZ) bekerja dengan cara mencegah sintesis DNA pada sel mamalia. Streptozotocin memasuki sel pankreas melalui transporter-GLUT2 (*Glucose transporter 2*) dan menyebabkan alkilasi DNA (Tripathi *and* Verma, 2014). Selain alkilasi DNA, STZ dapat bereaksi dengan sisi reaktif DNA lain dan menghasilkan 7-metilguanin, 3-metiladenin yang menyebabkan aktivasi poly-ADP-ribose polymerase (PARP) dan menyebabkan penurunan jumlah  $\text{NAD}^+$ . Penurunan  $\text{NAD}^+$  akan menyebabkan cadangan ATP digunakan untuk menggantikan  $\text{NAD}^+$  sehingga terhentinya produksi insulin (Goud *et al.*, 2015).

Streptozotocin akan menyebabkan rilis nitrit oksida sehingga terjadi penghancuran sel beta pankreas dan nekrosis (Tripathi *and* Verma, 2014). Rendahnya enzim penangkap radikal bebas pada sel beta pankreas menyebabkan sel tersebut lebih mudah mengalami efek sitotoksik (Goud

*et al.*, 2015). Pada kondisi tersebut radikal bebas yang berupa oksigen reaktif dan nitrogen reaktif akan menyebabkan kerusakan pada sel beta pankreas dan inaktivasi enzim mitokondrial (Soltesova *and* Herichova, 2011; Wu *and* Yan, 2015). Kerusakan ini disebabkan oleh pemecahan peroksinitrit menjadi radikal bebas lain salah satunya radikal hidroksil. Radikal bebas tersebut akan melukai DNA dan menekan kerja mitokondria (Soltesova *and* Herichova, 2011; Szkudelski, 2001).

Stres oksidatif pada hewan diabetes disebabkan oleh terjadinya auto-oksidasi, glikasi protein, pembentukan produk glikasi, dan reaksi jalur polyol yang berkontribusi dalam menghasilkan radikal bebas (Goud *et al.*, 2015; Wu *and* Yan, 2015). Jalur polyol yaitu proses reduksi glukosa menjadi sorbitol dan dikonversi menjadi fruktosa muncul ketika kadar glukosa intrasel meningkat (Lorenzi, 2007). Hasil metabolisme dari jalur polyol yang berupa NADH oksidase akan menyebabkan stress oksidatif pada sel sehingga terjadi disfungsi mitokondria (Tang *et al.*, 2012).

### **2.2.2 Luka dan Proses Penyembuhan Luka**

Luka merupakan permukaan kasar pada kulit akibat berbagai jenis cedera atau penyakit. Ketika suatu jaringan kehilangan penutupan oleh epitel permukaan, hal ini akan menyebabkan pembentukan luka karena kulit kehilangan lapisan epitel terluar apapun penyebabnya (Prasetyono, 2009). Penyebab terjadinya luka pada jaringan biasanya adalah trauma (sekali maupun berulang), terbakar (suhu maupun kimiawi), gigitan atau sengatan serangga, tekanan, gangguan vaskuler, immunodefisiensi,

malignansi, gangguan jaringan ikat, penyakit metabolik, defisiensi nutrisi, dan efek samping pengobatan (Orsted *et al.*, 2011). Luka insisi merupakan salah satu contoh dari luka terbuka dimana terjadi robekan linier pada kulit dan jaringan di bawahnya karena teriris oleh instrumen tajam. Luka terbuka merupakan suatu keadaan rusaknya sebagian jaringan tubuh dari kondisi normal yang disebabkan oleh trauma benda tajam, benda tumpul, perubahan suhu, zat kimia, ledakan, sengatan listrik, atau gigitan hewan (Fatimatuzzahroh dkk., 2015).

Proses penyembuhan luka merupakan proses fisiologis yang tergantung pada berbagai faktor yang saling terkait. Semua jaringan pada tubuh dapat menjalani proses penyembuhan menggunakan salah satu dari dua mekanisme yaitu: regenerasi dan perbaikan. Regenerasi merupakan pergantian jaringan rusak dengan sel yang identik sehingga bersifat terbatas. Perbaikan merupakan mekanisme penyembuhan luka utama yang mengganti jaringan yang mengalami kerusakan dengan jaringan ikat sehingga membentuk bekas luka (Flanagan, 2000).

Penyembuhan luka terbagi atas empat fase utama yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase resolusi (Guo *and* DiPietro, 2010). Luka yang mengalami proses penyembuhan mengalami berbagai aktivitas yang meliputi penggumpalan, fagositosis, penutupan luka, dan pengembalian kekuatan regang (Orsted *et al.*, 2011). Proses penyembuhan luka akan terjadi secara langsung setelah terjadinya

perluasan yang diinduksi oleh berbagai *growth factor*, sitokin, dan senyawa dengan berat molekul kecil (Werner *and* Grose, 2003).

Fase hemostasis memiliki dua aktivitas penyembuhan penting yaitu konstriksi vaskuler, agregasi platelet, degranulasi, dan pembentukan fibrin (thrombus) (Guo *and* DiPietro, 2010). Platelet atau yang biasa disebut trombosit, merupakan sel anukleat yang beredar pada aliran darah (Mekaj, 2015). Ketika terjadi luka pada jaringan, platelet pada darah akan melekat pada kolagen tipe 1 dalam pengaruh ADP (Adenosin difosfat) hasil kerusakan jaringan. Platelet akan melepaskan senyawa yang menginduksi terjadinya vasokonstriksi untuk mempermudah terjadinya perlekatan. Platelet yang teraktivasi akan menghasilkan glikoprotein yang lengket sehingga terjadi agregasi platelet (Orsted *et al.*, 2011).

Proses degranulasi platelet akan menginduksi rilis PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) yang bekerja mengumpulkan neutrofil dan monosit dari darah menuju luka (Orsted *et al.*, 2011; Werner *and* Grose, 2003). PDGF meningkatkan proliferasi fibroblas yang kemudian akan membantu pembentukan matriks ekstraseluler yang dibutuhkan dalam proses penutupan luka (Werner *and* Grose, 2003; Takeo *et al.*, 2015). Pada saat terjadinya agregasi platelet, reseptor platelet akan berinteraksi dengan kolagen dan menginduksi pentautan fibrin dalam pembentukan thrombus (Golebiewska *and* Poole, 2015). Fibrin akan bekerja sebagai kerangka untuk tempat menetapnya sel yang akan datang seperti neutrofil, monosit, fibroblas, dan sel endotelial (Prasetyono, 2009).

Proses inflamasi merupakan tahapan dimana terjadinya infiltrasi neutrofil, limfosit, dan monosit yang kemudian terdiferensiasi menjadi makrofag (Guo *and* DiPietro, 2010). Proses inflamasi biasanya terjadi selama 4 hari setelah terjadinya perlukaan (Orsted *et al.*, 2011). Fase inflamasi memiliki dampak yang baik dan dampak yang buruk. Pembersihan sisa jaringan dan mikroorganisme dibutuhkan dalam proses penyembuhan luka (Martin *and* Nunan, 2015). Apabila terjadi perpanjangan fase inflamasi akibat infeksi atau racun yang dapat menyebabkan peningkatan sitokin pro-inflamasi sehingga luka memasuki tahap kronis dan gagal mengalami proses kesembuhan (Guo *and* DiPietro, 2010).

Pada saat terjadinya proses inflamasi, plasma darah dan neutrofil akan memasuki jaringan yang mengalami kerusakan. Neutrofil akan melakukan fagositosis terhadap mikroorganisme yang mencemari dan sisa-sisa jaringan sel. Kematian neutrofil pada proses ini akan mengakibatkan terlepasnya enzim intraseluler yang akan mencerna jaringan lebih lanjut. Seiring dengan kerusakan fibrin pada proses pembersihan ini, hasil degradasi akan membuat sel seperti sel epitel dan sel fibroblas terkumpul dengan bantuan sel mast lokal. Makrofag akan membantu neutrofil dalam mencerna mikroorganisme sehingga menjadi baris pertahanan kedua setelah neutrofil (Orsted *et al.*, 2011).

Makrofag dapat menghasilkan enzim ekstraseluler untuk menghancurkan jaringan nekrotik yang termasuk dalam golongan enzim

MMP (*Matrix metalloproteinase*). MMP dihasilkan oleh berbagai sel termasuk makrofag, sel epitel, fibroblas, dan neutrofil. Enzim ini bekerja dibawah pengaruh sitokin pro-inflamasi seperti TNF-alfa (*Tumour Necrosis Factor alpha*), interleukin-1, dan interleukin-6. Makrofag dapat memproduksi berbagai jenis sitokin dan *growth factor* meliputi FGF (*Fibroblast Growth Factor*), TGF-beta (*Transforming Growth Factor beta*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), dan Interleukin-1 (Orsted *et al.*, 2011).

Fase proliferasi merupakan fase dimana terjadi proses reepitelialisasi, angiogenesis, sintesis kolagen, dan pembentukan matriks ekstraseluler (Guo *and* DiPietro, 2010). Proliferasi terjadi sekitar 4 hari setelah terjadinya perlukaan hingga hari ke 21, tergantung dari ukuran luka dan kondisi kesehatan penderita (Orsted *et al.*, 2011). Jaringan granulasi yang tersusun oleh kolagen dan protein jaringan ikat akan mulai terbentuk dan dilanjutkan dengan proses angiogenesis. Angiogenesis ditandai dengan terjadinya migrasi sel endotelial dan pembentukan pembuluh darah yang dipengaruhi oleh PDGF, TGF-beta, dan IGF (*Insulin-like Growth Factor*) pada fase inflamasi. Kemudian terjadi pelepasan FGF (*Fibroblast Growth Factor*) menuju ke molekul jaringan ikat yang diikuti pelepasan VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) yang dilakukan oleh makrofag (Prasetyono, 2009).

Fibroblas pada jaringan luka yang telah terkumpul akibat degranulasi platelet akan menghasilkan matriks provisional yang terdiri

dari kolagen, glikosaminoglikan, dan fibronektin. Fibroblas lokal pada jaringan akan berubah menjadi myofibroblas yang memiliki kemampuan kontraksi pada luka karena memiliki mikrofilamen aktin intraseluler. Kontraksi jaringan bertujuan untuk memperkecil luas luka dalam rangka melindungi jaringan lain dari efek samping terjadinya luka (Prasetyono, 2009).

Proses reepitelialisasi terjadi mulai awal perlukaan dengan induksi oleh sitokin pro-inflamasi yaitu interleukin-1 dan TGF-alfa yang meningkatkan ekspresi KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) pada fibroblas. Induksi tersebut akan menghasilkan terlepasnya KGF dan Interleukin-6 yang memberi rangsang pada keratinosit di sekitarnya untuk berpindah ke daerah luka, berproliferasi, dan melakukan diferensiasi pada epidermis (Prasetyono, 2009).

Fase terakhir pada proses penyembuhan luka adalah fase remodeling atau fase resolusi yang ditandai dengan terjadinya perubahan pada kolagen dan terjadinya maturasi vaskuler (Guo *and* DiPietro, 2010). Tujuan dari fase remodeling adalah melakukan penataan pada jaringan kolagen untuk menghasilkan kekuatan regang yang kuat dan mengurangi jumlah kepadatan pembuluh kapiler (Orsted *et al.*, 2011). Fase ini terjadi mulai terjadi sekitar hari ke 8 setelah terjadinya luka hingga hari ke 21. Kolagen tipe III yang diproduksi dan disimpan oleh fibroblas pada tahap proliferasi akan tergantikan oleh kolagen tipe I melalui proses degradasi yang dimediasi oleh MMP hasil sekresi makrofag. Fase ini diakhiri

dengan terjadinya keseimbangan antara penyimpanan kolagen dan degradasi kolagen sehingga terbentuk jaringan bekas luka (Prasetyono, 2009).

### **2.2.3 Hambatan Penyembuhan Luka Diabetes**

Hambatan penyembuhan luka ditandai dengan lambatnya infiltrasi seluler, pembentukan jaringan granulasi dalam waktu lama, penurunan angiogenesis, jumlah kolagen yang menurun dan gangguan pengaturan kolagen (Altavilla *et al.*, 2001). Peningkatan stres oksidatif terjadi pada penyakit diabetes baik tipe 1 maupun tipe 2. Kondisi hiperglikemia pada kasus penyakit diabetes akan meningkatkan produksi radikal bebas yang dapat berupa oksigen reaktif (ROS) maupun nitrogen reaktif (RNS) (Raza *et al.*, 2011). Produksi radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang menyebabkan gangguan pada keratinosit endotel, fibroblas, dan metabolisme kolagen (Altavilla *et al.*, 2001).

Hiperglikemia memiliki dampak merusak pada penyembuhan luka dikarenakan pada kondisi ini akan terbentuk AGE (*Advanced Glycation End-product*) yang menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi yang dapat mengganggu proses sintesis kolagen. Paparan glukosa dalam jangka panjang dapat menyebabkan perubahan morfologi, berkurangnya tingkat proliferasi, dan diferensiasi yang abnormal pada sel keratinosit (Tsourdi *et al.*, 2013).

Hambatan penyembuhan luka diabetes terjadi karena penurunan infiltrasi sel inflamatori pada awal fase inflamasi yang diikuti dengan

peningkatan jumlah infiltrasi neutrofil dan makrofag pada fase akhir. Perubahan waktu kedatangan sel ini menyebabkan perubahan pada sitokin dan *growth factor* yang berperan dalam penyembuhan luka. Pada kondisi ini didapatkan peningkatan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, dan TNF-alfa serta terjadi penurunan sitokin anti-inflamasi misalnya IL-10 (Xu *et al.*, 2013). Peningkatan sitokin pro-inflamasi merupakan salah satu akibat gangguan fungsi makrofag, dimana produksi sitokin dilakukan secara berlebihan (Khanna *et al.*, 2010). Akumulasi makrofag pada kasus diabetes menunjukkan penurunan berbagai *growth factor* (Mirza *et al.*, 2014). Peningkatan sitokin pro-inflamasi akan memperpanjang kondisi inflamasi sehingga luka memasuki tahap kronis dan gagal mengalami proses kesembuhan (Guo and DiPietro, 2010).

### 2.3 Kulit

Kulit merupakan organ yang membatasi antara organisme dan lingkungan. Kulit memiliki fungsi dasar sebagai alat proteksi baik secara mekanis maupun kimiawi suatu organisme terhadap lingkungan. Fungsi sekunder kulit adalah sebagai organ sensori suatu organisme agar dapat mengenali lingkungan dan menentukan respon yang harus diberikan seperti respon refleks pada panas atau rangsangan yang mengancam lainnya (Chuong *et al.*, 2002). Kulit merupakan organ yang tersusun dari 4 jaringan dasar yaitu berbagai jenis epitel yang dilengkapi dengan pembuluh darah dan kelenjar kulit, jaringan ikat dan sel-sel lemak, jaringan otot, dan jaringan syaraf (Kalangi, 2013).

Kulit terdiri atas dua lapisan utama yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat yang agak padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis, yang pada beberapa tempat terutama terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2013).

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel pipih berlapis dengan jaringan tanduk. Keratinosit adalah jenis sel yang mendominasi lapisan epidermis, yaitu lapisan terluar dari kulit dan menyusun sekitar 90% bagian lapisan tersebut (McGrath *et al.*, 2004). Epitel pipih berlapis ini tersusun oleh banyak lapis sel yang disebut keratinosit yang selalu diperbarui melalui mitosis sel basal yang secara berangsur digeser ke permukaan. Epidermis terdiri atas lima lapisan, berikut ini adalah lapisan epidermis menurut Kalangi (2013) secara berurutan dari dalam ke permukaan:

#### 1. Stratum Basal

Lapisan ini terletak paling dalam dan terdiri atas satu lapis sel yang tersusun berderet-deret di atas membran basal dan melekat pada dermis di bawahnya. Sel pada lapisan ini berbentuk kuboid atau silindris dengan inti sel besar dan sitoplasma basofilik.

#### 2. Stratum Spinosum

Lapisan ini terdiri atas beberapa lapis sel dengan bentuk poligonal dengan inti sel berbentuk lonjong. Sitoplasma pada lapisan ini akan terlihat kebiruan.

### 3. Stratum Granulosum

Lapisan ini terdiri atas 2-4 lapis sel pipih dengan granula basofilik yang disebut granula keratohialin. Granula tersebut merupakan partikel amorf tanpa membran yang dikelilingi oleh ribosom.

### 4. Stratum Lucidum

Lapisan ini dibentuk oleh 2-3 lapisan sel pipih yang tembus cahaya dan bersifat eosinofilik. Pada sel lapisan ini tidak ditemukan inti maupun organel yang membuat sel terlihat transparan.

### 5. Stratum Korneum

Lapisan ini terdiri dari banyak lapisan sel-sel mati, pipih dan tidak berinti. Pada lapisan ini, sitoplasma sel telah tergantikan oleh keratin yang terdehidrasi sehingga selalu terkelupas.



**Gambar 2.3** Lapisan-lapisan epidermis (Swanson, 1996).

Dermis merupakan bagian yang terdiri atas stratum papilaris dan stratum retikularis. Batas antara kedua lapisan ini terlihat tidak tegas dengan serat yang

saling menjalin. Stratum papilaris memiliki bentukan papila dermis yang sebagian besar memiliki pembuluh kapiler dan sebagian kecil memiliki akhir syaraf sensoris yaitu badan Meissner. Stratum retikularis terletak lebih dalam dan terlihat lebih tebal. Pada lapisan ini berkas kolagen kasar dan serat elastin membentuk jalinan padat irreguler. Jalinan yang terletak lebih dalam dan longgar terisi oleh jaringan lemak, kelenjar keringat, sebacea, dan folikel rambut (Kalangi, 2013).

Hipodermis merupakan sebuah lapisan subkutan di bawah stratum retikularis dermis. Lapisan ini berupa jaringan ikat yang lebih longgal dengan serat kolagen halus dan sejajar dengan permukaan kulit. Lapisan ini memiliki jaringan lemak lebih banyak dibandingkan dengan dermis. Lemak yang memiliki ketebalan lebih dari 3 cm atau lebih disebut *panniculus adiposus* (Kalangi, 2013)

## 2.4 Sediaan Obat

### 2.4.1 Sediaan Topikal

Salep merupakan sediaan semisolid yang memiliki sifat viskoelastis ketika mendapat tekanan. Salep secara umum memiliki bahan obat dan digunakan pada bagian luar tubuh maupun pada membran mukosa. Salep dapat diberikan baik pada kondisi membran mukosa maupun kulit yang rusak atau utuh. Salep memiliki karakteristik yaitu tidak mudah tercuci, memiliki efek emolien, efek oklusif dan berminyak (Usha and Ashish, 2015).

Salep dengan basis hidrokarbon diketahui sebagai basis salep oleaginus yang mencakup petrol putih dan salep putih. Basis hidrokarbon

memiliki keunggulan yaitu memperpanjang kontak antara bahan obat dan sifat oklusif yang bagus. Basis ini memiliki efek emolien yang tinggi sehingga tidak mudah dicuci dan tidak mudah mengering setelah beberapa waktu (Ueda *et al.*, 2009).

Kulit merupakan organ dengan luas permukaan paling besar pada tubuh. Epidermis merupakan lapisan terluar tubuh dan tidak memiliki vaskularisasi sehingga jaringan ini hidup dengan melakukan difusi nutrisi dari *dermoepidermal junction*. Pemberian obat pada kulit akan menyebabkan terjadinya disolusi obat dari sediaan dalam waktu sekitar 6 sampai 8 jam (Ruela *et al.*, 2016). Pembawa obat yang bersifat oklusif dapat meningkatkan gerak molekuler obat dan permeabilitas pada kulit (Nair *et al.*, 2013). Obat yang telah mengalami disolusi akan mengalami proses partisi tergantung jenis substansi yang akan masuk melalui proses difusi.

Metode difusi obat pada kulit ada dua jenis, yaitu jalur transepidermal dan transapendegeal. Jalur transepidermal terbagi menjadi dua metode difusi yaitu jalur intraseluler melalui korneosit apabila substansi bersifat hidrofilik dan jalur interselular melalui matriks lipid apabila substansi bersifat lipofilik (Alkilani *et al.*, 2015). Jalur transapendegeal adalah jalur difusi obat yang melewati folikel rambut dan kelenjar pada kulit dan biasanya digunakan untuk molekul besar atau molekul yang tidak bisa menembus stratum korneum (N'Da, 2014). Setelah terjadi difusi pada epidermis, obat akan memasuki lapisan dermis

sehingga siap untuk dilakukan absorpsi oleh mikrovaskuler untuk beredar secara sistemik (Alkilani *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Sediaan Oral

Obat dalam bentuk pil merupakan salah satu sediaan yang umum digunakan dalam pengobatan. Sediaan dalam bentuk ini memiliki kerugian yaitu perpanjangan onset kerja obat. Pada sediaan berbentuk cairan, keterlambatan ini dapat dihindari. Kondisi lambung juga berpengaruh dalam kinerja obat. Bentuk lain dari sediaan obat adalah serbuk effervescent (Ipci *et al.*, 2016).

Effervescent merupakan obat yang melepaskan gelembung udara pada cairan pelarut sebagai hasil reaksi kimia. Effervescent memiliki kemampuan serap dan kemampuan larut yang lebih baik dibandingkan dengan sediaan tablet dan keseimbangan asam-basa yang dihasilkan dapat menjadi *buffer* yang baik pada lambung. Sediaan ini dapat meningkatkan konsumsi cairan pada pasien dan dapat digunakan pada pasien dengan gangguan pada proses menelan (Ipci *et al.*, 2016).

Salah satu keuntungan yang dimiliki oleh effervescent adalah menambah konsumsi air pada pasien (Ipci *et al.*, 2016). Air merupakan bagian penting dari kulit dimana zat ini menyusun sekitar 30% dari keseluruhan kulit. Lapisan Epidermis pada kulit merupakan lapisan yang memiliki kadar air tertinggi yaitu 70%. Kulit yang terhidrasi dengan baik dapat mempercepat penyembuhan luka, meningkatkan epitelisasi,

membantu sintesis matriks ekstraseluler, dan mengumpulkan faktor pertumbuhan pada jaringan luka (Ousey *et al.*, 2016).

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

Reaksi karbon dioksida yang dihasilkan dapat meningkatkan permeabilitas paraseluler sehingga meningkatkan absorpsi terhadap zat aktif yang terdapat di dalam larutan effervescent. Jalur paraseluler merupakan rute absorpsi bahan aktif hidrofilik yang berdifusi ke dalam interseluler diantara sel epitel. Peningkatan kemampuan absorpsi tersebut terjadi karena partisi molekul karbon dioksida masuk ke dalam membran sel, yang meningkatkan kondisi hidrofobik pada lingkungan, sehingga memungkinkan senyawa aktif hidrofobik untuk diabsorpsi. Efek karbon

dioksida ini tidak menimbulkan reaksi toksik pada sel, dan epitel akan kembali normal setelah 20 menit (Palasinamy, *et al.*, 2011).

Pemberian obat secara oral dapat dilakukan dengan menggunakan sonde. Penggunaan sonde bertujuan untuk memasukkan suatu substansi menuju esofagus bagian bawah atau lambung. Teknik administrasi menggunakan sonde umum digunakan dan relatif aman. Keuntungan penggunaan sonde yaitu teknik paling akurat untuk administrasi menuju saluran gastro-intestinal karena mengurangi risiko terjadinya variasi pemberian substansi (Animal Care & Use Standard Committee and Animal Welfare & Ethics Committee, 2016a). Pemberian obat aman dilakukan selama tidak terjadi gejala refluks akibat keracunan, kerusakan jaringan secara mekanis, gangguan pernafasan, dan kematian mendadak (Damsch *et al.*, 2011).

Pemberian obat melalui jalur oral memiliki beberapa tahapan yang terdiri dari proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi. Absorpsi merupakan tahap dimana senyawa obat dari lokasi pemberian akan dipindahkan menuju aliran darah. Obat diserap melalui tiga jalur tergantung dari jenis substansi yang akan dipindahkan menuju aliran darah. Substansi dengan sifat larut lemak akan berpindah melalui sel epitel pada saluran cerna dan substansi dengan sifat larut air akan berpindah melalui kanal di antara sel saluran cerna. Ukuran partikel yang besar membutuhkan penggunaan energi dalam proses pemindahan menuju aliran darah yang dibantu oleh protein karier (Sakai, 2008).

Flavonoid oligomer akan lebih mudah diserap akibat bereaksi dengan asam lambung menjadi dimer dan monomer. Flavonoid glikosida yang susah diserap akan dihidrolisa oleh bakteri kolon menjadi bentuk yang lebih mudah diserap dan mengalami penyerapan di kolon (Hollman, 2004). Senyawa flavonoid pada jeruk diketahui memiliki sifat yang mudah larut dan memiliki waktu tinggal di usus singkat sehingga cepat terserap menuju aliran darah (Kumar *and* Pandey, 2013)

Flavonoid yang telah memasuki aliran darah akan mengalami metabolisme lanjutan di hepar. Mayoritas proses glukoronidasi dilakukan oleh UDP-*glucoronosyltransferase* (UGT). Metabolisme lain yang terjadi pada sitosol terhadap flavonoid adalah sulfasi dan metilasi yang akan meningkatkan afinitas terhadap plasma protein. Proses konjugasi senyawa flavonoid akan meningkatkan kelarutan dari flavonoid tersebut sehingga dapat diedarkan dan terdifusi ke dalam jaringan dengan bebas.

Flavonoid akan mengalami deglukoronidasi di jaringan akibat  $\beta$ -glukoronidase yang dihasilkan oleh neutrofil (Gonzales *et al.*, 2015). Flavonoid yang mengalami deglukoronidasi kembali menjadi flavonoid yang aktif sehingga dapat menunjukkan aktivitas antioksidan, antidiabetik, antibakteri dan membantu regulasi pertumbuhan jaringan (Kumar *and* Pandey, 2013). Molekul flavonoid yang tidak terkonjugasi sehingga tidak memiliki afinitas tinggi terhadap albumin kembali akan terfiltrasi oleh glomerulus dan dieksresikan melalui urin (Sakai, 2008).

## 2.5 Jeruk Manis

*Citrus sinensis* (L. Osbeck) atau jeruk manis berasal dari Asia timur tetapi telah dikonsumsi di berbagai penjuru dunia sebagai sumber vitamin C yang merupakan antioksidan kuat yang baik untuk sistem imun. Jeruk manis menempati posisi nomor dua dalam jumlah produksi di seluruh dunia dan memiliki jumlah lahan tanam terbanyak dibanding jenis buah lain. Jeruk manis memiliki pohon yang selalu hijau dengan tinggi berkisar antara 7.5 m hingga 15 m. Daun jeruk memiliki variasi bentuk mulai ellips hingga oval dengan panjang 6.5 cm hingga 15 cm dan lebar 2.5 cm hingga 9.5 cm. Pohon jeruk manis memiliki bunga berwarna putih dengan benang sari berwarna kuning. Buah yang dihasilkan berbentuk bulat hingga oval dengan warna matang kuning hingga oranye (Etebu *and* Nwauzoma, 2014).

Buah jeruk manis termasuk dalam famili Rutaceae dan sub-famili Aurantioideae. Dalam sub-famili ini terdiri dari tiga jenis genera yaitu Citrus, Fortunella, dan Poncirus Trifoliata (Etebu *and* Nwauzoma, 2014). Genera Citrus terdiri dari sekitar 22 spesies dan *Citrus sinensis* merupakan salah satu spesies yang banyak diproduksi (Etebu *and* Nwauzoma, 2014; Milind *and* Dev, 2008).

Adapun klasifikasi botani buah jeruk manis menurut Milind *and* Dev (2008), adalah sebagai berikut :

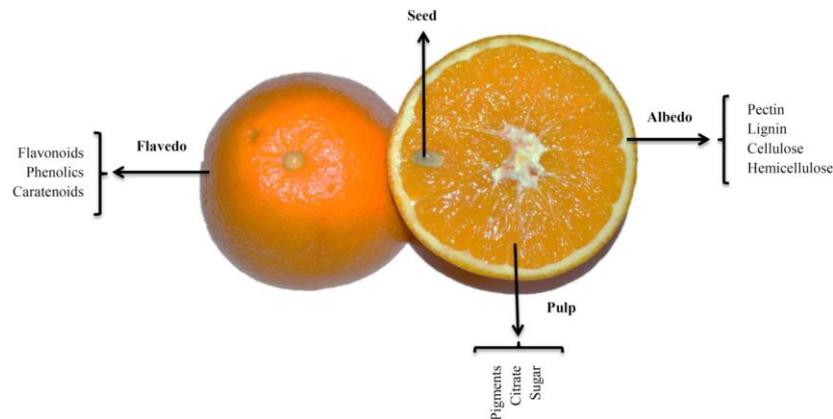
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Dicotyledons
Sub-kelas	: Sapindales

Ordo	: Rosidae
Famili	: Rutaceae
Sub-famili	: Aurantioideae
Genera	: Citrus
Sub-genera	: Papeda
Spesies	: <i>C. sinensis</i>

Buah jeruk manis memiliki daging buah yang berair dan manis. Daging buah jeruk terbagi menjadi 10 hingga 14 segmen dengan warna kuning hingga oranye. Buah yang matang disebut hesperidium, dimana hesperidium merupakan jenis beri yang memiliki beberapa biji dan berdaging. Kantung daging buah jeruk mengandung gula, asam organik, dan kadar air yang tinggi. Jaringan yang mirip dengan spons memenuhi kebanyakan bagian dari buah jeruk manis (Etebu *and* Nwauzoma, 2014).



**Gambar 2.4** Buah Jeruk Manis (Corleau, 2012).



**Gambar 2.5** Anatomi Buah Jeruk (Putnik *et al.*, 2017).

Buah jeruk memiliki potensi sebagai obat dengan berbagai manfaat. Buah jeruk manis memiliki potensi sebagai antioksidan karena mengandung flavonoid dan vitamin C (Etebu *and* Nwauzoma, 2014; Milind *and* Dev, 2012). Efek antioksidan pada kulit jeruk manis ditunjukkan oleh senyawa polifenol dan karotenoid. Kandungan polifenol pada kulit jeruk dilaporkan memiliki sifat anti-karsinogenik, anti-mutagenik, anti-alergenik, dan memperlambat penuaan (Putnik *et al.*, 2012). Jeruk manis memiliki sifat anti-inflamasi karena dapat mempengaruhi enzim regulator seperti protein kinase C, fosfodiesterase, fosfolipase, lipooksigenase dan siklooksigenase (Etebu *and* Nwauzoma, 2014).

Flavonoid pada jeruk manis memiliki sifat anti-kanker dan anti-arteriosklerosis karena sifatnya yang antimutagenik dan menetralsasi radikal bebas (Etebu *and* Nwauzoma, 2014). Beberapa flavonoid yang terkandung dalam jeruk dapat menekan proliferasi sel kanker dan limfosit T yang diaktivasi oleh antigen (Milind *and* Dev, 2012). Kandungan pektin, alkaloid synephrine, dan senyawa antioksidan dapat mengurangi kadar kolesterol tubuh sehingga membuat jeruk memiliki sifat anti-obesitas (Etebu *and* Nwauzoma, 2014). Sifat

menurunkan kolesterol juga berpotensi melindungi kondisi jantung dan mencegah terjadinya thrombosis sehingga bersifat proteksi terhadap penyakit kardio vaskuler (Khan, 2014; Milind *and* Dev, 2012; Muhtadi *et al.*, 2015).

Kandungan zat yang terkandung dalam setiap 100 gram Jeruk Manis menurut Aj *and* Lo (2016) dan Zahra *et al.* (2017) tersaji pada **tabel 2.1** serta **tabel 2.2** berikut:

**Tabel 2.1** Kandungan Fitokimia Kulit Jeruk Manis (Sumber: Aj *and* Lo. 2016)

Zat	Kandungan
Alkaloid	0,55±0,01 gram
Saponin	1,60±0,02 gram
Tannin	0,54±0,01 gram
Oksalat	0,04±0,01 gram
Phenol	0,07±0,00 gram
Vitamin A	04,10±0,06 gram
Vitamin B <sub>1</sub>	0,11±0,01 gram
Vitamin B <sub>2</sub>	0,08±0,00 gram
Vitamin B <sub>3</sub>	0,87±0,01 gram
Vitamin B <sub>5</sub>	0.48±0,00 gram
Vitamin B <sub>9</sub>	026,67±0,58 gram
C	136,67±4,16 gram
E	0.21±0.01 gram

**Tabel 2.2** Kandungan Gizi Kulit Jeruk Manis (Sumber: Zahra *et al.* 2017)

Zat	Kandungan
Karbohidrat	10,7±0,15%
Lemak	1,65±0,005%
Protein	3,00±0,05%
Serat Kasar	5,01±0,005%
Abu	0,0338±0,04%

Kulit jeruk merupakan salah satu limbah yang dihasilkan oleh industri pengolahan jeruk, dimana 10% dari berat jeruk dimiliki oleh kulit jeruk. Kulit jeruk memiliki kandungan fitokimia yang baik sebagai obat dan suplemen (Arora *and* Kaur, 2013). Hasil analisa Omoba *et al.* (2015) menunjukkan bahwa kandungan senyawa fenolik dan antioksidan pada kulit jeruk manis yang matang lebih tinggi daripada jeruk yang belum matang. Kulit jeruk memiliki kandungan asam askorbat pada bagian kulit sehingga berpotensi sebagai antioksidan (Barros *et al.*, 2012).

Analisa kandungan flavonoid oleh Nogata *et al.* (2014) menunjukkan bahwa kulit jeruk manis mengandung eriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, neoponcirin, isorhoifolin, rhoifolin, diosmin, neodiosmin, sinensetin, nobiletin, tangeretin, dan heptamethoxyflavone dengan flavonoid tertinggi yaitu hesperidin sebanyak 2070 mg/ 100 gram berat basah. Kandungan limonene ekstrak kulit jeruk manis menunjukkan sifat antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans* (Obidi *et al.*,

2013). Heptamethoxyflavone merupakan salah satu flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk manis dan memiliki aktivitas anti-inflamasi yang kuat (Gossiau *et al.*, 2014; Nogata *et al.*, 2014). Kandungan flavonoid pada kulit jeruk manis memiliki efek anti-diabetik dalam meningkatkan produksi insulin, metabolisme lipid, dan mengurangi stress oksidatif yang ditunjukkan oleh hesperidin, naringin, diosmin, dan tangeretin (Ahmed *et al.*, 2012; Vinayagam and Xu, 2015).

Kandungan metabolit sekunder pada kulit jeruk dapat berubah selama proses penyimpanan. Langkah yang dapat dilakukan sebagai langkah penyimpanan kulit jeruk apabila tidak dilakukan dehidrasi adalah pembekuan (M'hiri *et al.*, 2014). Kadar metabolit sekunder pada kulit jeruk yang disimpan pada suhu rendah dapat mengalami penurunan signifikan pada hari ke 21 dan mengalami kerusakan pada hari ke 84 (Shamloo *et al.*, 2015). Pada beberapa flavonoid misalnya hesperidin, proses pendinginan kulit jeruk dapat meningkatkan efek antioksidan ekstrak tersebut (Shamloo *et al.*, 2015; Castro-Vazquez *et al.*, 2016).

## **2.6 Sitokin Interleukin-6 (IL-6)**

Interleukin-6 (IL-6) merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi (Werner and Grose, 2003). IL-6 merupakan mediator yang memiliki efek pleiotropik pada inflamasi, respon imun, dan hematopoiesis (Tanaka *et al.*, 2014). IL-6 merupakan glikoprotein berbentuk heliks dengan berat molekul antara 20 hingga 30 kDa (Maggio *et al.*, 2006). Pada proses inflamasi, IL-6 akan diproduksi pada awal fase inflamasi dan bergerak menuju hepar melalui peredaran darah. Perpindahan sitokin akan menyebabkan terjadinya induksi protein fase akut meliputi CRP (C-

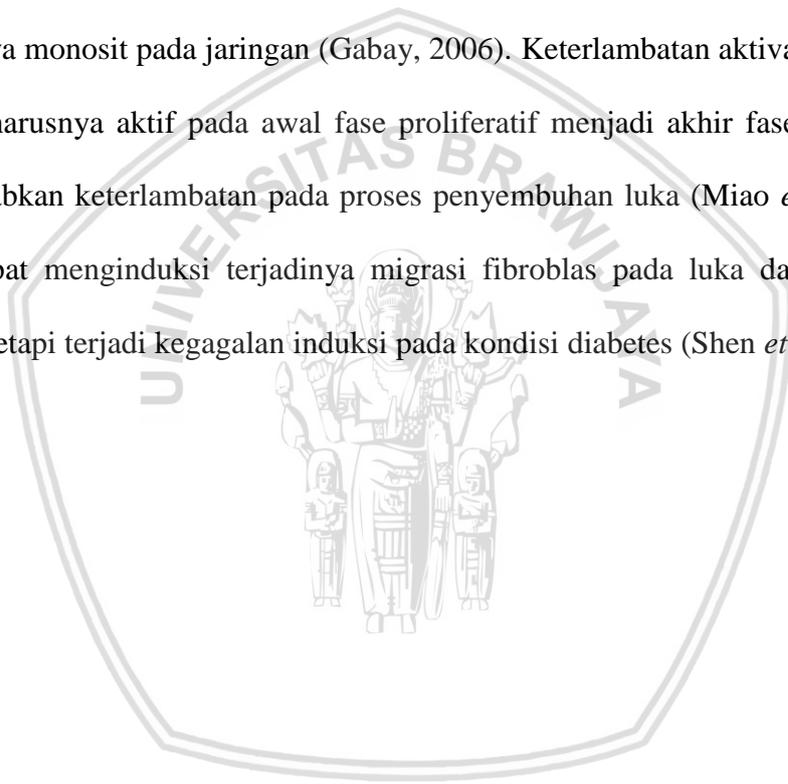
*reactive Protein*), SAA (*Serum Amyloid A*), fibrinogen, haptoglobin, dan alfa1-antikimotripsin. Peningkatan protein fase akut tersebut diikuti dengan penurunan produksi fibronectin, albumin, dan transferrin. Ketika IL-6 mencapai sumsum tulang, megakaryosit akan mendapat induksi dan melepaskan platelet ke peredaran darah (Tanaka *et al.*, 2014). Dalam imunitas spesifik, IL-6 merangsang pertumbuhan dan diferensiasi sel B menjadi sel mast yang memproduksi antibodi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013; Shaikh, 2011). Sinyal yang ditimbulkan oleh IL-6 menyebabkan rekrutmen monosit ke daerah inflamasi (Hewajuli, 2016).

Interleukin-6 memiliki peran sebagai penanda dalam terjadinya kerusakan jaringan baik pada trauma maupun luka bakar (Tanaka *et al.*, 2014). Ekspresi IL-6 akan meningkat setelah terjadinya kerusakan pada kulit dan bersifat lokal (Hanel *et al.*, 2013). Aktivitas lokal IL-6 terlihat paling tinggi pada stratum basalis dan stratum granulosum (Wang *et al.*, 2004). IL-6 diproduksi oleh berbagai sel selain sel imun yang meliputi sel mesenkimal, sel endotelial, jaringan adiposa dan fibroblas (Maggio *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2014). Kekurangan IL-6 pada jaringan luka akan menyebabkan terjadinya hambatan pada proses penyembuhan luka akibat tidak adanya efek mitogenik IL-6 pada keratinosit dan efek kemoatraktan pada neutrofil (Galucci *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003; Werner and Grose, 2003).

Pada kasus diabetes terjadi peningkatan interleukin-6 tetapi tidak terjadi progresi lebih lanjut selama perkembangan penyakit diabetes tipe 1 sehingga bersifat persisten (Reis *et al.*, 2012). Proses diabetes secara lokal akan meningkatkan produksi IL-6 dan mampu menyebabkan eksaserbasi

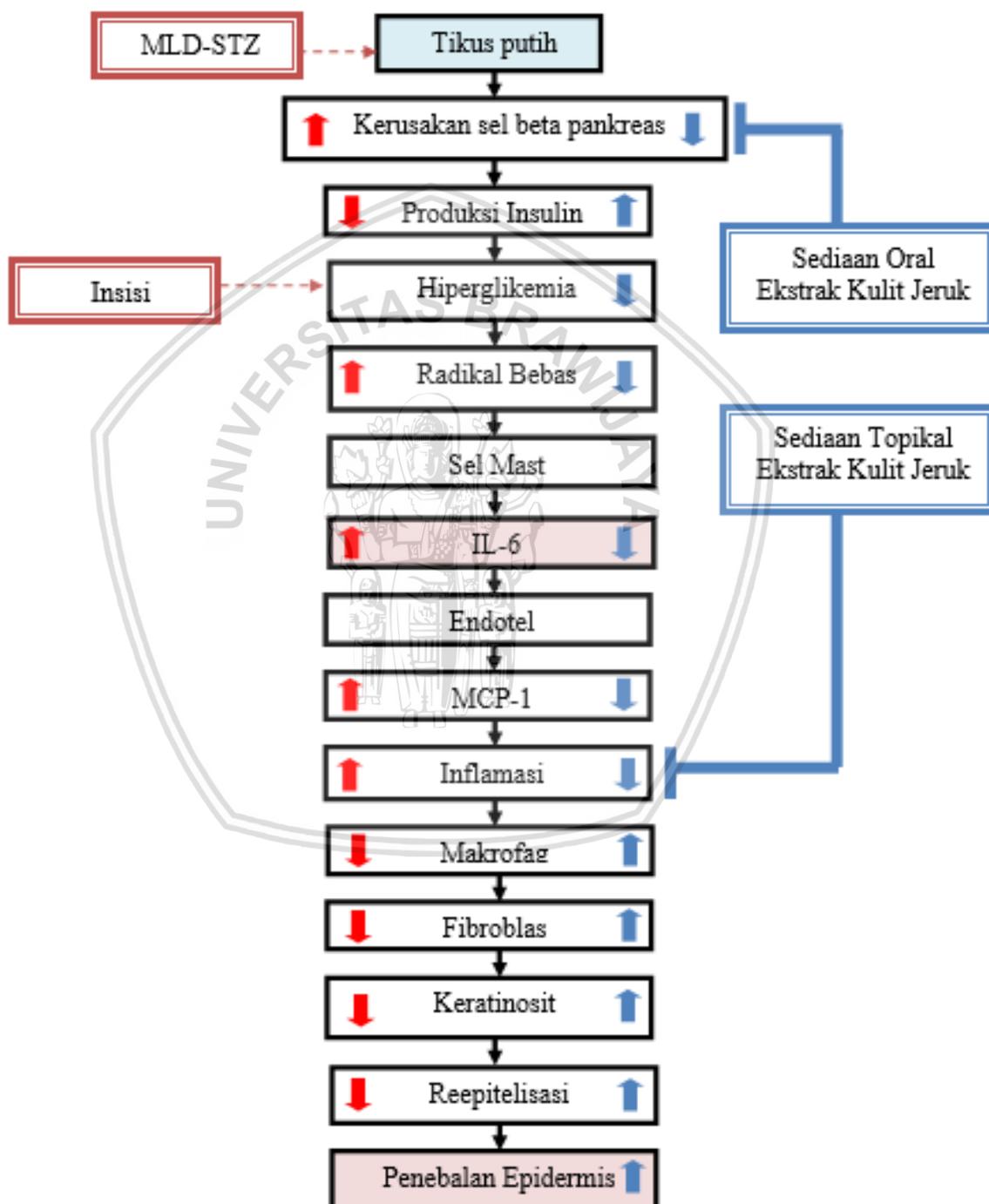
atherosklerosis dengan cara menginduksi aktivitas endotel, sel otot polos, dan makrofag (Sallam *et al.*, 2012). Stres oksidatif akan mempengaruhi kondisi sel mast dan meningkatkan produksi IL-6 (Frossi *et al.*, 2003).

IL-6 dapat menginduksi sel endotelial untuk menghasilkan IL-8 dan MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*) sehingga endotel menunjukkan aktivitas molekul adesi. Akumulasi MCP-1 akan menyebabkan keterlambatan masuknya monosit pada jaringan (Gabay, 2006). Keterlambatan aktivasi makrofag yang seharusnya aktif pada awal fase proliferasi menjadi akhir fase proliferasi menyebabkan keterlambatan pada proses penyembuhan luka (Miao *et al.*, 2012). IL-6 dapat menginduksi terjadinya migrasi fibroblas pada luka dalam kondisi normal tetapi terjadi kegagalan induksi pada kondisi diabetes (Shen *et al.*, 2017).



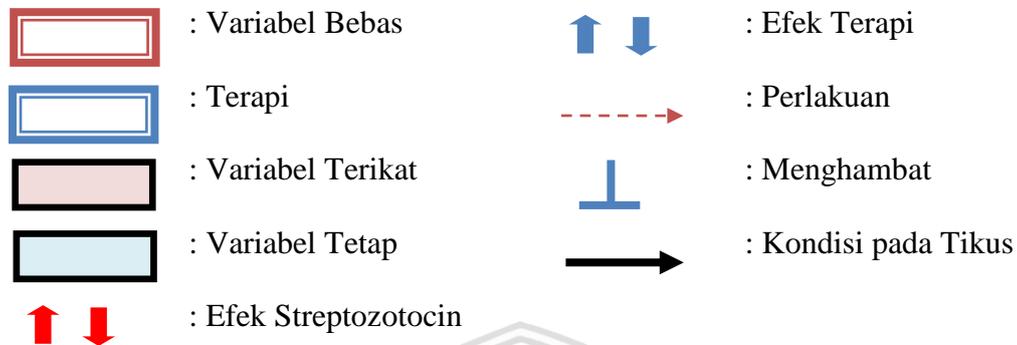
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

## Keterangan :



Induksi streptozotocin (STZ) menggunakan metode MLD (*Multiple Low Doses*) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari akan menyebabkan gangguan pada pankreas. Streptozotocin bekerja dengan cara memasuki sel beta pankreas menggunakan transporter glukosa yaitu GLUT2 pada membran sel. STZ akan menyebabkan terjadinya alkilasi DNA dan aktivasi PARP yang menyebabkan deplesi  $\text{NAD}^+$ . Jumlah  $\text{NAD}^+$  yang menurun akan dikompensasi oleh ATP sehingga sel mengalami krisis energi yang menyebabkan terhentinya produksi insulin. Radikal bebas yang dilepaskan oleh STZ yang berupa nitrit oksida akan menyebabkan pembentukan peroksinitrit yang melukai DNA melalui proses metilasi dan menekan kerja mitokondria. Kondisi ini akan menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah sehingga terjadi hiperglikemia.

Luka insisi pada hewan model akan menyebabkan terjadinya inisiasi proses penyembuhan luka akibat kerusakan jaringan perifer. Pada kondisi hiperglikemia, terjadi peningkatan produksi radikal bebas yang menyebabkan gangguan pada endotel dan fibroblas. Hiperglikemia akan menghasilkan AGE melalui metabolisme fruktosa dari jalur polyol. Stres oksidatif berkelanjutan akan

menyebabkan gangguan pada sel mast sehingga terjadi peningkatan produksi IL-6. IL-6 yang merupakan sitokin pro-inflamasi akan menginduksi sel endotelial untuk melakukan akumulasi MCP-1 sehingga terjadi akumulasi monosit pada endotel.

Proses inflamasi akan berlangsung lebih lama akibat terjadinya keterlambatan aktivasi makrofag pada jaringan karena terakumulasi pada endotel sebagai monosit. IL-6 akan meningkat sejak proses perlukaan pertama dimana pada kasus diabetes akan terjadi kondisi persisten pada jumlah IL-6. IL-6 dalam jumlah banyak tidak diimbangi dengan migrasi fibroblas yang sepadan sehingga mempengaruhi proses pembentukan kolagen dalam proses penyembuhan luka.

Pemberian salep ekstrak kulit jeruk pada luka bertujuan untuk membantu penyembuhan luka insisi. Kandungan senyawa fenolik dan antioksidan akan membantu mengurangi stres oksidatif dalam penyembuhan luka. Flavonoid pada kulit jeruk juga memiliki sifat antimikroba yang dapat membantu membunuh mikroba pada jaringan luka.

Pemberian pengobatan secara oral menggunakan ekstrak kulit jeruk bertujuan untuk membantu menghentikan progresi kerusakan sel beta pankreas. Flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk dapat meningkatkan efektivitas produksi insulin, mengurangi proses peroksidasi lemak, menurunkan kadar glukosa darah, dan menurunkan aktivitas MCP-1. Penurunan stres oksidatif akan menurunkan paparan pada sel mast sehingga mengurangi produksi IL-6.

Senyawa flavonoid dan antioksidan yang terkandung dalam ekstrak kulit jeruk diharapkan dapat menurunkan kondisi diabetik dan penurunan sitokin pro-inflamasi seperti Interleukin-6 (IL-6). Dengan penurunan kondisi diabetik, IL-6

akan kembali pada fungsi normal dan menginduksi terjadinya migrasi fibroblas pada jaringan luka dan menginduksi proliferasi keratinosit pada epidermis sehingga memperbaiki kondisi epidermis.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

1. Terapi oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) menurunkan ekspresi IL-6 pada penyembuhan luka tikus diabetes (*Rattus norvegicus*).
2. Terapi oral dan topikal ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) meningkatkan ketebalan epidermis pada penyembuhan luka tikus diabetes (*Rattus norvegicus*).

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2017 – Maret 2018 di Laboratorium Fisiologi Hewan Coba Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Malang, pembuatan ekstrak kulit jeruk manis dilakukan di Materia Medica Batu, pembuatan sediaan terapi dilakukan di Laboratorium Parasitologi Veteriner dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, pembuatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang, tempat minum, timbangan, *rotary evaporator*, *waterbath*, *digital shaker*, oven, mortar, *aluminium foil*, spatula, glukometer, sonde lambung, spuit, cawan petri, gunting, *scalpel blade*, pinset, silet, *ice box*, *freezer*, gelas penutup, gelas objek, *vortex*, tabung falkon 15 ml, gelas beker 100 ml, papan bedah, pot organ, *microtome*, *dehydrator autotechnicon*, kapas steril, tisu, masker, *gloves*, dan mikroskop (Olympus BX51).

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah pakan tikus, air, kulit jeruk, streptozotocin, vaselin album, dekstrin, asam sitrat, asam tartrat,

natrium bikarbonat, ketamine, xylazine, povidon iodine 10%, NaCl fisiologis, formalin 10%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, xylol, parafin, *Hematoxylin Eosin* (HE), ethanol 70%, ethanol, 80%, ethanol 90%, ethanol 96%, ethanol 100%, *Phospate Buffer Saline* (PBS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%, antibodi IL-6, antibodi sekunder IL-6 berlabel biotin, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), Diaminobenzidine (DAB), *Mayer Hematoxylin*, dan Entelan.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental yang berarti mengacu pada variabel perlakuan dan variabel dampak (Jaedun, 2011). Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana desain RAL digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Estimasi besar sampel dihitung menggunakan rumus  $t(n-1) \geq 15$  (Kusriningrum, 2008). Perhitungan besar sampel adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n-5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan besar sampel tersebut, jumlah ulangan paling sedikit dilakukan adalah 4 kali dalam masing-masing kelompok. Satu kelompok perlakuan terdiri dari 4 hewan coba. Hewan coba dalam penelitian ini

dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan meliputi kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok T1, kelompok T2, dan kelompok T3.

Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan kelompok kontrol sehat yang dilukai tanpa mendapat induksi penyakit diabetes maupun perlakuan terapi. Kelompok kontrol positif (K+) merupakan kelompok kontrol yang diinduksi menggunakan STZ secara MLD dan dilukai, tetapi kelompok ini tidak mendapatkan perlakuan terapi. Kelompok T1 merupakan kelompok yang diinduksi menggunakan STZ secara MLD dan dilukai serta mendapat terapi oral ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dengan dosis 500 mg/kgBB. Kelompok T2 merupakan kelompok yang diinduksi menggunakan STZ secara MLD dan dilukai serta mendapat terapi salep ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dengan konsentrasi 5%. Kelompok T3 merupakan kelompok yang diinduksi menggunakan STZ secara MLD dan dilukai serta mendapat terapi salep ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dengan konsentrasi 5% yang dikombinasikan dengan terapi oral ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dengan dosis 500 mg/kgBB. Terapi salep dan oral dilakukan sebanyak satu kali dalam sehari.

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

<b>Kelompok Perlakuan</b>	<b>Perlakuan</b>
Kelompok K(-)	Tikus sehat tanpa induksi STZ + insisi
Kelompok K(+)	Tikus dengan induksi STZ + insisi
Kelompok T1	Tikus dengan induksi STZ + insisi + terapi oral ekstrak kulit jeruk (dosis 500 mg/kgBB)
Kelompok T2	Tikus dengan induksi STZ + insisi + terapi salep ekstrak kulit jeruk (konsentrasi 5%)
Kelompok T3	Tikus dengan induksi STZ + insisi + terapi oral ekstrak kulit jeruk (dosis 500 mg/kgBB) + terapi salep ekstrak kulit jeruk (konsentrasi 5%)

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Salep ekstrak kulit jeruk, effervescent ekstrak kulit jeruk, insisi, dan streptozotocin

Variabel terikat : Ekspresi IL-6 dan ketebalan epidermis.

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

#### 4.5 Tahapan Penelitian

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

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Pada percobaan ini terdapat 20 ekor tikus sebagai hewan coba. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan berat badan sekitar 150 gram dan berada dalam kondisi sehat. Tikus diadaptasikan selama tujuh hari dengan kandang terpisah dan diberi pakan yang sama pada semua tikus. Tikus dibagi 5 kelompok perlakuan dan dalam masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus ditempatkan pada kandang yang berlokasi pada tempat yang bebas suara ribut dan terjaga dari polutan. Kandang terbuat dari plastik dan lantai kandang mudah untuk dibersihkan. Kandang terbagi menjadi empat bagian yang dibatasi oleh sekat sehingga tikus tinggal secara terpisah.

### 4.6.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis

Kulit jeruk yang digunakan diperkirakan berusia kurang lebih 8 bulan karena telah memenuhi kriteria kematangan buah jeruk manis menurut Sutopo (2015). Buah yang digunakan berukuran hampir seragam dan ketika ditekan tidak kaku dan keras. Kulit buah memiliki variasi berkas kekuningan yang menandakan buah telah memasuki pematangan. Rachel *et al.* (2013) menyarankan agar menggunakan kulit jeruk yang telah mencapai usia matang karena mengandung lebih banyak metabolit sekunder dibandingkan kulit jeruk yang masih hijau sepenuhnya.

Kulit jeruk manis disiapkan dan dilakukan pemisahan antara vesikel buah dan kulit. Kulit yang sudah dipisahkan kemudian dibersihkan hingga

tidak ada bekas vesikel buah yang tertinggal. Kulit jeruk dikeringkan dengan cara dilakukan penjemuran di dalam ruangan selama 7 hari. Kulit yang telah kering dihancurkan menjadi serbuk dan kemudian ditimbang sebanyak 500 gram. Pembasahan pada serbuk kulit jeruk dilakukan dengan memberi sedikit ethanol 96%. Serbuk yang telah dibasahi kemudian dipindahkan ke dalam wadah yang memiliki tutup dan diratakan pada dasar wadah. Ditambahkan pelarut ethanol 96% sebanyak 2 L dan dilakukan penutupan pada wadah hingga tertutup rapat. Wadah tempat menampung larutan ekstrak kulit jeruk diberi perlakuan *shaking* dengan menggunakan *shaker* digital selama 24 jam dengan kecepatan 50 rpm. Hasil perendaman selama 24 jam disaring menggunakan kain saring menuju labu erlenmeyer. Hasil penyaringan diuapkan pada *rotary evaporator* selama 3 jam. Larutan sisa penguapan, dipanaskan pada permukaan *waterbath* selama 2 jam. Hasil dari proses maserasi yang dilakukan yaitu 40 gram ekstrak pekat kulit jeruk manis yang berupa cairan kental.

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

Tikus DM diperoleh dengan cara injeksi MLD-STZ (dosis 20 mg/kg BB) secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut (Soeatmadji et al., 2005). Inkubasi STZ dilakukan selama 14 hari dan pemeriksaan kadar gula darah dilakukan pada hari terakhir masa inkubasi. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer digital. Sebelum digunakan, dilakukan persiapan stik glukometer dan glukometer digital terlebih dahulu. Dilakukan perlukaan pada bagian ekor untuk menginduksi keluarnya darah

menggunakan jarum suntik. Tetesan darah diposisikan pada rangkaian glukometer dan stik sehingga memunculkan kadar glukosa darah pada layar glukometer. Tikus dengan kadar gula darah lebih dari 200 mg/dL menandakan bahwa tikus tersebut mengalami diabetes.

Pemberian STZ melalui rongga peritoneum terjadi melalui jaringan peritoneal sekitar dan berpindah menuju ke seluruh tubuh melalui sistem sirkulasi. Streptozotocin akan mengalami ultrafiltrasi pada membran peritoneum dan memasuki pembuluh kapiler (Chaudary *et al.*, 2010). Streptozotocin akan memasuki pankreas melalui reseptor GLUT2 yang berada pada membran sel dan menyebabkan alkilasi DNA pada pankreas (Tripathi *and* Verma, 2014).

#### **4.6.4 Pembuatan Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis**

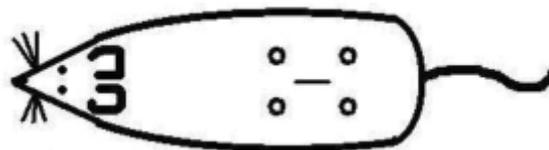
Sediaan salep dibuat menggunakan metode *geometric dillution* dengan mencampurkan vaselin album sebagai bahan dasar dan ekstrak kulit jeruk manis. Pembuatan salep dengan konsentrasi 5% (Ramasamy *and* Bhaskar, 2016) dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak kulit jeruk manis sebanyak 1 gram ditambahkan dengan vaselin album sehingga diperoleh campuran sebanyak 20 gram. Salep kemudian dibungkus dalam aluminium foil.

Sediaan serbuk effervescent dapat dibuat dengan mencampurkan kombinasi natrium bikarbonat, asam sitrat, dan asam tartarat (Iacovone *et al.*, 2010). Ekstrak kering kulit jeruk dengan cara mencampur ekstrak kulit jeruk manis dengan dekstrin (1:1), kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 10 jam. Hasil oven dihaluskan menggunakan mortar sehingga

didapatkan ekstrak sediaan serbuk. Effervescent dibuat dengan mencampurkan ekstrak kulit jeruk manis serbuk, natrium bikarbonat, asam tartrat, dan asam sitrat (3,5 : 3 : 1,5 : 1) (Novidiyanto dan Setyowati, 2008). Semua bahan dicampur menggunakan mortar sampai homogen, kemudian disimpan dalam wadah tertutup.

#### 4.6.5 Pembuatan Luka Insisi

Tikus dianestesi menggunakan campuran ketamine (dosis 44-87.5mg/kg BB) dan xylazine (6.25-12.5 mg/kg BB) dengan pemberian secara intra peritoneal (Bliss, 2016). Setelah tikus berada dalam pengaruh anestesi, dilakukan pembersihan rambut daerah punggung dengan cara dicukur. Kemudian dilakukan disinfeksi menggunakan alkohol 70% dan povidon iodine 10% pada punggung tikus yang telah dicukur. Sayatan dilakukan pada punggung tikus (Gal *et al.*, 2011) yang dibuat sepanjang 2 cm (Alizadeh, 2010). Luka dibuat dengan kedalaman 0.2 cm dan dibiarkan terbuka tanpa perban (Das, 2013). Tikus dikembalikan ke kandang masing-masing sesuai kelompok setelah mendapat luka sayat.



**Gambar 4.1** Lokasi Insisi (Gal *et al.*, 2008).

Luka insisi yang dibuat pada tikus termasuk ke dalam luka kelas I menurut Onyekwelu *et al.* (2017). Klasifikasi luka yang dijelaskan oleh Onyekwelu *et al.* (2017), membagi luka menjadi 4 bagian. Luka kelas I

(Bersih) merupakan luka yang berada dalam kondisi bersih tanpa memasuki organ luminal. Luka kelas II (Bersih-Terkontaminasi) adalah luka yang memasuki daerah organ luminal tanpa adanya kontaminasi. Luka kelas III (Terkontaminasi) merupakan luka yang tidak disengaja dengan adanya tumpahan materi saluran gastrointestinal. Luka kelas IV (Kotor-Terinfeksi) adalah luka lama atau luka yang menunjukkan keberadaan infeksi klinis dan perforasi organ viscera.

Luka yang dibuat pada tikus termasuk ke dalam luka stadium II menurut VNHC (2010). VNHC (2010) menyebutkan bahwa kedalaman luka terbagi menjadi 4 tingkatan. Luka stadium I adalah luka yang terjadi pada permukaan kulit yaitu bagian epidermis. Luka stadium II, merupakan luka yang terjadi pada bagian epidermis hingga mencapai dermis. Luka stadium III, adalah luka yang terjadi dan diikuti oleh hilangnya sebagian kulit hingga otot terlihat tetapi tidak terjadi perlukaan pada otot. Luka stadium IV, merupakan luka yang terjadi dengan hilangnya sebagian kulit dan terjadi perlukaan pada otot.

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

Pemberian ekstrak kulit jeruk manis sebagai terapi perlakuan diberikan secara oral dan topikal. Terapi diberikan sekali per hari selama 10 hari. Kelompok 3 diberi terapi secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 500 mg/kg BB (Setyowati, 2014). Kelompok 4 diberi terapi topikal dengan mengoleskan salep sebanyak kurang lebih 0,1 gram pada daerah luka. Kelompok 5 diberi terapi kombinasi secara oral dan topikal.

#### 4.6.7 Euthanasi dan Pengambilan Jaringan Kulit

Hewan coba dieuthanasi dengan melakukan dislokasi pada bagian leher. Dislokasi leher dapat digunakan pada tikus (<200 gram) dengan cara menahan bagian leher dengan ibu jari dan jari telunjuk atau menahan bagian pangkal tengkorak dengan tongkat yang dilanjutkan dengan menarik bagian pangkal ekor dengan cepat sehingga terjadi dislokasi pada vertebrae cervicalis (Leary *et al.*, 2013). Setelah dilakukan dislokasi pada leher, kematian dipastikan dengan cara menguji refleks ekstremitas, melakukan palpasi pada daerah thorax, dan mengamati refleks mata (Animal Care & Use Standards Committee and Animal Welfare & Ethics Committee, 2016b). Bagian preparat yang digunakan yaitu kulit di sekitar luka insisi dibersihkan terlebih dahulu menggunakan NaCl fisiologis dan dipotong. Fiksasi dilakukan pada jaringan yang telah diambil menggunakan *neutral-buffered* formalin (NBF) 10% (Webster *et al.*, 2009). Jaringan yang telah difiksasi disimpan dalam wadah spesimen yang tertutup rapat dan berada dalam suhu ruang.

#### 4.6.8 Pembuatan Preparat Kulit

Pembuatan preparat dilakukan dengan cara jaringan kulit yang telah difiksasi menggunakan larutan formalin 10% selama 2 jam, kemudian dilakukan *trimming* organ dan dimasukkan dalam *cassette tissue* dari plastik. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I,

alkohol absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan Xylol II. Proses pencetakan menggunakan parafin I, parafin II, dan parafin III. Sediaan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sediaan diletakkan ke arah vertikal dan horizontal sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 4 mikron dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan di atas air hangat bersuhu 46<sup>0</sup>C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan di atas *object glass* dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60<sup>0</sup>C. Kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk pemeriksaan mikroskopik (Balqis dkk., 2014).

#### **4.6.9 Pengamatan Ketebalan Epidermis pada jaringan kulit**

Pemeriksaan ketebalan epidermis dilakukan pada preparat yang telah diwarnai dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Pewarnaan HE terdiri dari hematoxylin dengan warna biru gelap hingga ungu yang mewarnai asam nukleat dan eosin dengan warna merah muda dan mewarnai protein secara non-spesifik. Pewarnaan jaringan secara umum menggunakan pewarna ini akan menunjukkan nukleus yang berwarna biru dan sitoplasma serta matriks ekstraseluler yang berwarna merah muda dengan berbagai tingkatan (Spector and Goldman, 2006). Pengukuran ketebalan epitel pada preparat histologi

dilakukan menggunakan menggunakan aplikasi *OptiLab Image Raster 3.0*. Epidermis yang baru tumbuh di tepi luka akan dibandingkan antar kelompok dan disajikan dalam bentuk tabel (Rahayu dkk., 2010). Pengukuran dilakukan pada 5 lokasi epidermis berbeda dan diambil rerata sebagai hasil pengukuran tebal epidermis.

#### **4.6.10 Pengamatan Ekspresi IL-6 dengan Imunohistokimia (IHK)**

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat pada xylol 1, xylol 2, dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan kemudian ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat* IL-6 (pengenceran 1:50) selama semalam pada suhu 40 °C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel *rabbit anti rat* IgG berlabel biotin selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) selama 10 menit. Presipitasi menggunakan DAB

akan menunjukkan hasil berwarna coklat (BIO-RAD, 2016). Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *Counterstaining* menggunakan kromogen *Mayer Hematoxylin* selama 5 menit. *Mayer Hematoxylin* akan menjadi *counterstain* nukleus sehingga terwarnai biru (BIO-RAD, 2016). Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan.

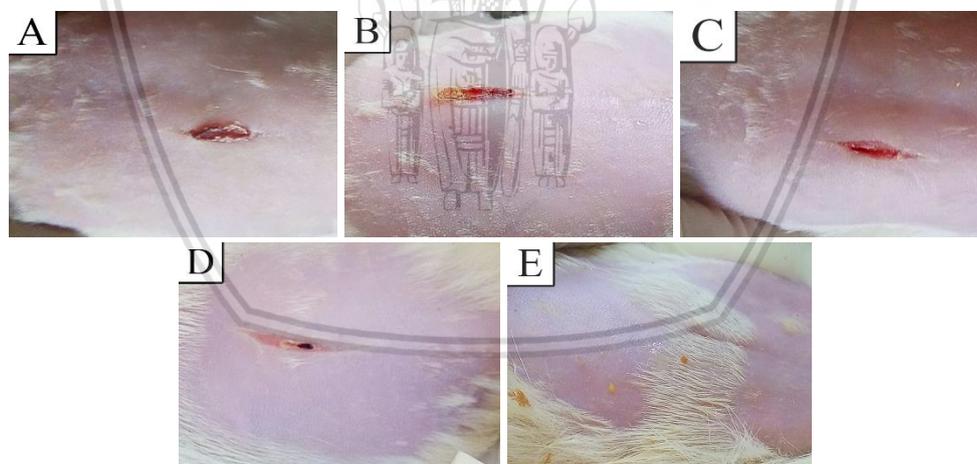
Pengukuran presentase area ekspresi IL-6 dilakukan dengan menggunakan *software IHC Profiler*. Data yang diperoleh dianalisa secara statistic menggunakan *SPSS for Windows 23* untuk uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dan uji Beda Nyata Jujur atau uji *Tukey* dengan tingkat signifikansi  $\alpha= 5\%$ .

#### 4.6.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah pengukuran ekspresi IL-6 dan ketebalan epidermis pada jaringan kulit yang kemudian dianalisa menggunakan ragam *analysis of variance* (ANOVA) dengan menggunakan program *SPSS (Statistic Product of Service Solution) 23 for windows* dengan tujuan untuk melihat signifikansi pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis, dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 5\%$ ) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi yang diberikan.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi MLD-STZ diamati dan dilakukan pengecekan kadar glukosa darah menggunakan glukometer untuk memastikan bahwa tikus telah mengalami kondisi diabetes mellitus. Kadar glukosa darah tikus yang mengalami diabetes yaitu  $>200$  mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003). Darah yang diuji diambil dari vena coccygea dan diukur menggunakan glukometer. Tikus yang menunjukkan kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dl ditandai menggunakan spidol pada bagian ekornya. Insisi kemudian dibuat pada daerah punggung sepanjang 2 cm dalam kondisi tikus teranestesi dan kemudian diberi terapi menggunakan ekstrak kulit jeruk manis selama 10 hari.



**Gambar 5.1** Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan jaringan kulit tikus setelah 10 hari terapi.

Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral effervescent kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep

Gambaran makroskopis menunjukkan adanya perbedaan pada masing-masing kelompok seperti yang terlihat pada **Gambar 5.1**. Kondisi luka tikus kontrol negatif (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan luka yang sudah mulai mengering dan terbentuk keropeng yang menutupi. Kondisi luka insisi tikus kontrol positif (**Gambar 5.2 B**) menunjukkan luka yang belum menutup dan terlihat sedikit basah. Kondisi luka tersebut menunjukkan bahwa terjadi perpanjangan kondisi inflamasi akibat kondisi diabetes.

Kondisi luka insisi tikus terapi oral (**Gambar 5.1 C**) menunjukkan mulai adanya penutupan luka tanpa terbentuknya keropeng tetapi masih terlihat kemerahan pada area insisi. Kondisi luka insisi tikus terapi salep (**Gambar 5.1 D**) menunjukkan penutupan luka yang lebih baik daripada penutupan luka terapi oral, dimana luka lebih tertutup dan warnanya terlihat lebih merah. Kondisi luka insisi tikus terapi kombinasi (**Gambar 5.1 E**) menunjukkan penutupan luka yang paling baik dibandingkan dengan tikus diabetes pada kelompok perlakuan lain, luka sudah terlihat cukup tertutup, tidak ada warna kemerahan dan keropeng, serta mulai terlihat penumbuhan rambut disekitar area insisi.

Kemudian dilakukan metode imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi IL-6 dan pengukuran penebalan epidermis pada jaringan luka untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis pada kesembuhan luka tikus yang mengalami diabetes. Ekspresi IL-6 pada preparat kulit ditunjukkan dengan adanya warna kecoklatan dan penggunaan *IHC-Profiler* akan menampilkan zona pada preparat yang menunjukkan ekspresi IL-6. Penebalan epidermis bagian luka

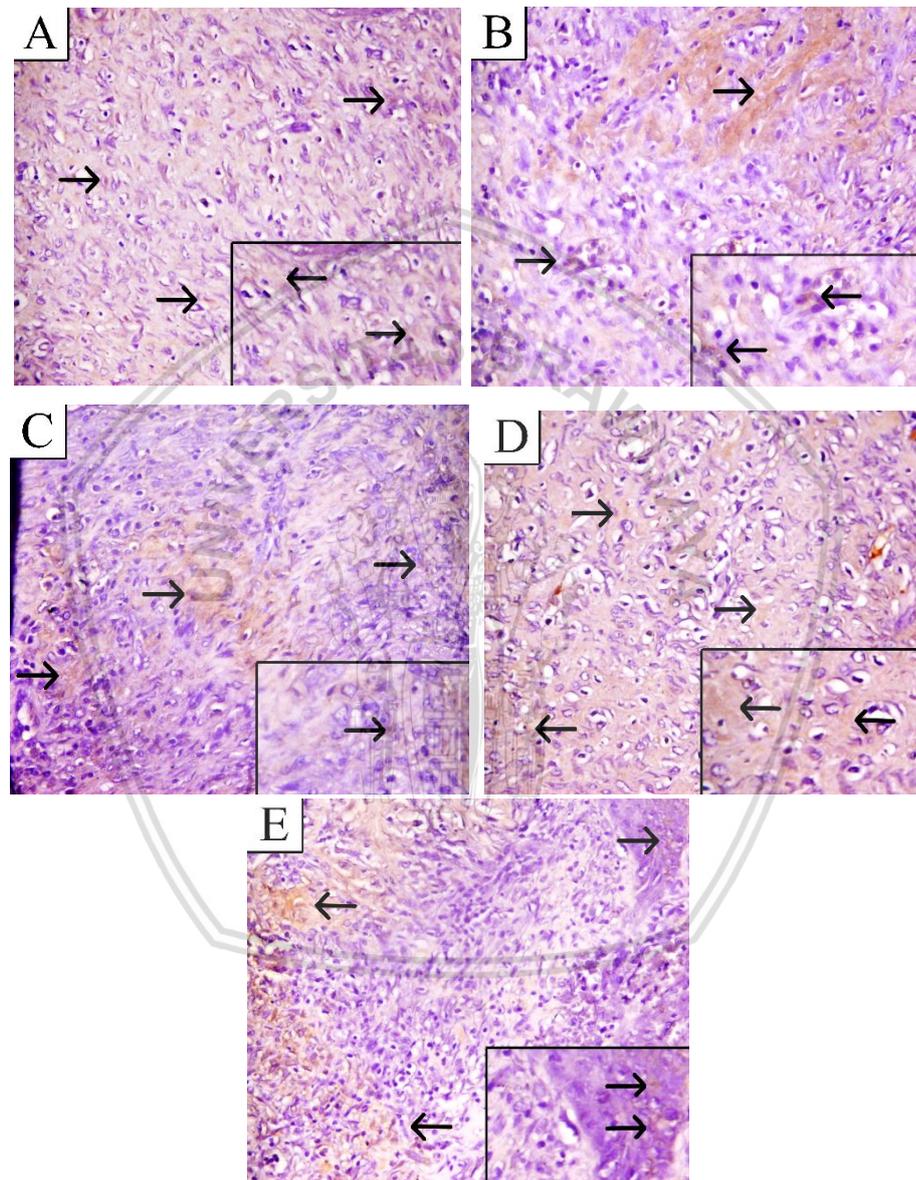
ditentukan dengan mengukur jarak antara stratum basal hingga bagian terluar pada jaringan luka tersebut.

### **5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ekspresi IL-6 pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes**

Metode imunohistokimia (IHK) merupakan suatu proses identifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel menggunakan antibodi spesifik (Sukmadadari, 2012). Prinsip metode imunohistokimia adalah menggunakan reaksi imunologis dan reaksi kimiawi. Reaksi imunologis ditunjukkan dengan adanya ikatan antara antigen dan antibodi. Reaksi kimiawi pada imunohistokimia ditunjukkan oleh ikatan antara enzim dan substrat. Ekspresi IL-6 dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan.

Ekspresi IL-6 dapat diamati pada semua kelompok yang diberi perlakuan insisi karena sitokin ini merupakan salah satu penanda terjadinya kerusakan pada jaringan (Tanaka *et al.*, 2014). Sitokin tersebut diproduksi oleh sel endothelial, jaringan adiposa, sel imun, fibroblas, dan makrofag (Duque *and* Descoteaux, 2014; Maggio *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2014). Pada kondisi diabetes, jumlah IL-6 akan mengalami peningkatan dan bersifat persisten (Reis *et al.*, 2012). Warna coklat pada gambaran imunohistokimia terlihat akibat terjadinya ikatan antara antigen (IL-6) dalam jaringan kulit dengan antibodi primer (*Rat anti IL-6*) yang selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder (*Rabbit Anti Rat Biotin Labeled*). Penambahan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) pada biotin akan menyebabkan terjadinya reaksi pada *Horse Radish Peroxidase* yang bereaksi

terhadap substrat *Diamino Benzidine* (DAB) sehingga terbentuk warna coklat pada ekspresi IL-6 (**Gambar 5.2**).



**Gambar 5.2** Ekspresi IL-6 dengan pewarnaan imunohistokimia pada bagian dermis luka insisi tikus model diabetes (Perbesaran mikroskop 400x).

Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral effervescent kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep. Tanda (→) menunjukkan ekspresi IL-6

Pengamatan ekspresi IL-6 pada preparat immunohistokimia dilakukan dengan menganalisis masing-masing ulangan dengan penilaian pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x pada semua kelompok. Hasil ekspresi IL-6 yang diproses menggunakan *software IHC Profiler* dan didapatkan hasil dalam bentuk persentase (%). *IHC Profiler* bekerja dengan cara melakukan dekonvolusi warna sehingga dapat membagi pewarnaan menjadi beberapa gambar sesuai pewarnaan (Varghese *et al.*, 2014). Prinsip kerja *IHC Profiler* sama seperti *ImmunoRatio* karena menggunakan metode dekonvolusi warna (Touminen *et al.*, 2010). Hasil tersebut kemudian dianalisa menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistic 23 for Windows*.

Berdasarkan statistika deskriptif, semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar deviasi yang lebih kecil dari *mean*. Uji statistika yang berikutnya dilakukan adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Berdasarkan kedua uji tersebut, data ekspresi IL-6 tersebut tergolong homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *One Way ANOVA*. Pada uji *one way ANOVA* didapatkan hasil nilai  $p < 0,05$  yang menunjukkan  $H_0$  ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Setelah itu dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata signifikan. Hasil pengujian data menggunakan uji BNJ disajikan pada **Tabel 5.1** sebagai berikut:

**Tabel 5.1** Rata-rata Hasil Uji BNJ Ekspresi IL-6 pada Kelompok Tikus Perlakuan

Kelompok	Ekspresi IL-6		
	Rata-rata (ekspresi) $\pm$ SD (%)	Peningkatan terhadap K- (%)	Penurunan Terhadap K+ (%)
1 (Kontrol negatif)	34,93 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	-	-
2 (Kontrol positif)	54,67 $\pm$ 2,1 <sup>d</sup>	56,51%	-
3 (Terapi Oral)	39,09 $\pm$ 1,4 <sup>bc</sup>	-	28,50%
4 (Terapi Salep)	42,51 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	-	22,24%
5 (Terapi Kombinasi)	36,41 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>	-	33,40%

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

Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok kontrol negatif (K-) sebesar 34,93  $\pm$  2,7% yang digunakan sebagai acuan dan pembanding terhadap ekspresi pada kelompok kontrol positif (K+). Ekspresi IL-6 pada kelompok K+ menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok K- dengan rata-rata 54,67  $\pm$  2,1. Pada kondisi normal, IL-6 merupakan salah satu faktor kunci pada proses inflamasi (Gabay, 2006) dan terjadi peningkatan jumlah IL-6 pada kondisi diabetes (Reis *et al.*, 2012).

IL-6 memiliki dua sifat, dimana pada awal fase inflamasi IL-6 bersifat defensif terhadap antigen dan pada fase kronis bersifat pro-inflamasi (Gabay, 2006). Pada kondisi diabetes terjadi peningkatan jumlah IL-6 (Reis *et al.*, 2012) dan IL-6 akan meningkatkan aktivitas endotel dan memperpanjang proses inflamasi (Gabay, 2006; Guo and DiPietro, 2010). Pada kondisi diabetes, terjadi peningkatan metabolisme glukosa melalui jalur polyol sehingga dapat meningkatkan jumlah ROS (Tang *et al.*, 2012). Tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai

mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotriene (Baratawidjaja, 2006) serta meningkatkan kadar IL-6 (Frossi *et al.*, 2003).

Hasil penggunaan terapi ekstrak kulit jeruk manis menunjukkan adanya penurunan pada ekspresi IL-6. Ekspresi IL-6 pada kelompok terapi oral menunjukkan penurunan sebesar 28,50% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $39,09 \pm 1,4\%$ . Ekspresi IL-6 pada kelompok terapi salep menunjukkan penurunan sebesar 22,24% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $42,51 \pm 0,6\%$ . Ekspresi IL-6 pada kelompok terapi kombinasi oral dan topikal menunjukkan penurunan sebesar 33,40% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $36,41 \pm 0,7\%$ .

Penurunan yang ditunjukkan oleh terapi oral effervescent kulit jeruk manis mencegah terjadinya interaksi AGE dengan protein sehingga mencegah produksi sitokin pro-inflamasi secara berkelanjutan. Salah satu mekanisme antioksidan pada kondisi diabetes adalah menjadi kompetitor pada permukaan sel sehingga mencegah terjadinya akumulasi sorbitol dan mengurangi glikosilasi protein (Santosh *and* David, 2017). Kandungan vitamin dan flavonoid dari kulit jeruk manis mampu menurunkan hiperglikemia pada tikus DM (Ahmad, *et al.*, 2013). Flavonoid pada kulit jeruk manis dapat membantu regenerasi sel-  $\beta$  pankreas sehingga hormon insulin dapat diproduksi kembali dan kadar gula darah dapat dikontrol (Muhtadi *et al.*, 2015).

Ekspresi IL-6 pada kelompok terapi oral lebih banyak mengalami penurunan dibandingkan kelompok terapi topikal yaitu sebesar 6,26%. Salep sebagai obat topikal bekerja dengan cara masuk ke dalam permukaan kulit

mengikuti suatu gradien konsentrasi (difusi secara pasif) (Sharma, 2015).. Pemberian obat secara topikal memungkinkan kontak zat aktif dalam salep ekstrak kulit jeruk manis terhadap jaringan kulit sehingga dapat memberikan efek terapi secara langsung pada area luka. Tidak seperti pemberian secara topikal, pemberian secara oral memerlukan proses metabolisme sehingga tidak langsung bekerja secara lokal pada luka (Zhang *et al.*, 2007). Pemberian secara oral yang telah mengalami metabolisme akan beredar secara sistemik dan memberi pengaruh terhadap kulit dan pankreas.

Flavonoid secara umum ditemui pada jenis buah jeruk dan memiliki efek salah satunya antioksidan dan anti-inflamasi (Pinho-Riberio *et al.*, 2015). Kondisi diabetes mellitus menyebabkan luka insisi mengalami proses inflamasi yang lebih lama akibat terjadinya disfungsi metabolik pada sel tubuh (Chen *et al.*, 2012). Penurunan kondisi inflamasi terjadi karena salah satu flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin memiliki sifat anti-inflamasi (Vinayagam *and* Xu, 2015).

Flavonoid sebagai agen anti-inflamasi membuat fase inflamasi pada luka berlangsung lebih singkat. Flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk menghambat proses inflamasi yang terjadi dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX) pada kaskade asam arakidonat sehingga menghambat mediator inflamasi (Kartikaningtyas, dkk., 2015). Selain pada kaskade asam arakidonat, hesperidin juga menurunkan pembentukan radikal bebas dan sitokin proinflamasi (Vinayagam *and* Xu, 2015).

Pada kondisi diabetes, sumber utama radikal bebas pada sel beta pankreas adalah gangguan pada membran mitokondria yang menghasilkan ion superoksida ( $O_2^-$ ). Ion superoksida dapat bereaksi dan berubah menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Hidrogen peroksida dapat dikonversi menjadi radikal hidroksil ( $HO^\cdot$ ) yang bersifat reaktif. Selain ion superoksida, radikal nitrit oksida juga dapat membentuk radikal bebas lain dalam bentuk peroksinitrit ( $ONO_2^\cdot$ ) (Gerber *and* Rutter, 2017). Radikal bebas ini memiliki efek merusak pada asam ribonukleat, protein, dan lipid dan berpotensi menyebabkan apoptosis sel pankreas (Acharya *and* Ghaskadbi, 2010; Gerber *and* Rutter, 2017). Pankreas melawan kondisi stress oksidatif menggunakan enzim katalase, superoksidase dismutase (SOD), dan glutathione peroksidase, tetapi aktivitas enzim tersebut pada pankreas tergolong rendah dibandingkan dengan jaringan lain (Acharya *and* Ghaskadbi, 2010).

Flavonoid lain yang diketahui memiliki efek antioksidan pada jeruk adalah hesperidin dan naringenin. Naringenin dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD pada kondisi hiperglikemia (Hossain *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan hesperidin dalam melawan radikal bebas adalah dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD dan katalase (Bentli *et al.*, 2013). Selain menurunkan kadar radikal bebas intrasel, hesperidin juga menurunkan aktivitas oksidasi terhadap lipid dan protein sehingga dapat mencegah terjadinya aktivasi kaspase p38 yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis superoksida (Liu *et al.*, 2017).

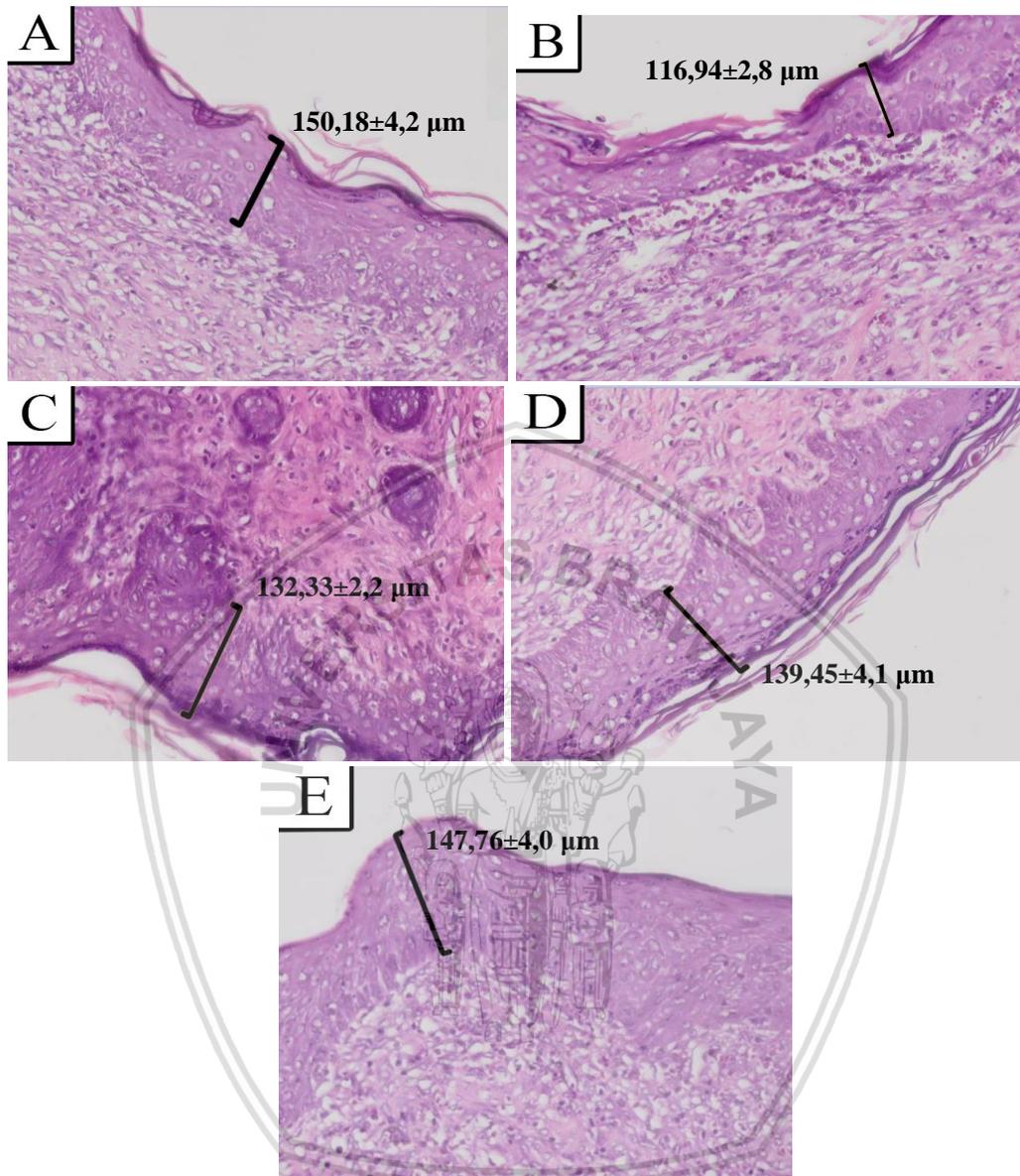
Pengaruh flavonoid yang dikandung oleh kulit jeruk terhadap pankreas dan kondisi diabetik secara umum ditunjukkan oleh berbagai jenis flavonoid. Tangeretin dan diosmin membantu meningkatkan aktivitas enzim glikolitik dengan merangsang sel  $\beta$  pankreas untuk menghasilkan insulin dengan efek antioksidan yang dimiliki (Vinayagam *and* Xu, 2015). Penekanan kondisi hiperglikemia akan membantu menurunkan jumlah radikal bebas dan akan mengurangi pembentukan AGE sehingga mengurangi produksi radikal bebas berkelanjutan (Panigrahy *et al.*, 2016). Penurunan radikal bebas dapat mengurangi terjadinya kaskade inflamasi yang dapat menjadi salah satu aktivitas yang meningkatkan kadar IL-6 (Reis *et al.*, 2012).

Penurunan ekspresi IL-6 paling tinggi diamati pada perlakuan dengan terapi kombinasi antara terapi oral dan terapi topikal. Hal ini terjadi karena pemberian secara oral dari ekstrak kulit jeruk manis memiliki kandungan vitamin C dan flavonoid yang mampu menurunkan aktivitas radikal bebas dan inflamasi yang terjadi pada tikus yang mengidap diabetes melitus. Aktivitas radikal bebas yang ditekan dan pencegahan terjadinya apoptosis (Bentli *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017) membantu mengurangi kerusakan pada pankreas dan dapat membantu meningkatkan produksi insulin (Vinayagam *and* Xu, 2015) untuk mengatur kondisi hiperglikemia. Penurunan jumlah radikal bebas akan mengurangi pembentukan AGE sehingga mengurangi produksi radikal bebas berkelanjutan (Panigrahy *et al.*, 2016). Pemberian secara topikal dari salep ekstrak kulit jeruk manis yang memiliki efek anti-inflamasi yang dapat langsung bekerja pada area luka (Ahmad, *et al.*, 2013;

Ramasamy dan Bhaskar, 2016). Kombinasi terapi ini memiliki efek sinergis yang dapat menurunkan ekspresi IL-6 sehingga mempercepat fase inflamasi sehingga proses kesembuhan luka dapat dilanjutkan ke fase proliferasi dan remodeling.

## **5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ketebalan Epidermis pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes**

Salah satu indikator keberhasilan pemberian terapi ekstrak kulit jeruk pada luka insisi tikus model diabetes mellitus melalui pengamatan histopatologi adalah ketebalan epidermis dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Epidermis merupakan salah satu lapisan kulit terluar dan tersusun oleh sel keratinosit yang diperbarui melalui mitosis sel basal (Kalangi, 2013). Diferensiasi sel keratinosit pada membran basal dipengaruhi oleh fibroblas dan Interleukin-6 (Prasetyono, 2009) dimana pada kondisi diabetes terjadi gangguan aktivitas pada fibroblas dan IL-6 (Reis *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2007). Penilaian ketebalan epidermis dilakukan dengan cara mengukur keratinosit pada stratum basal hingga mencapai lapisan terluar pada preparat HE luka insisi tikus (**Gambar 5.3**).



**Gambar 5.3** Gambaran histopatologi epidermis dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) pada luka insisi tikus model diabetes (Perbesaran mikroskop 100x).

Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral effervescent kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep. Tanda (■) menunjukkan tebal epidermis.

Pengamatan ketebalan epidermis pada preparat HE dilakukan dengan mengukur masing-masing ulangan dengan penilaian pada 5 hasil pengukuran

dengan perbesaran 100x pada semua tikus. Ketebalan epidermis diukur menggunakan *OptiLab Image Raster 3.0* dan didapatkan hasil dalam bentuk  $\mu\text{m}$ . Pengukuran dilakukan dengan mengukur epidermis dari perbatasan antara stratum basal epidermis dan papilla dermis hingga ke bagian stratum korneum terluar yang masih menyatu pada jaringan kulit.

Data yang telah diperoleh kemudian dianalisa menggunakan *software IBM SPSS Statistic 23 for Windows*. Uji yang dilakukan adalah uji homogenitas dan normalitas data dimana kemudian dilanjutkan dengan pengujian *one way ANOVA*. Setelah pengolahan *one way ANOVA*, dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata ketebalan epidermis yang signifikan. Hasil uji BNJ tersebut dapat dilihat pada **Tabel 5.2** berikut:

**Tabel 5.2** Rata-rata Hasil Uji BNJ Ketebalan Epidermis pada Kelompok Tikus Perlakuan

Kelompok	Tebal Epidermis		
	Rata-rata (tebal) $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )	Peningkatan terhadap K+ (%)	Penurunan Terhadap K- (%)
1 (Kontrol negatif)	150,18 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	-	-
2 (Kontrol positif)	116,94 $\pm$ 2,8 <sup>c</sup>	-	22,04%
3 (Terapi Oral)	132,33 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	13,16%	-
4 (Terapi Salep)	139,45 $\pm$ 4,1 <sup>b</sup>	19,24%	-
5 (Terapi Kombinasi)	147,76 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	26,35%	-

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

Rata-rata tebal epidermis pada kelompok kontrol negatif (K-) sebesar 150,18  $\pm$  4,2  $\mu\text{m}$  yang digunakan sebagai acuan dan pembanding terhadap ekspresi pada kelompok kontrol positif (K+). Penebalan epidermis pada kelompok K- menunjukkan perbedaan 22,04% terhadap kelompok K+

dengan rata-rata pada kelompok K+ sebesar  $116,94 \pm 2,8 \mu\text{m}$ . Aktivitas penebalan epidermis pada kondisi normal ditentukan oleh fibroblas dan sitokin salah satunya IL-6 (Prasetyono, 2009), tetapi pada kondisi diabetes terjadi disfungsi IL-6 dan menyebabkan hambatan pada tahap migrasi fibroblas (Shen *et al.*, 2017). Fibroblas memiliki peran penting pada penebalan epidermis yaitu dalam meningkatkan ekspresi KGF (Prasetyono, 2009).

Hasil penggunaan terapi ekstrak kulit jeruk manis menunjukkan adanya peningkatan tebal epidermis pada masing-masing perlakuan terhadap kelompok kontrol positif. Penebalan epidermis pada kelompok terapi oral menunjukkan peningkatan sebesar 13,16% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $132,33 \pm 2,2 \mu\text{m}$ . Penebalan epidermis pada kelompok terapi salep menunjukkan peningkatan sebesar 19,24% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $139,45 \pm 4,1 \mu\text{m}$ . Penebalan epidermis pada kelompok terapi kombinasi oral dan topikal menunjukkan peningkatan sebesar 26,35% dengan rata-rata ekspresi sebanyak  $147,76 \pm 4,0 \mu\text{m}$ .

Peningkatan yang ditunjukkan oleh terapi oral effervescent kulit jeruk hampir serupa dengan pemberian terapi secara topikal tetapi hasil menunjukkan bahwa terapi topikal lebih unggul dengan selisih 6,08%. Faktor yang mempengaruhi efek pemberian secara oral yaitu rute ini memerlukan proses metabolisme sehingga tidak langsung bekerja secara lokal pada luka (Zhang *et al.*, 2007). Faktor yang tidak dijumpai pada tikus kelompok terapi oral adalah perlakuan terhadap kulit yaitu perlindungan pada luka. Kelompok

terapi topikal mendapat perlakuan pemberian salep yang memiliki sifat emolien (Usha *and* Ashish, 2015) dan mempertahankan kelembaban luka. Reepitelisasi luka pada kondisi yang lebih lembab menunjukkan proses yang lebih baik dibandingkan pada luka dalam kondisi kering (Rosique *et al.*, 2015).

Kulit jeruk manis diketahui memiliki kandungan vitamin A, C, E, dan flavonoid terutama hesperidin dan polimetoksisflavone. Pada penggunaan terapi ekstrak kulit jeruk manis secara topikal diketahui bahwa vitamin dan flavonoid memiliki peran dalam pembentukan epitel. Vitamin A melindungi jaringan dari invasi mikroorganisme dengan cara menginduksi sekresi mukus pada permukaan sel epitel. Vitamin C membantu meningkatkan migrasi leukosit ke daerah luka sebagai agen pertahanan. Vitamin E memiliki aktivitas anti-inflamasi dengan cara melakukan blokade pada jalur prostaglandin E<sub>2</sub> (Kartikaningtyas dkk., 2015).

Flavonoid membantu melakukan regulasi ekspresi matriks ekstraseluler (ECM) dan enzim matriks metalloproteinase (MMP). Penggunaan hesperidin secara topikal menunjukkan aktivitas antibakteri dan polimetoksisflavone membantu dalam mengurangi kuantitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2) (Kartikaningtyas dkk., 2015). Pemberian Hesperidin diketahui dapat mengurangi gejala inflamasi akibat aktivitas inhibisi terhadap prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2</sub>, dan tromboksan A (Liu *et al.*, 2012).

Vitamin C merupakan kandungan vitamin tertinggi pada kulit jeruk manis yang menunjukkan aktivitas antioksidan tinggi (Aj and Lo, 2016). Pemberian vitamin C secara oral pada kondisi normal menunjukkan peningkatan proliferasi fibroblas, deposisi kolagen, dan mempercepat kesembuhan luka (Nai *et al.*, 2014). Penggunaan vitamin C secara topikal juga menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah vitamin C pada jaringan kulit dan dapat mempercepat terjadinya penyembuhan luka (Sarpooshi *et al.*, 2016). Faktor yang mempengaruhi perbedaan antara proses reepitelisasi pada kelompok terapi oral dan kelompok terapi topikal adalah kondisi diabetes. Pada terapi oral, vitamin C diserap dalam jumlah sedikit oleh usus (Sarpooshi *et al.*, 2016) dan berada dalam kondisi radikal bebas yang tinggi akibat kondisi hiperglikemia (Raza *et al.*, 2011) sehingga pengaruh pada proses reepitelisasi kurang maksimal. Sebaliknya pada terapi topikal, vitamin C sebagai antioksidan dan penunjang aktivitas penyembuhan luka dapat lebih menunjukkan pengaruh karena lebih terlokalisasi pada satu tempat.

Gambaran makroskopis dan data menunjukkan bahwa kelompok terapi topikal lebih unggul dalam penutupan luka dibandingkan dengan terapi oral. Hal tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh faktor aktivitas flavonoid dan vitamin C secara langsung karena memiliki sifat yang mudah terserap pada lapisan kulit melalui difusi pasif (Alkilani *et al.*, 2015; N'Da, 2014). Kondisi diabetes dengan stres oksidatif yang tinggi mengakibatkan pembentukan AGE. Pada kondisi diabetes, terjadi akumulasi AGE yang menyebabkan gangguan pada matriks ekstraseluler. Glikosilasi yang terjadi

pada kolagen menyebabkan gangguan pada aktivitas fibroblas dan mengakibatkan terjadinya kesulitan dalam melakukan kontraksi luka (Tracy *et al.*, 2016).

Pemberian hesperidin secara topikal pada kulit meningkatkan homeostasis permeabilitas epidermis dan merangsang proliferasi epidermis pada kulit. Hesperidin bekerja bersama vitamin E dalam meningkatkan transglutaminase-1 dan aktivitas PPAR yang berperan penting dalam homeostasis kulit (Hou *et al.*, 2012). Vitamin C dapat disimpan di keratinosit dalam bentuk utuh maupun dalam bentuk teroksidasi. Vitamin C memiliki peran dalam mengurangi jumlah radikal bebas, mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas, mempertahankan keseimbangan redoks untuk melakukan proses diferensiasi keratinosit, dan membantu regulasi apoptosis pada sel yang mengalami kerusakan DNA (Catani *et al.*, 2005).

Pemberian topikal dapat mengurangi radikal bebas yang akan mempengaruhi jumlah AGE. Penurunan jumlah AGE akan mengurangi gangguan pada kolagen. Papila dermis tersusun oleh banyak kolagen yang meliputi kolagen tipe I, III, dan IV. Kolagen tipe I meningkatkan aktivitas proliferasi dan migrasi fibroblas ke papila dermis, dimana jaringan ini disusun oleh kolagen tipe I, kolagen III dan dibatasi oleh kolagen tipe IV serta VII pada perbatasan dermis dan epidermis (Tracy *et al.*, 2016). Fibroblas dapat menghasilkan IL-6 yang berfungsi menginduksi makrofag untuk mengeluarkan enzim MMP-1 (Sundararaj *et al.*, 2009) yang merupakan salah

satu enzim yang membantu proses reepitelisasi dan migrasi sel (salah satunya keratinosit) (Nagase *et al.*, 2006).

Hasil pada kelompok perlakuan kombinasi antara terapi oral dan terapi topikal menunjukkan penebalan epidermis paling signifikan dibandingkan dengan kelompok terapi lain. Aktivitas pengobatan secara oral berkontribusi dalam mengatasi kondisi inflamasi secara sistemik dan membantu mengatasi kondisi hiperglikemia, dimana diketahui beberapa flavonoid dan vitamin C pada kulit jeruk manis memiliki pengaruh terhadap aktivitas proinflamasi dan aktivitas antioksidan (Nai *et al.*, 2014; Vinayagam and Xu, 2015). Pemberian terapi topikal dapat memberi efek protektif pada luka (Kartikaningtyas dkk., 2015) dan membantu aktivitas reepitelisasi pada kulit dengan menurunkan kondisi inflamasi (Ahmad, *et al.*, 2013). Vitamin C akan meningkatkan aktivitas fibroblas (Nai *et al.*, 2014) sehingga dapat menunjang proses migrasi fibroblas pada awal fase perlukaan (Braithwaite-Wikman *et al.*, 2007; Pastar *et al.*, 2013). Peralihan fase inflamasi pada kondisi diabetes yang lebih cepat menuju fase proliferasi akan meningkatkan aktivitas proliferasi keratinosit yang bermigrasi sehingga penyembuhan luka dan penebalan epidermis dapat berlangsung lebih cepat.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa efek terapi pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) pada luka insisi tikus model diabetes adalah sebagai berikut:

1. Pemberian terapi kombinasi ekstrak kulit jeruk manis secara oral 500 mg/kgBB dan topikal konsentrasi 5% lebih efektif menurunkan ekspresi IL-6 pada tikus model diabetes melitus sebesar 33,40% dibandingkan dengan terapi secara terpisah.
2. Pemberian terapi kombinasi ekstrak kulit jeruk manis secara oral 500 mg/kgBB dan topikal konsentrasi 5% pada luka insisi tikus model diabetes melitus dapat membantu meningkatkan penebalan epidermis sebesar 26,35%.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk membandingkan tingkat kesembuhan luka insisi tikus model diabetes menggunakan obat-obatan konvensional yang beredar di masyarakat dengan salep dan effervescent ekstrak kulit jeruk manis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M., M. N., Ansari, A., Alam, and T.H., Khan. 2013. Oral Dose of Citrus Peel Extract Promotes Wound Repair in Diabetic Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16 (20): 1086-1094
- Acharya, J. D., and S. S., Ghaskadbi. 2010. Islets and their antioxidant defense. *Islets*: 224-235
- Ahmed, O. A., A. M., Mahmoud, A., Abdel-Moneim, and B., Ashour. 2012. Antidiabetic Effects of Hesperidin and Naringin in Type 2 Diabetic Rats. *Diabetologia Croatia* 41(2): 53-67
- Aj, U., and I., Io. 2016. Comparative studies of phytochemical and vitamin constituent of citrus sinensis and vitis vinifera peels. *EC Nutrition* 4(2): 812-816
- Alizadeh, A. M. 2010. The effect of Teucrium polium honey on the wound healing and tensile strength in rat. *Iranian Journal of Basic Medical Science* 14 (6): 499-505
- Alkilani, A. Z., M. T. C., McCrudden, and R. F., Donnelly. 2015. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutica Development Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* 7: 438-470
- Al-Snafi, A. E. 2016. Nutritional Value and Pharmacological Importance of Citrus Species Grown in Iraq. *IOSR Journal of Pharmacy* 6(8): 76-108
- Altavilla, D., A., Saitta, D., Cucinotta, M., Galeano, B., Deodato, M., Colonna, V., Torre, G., Russo, A., Sardella, G., Urna, G. M., Campo, V., Cavallari, G., Squadrito, and F., Squadrito. 2001. Inhibition of lipid peroxidation restore impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 50: 667-674
- American Diabetes Association. 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Melitus. *Diabetes Care* 35(1): 64-71
- Animal Care & Use Standard Committee and Animal Welfare & Ethics Committee. 2016a. Administration of Substance by Oral Gavage in Mice and Rats. Office for Research Ethics & Integrity. The University of Melbourne.

- Animal Care & Use Standard Committee *and* Animal Welfare & Ethics Committee. 2016b. Humane Killing of Mice and Rats. Office for Research Ethics & Integrity. The University of Melbourne.
- Arora, M. and P., Kaur. 2013. Phytochemical Screening of Orange Peel and Pulp. *International Journal of Research in Engineering and Technology* 2 (12): 517-522
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Balqis, U., Rasmaidar, dan Marwiyah. 2014. Gambaran histopatologi penyembuhan luka bakar menggunakan daun kedondong (*Spondias dulcis* F.) dan minyak kelapa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria* 8 (1): 31-36
- Baranoski, S. and E. A., Ayello. 2012. Wound Care Essentials 3<sup>rd</sup> Edition – Practice Principles. Ambler: Lippincott Williams & Wilkins
- Baratawidjaja, K. G. 2006. Imunologi Dasar Edisi ke-7. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Baratawidjaja, K. G., dan I., Rengganis. 2013. Imunologi Dasar Edisi ke-10. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Barros, H. R., T. A. P., Ferreira, and M. I., Genovese. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from brazil. *Food Chemistry* 134: 1892-1898
- Baynest, H. B. 2015. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*
- Bentli, R., O., Ciftci, A., Cetin, M., Unlu, N., Basak, and M., Cay. 2013. Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Eur. Cytokine Net.* 24(2): 91-6
- Berata, I K., A. A. G., Arjana, I W., Sudira, I M., Merdana, I K., Budhiasa, dan I. B. M., Oka. 2010. Studi Patologi Kejadian Cysticercosis pada Tikus Putih. *Jurnal Veteriner* 11 (4): 232-237
- Berg, J. M., J. L., Tymoczko, and L., Stryer. 2002. Biochemistry 5<sup>th</sup> Edition. New York: W. H. Freeman
- Bhattacharya, S. 2015. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. *Free Radicals in Human Health and Disease*:17-29

- BIO-RAD. 2016. Immunohistochemistry: Tips and Tricks for your IHC-Paraffin Experiments. *Immunohistochemistry*: 1-8
- Bliss, S. 2016. Rodent Anesthesia. Cornell University Institutional Animal Care and Use Committee. 6(5): 1-9
- Braiman-Wiksman, L., I., Solomonik, R., Spira, and T., Tennenbaum. 2007. Novel Insight into Wound Healing Sequence of Events. *Toxicologic Pathology* 35:767-769
- Brasslasu, E. D., C., Bradatan, M., Cornila, I., Savulescu, R., Cojmaleata, and M. C., Braslasu. 2007. Normal Blood Glucose in White Wistar Rat and Its Changes Following Anesthesia. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinaria XI*: 120-123
- Carvalho, E. N. D., N. A. S. D. Carvalho, and L. M. Ferreira. 2003. Experimental Model of Induction of Diabetes Mellitus in Rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 18:60-64
- Catani, M. V., I., Savini, A., Rossi, G., Mellino, and L., Avigliano. 2005. Biological Role of Vitamin C in Keratinocytes. *Nutrition Reviews*: 81-90
- Catchpole, B., J. M., Ristic, L. M., Fleeman, & L. J., Davison. 2005. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks. *Diabetologia*. 48(10): 1948-56
- Castro-Vazquez, L., M. E., Alanon, V., Rodriguez-Robledo, M. S., Perez-Coello, I., Hermosin-Gutierrez, M. C., Diaz-Maroto, J., Jordan, M. F., Galindo, and M. D. M., Arroyo-Jimenez. 2016. Bioactive Flavonoids, Antioxidant Behaviour, and Cytoprotective Effects of Dried Grapefruit Peels (*Citrus paradisi* Mac.). *Oxidative Molecula and Cellular Longevity*: 1-12
- Chaudhary, K., S., Haddadin, R., Nistala, and C., Papageorgio. 2010. Intraperitoneal Drug Therapy: An Advantage. *Current Clinical Pharmacology* 5: 82-88
- Chen, T., E., Xu, H., Lu, H., Xu, S., Wang, H., Zhao, and Y., Liu. 2012. The influence of diabetes enhanced inflammation on cell apoptosis and periodontitis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 712-719
- Chuong, C. M., B. J., Nicklolloff, P. M., Elias, L. A., Goldsmith, E., Macher, P. A., Maderson, J. P., Sundberg, H., Tagami, P. M., Plonka, K., Thestrup-Pedersen, K., B. A., Bernard, J. M., Schroder, P., Dotto, C. H., Chang, M. L., Williams, K. R., Feingold, L. E., King, A. M., Kligman, J. L., Rees &

- E., Christophers. 2002. What is the 'true' function of skin. *Experimental Dermatology* 11: 159-187
- Corleau, J. 2012. Citrus sinensis (L.) Osbeck (pro sp.). <http://eol.org/pages/582206/overview> . [12 Juli 2017]
- Damsch, S., G., Eichebaum, A., Tonelli, L., Lammens, K., Van den Bulck, B., Feven, J., Vandenberghe, A., Megens, E., Knight, and M., Kelley. 2011. Gavage-Related Reflux in Rats: Identification, Pathogenesis, and Toxicological Implications (Review). *Toxicology Pathology* 39: 348-360
- Das, K. 2013. Wound Healing potential of aqueous crude extract of Stevia rebaudiana in mice. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 23(2): 351-357
- Dewi, D. I. 2010. Tikus Riul (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *BALABA* 6 (2): 22-23
- Duque, G. A., and A., Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious disease. *Frontiers in Immunology* 5(491): 1-12
- Etebu, E. and A. B., Nwauzoma. 2014. A Review on sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck): Health, Disease, and management. *American Journal of Research Communication* 2(2): 33-70
- Fajardo, R. J., L., Karim, V. I., Calley, and M. L., Bouxsein. 2014. A Review of Rodent Models of Type 2 Diabetic Skeletal Fragility. *Journal of Bone and Mineral Research* 29(5): 1025-1040
- Fall, T., H. H., Hamlin, A., Hedhammar, O., Kampe, and A., Egenvall. 2007. Diabetes Mellitus in a population of 180.000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *J Vet Intern Med.* 21: 1209-1216
- Fatimatzahroh, N. K., Firani, dan H., Kristianto. 2015. Efektifitas Ekstrak Bunga Cengkeh (*Zyzygium aromaticum*) terhadap Jumlah Pembuluh Darah Kapiler pada Proses Penyembuhan Luka Insisi Fase Proliferasi. *Majalah Kesehatan FKUB* 2 (2): 92-98
- Favela-Hernandez, J. M. J., O., Gonzales-Santiago, M. A., Ramirez-Cabrera, P. C., Esquivel-Ferrino, and M., Camacho-Corona. 2016. Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis. *Molecules* 21 (247): 1-24
- Fitria, L. dan M., Sarto. 2014. Profil Hematologi Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Jantan dan Betina Umur 4, 6, dan 8 Minggu. *Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi* 2 (2): 94-100.

- Flanagan, M. 2000. The Physiology of Wound Healing. *Journal of Wound Care* 9 (6): 299-300
- Furman, B. L. 2015. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47.1-5.47.20
- Frossi, B., M., De Carli, K. C., Daniel, J., Rivera, and C., Pucillo. 2003. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 33: 2168-2177
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 8 (2): 1-6
- Gal, P., R., Kilik, M., Mokry, B., Vidinsky, T., Vasilenko, S., Mozes, N., Bobrov, Z., Tomori, J., Bober, & I., Lenhardt. 2008. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and semi-qualitative histological assessment. *Veterinarni Medicina.* 53 (12): 652-659
- Galucci, R. M., D. K., Sloan, J. M., Heck, A. R., Murray, and S. J., O'Dell. 2004. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J. Invest. Dermatol* 122: 764-772
- Gerber, P. A., and G. A., Rutter. 2017. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxidants & Redox Signaling* 26(10): 510-518
- Gina, L. P., C., Mahdi, dan Aulanni'am. 2014. The influence water extract of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) on reducing of blood glucose level and the superoxide dismutase (SOD) activity on diabetes mellitus rats induced with multiple low dose of streptozotocin (MLD-STZ). *J. Pure App. Chem. Res.* 3 (3): 131-137
- Golebiewska, E. M. and A., Poole. W. 2015. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood review* 29 (3): 153-162
- Gonzales, G. B., C., Grootaent, G., Smaghe, and M., Zeti. 2015. Flavonoid interaction during digestion, absorption, distribution and metabolism: A Sequential structure-activity/property relationship approach in the study of bioavailability. *Drug Metabolism Review:* 1-16
- Gossiau, A., K. Y., Chen, C., Ho, and S., Li. 2014. Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extracts enriched with bioactive polymethoxyflavones. *Food science and human wellness* 3: 26-35

- Goud, B. J., V., Dwarakanath, & B. K. C., Swamy. 2015. Streptozotocin – A diabetogenic agent in animal model. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research* 3 (1): 253-269
- Guo, S. and L. A., DiPietro. 2010. Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* 89(3): 219-229
- Hanel, K. H., C., Cornellissen, B., Luscher, and J. M., Barin,. 2013. Cytokines and the Skin Barrier. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6720-6745
- Henson, M. S. and T., O'Brien. 2006. Feline Models of Type 2 Diabetes Mellitus. *ILAR Journal.* 47 (3): 234-242
- Hewajuli, D.A. dan NLPI, Dharmayanti. 2016. Disregulasi Sitokin pada Unggas dan Mamalia yang Terinfeksi Virus Avian Influenza. *WARTAZOA* 26 (1): 27-38
- Hossain, M. K., A. A., Dayem, J., Han, Y., Yin, K., Kim, S. K., Saha, G., Yang, H. Y., Choi, and S., Cho. 2016. Molecular mechanism of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International Journal of Molecular Science* 17(569): 1-32
- Hubrecht, R. C. and J., Kirkwood. 2010. *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory and other research animal 8<sup>th</sup> edition.* West Sussex: Wiley-Blackwell Publishing
- Hoening, M. 2003. Diabetes in Pets. *Diabetes Voice* 48 (1): 34-35
- Hoening, M. 2014. Comparative Aspects of human, canine, and feline obesity and factors predicting progression to diabetes. *Vet. Sci.* 1: 121-135
- Hollman, P. C. H. 2008. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42: 74-83
- Hou, M., M., Man, W., Man, W., Zhu, M., Hupe, K., Park, D., Crumrine, P. M., Elias, and M., Man. 2012. Topical Hesperidin Improves Epidermal Permeability Barrier Function and Epidermal Differentiation in Normal Murine Skine. *Exp Dermatol* 21 (5): 337-340
- Iacovone, A., M. P., Munhoz, and A., Rizzato. 2010. Effervescent Powder Formulation for Beverages and Its Use. *Patent Application Publication US 2010/0003384 A1*
- Ipci, K., T., Oktemer, L., Birdane N. Altintoprak, N.B., Muluk, D., Passali, A., Lopatin, L., Belussi, R., Mladina, R., Pawankar, and C., Cingi. 2016.

Effervescent tablets: a safe and practical delivery system for drug administration. *ENT Updates 2016* 6(1): 46-50

Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. *In Service I – Pelatihan Penulisan Artikel Ilmiah LPMP Provinsi DIY*

Joshi, S. R., R. M., Parikh and A. K., Das. 2007. Insulin – History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *Supplement of Japi* 55: 19-25

Kalangi, S. J. R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik* 5 (3): s12-20

Kartikaningtyas, A. T., Prayitno, dan S. P., Lastianny. 2015. Pengaruh aplikasi gel ekstrak kulit citrus sinensis terhadap epitelisasi pada penyembuhan luka gingiva tikus sprague dawley. *Maj Ked Gi Ind* 1(1): 86-93

Khan, R. A. 2014. Effect of Citrus sinensis (Sweet orange) on coagulation. *South Asian J. Exp. Biol.* 4 (2): 54-60

Khanna, S., S., Biswa, Y., Shang, E., Collard, A., Azad, C., Kauh, V., Bhaskar, G. M., Gordillo, C. K., Sen, and S., Roy. 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS ONE* 5 (3): 1-12

Kumar, S. and A. K., Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: AN Overview. *The Scientific World Journal* 2013: 1-16

Kusriningrum, R. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya

Leary, S., D., Underwood, R., Anthony, S., Cartner, D., Corey, T., Grandin, C., Greenace, S., Gnawley-Brant, M. A., McCrackin, R., Meyer, D., Miller, J., Shearer, R., Yanong, G. C., Golab, and E., Patterson-Kane. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association. Schaumburg

Lin, Z., T., Kondo, Y., Ishida, T., Takayasu, and N., Mukaida. 2003. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 73: 713-721

Liu, W. Y., S., Liou, T., Hong, and I., Liu. 2017. Protective effect of hesperidin (citrus flavonone) on high glucose induced oxidative stress apoptosis in a cellular model for diabetic retinopathy. *Nutrients* 9 (1312): 1-15

- Liu, Y., E., Heying, and S. A., Tanumihardjo. 2012. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 530-545
- Lorenzi, M. 2007. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research* 2007: 1-10
- Lukic, M. L., N., Pejnovic, and A., Lukic. 2014. New insight into early events in type 1 diabetes: role for islet stem cell exosome. *Diabetes* 63: 835-837
- Maggio, M., J. M., Guralnik, D. L., Longo, and L., Ferucci. 2006. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J. Gerontol. A. Biol. Med. Sci.* 61 (6): 575-584
- Martin, P. and R., Nunan. 2015. Cellular and molecular mechanism of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology* 173: 370-378
- Maula, I. F. 2014. Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley Secara In Vitro [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Syarif Hidayatullah Jakarta.
- McCann, T. M., K. E., Simpson, D. J., Shaw, J. A., Butt, & D. A., Gunn-Moore. 2007. Feline diabetes mellitus in the UK: the prevalence within an insured cat population and a questionnaire-based putative risk factor analysis. *Journal of Feline Medicine & Surgery.* 9(4): 289-299
- McFarland-Mancini, M., H. M., Funk, A. M., Paluch, M., Zhou, P. V., Giridhar, C. A., Mereer, S. C., Kozma, and A. F., Drew. 2010. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. *The Journal of Immunology* 184: 7219-7228
- McGrath, J. A., R. A. J., Eady, and F. M., Pope. 2004. Rook's Textbook of Dermatology 7<sup>th</sup> Edition. New Jersey: Blackwell Publishing
- Mendes, J. J., C. I. Leandro, D. P., Bonaparte, and A. L., Pinto. 2012. A Rat Model of Diabetic Wound Infection for the Evaluation of Tropical Antimicrobial Therapies. *Comparative Medicine* 62(1): 37-48
- Mekaj, Y. M. 2015. The roles of platelets in inflammation, immunity, wound healing and malignancy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9(3): 5347-5358

- M'hiri, N., I., Ioannou, M., Ghoul, and N. M., Boudhrioua. 2014. Extraction methods of citrus peel phenolic compound – a review. *Food Review International*: 1-58
- Miao, M., Y., Niu, T., Xie, B., Yuan, C., Qing, and S., Lu. 2012. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair Regen* 20 (2): 203-213
- Milind, P. and C., Dev. 2012. Orange: range of benefits. *International Research Journal of Pharmacy* 3 (7): 59-63
- Mirza, R. E., M. M., Fang, E. M., Weinheimer-Haus, W. J., Ennis, and T. J., Koh. 2014. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes* 63: 1103-1114
- Muhtadi, Haryoto, T., Azizah, A., Suhendi, dan K. H., Yen. 2015. Antidiabetic and antihypercholesterolemic activities of Citrus sinensis peel: in vivo study. *National Journal of Physiology, Pharmacy, and Pharmacology* 5(5): 382-385
- Nai, G. A., L. M. F., Manzoli, T. C. I., Silva, L. Q., Mamede, M. E. O. M., Disconzi, and R., Giuffrida. 2014. Action of ascorbic acid on the healing of malnourished rats skin wound. *Rev Nutr Campinas* 27(4): 459-472
- Nagase, H., R., Visse, and G., Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinase and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69: 562-573
- Nair, A., S. Jacob, B., Al-Dhubiab, M., Attimarad, and S., Harsha. 2013. Basic Consideration in the Dermatokinetics of Topical Formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49 (3): 423-434
- Nelson, R. W. and C. E., Reusch. 2014. Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *Journal of Endocrinology*. 222: T1-T9
- Nogata, Y., K., Sakamoto, H., Shiratsuchi, T., Ishii, M., Yano, and H., Ohta. 2014. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70: 1.178-192
- Novidiyanto & A., Setyowati. 2008. Formulasi serbuk effervescent sari wortel (Daucus carota). *AGRITECH* 28 (4): 150-156
- N'Da, D. D. 2014. Prodrug Strategies for Enhancing the Percutaneous Absorption of Drugs. *Molecules* 19: 20780-20804
- Obidi, O. F., A. O., Adelowotan, G. A., Ayoola, O. O., Johnson, M. O., Hassan, and S. C. U., Nwachukwu. 2013. Antimicrobial Activity of Orange Oil on

Selected Pathogens. *The International Journal of Biotechnology* 2(6): 113-122

Oguntibeju, O. O. 2013. *Diabetes Mellitus – Insights and Perspectives*. Rijeka: INTECHOPEN

Onyekwelu, I., R., Yakkani, L., Protzer, C. M., Pinkston, C., Tucker, and D., Seligson. 2017. Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient. *JAAOS Glob Res Rev* 1 (e022): 1-10

Omoba, O. S., R. O., Obafaye, S. O., Salawu, A. A., Bollgon, and M. L., Athayde. 2015. HPLC-DAD Phenolic Characterization and Antioxidant Activities of Ripe and Unripe Sweet Orange Peels. *Antioxidants* 4: 498-512

Orsted, H. L., D., Keast, L., Forest-Lalande, and M. F., Megle. 2011. Basic principles of wound healing. *Wound Care Canada* 9 (2): 4-12

Ousey, K., K. F., Cutting, A. A., Rogers, and M G., Rippon. 2016. The Importance of Hydration in Wound Healing: Reinvigorating the Clinical Perspective. *Journal of Wound Care* 25 (3): 122-130

Ozdemir, O., P. P., Akalin, N., Baspinar, and F., Hatipoglu. 2009. Pathological Changes in The Acute Phase of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 53:783-790

Palasinamy, P., R. Abhishekh, D. Yogana. 2011. Formulation and Evaluation of Effervescent Tablets of Aceclofenac. *IRJP* 2 (12)

Panigrahy, S. K, R., Bhatt, and A., Kumar. 2016. Reactive oxygen species: sources, consequences, and targeted therapy in type II diabetes. *Journal of Drug Targeting* 1029-2330: 1-37

Pastar, I., O., Stojandinovic, N. C., Yin, H., Ramirez, A. G., Nusbaum, A., Sawaya, S. B., Patel, L., Khalid, R. R., Isseroff, and M, Tomic-Canic. 2013. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Advances in Wound Care* 3(7): 445-464

Prasetyono, T. O. H. 2009. General concept of wound healing, revisited. *Med. J. Indones.* 18 (3): 208-215

Purwandari, L.E. 2007. Optimasi Campuran Asam Sitrat-Asam Tartrat dan Natrium Bikarbonat sebagai Eksipien dalam Pembuatan Granul Effervescent Ekstrak Rimpang Temulawak secara Granulasi Basah dengan Metode Desain Faktorial [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma

- Putnik, P., D. B., Kovacevic, A. R., Jambrak, F. J., Barba, G., Cravotto, A., Binello, J. M., Lorenzo, and A., Sphigelman. 2017. Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value comounds from citrus wastes – a review. *Molecules* 22: 1-24
- Rachel, A. A. R., K. B., Roger., K. N., Ysidor and B. G., Henri. 2013. Assessment of Physicochemical and Mineral Characters of The Orange (*Citrus sinensis*) Peels. *Journal of Asia Scientific Research* 3(12): 1181-1190
- Rahayu, F., F. W. W., Ade, dan W., Rahayu. 2013. Pengaruh pemberian topikal gel lidah buaya (*Aloe chinensis Baker*) terhadap reepitelisasi epidermis pada luka sayat kulit mencit (*Mus musculus*) [Artikel Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Riau.
- Ramasamy, S. S. and A., Bhaskar. 2016. Evaluation of the wound-healing potency of *Citrus sinensis* in wistar rats. *Der Pharmacia Lettre* 8(1): 161-168
- Raza, H., S. K., Prabu, A., John, and N., Avadhani. 2011. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular science* 12: 3133-3147
- Reis, J. S., C. A. V., Amaral, C. M. O., Volpe, J. S., Fernandes, E. A., Borges, C. A., Isoni, P. M., Ferreira dos Anjos, and J. A. N., Machado. 2012. Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 56(7): 441-448
- Riyanti, H., S. B. I., Simanjuntak, dan H., Winarsi. 2014. Aktivitas Glutation Peroksidase dan Kadar Gula Darah Tikus Diabetes yang Diberi Ekstrak Daun Kapulaga. *Scripta Biologica* 1(2): 153-156
- Rohmawati, N. 2008. Efek Penyembuhan Luka Bakar dalam Sediaan Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Lidah Buaya (*Aloe vera L.*) pada Kulit Punggung Kelinci *New Zealand*. [Skripsi]. Fakultas. Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Rosique, R. G., M. J., Rosique, and J. A. F., Junior. 2015. Curbing inflammation in skin wound healing: a review. *International Journal of Inflammation* 316235: 1-9
- Ruela, A. L. M., A. G., Perissinato, M. E. D., Lino, P. S., Mudrik, and G. R., Pereira. 2016. Evaluation of skin absorption of drugs from topical transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 52 (3): 527-544
- Saha, K. J., J., Xia, S. K., Engle, Y., Chen, W., Glaesner, and J. A., Jakubowski. 2006. A Model of Controlled Acute Hyperglycemia in Rats: Effects of

- Insulin and Glucagon-Like Peptide-1 Analog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:1159-1164
- Sakai, J. Bellis. 2008. Practical Pharmacology for the Pharmacy Technician. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins
- Sallam, A. A. W., and A. M. H., El-Sharawy. 2012. Role of Interleukin-6 (IL-6) and indicators of inflammation in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *Australian journal of basic and applied sciences* 6 (6): 430-435
- Santosh, H. N. And David, C. M. 2017. Role of ascorbic acid in diabetes mellitus: a comprehensive review. *Journal of Medicine, Radiology, Pathology and Surgery* 4: 1-3
- Sarpooshi, H. R., F., Mortazavi, M., Vaheb, and Y., Tabarayee. 2016. The effects of topical vitain c solution on burn wounds granulation: a randomized clinical trial. *J. Biomed*: e8301
- Setyowati, E. 2014. Aktivitas antidiabetes melitus ekstrak kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis*) dan kulit buah kelengkeng (*Euphoria longan* (Lour.) Steud) terhadap tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi aloksan [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shaikh, P. Z. 2011. Cytokies & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: a review. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences* 2 (11): 1247-1263
- Shamloo, M. M., M., Sharifani, and A. D., Garmakhany. 2015. Alternation of secondary metabolites and quality attributes in Valencia Orange fruit (*Citrus sinensis*) as influenced by storage period and edible covers. *Journal of Food Science Technology* 52 (4): 1936-1947
- Sharma, S. 2015. Topical Drug Delivery System. <http://www.pharmainfo.net>. [6 April 2018]
- Shen, T. N., S., Kanazawa, M., Kado, K., Okada, L., Luo, A., Hayashi, H., Mizuno, and R., Tanaka. 2017. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PloS ONE* 12(5):1-19
- Siddiqui, A. A., S. A., Siddiqui, S., Ahmad, S., Siddiqui, L., Ahsan, and K., Sahu. 2013. Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review. *International Journal f Drug Development & Research*. 5(2): 1-23
- Skudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*. 50: 536-546

- Soeatmadji, D.W., F., Fatchiyah, and B.S., Sumitro, and Aulanni'am. 2005. Detection of GAD 65 Auto Antibodies Of type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Produce From Bovine Brain Tissue. *Medical Journal of Indonesia* 14:109-205
- Soltesova, D. and I., Herichova. 2011. On the mechanism diabetogenic effects of the alloxan and stretozotocin. *Diabetologie* 14 (3): 130-138
- Spector, D. L. and R. D., Goldman. 2006. *Basic Methods in Microscopy - Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual*. Northwestern University Medical School. Chicago
- Sukmadadari, A. E., R. Ratnawati, dan T. E. Hernowati. 2012. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TNF-  $\alpha$  pada Jaringan Hepar Tikus Wistar yang diinduksi DMBA [Skrpisi]. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Sun, C., X., Li, L., Liu, M. J., Canet, Y., Guan, Y., Fan, and Y., Zhou. 2016. Effect of Fasting Time on Measuring Mouse Blood Glucose Level. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9(2): 4186-4189
- Sundararaj, K. P., D. J., Samuevel, Y., Li., J. J., Sanders, M. F., Lopes-Virella, and Y., Huang. 2009. Inteleukin-6 Released fro Fibroblast is Essential for Up-Regulation of Matrix Metalloproteinase-1 Expression by U937 Macrophages in Coculture. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (20) 13714-13724
- Sutopo. 2015. Teknik Budidaya Jeruk Manis Pacitan. <http://balitjestro.litbang.pertanian.go.id/teknik-budidaya-jeruk-manis-pacitan.html>. [15 Maret 2018]
- Swanson, J. R. 1996. Epidermis. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/medicine/dermatology/melton/skinlsn/sklnsn.htm>. [6 Agustus 2017]
- Takeo, M., W., Lee and M. Ito. 2015. Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring harb. Perspect. Med.* 5: 1-12
- Tanaka, T., M., Narazaki, and T., Kishimoto. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 6:1-16
- Tang, W. H., K. A., Martin, and J., Hwa. 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetes mellitus. *Frontiers in pharmacology* 3 (87): 1-8
- Touminen, V. J., S., Rutoistenmaki, A., Viitanen, and M., Jumppanen. 2010. ImmunoRatio: A Publicly available web application for quantitative image

analysis of estrogen receptor (Er), progesterone receptor (Pr), and Ki-67. *Breast Cancer Research* 12: R56

- Tracy, L. E., R. A., Minasian, and E. J., Caterson. 2016. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblasts Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care* 5 (3): 119-136
- Tripathi, V., and J., Verma. 2013. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research* 6 (6): 29-32
- Tsourdi, E., A., Barthel, H., Rietzsch, A., Reichel, and S. R., Bornstein. 2013. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *BioMed Research International* 2013: 1-6
- Ueda, C. T., V. P., Shah, K., Derdzinski, G., Ewing, G., Flynn, H., Mailbach, M., Marques, H., Rytting, S., Shaw, K. Thakker, & A., Yacobi. 2009. Topical and Transdermal Drug Products. *Pharmacopoeial Forum*. 35(3): 705-764
- Unal, D., A., Kara, S., Aksak, B. Z., Altunkaynak, and S., Yildirim. 2012. Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system. *Dicle Medical Journal* 39 (2): 310-315
- Usha, Y. S. and A. M., Ashish. 2015. Review on: an Ointment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 4(2): 170-192
- Varghese, F., A. B., Bukhari, R., Malhotra, and A., De. 2014. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS ONE* 9(5): e96801
- Vinayagam, R. and B., Xu. 2015. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism* 12(60): 1-20
- Visiting Nurse & Hospice Care (VNHC). 2010. *Integumentary – Pressure Ulcer and Wound Assessment*. Santa Barbara: Visiting Nurse & Hospice Care
- Wang, X., M., Schunck, K., Kallen, C., Neumann, C., Trautwein, S., Rose-John, and E., Proksch, E. 2004. The Interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 123: 124-131
- Webster, J. D., M. A., Miller, D., DuSold, and J., Ramos-Vara. 2009. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 57(8): 753-761

- Werner, S., and R., Grose. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* 83: 835-870
- World Health Organization. 2006. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia. World Health Organization. United Nations.
- Wu, J and L., Yan. 2015. Streptozotocin-induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2015(8): 181-188
- Xu, F., C., Zhang, and D. T., Graves. 2013. Abnormal cell responses and role of TNF- $\alpha$  in impaired wound healing. *BioMed Research International*: 1-9
- Zahra, N., Alim-un-Nisa, I., Kalim, M. K., Saeed, I., Ahmad, and S., Hina. 2017. Nutritional Evaluation and Antioxidant Activity of Zest Obtained from Orange (*Citrus sinensis*) Peels. *International Journal of Theoretical & Applied Sciences* 9(1): 07-10
- Zhang, L., Z., Zuo, and G., Lin. 2007. Intestinal and Hepatic Glucoronidation of Flavonoids. *Molecular Pharmaceutics* 4 (6): 833-845