

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS
(*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP
EKSPRESI IGF-1 DAN JUMLAH SEL MONONUKLEAR
PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL DIABETES MELLITUS HASIL INDUKSI
STREPTOZOTOSIN**

SKRIPSI

**Oleh :
FUAD NABIL QOYS
135130101111006**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS
(*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP
EKSPRESI IGF-1 DAN JUMLAH SEL MONONUKLEAR
PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL DIABETES MELLITUS HASIL INDUKSI
STREPTOZOTOSIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
FUAD NABIL QOYS
135130101111006



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK MANIS
(*Citrus sinensis*) SECARA ORAL DAN TOPIKAL TERHADAP
EKSPRESI IGF-1 DAN JUMLAH SEL MONONUKLEAR
PADA PENYEMBUHAN LUKA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL DIABETES MELLITUS HASIL INDUKSI
STREPTOZOTOSIN****Oleh:****FUAD NABIL QOYS****135130101111006**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 31 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

drh. Dyah Ayu Oktavianie, M. Biotech

NIP. 19630404 198701 1 001`

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setya Yuwono, M.App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fuad Nabil Qoys

NIM : 135130101111006

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Oral dan Topikal Terhadap Ekspresi IGF-1 dan Jumlah Sel Mononuklear pada Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus Hasil Induksi Streptozotosin

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 tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2019

Yang menyatakan,

Fuad Nabil Qoys
NIM. 135130101111006

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Oral dan Topikal Terhadap Ekspresi IGF-1 dan Jumlah Sel Mononuklear Pada Proses Penyembuhan Luka Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus Hasil Induksi Streptozotosin

ABSTRAK

Luka pada penderita DM mengakibatkan fase inflamasi berkepanjangan karena tingginya stres oksidatif yang mengakibatkan terjadi gangguan aktivitas IGF-1 dan meningkatnya adhesi sel MN pada area luka. Kulit jeruk manis diketahui mengandung flavonoid yang memiliki sifat antidiabetik dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi IGF-1 dan jumlah sel MN pada luka insisi yang telah di terapi menggunakan salep dan *effervescent* ekstrak kulit jeruk manis. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berat 150-200 gram yang dibagi dalam 5 kelompok masing-masing 4 ekor diantaranya kontrol negatif insisi tanpa DM, kontrol positif insisi kondisi DM, terapi 1 insisi kondisi DM diterapi *effervescent* 500 mg/kgBB, terapi 2 diterapi salep 5%, terapi 3 kombinasi. Terapi dilakukan pada hewan tikus model DM hasil induksi streptozotocin melalui *intraperitoneal* 20 mg/kgBB sekali sehari selama 5 hari, Salep dibuat dengan mencampurkan ekstrak dengan vaselin albumin dan *effervescent* dibuat dengan mencampurkan ekstrak, dekstrin, asam sitrat, asam tartrat dan natrium bikarbonat. Pengobatan dilakukan selama 10 hari, kemudian dilakukan pengamatan histopatologi kulit. Ekspresi IGF-1 diamati dengan *software immunoratio* dan jumlah sel MN menggunakan *software imageraster*. Analisis data menggunakan uji one way ANOVA dan uji tukey dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil menunjukkan terapi oral, salep dan kombinasi berbeda signifikan dibandingkan tikus DM tanpa terapi. Terapi efektif pada terapi kombinasi dimana peningkatan ekspresi IGF-1 hingga 79,20% sedangkan pada jumlah sel MN mengalami penurunan hingga 90,6%. Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak kulit jeruk manis kombinasi oral dan topikal dapat digunakan sebagai terapi luka insisi penderita DM.

Kata kunci : DM, IGF-1, Jumlah sel MN, Tikus putih (*Rattus norvegicus*), Luka, Kulit Jeruk Manis

repository.ub.ac.id

**The Effect of Giving Sweet Orange Peel Extract (*Citrus sinensis*)
by Oral and Topical to The Expressions IGF-1 and The Number
of Mononuclear Cells on Healing Wounds Rats
(*Rattus norvegicus*) Model of Diabetes
Mellitus Result Induction
Streptozotocin**

ABSTRACT

Wounds in DM sufferers result in prolonged inflammatory phases due to high oxidative stress which results in disruption of IGF-1 activity and increasing the cell adhesion of MN in the wound area. Sweet Orange peel is known to contain flavonoids that have antidiabetic and anti-inflammatory properties. This research aimed to know the expression of IGF-1 and the number of MN cells in the incision wound that have been in therapy using the ointment and effervescent extracts of sweet orange peel. The animal models used of rats (*Rattus norvegicus*) males Wistar strain weight 150-200 gram which were divided into 5 groups with 4 rats each group consist of negative control incision without DM, positive control of the incision of the DM condition, therapy 1 incision of the DM condition treated Effervescent 500 mg/kg BB, therapy 2 treated ointment 5%, Therapy 3 combinations. Therapy was conducted in animal rats DM model streptozotocin induction result through Intraperitoneal 20 mg/kg BB once per day along 5 days, ointment made by extracts mixed with Vaseline albumin and effervescent made by extracts, Dextrin, citric acid, tartrate acid and sodium bicarbonate mixing. Treatment was administreted for 10 days, and then conducted observation of skin histopathology. The expression IGF-1 was measured with ImmunoRatio software and MN cell count used ImageRaster software. Data analysis used one way ANOVA test and Tukey test with 95% confidence rate. The results showed oral therapy, ointment and combination has significantly different of DM rats without therapy. Effective therapy was combination therapy which has elevation of IGF-1 expression up to 79.20% and reduction of the MN cell number to 90.6%. The conclusion of this research were the sweet orange peel extract of oral and topical combinations could be used as a wound therapy for patients with DM.

Keywords : Rats (*Rattus norvegicus*), Wounds, Sweet Orange Peel, DM, IGF-1, the number of mononuclear cells.

KATA PENGANTAR

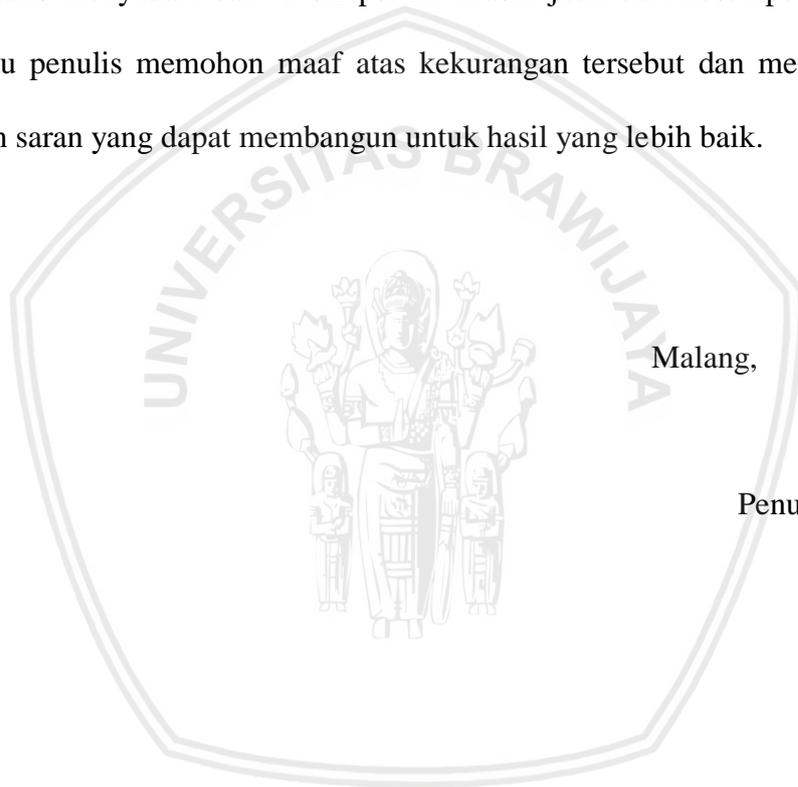
Puji syukur kehadirat Allah SWT yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Oral dan Topikal Terhadap Ekspresi IGF-1 dan Jumlah Sel Mononuklear Pada Proses kesembuhan Luka Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus Hasil Induksi Streptozotosin”**. Serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada :

1. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M. Biotech selaku dosen pembimbing 1 atas segala bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. drh. Fajar Shodiq Permana, M. Biotech selaku dosen pembimbing 2 atas segala bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.

3. drh. M. Arfan Lesmana, M. Sc selaku dosen penguji 1 dan drh. Albiruni Haryo, M. Sc selaku dosen penguji 2 yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
5. Keluarga tercinta Ayahanda Mahmudi S.Pd, ibunda Siti Muhibah Hamid S.Pd serta adik Faqih Zulham Nawwaf yang selalu memberi kasih sayang, doa, dan dukungan untuk menyelesaikan studi serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
6. Kepada DIKTI yang telah mendanai penelitian dalam pekan karya ilmiah mahasiswa dan terimakasih seluruh dosen yang telah membimbing khususnya Dr. Sasangka Prasetyawan, M.S yang telah memberikan ilmu selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
7. Teman seperjuangan penelitian Dwiyana Marta Afrida, Damar Alam Purwastoko, Ivana Aginta Ginting, Giovani Saputra atas kontribusi, bantuan dan inspirasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Seluruh teman dan sahabat di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan teman-teman angkatan 2013 pada umumnya yang telah menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
9. Teman-teman asisten laboratorium kesehatan masyarakat veteriner dan radiologi yang telah memberikan dukungan kepada penulis.

Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan informasi yang sebaik-baiknya khususnya bagi penulis sendiri dan rekan-rekan mahasiswa yang lain. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut dan mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun untuk hasil yang lebih baik.



Malang,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Batasan Masalah	6
1.4 Tujuan	8
1.5 Manfaat	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Diabetes Mellitus	9
2.1.1 Etiologi	9
2.1.2 Patofisiologi dan Gejala Klinis	11
2.2 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) Model Diabetes	13
2.2.1 Streptozotolin	15
2.2.2 Kulit	17
2.2.3 Luka dan Fase Penyembuhan Luka	19
2.2.4 Gangguan Penyembuhan Luka	24
2.3 Kulit Jeruk Manis (<i>Citrus sinensis</i>)	26
2.4 Sediaan Obat	29
2.4.1 Sediaan Obat Per-oral	29
2.4.2 Sediaan Obat Topikal	30
2.5 Insuline-like Growth Factor - 1	31
2.5.1 Hubungan IGF-1 terhadap proses penyembuhan luka	32
2.6 Sel Radang Mononuklear	33
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	35
3.1 Kerangka Konseptual	35
3.2 Hipotesis Penelitian	39
BAB IV. METODE PENELITIAN	40
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	40
4.2 Alat dan Bahan	40
4.3 Sampel Penelitian	41
4.4 Rancangan Penelitian	42
4.5 Variabel Penelitian	43
4.6 Tahapan Penelitian	44



4.7	Prosedur Kerja	44
4.7.1	Persiapan Hewan Coba	44
4.7.2	Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis	45
4.7.3	Induksi MLD-STZ (<i>Multiple Low Dose Streptozotocin</i>)	46
4.7.4	Pembuatan Salep dan Serbuk <i>Effervescent</i> Jeruk Manis	46
4.7.5	Pembuatan Luka Insisi	47
4.7.6	Terapi Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis	48
4.7.7	Pengambilan dan Pembuatan Preparat Kulit	48
4.7.8	Pewarnaan <i>Hematoksin Eosin</i>	49
4.7.9	Tahapan Penghitungan Jumlah Sel MN	50
4.7.10	Tahapan Pewarnaan IGF-1 dengan <i>Imunohistokimia</i>	51
4.7.11	Analisa Data	52
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	54
5.1	Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (<i>Citrus sinensis</i>) terhadap Ekspresi IGF-1 (<i>Insulin-like Growth Factor- 1</i>) pada Luka Insisi Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	56
5.2	Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (<i>Citrus sinensis</i>) terhadap jumlah sel Mononuklear (MN) pada Luka Insisi Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	66
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	77
6.1	Kesimpulan	77
6.2	Saran	77
DAFTAR PUSTAKA	78
LAMPIRAN	87

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	43
5.1 Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap ekspresi IGF-1 (<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>).....	61
5.2 Pengaruh ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal dan kombinasi terhadap jumlah sel MN (<i>Mononuklear</i>).....	70



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus Putih (<i>Rattus novogicus</i>).....	13
2.2 Struktur kimia streptozotosin	16
2.3 Gambar histologi kulit.....	19
2.7 Struktur kulit jeruk manis (<i>Citrus sinensis</i>)	27
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	35
4.1 Gambaran histologi sel mononuklear pada jaringan kulit menggunakan pewarnaan HE.....	51
5.1 Gambaran makroskopis kesembuhan luka insisi tikus hari ke-10	54
5.2 Ekspresi Insulin-like Growth Factor (IGF-1) kontrol negatif.....	57
5.3 Ekspresi Insulin-like Growth Factor (IGF-1) kontrol positif.....	58
5.4 Ekspresi Insulin-like Growth Factor (IGF-1) kontrol terapi 1	58
5.5 Ekspresi Insulin-like Growth Factor (IGF-1) kontrol terapi 2.....	59
5.6 Ekspresi Insulin-like Growth Factor (IGF-1) kontrol terapi 3.....	59
5.7 Mikroskopis sel mononuklear (MN) kontrol negatif	67
5.8 Mikroskopis sel mononuklear (MN) kontrol positif	68
5.9 Mikroskopis sel mononuklear (MN) terapi 1	68
5.10 Mikroskopis sel mononuklear (MN) terapi 2	69
5.11 Mikroskopis sel mononuklear (MN) terapi 3	69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	87
2. Determinasi Tanaman Jeruk Manis	88
3. Uji Fitokimia Kulit Jeruk Manis	89
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	90
5. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis	92
6. Perhitungan Dosis Induksi Streptozotocin	93
7. Perhitungan Pembuatan <i>Effervescent</i>	94
8. Pembuatan Preparat Histopatologi	95
9. Pewarnaan Sel radang MN dengan <i>Hematoksilin Eosin</i>	96
10. Ekspresi IGF-1 dengan Imunohistokimia	97
11. Hasil Uji Statistika Ekspresi IGF-1	99
12. Hasil Uji Statistika Jumlah Sel Mononuklear	103
13. Dokumentasi Kegiatan	107



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
0C	: Derajat Celsius
%	: Persen
μ	: Mikron
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
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
dL	: Desiliter
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GH	: <i>Growth Hormone</i>
GHRH	: <i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>
GHP	: <i>Growth Hormon Binding Protein</i>
GLUT2	: <i>Glucose Transporter 2</i>
HE	: <i>Hematoksin Eosin</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
kg	: Kilogram
L	: Liter
m	: Meter
mg	: Miligram
MLD	: <i>Multiple Low Dose</i>
MN	: <i>Mononuklear</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>
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
RAL	: Rancangan acak lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
STZ	: <i>Streptozotzin</i>
TNF-α	: <i>Tumor necrosis factor-α</i>
KDa	: <i>Kilodaltons</i>





BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang disebabkan multifaktorial seperti kurangnya insulin atau ketidak mampuan tubuh untuk memanfaatkan hormon insulin (resistensi insulin) dengan sintom berupa hiperglikemia kronis dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, protein sebagai akibat dari defisiensi sekresi hormon insulin, aktifitas insulin, defisiensi transporter glukosa yang dapat menimbulkan berbagai penyakit komplikasi (Nugroho, 2006).

Bedasarkan etiologinya DM dibagi menjadi DM tipe 1 dan DM tipe 2. Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun terhadap sel beta Langerhans pankreas, sehingga produksi insulin sangat sedikit. Diabetes melitus tipe 2 yang disebabkan oleh kenaikan gula darah akibat penurunan sekresi insulin oleh sel beta pankreas dan atau gangguan fungsi insulin (resistensi insulin). Gangguan pada hormon insulin merupakan dasar terjadinya gejala pada diabetes mellitus dimana insulin diproduksi organ pankreas (Pulung *et al.*, 2009).

Tidak hanya pada manusia, diabetes mellitus juga dapat terjadi pada hewan. Pada umumnya hewan yang sering menderita diabetes mellitus adalah anjing dan kucing. Aja, (2016) menyatakan bahwa diabetes mellitus merupakan penyakit yang umum terjadi pada anjing dan kucing dengan angka prevalensi mencapai 0,4 -1,2% setiap tahunnya. Pada tahun 2016 dilakukan penelitian

terhadap 10.000 anjing dan kucing dan ditemukan 24 kasus DM pada anjing, dan 68 kasus DM pada kucing, kejadian diabetes mellitus pada hewan anjing dan kucing disebabkan beberapa faktor yang meliputi genetik, obesitas, pankreatitis, penyakit hormonal, penyakit pada ginjal, penyakit pada jantung, dan efek samping obat. Diabetes mellitus umumnya menyerang kucing pada umur antara 10 hingga 13 tahun sedangkan pada anjing sering terjadi pada umur antara 5 hingga 12 tahun. *Samoyed*, *Tibtan Terrier*, dan *Caim Terrier* adalah jenis anjing yang sering terkena diabetes mellitus sedangkan jenis kucing yang rentan terkena diabetes adalah *Burmese* dan seluruh pejantan *neuter* (Gunna-Moore, 2013).

Penyakit diabetes mellitus berpengaruh besar terhadap kesembuhan luka. Luka merupakan rusaknya struktur dan fungsi anatomis normal jaringan akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal. Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes terjadi lebih lama dibandingkan kondisi luka tanpa DM. Luka penderita diabetes menunjukkan proses penyembuhan yang abnormal ditandai dengan inflamasi persisten, infeksi bakteri dan penumpukan eksudat (Baqarizky, 2015).

Lamanya proses kesembuhan luka pada penderita DM juga diakibatkan oleh produksi *advance glycosylation end products* (AGE) yang dapat berikatan dengan reseptor makrofag spesifik kemudian mengakibatkan sintesis sitokin proinflamasi secara terus menerus serta peningkatan stres oksidatif pada area luka. Peningkatan ini menyebabkan kerusakan sel, terutama sel β pankreas yang diperantarai mekanisme *cellular mediated autoimmune* (CMA) sehingga terjadi gangguan produksi insulin. Tingginya kadar gula dalam darah akan menghambat leukosit melakukan fagositosis sehingga rentan terhadap adanya infeksi pada luka. Pada jaringan yang rusak selanjutnya terjadi penyembuhan luka yang terdiri atas 4 fase yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodelling jaringan ikat dan komponen parenkim. Keempat fase tersebut diinisiasi, dimediasi, dan diteruskan oleh mediator biokimia berupa sitokin dan *growth factor* (Gurtner, 2007).

Salah satu *growth factor* yang berperan dalam proses penyembuhan luka yaitu IGF-1. IGF-1 merupakan *growth factor* pro-insulin yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan jaringan normal dan metabolisme tubuh. Selain itu, IGF-1 telah terbukti berperan dalam proses homeostasis glukosa, yang menurunkan kadar glukosa dan peran kesensitifan insulin. Penelitian Achar *et al.*, (2014) juga menyatakan bahwa IGF-1 berperan dalam perkembangan beberapa penyakit, salah satunya adalah DM. Secara spesifik, IGF-1 merupakan hormon polipeptida yang secara struktur dan fungsinya sama seperti insulin, yang ketika terjadi gangguan maka semakin berisiko untuk terkena penyakit diabetes. Gangguan IGF-1 di perifer meningkatkan ambilan glukosa dan secara fungsional menginaktivasi IGF1R pada otot sehingga menyebabkan resistensi insulin sehingga terjadi diabetes. Pada tahap

kesembuhan luka sel monosit dalam darah akan menjadi teraktivasi dan berdeferensiasi menjadi makrofag setelah 48 jam, yang berperan besar dalam tahap inflamasi penyembuhan luka. Gangguan terhadap fungsi Makrofag akan mengganggu penyembuhan luka. Setelah teraktivasi, sel Makrofag sendiri juga akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi dan *growth factor* salah satunya IGF-1 yang berfungsi dalam merangsang migrasi sel epidermal dan proliferasi fibroblast sehingga membentuk jaringan granulasi di area luka dan di lanjutkan fase kesembuhan luka yaitu *remodeling* (Gurtner, 2007).

Pencegahan produksi *advance glycosylation end products* (AGE) karena hiperglikemi dapat menggunakan terapi dengan terapi non farmakologis maupun farmakologis. Penggunaan obat antidiabetes seperti Metformin, Glikazid, dan Akarbose, kebanyakan berlangsung lama dan menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan serta tingginya biaya pengobatan sehingga diperlukan alternatif terapi untuk mengurangi timbulnya beberapa efek samping dan biaya pengobatan. Salah satunya dengan memanfaatkan tanaman yang diketahui berkhasiat hipoglikemik yang berada disekitar (Nogata *et al.*, 2005).

Hasil penelitian yang dilakukan Parmar *et al.*, (2007) menyatakan bahwa ekstrak kulit jeruk manis berpotensi sebagai antidiabetes. Jeruk manis dengan nama ilmiah *Citrus sinensis*. Kandungan senyawa dalam kulit buah jeruk manis antara lain flavonoid, vitamin E, vitamin A, polifenol dan asam askorbat yang mampu menekan glikasi protein pada kondisi hiperglikemia sehingga produksi AGE. Kandungan flavonoid diduga memiliki aktivitas antidiabetes. Senyawa flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin mampu menekan produksi enzim

cyclooxygenase (COX) sehingga mempercepat selesainya fase inflamasi pada luka DM. Flavonoid juga dapat mencegah hambatan kesembuhan luka dengan menekan terbentuknya *reactive oxygen species* sehingga terjadi regenerasi kerusakan sel beta pankreas dan merangsang sel beta pankreas untuk memproduksi insulin (Muhtadi *et al.*, 2015). Flavonoid juga memiliki efek dalam meningkatkan penyembuhan luka dengan mempercepat laju epitelisasi melalui induksi produksi PDGF, TGF- β , IGF-1, dan VEGF (Parmar *et al.*, 2007).

Terapi DM menggunakan ekstrak kulit jeruk manis dibuat dalam bentuk sediaan serbuk *effervescent* dan salep. Serbuk *effervescent* digunakan sebagai sediaan terapi per oral karena membutuhkan waktu absorpsi yang lebih cepat dibanding sediaan tablet. Sediaan ini juga lebih mudah diberikan terhadap pasien yang kesulitan menelan obat tablet konvensional. Salep sebagai sediaan topikal memiliki kelebihan menjaga kelembapan kulit dan dapat bertahan lama pada permukaan kulit sehingga diharapkan memperpanjang efek terapi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) yang diberikan secara oral dan topikal terhadap penyembuhan luka pada hewan model diabetes mellitus. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi *Insulin Growth Factor- 1* (IGF-1) dan jumlah sel radang mononuklear, yakni makrofag dan limfosit. Penelitian ini diharapkan dapat membuat inovasi pengobatan kesembuhan luka pasca operasi yang efektif khususnya bagi pasien penderita diabetes mellitus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa rumusan masalah yang didapat antara lain yaitu:

- 1.2.1 Apakah pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal dapat mempengaruhi peningkatan ekspresi IGF-1 pada luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus?
- 1.2.2 Apakah pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal dapat mempengaruhi penurunan terhadap jumlah sel radang mononuklear pada luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan Model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Penggunaan tikus telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 761-KEP-UB.
2. Tikus model diabetes diperoleh dengan cara induksi Streptozotocin secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut diinkubasi selama 14 hari dan penentuan kondisi diabetes diukur menggunakan glukometer digital dan dinyatakan diabetes jika glukosa darah >200 mg/dL (Aulanni'am, 2005).

3. Luka insisi *full thickness* dibuat menggunakan scalpel steril sepanjang 2 cm diantara regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis* (1 cm di lateral vertebralvolumna, 5 cm dibelakang garis intraaural) pada tikus teranastesi *xylazin ketamin* (Alizadeh, 2010).
4. Tanaman kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) yang digunakan berasal dari kota Batu dan diuji determinasi di UPT Materica Medica kota Batu. Kulit jeruk manis diekstrak menggunakan etanol 96%.
5. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dilakukan secara oral dalam bentuk serbuk *effervescent* dengan dosis 500 mg/kg BB serta secara topikal dalam bentuk salep konsentrasi 5%. Pemberian terapi dilakukan sekali sehari selama 10 hari pasca insisi.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IGF-1 dan jumlah sel radang mononuklear. Pengamatan ekspresi IGF-1 menggunakan metode imunohistokimia di hitung dengan software *ImmunoRatio* dan pengamatan jumlah sel radang mononuklear menggunakan pewarnaan *Hematoxyllin Eosin* (HE) di hitung dengan software *Image Raster*.
7. Analisa Statistika menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan tujuan untuk melihat signifikansi pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis terhadap luka. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 5\%$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi yang diberikan.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa tujuan dari penelitian ini antara lain yaitu:

- 1.4.1 Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal terhadap ekspresi IGF-1 pada luka insisi kulit tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus
- 1.4.2 Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal terhadap jumlah sel radang mononuklear pada luka insisi kulit tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus

1.5 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat dalam penelitian ini yakni sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) yang diberikan secara oral dan topikal untuk membantu proses penyembuhan luka bagi pasien diabetes mellitus yang dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif dan telah diuji berdasarkan ekspresi IGF-1 dan jumlah sel radang mononuklear serta memberikan nilai tambah pemanfaatan limbah kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.2 Etiologi

Diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme endokrin dengan karakteristik utama penyakit ini yaitu peningkatan level glukosa dalam darah, (hiperglikemia) yang disebabkan oleh karena menurunnya produksi insulin, disfungsi insulin atau menurunnya respon reseptor insulin pada organ target, seperti otot-otot rangka dan hepar. Lebih dari 90 persen dari semua populasi penderita diabetes adalah diabetes mellitus tipe 1 yang ditandai dengan hipoinsulinemia secara permanen (Nelson *et al.*, 2014).

Diabetes mellitus dibagi menjadi 2 kategori utama berdasarkan sekresi insulin endogen untuk mencegah munculnya ketoasidosis, yaitu (1) Diabetes mellitus tergantung insulin (IDDM = *insulin dependent diabetes mellitus*) atau tipe I. Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun terhadap sel beta Langerhans pankreas, sehingga produksi insulin sangat sedikit. dan (2) Diabetes mellitus tidak tergantung insulin (NIDDM = *non-insulin dependent diabetes mellitus*) atau tipe II. Diabetes melitus tipe 2 paling sering ditemukan, terutama yang disebabkan oleh kenaikan gula darah akibat penurunan sekresi insulin oleh sel beta pankreas dan atau gangguan fungsi insulin (resistensi insulin) (Pulung *et al.*, 2009).

Hiperglikemia kronis pada diabetes melitus akan disertai dengan kerusakan, gangguan fungsi beberapa organ tubuh khususnya mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah. Walaupun pada diabetes melitus ditemukan

gangguan metabolisme semua sumber makanan, kelainan metabolisme yang paling utama ialah kelainan metabolisme karbohidrat (Nugroho, 2006).

Glukosa ($C_6H_{12}O_6$) merupakan monosakarida yang memiliki peranan penting sebagai sumber energi bagi tubuh. Dalam respirasi selular, sel-sel mengekstraksi energi yang tersimpan dalam molekul glukosa. Metabolisme glukosa di dalam tubuh dipengaruhi oleh hormon insulin. Hormon insulin adalah protein kecil dengan berat molekul 5700, terdiri atas dua rantai polipeptida yang saling berhubungan. Insulin disintesis oleh sel β pankreas di pulau langerhans pankreas. Pulau-pulau langerhans merupakan kumpulan sel-sel endokrin sel β pankreas (menghasilkan hormon insulin) dan sel-sel alfa (mensekresikan hormon peptida glukagon). Insulin dan glukagon bekerja antagonis untuk mengatur glukosa di dalam darah. Pengaturan berfungsi sebagai bioenergetik dan homeostasis, karena glukosa merupakan bahan utama untuk respirasi seluler dan sumber kunci kerangka karbon untuk sintesis senyawa organik lainnya. Dalam kondisi DM terjadi defisiensi insulin atau hilangnya respon insulin terhadap jaringan target sehingga glukosa tidak dapat dibawa masuk ke dalam sel sehingga terjadi hiperglikemia (Gunna- Moore, 2013). Oleh karena itu diagnosis diabetes melitus selalu berdasarkan tingginya kadar glukosa dalam plasma darah (Pulung et al., 2009). Gejala klinis diabetes melitus pada anjing dan kucing meliputi *polyuria*, *polydipsia*, *polyphagia*, dan kekurusan. Gejala klinis tersebut akan tampak apabila kadar gula darah mencapai 180-220 mg/dl pada anjing, dan 220-270 mg/dl pada kucing (Nelson et al., 2014).

2.1.2 Patofisiologi dan Gejala Klinis

Diabetes mellitus (DM) tipe I diperantarai oleh degenerasi sel β Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (streptozotosin, aloksan), atau secara genetik (*wolfram syndrome*) yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali. Hal tersebut mengakibatkan penurunan pemasukan glukosa dalam otot dan jaringan adiposa. Secara patofisiologi, penyakit ini terjadi lambat dan membutuhkan waktu yang bertahun-tahun. Penurunan berat badan merupakan ciri khas dari penderita DM I yang tidak terkontrol. Gejala yang sering mengiringi DM I yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Peningkatan volume urin terjadi disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik) dan benda-benda keton dalam urin. Lebih lanjut, diuresis osmotik tersebut akan mengakibatkan kondisi dehidrasi, kelaparan dan shock. Gejala haus dan lapar merupakan akibat dari kehilangan cairan dan ketidakmampuan tubuh menggunakan nutrisi (pulung *et al.*, 2009).

Pada DM I, kadar glukosa darah sangat tinggi, tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkannya secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Seiring dengan kondisi tersebut, terjadi perangsangan lipolisis serta peningkatan kadar asam lemak bebas dan gliserol darah. Dalam hal ini terjadi peningkatan produksi asetil-KoA oleh hati, yang pada gilirannya diubah menjadi asam asetoasetat dan pada akhirnya direduksi menjadi asam β -hidroksibutirat atau mengalami dekarboksilasi menjadi aseton. Pada kondisi normal, konsentrasi benda-benda keton relatif rendah karena

insulin dapat menstimulasi sintesis asam lemak dan menghambat lipolisis. Hanya dibutuhkan kadar insulin yang kecil untuk menghambat lipolisis (Nugroho, 2006) .

Pada kondisi DM II, insulin masih cukup untuk mencegah terjadinya benda-benda keton sehingga jarang dijumpai ketosis. Namun demikian, koma hiperosmolar non-ketotik dapat terjadi. DM II tersebut cenderung terjadi pada individu usia lanjut dan biasanya didahului oleh keadaan sakit atau stres yang membutuhkan kadar insulin tinggi. Pada DM II, kehadiran insulin tidak cukup untuk mencegah glukosuria. Seiring dengan itu, terjadi kehilangan cairan dan elektrolit tubuh yang diikuti dengan dehidrasi berat. Lebih lanjut, terjadi penurunan ekskresi glukosa dan pada akhirnya menghasilkan peningkatan osmolaritas serum (hiperosmolaritas) dan glukosa darah (hiperglikemik) (Nugroho, 2006).

Secara patofisiologi, DM tipe II disebabkan karena dua hal yaitu (1) penurunan respon jaringan perifer terhadap insulin, peristiwa tersebut dinamakan resistensi insulin, dan (2) Penurunan kemampuan sel β pankreas untuk mensekresi insulin sebagai respon terhadap beban glukosa. Sebagian besar DM tipe II diawali dengan kegemukan karena kelebihan makan. Sebagai kompensasi, sel β pankreas merespon dengan mensekresi insulin lebih banyak sehingga kadar insulin meningkat (hiperinsulinemia). Konsentrasi insulin yang tinggi mengakibatkan reseptor insulin berupaya melakukan pengaturan sendiri (*self regulation*) dengan menurunkan jumlah reseptor atau *down regulation*. Hal ini membawa dampak pada penurunan respon reseptornya dan lebih lanjut mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Di lain pihak, kondisi hiperinsulinemia juga dapat mengakibatkan desensitisasi reseptor insulin pada tahap postreseptor, yaitu penurunan aktivasi

kinase reseptor, translokasi *glucose transporter* dan aktivasi *glycogen synthase*. Kejadian ini mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Dua kejadian tersebut terjadi pada permulaan proses terjadinya DM tipe II. (Nelson *et al.*, 2014).

2.2 Tikus (*Rattus norvegicus*) Model DM

Tikus (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan model karena memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik dengan mamalia sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada anjing dan kucing (Hedrich, 2006). Tikus putih memiliki ciri antara lain rambut berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot tikus putih pada usia dewasa sekitar 250 – 500 Gram (Ress *et al.*, 2005), seperti pada **Gambar 2.1**. Tikus putih tersertifikasi diharapkan lebih mempermudah peneliti dalam mendapatkan hewan percobaan yang sesuai dengan kriteria yang dibutuhkan. Klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut:

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



Gambar 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*)
(Ress *et al.*, 2005)

Menurut Ress *et al.*, (2005) terdapat beberapa galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian. Galur-galur tersebut antara lain : Wistar, Sprague

Dawley, Long evans, dan Holdzman. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* galur wistar jantan. Tikus galur wistar lebih besar daripada famili tikus pada umumnya. Tikus ini memiliki panjang mencapai 40 cm, jika diukur dari hidung sampai ujung ekor dengan berat 140-500 gram (Purwaningtyas, 2016).

Keunggulan tikus putih dibandingkan dengan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih cepat berkembang biak, sangat mudah di tangani dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan. Secara umum, berat badab tikus laboratorium lebih ringan di bandingkan tikus liar. Biasanya pada umur empat minggu beratnya 35-40 g, dan beart dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung pada galur (Krinke *et al.*, 2007). Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan tidak jauh berbeda dibandingkan dengan mamalia lainnya selain itu, penggunaan tikus sebagai hewan coba juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama produksi 1 tahun, temperatur 35 -37, konsumsi pakan 5-6 g/100g BB dan konsumsi minum 10-12 mL/100g BB (Bogdanske *et al.*, 2010).

Menurut Khoshneviszadeh *et al.*, (2014) yang melakukan penelitian mengenai regenerasi jaringan kulit tikus berlangsung selama 4-12 hari yang telah dibuktikan pada hari pertama diameter luka (1 cm), hari ke-4 (3 mm), hari ke-8 (2 mm), dan pada hari ke-12 (1 mm). Hal ini telah menunjukkan bahwa regenerasi jaringan kulit tikus telah melewati fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi

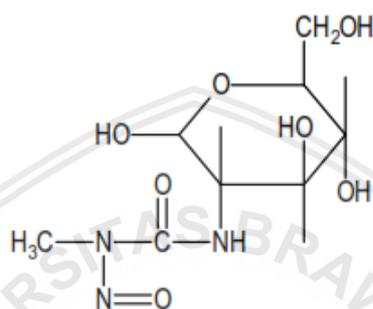
(*remodeling*). Pembuatan hewan model diabetes mellitus digunakan dengan metode diabetogenik untuk menghasilkan kondisi hiperglikemia pada hewan coba yang merupakan tanda dari penyakit diabetes mellitus. Beberapa agen diabetogenik yang dapat digunakan yaitu Streptozotocin, Alloxan, Vacor, Dithizone, 8-hidroksikuinolon (Ress *et al.*, 2005).

2.2.1 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoareido)-D-glukopiranosil] merupakan obat yang dapat menyebabkan diabetes secara permanen diperoleh dari sintesis bakteri tanah gram positif *Streptomyces achromogenes* adalah aminoglikosida yang tidak biasa karena memiliki gugus nitrosoamino sehingga dapat menjadi donor nitrit oksida (Goud *et al.*, 2015). Nitrit oksida merupakan salah satu radikal bebas yang dapat bereaksi dengan anion superoksida menjadi peroksinitrit yang dapat digunakan untuk menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 untuk dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ juga dapat diberikan secara berulang, untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8-10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa (Szkudelski, 2001).

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 *et al.*, 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. Selain alkilasi DNA, STZ dapat bereaksi dengan sisi reaktif DNA lain dan menghasilkan 7-metilguanin, 3-metiladenin yang menyebabkan aktivasi poly-ADP-ribosa polymerase (PARP) dan menyebabkan penurunan jumlah NAD⁺. Penurunan NAD⁺ akan menyebabkan cadangan ATP digunakan untuk menggantikan NAD⁺ sehingga terhentinya produksi insulin (Goud *et al.*, 2015). Selanjutnya, STZ akan menyebabkan rilis nitrit oksida sehingga terjadi penghancuran sel beta pankreas dan nekrosis (Soltesova *et al.*, 2011). 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 (Tang *et al.*, 2012). 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 *et al.*, 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 (Soltesova *et al.*, 2011) Jalur polyol yaitu proses reduksi glukosa menjadi sorbital dan dikonversi menjadi fruktosa muncul ketika kadar glukosa intrasel meningkat (Lorentz *et al.*, 2006). 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 Kulit

Kulit merupakan organ terbesar pada tubuh dan berfungsi sebagai garis pertahanan pertama tubuh terhadap mikroorganisme. Kulit berperan sebagai reseptor sensorik untuk sentuhan, tekanan, gataran, nyeri, panas, dan dingin beberapa fungsi lainnya meliputi produksi vitamin D, penyimpanan air, lemak, elektrolit, karbohidrat, dan protein, penghalang terhadap bahan kimia dan radiasi, dan isolator pada lemak subkutan, kulit terdiri dari dua lapisan utama yakni epidermis dan dermis (Pevletic, 2010).

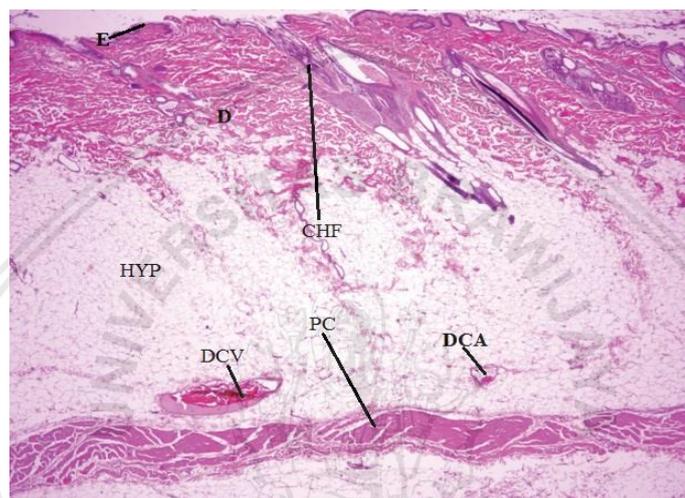
Epidermis terdiri atas lapisan tunggal sel ectoderm kuboid yang berkembang menjadi startified saat fetus matur. Pada area yang berambut, epidermis terbagi menjadi lima lapisan utama yaitu startum basal, startum

spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum, dan stratum korneum. Stratum basal merupakan satu lapisan sel-sel kuboid dan kolumnar yang terletak pada membran basal yang berbatasan dengan dermis. Sel-sel ini memproduksi stratum spinosum, lapisan dengan ketebalan bervariasi yang terdiri atas sel poligonal yang menjadi skuamosa pada bagian permukaannya sel dari stratum granulosum berisi granula keratohyalin basofilik pada bagian sitoplasmanya. Stratum lucidum merupakan lapisan yang tipis, pucat, eosinofilik dan translusent. Lapisan yang paling superfisial dari kulit adalah stratum korneum yang terdiri dari sel skuamosa berkeratin yang mati dan mengelupas dibagian permukaan kulit. Kombinasi stratum basal dan stratum spinosum membentuk stratum germinativum yang memiliki aktivitas mitosis yang berperan dalam regenerasi sel kulit pasca luka (Bacha, 2012).

Dermis terdiri dari kolagen, retikuler (prekolagen), dan serat elastis dalam substansi dasar mukopolisakarida. Substansi dasar ini terdiri dari asam hyaluronik dan asam sulfat chondroitin yang merupakan komponen utama dari dermis. Sembilan puluh persen dari serabut dermal terdiri dari kolagen. Fibroblas, makrofag, sel makrofag, sel plasma, dan sel mast pada dermis terdapat lebih banyak di bagian superficial. Dermis mengandung jaringan kulit kapiler, limfatik, komponen saraf, otot arrector pili, folikel rambut, dan kelenjar keringat (Pavletic, 2010).

Di bawah lapisan dermis terdapat lapisan hypodermis atau subkutan, lapisan subkutan terutama terdiri dari lemak dengan trabekula kolagen longgar dan serat elastis. Lapisan subkutan menghubungkan kulit dengan jaringan di bawahnya seperti muskulus dan tulang. Salah satu penyusun lapisan subkutan pada mencit

adalah panniculus carnosus. Panniculus carnosus merupakan komponen dari startum fibrosum subkutan, yang dalam lapisan jaringan ikat dari hipodermis. Serat otot panniculus carnosus sangat tidak teratur dan cenderung berjalan melintang. Panniculus carnosus menembus dermis dan memungkinkan gerakan involunter pada kulit (Bacha, 2012).



Gambar 2.3 Gambar histologi kulit. E, epidermis; D, dermis, HYP, hipodermis; CHF, compound hair follicle; DCA, direct cutaneous artery; DCV, direct cutaneous vein; PC, panniculus carnosus (Pavletic, 2010)

2.2.3 Luka dan Fase Penyembuhan Luka

Luka adalah diskontinuitas jaringan yang disebabkan oleh trauma dari luar. Penyembuhan luka adalah proses tubuh untuk memperbaiki kerusakan jaringan agar dapat berfungsi kembali. Tubuh berusaha untuk menormalkan kembali semua kondisi abnormal akibat luka dengan proses penyembuhan. Respon tubuh apabila integritas kulit mengalami kerusakan berupa fase yang saling tumpang tindih, tetapi secara biologis dapat dibedakan. Setelah terjadi luka dan fase hemostasis, terjadi fase inflamasi yang bertujuan untuk menghilangkan jaringan nonvital dan mencegah infeksi bakteri invasif. Kemudian, terjadi fase proliferasi

dimana terjadi keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan regenerasi jaringan. Pada fase yang terakhir, terjadi fase *remodelling* yang bertujuan untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktural dari luka (Lorentz *et al.*, 2006).

a. Fase Hemostasis

Fase hemostasis ini ditandai dengan adanya vasokonstriksi, sumbat trombosit, dan pembentukan *fibrin plug* sebagai proses koagulasi. Fungsi dari hemostasis adalah untuk mencegah kehilangan darah akibat kerusakan pembuluh darah. Pada saat terjadinya luka, darah akan mengalir dari pembuluh darah yang rusak, lalu mengisi area luka. Selanjutnya pembuluh darah mengalami vasokonstriksi selama 5-10 menit oleh vasokonstriktor (serotonin dan tromboksan A_2) yang berlangsung selama 5-10 menit. Kerusakan endotel juga menginduksi terjadinya sumbat trombosit. Terbentuknya sumbat trombosit karena perekatan antara trombosit dengan trombosit baru yang diaktivasi oleh tromboksan A_2 . Trombosit yang teraktivasi akan mengeksresikan *growth factor* seperti *Platelet Derivate Growth Factor* (PDGF) dan Transforming Growth Factor – β (TGF- β) yang berperan dalam menginduksi terjadinya kemotaksis. Tahap terakhir yaitu pembentukan *fibrin plug* yang mengisi area luka merupakan proses koagulasi dengan melalui 2 jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Kedua jalur tersebut akan mengaktivasi factor X untuk mengubah protombin menjadi trombin. Trombin merupakan suatu enzim yang mengubah fibrinogen menjadi polimer fibrin, sehingga terbentuklah *fibrin plug* pada area luka. Sama halnya dengan *fibrin plug*, area luka akan diisi dengan Ekstracelluler Matrix (ECM) yang berfungsi untuk menjaga stabilitas tepi luka serta memberi daya regang terhadap luka (Blakytyn, 2006). Secara bersamaan, pembuluh

darah sekitar area luka mengalami vasodilatasi yang menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler oleh vasodilator (prostaglandin, leukotrien, bradikinin, histamin) untuk memasuki fase inflamasi.

b. Fase Inflamasi

Pada fase inflamasi ini sebenarnya tumpang tindih dengan fase hemostasis yang berlangsung beberapa menit setelah cedera sampai 24 jam dan selama kisaran 3 hari pasca luka (Koh *et al.*, 2011). Fungsi dari fase ini adalah untuk menghilangkan jaringan yang mati dan mencegah infeksi mikrobial. Fase ini dimulai dari terjadinya vasodilatasi yang menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler oleh vasodilator (prostaglandin, leukotrien, bradikinin, histamin) sehingga netrofil menempel pada tepi pembuluh darah dan bermigrasi keluar pembuluh darah ke jaringan luka untuk fagositosis mikroorganisme asing, mencerna jaringan yang nekrosis serta melepaskan sitokin proinflamasi (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, dan TNF- α) yang berperan dalam respon inflamasi (Pradhan *et al.*, 2009). Netrofil merupakan sel pertama yang masuk pada luka dan puncaknya pada 24-48 jam pasca terjadinya luka. Migrasi netrofil akan mulai berkurang jika luka sudah tidak terkontaminasi lagi dan akan dilanjutkan migrasi monosit ke area jaringan sehingga berubah menjadi makrofag setelah 48-72 jam pasca terjadinya luka (Dovi *et al.*, 2004). Makrofag memiliki fungsi yang sama dengan neutrofil serta memiliki peranan penting dalam menstimulasi proses proliferasi dengan menghasilkan beberapa *growth factor* seperti *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), *Platelet Derivate*

Growth Factor (PDGF), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Dinh *et al.*, 2012).

c. Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung mulai hari ke-4 hingga hari ke 21 pasca terjadinya luka. Fase ini meliputi fibroplasia, angiogenesis dan re-epitelisasi. Fibroplasia ditandai dengan adanya diferensiasi sel-sel mesenkim menjadi fibroblast. Dalam fase proliferasi ini sangat dipengaruhi oleh peranan growth factor seperti *Platelet Derivate Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) dalam tahapan fibroplasia. *Growth factor* tersebut dihasilkan oleh makrofag, platelet, dan fibroblast yang berfungsi sebagai kemotaksis fibroblast, aktivitas fibroblast dan mendukung proses proliferasi dari fibroblast (Gurtner, 2007). *Growth factor* tersebut diekspresikan secara lokal pada jaringan luka hingga 5 minggu pasca luka. Menurut (Martin, 2007) kombinasi *Platelet Derivate Growth Factor* (PDGF) dan *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) ini menyatakan peningkatan regenerasi fibroblast dan migrasi sel epidermal.

Adanya beberapa *growth factor* menyebabkan kemotaksis fibroblast menuju luka, fibroblast berproliferasi, dan bermigrasi menuju area luka. Fibroblast berasal dari sel mesenkim yang belum terdeferensiasi, menghasilkan substansi dasar untuk sintesis kolagen. Kadar kolagen yang disekresikan tersebut akan menentukan *tensile strength*. Selanjutnya proses angiogenesis yaitu pembentukan pembuluh darah baru yang kemudian sel endotel akan bermigrasi pada area luka yang dipengaruhi oleh *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Proses

angiogenesis dan fibroplasia terjadi secara bersamaan dengan tujuan agar suplai nutrisi untuk fibroblast terpenuhi dalam proses fibroplasia (Weller *et al.*, 2006). Pada fase ini, terbentuklah jaringan granulasi. Apabila jaringan granulasi telah terbentuk dengan baik maka sel epidermal pada tepi luka akan mengalami proliferasi dan bermigrasi yang diikuti dengan akumulasi membran basalis atas pengaruh dari beberapa *growth factor* seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Keratinocyte Growth Factor* (KGF). Dengan demikian luka akan ditutup oleh sel-sel epidermal.

d. Fase maturasi (*remodelling*).

Fase maturasi berlangsung mulai hari ke 21 hingga sekitar 1 tahun. Fase ini dimulai setelah kavitas luka terisi oleh jaringan granulasi dan proses re-epitelisasi telah berakhir. Perubahan yang terjadi adalah penurunan kepadatan sel dan vaskularisasi, dan diikuti dengan penataan serat kolagen sepanjang area luka untuk meningkatkan kekuatan jaringan baru.

Kontraksi dari luka dan maturasi kolagen sedang berlangsung pada fase ini. Kontraksi luka terjadi akibat aktivitas miofibroblast, yaitu fibroblast yang mengandung komponen mikrofilamen aktin intraseluler. Kolagen tipe III akan berganti menjadi kolagen tipe I dengan bantuan *matrix metalloproteinase* (MMP) yang disekresikan oleh makrofag, fibroblast, dan sel endotel yang berfungsi dalam degradasi kolagen tipe III. Sekitar 80% kolagen kulit adalah kolagen tipe I yang memungkinkan terjadinya *tensile strength* pada kulit (Gurtner, 2007).

Kolagen awalnya tersusun secara tidak beraturan sehingga membutuhkan *lysyl hydroxylase* untuk mengubah lisin menjadi hidroksilisin yang bertanggung jawab terhadap terjadinya *cross-linking* antar kolagen. *Cross-linking* menyebabkan terjadinya *tensile strength* sehingga luka tidak mudah terkoyak (Blakytyn, 2006).

2.2.4 Gangguan Kesembuhan Luka pada Kasus Diabetes Mellitus

Pada penelitian Tanenberg *et al.*, (2011), menunjukkan bahwa penderita diabetes melitus mengalami hambatan penyembuhan luka. Hal ini terjadi karena hiperglikemia kronis mengakibatkan gangguan fungsi leukosit MN, penebalan kapiler, malnutrisi, gangguan fungsi pembekuan darah, dan dehidrasi. Hiperglikemia menyebabkan jejas fungsi fagositosis MN sehingga terjadi peningkatan frekuensi infeksi karena gangguan kemotaksis, fagositosis pelepasan super oksida. Peningkatan kadar HbA1c akan menurunkan aktivitas sel MN yang berfungsi sebagai antimikrobal dengan cara fagositosis (Lobmann *et al.*, 2005).

Penurunan aktivitas fagositosis MN tersebut diakibatkan terjadinya gangguan pada fungsi *intracellular killing* pada proses fagositosis. Pada kondisi hiperglikemia gula dalam darah diubah menjadi sorbitol melalui jalur poliol yang membutuhkan banyak nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen fosfat (NADPH). Proses *intracellular killing* membutuhkan banyak energi untuk membentuk radikal bebas dan hidrogen peroksidase namun apabila terjadi kekurangan energi maka kemampuan fagositosis MN juga berkurang (Lobmann *et al.*, 2005).

Pada kondisi hiperglikemia, 30% glukosa yang tidak mengalami fosforilasi oleh enzim heksokinase memasuki jalur poliol untuk diubah menjadi sorbitol

dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR). Enzim ini menggunakan NADPH untuk mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduksi gugus aldehid glukosa. Konversi ini menyebabkan penurunan level antioksidan *glutathion* (GSH). Dengan bantuan enzim sorbitol dehidrogenase (SDH), sorbitol akan diubah menjadi fruktosa-3-phosphate dan 3-deoxyglucosone, hasil ini kemudian masuk glikasi non-enzimatik. Pada pembentukan fruktosa ini co-faktor nikotinamida adenosin dinukleotida (NAD⁺) dikonversi menjadi nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen (NADH) oleh SDH. Nikotinamida adenosin dinukleotida hidrogen merupakan substrat untuk oksidasi NADH sehingga terjadi produksi ROS (Tang, *et al.*, 2012). Hiperglikemia pada penderita DM dapat meningkatkan stres oksidatif, tingginya kadar glukosa dalam darah dapat mengganggu transport elektron pada mitokondria sehingga terjadi produksi superoksida anion. Tingginya kadar gula dalam darah juga memicu stres oksidatif melalui auto-oksidasi dari glukosa melalui glikasi non-enzimatik. Glukosa dapat bereaksi secara non enzimatis dengan gugus-gugus amino protein. Proses ini menghasilkan *advanced glycosylation end product* (AGE) yang terakumulasi pada dinding pembuluh darah. Produk ini merupakan salah satu penanda modifikasi protein akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino (Tsourdi *et al.*, 2013).

Akumulasi AGE di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas, selain itu AGE akan berikatan terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) sehingga mengakibatkan sintesis sitokin dan growth factor. Sintesis sitokin dan growth factor ini berdampak pada panjangnya fase inflamasi pada luka penderita DM. Kondisi hiperglikemia mengakibatkan akumulasi ROS pada jaringan. Radikal

bebas ini memiliki reaktivitas yang tinggi karena dapat menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal (Suriadi, 2004).

2.3 Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*)

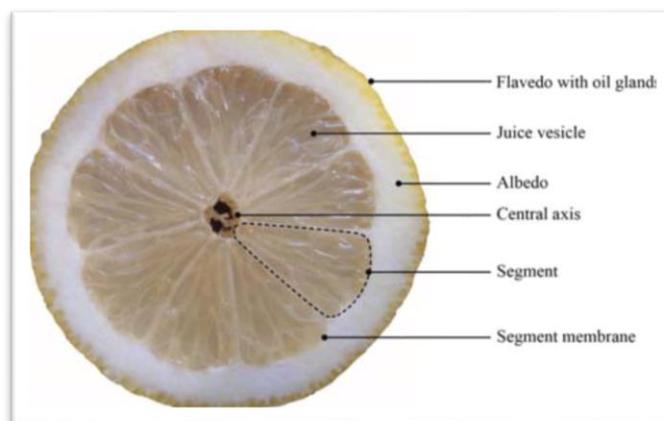
Indonesia terdapat berbagai macam jenis jeruk. Keragaman jeruk sangat tinggi yang ditunjukkan oleh banyaknya anggota pada marga *Citrus* yaitu jeruk manis pacitan, jeruk manis sunkis lau kawar, jeruk manis medan, dan jeruk manis sunkis atau washington orange (WNO). Jeruk yang digunakan pada penelitian ini yaitu jeruk manis pacitan. Ciri khas jeruk pacitan yaitu kandungan air dalam buah yang banyak dan rasa buah yang manis dengan kulit tebal (Karsinah *et al.*, 2006). Jeruk manis (*Citrus sinensis*), yang mempunyai ciri tanaman dengan ketinggian 3-10 meter, ranting berduri; duri pendek berbentuk paku. Tangkai daun panjang 0,5 – 3,5 cm. helaian daun bulat telur, elliptis atau memanjang, dengan ujung tumpul atau meruncing tumpul. Mahkota bunga putih atau putih kekuningan. Buah bentuk bola, atau bentuk bola tertekan berwarna kuning, oranye atau hijau dengan kuning. Daging buah kuning muda, oranye kuning atau kemerah-merahan dengan gelembung yang bersatu dengan yang lain (Hardiyanto, 2007).

Jeruk Manis disebut juga jeruk peras mempunyai nama ilmiah *Citrus sinensis*. Klasifikasi tanaman jeruk manis menurut Van (2008), adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Sub divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Sapindales
Famili : Rutaceae
Genus : Citrus
Spesies : *Citrus sinensis*

Bagian utama buah jeruk dari luar sampai ke dalam adalah kulit (tersusun atas flavedo, kelenjar minyak, albedo dan ikatan pembuluh), segmen-segmen (dinding segmen, rongga cairan, biji), *core* (bagian tengah yang terdiri dari ikatan pembuluh dan jaringan parenkim). Kulit jeruk secara fisik dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu flavedo dan albedo (**Gambar 2.7**). Albedo merupakan jaringan seperti spon berwarna putih yang berhubungan dengan *core* ditengah-tengah buah. Bagian albedo mengandung banyak selulosa, hemiselulosa, lignin, senyawa pektat dan fenol. Albedo banyak mengandung senyawa flavon hesperides seperti hesperidin dan naringin serta senyawa-senyawa limonin. Flavedo dicirikan dengan adanya warna hijau, kuning atau orange. Pigmen yang terdapat pada flavedo adalah kloroplas dan karetenoid (Hardiyanto, 2007).



Gambar 2.7 Struktur kulit jeruk manis (Hardiyanto, 2007)

Buah jeruk memiliki potensi sebagai obat dengan berbagai manfaat. Buah jeruk manis memiliki potensi sebagai antioksidan karena mengandung flavonoid dan vitamin C. Jeruk manis memiliki sifat anti-inflamasi karena dapat mempengaruhi enzim regulator seperti protein kinase C, fosfodiesterase, fosfolipase, lipooksigenase dan siklooksigenase. Flavonoid pada jeruk manis memiliki sifat anti-kanker dan anti-arteriosklerosis karena sifatnya yang antimutagenik dan menetralsasi radikal bebas (Etebu *et al.*, 2014) Sedangkan pada kulit jeruk manis yang 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 (Hardiyanto, 2007). Hasil analisa Etebu *et al.*, (2014) 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. Pada penelitian Ahmad, *et al.* (2013) pemberian ekstrak kulit *Citrus sinensis* dosis 400mg/kgBB secara oral pada tikus model diabetes dengan luka eksisi *full thickness* mempercepat kesembuhan luka lebih baik dibandingkan dengan terapi ekstrak kulit *Citrus lemonen* dan *Citrus paradise* yang di ketahui dari 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* (Karsinah *et al.*, 2006). Heptamethoxyflavone merupakan salah satu flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk manis dan memiliki aktivitas anti-inflamasi yang kuat (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 (Ahmad *et al.*, 2013).

2.4 Sediaan Obat

2.4.1 Sediaan Obat Per-oral

Terapi secara peroral merupakan pemberian terapi yang cara penggunaannya masuk melalui mulut. Keuntungan pemberian terapi melalui rute ini adalah relatif aman, praktis, dan ekonomis. Kerugian yang dapat terjadi adalah timbul efek lambat, tidak bermanfaat untuk pasien yang sering muntah, diare, atau tidak sadar. Untuk tujuan terapi serta efek sistematik yang dikehendaki, penggunaan oral adalah yang paling menyenangkan dan murah, serta umumnya paling aman. 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* (Sanjoyo, 2005).

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 (Sanjoyo, 2015; Gupta, 2005).

2.4.2 Sediaan Obat Topikal

Obat topikal yang berjenis 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 (Wyatt *et al.*, 2001). Salep memiliki karakteristik yaitu tidak mudah tercuci, memiliki efek emolien, efek oklusif dan berminyak. 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 (Sharma, 2015).

Obat topikal bekerja dengan cara masuk ke dalam permukaan kulit mengikuti suatu gradient konsentrasi (difusi pasif). Gradien konsentrasi ditimbulkan oleh perbedaan konsentrasi obat aktif dalam sediaan yang diaplikasikan pada kulit dan konsentrasi obat aktif dalam jaringan kulit serta jaringan di bawahnya (Schaefer *et al.*, 2008).

2.5 Ekspresi *Insulin like Growth Factor-1* (IGF-1)

Insulin-like Growth Factor 1 adalah hormon polipeptida 70 AA dengan efek endokrin, parakrin, dan autokrin. IGF-1 ini 60% homolog dengan IGF-2 dan 50% homolog dengan struktur proinsulin. IGF-1 memiliki kesamaan urutan terhadap insulin dan terdiri dari proinsulin domain A, B dan C. Tidak seperti insulin, di mana domain C dihapus selama pengolahan proinsulin, domain C merupakan bagian aktif dari IGF. Hormon polipeptida ini diproduksi terutama oleh organ hati (75 % dalam sirkulasi) untuk stimulasi endokrin GH dan stimulasi endokrin insulin. IGF-1 ini sebagian bertanggung jawab untuk aktivitas sistemik GH meskipun IGF-1 ini memiliki sejumlah peran sendiri (anabolik, antioksidan, anti-inflamasi dan aksi sitoprotektif) (Aguirre, 2016).

Hipotalamus yang di aktifasi oleh diferensiasi makrofag akibat fase inflamasi yang kemudian berikatan dengan GHRH yang akan merangsang somatotrof di hipofisis anterior agar mengeluarkan hormon pertumbuhan GH. GH yang disekresi terdapat dalam bentuk bebas maupun terikat oleh *Growth Hormon Binding Protein* (GHBP-domain sekunder dari reseptor IGF-1R). Aktivasi IGF-1 yang dilepaskan dalam hati maupun jaringan lain (kulit) akan berikatan dengan reseptor IGF-1R dalam sel, sehingga menyebabkan stimulasi proliferasi, diferensiasi sel dan penghambatan kematian sel, jalur sinyal utama IGF-1R terikat pencegahan apoptosis melalui aktivasi *Phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K), sedangkan untuk proses proliferasi dan diferensiasi sel mengarah pada aktivasi *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Varsha *et al.*, 2014).

2.5.1 Hubungan *Insulin-like Growth Factor-1*(IGF-1) terhadap Proses Penyembuhan Luka

Dalam proses penyembuhan luka, secara khusus growth factor berpengaruh dalam kemotaksis (menarik sel-sel untuk ke area luka), induksi proliferasi sel, angiogenesis, dan mengatur sintesis serta degradasi *Extracellular Matrix* (ECM). Pada kulit, Ekspresi IGF-1 akan diproduksi selama proses penyembuhan luka. Protein IGF-1 dihasilkan dari sel epidermal, fibroblast maupun makrofag sebagai *growth factor* yang berperan dalam proliferasi fibroblast serta migrasi sel keratinosit. IGF-1 dapat berperan dalam efek biologis apabila berikatan pada IGF-1R yang merupakan reseptor transmembran (Varsha *et al.*, 2014). *Insulin-like Growth Factor-1 Reseptor* (IGF-1R) dapat ditemukan pada membran basal di epidermis (Aguirre, 2016).

Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) bekerja baik secara autokrin dan parakrin. Saat terjadinya luka, ekspresi IGF-1 akan meningkat untuk mendukung proses proliferasi. Makrofag akan mengespresikan IGF-1 pada hari 1-3 pasca terjadinya luka. Efek IGF-1 pada fibroblast yaitu merangsang proliferasi pada tahap reepitelisasi pada jaringan kulit, pertahanan diri, migrasi dari fibroblast itu sendiri. Proses proliferasi fibroblast ini dipengaruhi oleh adanya IGFBP-3 yang mampu memodulasi IGF-1 untuk berikatan dengan IGF-1R (Christoper *et al.*, 2010).

Pada Proses penyembuhan luka, IGF-1 berperan dalam proliferasi dan differensiasi fibroblast. Selama proses proliferasi, fibroblast akan berdiferensiasi menjadi myofibroblast dengan mengembangkan struktur yang mirip dengan sel otot polos, termasuk adanya mikrofilament dan ekspresi *α -smooth muscle actin* yang

dikendalikan secara lokal oleh IGF-1. Berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa myofibroblast mengalami peningkatan atas pengaruh IGF-1 pada hari ke-7 pasca operasi (Achar et al., 2014).

Menurut Christoper *et al.*, (2010), jika perkembangan epidermal dipengaruhi oleh IGF-1. Hal ini dibuktikan pada percobaan tikus transgenik yang kekurangan reseptor IGF-1 sehingga terhambatlah perkembangan sel dari membran basal sampai *stratum spinosum* dari epidermis yang menyebabkan kulit menjadi tipis dan transparan. Konsentrasi IGF-1R yang tertinggi berada pada sel basal di epidermis untuk mendukung proliferasi dan migrasi keratinosit. Insulin-like Growth Factor-1 Reseptor (IGF-1R) berekspresi pada lapisan epidermis sejalan dengan proliferasi keratinosit di membran basal pada epidermis. Awalnya fibroblast yang berada di dermis merangsang IGF-1R dari keratinosit secara parakrin. Sehingga IGF-1 diekspresikan oleh sel keratinosit untuk mendukung terjadinya proliferasi dan differensiasi dari sel keratinosit sendiri.

2.6 Sel Radang Mononuklear

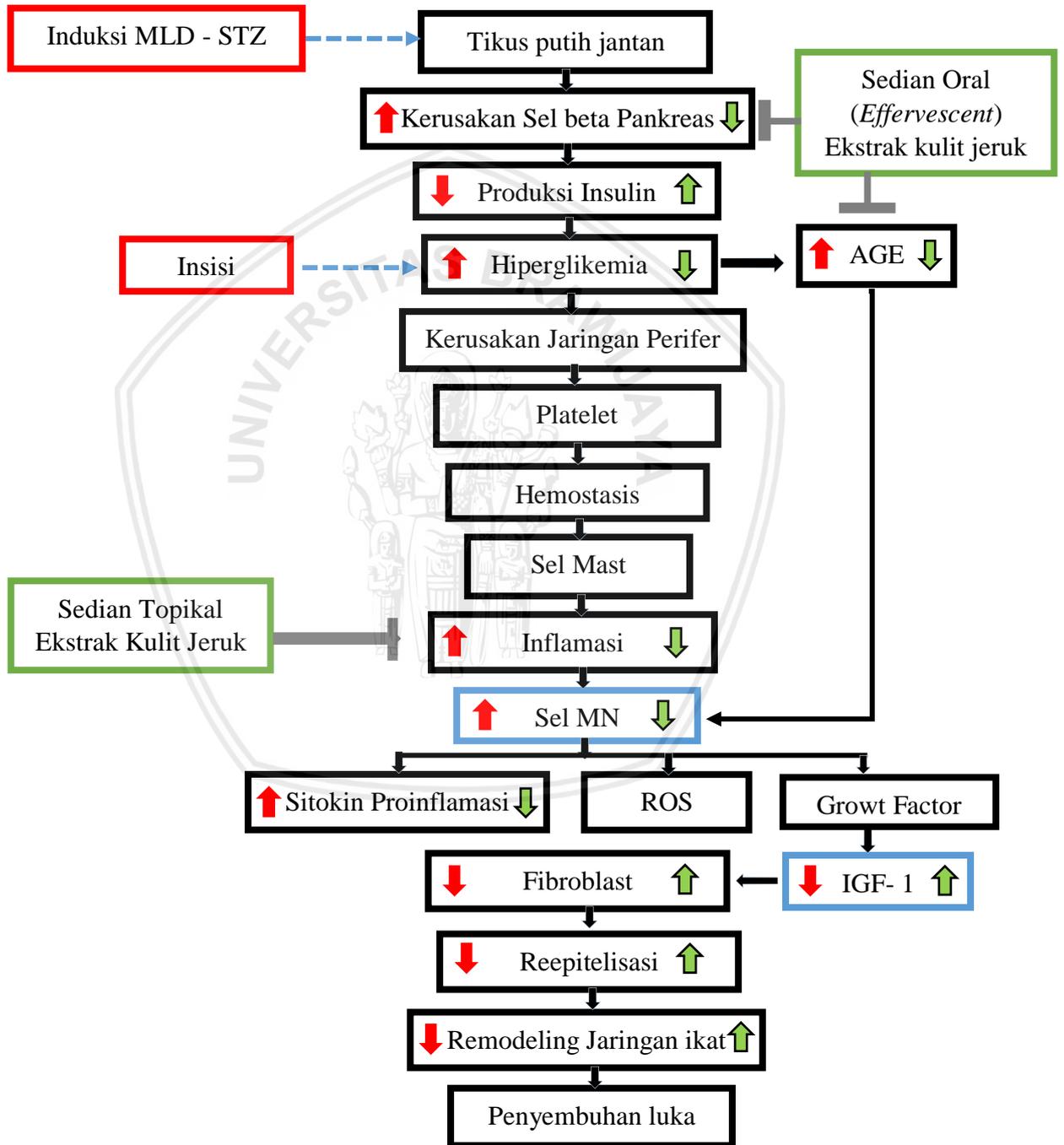
Sel radang merupakan sel-sel yang muncul akibat suatu proses inflamasi (peradangan) pada jaringan. Sel-sel radang tersebut biasanya dapat ditemukan pada eksudat tempat terjadinya inflamasi (radang), dimana eksudat radang terdiri dari sel radang akut (PMN), sel radang kronis (MN), serta jaringan ikat (sel-sel fibroblas). Yang termasuk sel PMN (*polymorphonuclear*) adalah sel neutrofil, eosinofi, dan basofil. Yang termasuk sel MN (*mononuclear*) adalah sel limfosit, monosit, dan sel plasma (Priosoeryanto *et al.*, 2006).

Monosit memiliki diameter 16-20 mm dan memiliki inti besar berbentuk oval atau berlekuk dengan kromatin mengelompok. Sitoplasma monosit berwarna biru pucat dan mengandung banyak vakuola. Granula sitoplasma juga sering ada. Prekursor monosit dalam sumsum tulang (monoblas dan promonosit) sukar dibedakan dari mieloblas dan monosit. Pada jaringan, monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag yang teraktivasi menyebabkan ukuran sel bertambah besar, kandungan enzim lisosom menjadi meningkat, metabolismenya lebih aktif, dan kemampuan membunuh mikroorganisme lebih besar (Puspitasari *et al.*, 2006).

Limfosit yang terdapat dalam darah perifer berukuran kecil dan berdiameter lebih kecil dari 10mm. Nukleus limfosit gelap, berbentuk bundar atau agak berlekuk dengan kelompok kromatin kasar dan tidak berbatas tegas. Sitoplasma limfosit berwarna biru-langit dan dalam kebanyakan sel, terlihat seperti bingkai halus di sekitar inti. Limfosit yang beredar berukuran lebih besar dengan diameter 12-16mm dengan sitoplasma yang banyak yang mengandung sedikit granula azuropilik. Bentuk yang lebih besar ini dipengaruhi oleh antigen yang akan menghasilkan antibodi. Limfosit terdiri dari limfosit B, limfosit T dan sel NK (*natural killer*) (Hoffbrand *et al.*, 2007).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HEPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar:

	: Variabel Bebas		: Menghambat
	: Variabel Kontrol		: Kondisi Tikus
	: Variabel Terikat		: Perlakuan
	: Efek Streptozotocin		: Efek Terapi

Induksi streptozotocin (STZ) menggunakan metode MLD (*Multiple Low Doses*) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari akan menyebabkan gangguan pada pankreas. STZ 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 NAD⁺. Jumlah 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 dan menekan kerja mitokondria. Kondisi ini akan menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah sehingga terjadi hiperglikemia.

Penyembuhan luka terdiri dari fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Pada fase hemostasis, jaringan perifer yang terluka akan terjadi spasm vaskular, pembentukan platelet dan koagulasi darah setelah terjadinya proses hemostasis maka akan dilanjutkan pada fase inflamasi. Setelah terjadinya kerusakan jaringan dan adanya invasi dari bakteri, arteriol pada daerah yang rusak akan melebar untuk meningkatkan aliran darah ke lokasi kerusakan. Vasodilatasi ini disebabkan oleh

histamin yang di lepaskan oleh sel mast. Pelepasan histamin juga meningkatkan permeabilitas kapiler dengan memperbesar pori kapiler. Pada fase inflamasi ini terjadi aktivitas berbagai sel inflamasi yang salah satunya adalah sel MN. Selain melalui fagositosis, sel MN juga berperan dalam eliminasi bakteri dengan cara produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS penting dalam mencegah infeksi bakterial, namun tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakhidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator pro-inflamasi. Selain sebagai fagositosis, Sel MN terutama makrofag juga memproduksi Growth factor yang berfungsi untuk memicu terjadinya proses fase proliferasi yang di tandai dengan angiogenesis, fibroplasia, dan repitelisasi dengan tujuan untuk meningkatkan kolagen, mengisi luka dengan jaringan granulasi dan memperbaiki intergritas dari kulit, dan berlanjut pada *remodeling* jaringan ikat.

Hiperglikemia pada tikus DM ditandai dengan kadar gula darah puasa > 200 mg/dl. Pada hewan DM yang mengalami kondisi luka, terjadi hambatan penyembuhan luka yang diakibatkan oleh tingginya kadar gula dalam darah. Pada kondisi diabetes melitus terjadi peningkatan *advance glycosylation end products* (AGE) melalui jalur glikasi non enzimatis. Hasil produksi ini akan berikatan dengan reseptor makrofag spesifik sehingga meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) untuk mencegah infeksi bakterial, namun tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakhidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator pro-inflamasi sehingga menyebabkan lamanya kesembuhan luka. Sel MN terutama makrofag juga memproduksi Growth factor khususnya IGF-1. Peran IGF-1 pada kesembuhan luka yaitu menstimulasi endotel untuk menghasilkan faktor adhesi seperti fibroblast, sintesis kolagen, keratinosit untuk

dikenali oleh sel MN sehingga terjadi peningkatan infiltrasi sel pada area luka. Kondisi menurunnya kadar growth factor IGF-1 dan peningkatan sel MN akan memperlama kesembuhan luka karena luka berada pada fase inflamasi yang lebih lama. Reaksi inflamasi yang terus-menerus dapat mengakibatkan penurunan proliferasi fibroblas dan produksi kolagen dalam proses kesembuhan luka sehingga dibutuhkan waktu yang lebih lama dalam kesembuhan luka diabetes.

Pemberian terapi kulit jeruk secara oral bertujuan untuk mengontrol kadar gula dalam darah secara sistemik dengan memperbaiki sel β pankreas sehingga tidak terjadi gangguan kesembuhan luka pada penderita DM. Kandungan flavonoid pada kulit jeruk mampu mengurangi stres oksidatif pada sel β pankreas dan dapat meregenerasi sel yang rusak untuk memproduksi insulin kembali, sehingga kadar gula dalam darah dapat diturunkan. Kandungan asam askorbat dalam kulit jeruk mampu mencegah glikasi non enzimatis pada protein sehingga pembentukan AGE dapat ditekan dan tidak terjadi gangguan kinerja makrofag dalam produksi ROS, growth factor IGF-1 dan sitokin pro-inflamasi. Terapi secara oral bekerja secara sistemik dan didukung dengan terapi topikal yang bekerja secara lokal pada area luka untuk mempercepat kesembuhan luka.

Pemberian terapi secara topikal bertujuan untuk memperbaiki kulit yang luka dengan cara mempersingkat fase inflamasi dalam kesembuhan luka. Senyawa flavonoid hesperidin yang terkandung dalam kulit jeruk manis bekerja dengan cara menekan produksi enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga meningkatkan stimulasi terhadap makrofag untuk menghasilkan growth factor IGF-1. Peningkatan produksi growth factor ini akan mengurangi produksi faktor adhesi fibroblast, sintesis kolagen, migrasi keratinosit terhadap sel MN untuk infiltrasi ke dalam area luka. Terapi ekstrak kulit jeruk manis diharapkan mampu menekan sitokin proinflamasi

dan jumlah sel MN sehingga mempercepat selesainya fase inflamasi agar dapat dilanjutkan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan peningkatan fibroblas, migrasi keratinosit, dan kemudian dilanjutkan fase remodelling yang ditandai dengan sintesis kolagen dan degradasi kolagen sehingga proses kesembuhan luka telah selesai.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan sebagai berikut:

1. Terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal mempengaruhi peningkatan ekspresi IGF-1 yang berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus.
2. Terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal mampu menurunkan jumlah sel radang Mononuklear yang berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan dimulai dari 10 April 2017 hingga 20 Juni 2017. Penelitian dilaksanakan di beberapa laboratorium, yaitu di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Ilmu dan Teknologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pembuatan ekstrak kulit jeruk manis dilakukan di Materia Medica Batu, pembuatan sediaan terapi dilakukan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Parasitologi Veteriner, pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan pembuatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, tempat minum, timbangan, *rotary evaporator*, *waterbath*, *digital shaker*, oven, mortar, *aluminium foil*, spatula, penggaris, kamera, glukometer, sonde lambung, spuit, cawan petri, gunting, *scalpel*, *blade*, pinset, silet, *ice box*, *freezer*, *cover glass*, *object glass*, *vortex*, tabung falkon 15 ml, gelas beker 100 ml, papan bedah, pot organ, *microtome*, *dehydrator autotechnicon*, kapas steril, *tissue*, masker, *gloves*, *software* Optilab viewer dan mikroskop (Olympus BX51).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan standar tikus, sekam, kulit jeruk manis, etanol 96%, dekstrin,

asam sitrat, asam tartrat, natrium bikarbonat, streptozotocin, natrium sitrat, NaCl fisiologis, vaselin album, ketamine, xylazine, akuades, alkohol 70%, povidone iodine, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 95%), parafin cair, formalin 10%, xylol, Entellan, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), H₂O₂ 3%, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%, antibodi IGF-1, antibodi sekunder IGF-1, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), Diaminobenzidine (DAB), dan *Hematoxylin Eosin*.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar berumur 8-12 minggu dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor dan diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan dengan kondisi di laboratorium. Adapun estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011):

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

Keterangan :

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa setiap 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan

coba dalam penelitian sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 761-KEP-UB (**Lampiran 8**).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena media yang dipergunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Montgomery dan Kowalsky, 2011). Pada penelitian ini hewan coba dibagi menjadi 5 perlakuan, masing-masing Perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Perlakuan (1) adalah kontrol negatif berisi tikus tanpa DM dengan insisi tanpa terapi. Perlakuan (2) adalah kontrol positif berisi tikus DM dengan insisi tanpa terapi. Perlakuan (3) terapi 1 adalah tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dengan dosis 500 mg/kg BB. Perlakuan (4) terapi 2 adalah tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara topikal (salep konsentrasi 5%). Perlakuan (5) terapi 3 adalah tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara kombinasi oral dan topikal.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
1 (Kontrol Negatif)	Tikus tanpa DM dengan insisi 2 cm tanpa terapi
2 (Kontrol Positif)	Tikus DM dengan insisi 2 cm tanpa terapi
3 (Terapi 1)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi peroral ekstrak kulit jeruk manis dosis 500 mg/kg BB
4 (Terapi 2)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi topikal salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%
5 (Terapi 3)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi kombinasi oral dan topikal

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Variabel bebas : dosis Ekstrak kulit jeruk, perlakuan luka insisi,
- Variabel terikat : Ekspresi IGF-1 dan jumlah sel Mononuclear pada jaringan kulit.
- Variabel kontrol : Streptozotocin, homogenitas tikus (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari strain, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu ruang, pakan, minum, dan kelembapan kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Rancangan penelitian dan Persiapan hewan coba
2. Pembuatan ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)
3. Induksi MLD-STZ pada hewan coba
4. Pembuatan salep dan serbuk effervescent ekstrak jeruk manis
5. Pembuatan luka insisi pada hewan coba
6. Terapi salep dan serbuk ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)
7. Euthanasi dan pengambilan jaringan kulit pada hewan coba
8. Pembuatan preparat kulit
9. Pengamatan jumlah sel radang mononuklear dengan histopat
10. Pengamatan ekspresi IGF-1 dengan Imunohistokimia (IHK)
11. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

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

individu untuk mencegah tikus saling menggigit selama masa terapi. Kandang terbuat dari bahan plastik dan berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi, serta ventilasi cukup. Tikus diadaptasikan selama 7 hari dan diberi diet standar dan air biasa untuk minum. Pemberian makanan dan minuman secara *ad libitum*.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis

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

4.7.3 Induksi MLD-STZ (Multiple Low Dose Streptozotocin)

Tikus DM diperoleh dengan cara injeksi MLD-STZ (dosis 20 mg/kg BB) secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am, 2005). Masa inkubasi STZ dilakukan selama 14 hari dan pemeriksaan kadar gula darah dilakukan pada hari terakhir masa inkubasi. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer digital. Pengukuran kadar gula dilakukan dengan memberi perlukaan pada vena coccygea tikus untuk menginduksi keluarnya darah menggunakan spuit 1 ml. 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 (Hussain, 2002).

4.7.4 Pembuatan Salep dan Serbuk *Effervescent* 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% 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 alumunium foil. Sediaan *effervescent* dibuat menggunakan metode granulasi kering. Ekstrak kering untuk pembuatan *effervescent* didapat dengan cara mencampur ekstrak kulit jeruk manis dengan dekstrin (1:1), kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 10 jam. Hasil oven dihaluskan menggunakan mortar sehingga didapatkan ekstrak sediaan serbuk. *Effervescent* dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak serbuk 150 mg, asam sitrat 42 mg, asam tartrat 63 mg,

dan natrium bikarbonat 126 mg (3,5:1:1,5:3). Serbuk *effervescent* kemudian dilarutkan dalam akuades sebanyak 2 mL untuk sekali pemberian terapi. Semua bahan dicampur menggunakan mortar sampai homogen, kemudian disimpan dalam wadah tertutup. 150 mg ekstrak serbuk, 42 mg asan sitrat, 63 mg asam tartrat, 126 mg natrium bikarbonat. Serbuk *effervescent* kemudian dilarutkan dalam akuades sebanyak 2 mL (Novidianto *et al.*, 2008).

4.7.5 Pembuatan Luka Insisi

Seluruh tikus (20 ekor) yang sudah diadaptasikan, pada hari pertama penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Masing-masing tikus diberi tanda atau label pada ekornya dengan menggunakan spidol tahan air sesuai kelompoknya. Setelah itu, tikus dianestesi menggunakan campuran ketamine (dosis 44-87.5mg/kg BB) dan xylazine (6.25-12.5 mg/kg BB) secara intra peritoneal (Tsourdi *et al.*, 2013). Setelah tikus teranestesi, dilakukan pencukuran rambut didaerah regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis*. Kemudian dilakukan disinfeksi menggunakan alkohol 70% dan povidon iodine 10% pada punggung tikus yang telah dicukur. Sayatan dilakukan pada punggung tikus di kulit daerah tulang belakang menggunakan scalpel steril sepanjang 2 cm diantara regio *dorsal thoracis* dan regio *lumbalis* (1 cm di lateral vertebral column, 5 cm dibelakang garis intraaural) (Alizadeh, 2010). Luka dibuat dengan kedalaman 0.2 cm dan dibiarkan terbuka tanpa perban (Das *et al.*, 2013). Tikus dikembalikan ke kandang masing-masing sesuai kelompok setelah mendapat luka sayat. Selama penelitian tikus diusahakan tidak lapar, tidak haus, dan bebas stres. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*.

Kandang ditempatkan di ruangan yang tenang, tidak bising, diatur suhu, kelembaban dan cukup cahaya. Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan sekam diganti setiap 1 hari sekali.

4.7.6 Terapi Salep dan Serbuk Ekstrak Jeruk Manis

Pemberian ekstrak kulit jeruk manis dilakukan secara oral dan topikal. Terapi diberikan sekali sehari selama 10 hari. Kelompok 3 terapi 1 diberi terapi secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 500 mg/kg BB (Muhtadi *et al.*, 2015). Kelompok 4 terapi 2 diberi terapi topikal dengan mengoleskan salep sebanyak $\pm 0,1$ gram pada daerah luka. Kelompok 5 terapi 3 diberi terapi kombinasi secara oral dan topikal.

4.7.7 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Kulit

Euthanasi dan pengambilan jaringan kulit pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-11 terapi. Hewan coba dieuthanasi dengan melakukan dislokasi pada bagian leher. Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan untuk pemeriksaan histologi secara aseptik menggunakan gunting dengan cara mengeksisi pada bagian luka yang paling luas dengan mengikutsertakan jaringan kulit normal kira-kira 0,5 cm dari tepi luka dengan luas sekitar 2,5 x 2,5 cm. Jaringan dibersihkan terlebih dahulu menggunakan NaCl fisiologis kemudian dilakukan fiksasi pada jaringan yang telah diambil menggunakan *neutral-buffered formalin* (NBF) 10% (Webster *et al.*, 2009). Jaringan yang telah difiksasi disimpan dalam wadah spesimen yang tertutup rapat dan berada dalam suhu ruang.

Pembuatan preparat dilakukan dengan cara jaringan kulit yang telah difiksasi menggunakan larutan formalin 10% selama 2 jam, kemudian dilakukan *trimming* organ dan dimasukkan dalam *cassette tissue* dari plastik. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan Xylol II. Proses pencetakan menggunakan parafin I, parafin II, dan parafin III. Sediaan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sediaan diletakkan ke arah vertikal dan horizontal sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 5 mikron dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat bersuhu 46°C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan diatas *object glass* dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C. Kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk pemeriksaan mikroskopik (Balqis, 2014).

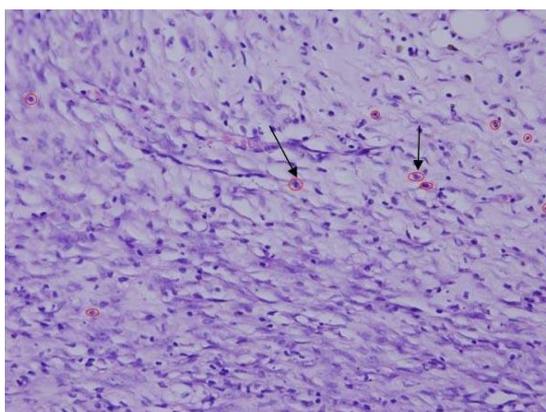
4.7.8 Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan Hematoksilin–Eosin dilakukan menggunakan zat pewarna hematoksilin. Zat pewarna hematoksilin berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik). Eosin merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna

merah muda. Tahapan pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol bertingkat I-III lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Sediaan dicuci dengan aquades selama 5 menit, setelah itu diwarnai dengan pewarna *hematoxyline eosin* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan bilas menggunakan air selama 10 menit dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit, setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 2 menit dan ditutup dengan gelas penutup.

4.7.9 Tahapan Penghitungan Jumlah Sel MN

Pengamatan histopatologi menggunakan metode penghitungan menurut cara Priosoeryanto *et al.* (2006) dan Low *et al.*, (2001), dengan menghitung jumlah sel yang diamati dari preparat histopatologi kulit menggunakan pewarnaan HE. Parameter yang digunakan adalah sel-sel Mononuclear (MN) yang memiliki ciri-ciri inti sel besar dan berwarna gelap serta sitoplasmanya terlihat tipis (**Gambar 4.1**). Inti terisi penuh oleh butir-butir khromatin padat sehingga sangat mengikat zat warna basa menjadi biru atau ungu. Pengamatan histopatologi dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus seri BX51) perbesaran 400x pada 5 lapang pandang dengan bantuan *Optilab viewer* kemudian jumlah sel radang Mononuclear dihitung menggunakan software *imageRaster*.



Gambar 4.1 Gambaran histologi sel Mononuklear (Makrofag) pada jaringan kulit tikus menggunakan pewarnaan HE dengan perbesaran 400x (Utami, 2015).

4.7.10 Tahapan Pewarnaan IGF-1 dengan Imunohistokimia

Langkah pewarnaan Imunohistokimia diawali dengan deparafin dan rehidrasi preparat jaringan. Proses deparafin dilakukan dengan cara preparat jaringan direndam masing-masing selama 5 menit dalam 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% H₂O₂ 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* IGF-1 (pengenceran 1:50) selama 24 jam pada suhu 40°C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel *biotin* (Rabbit anti-rat igG) selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci

kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromogen 3,3'- Diaminobenzidine (DAB) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Presipitasi menggunakan DAB akan menunjukkan hasil berwarna coklat (BIO-RAD, 2016). Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali selanjutnya *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 entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil berupa preparat IHK diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan kemudian difoto. Setelah itu dilakukan pengukuran presentase area ekspresi IGF-1 dengan menggunakan *software ImmunoRatio* dengan satuan DAB / nuklear area untuk mengamati peningkatan konsentrasi IGF-1 yang ditandai dengan peningkatan presentasi luas daerah yang terwarnai.

4.7.11 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah sel Mononuklear (MN) dan ekspresi *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1). Parameter dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *software IBM SPSS Statistic 23* dan selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan tujuan untuk melihat signifikansi pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis terhadap luka. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur

(BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 5\%$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi yang diberikan.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi MLD-STZ dilakukan observasi dan pengecekan kadar glukosa darah untuk memastikan bahwa tikus sudah mengalami diabetes mellitus. Kadar glukosa darah tikus yang mengalami diabetes yaitu >200 mg/dl (Aulanni'am, 2005). Kadar glukosa darah diukur dengan mengambil darah dari vena coccygea dan diukur menggunakan glukometer. Kadar glukosa darah tikus yang menunjukkan >200 mg/dl kemudian ditandai menggunakan spidol pada ekornya. Insisi kemudian dilakukan pada daerah punggung sepanjang 2 cm, kemudian diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral, topikal maupun kombinasi selama 10 hari. hasilnya menunjukkan adanya perbedaan secara makroskopis (**Gambar 5.1**) antara perlakuan terapi dan kontrol.



Gambar 5.1 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan luka insisi pada jaringan kulit tikus pasca 10 hari terapi.

Keterangan : (A) Kontrol negatif. (B) Kontrol positif. (C) Terapi 1 oral *effervescent* kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) Terapi 2 topikal salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) Terapi 3 kombinasi oral *effervescent* dan topikal salep ekstrak kulit jeruk manis.

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

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

Pada perlakuan terapi 3 **Gambar 5.1 (E)** dengan pemberian terapi kombinasi dari *effervescent* dosis 500mg/kg BB dan salep kulit jeruk manis 5% secara topikal terlihat tepi luka insisi yang sudah bertaut sempurna, pertumbuhan

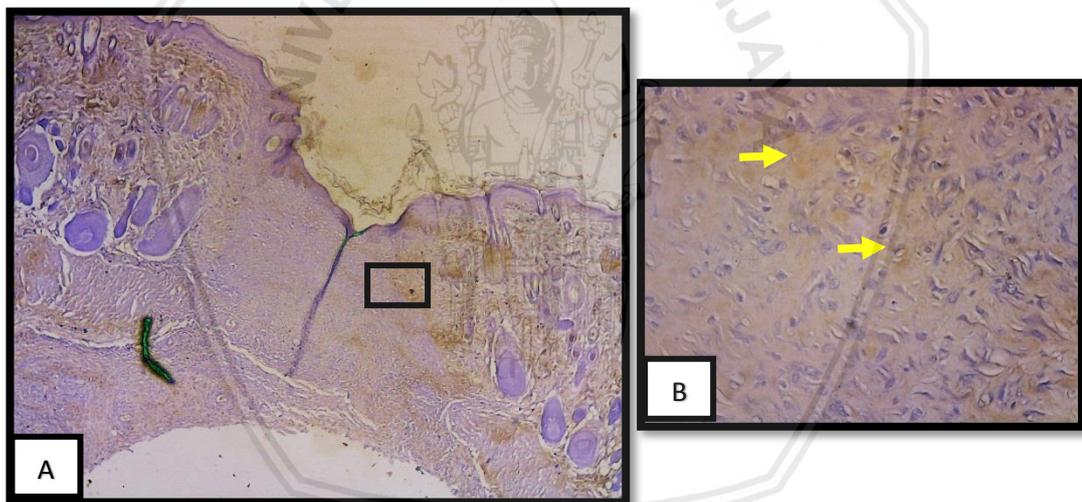
rambut disekitar area luka, tidak terdapat keropeng dan pembengkakan. Rambut yang tumbuh disekitar area luka tersebut menunjukkan terjadinya proses regenerasi dan kondisi kulit sudah mulai kembali normal (Listyanti 2006). Pada perlakuan terapi 3 ini terlihat proses kesembuhan luka yang mencapai fase *remodelling* atau maturasi dimana terdapat jaringan ikat atau *scar* yang telah matang dengan ciri tidak berwarna merah dan tidak ditumbuhi rambut (Flanagan, 2000). Pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal maupun kombinasi dapat diamati perbedaannya secara mikroskopis dengan mengamati ekspresi IGF-1 dan jumlah sel MN.

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) terhadap Ekspresi IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor- 1*) pada Luka Insisi Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pemeriksaan ekspresi IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) dengan menggunakan metode Imunohistokimia. 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 kimia pada imunohistokimia ditunjukkan oleh ikatan antara enzim dan substrat. Ekspresi IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan.

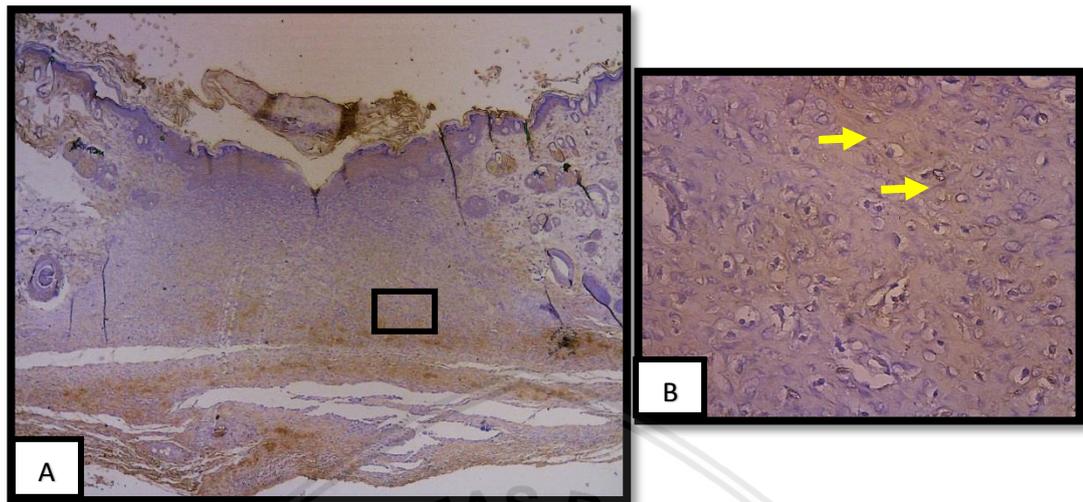
Ekspresi IGF-1 terlihat pada semua perlakuan. Ekspresi IGF-1 tersebar pada bagian pembuluh darah dan jaringan ikat yang ditunjukkan dengan tanda panah pada **gambar 5.2**. Ekspresi IGF-1 paling banyak terdapat pada area

pembuluh darah tepatnya pada sitoplasma karena IGF-1 dikeluarkan oleh growth factor yang berasal dari aliran darah menuju sel target yang mengalami kerusakan. Warna coklat pada gambaran imunohistokimia dihasilkan dari ikatan antara antigen (IGF-1) dalam jaringan kulit dengan antibodi primer (*Rat anti IGF-1*) yang selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG* berlabel Biotin, kemudian dilakukan penambahan *Strep avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HARP) dan substrat *Diamino Benzidine* (DAB) sehingga terbentuk warna coklat pada ekspresi IGF-1 (BIO-RAD, 2016).



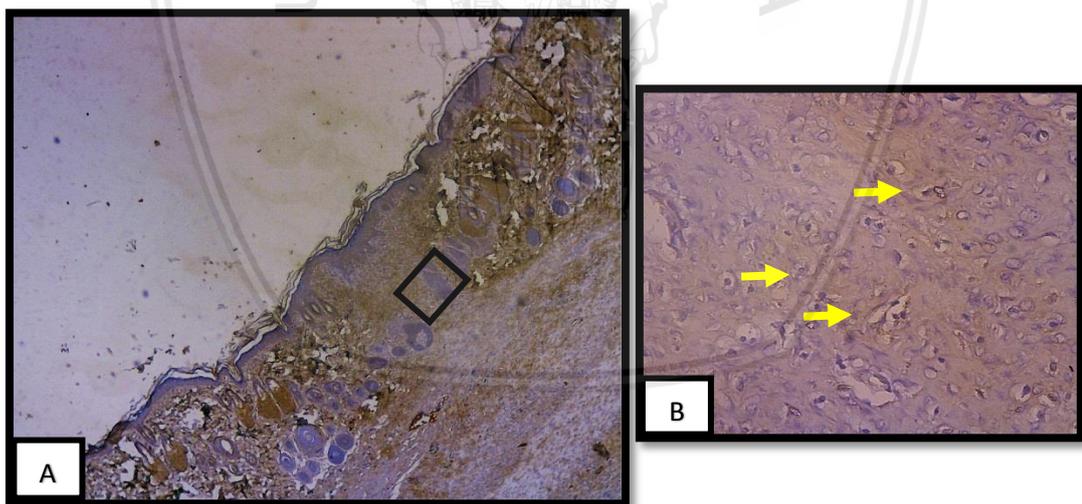
Gambar 5.2 Ekspresi IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x pada luka insisi model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia

Keterangan : kontrol negatif. Warna coklat pada tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1



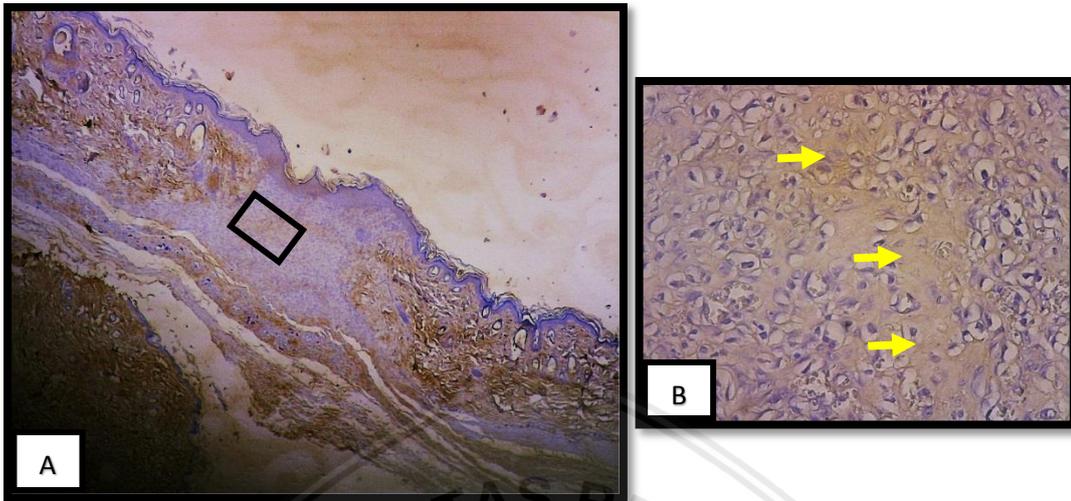
Gambar 5.3 Ekspresi IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x pada luka insisi model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia.

Keterangan : kontrol positif. Warna coklat pada tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1



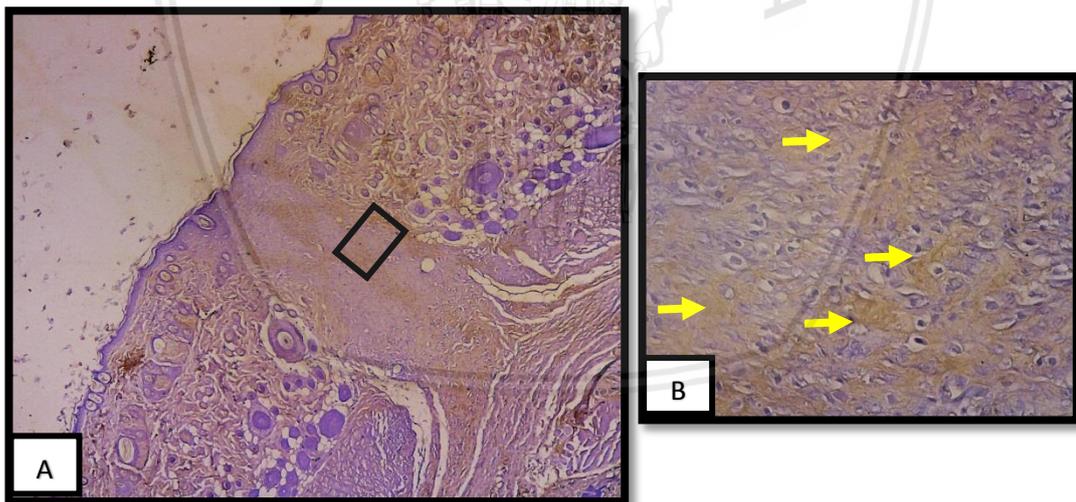
Gambar 5.4 Ekspresi IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x pada luka insisi model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia

Keterangan : terapi 1 oral effervescent kulit jeruk manis 500mg/kg BB. Warna coklat pada tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1



Gambar 5.5 Ekspresi IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x pada luka insisi model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia

Keterangan : terapi 2 topikal salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. Warna coklat pada tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1



Gambar 5.6 Ekspresi IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x pada luka insisi model diabetes dengan pewarnaan Imunohistokimia.

Keterangan : terapi 3 kombinasi oral *effervescent* dan topikal salep ekstrak kulit jeruk manis. Warna coklat pada tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1

Luka insisi pada jaringan kulit akan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan maupun terputusnya pembuluh darah. Mekanisme hemostasis terdiri dari

tiga langkah utama yaitu spasme vascular, pembentukan sumbat trombosit dan koagulasi darah. Selain terjadinya hemostasis, kerusakan jaringan akan menyebabkan makrofag memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*), Sitokin pro-inflamasi dan *Growth Factor*. IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) merupakan hormon polipeptida yang secara struktur dan fungsinya sama seperti insulin namun reseptornya berbeda, yang ketika terjadi gangguan maka semakin berisiko untuk terkena penyakit diabetes. IGF-1 di perifer menurunkan ambilan glukosa dan secara fungsional menginaktivasi IGF1R pada otot sehingga menyebabkan resistensi insulin dan diabetes (Achar *et al.*, 2014). Terjadinya resistensi insulin menyebabkan stress oksidatif, yang mampu menyebabkan inflamasi berlebih hingga kerusakan organ. Terapi ekstrak kulit jeruk manis yang mengandung Flavonoid sebagai antioksidan dapat menekan inflamasi.

Pengamatan ekspresi IGF-1 pada penelitian ini dilakukan dengan menganalisis masing-masing ulangan dengan penilaian pada 5 lapang bidang pandang dengan perbesaran 400x antar kelompok perlakuan. Hasil ekspresi IGF-1 yang diperoleh dikonversikan ke dalam presentase (%) dan di proses menggunakan *software ImmunoRatio*, Kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistic 23*. Berdasarkan statistika deskriptif (**Lampiran 11.2**), semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar deviasi yang lebih kecil dari *mean*. Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Berdasarkan kedua uji tersebut (**Lampiran 11.3**

dan **Lampiran 11.1**), data tersebut tergolong homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *one way* ANOVA.

Pada uji *one way* ANOVA (**Lampiran 11.4**) diperoleh hasil nilai Sig. < 0,05 dan menunjukkan H0 ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Uji lanjutan berupa uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (**Lampiran 11.5**) dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Hasil dari Uji BNJ tersebut ditunjukkan pada **Tabel 5.1** berikut ini.

Tabel 5.1 Rata-rata Hasil Uji BNJ Ekspresi IGF-1 Pada kelompok Tikus Perlakuan

Perlakuan	Ekspresi IGF-1		
	Rata-rata (ekspresi)±SD	Penurunan terhadap K(-) %	Peningkatan terhadap K(+) %
K- (Kontrol negatif)	33,15±0,3 ^c	-	-
K+ (Kontrol positif)	21,93±0,1 ^a	33,86	-
T1 (Oral <i>Effervescent</i> 500mg/KgBB)	27,31±0,2 ^b	-	24,56
T2 (Topikal Salep 5%)	34,76±0,3 ^c	-	58,54
T3 (Kombinasi <i>Effervescent</i> + Salep)	39,29±0,4 ^d	-	79,20

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

Analisa uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal maupun kombinasi pada luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus model diabetes mellitus mampu mencegah terjadinya penurunan kadar ekspresi IGF-1 secara signifikan ($\rho < 0,05$), hal ini ditunjukkan dengan adanya 4 jenis notasi pada uji lanjutan tukey (**Tabel 5.1**) Hasil uji tukey menunjukkan pada kelompok kontrol negatif berbeda signifikan ($\rho < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif, terapi 1 dan terapi 3 dan bernetasi sama dengan terapi 2. Pada kelompok kontrol positif berbeda signifikan

dengan kontrol negatif, terapi 1, terapi 2, dan terapi 3. Pada terapi 1 berbeda signifikan dengan kontrol negatif, kontrol positif, terapi 2 dan terapi 3. Pada terapi 2 berbeda signifikan dengan kontrol positif, terapi 1 dan terapi 3 tetapi bernotasi sama dengan kontrol negatif. Pada terapi 3 berbeda signifikan dengan kontrol negatif, kontrol positif, terapi 1 dan terapi 2. Berdasarkan pemaparan ini menunjukkan bahwa kelompok terapi 2 dapat mencegah penurunan ekspresi IGF-1 di bandingkan dengan kontrol positif, karena berada di notasi sama dengan kontrol negatif. Namun kesembuhan luka pada terapi 3 lebih baik dibandingkan dengan terapi 2 (**Tabel 5.1**).

Rata-rata ekspresi IGF-1 pada kontrol negatif sebesar $33,15 \pm 0,3^c$ yang digunakan sebagai indikator normal ekspresi IGF-1 pada luka normal dan sebagai pembanding dengan kelompok kontrol positif. Ekspresi IGF-1 pada kelompok kontrol negatif berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif. IGF-1 merupakan salah satu *growth factor* yang berkerja secara tidak langsung yang di lepaskan oleh makrofag. Pada keadaan sehat ekspresi IGF-1 akan menurun dibandingkan dalam keadaan luka sebab pada saat luka IGF-1 ini sangat dibutuhkan pada penyembuhan luka untuk memicu penyembuhan sel, diferensiasi, mengawali pemulihan jaringan yang rusak, dan mengurangi stress oksidatif (Werner S, 2009).

Pada perlakuan kontrol positif rata-rata ekspresi IGF-1 yaitu $21,93 \pm 0,1^a$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dengan persentase penurunan terhadap kontrol negatif sebesar 33,86 %. Penurunan ekspresi IGF-1 pada perlakuan kontrol positif dikarenakan kondisi fisiologis luka yang di sebabkan yaitu berupa proses hiperglikemi yang diiringi oleh perubahan

komposisi tubuh, perubahan neuro-hormonal khususnya penurunan *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Penurunan IGF-1 akan mengakibatkan penurunan ambilan glukosa karena menurunnya sensitivitas reseptor dan aksi insulin, sehingga menyebabkan mempercepat pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakhidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotriene. Mediator inflamasi tersebut memiliki efek kemotaktik terhadap makrofag yang akan menuju ke area inflamasi dan mengeluarkan beberapa sitokin proinflamasi sehingga menyebabkan inflamasi presisten pada jaringan yang luka sehingga proliferasi serta migrasi keratinosit pada luka terhambat.

Pada perlakuan terapi 1 (terapi oral *effervescent*) rata-rata ekspresi IGF-1 yaitu $27,31 \pm 0,2^b$ dengan persentase peningkatan terhadap kontrol positif sebesar 24,56%. Rata-rata ekspresi IGF-1 pada perlakuan terapi 1 ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi oral *effervescent* ekstrak kulit jeruk manis meningkatkan ekspresi IGF-1 lebih baik dibandingkan kelompok luka tikus DM namun tidak lebih baik dibandingkan dengan luka tikus normal. Dikarenakan kontrol negatif dan terapi oral mempengaruhi tubuh secara sistemik dan memperbaiki gangguan kesembuhan luka akibat hiperglikemia.

Peningkatan rata-rata ekspresi IGF-1 pada perlakuan terapi 1 dibandingkan perlakuan kontrol positif dikarenakan terapi oral *effervescent* kulit jeruk manis dapat mencegah interaksi AGE dengan makrofag sehingga mencegah

produksi sitokin proinflamasi secara terus-menerus. Kandungan vitamin C pada ekstrak kulit jeruk manis dapat berkompetisi dengan glukosa dalam ikatannya dengan protein sehingga menekan pembentukan AGE dan gangguan kesembuhan luka dapat dicegah. Selain manfaat terhadap kesembuhan luka, terapi secara oral juga berdampak secara sistemik. Menurut penelitian Ahmad, *et al.*, (2013) kandungan flavonoid dari kulit jeruk manis mampu menurunkan hiperglikemia pada tikus DM. Flavonoid kulit jeruk manis dapat menekan radikal bebas dan meregenerasi sel β pankreas sehingga hormon insulin dapat diproduksi kembali dan kadar gula darah dapat dikontrol sehingga mencegah gangguan kesembuhan luka seperti AGE (*advanced glycosylation end product*). Flavonoid juga mampu menstimulasi jalur sinyal intraseluler untuk proliferasi dan diferensiasi sel melalui *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), Fibroblas berproliferasi dan mengekspresikan reseptor integrin $\alpha 5\beta 3$, melalui reseptor tersebut sel-sel fibroblas akan bermigrasi menuju luka melalui ikatan dengan matriks ekstraseluler untuk membentuk jaringan granulasi (Muhtadi, *et al.*, 2015). Pada penelitian Verma, *et al.*, (2013) menyatakan bahwa konsumsi flavonoid secara rutin dapat menginduksi sel duktus pankreas sehingga terbentuk formasi baru sel β pada pankreas dan terjadi neogenesis pada pulau langerhans pada tikus yang sudah diinjeksi STZ.

Pada perlakuan terapi 2 (terapi salep konsentrasi 5 %) didapatkan rata-rata ekspresi IGF-1 yaitu $34,76 \pm 0,3^c$ dengan persentase peningkatan terhadap kontrol positif sebesar 58,54%. Rata-rata ekspresi IGF-1 pada perlakuan terapi 2 ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi salep meningkatkan ekspresi IGF-1 lebih baik dibandingkan

kelompok luka tikus DM tanpa terapi. Peningkatan rata-rata ekspresi IGF-1 pada perlakuan terapi 2 dibandingkan perlakuan kontrol positif dikarenakan kandungan flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin bersifat antiinflamasi dengan menghambat siklooksigenase dan lipopksigenase sehingga terjadi pembatasan jumlah inflamasi yang bermigrasi ke jaringan perlukaan yang dapat mempersingkat reaksi inflamasi dan kemampuan proliferasi sel atas pengaruh dari *growth factor* seperti IGF-1 dan TGF- β tidak terhambat sehingga terjadi pembentukan jaringan granulasi (Felipe, *et al.*, 2015). Pada penelitian Ramasamy dan A. Bhaskar., (2016) menunjukkan bahwa salep kulit jeruk manis 5% mempercepat proses kesembuhan luka paling baik dibandingkan dengan dosis 10% dan terapi salep nitrofurazone.

Pada perlakuan terapi 3 (kombinasi *effervescent* dan salep) didapatkan rata rata ekspresi IGF-1 yaitu $39,29 \pm 0,4^d$ dengan persentase peningkatan terhadap kontrol positif sebesar 79,20%. Rata-rata ekspresi IGF-1 pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok terapi kombinasi oral *effervescent* dosis 500mg/kg BB dan topikal salep 5% terlihat ekspresi IGF-1 pada luka yang paling banyak dibandingkan semua perlakuan terapi. Hal ini terjadi karena kombinasi terapi *effervescent* dan salep *Citrus sinensis* dapat menekan produksi AGE sehingga hambatan kesembuhan luka secara sistemik dapat dikurangi dan secara lokal dapat menghambat siklooksigenase dan lipopksigenase sehingga dapat menekan produksi sitokin proinflamasi sehingga perbaikan kesembuhan luka pada terapi 3 lebih baik dibandingkan terapi 1, terapi 2, kontrol negatif dimana luka tikus tanpa diabetes namun tidak diterapi (Cunningham, 2013; Felipe, *et al.*, 2015; Safari, *et al.*, 2006).

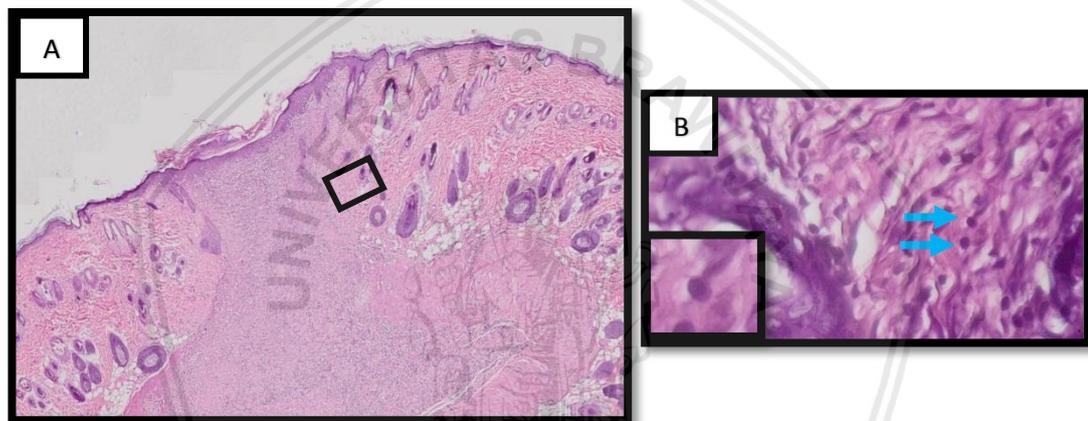
Tingginya ekspresi IGF-1 pada luka menandakan proses inflamasi sudah selesai dan proses kesembuhan luka dilanjutkan ke fase proliferasi.

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

Salah satu indikator keberhasilan pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis pada luka insisi tikus model diabetes mellitus selain diamati dari peningkatan ekspresi IGF-1 juga dapat diketahui melalui pengamatan histopatologi kulit yaitu dengan menghitung jumlah sel mononuklear dengan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE). Tahap awal kesembuhan luka yaitu fase inflamasi akut yang ditandai dengan peningkatan sel mononuklear terutama monosit. monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Sel ini dibutuhkan untuk membersihkan area luka dari masuknya benda asing, infeksi mikroorganisme serta membersihkan jaringan yang rusak. Setelah itu pada hari yang ketiga fungsi fagositosis mononuklear akan mengalami penurunan yang menandakan tahap kesembuhan luka memasuki fase proliferasi (Komesu, *et al.*, 2004).

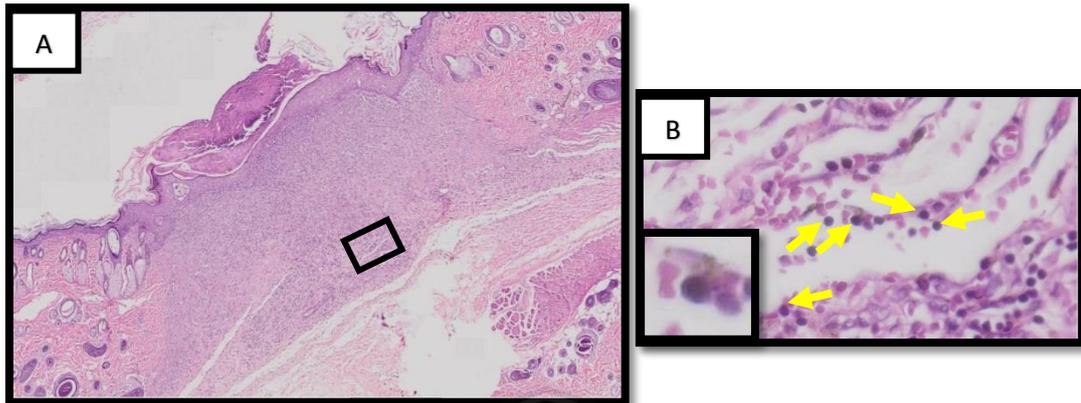
Sel mononuklear merupakan leukosit agranular di antara lain monosit, limfosit dan sel plasma. Monosit memiliki ciri berdiameter 16-20 μm dan memiliki inti besar berbentuk oval atau berlekuk dengan kromatin mengelompok. Sitoplasma monosit berwarna biru pucat dan mengandung banyak vakuola. Granula sitoplasma juga sering ada. Limfosit memiliki ciri diameter 12-16 μm Nukleus limfosit gelap, berbentuk bundar atau agak berlekuk dengan kelompok kromatin kasar dan tidak berbatas tegas. Sitoplasma limfosit berwarna biru-langit dan dalam kebanyakan sel, terlihat seperti bingkai halus di sekitar inti, nukleus sel MN memiliki sifat basofilik

sehingga terwarnai ungu dengan pewarnaan HE. Pengamatan jumlah MN pada penelitian ini dilakukan dengan menganalisis masing-masing ulangan dengan penilaian pada 5 lapang bidang pandang dengan menggunakan *software* Optilab viewer® perbesaran 400x antar masing-masing kelompok perlakuan seperti pada **Gambar 5.3**. Hasil perhitungan jumlah sel MN yang diperoleh dikonversikan ke dalam presentase (%) dan di proses menggunakan program *ImageRaster*.



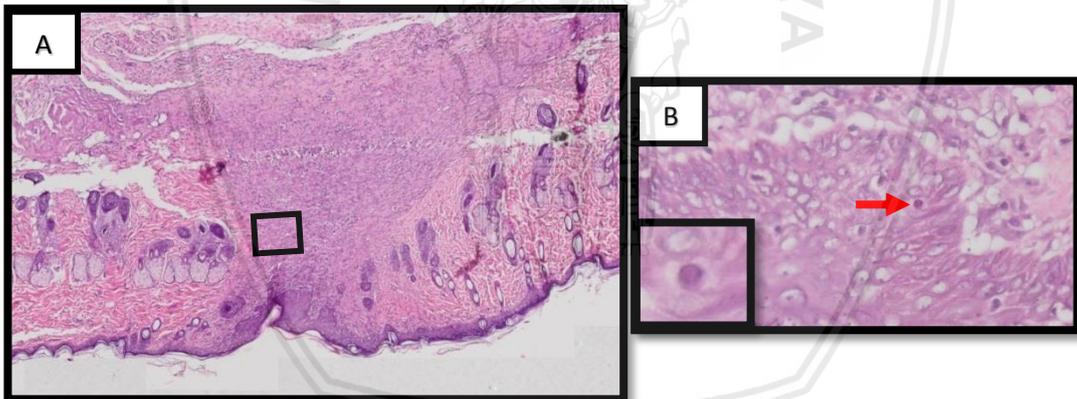
Gambar 5.7 Gambaran mikroskopis sel MN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoxilin eosin (HE) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x

Keterangan : Kontrol negatif. Tanda panah :
➔ (Monosit)
➔ (Limfosit)
➔ (Makrofag)



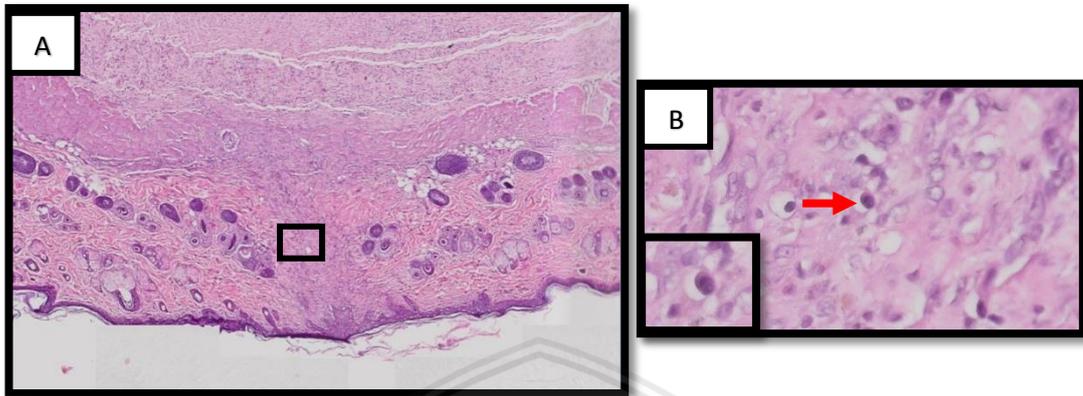
Gambar 5. 8 Gambaran mikroskopis sel MN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x

Keterangan : Kontrol positif. Tanda panah :
→ (Monosit)
→ (Limfosit)
→ (Makrofag)



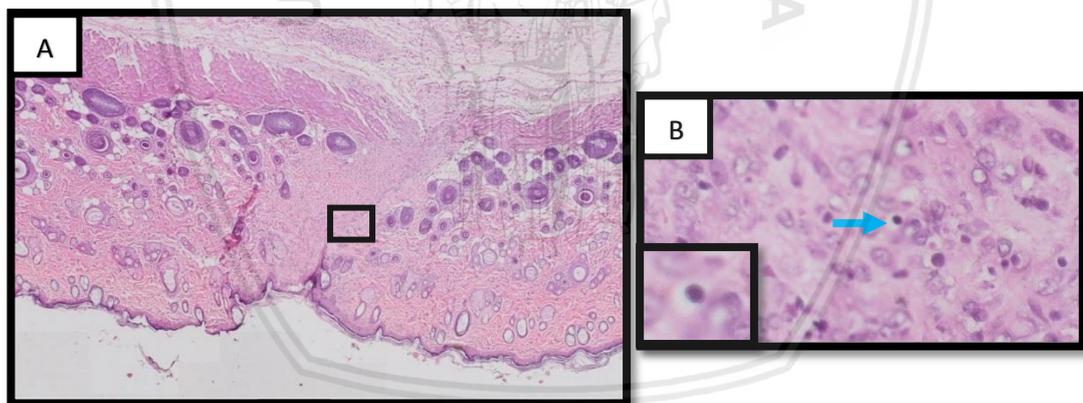
Gambar 5. 9 Gambaran mikroskopis sel MN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x

Keterangan : Terapi 1 Oral Effervescent 500mg/kgBB. Tanda panah :
→ (Monosit)
→ (Limfosit)
→ (Makrofag)



Gambar 5. 10 Gambaran mikroskopis sel MN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x

Keterangan : Terapi 2 Topikal salep konsentrasi 5%. Tanda panah : → (Monosit)
→ (Limfosit)
→ (Makrofag)



Gambar 5. 11 Gambaran mikroskopis sel MN pada luka insisi tikus model diabetes dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) (A) perbesaran 40x (B) perbesaran 400x

Keterangan : Terapi 3 Kombinasi *effervescent* dan salep. Tanda panah : → (Monosit)
→ (Limfosit)
→ (Makrofag)

Kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistic 23*. Berdasarkan statistika deskriptif (**Lampiran 12.2**), semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar

deviasi yang lebih kecil dari *mean*. Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Berdasarkan kedua uji tersebut (**Lampiran 12.3** dan **Lampiran 12.1**), data tersebut tergolong homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *one way* ANOVA.

Pada uji *one way* ANOVA (**Lampiran 12.4**) diperoleh hasil nilai Sig. < 0,05 dan menunjukkan H0 ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Uji lanjutan berupa uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (**Lampiran 12.5**) dilakukan untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Hasil dari Uji BNJ tersebut ditunjukkan pada **Tabel 5.2** berikut ini.

Tabel 5.2 Rata-rata Hasil Uji BNJ Jumlah Sel MN Pada kelompok Tikus Perlakuan

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

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

Analisa uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal maupun kombinasi pada luka insisi tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus model diabetes mellitus mampu mencegah terjadinya peningkatan jumlah sel MN secara signifikan ($\rho <$

0,05), hal ini ditunjukkan dengan adanya 3 jenis notasi pada uji lanjutan tukey (**Tabel 5.2**) Hasil uji tukey menunjukkan pada kelompok kontrol negatif berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif, terapi 2, terapi 3 dan bernotasi sama dengan terapi 1. Pada kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan kontrol negatif, terapi 1, terapi 2, dan terapi 3. Pada terapi 1 berbeda signifikan dengan kontrol positif, terapi 2, terapi 3 dan bernotasi sama dengan kontrol negatif. Pada terapi 2 berbeda signifikan dengan kontrol negatif, kontrol positif, terapi 1 dan bernotasi sama dengan terapi 3. Pada terapi 3 berbeda signifikan dengan kontrol negatif, kontrol positif, terapi 1 dan bernotasi sama dengan terapi 2. Berdasarkan pemaparan ini menunjukkan bahwa kelompok terapi 1 dapat mencegah peningkatan jumlah sel MN di bandingkan dengan kontrol positif, karena berada di notasi sama dengan kontrol negatif. Namun kesembuhan luka pada terapi 3 lebih baik dibandingkan dengan kontrol negatif terapi 1 dan terapi 2 dilihat dari persentase jumlah penurunan sel MN (**Tabel 5.2**)

Rata-rata jumlah sel MN pada kelompok kontrol negatif sebesar $2,4 \pm 0,2^b$ yang digunakan sebagai indikator normal jumlah sel MN luka tanpa diabetes dan tanpa terapi yang kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, dan terlihat persentase peningkatan terhadap kontrol negatif sebesar 120,8%. Pada luka tikus kontrol negatif tanpa diabetes berbagai mediator inflamasi seperti prostaglandin, sitokin proinflamasi dan produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) akan menarik makrofag untuk menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka. Pada umumnya makrofag ditemukan dua hari pertama

untuk melakukan fungsi fagositosis dan membersihkan luka dari benda asing, bakteri dan sel mati (Velnar, 2013).

Pada kelompok kontrol positif rata-rata jumlah MN yaitu $5,3 \pm 0,3^c$ sehingga terdapat perbedaan secara signifikan dengan kelompok kontrol negatif dengan persentase peningkatan terhadap kontrol negatif sebesar 120,8%. Pada kelompok kontrol positif tikus mengalami kondisi diabetes melitus dimana fase inflamasi pada luka insisi terlambat terjadi dan bertahan lebih lama dibanding kondisi luka tanpa DM sehingga memperpanjang proses kesembuhan luka (Komesu, *et al.*, 2004). Gangguan kesembuhan luka juga diakibatkan oleh kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita DM sehingga memicu terjadinya glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan *advanced glycosylation end product* (AGE). Pada kondisi hiperglikemia pembentukan AGE dapat terjadi dalam beberapa hari sampai berminggu-minggu dan bersifat irreversibel (Hafizur, *et al.*, 2017). Produk glikasi ini dapat mengakibatkan berbagai gangguan secara sistemik dalam tubuh, salah satunya adalah sel MN dimana perlekatan AGE dapat menginduksi sel ini untuk menghasilkan ROS, proinflamasi dan growth factor (Wong, *et al.*, 2002). *Reactive oxygen species* (ROS) dalam jumlah yang berlebihan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakidonat yang akan memicu ulang berbagai mediator inflamasi pada luka seperti prostaglandin dan leukotrien. Peningkatan mediator inflamasi ini berdampak pada infiltrasi sel MN pada area luka sehingga dapat memperlama fase inflamasi (Anggita, 2017).

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

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

Pada kelompok terapi 2 (terapi topikal salep konsentrasi 5%) didapatkan rata-rata jumlah MN $0,7 \pm 0,1^a$ dan terlihat penurunan presentase jumlah rata-rata MN terhadap kelompok kontrol positif sebesar 86,8%. Rata-rata jumlah sel MN pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif, kontrol negatif, terapi 1, dan tidak berbeda secara signifikan dengan terapi 3. Hal ini menunjukkan bahwa pada terapi salep 5% dapat menurunkan jumlah sel MN pada luka tikus DM lebih baik dibandingkan kontrol positif dengan luka tikus dengan DM tanpa terapi. Kandungan hesperidin pada ekstrak kulit *Citrus sinensis* dapat menekan produksi sitokin proinflamasi sehingga dapat menekan adhesi sel MN pada sel endotel (Felipe, *et al.*, 2015). Adhesi sel MN pada dinding pembuluh

darah merupakan awal dari gerakan sel MN masuk ke dalam jaringan. Penghambatan adhesi sel MN pada dinding pembuluh darah mengakibatkan infiltrasi sel MN kedalam jaringan turun sehingga inflamasi akan berkurang. Luka dengan jumlah sel MN lebih sedikit menunjukkan kesembuhan luka yang lebih cepat. Hal ini disebabkan sel MN menghasilkan enzim elastine yang mempunyai kemampuan memecah protein yang mampu merusak jaringan dan perbaikan matriks ekstra seluler. Gangguan pada matriks ekstra seluler ini dapat menyebabkan terganggunya perbaikan epitel sehingga proses penyembuhan luka dapat terhambat (Kumar, *et al.*, 2010).

Pada kelompok terapi 3 (kombinasi oral *effervescent* dan salep ekstrak kulit jeruk) $0,5 \pm 0,1^a$ dan terlihat presentase penurunan rata-rata sel MN terhadap kelompok kontrol positif sebesar 90,6%. Rata-rata sel MN pada kelompok terapi ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif, kontrol negatif, terapi 1 dan tidak berbeda secara signifikan dengan terapi 2. Pada kelompok terapi kombinasi oral *effervescent* dosis 500mg/kgBB dan salep 5% terlihat jumlah sel MN pada luka yang paling sedikit dibandingkan semua kelompok terapi. Hal ini terjadi karena terapi salep ekstrak *Citrus sinensis* dapat mempercepat selesainya fase inflamasi pada luka dan terapi *effervescent Citrus sinensis* dapat menekan produksi AGE sehingga hambatan kesembuhan luka dapat ditekan, sehingga perbaikan kesembuhan luka pada terapi 3 lebih baik dibandingkan kontrol positif dimana luka tikus diabetes namun tidak diterapi (Cunningham, 2013; Felipe, *et al.*, 2015; Safari, *et al.*, 2006). Penurunan jumlah sel MN pada luka menandakan proses

peradangan sudah selesai dan proses kesembuhan luka dilanjutkan ke fase berikutnya.

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

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

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

BAB VI 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 mellitus adalah sebagai berikut:

1. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal pada luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 dengan peningkatan hingga 79,20 % terhadap kontrol positif.
2. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal pada luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus mampu menurunkan jumlah sel Mononuklear (MN) paling baik yaitu 90,6 % terhadap kontrol positif.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan kesembuhan luka insisi tikus (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus menggunakan obat-obatan konvensional yang ada di masyarakat dengan salep dan effervescent ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*).

DAFTAR PUSTAKA

- Achar Rosi A, N, Thiago C, S, Eduardo A, Roosecelis B M, Jose Lucio M. 2014. *Use of insulin-like growth factor in the healing of open wounds in diabetic and non-diabetic rats*. Acts Cirurgica Brasileira. New york.
- Aguirre G. A, J. Rodríguez De Ita, R. G. de la Garza and I. Castilla-Cortaza. 2016. *Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome*. <https://translationalmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-015-0762-z>. Dia akses pada tanggal 20 januari 2018.
- Ahmad, M., M. N. Ansari, A. Alam and T. H. Khan. 2013. *Oral Dose of Citrus Peel Extracts Promotes Wound Repair in Diabetic Rats*. Pakistan Journal of Biological Sciences 16 (20): 1086-1094.
- Aja, D.S. 2016. *Section One Diabetes Mellitus*. In : State of Pet Health 2016 Report. Banfield Pet Hospital., California.
- 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.
- Anggita, O.Y.F. 2017. *Pengaruh Salep Kefir Susu Sapi Kombinasi Lidah Buaya (Aloe vera) terhadap Jumlah Sel radang dan Jumlah Kapiler Sebagai Terapi Luka Insisi pada Kulit Tikus (Rattus norvegicus)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, dan B.S. Sumitro. 2005. *Detection of GAD 65 Auto Antibodies of Type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Produce from Bovine Brain Tissue*. Medical Journal of Indonesia 14:197-205.
- Bacha, W. J and Bacha L. M. 2012. *Color atlas of veterinary histology Third Edition*. Wiley-Blackwell. USA.
- Baqarizky, Fiihzda. 2015. *Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar, dan Ginjal Tikus Diabetes Melitus Yang Diinduksi Streptozotocin Dengan Pewarnaan*

Hematoksin Eosin. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatulla Jakarta. Jakarta.

Balqis, U., Rasmaidar, Marwiyah. 2014. *Gambaran Histopatologis Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (Spondias dulcis F.) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*, Jurnal Medika Veterinaria.

Bio-Rad, 2016. *Imunohistokimia Application Guide*. Bio-Rad Laboratories, inc, USA.

Blakytyn, R. and E. Jude. 2006. *The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes*. Diabet Med., 23(6): p. 594-608.

Bogdanske, J., S. Stelle, M. Rilley, and B. Schiffman. 2010. *Laboratory Rat Procedural Techniques*. CRC Press. Boca Raton. London.

Christoper, Wraight, dan George A. Werther. 2010. *Insulin-Like Growth Factor-1 and Epidermal Growth Factor Regulate Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in the Human Keratinocyte Cell Line HaCat*. The Society for investigative Dermatology, inc. 105.

Cholis, M., T. Hidayat, S.H.W. Tantari. 2013. *Terapi Dalam Dermatologi*. Edisi 1. UB Press. Malang.

Cunningham, J.J. 2013. *The Glucose atau Insulin System and Vitamin C: Implication in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. Journal of the American College of Nutrition 17:2, 105-108.

Das, K. 2013. *Wound Healing Potential of Aqueous Crude Extract of Stevia Rebaudiana in Mice*. Brazilian Journal of Pharmacology. 23: 351-357.

Dinh, T. 2012. *Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration*. Journal in Diabetes.

Dovi, J.V., A.M. Szpaderska, and L.A. DiPietro. 2004. *Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury*. Thromb Haemost.

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.

- Felipe, A.P., S.N.H. Miriam and M.B. Sergio. 2015. *Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B*. *Chemico-Biological Interactions*. Volume 228, 88-99.
- Flanagan, M. 2000. *The Physiology of Wound Healing*. *Journal of Wound Care* Vol 9, No 6.
- Gunna- Moore, D. 2013. *Diabetes Mellitus in Cats*. Crieff 2 Day Small Animal CPD Meeting. United Kingdom. 284-304.
- Gupta, S. & Sharma, R.K. 2005. *Role of oxidative stress biomedicine farmakology terapi*. Biomed Cental.
- Gurtner GC, 2007. *Wound Healing, Normal and Abnormal: Grabb and Smith's Plastic Surgery* 6th edition, p: 15-22.
- 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.
- Hafizur, R.M., S. Momin, N. Fatima. 2017. *Prevention of Advanced Glycation Endproducts Formation in Diabetic Rats through Beta-cell Modulation by Aegle Marmelos*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17:227.
- Han, Seung. 2016. *Innovations and Advances in Wound Healing*. Second Edition. Spinger. New York.
- Hardiyanto M, E, Mujiarto, Sumiarti. 2007. *Kekerabatan genetik beberapa spesies jeruk berdasarkan kekerabatan*. *Jurnal hortikultural*. Universitas Negri Malang; Malang.
- Hendrich, H. J. 2006. *Taxonomy and stocks and strains in the Laboratory Rat*. Burlington : Elsevier Academic.
- Hussain, H.E.M. 2002. *Reverse of Diabetic Retinopathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats sing Traditional Indian Anti Diabetic Plan Azadirachta Indika*. *Idian Journal Clinic Biochemical*. 17:115-123.

- Hoffbrand A.V., Pettit JE. 2007. *Leukemia. Dalam : Essential Haematology (Kapita Selekta Haematology)*. Edisi 2. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal: 127-155.
- Karsinah, sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidin noor. 2006. *Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jeruk Berdasarkan Analisis Penanda RAPD*. J. Biotek. Pert 7; Jakarta.
- Kartikaningtyas, A.T., Prayitno, 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.
- Khoshneviszadeh, M. 2014. *Topical Simvastatin Enhances Tissue Regeneration in Full- Thickness Skin Wounds in Rat Models*. Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
- Krinke, G. 2007. *The Laboratory Rat*. San Diego. CA: Academic Press. Hal.15-152.
- Kumar, V., A.K. Abbas, M. Fausto, R. Mitchell and Robbins. 2010. *Basic Pathology*. 8th edition. Elsevier Saunders Inc. China.
- Koh, T.J. and L.A. DiPietro. 2011. *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage*. Expert Rev Mol Med.
- Komesu, M.C., M.B. Tanga, K.R. Buttros, C. Nakao. 2004. *Effects of Acute Diabetes on Rat Cutaneous Wound Healing*. Elsevier Pathophysiology 11 (2004) 63–67.
- Listyanti AR. 2006. *Pengaruh Pemberian Getah Batang Pohon Pisang Ambon (Musa parasidiaca var. Sapientum) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (Mus musculus albinus)*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Lobmann, R., G. Schutz, H. Lehnert. 2005. *Proteases and the Diabetic Foot Syndrome: Mechanisms and Therapeutic Implications*. Diabetes Care 28(2): 461-471.
- Lorentz, H.P. and Longaker. 2006. *Wound Healing: Repair Biology and Wound Scar Treatment in Mathes*. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- Low QEH, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. 2001. *Wound Healing in MIP-alpha and MCP-1 Mice*. American Journal of Pathology.159:457-463.
- Martin, P. 2007. *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science. 276(5309): p. 75-81.
- Milind, P. dan C. Dev. 2012. *Orange: Range of Benefits*. International Research Journal of Pharmacy 3(7): 59-63.
- Montgomery , D.C and S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Willey an Sains inc. ISBN 978-0-470-16990-2.
- Muhtadi, E. Setyowati, dan T. Azizah, 2015. *Aktivitas Antidiabetes Melitus Ekstrak Kulit Buah Jeruk Manis (Citrus Sinensis) dan Kulit Buah Kelengkeng (Euphoria longan (Lour.) Studi Terhadap Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Aloksan [Skripsi]*. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Morison, M.J. 2004. *Manajemen Luka*. EGC. Jakarta.
- Naibaho, O.H., V.Y.Y. Paulina, Y. Weny. 2013. *Pengaruh Basis Salep terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (Omicum sanctum L) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Farmasi. UNSRAT.
- Nelson, WR.R., and C.E. Reusch. 2014. *Animal Models of Disease: Classification and Etiology of Diabetes in Dogs and Cats*. Departement of Medicine and Epidemiology, School of Veterinery Medicine, Universitas of California. Journal of Endocrinology 222, T1-T9.
- Nugroho, A. E. 2006. *Review Hewan Percobaan Diabees Mellitus: Patologi dan Mekanise Aksi Diabetogenetik*. Biodeversitas 7 (4): 378-382.
- Novidiyanto, Astuti Setyowati. 2008. *Formulasi Serbuk Effervescent Sari Wortel (Daucus carrota)*. Agritec. Universitas mercu buana; yogyakarta.

- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuci, H., Ishii, T., Yano, M and Ohta, H. 2005. 'Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species', Biosci Biotechnol. Biochem.
- Palasinamy, P., R. Abhishekh, D. Yogana. 2011. *Formulation and Evaluation of Effervescent. Tablets of Aceclofenac. IRJP 2.*
- Parmar, H. & Kar, A. 2007. *Antidiabetic Potential of Citrus sinensis and Punicagranatum Peel Extracts in Alloxan Treated Male Mice*, Journal online, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806305>), diakses 25 Februari 2018).
- Pavletic, Michael M. 2010. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. Third Edition. Wiley-Blackwell. Boston, USA.
- Pradhan, L. 2009. *Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing*. Expert Rev Mol Med,. 11: p. e2.
- Priosoeryanto BP, Huminto H, Wientarsih I, Estuningsih S. 2006. *Aktivitas Getah Pohon Pisang dalam Proses Persembuhan Luka dan Efek Kosmetikny pada Hewan*. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat. Institut Pertanian Bogor.
- Pulung A, A., dan Herqutanto. 2009. *Diabetes Mellitus Tipe 1: Penyakit Baru yang akan Makin Akrab dengan Kita*. Majalah Kedokteran Indonesia vol: 59.
- Purwaningtyas B. 2016. *Pengaruh Ekstrak Kacang Tunggak (Vigna unguiculata) Terhadap Penurunan Kadar Maondialdehyde, Diameter Duktus dan Tebal Epitel Duktus Kelenjar Payudara Rattus norvegicus Ovariectomi*. Program Studi Magister Kebidanan. Universitas Brawijaya.
- Puspitasari, H.A., H.B.A Ummah, dan S.S Tri. 2011. *Faktor-faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka Post Operasi Sectio Caesarea (SC)*. Jurnal Ilmiah Kesehatan Keperawatan.
- Ramasamy, S. S. and A. Bhaskar. 2016. *Evaluation of the Wound-Healing Potency of Citrus sinensis in Wistar albino Rats*. Der Pharmacia Lettre 8 (1): 161- 168.
- Ress, D.A. and J.C. Alcolado. 2005. *Animal Models of Diabetes Mellitus*. Diabetic Medicine 22: 359-370.

- Safari, M.R., N. Sheik and K.M. Khosro. 2006. Study on the Efferct of Vitamin C on the In Vitro Albumin Glycation Reaction. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4: 275-279.
- Sanjoyo, Raden. 2005. *Obat biomedik farmakologi*. diakses pada tanggal 19 februari 2018 dari (<http://yoyoke.web.ugm.ac.id/download/obat.pdf>).
- Schaefer, H., T. E. Redelmeier, Nohynek, J. Lademann. 2008. *Pharmacokinetics and Topical Application of Drugs*. New York: McGraw Hill.
- Sharma, S. 2015. *Topical Drug Delivery Systems: A Review*. (<http://www.pharmainfo.net>) diakses pada 10 Januari 2018.
- Suprpto, R. Y. 2017. *Perbedaan Kadar Insuline-like Growth Factor-1 (IGF-1) pada Wharton Jelly Tali Pusat dan Plasenta pada Bayi Baru Lahir Di RSUD DR. Moewardi Surakarta*. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Suriadi. 2004. *Perawatan Luka*. Cetakan ke I. CV Sagung Seto. Jakarta.
- Sukmadadari, A.E., R. Ratnawati, T. E. Hernowati. 2012. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Ekspresi TNF- α pada Jaringan Hepar Tikus Wistar yang dinduksi DMBA [Skrpisi]*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Soltesova, D. and I., Herichova. 2011. *On the mechanism diabetogenic effects of the alloxan and streptozotocin*. *Diabetologie* 14 (3): 130-138.
- Swamy, H.M.K., V. Krishna, K. Shankarmurthy, B.A. Rahiman. 2007. *Wound Healing Activity of Embelin isolated from the Ethanol Extract of Leaves of Embelia ribes Burm*. *Journal of Ethnopharmacology* 109.
- Szkudelski, T. 2001. *The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cell of the Rat Pancreas*. *Physiology Research* 50: 536-554.
- Tanenbergs, R. J. .2011. *Duloxetine, Pregabalin, and Duloxetine Plus Gabapentin for Diabetic Peripheral Neuropathic Pain Management in Patients with Inadequate Pain Response to Gabapentin*. *Mayo Clin Proc* 86(7): 615-626.

- Tang, W. H., K. A., Martin, and J., Hwa. 2012. *Aldose reductase, oxidative stress, and diabetes mellitus*. *Frontiers in pharmacology* 3 (87): 1-8.
- Terry J, Smith. 2010. *Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2879913/>). Di akses pada tanggal 20 januari 2018.
- Utami, Yulian, Gadis M, Nurdiana. 2015. *Efektifitas Hidrogel Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) terhadap Penurunan Jumlah Makrofag pada Penyembuhan Luka Fase Proliferasi Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar Kondisi Hiperglikemia*, Majalah FKUB; Malang.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *Flora. Untuk sekolah di indonesia*. Pradya paramita, Jakarta.
- Varsha Utani A, Hamasaki Y, Shinkai H. 2014. *Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts*. *Dermatol Sci*; 26:156-60.
- Verma, P.R., P.R. Intakar, S.K. Arora. 2013. *Evaluation of Antidiabetic Antihyperlipidemic and Pancreatic Regeneration, Potential of Aerial Parts of Clitoria ternatea*. *Rev Bras Farmacogn* 23: 819-829.
- Velnar, T. 2013. *The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms*. *Journal of International Medical Research* 37: 1528.
- Webster Kylie E. Stacey Walters, Rachel E. Kohler, Tomas Mrkvan, Onur Boyman, Charles D. Surh, Shane T. Grey, and Jonathan Sprent¹. 2009. *In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression*. The Rockefeller University Press; Australia.
- Weller, K. 2006. *Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice*. *FASEB J*.
- Werner S, G. R. (2009). *Regulation of wound healing by growth factor and cytokines*. *Physiol Rev* 83, 835-870.

Wong, R.K.M., A.I. Pettit., J.E. Davies., L.L. Ng. 2002. *Augmentation of the Neutrophil Respiratory Burst Through the Action of Advanced Glycation End Products*. Diabetes. VOL. 51, September 2002.

Wyatt, E.L., S.H. Sutter, L.A. Drake. 2001. *Dermatological Pharmacology; the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill.

