

EFFECT OF OINTMENT FROM COMBINED *Centella asiatica* (L.) Urban AND *Coleus amboinicus* EXTRACTS ON SKIN WOUND TISSUE REPAIR IN DIABETIC RATS

Tajul Anshor FH¹, Muhammad In'am Ilmiawan², Didiek Pangestu Hadi³

Abstract

Background: A single *Centella asiatica* L. Urban (CALU) extract stimulated cellular proliferation in granulation tissue, while a single *Coleus amboinicus* L. (CAL) extract acted as antiseptic agent. Diabetic wound closure is sensitively difficult to be done because proliferation is likely inhibited by antiseptic alteration resulted as infectious wound. Both extracts may give synergy in combination into ointment. **Objective:** to investigate the effect of combined-extracts ointment on angiogenesis, inflammatory cells and microscopic wound diameter. **Methods:** posttest only group design was experimentally conducted, sixty rats were randomly divided into 5 groups; each group was treated with different ointment constituent: single 1,5% CALU extract; single 5% CAL extract; both extracts (1,5%CALU+ 5%CAL); placebo and Sanoskin Melladerm Plus® (SMP). Diabetic rat's skin was excised and treated with hydrocarbon-based ointment. Assessment on angiogenesis, inflammatory cells and wound diameter were observed histopathologically on day 3, 7 and 14 after treatment. The data were analyzed by one-way ANOVA and LSD. **Results:** combined-extracts ointment effect was significantly different ($p < 0,05$) compared to either single CALU, single CAL, placebo or SMP® in term of angiogenesis and inflammatory cells, but not significantly different ($p > 0,05$) compared to SMP® in term of wound diameter reduction. **Conclusion:** Combined-extracts ointment is better than either single extract, placebo or SMP® in improving angiogenesis and reducing number of inflammatory cells, but not better than SMP® in reducing wound diameter.

Keywords: combined-extracts, single extract, angiogenesis, inflammatory cells, wound diameter.

1. Medical School, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Pontianak
2. Departement of Pathology Anatomy, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Pontianak
3. Departement of Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Pontianak

EFEK SALEP KOMBINASI EKSTRAK HERBA PEGAGAN (*Coleus amboinicus* L.) DAN DAUN JINTEN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP JARINGAN LUKA KULIT TIKUS YANG DIINDUKSI DIABETES

Tajul Anshor FH¹, Muhammad In'am Ilmiawan², Didiek Pangestu Hadi³

Abstrak

Latar Belakang: Sediaan ekstrak pegagan tunggal berperan menstimulasi proliferasi sel-sel dalam jaringan granulasi, sedangkan sediaan tunggal ekstrak daun jinten berpotensi sebagai agen antiseptik, keduanya diduga akan sinergis jika dikombinasi dalam sediaan salep, sehingga diharapkan dapat memberikan efek perbaikan jaringan luka lebih optimal dalam kondisi diabetes. **Tujuan:** Mengetahui efek salep kombinasi dua ekstrak terhadap angiogenesis, sel radang dan diameter luka secara mikroskopis dibandingkan dengan salep ekstrak tunggal dan salep komersil *Sanoskin Melladerm Plus*[®]. **Metode:** penelitian eksperimental Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan *posttest only group design*. Sebanyak 60 ekor tikus dibagi ke dalam 5 kelompok; kontrol negatif (salep plasebo), kontrol positif (salep komersil *Sanoskin Melladerm Plus*[®]), perlakuan I (salep pegagan 1,5%), perlakuan II (salep jinten 5%) dan perlakuan III (salep kombinasi pegagan 1,5%+jinten 5%). Tikus diinduksi hiperglikemia dan dilukai sebelum mendapat perlakuan. Jaringan luka hari ke-3, 7 dan hari ke-14 diamati secara histopatologi untuk menilai angiogenesis, sel radang dan diameter luka mikroskopis. Data dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD*. **Hasil:** Hasil uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan 3 dan perlakuan 1, 2 maupun kontrol positif dalam hal angiogenesis dan sel radang, namun tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol positif menyempitkan diameter luka mikroskopis. **Kesimpulan:** Salep kombinasi dua ekstrak lebih baik daripada salep ekstrak tunggal dan salep *sanoskin*[®] dalam meningkatkan angiogenesis dan menurunkan sel radang, namun tidak lebih baik daripada salep *sanoskin*[®] dalam menyempitkan diameter luka mikroskopis.

Kata kunci: salep kombinasi, angiogenesis, sel radang, diameter luka

-
1. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak
 2. Departemen Patologi Anatomi, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak
 3. Departemen Fisiologi, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak

PENDAHULUAN

Penyakit Diabetes Mellitus (DM) dapat menyebabkan komplikasi luka yang dideritanya susah untuk sembuh. Jumlah pasien DM di Indonesia terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Jumlah penderita DM di Indonesia tahun 2007 mencapai sekitar 5,6 persen atau 7 juta orang dari 200 juta, jumlah ini menempatkan Indonesia di peringkat 4 dunia setelah Cina, Amerika dan India.³⁸ Sebanyak 2,4 juta penduduk Indonesia meninggal akibat DM.²⁹ Angka ini diperkirakan akan terus bertambah mencapai 21,3 juta orang pada tahun 2030. Prevalensi DM di Kalimantan Barat (Kalbar) yaitu 0,8 %.²⁹ Hiperglikemia adalah salah satu kondisi yang dapat mengganggu proses penyembuhan luka. Kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan gangguan sirkulasi mikrovaskular yang dapat mengganggu pengangkutan oksigen, sel-sel fagositik dan antibiotik ke daerah luka sehingga mempersulit penyembuhan.^{16,17} Infeksi akan menjadi penentu keberhasilan penyembuhan luka pada kondisi DM. Pada infeksi terjadi insufisiensi vaskular dan menurunnya fungsi leukosit sehingga akan meningkatkan morbiditas.^{8,9} Dua masalah utama dalam luka DM yakni luka mudah terbuka dan penurunan imunitas lokal yang akan menyebabkan infeksi menjadi semakin meluas hingga ke struktur kulit yang lebih dalam.¹⁶ Menurut Yuan-Sung Kuo (2012) adanya penutupan luka adalah target utama dalam terapi efektif pada luka diabetik untuk mengurangi risiko eksaserbasi luka dan amputasi, hal ini tentu dipengaruhi oleh keparahan luka, vaskularisasi dan ada tidaknya infeksi.³⁹ Beberapa bahan herbal dalam *Complemantray Alternative Medicine* (CAM) yang berpotensi dalam penyembuhan luka adalah Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L).Urban) dan Daun Jinten (*Coleus amboinicus* L.).¹² Herba pegagan mengandung triterpenoid yang dapat memacu pembentukan kolagen tipe 1 sebagai tahap awal perbaikan jaringan.²⁰ Asiatikosida yang terdapat pada herba pegagan dapat meningkatkan kolagen dan epitelisasi luka tumpul pada

babi, sedangkan *C. amboinicus* memiliki potensi antiseptik dan stimulan fagositosis paling tinggi dibandingkan spesies lain.^{19, 34} Ekstrak daun jinten dapat meningkatkan kapasitas fagositosis sel netrofil menjadi 80% sehingga dapat meningkatkan pertahanan tubuh melalui peningkatan sifat fagositik sel netrofil.³²

Berlandaskan penelitian sebelumnya mengenai potensi herba pegagan dan daun jinten, peneliti bermaksud mengombinasikan potensi masing-masing tumbuhan ke dalam suatu formulasi dengan maksud mendapatkan khasiat yang saling melengkapi untuk membantu mempercepat penutupan luka melalui proses mempercepat reepitelisasi, neovaskularisasi dan mencegah infeksi di daerah luka.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan, *blender* (*Nationa*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), bejana maserasi, batang pengaduk kaca, *oven* (*Memmert*[®]), *rotary evaporator* (*Eyela*[®]), beaker (*Pyrex*[®]), tabung reaksi (*Pyrex*[®]), labu erlenmeyer (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), penangas air (*Memmert*[®]), gelas krusibel, cawan penguap, desikator, toples, termometer, mortir, stamper, kertas perkamen, kertas saring, pot salep, corong kaca, sudip, *minor set*, jarum suntik, spuit, glukometer (*EasyTouch*[®]), *tissue processor*, mikrotom dan kaca preparat,

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain akuades, etanol 70%, n-heksana, HCl pekat p.a (*Merck*[®]), serbuk Mg, FeCl 3% p.a (*Merck*[®]), asam asetat glasial p.a (*Merck*[®]), H₂SO₄ pekat p.a (*Merck*[®]), reagen Mayer, reagen Molisch, kloroform, ekstrak herba pegagan, ekstrak daun jinten, pakan tikus standar, air minum, cera alba, vaselin, BHT, metil dan propil paraben, aloksan monohidrat (*Merck*[®]), strip glukometer (*EasyTouch*[®]), NaCl (0,9%), Sanoskin Melladerm Plus[®] dan set warna HE.

Hewan Uji

Sebanyak 60 ekor tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berkelamin jantan dengan berat badan 200-250 gram berusia 8-12 minggu diaklimasi di laboratorium hewan selama 8 hari.

Ekstraksi dan Skrining Fitokimia

Tanaman *Centella asiatica* (L.) Urban didapat dari perkebunan sayur Kelurahan Sungai Duri, Kabupaten Bengkayang dan Daun *Coleus amboinicus* L. dari perkebunan di Jalan Adi Sucipto, Kecamatan Sungai Raya, Kabupaten Kubu Raya, keduanya dimaserasi dengan pelarut masing berturut-turut etanol 70% dan n-heksana. Penyaringan maserat dilakukan setiap 1x24 jam selama 5 hari atau hingga pelarut berwarna bening.^{11,10,15 27}

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder pada sampel yang meliputi pemeriksaan triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan minyak atsiri.^{4,13}

Formulasi Salep

Pembuatan salep dibuat dengan formulasi seperti tabel 1 berikut:²²

Tabel 1. Formulasi salep

No.	Nama Bahan	F0 (g)	F1 (g)	F2 (g)	F3 (g)
1.	Ekstrak pegagan	-	1,5 %	-	1,5 %
2.	Ekstrak jinten	-	-	5 %	5 %
3.	Metil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15
4.	Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
5.	Butilhidroktoluene (BHT)	0,01	0,01	0,01	0,01
6.	Cera Alba	4,75	4,75	4,75	4,75
7.	Vaselin putih	90,07	90,07	90,07	90,07

Keterangan: F0=salep plasebo tanpa bahan aktif, F1=salep pegagan 1,5%, F2=salep jinten 5%, F3=salep kombinasi pegagan 1,5% + jinten 5%

Pembuatan salep diawali dengan menimbang bahan-bahan yang diperlukan. Cera alba dilelehkan diatas penangas air, vaselin putih ditambahkan, diaduk sampai homogen dan dingin. BHT yang telah dilarutkan dengan etanol dimasukkan kedalam basis salep digerus homogen. Metil paraben dan propil

paraben yang telah dilarutkan dengan etanol dicampurkan dengan ekstrak. Setelah basis jadi, ditambahkan ekstrak kental pegagan dan jinten ke dalam basis sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai homogen sejumlah konsentrasi yang diinginkan dalam salep.²²

Induksi Hiperglikemia dan Perlukaan Hewan Uji

Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 16-18 jam. Kadar glukosa darah puasa normal diukur secara kuantitatif. Kemudian, larutan aloksan monohidrat disuntikan secara intraperitoneal dengan dosis 155 mg/kgBB. Tikus dinyatakan hiperglikemia jika kadar glukosa darah puasanya ≥ 150 mg/dL. Pengukuran kadar glukosa dilakukan melalui cuplikan darah vena ekor dengan menggunakan alat *Glucometer EasyTouch*[®].⁷ Pembuatan luka eksisi pada tikus dilakukan menurut metode *Mortone and Malone*.²³

Uji Efek Penyembuhan Luka

Uji efek penyembuhan luka dilakukan terhadap 60 ekor tikus yang terbagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok kontrol positif diberi salep komersial Sanoskin Melladerm Plus[®], kelompok kontrol negatif diberi salep plasebo (F0), kelompok I diberi salep tunggal ekstrak herba pegagan 1,5% (F1), kelompok II diberi salep dengan ekstrak tunggal daun jinten 5% (F2), sedangkan kelompok III diberi salep kombinasi ekstrak herba pegagan dan daun jinten sesuai dengan perbandingan konsentrasi optimum (F3).

Pemberian salep dilakukan secara topikal dengan cara mengoleskannya di bagian luka pada tikus perlakuan menggunakan *cotton bud* steril setiap hari, dari hari ke-1 sampai hari ke-14 setelah perlukaan sebanyak 2 kali sehari pada waktu pagi dan sore hari. Luka juga akan dibersihkan satu kali sehari menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,9%. Pengamatan angiogenesis, sel radang dan diameter luka mikroskopis dilakukan melalui pengamatan jaringan yang dieksisi dan diwarnai dengan pewarnaan HE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi, Skrining Fitokimia dan Uji Organoleptis Formula Salep

Tabel 2. Hasil pembuatan ekstrak (Data Primer, 2014)

Simplisia	Berat (gr)	Pelarut	Maserat (L)	Ekstrak (gr)	Rendemen (%)	Kadar air (%)
Jinten	650	n-heksana	5,75	37,278	5,74%	4,93
Pegagan	1000	Etanol 70%	4,05	63,74	20,78%	24,93

Tabel 3. Hasil skrining fitokimia kedua ekstrak etanol (Data Primer, 2014)

No.	Pemeriksaan	Pegagan	Jinten
1.	Triterpenoid	+	+
2.	Flavonoid	+	+
3.	Tanin	+	+
4.	Alkaloid	+	-
5.	Saponin	+	-
6.	Minyak Atsiri	-	+

Keterangan: (+) Positif, (-) Negatif

Tabel 4. Hasil uji organoleptis formula salep (Data Primer, 2014)

No.	Pemerian	F1	F2	F3	F0
1.	Bentuk sediaan	Setengah padat	Setengah padat	Setengah padat	Setengah padat
2.	Warna	kecoklatan	Hijau pekat	Hijau kehitaman	Putih
3.	Bau	Bau khas pegagan	Bau khas jinten	Bau khas jinten	Bau khas vaselin
4.	Homogenitas	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen

Keterangan:

F0 : Formula salep plasebo tanpa bahan aktif

F(+): Formula salep komersil

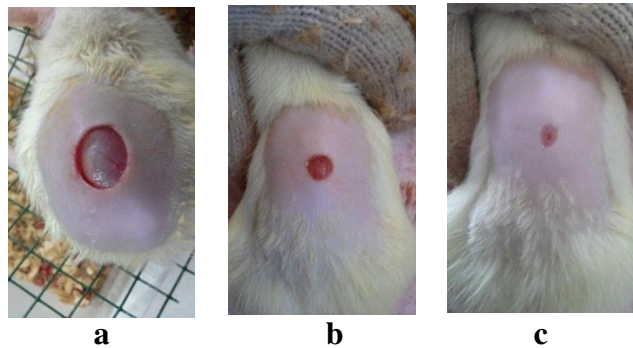
F1 : Formula 1 (salep dengan bahan aktif ekstrak herba pegagan 1.5 %)

F2 : Formula 2 (salep dengan bahan aktif ekstrak daun jinten 5 %)

F3 : Formula 3 (salep dengan kombinasi bahan aktif ekstrak herba pegagan : ekstrak daun jinten yaitu 1.5 % : 5%)

Gambaran Luka Selama Perlakuan

Secara makroskopis, pada hari ke-3, luka perlakuan sudah tampak menutup dengan ukuran luka yang lebih kecil dibandingkan luka kontrol. Perbandingan luka dapat dilihat pada gambar 1 berikut ini.

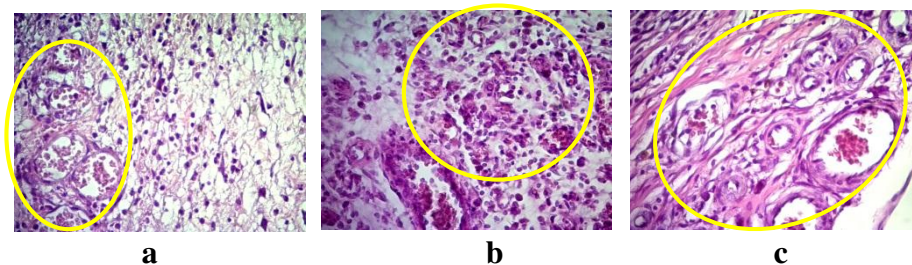


Gambar 1. Gambaran luka perlakuan hari ke-3 (a), 7 (b) dan 14 (c)

Pengamatan luka secara hari ke-7, kelompok perlakuan sudah tidak tampak adanya luka segar. Tidak tampak adanya tanda infeksi pada semua kelompok luka kontrol dan perlakuan pada pengamatan hari ke-3, 7 maupun hari ke-14.

Efek Sediaan Salep Ekstrak Kombinasi terhadap Angiogenesis

Gambaran lapang pandang perhitungan neovaskular dapat dilihat pada gambar 2 (a), (b) dan (c). Hasil penghitungan rerata neokapiler tiap kelompok dapat diamati pada tabel 5 dan hasil uji LSD semua data pada tabel 6.



Gambar 2. Gambaran angiogenesis luka perlakuan hari ke-3 (a), 7 (b) dan 14 (c), tampak daerah proliferasi vakular (daerah lingkaran kuning)
Tabel 5. Rerata jumlah neokapiler tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014).
Primer, 2014).

No.	Kelompok	Rerata Jumlah Neokapiler (butir)		
		Hari ke-3(SD)	Hari ke-7(SD)	Hari ke-14(SD)
1.	Kontrol Positif	67,5(21,4)	148,2(29,5)	168,2(29,0)
2.	Kontrol Negatif	99,0(20,4)	210,0(32,8)	279,2(45,4)
3.	Perlakuan 1	94,7(11,9)	169,5(42,8)	312,6(55,7)
4.	Perlakuan 2	109,2(13,7)	157,2(15,1)	313,6(23,6)
5.	Perlakuan 3	131,2(19,3)	184,5(13,4)	479,0(80,1)

Uji ANOVA	0,003	0,63	0,000
-----------	-------	------	-------

Tabel 6. Hasil uji LSD data jumlah neokapiler tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014)

Kelompok	Hari ke-3			Hari ke-7			Hari ke-14					
	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3		
Kontrol (-)		*	*	*	*				*	*	*	*
Kontrol (+)	*				*	*		*				*
Perlakuan 1	*				*			*				*
Perlakuan 2	*					*		*				*
Perlakuan 3	*	*	*			*		*	*	*	*	*

Keterangan:

*) Perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan deskripsi statistik yang disajikan dengan tabel 5 di atas, didapatkan bahwa rerata jumlah neokapiler setiap kelompok semakin hari semakin meningkat. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 3 dengan semua kelompok pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa salep kombinasi lebih baik daripada salep plasebo, pegagan ekstrak tunggal, ekstrak daun jinten tunggal bahkan lebih baik dari salep sanoskin® (tabel 6). Kelompok yang mendapat salep plasebo memberikan jumlah neovaskular paling rendah dibandingkan dengan semua kelompok (lihat tabel 5). Hal ini karena keadaan diabetes yang diketahui menghambat proliferasi endotel pembuluh darah.³⁶

Herba pegagan mengandung madekossida dan asam asiatikosida yang memiliki efek proliferaatif pada kolagen pada keadaan luka.^{18,21} Berdasarkan temuan sebelumnya diduga pegagan juga menstimulasi proliferasi sel-sel pada jaringan granulasi, termasuk sel endotel dan sel progenitor vaskular yang

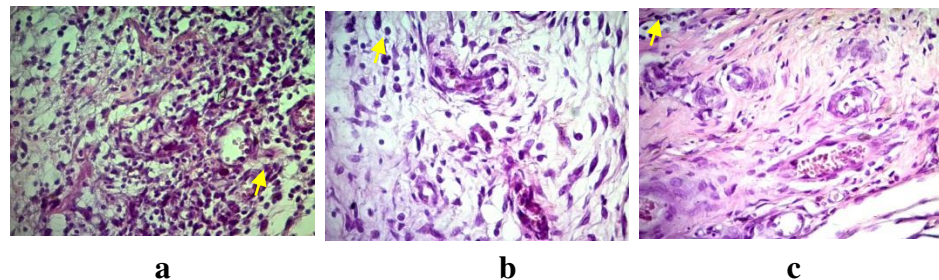
merupakan sel-sel utama yang dibutuhkan untuk angiogenesis.³³ Ekstrak herba pegagan juga diketahui dapat menstimulasi angiogenesis, menginduksi vasodilatasi dan menurunkan stres oksidatif.^{1, 14,18,35}

Ekstrak daun jinten mengandung minyak atsiri yang diketahui memiliki efek proinflamasi dan antiseptikum.³¹ Neovaskularisasi juga berhubungan dengan distribusi platelet, monosit, makrofag limfosit, sel endotel, fibroblast dan keratinosit.³⁶ Sehingga dicurigai ada hubungan antara fungsi proinflamasi terhadap neovaskularisasi yang diduga menstimulasi terbentuknya neokapiler untuk mendistribusi sel inflamasi serta melindungi jaringan luka dari agen infeksius. Jumlah neovaskular paling tinggi ditunjukkan oleh kelompok salep kombinasi.

Tingginya neovaskularisasi pada kelompok salep kombinasi menunjukkan adanya keunggulan efek jika kedua ekstrak dikombinasikan, sehingga fungsinya lebih optimal dibandingkan formulasi tunggal pegagan dan dau jinten saja. Fungsi tersebut tentu akan mendukung percepatan penyembuhan luka, karena luka melibatkan angiogenesis dalam regenerasi jaringan^{5,30}

Efek Sediaan Salep Ekstrak Kombinasi terhadap Sel Radang

Gambaran lapang pandang penghitungan sel radang dapat dilihat pada gambar 3 (a), (b) dan (c). Hasil penghitungan rerata jumlah se radang dan uji LSD tiap kelompok pada hari ke-3, 7 dan hari ke-14 dapat dilihat pada tabel 7 dan 8.



Gambar 3. Gambaran peradangan jaringan luka perlakuan hari ke-3 (a), 7 (b) dan 14 (c). tampak sel-sel radang (anak panah kuning) (Data Primer, 2014).

Tabel 7. Rerata jumlah sel radang tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014)

No.	Kelompok	Rerata Jumlah Sel Radang (butir)		
		Hari ke-3(SD)	Hari ke-7(SD)	Hari ke-14(SD)
1.	Kontrol Positif	1192.2(130.2)	851.5(271.3)	774.7(96.8)
2.	Kontrol Negatif	725.2(261.4)	900.7(288.8)	328.2(30.8)
3.	Perlakuan 1	1586.5(310.0)	582.7(185.8)	453.5(112.7)
4.	Perlakuan 2	1207.7(304.0)	764.7(165.6)	361.0(52.6)
5.	Perlakuan 3	1278.7(502.7)	756.0(166.6)	308.5(70.8)
Uji ANOVA		0,030	0,353	0,000

Tabel 8. Hasil uji LSD data jumlah sel radang tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014)

Kelompok	Hari ke-3			Hari ke-7			Hari ke-14				
	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3	
Kontrol (-)								*	*	*	*
Kontrol (+)			*		*			*			*
Perlakuan 1		*			*			*			*
Perlakuan 2								*			*
Perlakuan 3		*						*	*	*	*

Keterangan:

*) Perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji LSD (lihat tabel 8) pada hari ke-3 menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 3 dengan kelompok kontrol positif. Sedangkan pada hari ke-14 kelompok perlakuan 3 berbeda signifikan dengan semua kelompok.

Sebagian besar jumlah sel radang menurun dari hari ke-3 hingga hari ke-14 (lihat tabel 7). Menurunnya jumlah sel radang di hari ke-14 ini dikarenakan

proses perbaikan jaringan diakhiri dan dilanjutkan proses maturasi.²⁸ Hal ini sesuai dengan hasil pernyataan Putriyanda (2006) dimana sel radang neutrofil banyak dijumpai pada fase akut atau hari ke-1 hingga sekitar hari ke-2 luka, kemudian akan menurun pada hari ke-7 dimana sel radang didominasi oleh sel radang limfosit dan makrofag hingga fase maturasi.

Jumlah sel radang salep kombinasi hari ke-14 berbeda bermakna dengan semua kelompok (lihat tabel 8). Hal ini menunjukkan bahwa salep kombinasi memberikan efek yang lebih baik terhadap jumlah sel radang jaringan. Salep kombinasi memberikan efek peningkatan yang signifikan terhadap sel radang di hari ke-3 dan menurunkan sel radang secara signifikan di hari ke-14. Hal ini sesuai dengan kebutuhan sel radang dimana akan cenderung tinggi pada hari 1-3 dan menurun mulai hari ke-5 setelah luka.²⁸

Penurunan sel radang juga tampak pada kelompok yang mendapat salep ekstrak herba pegagan. Hal ini didukung penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan asam triterpenoid, asam asiaticosida, asam madecosida, saponin dan triterpenoid asiaticosida pada ekstrak herba pegagan juga memiliki efek terhadap aktivitas sel-sel radang akut maupun kronik.^{37,22}

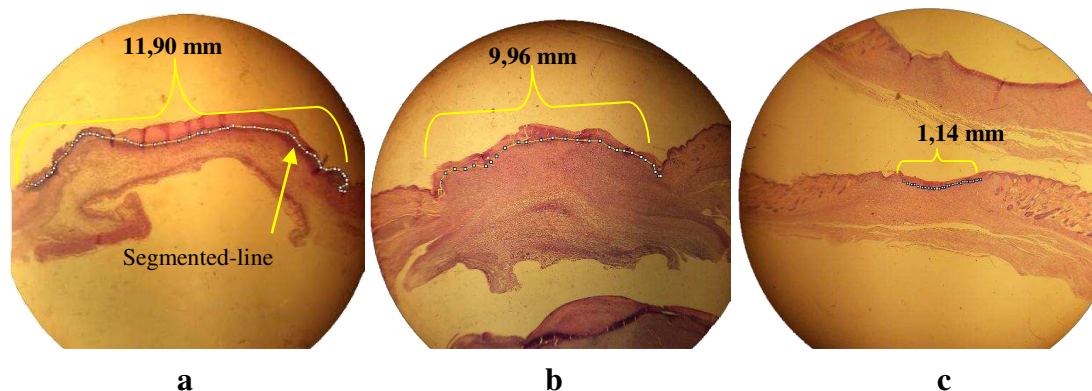
Perbedaan bermakna paling jelas ditemukan pada perbandingan ekstrak salep kombinasi dengan ekstrak pegagan tunggal maupun ekstrak daun jinten tunggal di hari ke-14 (lihat tabel 8). Jika kedua ekstrak tersebut berdiri tunggal tidak dapat memiliki efek yang lebih baik daripada jika kedua ekstrak dikombinasi. Selain karena efek senyawa aktif pegagan seperti yang dijelaskan sebelumnya, hal ini berhubungan dengan fungsi minyak atsiri ekstrak daun jinten yang dapat meningkatkan aktivitas sel radang.^{31,32}

Salep kombinasi bahkan berbeda signifikan dengan kelompok salep sanoskin® dimana ini menunjukkan efek kombinasi ekstrak di dalamnya lebih

optimal dibandingkan bahan aktif pada salep sanoskin®. Selain ekstrak pegagan yang merupakan agen proinflamasi, ekstrak minyak esensial daun jinten diketahui memiliki kemampuan sitotoksik, yaitu kemampuan menstimulasi limfosit dan makrofag untuk memakan substrat yang dianggap sebagai benda asing atau mati.^{31,32}

Efek Sediaan Salep Ekstrak Kombinasi terhadap Diameter Luka

Pengamatan diameter tepi luka dilakukan dengan mengukur jarak antara epitel terluar secara mikroskopis pada perbesaran 20 menggunakan alat bantu *stereo microscope* (lihat gambar 4(a), (b) dan (c)). Hasil penghitungan rerata diameter antara epitel terluar tiap kelompok pada hari ke-3, 7 dan hari ke-14 dapat diamati pada tabel 9. Hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 10.



Gambar 4. Gambaran diameter luka dengan epitel terluar pada kelompok perlakuan hari ke-3 (a), 7 (b) dan 14 (c) (Data Primer, 2014).

Tabel 9. Rerata diameter antara epitel terluar tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014)

No.	Kelompok	Rerata Diameter antara Epitel Terluar (mm)		
		Hari ke-3(SD)	Hari ke-7(SD)	Hari ke-14(SD)
1.	Kontrol Positif	10,1(0,7)	8,9(1,3)	0,1(0,0)
2.	Kontrol Negatif	10,4(0,6)	10,2(0,8)	4,8(1,1)
3.	Perlakuan 1	8,8(1,2)	7,7(1,5)	2,7(0,6)
4.	Perlakuan 2	10,1(1,6)	8,0(1,1)	0,8(0,9)
5.	Perlakuan 3	10,2(0,4)	9,8(0,3)	0,1(0,1)
Uji ANOVA		0,264	0,029	0,000

Tabel 10. Hasil uji LSD data jarak antara epitel terluar tiap kelompok hari ke-3, 7 dan 14 (Data Primer, 2014)

Kelompok	Hari ke-3			Hari ke-7			Hari ke-14			
	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3	Kontrol(-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
Kontrol (-)		*					*	*	*	*
Kontrol (+)	*							*	*	
Perlakuan 1					*		*	*	*	*
Perlakuan 2				*			*	*	*	
Perlakuan 3						*	*	*	*	

Keterangan:

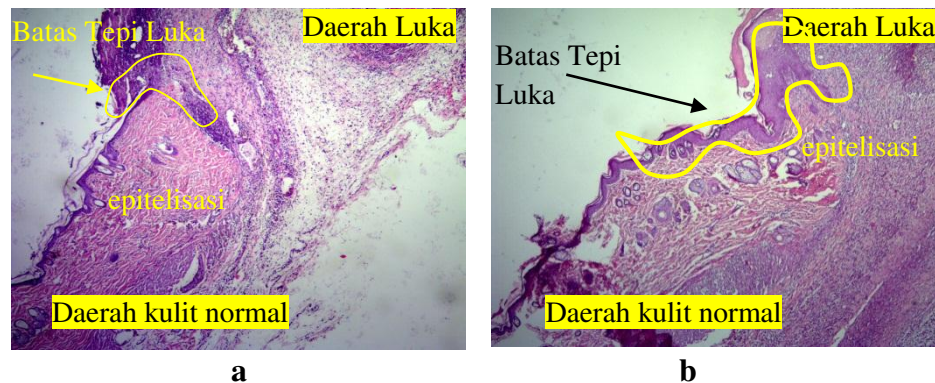
*) Perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji LSD (tabel 10) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 3 dengan kelompok perlakuan 1 dan kontrol negatif pada hari ke-14. Artinya salep kombinasi memiliki efek lebih baik dibandingkan salep pegagan dan plasebo. Sedangkan jika dibandingkan dengan salep sanoskin®, salep kombinasi tidak berbeda bermakna artinya salep tersebut tidak lebih baik daripada salep sanoskin® atau sama baiknya.

Efek salep pegagan tunggal tidak memberikan efek lebih baik daripada kombinasinya. Khasiat ekstrak pegagan baik dalam memicu proliferasi epitel. Karena seperti penelitian sebelumnya, kandungan ekstrak tersebut juga memberikan efek stimulan terhadap beberapa *growth factor* yang berperan penting dalam proliferasi sel, diantaranya pDGF, VEGF dan KGF.³⁹ KGF atau *keratinocyte growth factor* adalah faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh fibroblas yang merupakan faktor pertumbuhan yang secara khusus berperan dalam mitosis sel epidermal sehingga meningkatkan keratinosit yang

merupakan sel progenitor dalam epitelisasi.^{3,25} Namun jika fungsi salep pegagan tersebut berdiri tunggal, khasiat-khasiat tersebut tampak tidak optimal dibandingkan dengan kelompok yang dikombinasikan dengan ekstrak jinten.

Ekstrak pegagan juga diketahui dapat menstimulasi sintesis kolagen, memacu angiogenesis, menginduksi vasodilatasi, menghambat inflamasi dan menurunkan stres oksidatif.^{1,14,18,35} Epitelisasi juga dipengaruhi oleh adanya kolagenasi, hal ini dikarenakan faktor keratinasi dari fibroblas yang merupakan sel muda penyusun jaringan ikat.¹⁴ Hal tersebut dapat dijelaskan pada gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Gambaran epitelisasi tepi luka kelompok pegagan (b) dan epitelisasi tepi luka kelompok kombinasi (a) hari ke-3

Gambar di atas menunjukkan salah satu sampel dari kelompok perlakuan yang mendapat salep ekstrak pegagan, dimana dapat diamati adanya reepitelisasi baru yang lebih panjang pada sampel b daripada sampel a. Tepat di bawah daerah reepitelisasi tampak jaringan ikat yang membatasi antara daerah luka dan daerah kulit normal. Jaringan ikat tersebut diduga karena kandungan asam triterpenoid, asam asiaticosida, asam madecosida, saponin dan triterpenoid asiaticosida pada ekstrak herba pegagan yang diketahui menstimulasi sintesis kolagen sehingga meningkatkan matriks jaringan ikat dalam jaringan granulasi.³³

Diameter antar epitel terluar dari kelompok salep kombinasi berbeda bermakna dengan dan kelompok perlakuan ekstrak herba pegagan (tabel 10), dimana diameter pada salep kombinasi jauh lebih pendek daripada salep ekstrak herba pegagan, hal ini bermakna bahwa salep kombinasi memberikan efek yang lebih baik daripada salep pegagan pada hari ke-14. Salep kombinasi memiliki dua fungsi yang dimiliki kedua ekstrak sekaligus, terutama peran ekstrak pegagan. Ekstrak pegagan memiliki efek proliferasi dan antioksidan yang dapat menstimulasi faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk sintesis kolagen dan sel lain dalam jaringan granulasi.¹⁸

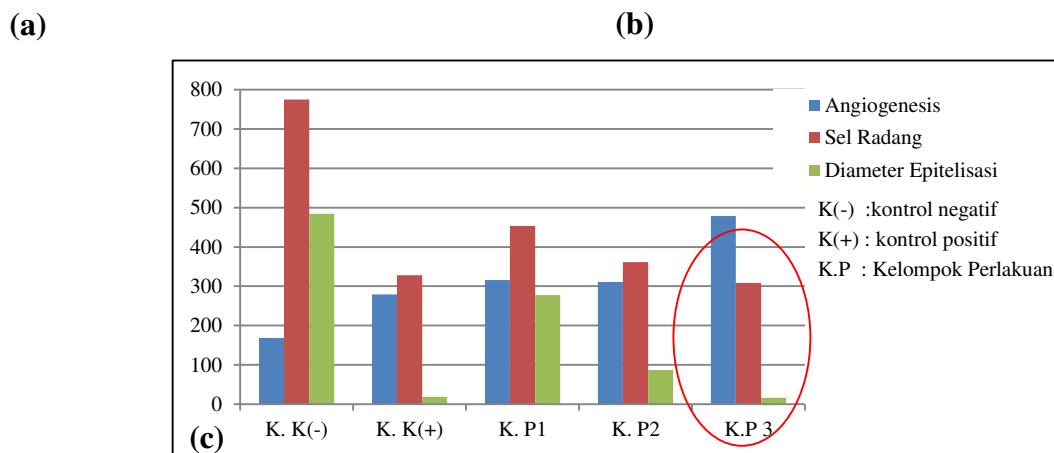
Diameter epitel salep kombinasi tidak berbeda bermakna dengan salep sanoskin®, artinya efek yang diberikan kedua salep tidak jauh berbeda, sehingga pada hari ke-14 dapat diketahui salep kombinasi tidak jauh lebih baik daripada salep sanoskin®.

Efek Salep Kombinasi terhadap Angiogenesis, Sel Radang dan Diameter Luka pada Kondisi Diabetes

Menurut Motlik *et al.* (2007) keratinisasi epitel adalah parameter paling penting dalam penutupan luka, sedangkan menurut Brikhaus (2000) dan Dovi *et al.* (2003) justru yang paling penting dalam penilaian luka dalam kondisi diabetes adalah kontraksi kolagen dan kepadatan jaringan ikat.^{2,6,24} Parameter lain yang paling penting menurut Tam *et al.* (2012) adalah neovaskularisasi yang adekuat, sedangkan menurut Lipsky *et al.* (2004) ada tidaknya infeksi merupakan faktor utama yang harus diperhatikan dalam penyembuhan luka.^{16,36}

Penyembuhan luka pada kondisi diabetes akan lebih optimal jika pada terdapat angiogenesis yang tinggi, diameter epitel yang pendek dan jumlah sel radang sesuai kebutuhan (tinggi pada hari 1-3 dan menurun pada setelah hari ke-7) terutama dalam kondisi yang kurang adekuat seperti diabetes. Sedangkan

dalam penelitian ini ditemukan hasil efek lebih baik yang ditunjukkan oleh kelompok salep kombinasi. Efek terbaik dari kombinasi ini terutama ditunjukkan pada hari ke-14. Hal ini secara umum dapat ditunjukkan oleh grafik pada gambar 6 di bawah ini.



Gambar 6. Grafik Perbandingan efek angiogenesis, sel radang dan epitelisasi antar kelompok pada hari ke-3 (a), 7 (b) dan 14 (c) (Data Primer, 2014). Gambar di atas menunjukkan bahwa salep kombinasi (perlakuan 3) memberikan efek jumlah angiogenesis paling tinggi, menurunkan sel radang paling rendah dan penyempitan diameter luka paling pendek. Setiap kelompok menunjukkan efek yang berbeda untuk setiap parameter yang diukur (gambar 6). Namun, penilaian utama lebih diutamakan pada hari terakhir luka (hari ke-14), dimana pada setiap parameter, kelompok hewan uji yang mendapat salep kombinasi (perlakuan 3) memberikan efek perbaikan luka yang lebih baik dari kelompok lain baik dari parameter angiogenesis, jumlah sel radang dan diameter luka.

KESIMPULAN

Salep kombinasi 1,5% ekstrak herba pegagan dan 5% ekstrak daun jinten dapat menurunkan jumlah sel radang dan meningkatkan jumlah neovaskular pada jaringan luka kulit tikus diabetes dan efeknya lebih baik dibandingkan dengan salep ekstrak tunggal, namun tidak lebih baik dari salep sanoskin® dalam menyempitkan diameter luka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) RI. 2010. Buku Acuan Sediaan Herbal. Direktorat Obat Asli Indonesia. Jakarta: Deputi Bidang Pengawasan Obat Tradisional (Badan POM RI).
2. Brinkhaus, M. Lindner, D. Schuppan, and E. G. Hahn. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, vol. 7, no. 5, pp. 427–48.
3. Chedid M., Hoyle J.R., Csaky K.G., Rubin J.S. 1996. Glucocorticoids inhibit keratinocyte growth factor production in primary dermal fibroblasts. *Endocrinology*, 137, 2232–7
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia Edisi Ke-3. Jakarta: Depkes RI; 1999
5. Diegelmann R.F., Evans M.C. 2009. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed wound healing. *Front Biosci*: 9: 283-9.
6. Dovi J.V., He L.K., DiPietro L.A. 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of Leukocytes Biology*, 73, 448–55.
7. Etuk, E.U. 2010. Animal Model for Studying Diabetes Melitus. *Agric.Biol.J. N. Am.* 1(2):130-4
8. Frykberg dan T. Zgonis. 2002. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *American Family Physician*, vol. 66, no. 9, pp. 1655-62.

9. Frykberg, B. Wittmayer, and T. Zgonis. 2007. Surgical management of diabetic foot infections and osteomyelitis. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, vol. 24, no. 3, pp. 469–82.
10. Gunawan Didik dan Sri Mulyani. 2004. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya.
11. Harborne, J.B. 2006. Metode Fitokimia Penuntun cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Ed ke-2, Padmawinata, Kosasih; Iwang Soediro (alih bahasa), Mansoor, Sofia (ed), Bandung: Penerbit ITB
12. How Yee Lai & Yau Yan Lim. 2012. Potential dermal wound healing agent in *Blechnum orientale* Linn and *Plectrahrthus*. *BMC Journal CAM*.Vol 11. No.62. diakses 8 Oktober 2012
13. Indrayani Lany, Hartati Soetjipto, Lydia Sihasale. Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk.Penel.Hayati*. 2006; 12: 57-61
14. Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Samukawa, K., Satake, N., Sakanaka, M., 200., Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, 584:415-23 (online: [http://www.sciencedirect.com/science /article/pii/S0014299908001672](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299908001672)) diakses 6 Oktober 2013
15. Korompis G, Vennetia R, Oksfriani J Sumampouw. 2010.Uji In Vitro Aktivitas Antibakteri dari *Lansium domesticum* Correa (Langsat). *Chem. Prog.*; 3(1): 13-19
16. Lipsky, D. G. Armstrong, D. M. Citron, A. D. Tice, D. E. Morgenstern, and M. A. Abramson. 2005. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, doubleblinded, multicentre trial,” *The Lancet*, vol. 366, no. 9498, pp. 1695–703.

17. Lipsky, P. Giordano, S. Choudhri, and J. Song. 2007. Treating diabetic foot infections with sequential intravenous to oral moxifloxacin compared with piperacillin-tazobactam/ amoxicillin-clavulanate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, no. 2, pp. 370–6.
18. Liu M, Dai Y, Li Y, Luo Y, Huang F, Gong Z, Meng Q. 2008. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Plant Medica* 74:8.pg 809-15 (online: http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/18484522/Madecassoside_isolated_from_Centella_asiatica_herbs_facilitates_burn_wound_healing_in_mice) diakses tanggal 15 Juni 2014
19. Lukhoba, C. W. M. S. J. Simmonds, and A. J. Paton. 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 1, pp. 1–24.
20. Mackay, Douglas dan Alan L. Miller. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. *Alternative Medicine Review*. Vol.8, no.4, pp. 359-77
21. Mayefis, Delladari. 2011. Pengaruh Kombinasi Ekstrak Herba Herba pegagan (*Centella asiatica* L.) dan Getah Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Mencit Putih Jantan. *Publikasi Ilmiah Universitas Andalas- Fakultas Farmasi*. (online : <http://www.repository.unand.ac.id/155449/>) diakses 18 September 2013
22. Moerfiah; Muztabadihardja; Santi Puspita Dewi. 2011. Efektivitas Sediaan Salep Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) untuk Penyembuhan Luka pada Mencit Jantan (*Mus musculus albinus*), *Fitofarmaka*, 1(1):17-23
23. Morton, J.J.P. and Malone M.H. 1992. Evaluation of Vulnerary by An Open Wound Procedure in Rats. *Archieve Int Pharmacodyn*. 196: 117-28

24. Motlik J., Klima J., Dvorankova B., Smetana K.Jr. 2007. Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology*, 67, 105–11.
25. Nayak BS, Pereira LMP. 2006. Catharanthus roseus flower extract has wound –healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med* 2006; 6: 41.
26. Nuryani, Sri. 2012. Gambaran pengetahuan dan perilaku pengelolaan penyakit diabetes melitus pada penderita diabetes melitus di puskesmas P.Parit Husin II Pontianak. *Naskah Publikasi Akademik Universitas Tanjungpura*. Pontianak
27. Pramono S dan D. Ajiastuti. 2004. Standardisasi Ekstrak Herba pegagan (*Centella asiatica*.(L.).Urban) Berdasarkan Kadar Asiatikosida Secara KLT-Densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia*. 15(3): 118-23
28. Putriyanda N. 2006. Kajian patologi aktifitas getah batang pohon pisang tanduk (*Musa paradisiaca forma typica*) dalam proses persembuhan luka kulit pada mencit (*Mus musculus albinus*) *skripsi*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
29. Riset Kesehatan Dasar. 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan DepKes RI, Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar Tahun. Jakarta.
30. Rukmono. 1996. Patologi. Kumpulan Kuliah Patologi. Jakarta: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
31. Santosa, Christin Marganingsih dan Siti Isrina Oktavia Salasia. 2004. The Effect of Bangun-Bangun Leaves (*Coleus amboinicus*,L) Water Extract on The rats Lymphocytes Activity. *Jurnal Sains Vet*. XXII(2). Bagian PA FKH UGM. Yogyakarta
32. Santosa, CM & Triana Hertiani. 2005. Kandungan senyawa kimia dan efek ekstrak air Daun Bangun-bangun (*Coleus amboinicus*, L.) pada aktivitas

- fagositosis netrofil tikusputih (*Rattus norvegicus*). *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 3. No. 16 pp: 141-8.
33. Shetty, Somashekar dan Sudhakar Pemmineti. 2013. Evaluation of Centella Asiatica Leaf Extract for Wound Healing in Sterptozotocin Induced Diabetic Rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* (RJPBCS) Volume 4 Issue 2 Page No. 1082
 34. Shukla, A. M. Rasik, G. K. Jain, R. Shankar, D. K. Kulshrestha, and B. N. Dhawan. 1999. in vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from Centella asiatica. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 65, no. 1, pp. 1–11.
 35. Somboonwong, Juraiporn. Mattana Kankaisre, Boonyong Tantisira, Mayuree H Tantisira. 2012. Wound healing activities of different extracts of Centella asiatica in incision models: an experimental animal study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12:13.
 36. Tam, Chong Wam, Chun Hay Ko, Ping Chung Leung, Kwok Pui Fung, Clara Bik San Lau. 2012. Endothelial progenitor cells, a unipotent stem cell, involved in neovascularization of wound healing in diabetic foot ulcer. *EWMA Journal*. vol 12 no 2
 37. Winarto, W.R dan Maria Surbakti. 2003. Khasiat dan Manfaat Pegagan. Jakarta: Agromedia Pustaka
 38. World Health Organization (WHO). 2009. Diabetic Report Count and Card 2010. Time Table and News of Indonesian Helat Observatory Report vol 4. (online) (<http://apps.who.int/ghodata/>) diakses 05 Oktober 2013
 39. Yuan-Sung Kuo, Hsiung-Fei Chlen dan William Lu. 2012. Plectranthus amboinicus and Centella asiatica Cream for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Hindawi Publishing Corporation of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 20.