ARTIKEL PENELITIAN

Efek Salep Ekstrak Etanol 70% Daun Karamunting terhadap Re-epitelisasi Luka Insisi Kulit Tikus Wistar

Wenny Rupina,[1*] Heru Fajar Trianto,[2] Iit Fitrianingrum [3]

[1]Program Studi Pendidikan Dokter, FK Universitas Tanjungpura
[2]Departemen Histologi, FK Universitas Tanjungpura
[3]Departemen Famakologi, FK Universitas Tanjungpura

*Korespondensi: wenny.librt@gmail.com
Diterima: 20 November 2015; Disetujui 10 Februari 2016
DOI: 10.23886/ejki.4.5905.26-30

Abstrak

Sejumlah studi menunjukkan bahwa tanaman tradisional potensial sebagai agen penyembuhan luka, salah satunya daun karamunting (Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui re-epitelisasi kulit tikus putih galur wistar dengan luka insisi yang diberi salep ekstrak etanol 70% daun karamunting. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan posttest only control group design. Subjek penelitian adalah 25 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol positif (salep sanoskin®), kelompok kontrol negatif (salep plesebo), kelompok perlakuan 1 (salep ekstrak daun karamunting 2,5%), kelompok perlakuan 2 (salep ekstrak daun karamunting 5%) dan kelompok perlakuan 3 (salep ekstrak daun karamunting 10%). Pada setiap kelompok dilakukan insisi di punggung sepanjang 2 cm dengan kedalaman 0,2 cm sejajar os.vertebrae, berjarak 5 cm dari telinga. Pada hari kesepuluh dilakukan pengambilan jaringan luka dan pembuat preparat histologi dengan pewarnaan H&E dan diamati tebal dan lebar celah epitel pada perbesaran lensa objektif 10x. Pemberian salep ekstrak etanol 70% daun karamunting mengakibatkan penurunan tebal celah epitel (p<0,05) dan memperkecil lebar celah epitel (p<0,05) dibandingkan dengan control negatif. Salep ekstrak etanol 70% daun karamunting dapat meningkatkan re-epitelisasi luka insisi kulit tikus putih galur wistar dengan konsentrasi efektif 5%.
Kata kunci: *Daun karamunting; reepitelisasi; penyembuhan luka*

Effect of 70% Ethanol Extract Ointment of Karamunting Leaves on Re-epitelisation Incision Wound Healing on Wistar Rat's Skin

Abstract

Recent researches indicate that traditional plant may act as a wound healing agent, one of them is Karamunting leaves. The aim of this research is to find out the effect of 70% ethanol extract ointment of karamunting leaves on re-epithelialization of incision wound healing on wistar rat's skin. This research was an *experimental research with post-test only control group design. The research subjects were twenty male wistar rats in which further divided to five groups; positive control group (sanoskin® ointment), negative control group (placebo ointment), experimental group 1 (*2,5% *karamunting leaves ointment), experimental group 2 (*5% *karamunting leaves ointment) and experimental group 3 (*10% *karamunting leaves ointment). All groups underwent 2 cm long incision at the back with 0,2 cm depth, parallel with os.vertebrae, within 5 cm from the ear.On the tenth day, wound tissue were taken from all groups sample and processed into histological blood smears stained with H&E to check the* thickness and the width of the slit skin epithelium *observed with 10x objective lens magnification. The 70% ethanol extract ointment of leaves Karamunting decreased slit thickness* epithelium (p<0,05) and minimized slit width epithelium (p<0.05) compared to negative control. *70% ethanol extract ointment of leaves Karamunting increased wound re-epithelialization of incision wound on wistar rat's skin with an effective concentration of 5%.*
Keywords*: Karamunting leaves; re-epithelialization; wound healing*

Pendahuluan

Luka adalah kerusakan fisik yang disebabkan oleh mikroba, trauma mekanik, kimia, atau suhu yang mengenai jaringan yang mengakibatkan terbukanya atau hancurnya kulit serta ketidakseimbangan fungsi dan anatomi kulit normal.[1-3] Prevalensi luka terbanyak di seluruh dunia adalah luka akibat operasi yaitu 110 juta kasus per tahun sedangkan luka akibat trauma 1,6 juta kasus per tahun, luka bakar 1,25 juta orang, luka kronik 6,5 juta orang,[4] luka akibat kecelakaan lalu lintas (KLL) 1,02%, dan luka akibat non-KLL 0,4%.[5]

Tanaman tradisional memiliki potensi sebagai agen penyembuhan luka dan sebagian besar disukai masyarakat karena ketersediaan yang luas. Salah satu tanaman tradisional yang berpotensi sebagai obat luka adalah daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) karena karamunting mengandung flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid.[6] Kandungan flavonoid merupakan antioksidan kuat yang dapat mengurangi lipid peroksidase, meningkatkan kecepatan epitelisasi, dan bersifat antimikroba. Penurunan lipid peroksidase oleh flavonoid akan mencegah nekrosis, memperbaiki vaskularisasi, dan meningkatkan viabilitas serabut kolagen dengan meningkatkan kekuatan anyaman serabut kolagen.[7] Tanin bersifat antimikroba dan meningkatkan epitelisasi sedangkan saponin meningkatkan kemampuan reseptor TGF-β fibroblas berikatan dengan TGF-β. TGF- β merupakan faktor pertumbuhan yang diperlukan fibroblas dalam mensintesis kolagen sehingga flavonoid, tanin, dan saponin diduga bertanggung jawab dalam proses *wound contraction*.[7-9]

Berdasarkan kandungan dan potensi daun karamunting sebagai agen penyembuhan luka, ingin diketahui pengaruh salep ekstrak etanol 70% daun karamunting terhadap re-epitelisasi jaringan luka.

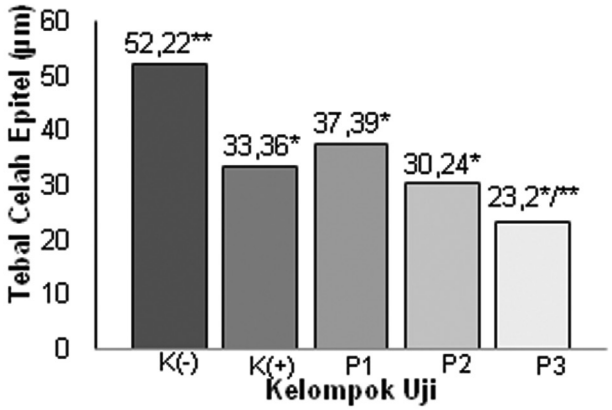
Metode

Penelitian ini merupakan *posttest only control group design* menggunakan tikus wistar jantan sebagai sampel. Sebanyak 25 ekor tikus, dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 5 ekor untuk kontrol positif dan negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3.

Tikus dibius dengan eter 10% secara inhalasi,[10] kemudian dilakukan insisi punggung sepanjang 2cm dengan kedalaman 0,2 cm sejajar tulang vertebrae, berjarak 5 cm dari telinga.[2] Masing-masing kelompok perlakuan dioleskan salep ekstrak daun karamunting 2,5%, 5%, dan 10%. Pada sampel kontrol negatif dioleskan salep plasebo, sedangkan sampel kontrol positif dioleskan salep sanoskin®. Pada hari ke-10 diambil jaringan luka lalu dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE kemudian diamati tebal dan lebar celah epitel dengan perbesaran lensa objektif 10x *stereo microscope* dan pengukuran *length* pada aplikasi *axiovision* rel.4.8. Data dianalisis menggunakan program spss 20 dengan uji *one way anova* dilanjutkan *post hoc test LSD.*

Hasil

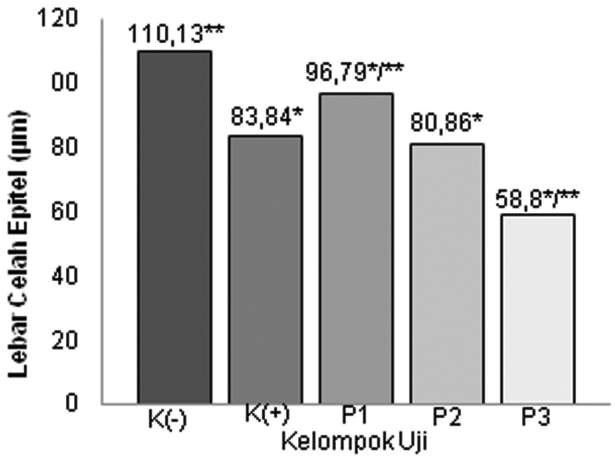
Pada Gambar 1. tampak perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan P1, P2 dan P3 (p<0,001), yang mengindikasikan pemendekan celah epitel akibat pemberian salep ekstrak daun karamunting yang ditandai dengan rerata tebal celah epitel pada kontrol negatif <P1, P2 dan P3. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif dengan P1 dan P2 (p≥0,244) yang menunjukkan rerata tebal celah pada kelompok P1 dan P2 mendekati normal. Terdapat perbedaan bermakna antara kontrol positif dengan P3 (p≤0,031) menunjukkan bahwa terjadi re-epitelisasi pada kelompok P3 yang ditandai dengan rerata tebal celah epitel P3 lebih besar dibandingkan kelompok kontrol positif.



K(-)=kontrol negatif, K(+)=kontrol positif
P1=ekstrak karamunting 2,5% P2=ekstrak karamunting 5%
P3=ekstrak karamunting 10%
*Berbeda bermakna dengan kontrol negatif.
** Berbeda bermakna dengan kontrol positif

Pada kelompok perlakuan didapat perbedaan bermakna antara P1 dengan P2 (p=0,046) maupun P3 (p<0,001) yang menunjukkan perbaikan epitel pada kelompok P2 dan P3 lebih baik dari P1 yang ditandai dengan rerata tebal celah epitel P2 dan P3 lebih besar dibandingkan P1. Adanya perbedaan bermakna antara kelompok P2 dengan P3 (p=0,049) menunjukkan perbaikan epitel perlakuan 3 lebih besar dibandingkan P2.

Gambar 2 menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan P1, P2 dan P3 (p≤0,001), mengindikasikan pemendekan lebar celah epitel setelah pemberian salep ekstrak karamunting yang ditandai dengan rerata lebar celah epitel kontrol negatif <P1, P2 dan P3. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kontrol positif dengan P2 (p≥0,405), menunjukkan re-epitelisasi pada kelompok P2 mendekati normal. Terdapat perbedaan bermakna antara kontrol positif dengan P3 (p≤0,031), menunjukkan terjadi re-epitelisasi pada kelompok P3 yang ditandai dengan rerata lebar celah epitel kelompok P3 lebih besar dibandingkan kelompok kontrol positif.

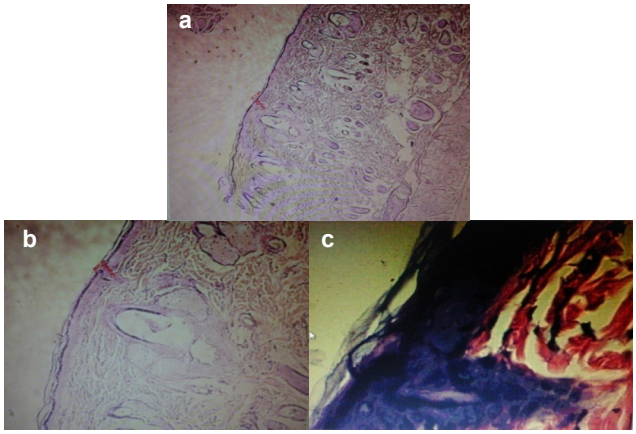


Gambar 2. Rerata Lebar Celah Epitel Kulit masing-masing Kelompok

K(-)=kontrol negatif, K(+)=kontrol positif, P1= ekstrak karamunting 2,5%, P2= ekstrak karamunting 5%, P3= ekstrak karamunting 10%.
*Berbeda bermakna dengan kontrol negatif. **Berbeda bermakna dengan kontrol positif

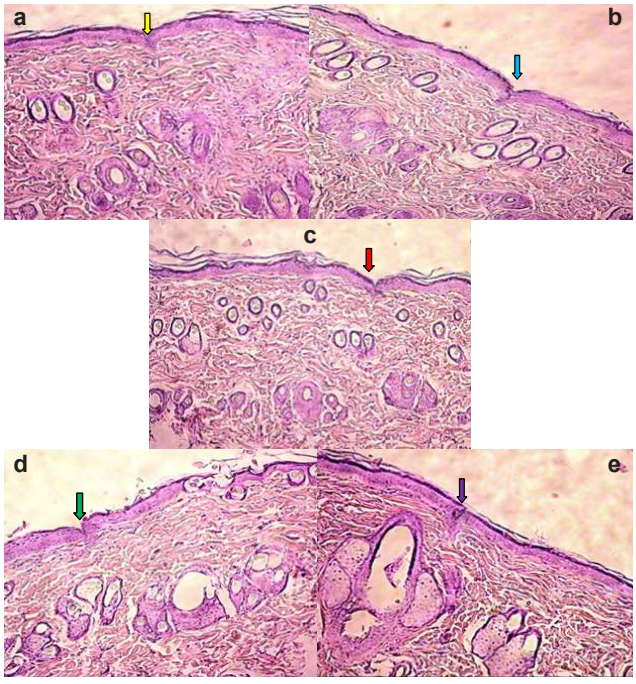
Pada kelompok P1 didapatkan perbedaan signifikan dengan P2 (p<0,001) dan P3 (p<0,001), menunjukkan bahwa re-epitelisasi pada kelompok P2 dan P3 lebih baik dari kelompok P1 yang ditandai dengan rerata lebar celah epitel pada kelompok P2 dan P3 lebih besar dibandingkan P1. Adanya perbedaan bermakna antara kelompok P2 dengan P3 (p<0,001) menunjukkan perbaikan epitel perlakuan 3 lebih besar dibandingkan P2.

Gambar 3 memperlihatkan gambaran mikroskopis luka di kulit tikus pada hari ke-10.



Gambar 3. Gambaran Mikroskopik Luka Kulit Tikus Hari ke-10. Tampak struktur kulit tikus (a) pada pembesaran 4x dan (b) pembesaran 10x. (c) Pada pembesaran 40x tampak tebal celah epitel (panah kuning) dan lebar celah epitel (panah merah)

Gambar 4 menunjukkan perbedaan ukuran tebal dan lebar celah epitel pascaperlakuan yaitu terjadi penyempitan lebar celah dan penipisan ketebalan celah epitel terutama pada P2 dengan konsentrasi 5% dan P3 dengan konsentrasi 10%.



Gambar 4. Gambaran Tebal dan Lebar Celah Epitel Luka Hari ke-10. Kelompok kontrol negatif (a) mendapat salep plasebo. Kontrol positif (b) mendapat salep sanoskin. Kelompok perlakuan 1 (c) mendapat salep ekstrak karamunting 2,5%. Kelompok perlakuan 2 (d) mendapat salep ekstrak karamunting 5%. Kelompok perlakuan 3 (e) mendapat salep ekstrak karamunting 10%. Tanda panah menunjukkan lebar celah epitel di luka.

Pembahasan

Epitelisasi adalah tahapan perbaikan luka, terjadi migrasi keratinosit, proliferasi keratinosit, dan diferensiasi neoepitel menjadi epitel berlapis-lapis.[11] Li et al[12] menyebutkan bahwa pembentukan kembali dermis dimulai pada hari ke-3 atau ke-4 setelah perlukaan, dengan ciri pembentukan neovaskularisasi dan penumpukan fibroblas. Kolagen tipe III disekresikan maksimal oleh fibroblas antara hari ke-5 dan ke-7, setelah itu akan terjadi perubahan fenotip fibroblas menjadi miofibroblas. Pada hari ke-7 sampai ke-9 epitelisasi dan *basement membrane zone* (BMZ) sudah terbentuk. Epitelisasi dapat dibuktikan dengan mengukur tebal dan lebar celah epitel yang terbentuk.

Hasil pengamatan hari ke-10 menunjukkan bahwa salep ekstrak etanol 70% daun karamunting meningkatkan epitelisasi dibandingkan kontrol negatif. Pada konsentrasi 5% terjadi peningkatan epitelisasi yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif yang diberikan salep sanoskin@. Pada konsentrasi 10% terjadi peningkatan epitelisasi secara signifikan dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan dan kontrol, bahkan peningkatan epitelisasi lebih besar dibandingkan kontrol positif.

Peningkatan epitelisasi pada kelompok yang mendapat salep ekstrak etanol 70% daun karamunting berupa tebal dan lebar celah epitel yang menyempit atau menipis. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Prasetyo et al[13] yang menyatakan epitelisasi yang sempurna salah satunya ditandai dengan celah luka epitel yang menutup sempurna. Penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh proses epitelisasi, semakin cepat proses tersebut semakin cepat pula luka menutup sehingga semakin cepat penyembuhan luka. Penelitian Jain[14] juga menyatakan pada luka yang menyembuh atau membaik ketebalan epitel makin mendekati normal sekitar 0,04–1,5mm. Proses epitelisasi akan mengembalikan epidermis utuh seperti semula dan faktor yang terlibat adalah migrasi dan proliferasi keratinosit, diferensiasi neoepitel menjadi epidermis yang berlapis-lapis.[12]

Terjadinya perbedaan epitelisasi pada kelompok P1, P2, dan P3 disebabkan oleh perbedaan konsentrasi ekstrak daun karamunting yang ditambahkan dalam formulasi salep. Peningkatan epitelisasi jaringan luka oleh salep daun karamunting dimungkinkan karena daun karamunting mengandung *phenolic compounds* yang berpengaruh pada mekanisme penyembuhan luka yaitu tanin, flavonoid, saponin, fenol dan triterpenoid.[3] Kandungan triterpenoid dan flavonoid daun karamunting berperan penting dalam meningkatkan proses penyembuhan luka. Kedua zat tersebut mempunyai efek antimikroba dan bertanggungjawab dalam kontraksi luka serta peningkatan kecepatan epitelisasi.[15] Zat aktif tanin dan saponin dalam daun karamunting berperan sebagai antioksidan dan antimikroba, meningkatkan kontraksi luka dan kecepatan epitelisasi.[2] Saponin juga dapat meningkatkan kemampuan reseptor TGF-β yang terdapat pada fibroblas untuk berikatan dengan TGF-β yang merupakan faktor pertumbuhan yang diperlukan fibroblas dalam mensintesis kolagen.[7-9] Kolagen merupakan matriks ekstraseluler yang berperan sebagai kerangka untuk migrasi keratinosit. Pembentukan matriks ekstraseluler yang lebih padat akan memacu proses epitelisasi keratinosit.[16] Tanin diduga berperan dalam pengaturan transkripsi dan translasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF).[17] VEGF bertindak secara parakrin tidak hanya pada sel endotel vaskular kulit tetapi juga pada keratinosit dan sel imun yang mempromosikan re-epitelisasi dan pada saat yang sama merangsang angiogenesis serta memulihkan perfusi oksigen.[18]

Pada tahap awal proses penyembuhan luka akan terjadi fase inflamasi dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan netrofil dan makrofag sebagai bagian dari sistem imun untuk membantu mempercepat pembersihan luka. Selain efek positif, ROS juga berdampak negatif. Pada kadar rendah hidrogen peroksida dan ROS yang lain menghambat migrasi dan proliferasi berbagai sel, termasuk sel kulit (keratinosit). Dalam kadar tinggi, ROS merusak jaringan bahkan berubah menjadi neoplasma, sehingga keberadaan ROS akan menghambat penyembuhan luka. [19]

Daun karamunting mempunyai sistem untuk mendetoksifikasi ROS dalam melindungi dari stres oksidatif. Flavonoid merupakan antioksidan kuat, dapat membasmi radikal bebas,[20] melindungi tubuh melawan ROS, meningkatkan fungsi antioksidan endogen, dan meningkatkan enzim antioksidan dalam jaringan granulasi.[2] Daun karamunting mendapat flavonoid yang dapat menghambat mediator radang seperti Interleukin-1 (IL-1) dan *tumor necrosis factor* (TNF) yang dihasilkan makrofag dan sitokin reseptor yang secara umum tampak pada penekanan rasa nyeri, demam dan kerusakan jaringan.[21] Flavonoid dan fenol dapat mengurangi lipid peroksidase, meningkatkan kecepatan epitelisasi, dan antimikroba.

Penurunan lipid peroksidase oleh flavonoid dan fenol akan mencegah nekrosis, memperbaiki vaskularisasi, dan meningkatkan viabilitas serabut kolagen dengan meningkatkan kekuatan anyaman serabut kolagen.[3,7]

Kesimpulan

Pemberian salep ekstrak etanol 70% daun karamunting meningkatkan epitelisasi luka pada kulit tikus. Dosis efektif salep ekstrak etanol 70% daun karamunting yang dapat meningkatkan epitelisasi jaringan luka adalah konsentrasi 5%.

Daftar Pustaka

1. Nagori BD, Solanki, R. Role of medicinal plants in wound healing. Research Journal of Medicinal Plant. 2011;5(4):392-405.
2. Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in wound healing studies of plants. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011 may 26:1-15.
3. Soni H, Singhai AK. A recent update of botanicals for wound healing activity. International Research Journal of Pharmacy. 2012;3:1-6.
4. Driscoll P. Incidence and prevalence of wounds by etiology. 2009. http://mediligence.com/2009/ 12/13/ incidence-and-prevalence-of-wounds-by etiology. 18 juni 2014.
5. Indonesia health profile. http://www.ino.searo.who.int/ en/Section3_30.htm. 17 Juni 2014.
6. Sutomo, Arnida, Hernawati F, Yuwono M. Kajian farmakognostik simplisia daun karamunting (*R.tomentosa*) asal Pelaihari Kalimantan Selatan. Sains dan Terapan Kimia. 2010;1(4):38 -50.
7. Agarwal PK, Singh A, Gaurav K, Goel S, Khanna HD, Goel RK. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (M.sapientum var. paradisiaca) in rats. Indian J Exp Biol. 2009;47:322-40.
8. Kanzaki T, Monsaki N, Shina R, Saito Y. Role of transforming growth factor-β pathway in the mechanism of wound healing by saponin from ginseng radix rubra. Brit J Pharmacol. 1998;125:255-62.
9. Nur P, Handayani MP. Efek jus buah belimbing manis (*Averrhoa carambola*) dalam meningkatkan pembentukan kolagen pada soket tikus putih (*Rattus novergicus* strain wistar) jantan pasca pencabutan gigi [skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya; 2013.
10. Masir O, Manjas M, Putra AE, Agus S. Pengaruh cairan cultur filtrate fibroblast (CFF) terhadap penyembuhan luka; penelitian eksperimental pada rattus norvegicus galur wistar. Jurnal Kesehatan Andalas. 2012;1(3):112-7.
11. Winny A. Pemberian salep ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) meningkatkan proses regenerasi jaringan luka pada *R.norvegicus* jantan [tesis]. Denpasar: Universitas Udayana; 2013.
12. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in Dermatology.2007;25:9-18.
13. Prasetyo BF, Wientarsih I, Priosoeryanto BP. Aktivitas sediaan gel ekstrak batang pohon pisang ambon dalam proses penyembuhan luka pada mencit. Jurnal Veteriner. 2010;11(2):70-3.
14. Jain S. Dermatology. Journal of Ilustrated Study Guide and Comprehensive Board Review. 2012: 2-10.
15. Prasetyo BF, Wientarsih I, Priosoeryanto BP. Aktivitas sediaan gel ekstrak batang pohon pisang ambon dalam proses penyembuhan luka pada mencit. Jurnal Veteriner. 2010;11(2):70-3.
16. Nayak BS, Pereira LMP. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in sprague dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2006;6:41.
17. Li K, Diao Y, Zhang H, Wang S, Zhang Z, Yu B, et al. Tannin extracts from immature fruits of terminalia chebula fructus retz. promote cutaneous wound healing in rats. BioMed Central Complementary and Alternative Medicine. 2011;11:86.
18. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Aron G. Nusbaum, et al. Epithelization in wound healing: A comprehensive review. Wound Healing Society. 2013;3(7); 445-64.
19. Arif Mz, Muhartono. Perbandingan tingkat kesembuhan luka bakar dengan pemberian madu dan gentamisin topikal pada *Rattus norvegicus*. Medical Journal of Lampung University. 2012:33-46.
20. Keller U, Kumin A, Braun S, Werner S. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings vol 11, 2006.
21. Saroja M, Santhi R, Annapoorani S. Wound healing activity of flavonoid fraction of cynodon dactylon in swiss albino mice. International Research Journal of Pharmacy. 2012;3(2):230-31.