

Jumlah Fibroblas pada Luka Bakar Derajat II pada Tikus dengan Pemberian Gel Ekstrak Etanol Biji Kakao dan Silver Sulfadiazine

(*The Total Fibroblast on the Second Degree Burns of Rats after Treatment using Ethanolic Extract of Cocoa Beans*)

Muhammad Izat Fuadi¹, Ulfa Elfiah¹, Misnawi²

¹Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

²Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
Jln. PB Sudirman No. 90, Jember 68118
e-mail: izatfuadi28@gmail.com

Abstract

The healing process of burns can be disturbed by bacteria and free radicals. Polyphenol (flavonoid and procyanidin) in cocoa have an antibacterial activity, antiinflammatory and antioxidants. This study aimed to investigate the effect of the cocoa beans ethanolic extract on the second degree burns healing process by measuring the number of fibroblasts. The in vivo test was done by creating a second degree burns on the mice backs then treated with either: the ethanolic extract of cocoa beans gel 8 %, Silver Sulfadiazine or Normal saline. The number of fibroblasts was counted in histopathology preparations. The result showed the number of fibroblasts 26.67 cells/field of view in Normal saline group; 44.23 cells/field of view in Silver Sulfadiazine group; 50.02 cells/field of view in the ethanolic extract of cocoa beans gel 8 % group. The data analysis showed significant differences between treatment groups. The conclusion was the ethanolic extract of cocoa beans affect the healing process on second degree burns and the number of fibroblasts in the ethanolic extract of cocoa beans gel 8% group was higher than Normal saline and Silver Sulfadiazine groups.

Keywords: *ethanolic extract of cocoa beans, polyphenols, flavonoids, procyanidin, second degree burns, Silver Sulfadiazine*

Abstrak

Proses penyembuhan luka bakar dapat terhambat oleh bakteri dan radikal bebas. Polifenol (flavonoid dan prosianidin) yang ditemukan pada kakao mempunyai aktivitas antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek gel ekstrak etanol biji kakao terhadap penyembuhan luka bakar derajat II melalui penghitungan jumlah fibroblas. Uji *in vivo* dilakukan dengan membuat luka bakar derajat II pada punggung tikus, dirawat sesuai kelompok perlakuan yaitu gel ekstrak etanol biji kakao 8%, Silver Sulfadiazine atau *Normal saline*. Data didapatkan dari penghitungan jumlah fibroblas pada preparat histopatologi. Hasil penelitian didapatkan jumlah fibroblas 26,67 sel/lapang pandang pada kelompok *Normal saline*; 44,23 sel/lapang pandang pada kelompok Silver Sulfadiazine; 50,02 sel/lapang pandang pada kelompok gel ekstrak etanol biji kakao 8%. Hasil analisis data menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Kesimpulannya adalah gel ekstrak etanol biji kakao berpengaruh pada penyembuhan luka bakar derajat II dan jumlah fibroblas pada kelompok perlakuan gel ekstrak etanol biji kakao 8% lebih tinggi dari kelompok *Normal saline* dan kelompok Silver Sulfadiazine.

Kata kunci: ekstrak etanol biji kakao, polifenol, flavonoid, prosianidin, luka bakar derajat II, Silver Sulfadiazine.

Pendahuluan

Luka bakar atau *combustio* adalah luka yang disebabkan oleh kontak langsung dengan benda bersuhu tinggi seperti api, air panas, listrik, bahan kimia, radiasi dan dapat menyebabkan komplikasi diantaranya *shock*, infeksi, ketidakseimbangan elektrolit dan masalah distress pernafasan. Selain itu dapat menyebabkan distress emosional dan psikologi yang berat dikarenakan cacat dan kematian [1].

Proses penyembuhan luka terdapat 3 fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (*remodeling*). Pada fase proliferasi terjadi fibroplasia dimana fibroblas disini berperan menonjol dalam sintesis kolagen. Gangguan pada fase ini akan mengakibatkan proses penyembuhan luka semakin lama dan dapat terjadi luka kronis. Proses ini juga dipengaruhi oleh pemakaian produk perawatan luka, karena produk perawatan luka yang kurang tepat akan memperlambat penyembuhan luka [2]. Produk perawatan luka yang umum digunakan adalah pemberian antibiotik Silver Sulfadiazine (*Burnazin®*) 1% dan *Normal saline*.

Banyak penelitian dilakukan untuk mengetahui kemampuan farmakologi tumbuh-tumbuhan. Indonesia merupakan salah satu tempat dengan jenis tumbuhan terbanyak di dunia dengan memiliki sekitar 35 ribu jenis tumbuhan tingkat tinggi dan 3500 di antaranya dilaporkan sebagai tumbuhan obat. Salah satu tumbuhan yang dikenal dan terbukti memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan adalah tumbuhan coklat (*Theobroma cacao*).

Salah satu produk yang dapat dihasilkan dari pengolahan tumbuhan coklat ini adalah polifenol yang didapatkan dengan cara mengekstrak biji kakao. Senyawa polifenol dalam biji kakao meliputi flavonoid, katekin, epikatekin, prosianidin, antosianidin, tanin kompleks, dan flavonol glikosida. Flavonoid dapat bersifat bakterisidal dan sebagai antioksidan juga memiliki aktivitas anti-inflamasi, aktivitas *o estrogenik*, aktivitas anti-alergi, efek pada vaskular dan aktivitas antitumor sitotoksik [3].

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa gel ekstrak etanol biji kakao mempunyai pengaruh pada penyembuhan luka bakar derajat II dan membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah fibroblas pada luka bakar antara pemberian gel

ekstrak etanol biji kakao dan Silver Sulfadiazine.

Metode Penelitian

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental laboratories* dengan menggunakan *posttest control group design*. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novvergicus*) jenis *Sprague Dawley* albino jantan sebanyak 15 ekor yaitu 12 tikus untuk perlakuan dan 3 sebagai cadangan. Dari 12 tikus tadi terbagi lagi dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (*Normal saline*), kelompok kontrol positif (Silver Sulfadiazine), dan kelompok gel ekstrak etanol biji kakao 8%.

Pembuatan Gel Ekstrak Etanol 8%

Karbopol 2% dan propilen glikol 15% dikembangkan dengan sebagian akuades 71%. Kemudian trietanolamin (TEA) 4% dimasukkan tetes demi tetes ke dalam karbopol dan propilen glikol yang telah dikembangkan. Aduk hingga homogen dan tambahkan sisa akuades hingga membentuk masa gel yang homogen. Masukkan sedikit basis gel sebanyak 27,6 gram ke dalam lumpang, kemudian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao*) 2,4 gram ditambahkan dan digerus homogen dan didapatkan gel ekstrak etanol biji kakao sebanyak 30 gram.

Pembuatan Luka Bakar Derajat II

Adaptasi tikus dilakukan selama 7 hari lalu tikus dicukur bulunya pada bagian punggung lalu dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pembiusan menggunakan ketamin 0,5-0,6 ml secara intramuskular per ekor agar tikus tidak terlalu merasakan sakit saat pembuatan luka bakar derajat II. Luka bakar ini diperoleh dari uang logam berbahan aluminium bronze dengan berat 5,34 gram, tebal 1,83 mm, dan diameter 24 mm. Logam tersebut dibalut dengan kassa dan direndam pada air mendidih dengan suhu 98°C selama 3 menit selanjutnya bahan tersebut ditempelkan pada kulit bagian belakang tikus *Sprague Dawley* selama 10 detik.

Perawatan Luka Bakar Derajat II

Setelah tikus diberi luka bakar derajat II (*partial thickness*), luka dibersihkan dengan *Normal saline*. Selanjutnya, tikus diperlakukan sesuai kelompok perlakuan. Kelompok 1 hanya dibersihkan dengan *Normal saline*, kelompok 2 diolesi gel ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 8% sebanyak 0,5 gram sehari sekali

selama 10 hari, dan kelompok 3 diberi perlakuan dengan pemberian Silver Sulfadiazine (*Burnazin*®) 1 % sebanyak 0,5 gram sehari sekali selama 10 hari. Area yang telah diolesi kemudian ditutup dengan kasa dan direkatkan dengan plester yang tidak menyebabkan iritasi. Hewan coba dicegah agar tidak menggaruk, melepas, memakan atau menjilat gel yang telah diaplikasikan.

Pembuatan Preparat Histopatologi

Pada hari ke-11, tikus *dieusthanasia* dengan cara dislokasi servikal dan kulit yang diberi perlakuan diambil mulai dari tepi luka dan sedalam jaringan subkutan. Selanjutnya kulit tikus dimasukkan ke formalin 10% untuk fiksasi jaringan. Setelah itu kulit dibuat preparat histopatologi menggunakan pewarnaan HE.

Pengamatan Preparat Histopatologi

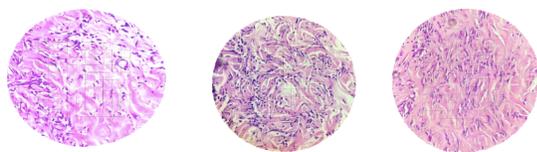
Pengamatan histopatologi dengan cara menghitung jumlah fibroblas. Penghitungan dilakukan dengan mikroskop cahaya pada enam lapang pandang secara sistematis dengan pembesaran 400x dan dengan bantuan mikrometer *graticulae*. Penghitungan dilakukan oleh 2 orang dengan metode *blinding* kemudian dari ke enam lapang pandang fibroblas yang teridentifikasi dijumlah dan dicari rata-ratanya.

Analisi Data

Analisis data dilakukan secara komputersasi dengan SPSS 21 PS dengan taraf signifikan $p < 0,05$. Jumlah fibroblas dianalisis dengan uji normalitas data, uji homogenitas, uji *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc Metode LSD*. Data hasil analisis disajikan dalam bentuk mean \pm SD.

Hasil Penelitian

Gambaran fibroblas hasil perlakuan dapat dilihat pada gambar 1. Hasil penghitungan jumlah fibroblas pada tiap perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.



Normal saline Gel Kakao 8% Silver Sulfadiazine
Gambar 1. Gambaran histopatologi kulit tikus dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

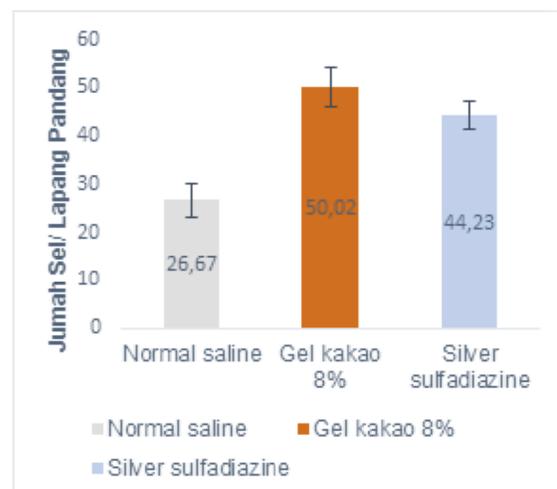
Tabel 1. Rata-rata jumlah fibroblas dari 6 lapang pandang

Kelompok	Rata-rata dari 6 lapang pandang \pm SD
1. <i>Normal saline</i>	28,17 \pm 1,71
2. <i>Normal saline</i>	30,67 \pm 6,49
3. <i>Normal saline</i>	22,83 \pm 2,88
4. <i>Normal saline</i>	25,00 \pm 3,51
1. Gel Kakao 8%	51,58 \pm 10,96
2. Gel Kakao 8%	44,33 \pm 0,52
3. Gel Kakao 8%	50,25 \pm 7,89
4. Gel Kakao 8%	53,92 \pm 14,49
1. Silver Sulfadiazine	42,42 \pm 5,36
2. Silver Sulfadiazine	41,00 \pm 1,06
3. Silver Sulfadiazine	46,83 \pm 1,51
4. Silver Sulfadiazine	46,67 \pm 1,92

Uji normalitas data menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,170 ($p > 0,05$) yang berarti bahwa sebaran data normal sedangkan pada uji homogenitas menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,960 ($p > 0,05$) yang berarti bahwa varian data sama.

Tabel 2. Rata-rata jumlah fibroblas

Kelompok	Rata-rata jumlah fibroblas \pm SD
1. Normal Saline	26,67 \pm 3,45
2. Gel Kakao 8%	50,02 \pm 4,08
3. Silver Sulfadiazine	44,23 \pm 2,97



Gambar 2. Grafik rata-rata jumlah fibroblas

Uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan jumlah fibroblas secara bermakna pada masing-masing kelompok. Pada uji *Post Hoc* metode *LSD* menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) antara kelompok *Normal saline* dan gel kakao 8%. Nilai signifikansi yang sama juga didapatkan antara kelompok *Normal saline* dan Silver Sulfadiazine yaitu sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Sedangkan pada kelompok Silver Sulfadiazine jika dibandingkan dengan gel kakao 8% didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,046 ($p < 0,05$). Ketiga nilai signifikansi $< 0,05$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan.

Pembahasan

Pada hasil penelitian didapatkan bahwa kelompok kontrol negatif (*Normal saline*) didapatkan rata-rata jumlah fibroblas 26,67 sel/lapang pandang dan merupakan hasil terendah jika dibandingkan dengan kelompok lain. Hal ini menandakan bahwa *Normal saline* hanya digunakan untuk membersihkan luka dan menghilangkan benda asing yang menempel pada luka [2].

Pada kelompok kontrol positif (Silver Sulfadiazine) (*Burnazin*®) 1% didapatkan rata-rata jumlah fibroblas 44,23 sel/lapang pandang. Hasil ini lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif (*Normal saline*) namun lebih rendah dari kelompok yang diberi gel ekstrak etanol biji kakao 8% yang rata-rata jumlah fibroblasnya 50,02 sel/lapang pandang. Silver Sulfadiazine (*Burnazin*®) 1% merupakan obat topikal *gold standard* yang diberikan pada luka bakar. Obat ini merupakan obat golongan sulfonamid yang memiliki sifat antibakteri dengan cara berkompetisi dengan substrat *PABA* untuk sintesis enzim *dihidropetroat* sehingga mencegah sintesis asam folat bakteri. Selain itu, Silver Sulfadiazine (*Burnazin*®) 1% mampu merangsang sel sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin dalam proses penyembuhan luka seperti *TGF-β*, *EGF*, *IL-1*, *IL-4* dan *IL-8* sehingga bersama dengan sifat antibakteri dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Selain itu Silver Sulfadiazine mempunyai efek positif pada proliferasi fibroblas yang merupakan penghasil kolagen dan fibronectin [4]. Akan tetapi karena sifat anti infeksiya, Silver Sulfadiazine (*Burnazin*®) 1% tidak memberikan kelembaban

pada luka sehingga tidak mendukung pada proses penyembuhan yang lebih cepat [5].

Hasil rata-rata jumlah fibroblas pada kelompok gel ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 8% sebesar 50,02 sel/lapang pandang. Hasil ini lebih tinggi dari kelompok yang hanya dibersihkan dengan kontrol negatif (*Normal saline*) dan lebih tinggi dari kelompok kontrol positif yang dirawat dengan Silver Sulfadiazine (*Burnazin*®) 1%. Hal ini terjadi karena, kandungan yang terdapat pada ekstrak etanol biji kakao dan bentuk sediaannya yang bersifat lembab yaitu gel. Kandungan ekstrak etanol biji kakao yaitu polifenol ini banyak sekali macamnya seperti flavonoid dan proisianidin. Flavonoid memiliki efek antioksidan yang dapat mempercepat fase inflamasi dengan cara menangkap radikal bebas dan mencegah reaksi oksidasi dengan meningkatkan aktifitas enzim *Superoxide dismutase (SOD)* dan *glutation transferase* [2]. Selain itu, flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi yang bekerja menghambat fase penting dalam biosintesis prostaglandin yaitu pada lintasan siklooksigenase dan juga memiliki aktivitas antibakteri melalui hambatan fungsi *gyrase* bakteri sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri dihambat [2,3].

Flavonoid dengan aktivitas antiinflamasinya dan proisianidin dapat merangsang sel-sel seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin seperti *EGF*, *TGF-β*, *IL-1*, *IL-4*, *IL-8*. *TGF-β* dan *EGF* berfungsi untuk induksi proliferasi dan migrasi fibroblas serta induksi fibroblas dalam produksi matriks ekstra seluler. *IL-1*, *IL-4* dan *IL-8* berfungsi menginduksi proses kemotaksis fibroblas dan keratinosit, mengaktifasi proliferasi fibroblas, menginduksi sintesa kolagen dan proteoglikan, mengaktifasi makrofag untuk memulai proses kemotaksis, menginduksi marginasi dan maturasi keratinosit [6].

Selain dari kandungan ekstrak etanol biji kakao, sediaan yang berupa gel dapat mempercepat proses penyembuhan karena sifatnya yang lembab. Gel dengan kandungan air dapat mempertahankan sifat lembab pada daerah luka dan sekitar luka [2]. Keadaan lembab dapat meningkatkan reepitelisasi dan migrasi epitel sehingga proses penyembuhan luka bisa lebih cepat. Reepitelisasi ini terjadi beberapa jam setelah luka. Sel epitel tumbuh dari tepi luka, bermigrasi ke jaringan ikat yang masih hidup. Epidermis segera mendekati tepi luka dan menebal dalam 24 jam setelah luka [7]. Keadaan lembab pada luka diperlukan untuk aktivitas *growth factor* seperti *TGF-β* dan *EGF*,

pengiriman oksigen, aktivitas permulaan enzim proteolitik dan pengiriman nutrisi yang lebih efektif [8].

Selain itu, sediaan gel yang bersifat dingin dan menyejukkan pada luka dapat memberikan keadaan nyaman sehingga nyeri dapat berkurang [2]. Nyeri merupakan salah satu faktor yang dapat menghambat penyembuhan luka. Nyeri bila tidak dikelola dengan tepat akan berakibat memperpanjang fase katabolik berupa peningkatan glukagon, kortikoid dan resistensi insulin. Peningkatan hormon glukokortikoid mempengaruhi proses anti inflamasi, menghambat pembentukan fibroblast, mengganggu sintesis kolagen sehingga menghambat penyembuhan luka. Dalam keadaan nyeri, β endorfin yang dilepas pituitaria kadarnya akan meningkat dan mempunyai sifat mensupresi makrofag, sehingga produksi *growth factor* dapat menurun. Penurunan beberapa faktor pertumbuhan ini akan berakibat terjadinya hambatan kesembuhan luka [7].

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa gel ekstrak etanol biji kakao mempunyai pengaruh terhadap proses penyembuhan luka bakar derajat II (*partial thickness*) dan jumlah fibroblas kelompok gel ekstrak etanol biji kakao 8 % lebih tinggi dari kelompok *Normal saline* dan kelompok Silver Sulfadiazine.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek gel ekstrak etanol kakao 8% pada rentang yang lebih luas yaitu pada ketiga fase penyembuhan luka.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

Daftar Pustaka

[1] Moenadjat. Luka Bakar Masalah dan Tatalaksana. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2009.

- [2] Subandi, Rini IK, Maslahatun L. Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Daun Cincu Hijau (*Cyclea barbata L. Miers*) terhadap Peningkatan Reepitelisasi Luka Bakar Derajat IIB pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar. Malang: Universitas Brawijaya. 2014.
- [3] Sartini. Pemanfaatan Kakao Sebagai Sumber Bahan Aktif/Pembantu Sediaan Farmasi (Obat Dan Kosmetik) Dan Suplemen Makanan. Makassar: Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. 2013.
- [4] Esfahani, Imanieh, Khoshneviszadeh, Meshksar, Noorafshan, Geramizadeh, Ebrahimi, Handjani, Tanideh. The Healing Effect of Arnebia Euchroma in Second Degree Burn Wounds in Rat as an Animal Model. Iran: Iranian Red Crescent Med J. 2012;14(2): 70-74.
- [5] Nugraha A, Muhartono. Perbandingan Tingkat Kesembuhan Luka Bakar Derajat II antara Pemberian Madu Topikal Nektar Kopi dengan Silver Sulfadiazine pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur *Sprague Dawley*. Lampung: MAJORITY (Medical Journal of Lampung University). 2012: 24-32.
- [6] Hidayat TSN. Peran Topikal Ekstrak Gel Aloe Vera Pada Penyembuhan Luka Bakar derajat Dua Dalam. Surabaya: Universitas Airlangga. 2013.
- [7] Prabakti Y. Perbedaan Jumlah Fibroblas di Sekitar Luka Insisi pada Tikus yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan tidak diberi Levobupivakain. Semarang: Universitas Diponegoro. 2005.
- [8] Nurdiana, Hariyanto P, Musfirah. Perbedaan Kecepatan Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dua Antara Perawatan Luka Menggunakan Virgin Coconut Oil (*Cocos nucifera*) Dan Normal Salin Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar. Malang: Universitas Brawijaya. Tanpa Tahun.