

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian karya tulis ilmiah pengaruh penggunaan krim kombinasi madu dan propolis terhadap gambaran histologi jumlah fibroblas terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka insisi ini menggunakan desain penelitian *True Experiment Design* atau eksperimental sungguhan dengan *Post Test Only Control Group*. Penelitian ini terbagi menjadi lima kelompok dengan tiga kelompok sebagai kelompok eksperimen dan dua kelompok sebagai kelompok kontrol. Kelima kelompok tersebut menggunakan subjek tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan Galur *Wistar* dengan jumlah lima tikus pada setiap kelompoknya. Pengujian dilakukan dengan cara tikus diinsisi sepanjang 15mm dengan kedalaman 1mm, masing-masing dua luka pada bagian punggung dan paha. Selanjutnya, selama 12 hari masing-masing kelompok tikus diterapi dengan satu jenis krim yang diberikan secara *blind* (*Blind Metode*) pada keempat kelompok dan betadine (*Povidone iodine*) pada satu kelompok (kontrol positif). Keempat kelompok diberi label kelompok A, B, C, D dan kelompok kontrol positif diberi label kelompok E.

Pada hari ke 13, tikus diterminasi untuk diambil jaringan kulit yang mengalami penyembuhan dan selanjutnya jaringan kulit tersebut dibuat

Dari hasil pembuatan preparat histologi dihasilkan 50 preparat histologi, dan selanjutnya dilakukan pembacaan preparat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x pada 30 lapang pandang untuk menghitung jumlah fibroblas.

Setelah pembacaan preparat selesai, kunci dari masing-masing krim untuk setiap kelompok diberikan, dan diketahui perlakuan untuk masing-masing kelompok sebagai berikut :

Kelompok A : Terapi dengan krim madu

Kelompok B : Terapi dengan basis krim (tidak terdapat bahan aktif)

Kelompok C : Terapi dengan krim kombinasi madu dan propolis

Kelompok D : Terapi dengan krim propolis

Kelompok E : Terapi dengan Betadine (*Povidone iodine*)

Selanjutnya dilakukan pengolahan data dari hasil penghitungan fibroblas. Untuk menguji normalitas data digunakan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov*.

Berdasarkan uji normalitas tersebut, dihasilkan nilai signifikansi $p=0,462$, sehingga diketahui bahwa sebaran data masing-masing kelompok adalah normal dengan nilai signifikansi $p > 0,05$.

Setelah dilakukan pengujian normalitas dan didapatkan hasil bahwa data terdistribusi normal, maka dapat dilakukan pengujian hipotesis dengan menggunakan uji analisis parametrik *One Way Anova*.

Pada tabel uji analisis diketahui nilai signifikansi $p = 0,001$. Data

signifikansi $p < 0,05$ yang berarti berdasarkan nilai signifikansi hasil uji analisis diatas, terdapat perbedaan jumlah fibroblas yang bermakna pada kelima kelompok perlakuan. Pengujian dengan menggunakan uji *One Way Anova* tidak dapat menunjukkan perbedaan antara masing-masing kelompok. Maka dari itu, untuk dapat mengetahui seberapa besar perbedaan jumlah fibroblas antara kelompok satu dengan yang lain, diperlukan pengujian dengan menggunakan uji *Post Hoc Multiple Comparisons*. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah Uji LSD (*Least Square Distance*).

Nilai signifikansi yang didapatkan dari tabel menunjukkan bermakna tidaknya perbedaan jumlah fibroblas antara setiap masing-masing kelompok dengan kelompok-kelompok yang lain. Dua kelompok dikatakan memiliki perbedaan jumlah fibroblas jika nilai $p < 0,05$. Dari tabel *Multiple Comparisons*, dapat diketahui bahwa terdapat beberapa kelompok yang memiliki perbedaan jumlah fibroblas yang bermakna, yang diantaranya adalah :

Tabel 1. Kelompok dengan Perbedaan Jumlah Fibroblas Signifikan

No	2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan	Nilai p
1.	Krim kombinasi madu dan propolis - Kelompok terapi krim madu	0,014
2.	Krim kombinasi madu dan propolis - Kontrol negatif	0,000
3.	Krim kombinasi madu dan propolis - Kontrol positif	0,001
4.	Krim propolis - Kontrol negatif	0,036

Selain empat pasang kelompok yang disebutkan diatas, yakni pasangan kelompok dengan nilai $p > 0,05$, maka perbandingan jumlah fibroblas antara kedua kelompok tersebut tidak signifikan atau tidak ada perbedaan yang bermakna.

Uji yang dilakukan selanjutnya adalah *Homogeneous Subsets* dan *Descriptive Statistics*. Dari kedua uji tersebut dihasilkan rerata jumlah fibroblas untuk setiap kelompok.

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Fibroblas pada Luka Insisi

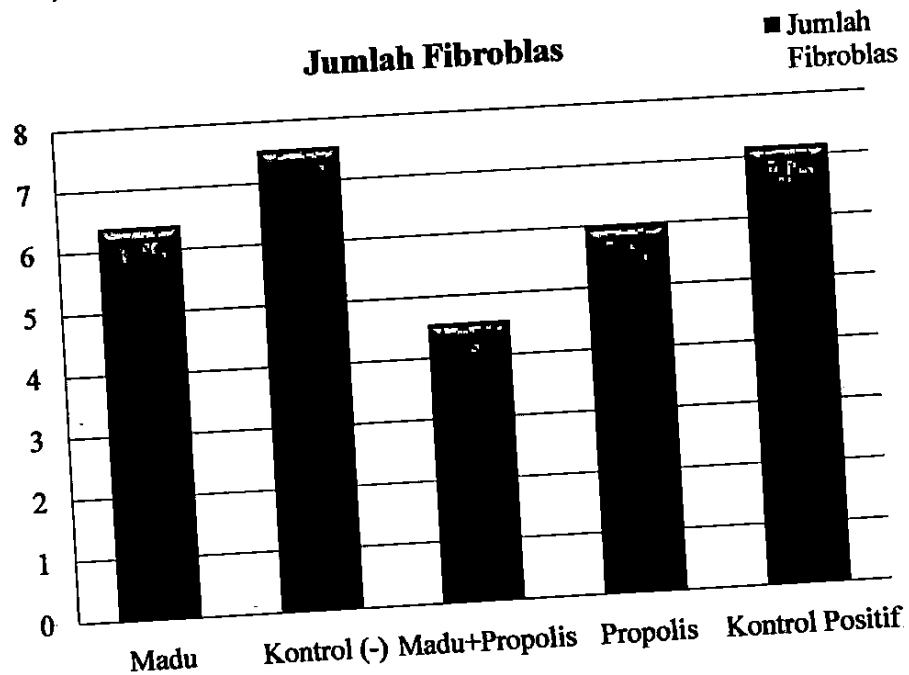
No.	Kelompok Penelitian	Rata-rata Jumlah Fibroblas
1.	Krim Madu	$6,38 \pm 2,06^a$
2.	Kontrol Negatif (Basis Krim)	$7,53 \pm 1,04^a$
3.	Krim Kombinasi Madu dan Propolis	$4,55 \pm 0,99^b$
4.	Krim Propolis	$5,98 \pm 2,49^{a,b}$
5.	Kontrol Positif (<i>Povidone iodine</i>)	$7,15 \pm 0,58^a$

Ket: angka yang diikuti huruf yang berbeda memiliki perbedaan yang signifikan

Diketahui pada fase maturasi untuk rata-rata jumlah fibroblas kelompok dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis memiliki jumlah fibroblas paling sedikit dengan jumlah $4,55 \pm 0,99$ sel. Kelompok dengan rata-rata jumlah fibroblas dari yang paling sedikit hingga paling banyak secara berturut-turut selanjutnya adalah kelompok dengan terapi

... .. 5,98 ± 2,49 sel krim madu dengan jumlah

6,38 ± 2,06 sel, *Povidone iodine* (kontrol positif) dengan jumlah 7,15 ± 0,58 sel, dan terakhir basis krim (kontrol negatif) dengan jumlah 7,53 ± 1,04 sel.



Gambar 8. Grafik Rata-rata Jumlah Fibroblas

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan tambahan terhadap kecepatan kesembuhan luka pada masing-masing kelompok perlakuan. Data waktu kesembuhan luka diolah dengan menguji normalitas menggunakan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov*. Nilai signifikansi dari uji normalitas waktu kesembuhan adalah $p = 0,114$. Data dikatakan normal jika $p > 0,05$ sehingga dapat diketahui bahwa sebaran data waktu kesembuhan normal.

Selanjutnya dilakukan uji hipotesis *One Way Anova* untuk mengetahui apakah data waktu kesembuhan memiliki perbedaan yang bermakna. Adapun nilai signifikansi yang didapat adalah $p = 0,002$. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukan bahwa terdapat perbedaan waktu kesembuhan yang bermakna.

Kemudian dilakukan lagi uji hipotesis yang menunjukan nilai signifikansi antar tiap dua kelompok perlakuan secara detail, untuk mengetahui bermakna tidaknya perbedaan data waktu kesembuhan pada setiap masing-masing kelompok dengan kelompok yang lain. Digunakan uji *Post Hoc Test Multiple Comparisons*. Adapun dari uji ini didapatkan hasil kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan waktu kesembuhan yang bermakna, antara lain:

Tabel 3. Kelompok dengan Perbedaan Waktu Kesembuhan Signifikan

No	2 kelompok yang memiliki perbedaan signifikan		Nilai P
1.	Kontrol Positif	Krim Madu	0,049
2.	Kontrol Positif	Krim Propolis	0,001
3.	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	0,000
4.	Krim Kombinasi Madu dan Propolis dan Kontrol Negatif		0,049

Kelompok-kelompok tersebut diatas memiliki perbedaan waktu kesembuhan yang bermakna karena memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$. Oleh karena itu, selain kelompok-kelompok diatas, tidak ditemukan

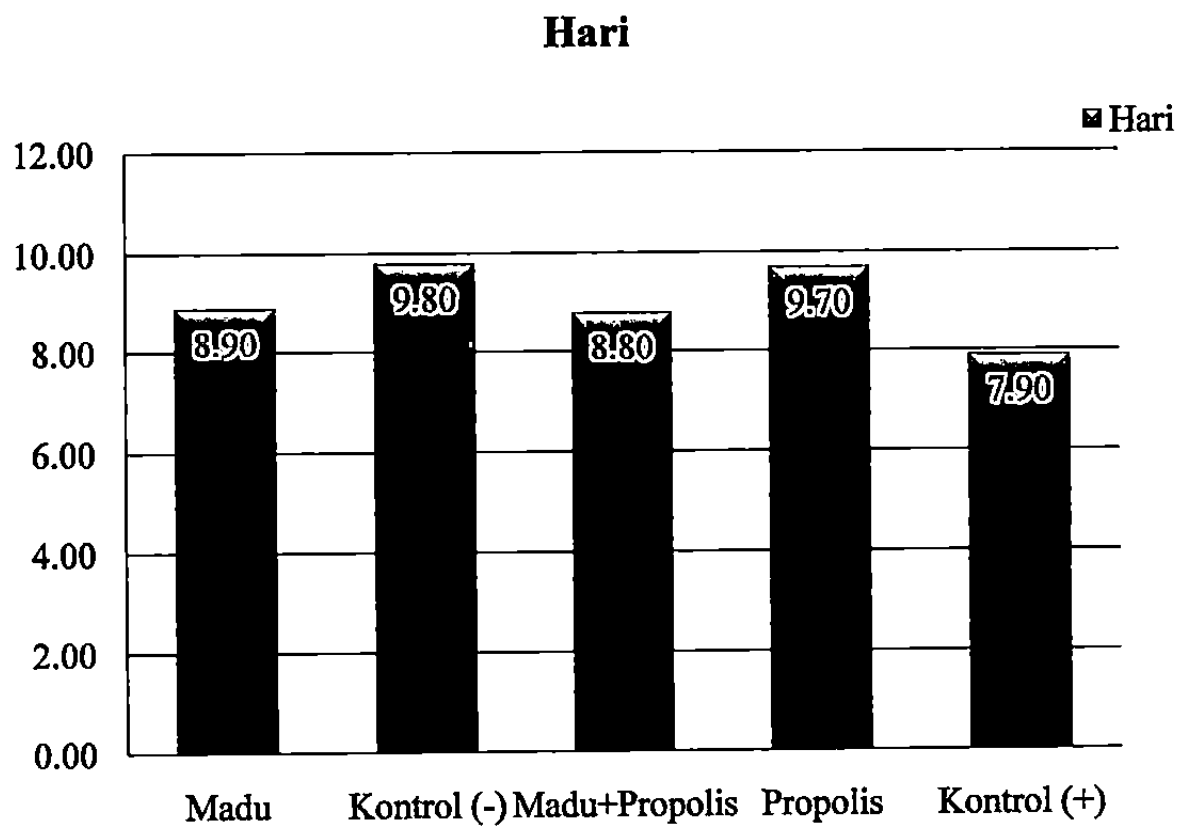
Berikutnya dilakukan uji *Homogeneous Subsets* dan *Descriptive Statistics* untuk mengetahui rata-rata waktu kesembuhan setiap kelompok.

Tabel 4. Rata-rata Waktu Kesembuhan pada Luka Insisi

No.	Kelompok Penelitian	Rata-rata Waktu Kesembuhan
1.	Krim Madu	$8,90 \pm 1,10^{a,b}$
2.	Kontrol Negatif (Basis Krim)	$9,80 \pm 1,32^b$
3.	Krim Kombinasi Madu dan Propolis	$8,80 \pm 0,92^{a,b}$
4.	Krim Propolis	$9,70 \pm 1,34^b$
5.	Kontrol Positif (<i>Povidone Iodine</i>)	$7,90 \pm 0,74^a$

Ket: angka yang diikuti huruf yang berbeda memiliki perbedaan yang signifikan

Berdasarkan tabel diatas, dapat dilihat bahwa kelompok yang memiliki rata-rata waktu kesembuhan paling cepat adalah kelompok kontrol positif dengan rata-rata $7,90 \pm 0,74$ hari. Setelahnya, kelompok yang memiliki rata-rata waktu kesembuhan dari yang paling cepat hingga paling lama adalah kelompok terapi krim kombinasi madu dan propolis dengan rata-rata $8,80 \pm 0,92$ hari, kelompok terapi krim madu dengan rata-rata $8,90 \pm 1,10$ hari, kelompok terapi krim propolis dengan rata-rata $9,70 \pm 1,34$ hari, dan yang terakhir adalah kelompok kontrol negatif dengan rata-rata $9,80 \pm 1,32$ hari.



Gambar 3.3. Efektifitas Madu dan Propolis Terhadap Jumlah Leukosit

luka, yang tidak saja mengaktifkan pembentukan bekuan yang menyatukan tepi luka, tetapi juga mengakumulasi beberapa mitogen dan menarik zat kimia ke daerah luka. Pembentukan kinin dan prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah di daerah luka. Hal ini menyebabkan edema dan kemudian menimbulkan pembengkakan dan nyeri pada awal terjadinya luka. Sel yang pertama menuju ke tempat terjadinya luka (24 – 48 jam pertama setelah terjadinya luka) adalah sel polimorfonuklear (PMN) yang fungsi utamanya memfagosit bakteri yang masuk. Akan tetapi pada penyembuhan luka normal, kehadiran sel – sel ini tidak begitu penting sebab penyembuhan luka dapat terjadi tanpa keberadaan sel-sel ini. Terdapatnya sel ini menunjukkan bahwa luka terkontaminasi bakteri. Apabila tidak terjadi infeksi, sel-sel PMN ini berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat setelah hari ketiga (Nugroho, 2005).

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag yang muncul pada 48 – 96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke 3. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi dan terbentuk karena proses kemotaksis serta migrasi. Makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap berada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Peningkatan jumlah makrofag ini akan disertai pula peningkatan jumlah fibroblas. Sesudah makrofag, akan muncul limfosit T dengan jumlah yang bermakna pada hari ke 5 dengan puncaknya pada hari ke 7. Keberadaan makrofag dan limfosit T sangat

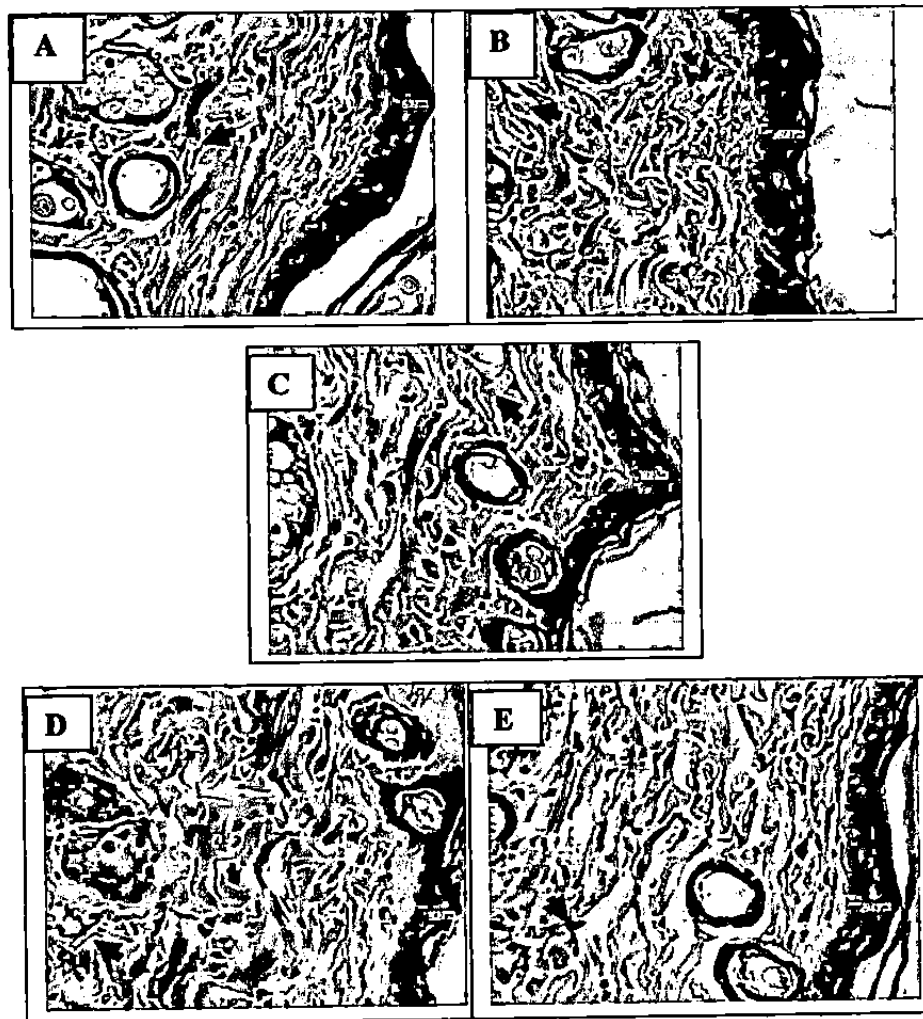
penting pada penyembuhan luka normal. Makrofag seperti halnya netrofil, memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Makrofag juga melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain yang mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi. Zat yang berfungsi sebagai transmittor interseluler ini secara keseluruhan disebut sitokin. Salah satu sitokin yang disekresi pada proses ini adalah TGF β . Migrasi dan proliferasi fibroblas dapat terjadi terutama dipacu oleh sitokin ini (Prabakti, 2005).

Proses yang terjadi selanjutnya adalah pembentukan jaringan granulasi. Pembentukan jaringan granulasi pada luka dimulai setelah luka dibersihkan dari jaringan mati dan sisa material yang tidak berguna. Jaringan granulasi merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi, yang bersamaan dengan timbulnya kapiler baru tertanam dalam jaringan longgar ekstraseluler dari matriks kolagen, fibronektin, dan asam hialuronik. Fibroblas muncul pertama kali secara bermakna pada hari ke 3 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Fibroblas ini berasal dari sel-sel mesenkimal lokal, terutama yang berhubungan dengan lapisan adventisia. Pertumbuhannya disebabkan oleh sitokin yang diproduksi makrofag dan limfosit. Fibroblas merupakan elemen utama pada proses perbaikan untuk pembentukan protein struktural yang berperan dalam pembentukan jaringan. Fibroblas juga memproduksi kolagen (glikoprotein berantai tripel) dalam jumlah besar yang merupakan unsur utama matriks ekstraseluler untuk membentuk kekuatan jaringan

parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke-3 luka, meningkat sampai minggu ke 3. Fibroblas juga menghasilkan matriks fibronectin, asam hialoronik dan glikos aminoglikan (GAG) (Nugroho, 2005).

Segera setelah matriks ekstrasel terbentuk, dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronectin. Hal ini tidak hanya menghasilkan migrasi sel substratum dan pertumbuhan sel ke dalam, tetapi juga menyebabkan penumpukan kolagen oleh fibroblas. Terbentuknya asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar berperan dalam pembentukan matriks ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Akibat kerangka bentuk asam hialuronat yang mengandung banyak air ini, asam hialuronat menyediakan matriks yang meningkatkan migrasi sel. Saat fibroblas memasuki dan mengisi luka, mereka menggunakan hialuronidase untuk mendigesti matriks sementara yang kaya akan asam hialuronat dan kemudian menimbun lebih banyak GAG. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentukan matriks. Serabut kolagen pada permulaan terdistribusi acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel-bundel fibril yang secara perlahan menyebabkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan dan kekuatan ketegangan. Sesudah 5 hari periode jeda, dimana saat ini bersesuaian dengan pembentukan jaringan granulasi awal dengan matriks sebagian besar tersusun dari fibronectin dan asam hialuronidase, terjadi peningkatan cepat dari kelentaran jaringan karena fibrogenesis

Fibroblas merupakan penghasil utama kolagen. Fibroblas menghasilkan molekul prekolagen interseluler yang disebut tropokolagen pada batas membran ribosom, membungkus prokolagen ke dalam vesikel sekretorik di apparatus golgi, dan kemudian mengeluarkannya menembus membran ke dalam ruang ekstraseluler dimana kolagen yang dihasilkan merupakan matriks yang dibutuhkan pada fase remodeling atau maturasi (Prabakti, 2005).



Gambar 10. Gambar Histologi Fibroblas (HE): A. Krim Madu; B. Kontrol; C. Krim Probiotik; D. Krim Probiotik; E. Krim Probiotik

Hasil penghitungan jumlah fibroblas pada penelitian ini didapat bahwa kelompok tikus dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis menunjukkan hasil penyembuhan luka paling baik dengan parameter berupa jumlah fibroblas terhitung memiliki hasil paling sedikit disaat berada pada fase maturasi. Kelompok ini diketahui menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok tikus dengan terapi krim madu, kontrol negatif (basis krim), dan kontrol positif (*Povidone iodine*). Akan tetapi kelompok tikus dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis ini tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok tikus dengan terapi krim propolis.

Madu mengandung katalase dan flavonoid yang memberikan efek antioksidan sebagai proteksi. Efek proteksi antioksidan dari flavonoid inilah yang sangat penting untuk pertumbuhan sel seperti stimulasi angiogenesis dan pertumbuhan fibroblas karena akan meningkatkan nutrisi untuk daerah luka (Januarsih & Atik, 2010).

Madu merupakan larutan yang mengalami supersaturasi dengan kandungan gula yang tinggi dan mempunyai interaksi kuat dengan molekul air (berosmolaritas tinggi/hiperosmotik). Apabila terjadi kontak dengan cairan luka, cairan luka akan terlarut akibat kandungan gula yang tinggi pada madu, sehingga luka menjadi lembab dan hal ini akan memudahkan terjadinya proses granulasi yang berarti akan mempercepat

2011). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, ketika kerja makrofag meningkat, maka akan memicu sekresi TGF β yang selanjutnya menyebabkan meningkatnya proliferasi dan migrasi fibroblas (Masli, 2005).

Selain flavonid dan asam phenolat, propolis memiliki komponen bahan bioaktif CAPE (*Caffeid Acid Phenethyl Ester*) yang mempunyai peranan dalam penanggulangan inflamasi, antioksidan, antibakteri, antivirus, immunomodulator serta merangsang penyembuhan jaringan. CAPE akan menstimulasi produk TGF- β 1 dimana diketahui bahwa TGF- β 1 adalah molekul fisiologis yang multipoten, bersifat meregulasi pertumbuhan dan perkembangan juga menginduksi penyembuhan luka dan regenerasi jaringan (Adi, *et al.*, 2013). TGF- β 1 merupakan anggota utama TGF β . Pada sel epitel dan fibroblas misalnya, TGF β tidak hanya menginduksi ekspresi protein matriks ekstraseluler (misalnya kolagen), tetapi juga ekspresi protein yang menghambat serum protease (Rifa'i, 2009).

Olczyk P., *et al.* (2013) menyatakan propolis mengandung glikoprotein seperti vitronectin dan laminin serta glikosaminoglikan seperti heparin sulfat. Glikoprotein dan glikosaminoglikan yang terkandung dalam propolis dapat membantu penyembuhan jaringan luka

..... memberikan energi terhadap makrofag untuk menginduksi

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kesembuhan luka pada kelompok yang diberi terapi obat standar (*Povidone iodine*) memberikan hasil kesembuhan kurang baik jika dibandingkan kelompok dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis dilihat secara mikroskopik. Hal ini dapat dilihat dari kelompok terapi *Povidone iodine* memiliki jumlah fibroblas lebih banyak disaat penyembuhan berada pada fase maturasi akhir atau penyempurnaan dimana jumlah fibroblas mulai berkurang (Junqueira, 2007). WHO tidak menyarankan penggunaan *Povidone iodine* pada luka bersih seperti luka hasil pembedahan dan luka kronis. Hal ini disebabkan *Povidone iodine* bersifat toksik yang dapat merusak perkembangan jaringan baru (WHO, 2010).

Prabakti, (2005) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa dalam penyembuhan luka, terdapat sejumlah faktor yang mempengaruhi, antara lain:

Faktor sistemik:

1. Nutrisi, pengaruhnya sangat menonjol. Defisiensi protein dan vitamin mengganggu sintesa kolagen dan memperlama penyembuhan.
2. Status metabolic
3. Status sirkulasi darah.
4. Hormon glukokortikoid mempunyai pengaruh anti-inflamasi, dapat mempengaruhi komponen inflamasi dan fibroplasia, sehingga dapat mengganggu sintesa kolagen

Faktor lokal:

1. Infeksi, merupakan penyebab tunggal keterlambatan penyembuhan.
2. Faktor mekanik misal mobilisasi awal, memperlambat penyembuhan.
3. Benda asing seperti benang yang tidak teresorpsi, pecahan tulang, dll, merupakan halangan untuk penyembuhan luka.
4. Macam, lokasi dan ukuran besarnya luka, mempengaruhi penyembuhan.

Daerah perlukaan juga mempengaruhi kecepatan penyembuhan luka. Contohnya perlukaan di daerah wajah lebih cepat sembuh daripada kaki, karena wajah kaya akan vaskularisasi. Luka kecil karena trauma lebih cepat sembuh daripada yang besar (Prabakti, 2005).

Banyak faktor yang menyebabkan perbedaan kecepatan penyembuhan pada setiap kelompok. Salah satu faktor yang berpengaruh penting adalah mobilisasi hewan uji. Pergerakan (mobilitas) dan perilaku hewan uji sebagai respon terhadap terapi yang diberikan sangat mempengaruhi hasil pengobatan. Berdasarkan pengamatan peneliti, terdapat respon tikus terhadap terapi yang diberikan, yakni tikus berusaha menjilati krim yang menempel pada luka. Sedangkan pada kelompok terapi *Povidone iodine*, tidak ada tikus yang tampak menjilati luka ketika terapi diberikan. Hal ini dapat memberi efek pada penyerapan terapi yang