

-  [Dashboard](#)
-  [Explore SINTA](#)
-  [Mutation History](#)
-  [List Verificator PT](#)
-  [My SINTA](#)
-  [Covid-19](#)

DETAIL DOCUMENT

Research

Detail Research

Verified by Maria Dwi Budi Jumpowati at 2022-08-16 09:37:33

NIDN Leader 0520077201		Leader Name SRI HARTATI YULIANI	
PDDIKTI Code PT (Leader) 051012		Institution (Leader) UNIVERSITAS SANATA DHARMA	
Title PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK TEMPE TERHADAP EKSPRESI KOLAGEN PADA PROSES PENYEMBUHAN LUKA TIKUS TERINDUKSI STREPTOZOTOCIN			
Skema Abbreviation UMUM/REGULER		Skema Name UMUM/REGULER	
The First year of the proposal <i>Tahun Pertama Usulan</i> 2019		Proposed Year of Activities <i>Tahun Usulan Kegiatan</i> 2019	The Year of The Activity <i>Tahun Pelaksanaan Kegiatan</i> 2019
			Duration of activity <i>Lama Kegiatan</i> 1 Year
Proposal Status DIDANAI		Funds are approved Rp. 15.000.000,-	
SINTA Afiliasi ID 422		Funds Institution UNIVERSITAS SANATA DHARMA ✔ in sync with Sinta Affiliation	
Target TKT TKT 2		Hibah Program PENELITIAN INTERNAL	
Focus Area FARMASI			
Fund Source Category INSTITUSI INTERNAL		Fund Source INTERNAL PT	
Country Fund Source ID			
Research Member SRI HARTATI YULIANI <i>Registered in Sinta using SRI HARTATI YULIANI (Sinta ID : 5977336)</i> Status : Leader (Leader) Universitas Sanata Dharma			



UNIVERSITAS SANATA DHARMA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

MRICAN, TROMOL POS 29 YOGYAKARTA 55002

TELP.(0274)513301, 515352 EXT.1526,1527, FAX. (0274)562383 - TELEGRAM : SADHAR YOGYA Rek. a/n Lembaga Penelitian No. 287 01 00277005 CIMB Niaga

SURAT PERJANJIAN
PELAKSANAAN PROGRAM PENELITIAN INTERNAL REGULER TAHUN 2019
UNIVERSITAS SANATA DHARMA-YOGYAKARTA
TAHUN 2019
No: 019 / Penel./LPPM-USD/III/2018

Pada hari ini, Senin tanggal 11 bulan Maret tahun 2019, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

No	Nama	Status
1	Dr. rer. nat. Herry Pribawanto Suryawan	Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Sanata Dharma (LPPM-USD) Yogyakarta, yang selanjutnya dalam Surat Perjanjian ini disebut sebagai PIHAK PERTAMA
2	Dr. Sri Hartati Yuliani, M.Si., Apt	Dosen Tetap Universitas Sanata Dharma, pengusul dan pelaksana Penelitian Internal Reguler Universitas Sanata Tahun 2019 yang selanjutnya dalam surat perjanjian ini disebut sebagai PIHAK KEDUA

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA** secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Penelitian Internal Reguler Universitas Sanata Dharma Tahun 2019 dengan ketentuan dan syarat-syarat yang diatur dalam pasal-pasal sebagai berikut:

PASAL 1

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA** untuk melaksanakan Penelitian Internal Universitas Sanata Dharma Tahun 2019 yang berjudul :

Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Tempe Terhadap Ekspresi Kolagen Pada Proses Penyembuhan Luka Tikus Terinduksi Streptozotocin

- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan, administrasi, dan keuangan atas pekerjaan sebagai dimaksud pada ayat (1).
(3) Pelaksanaan Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) didanai oleh Universitas Sanata Dharma Pos Anggaran LPPM USD.

PASAL 2

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberikan dana untuk kegiatan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 kepada **PIHAK KEDUA** sebesar :

Rp. 15.000.000 (Lima belas juta rupiah)

- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
- Pembayaran tahap pertama, sebesar 50% (lima puluh persen), dibayarkan setelah perjanjian ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
 - Pembayaran tahap kedua, sebesar 50% (lima puluh persen), dibayarkan setelah **PIHAK KEDUA** menyerahkan Laporan Akhir Hasil Penelitian, Luaran Penelitian (artikel ilmiah

yang telah terbit), dan Laporan Keuangan (Penggunaan Dana Penelitian) kepada **PIHAK PERTAMA** paling lambat 29 November 2019.

- c) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab dalam pembelanjaan dana tersebut pada ayat (1) dan berkewajiban untuk menyerahkan semua bukti-bukti pengeluaran sesuai jumlah dana yang diterima oleh **PIHAK PERTAMA**.

PASAL 3

Dana Penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) dibayarkan kepada **PIHAK KEDUA** melalui rekening yang diajukan dan atas nama **PIHAK KEDUA**.

PASAL 4

- (1) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan penelitian sesuai judul yang diajukan sebagaimana dimaksudkan pada Pasal 1 ayat (1).
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menindaklanjuti hasil penelitiannya untuk memperoleh paten dan/ atau publikasi ilmiah dalam jurnal nasional/internasional dan/atau teknologi tepat guna atau rekayasa sosial dan/atau buku ajar dan/atau modul.
- (3) Perolehan/luaran penelitian seperti dimaksud pada ayat (2) dimanfaatkan sebesar-besarnya untuk pelaksanaan Tri Dharma Perguruan Tinggi.

PASAL 5

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan Laporan Hasil Penelitian, Luaran Penelitian (Paling tidak draf finalnya), dan Laporan Keuangan (Penggunaan Dana Penelitian) dalam bentuk *Softcopy pdf* dan *hardcopy* kepada **PIHAK PERTAMA** selambat-lambatnya pada tanggal 29 November 2019.
- (2) Laporan Hasil Penelitian yang harus diserahkan **PIHAK KEDUA** kepada **PIHAK PERTAMA** sebagaimana dimaksud pada ayat (1) sebanyak 1 (satu) eksemplar *hardcopy* dan 1 (satu) naskah *softcopy pdf* pada keping CD dan diunggah di SIA Dosen.
- (3) Format dan sistematika Laporan Hasil Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) mengikuti aturan yang tertuang dalam *Buku Panduan Penelitian LPPM USD 2019*.
- (4) Apabila sampai batas waktu habisnya masa penelitian ini **PIHAK KEDUA** belum menyerahkan laporan/dokumen sebagaimana dimaksud pada ayat (1), maka **PIHAK KEDUA** akan mendapat teguran dari **PIHAK PERTAMA** untuk segera memenuhi kewajibannya menyelesaikan pekerjaan dalam tenggang perpanjangan waktu paling lama 1 (satu) bulan.
- (5) Apabila sampai batas waktu habisnya masa perpanjangan sebagaimana dimaksud pada ayat (2) **PIHAK KEDUA** belum juga menyerahkan laporan / dokumen sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dan tidak ada niat menyelesaikan pekerjaan, maka **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengembalikan dana penelitian yang telah diterimanya kepada Universitas Sanata Dharma.

PASAL 6

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa judul penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 dijumpai adanya indikasi duplikasi dengan penelitian lain dan/atau diperoleh indikasi ketidakjujuran/itikad kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka kegiatan penelitian tersebut dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima ke Kas Universitas Sanata Dharma.

PASAL 7

Hal-hal dan/atau segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggungjawab **PIHAK KEDUA** dan harus dibayarkan ke Universitas Sanata Dharma sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

PASAL 8

Hak atas kekayaan intelektual yang dihasilkan dari pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan yang berlaku.

PASAL 9

- (1) Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini, maka akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah; apabila jalan musyawarah tidak tercapai, maka Pengadilan Negeri Yogyakarta akan dipilih untuk menyelesaikannya.
- (2) Hal-hal yang belum diatur dalam perjanjian ini diatur kemudian oleh kedua belah pihak secara musyawarah.

Surat Perjanjian Pelaksanaan Program Penelitian Internal Reguler Universitas Sanata Tahun 2019 ini dibuat rangkap 2 (dua) dan bermaterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

PIHAK PERTAMA Ketua LPPM Univ. Sanata Dharma  <u>Dr. rer.nat. Herry Pribawanto Suryawan</u> P.2236	PIHAK KEDUA Ketua Pelaksanaan Penelitian  <u>Dr. Sri Hartati Yuliani, M.Si., Apt.</u> P.1828
--	--

LAPORAN PENELITIAN

Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Tempe Terhadap Ekspresi Kolagen Pada Proses
Penyembuhan Luka Tikus Terinduksi Streptozotocin

**Diajukan kepada
Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Sanata Dharma**



Diajukan oleh:
Dr. Sri Hartati Yuliani., M.Si., Apt.

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2019**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN

1	Penelitian	
	a	Judul Penelitian
	b	Bidang Ilmu
	c	Kategori Penelitian
2	Ketua Peneliti	
	a	Nama Lengkap
	b	Jenis Kelamin
	c	NIP/NIDN
	d	Pangkat/Golongan
	e	Jabatan Fungsional
	f	Program Studi/Fakultas
3	Lokasi Penelitian	
4	Institusi Mitra (bila ada)	
5	Jangka Waktu Penelitian	
6	Biaya yang diusulkan	
	a	Sumber dari USD
	b	Sumber lain (pribadi)
	c	Jumlah

Mengetahui
Kaprosdi Magister Farmasi

(Enade Perdana I., Ph.D., Apt)

Yogyakarta, 14 Agustus 2019
Ketua Peneliti

(Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt)

Mengetahui dan Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi

(Dr. Yustina Sri Hartini, M.Si., Apt)

Ketua LPPM

(Dr. Ret. Nat. Herry P. Suryawan)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena kasih karunia-Nya maka penelitian ini boleh selesai dengan tepat waktu. Banyak sekali hambatan yang dialami selama penelitian terutama pemesanan bahan yang cukup lama. Tetapi karena kasih karunia Tuhan semua dapat diatasi dengan baik.

Penelitian ini diharapkan akan dapat diaplikasikan sebagai salah satu parameter penyembuhan luka dengan perhitungan kuantitatif kolagen yang terbentuk dalam proses penyembuhan luka pada umumnya dan luka pada penderita diabetes pada khususnya. Selain dana dari LPPM-USD, penelitian ini juga didanai oleh DRPM Dikti melalui skema penelitian Tesis Magister.

Akhir kata, tiada gading yang tak retak, ada kelemahan dalam penelitian ini saran untuk kebaikan dan pengembangan penelitian ini sangat diharapkan.

Yogyakarta, 12 Agustus 2019
Peneliti,

Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	2
KATA PENGANTAR	3
DAFTAR ISI.....	4
DAFTAR TABEL	5
DAFTAR GAMBAR	6
INTISARI.....	7
ABSTRACT	8
BAB I. PENDAHULUAN	9
I.1. Latar Belakang.....	9
I.2. Rumusan Masalah.....	10
I.3. Tujuan Penelitian	10
I.4. Manfaat Penelitian	10
BAB II. KAJIAN TEORI.....	11
II.1. State of the Art.....	11
II.2. Luka	12
II.3. Luka diabetes.....	13
II.4. Genistein	14
II.5. Sediaan penyembuh luka.....	14
II.6. Landasan Teori	15
BAB III. METODOLOGI.....	16
III.1. Variabel Penelitian	16
III.2. Alat dan Bahan	16
III.3. Cara Kerja	17
III.4. Analisis Data	20
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	20
BAB V. PENUTUP.....	25
UCAPAN TERIMA KASIH.....	25
DAFTAR PUSTAKA	25

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Formula Gel Ekstrak Tempe	17
Tabel 2. Hasil penutupan luka, sintesis kolagen, epitelisasi dan kapilarisasi	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambaran mikroskopik epitelisasi pada setiap kelompok.	23
Gambar 2. Gambaran mikroskopik kapilarisasi setiap kelompok.	23
Gambar 3. Gambaran mikroskopik kolagen pada setiap kelompok	24

INTISARI

Tikus yang terinduksi Streptozotocin (STZ) akan rusak pankreas dan menyebabkan kadar gula darah tikus tinggi (dalam kondisi diabetes). Kondisi diabetes akan mengakibatkan proses penyembuhan luka menjadi lama (kronis). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian gel yang mengandung ekstrak tempe terstandar genistein dalam proses penyembuhan luka pada tikus terinduksi STZ terhadap pembentukan serat-serat kolagen. Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan uji tikus (Wistar) jantan, dengan umur 8 minggu, dengan bobot rata-rata 250-300g. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah pengukuran jumlah serat-serat kolagen yang terbentuk pada tahap awal proses penyembuhan luka pada kondisi diabet. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan korelasi pembentukan serat-serat kolagen pada tahap awal penyembuhan luka dengan pemberian gel ekstrak tempe secara topikal pada tikus terinduksi STZ terhadap mekanisme penyembuhan luka.

Hasil pengujian penutupan luka menggunakan perlakuan basis gel, gel ekstrak tempe 2,5%, gel ekstrak tempe 5%, gel ekstrak tempe 7,5% dan tanpa perlakuan, mengindikasikan kelompok perlakuan gel ekstrak tempe 5% dan 7,5% berpengaruh signifikan dalam penyembuhan luka diabetes pada hewan uji. Indikasi ini diperkuat dengan hasil uji statistik kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan gel ekstrak tempe 5% dan 7,5% berbeda signifikan dalam mempengaruhi respon penutupan luka, epitelisasi dan pembentukan kolagen. Hasil uji statistik kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan basis gel tanpa ekstrak dan gel ekstrak tempe 2,5% menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dalam mempengaruhi respon penutupan luka, epitelisasi dan pembentukan kolagen. Hasil uji statistik respon kapilarisasi mengindikasikan hasil yang tidak berbeda signifikan dari semua kelompok perlakuan.

Kata kunci: penyembuhan luka, tikus terinduksi STZ, ekstrak tempe, serat kolagen

ABSTRACT

Streptozotocin-induced rat (STZ) will cause its pancreas damage and increase rat blood sugar levels (in a diabetic condition). The condition of diabetes makes the process of wound healing becomes longer. The purpose of this study was to determine the effect of giving a gel containing genistein standardized tempe extract in the wound healing process in STZ induced mice on the formation of collagen fibers. The study was an experimental study using male Wistar test animals, with an age of 8 weeks, with an average weight of 250-300g. The parameter measured in this study is the measurement of the amount of collagen fibers formed in the early stages of the wound healing process in diabetes conditions. This research is expected to provide a correlation of the formation of collagen fibers in the early stages of wound healing by giving topical tempe extract gel to STZ induced mice on wound healing mechanisms.

The results of testing the wound closure using a base gel treatment, tempeh extract gel 2.5%, tempeh extract gel 5%, tempeh extract gel 7.5% and without treatment, indicated the treatment group tempeh extract gel 5% and 7.5% have a significant effect on diabetes wound healing in test animals. This indication is strengthened by the results of the non-treatment group statistical test with the 5% and 7.5% tempeh extract gel treatment groups significantly difference in influencing the wound closure response, epithelialization and collagen formation in tissue. The results of the statistical treatment group without treatment with the base treatment group without extract gel and tempeh extract gel 2.5% showed no significant difference in influencing the wound closure response, epithelialization and collagen formation. Statistical test results of capillarization responses indicated the results were not significantly difference from all treatment groups.

Keywords: wound healing, Streptozotocin-induced rat, tempe extract, collagen fiber

BAB I. PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik menahun dimana pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Kondisi ini dapat memicu terjadinya peningkatan konsentrasi glukosa di dalam darah (hiperglikemia). Penderita DM membutuhkan waktu yang lama dalam menyembuhkan luka (Falanga, 2004). Diabetes mellitus juga dikaitkan dengan kerusakan sel yang mencegah fibroblast membentuk matriks ekstraseluler dan keratinosit yang adekuat untuk epitelisasi luka (Hamed et al., 2014). Kondisi penyembuhan luka yang kronis juga memicu munculnya infeksi lebih lanjut (Sharp and Clark, 2011).

Pemicu lamanya proses penyembuhan luka pada kondisi diabetes adalah lambatnya rekrutmen netrofil pada area luka karena aliran darah yang sedikit pada kulit. Aliran darah yang sedikit pada kondisi diabetes menyebabkan kerja netrofil dan makrofag tidak efektif sehingga fase inflamasi menjadi lama. Pada fase proliferasi terjadi perlambatan deposit kolagen dan aktivitas fibroblas yang memperlambat proses penyembuhan luka (Sharp and Clark, 2011).

Sediaan gel yang diberikan secara topikal memberikan beberapa keuntungan, diantaranya adalah mampu menjaga kelembaban pada area luka, tidak toksis, mudah dibersihkan dan tidak dapat ditembus oleh bakteri. Selain itu sediaan gel terasa dingin saat dioleskan sehingga memberikan rasa nyaman pada penderita. Kelembaban sediaan gel akan membantu mempercepat proses penyembuhan luka. Proses pertukaran udara dan uap air pada luka diharapkan terjadi dalam penggunaan gel tersebut. Sifat-sifat gel tersebut diharapkan dapat mempercepat pertumbuhan jaringan baru dan proses rekonstruksi sehingga proses penyembuhan luka berlangsung lebih cepat (Gupta et al., 2011).

Genistein dapat digunakan untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Pemberian secara peroral genistein pada hewan uji mencit terbukti dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan mempercepat berakhirnya fase inflamasi (Park et al., 2011). Genistein yang diberikan secara subkutan pada mencit terbukti dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru pada area luka

sehingga mempercepat proses penyembuhan luka (Tie et al., 2013). Mencit terinduksi STZ yang mendapat asupan genistein pada pakan terbukti sembuh lebih cepat dibanding tanpa asupan genistein (Eo et al., 2015). Genistein diketahui bekerja pada MMP9 yang berperan dalam proses proliferasi jaringan kulit. Tempe digunakan sebagai sumber genistein karena proses fermentasi pada tempe akan meningkatkan jumlah genistein (Yuliani et al., 2018).

Penelitian ini akan mempelajari mengenai pemberian gel ekstrak tempe terstandar genisten secara topikal terhadap proses deposit kolagen yang menandai proses proliferasi pada penyembuhan luka tikus terinduksi STZ. Diharapkan dengan penggunaan gel yang mengandung ekstrak tempe maka deposit kolagen pada luka tikus terinduksi STZ akan meningkat dan proses penyembuhan luka menjadi lebih cepat. Penelitian ini sesuai dengan topik penelitian farmasi dalam Rencana Induk Penelitian 2016-2020 yaitu “Penyakit Degeneratif, Penyalit Kanker dan Obat Bahan Alam” lebih spesifik pada tema “Desain Obat Penyembuh Luka Secara Komputasi, Penapisan Maya Senyawa Kimia Alami, Derivatisasi dan Sintesis, Uji *in vitro* Ekstrak Tumbuhan/Senyawa Derivat, Formulasi dan uji *in vivo* Ekstrak Tumbuhan/Senyawa Derivat “

I.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian sediaan gel ekstrak tempe terstandar genistein akan mempercepat pembentukan serat kolagen pada luka tikus terinduksi STZ?

I.3. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efek pemberian sediaan gel ekstrak tempe terstandar genistein terhadap pembentukan serat kolagen pada luka tikus terinduksi STZ.

I.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya yang penyembuhan luka diabetes dan pembentukan serat-serat kolagen dengan pemberian ekstrak tempe secara topikal pada tikus diabetes. Penelitian ini juga dapat digunakan sebagai acuan bagi penelitian selanjutnya. Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan secara ilmiah pengaruh pemberian sediaan gel ekstrak tempe secara topikal untuk mempercepat penyembuhan luka pada kondisi diabetes.

BAB II. KAJIAN TEORI

II.1. State of the Art

Penggunaan sediaan bahan alam dalam penyembuhan luka diabetes sudah banyak diteliti. Flavonoid yang terkandung dalam tanaman *Marynia annua* Lin dan *Tephrosia purpurea* Linn telah terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetes dengan mekanisme menangkap radikal (Lodhi and Singhai, 2013), menginduksi pembentukan angiogenesis dan menaikkan level proein dan enzim (Lodhi et al., 2013). Saponin dari tanaman *Panax notoginseng* yaitu notoginsenosida mempunyai aktivitas menaikkan agregasi platelet, proliferasi fibroblast, meningkatkan angiogenesis dan memperingan inflamasi (Zhang et al., 2016). Aktivitas notoginsenosida tersebut terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetes. Tanaman *Centella asiatica* diketahui mengandung triterpenoid yang mempunyai aktivitas meningkatkan epiteliasi, produksi kolagen, menurunkan MMPs dan menghambat produksi nitrit oksida. Aktivitas tersebut dapat mempercepat penyembuhan luka diabetes (Mahmood et al., 2016). Senyawa fenolik dari tanaman *Catharanthus roseus* L mempunyai aktivitas mempercepat penyembuhan luka diabetes dengan mekanisme meningkatkan produksi kolagen dan antioksidan (Singh et al., 2014).

Genistein, suatu isoflavon yang terkandung dalam kedelai, mempunyai aktivitas biologis sebagai anti-inflamasi melalui penghambatan COX-2 (Song et al., 2003), menekan pelepasan interleukin 1- β (Sutrisno et al., 2014), memperbaiki enzim anti-oksidan (Valsecchi et al., 2011), merangsang pelepasan asam hialuronat yang merupakan bahan baku penting dalam proses regenerasi kulit (Miyazaki et al., 2002), dan menurunkan stress oksidasi⁹. Selain itu genistein mampu merangsang proses angiogenesis dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Wiegler et al., 1993). Aktivitas biologis yang dipunyai oleh genistein tersebut membuat genistein sangat berpotensi dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetes. Tempe merupakan hasil fermentasi kedelai. Fermentasi terbukti menaikkan kandungan isoflavon kedelai termasuk diantaranya genistein (Chaiyasut et al., 2010; Hong et al., 2012).

Pemberian secara oral genistein telah terbukti dapat mempercepat penyembuhan luka diabetes dengan mempercepat fase inflamasi dan merangsang pembentukan sel baru (Park et al, 2011). Pembentukan kulit dalam proses penyembuhan luka ditandai dengan terbentuknya serat kolagen pada fase proliferasi. **Dalam penelitian ini akan dilihat efek pemberian genistein secara topikal melalui pemberian gel ekstrak tempe terstandar genistein terhadap pembentukan serat kolagen.**

II.2. Luka

Luka didefinisikan sebagai kerusakan atau gangguan pada struktur dan fungsi anatomi normal (Velmar et al., 2009). Proses penyembuhan luka adalah respon fisiologis normal terhadap cedera yang terjadi dan umumnya mengarah pada pemulihan struktur dan fungsi normal pada jaringan yang rusak (Barati et al., 2013). Terdapat empat fase dalam proses penyembuhan luka yaitu haemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling* (Young and McNaught, 2011).

Fase haemostasis atau tahap koagulasi terjadi segera setelah terjadi luka. Pada fase ini terjadi vasokonstriksi untuk mengurangi hilangnya darah. Trombosit akan datang dan menempel pada dinding pembuluh darah yang terluka untuk melepaskan *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor-beta* (TGF- β), sehingga terjadi agregasi platelet dan koagulasi, yang menyebabkan pembentukan bekuan fibrin (Beldon, 2010). Fase selanjutnya adalah inflamasi, dimana neutrofil dan makrofag akan dikeluarkan. Pada fase ini terjadi fagositosis jaringan tidak berguna dan mikroorganisme asing pada luka (Hamed *et al.*, 2014).

Fase inflamasi merupakan fase penentu dalam keberhasilan proses penyembuhan luka. Pada fase ini neutrofil dan makrofag terlibat dalam penyembuhan luka. Makrofag merangsang pembentukan sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α . TNF- α terlibat secara erat dalam gangguan penyembuhan luka. Apoptosis fibroblast dapat terjadi dengan adanya induksi oleh TNF- α . Peningkatan TNF- α pada kondisi kronis dapat menyebabkan kegagalan dalam proses penyembuhan luka dan menurunkan produksi kolagen pada luka (Dong et al., 2016).

Pada fase proliferasi, terjadi perbanyakan sel endotelial, deposisi dan sintesis matriks ekstraseluler serta pembentukan jaringan granulasi dan kolagen. Fase ini dipengaruhi oleh MMP, TGF- β , *epidermal growth factor* (EGF), dan interleukin-1 (Greaves et al., 2013). Fase terakhir yaitu *remodelling*, pada fase ini proses inflamasi telah berhenti, dilanjutkan dengan proses pembentukan bekas luka, pemulihan morfologi jaringan normal, dan pengaturan kembali matriks kolagen pada kulit. Pada fase ini juga terjadi apoptosis yaitu penghilangan sel yang tidak lagi dibutuhkan (Hamed *et al.*, 2014).

II.3. Luka diabetes

Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan orang normal. Pada penderita DM proses penyembuhan luka melibatkan stress oksidatif yang menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan jaringan (Teoh et al., 2009). Kondisi hiperglikemia akan mencegah fibroblast membentuk matriks ekstraseluler dan keratinosit dalam jumlah yang memadai untuk epitelisasi luka. Selain itu, intensitas dan durasi respon inflamasi pada penderita DM juga meningkat (Hamed *et al.*, 2014), penurunan formasi granulasi jaringan dan terganggunya angiogenesis (Cianfarani et al., 2006). Pasien diabetes juga memiliki komplikasi mayor berupa perlambatan proses penyembuhan luka yang disebabkan oleh meningkatnya apoptosis, infiltrasi selular yang tertunda, penurunan angiogenesis, dan penurunan pembentukan dan pengaturan dari jaringan kolagen (Asai et al., 2012). Abnormalitas seluler lain yang muncul pada penderita diabetes diantaranya makrofag pada penderita diabetes memperlihatkan peningkatan TNF- α , interleukin 1 β dan penurunan VEGF (Zykova et al., 2000). Dengan demikian luka pada penderita diabetes mellitus merupakan permasalahan yang serius, karena membutuhkan perawatan yang lama dan dapat menyebabkan amputasi (Falanga, 2005).

TNF- α meningkat secara signifikan mulai hari ke 5 setelah terbentuknya luka. Kondisi ini menyebabkan terjadinya inflamasi yang berkepanjangan pada kondisi diabetes. Jumlah TNF- α akan terjaga tetap tinggi selama fase inflamasi belum berakhir. Over produksi TNF- α dari makrofag ini yang dapat menggagalkan

proses penyembuhan luka, dengan cara menurunkan jumlah fibroblast dan pembentukan kolagen (Dong et al., 2016).

II.4. Genistein

Tempe adalah kedelai yang terfermentasi. Sebagai sumber genistein dipilih tempe karena fermentasi terbukti meningkatkan jumlah genistein pada kedelai (Yuliani et al., 2018). Genistein dan daidzein merupakan salah satu isoflavon utama kedelai (Rostagno et al., 2007). Kelarutan isoflavon dipengaruhi oleh pH. Pada pH 4 – 6 kelarutan isoflavon lebih rendah dibandingkan kelarutannya pada pH 7 (Barbosa et al., 2006). Kelarutan genistein pada media air adalah 3×10^{-6} M (Stancanelli et al., 2007). Log P, ukuran hidrofobisitas senyawa, genistein mempunyai Log P sebesar 2,09 (Nakada et al., 2009). Degradasi senyawa isoflavon dipengaruhi oleh pH lingkungan (Chadha et al., 2011) dan panas (Stintzing et al., 2006). Genistein stabil pada kondisi netral, dan tidak stabil baik pada kondisi asam maupun basa (Chadha et al., 2011). Genistein pada suhu 150 °C pH 3 akan terdegradasi sempurna selama 7 setelah pemanasan. Sedangkan pada kondisi netral baik genistein masih stabil selama 7 jam (Stintzing et al., 2006).

II.5. Sediaan penyembuh luka

Sediaan penyembuh luka terbuka harus steril (Moynihan and Crean, 2009). Sediaan penyembuh luka hendaknya lembab (Okan et al., 2007), mengabsorpsi dan menghilangkan eksudat, mengisolasi panas, mencegah kontaminasi, menyediakan lingkungan yang kondusif untuk membangun pertahanan alami tubuh. Keuntungan lingkungan yang lembab adalah mencegah dehidrasi dan kematian sel, mempercepat angiogenesis, meningkatkan pecahnya jaringan yang mati dan fibrin (Field and Kerstein, 1994).

Bahan penutup luka yang bersifat oklusif dapat meminimalkan jaringan nekrosis dengan mencegah pengeringan, membantu menghilangkan jaringan mati (*debridement*), dan membentuk barier melawan organisme patogen dari luar sehingga meminimalkan inflamasi yang terjadi (Davis et al., 1990). Penggunaan bahan yang lebih bisa menahan lembab akan meningkatkan lingkungan yang lebih suportif dibandingkan bahan yang tidak mampu menahan lembab (Eaglstien et al., 1988). Bahan yang mampu menahan lembab berhubungan dengan menurunnya

infeksi, pasien lebih nyaman dan mengurangi kejadian bekas luka (Campton-Johnston and Wilson, 2001). Gel dengan gelling agent turunan asam akrilat sangat sesuai digunakan sebagai sediaan penyembuh luka karena sifat-sifat yang dimilikinya.

II.6. Landasan Teori

Proses penyembuhan pada penderita diabetes berbeda dengan pasien normal (Falanga, 2005), termasuk tidak berfungsinya respon inflamasi, penurunan formasi granulasi jaringan dan terganggunya angiogenesis (Cianfarani et al., 2006). Fibroblast yang diisolasi dari luka diabetikum menunjukkan penurunan respon proliferaatif terhadap faktor pertumbuhan (Loots et al., 2002) diantaranya TGF β 1 (Hasan et al., 1997), platelet-derived growth factor, dan sitokin lain (Stanley et al., 1997). Abnormalitas seluler lain yang muncul pada penderita diabetes diantaranya makrofag pada penderita diabetes memperlihatkan penurunan TNF- α , interleukin 1 β dan VEGF (Zykova et al., 2000). Aktivasi berlebihan dari beberapa MMPs diantaranya MMP-9 dapat mengganggu migrasi sel dan menyebabkan pecahnya beberapa matriks protein dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka (Signorelli et al., 2005). **Senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan respon inflamasi, menaikkan formasi granulasi jaringan dan meningkatkan angiogenesis pada penderita diabetes akan dapat mempercepat proses penyembuhan luka diabetes.**

Genistein, suatu isoflavon dari kedelai, telah diteliti kemampuannya sebagai penyembuh luka (Miyazaki et al., 2002). Aktivitas biologis genistein dalam proses penyembuhan luka diantaranya mempunyai aktivitas anti-inflamasi melalui penghambatan COX-2 (Song et al., 2003), menekan pelepasan interleukin 1- β (Sutrisno et al., 2014), memperbaiki enzim anti-oksidan (Valsecchi et al., 2011), merangsang pelepasan asam hialuronat yang merupakan bahan baku penting dalam proses regenerasi kulit (Miyazaki et al., 2002), dan menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011). Genistein mempercepat proses penyembuhan luka diabetes karena kemampuannya dalam menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al.,

2013). **Genistein, kandungan aktif ekstrak tempe, sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum. Penelitian ini akan melihat kemampuan genistein dalam gel ekstrak tempe dalam mempengaruhi pembentukan serat kolagen yang menandakan fase terakhir proses penyembuhan luka.**

BAB III. METODOLOGI

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni.

III.1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : variasi kadar ekstrak tempe pada gel sebagai sediaan topikal penyembuh luka.
- b. Variabel tergantung : ukuran luka dan jumlah serat kolagen yang terbentuk pada jaringan.
- c. Variabel pengacau:
 - 1) Variabel pengacau terkendali : usia tikus, bobot tikus, prosedur perlakuan dan pengukuran, kondisi aplikasi sediaan pada luka, wadah penyimpanan sediaan.
 - 2) Variabel pengacau tak terkendali : kondisi ruangan saat perlakuan, suhu dan kelembaban udara saat aplikasi sediaan.

III.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, alat ukur kadar glukosa, tissue processor, hot Plate, staining Jar, microtome, incubator, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah carbopol, tri ethanol amin, gliserol, asam borat, kalium borat, ekstrak tempe, ethanol, air, streptozotocin, bufer sitrat, ketamin injeksi, xylen, parafin, pisau mikrotom, slide mikroskop, coverglass, netral buffer formalin 10%, mounting medium, cat Masson's trichrome.

III.3. Cara Kerja

a. Pembuatan Gel

Sebanyak 1 g carbopol dikembangkan dalam 50 ml air selama semalaman. Gliserol ditambahkan sebanyak 12,5 g, dicampur sampai homogen (campuran 1). Ke dalam 28 ml dilarutkan 0,5 g asam borat dan 0,2 g kalium borat kemudian ditambahkan ke dalam campuran 1 demi sedikit sampai homogen. Campuran di atas disteril dengan autoklaf pada 115 °C selama 30 menit. Campuran diambil yang telah steril dan dipindahkan ke *laminar air flow* (LAF). Campuran ditunggu sampai agak dingin dengan lampu UV dinyalakan (catatan: LAF dibersihkan dengan etanol 70% dan kemudian lampu UV dinyalakan 24 jam sebelum digunakan). Setelah dingin dicampurkan ekstrak dan atau etanol dan aduk sampai homogen. Gel dimasukkan ke dalam tube (catatan: tube sudah dicuci dengan etanol 70%).

Tabel 1 Formula Gel Ekstrak Tempe

Bahan yang digunakan	F1	F2	F3	Basis
Carbopol	1 g	1 g	1 g	1 g
Trietanol amin (TEA)	qs ad pH 7	qs ad pH 7	qs ad pH 7	qs ad pH 7
Gliserol	12,5 g	12,5 g	12,5 g	12,5 g
Asam Borat	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Kalium Borat	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Ekstrak tempe	2,5 ml	5 ml	7,5 ml	-
Etanol	5 ml	2,5 ml	-	7,5 ml
Air	78 ml	78 ml	78 ml	78 ml

b. Pengurusan etichal clearance.

Ethical clearance dilakukan di LPPT UGM sebelum perlakuan terhadap hewan uji.

c. Waktu dan tempat penelitian

Perlakuan hewan coba, pengambilan sampel darah dan jaringan dilakukan di laboratorium pusat pangan dan gizi sekolah pasca sarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pembuatan preparat histologi, pengecatan, dan pengamatan kolagen sampel dilakukan pada laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

d. Eksperimental animal model

Menggunakan tikus (*Wistar*) jantan, dengan umur 8 minggu, dengan bobot rata-rata 150-200g. Tikus di perlakukan dalam kandang individu, dengan kondisi kelembaban 50-60%, suhu ruangan 20-25 derajat Celcius. Tikus diberi pakan standar untuk perawatan tikus. Tikus tidak diberi makan selama 12 jam sebelum dilakukan induksi Streptozotocin. Induksi STZ (Streptozotocin) intra peritoneal diberikan dengan dosis 45 mg/kgBB yang sudah dilarutkan dalam *citrate buffer* (0,1M) pH 4,5. Setelah 4 hari darah diambil melalui ekor, dan diukur kadar glukosa darah dengan menggunakan rapid test. Kondisi diabetes tercapai jika kadar glukosa >250mg/dl (Mendes, 2012).

Pada hari ke-4 setelah induksi dengan menggunakan STZ tikus dibius dengan *ketamine hydrochloride* (25 mg/kgbb) melalui intramuscular. Bulu tikus dicukur pada bagian punggung dan dioleskan 10% *povidon iodine*. Setelah kering dilakukan *biopsy* pada jaringan kulit menggunakan *punch biopsy* dengan ukuran 5 mm pada punggung hewan coba melalui *Plexus Retroorbitalis*, sebanyak 1 ml. Pengambilan gambar dilakukan pada punggung hewan coba yang dilukai. Setelah satu jam kemudian, sediaan dioleskan pada jaringan luka. Pengolesan dilakukan sebanyak 2 kali sehari selama 14 hari. Pengambilan darah diulangi pada jam ke 24, 72 dan 120. Sampel darah diukur kadar glukosa menggunakan *rapid test (Accucheck)* setiap hari selama 14 hari. Sampel darah yang terkumpul dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Bagian supernatan (serum) diambil dan dilakukan aliquot dan simpan pada suhu -20°C

i. Pengukuran kadar glukosa darah.

Sampel darah diambil dari hewan coba dan ditetaskan kedalam strip glukosa (accuchek), kemudian dibaca dengan menggunakan alat. .

ii. Pembuatan sediaan blok paraffin.

Sampel jaringan luka pada kulit diambil pada hari ke 14. Pengambilan sampel kulit dilakukan dengan melakukan pembedahan pada tikus. Sampel yang didapatkan di rendam kedalam neutral buffer formalin 10% selama 24-48 jam. Untuk selanjutnya di dipotong, dimasukkan ke dalam *embedding cassette* dan di rendam dengan ethanol bertingkat 70%, 96% dan absolut

dengan durasi masing-masing 2 jam. Jaringan dipindahkan ke dalam *xylene* selama minimal satu jam, dan lakukan sebanyak dua kali. Pindahkan ke dalam liquid paraffin (titik lebur paraffin 60°C) selama satu jam, lakukan sebanyak dua kali. Jaringan sampel dibuat menjadi sediaan blok paraffin agar bisa dilakukan pemotongan tipis untuk dilanjutkan pada pemeriksaan mikroskopis.

iii. Pemotongan sampel.

Pemotongan jaringan sampel dilakukan dengan menggunakan *microtome*, dengan ketebalan kurang dari 5µm. Rentangkan hasil potongan diatas air didalam *waterbath* (50-60°C), dan lekatkan diatas slide mikroskop. Slide mikroskop kemudian diletakan diatas *hot plate* (56-65°C) selama kurang lebih 5 menit.

iv. Deparafinisasi

Slide mikroskop dengan potongan jaringan, dimasukkan kedalam xylene I selama 10 menit selanjutnya dipindahkan ke dalam xylene II dan didiamkan selama 10 menit. Dilanjutkan perendaman kedalam alkohol absolut selama 2 menit, dan diulangi tahap ini. Slide mikroskop dipindahkan kedalam alkohol 95% selama 2 menit, dilanjutkan kedalam alkohol 70% selama 2 menit dan dilanjutkan dengan pencucian dibawah air mengalir.

v. Pengecatan *Masson's Trichrome*.

Sampel jaringan kemudian diwarnai secara bertahap menggunakan *Weigert's iron* ditetaskan hematoxylin dan didiamkan selama 10 menit. Cairan dihilangkan diatas slide dan ditambahkan *Picric acid alcoholic solution* dan didiamkan selama 4 menit. Jaringan dicuci kedalam *aquadest* selama 3-4 detik, dan ditetaskan *Ponceau acid fuchsin according to Mallory solution* dan didiamkan selama 4 menit, selanjutnya dicuci dengan *aquadest*, dilanjutkan pengecatan menggunakan *Phosphomolybdic acid solution*, didiamkan selama 4 menit. Slide dibersihkan dan ditambahkan Masson aniline blue solution dan diatkan selama 5 menit. Sampel dicuci menggunakan *aquadest*.

vi. Dehidrasi dan *clearing*.

Slide dimasukkan ke dalam mikroskop dalam alkohol 70% selama 1 menit, alkohol 95% selama 1 menit, alkohol absolut selama 1 menit. Selanjutnya dipindahkan kedalam Xylene II selama 1 menit, xyelene I selama 1 menit. Slide dikeringkan dan ditambahkan entellan dan ditutup menggunakan mikroskop cover glass.

vii. Pengamatan dibawah mikroskop.

Sampel diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x dan 100x. Kolagen akan terlihat dengan tampilan warna biru.

III.4. Analisis Data

Dalam penelitian ini akan dilakukan pengamatan terhadap kecepatan penyembuhan luka dengan mengukur 1) prosentase luka yang menutup pada masing-masing perlakuan dan 2) jumlah serat kolagen. Pada kedua parameter tersebut kemudian dibandingkan antara tikus yang diinduksi STZ dan tidak menggunakan uji t.

BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan berumur 8 minggu dengan bobot antara 170-200g. Pertimbangan pemilihan bobot hewan uji didasarkan pada kondisi hewan uji sudah mencapai usia optimal untuk digunakan sebagai hewan coba. Kondisi diabetes secara umum mempengaruhi penurunan berat badan secara berkala. Hal ini disebabkan adanya gangguan metabolisme lipid dan glukosa di dalam tubuh. Kondisi diabetes menurunkan penyimpanan trigliserida di dalam tubuh. Sehingga sumber energi yang diperoleh hanya dari asupan pangan saja. Glukosa yang ada di dalam darah tidak bisa digunakan sebagai sumber energi bagi otot. Sehingga masa otot akan mengecil dan menjadi salah satu penurunan berat badan.

Kondisi diabetes untuk hewan uji tikus adalah kondisi dimana tikus mempunyai kadar glukosa darah diatas 200mg/dl. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran kadar serum darah tikus untuk mengukur kadar glukosa darah pada hari ke 0, 3, 7 dan 14. Dari hasil uji diperoleh kadar gula darah hewan uji pada

pengukuran hari ke 0, 3, 7, 14 adalah >200mg/dl. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa hewan uji mengalami kondisi diabetes selama masa pengujian penyembuhan luka untuk menggambarkan proses penyembuhan luka pada kondisi diabetes.

Tingginya kadar glukosa pada penderita diabetes akan memberikan pengaruh terhadap proses penyembuhan luka. Menurunnya migrasi neutrofil dan makrofag, sehingga menimbulkan meningkatnya potensi infeksi dan perpanjangan kondisi inflamasi. Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- Alpha*) akan meningkat selama terjadinya ulkus. Tingginya TNF- α akan mengakibatkan terjadinya peningkatan apoptosis dan menurunkan proliferasi fibroblas (Rosyid 2016). Dengan menurunnya jumlah fibroblas, maka sintesis kolagen pada area luka juga akan mengalami penurunan. Tingginya ekspresi MMP (*Matrix Metalloproteinase*) pada kondisi diabetes akan memperburuk proses penyembuhan luka. MMP akan menyebabkan degradasi beberapa ECM (*extracellular matrix*), termasuk salah satunya adalah kolagen.

Respon penutupan luka, sintesis kolagen, epitelisasi dan kapilarisasi jaringan

Tahapan proses penyembuhan luka dikelompokkan menjadi empat tahapan yaitu, hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling (Velmar et al., 2009). Tahap hemostasis terjadi pada tahap awal setelah terjadinya luka. Terjadinya inflamasi pada daerah luka ditandai dengan meningkatnya aktivitas neutrofil dan makrofag pada are luka. Pembentukan pembuluh darah baru dan fibroblas terjadi pada tahap proliferasi. Selain itu mulai terbentuk jaringan epitel dari bagian tepi luka. Pada tahap remodeling, kolagen yang disintesis oleh fibroblas akan berikatan dan menjadi semakin padat. Pada tahap ini, jaringan epitel yang terbentuk semakin menebal dan menutup daerah permukaan luka (Baltzis et al., 2014).

Kecepatan penutupan luka ditunjukkan dengan menutupnya permukaan luka yang diakibatkan oleh adanya proses pembentukan sel epitel pada permukaan luka. Dari hasil percobaan pada kelompok gel basis, terdapat subyek uji yang tidak mengalami proses penyembuhan luka. Kondisi ini diperlihatkan dengan tidak

menurunkan ukuran diameter luka. Kecepatan penutupan luka dengan rata-rata tertinggi dihasilkan pada kelompok gel ekstrak 7,5%.

Dari hasil pengukuran kecepatan penutupan luka, didapatkan hasil perhitungan seperti pada tabel II. Hasil analisa statistik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$), menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada kelompok perlakuan gel ekstrak 5% dan gel ekstrak 7,5% terhadap kelompok tanpa perlakuan. Pada kelompok perlakuan gel ekstrak 2,5% dan kelompok perlakuan basis, tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok tanpa perlakuan.

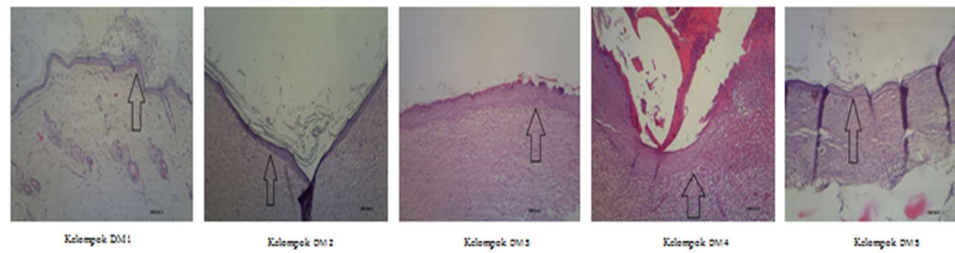
Tabel 2. Hasil penutupan luka, sintesis kolagen, epitelisasi dan kapilarisasi

Kelompok Perlakuan	Penutupan Luka (%)	Skor Kolagen	Skor Epiteliasi	Skor Kapilarisasi
DM1	16,23±4,07	1,11±0,33	6,00±2,64	8,33±4,61
DM2	48,99 ± 7,72	1,22±0,44	6,66±0,57	9,66±3,21
DM3	91,89±14,05 *	3,00±0,50*	7,33±2,31*	8,66±3,05
DM4	94,68 ±9,21*	3,67±0,50*	7,33±1,53*	7,66±3,21
DM5	33,82 ±10,30	1,67±1,00	5,00±1,73	5,66±2,51

Keterangan: *, perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok Tanpa Perlakuan

Pengamatan histopatologi jaringan sampel dilakukan untuk melakukan pengamatan terhadap proses penyembuhan luka dari proses pembentukan jaringan epitel, pembentukan pembuluh darah dan kolagen. Pada pengamatan ini dilanjutkan dengan penilaian scoring terhadap pembentukan sel epitel, pembuluh darah dan kolagen.

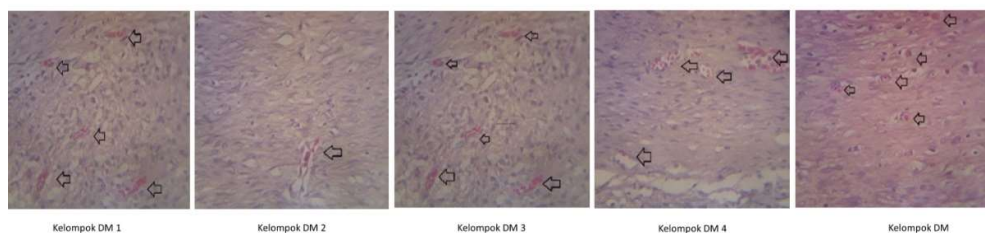
Penutupan luka dapat terjadi ketika sel epitel, yang terbentuk akibat adanya diferensiasi keratinosit, bermigrasi di atas matriks provisional. menuju ke tengah luka. Sel epitel akan bertemu pada area tengah luka, sehingga migrasi sel akan terhenti. Setelah itu pembentukan membrane basialis akan dimulai. Ketebalan jaringan epitel dilakukan dengan melakukan pengukuran gambar dengan menggunakan bantuan *Image Raster*. Tampilan jaringan epitel dapat ditunjukkan dengan anak panah pada gambar 2.



Gambar 1. Gambaran mikroskopik epitelisasi pada setiap kelompok.

Hasil analisa statistik dengan menggunakan ($p < 0,05$) menunjukkan adanya perbedaan bermakna derajat epitelisasi dari pemberian formula 5% dan 7,5% terhadap kelompok tanpa perlakuan. Sedangkan pada kelompok uji pemberian basis dan formula 2,5% tidak memiliki perbedaan yang bermakna terhadap kelompok tanpa perlakuan.

Pembentukan pembuluh darah baru memiliki peran yang besar dalam proses penyembuhan luka. Adanya pembuluh darah pada area luka akan meningkatkan proses penyembuhan luka. Pembuluh darah memberikan kontribusi terhadap suplai darah, oksigen dan nutrisi ke area luka. Pembuluh darah akan terlihat dengan adanya sel darah merah pada pengamatan preparat histologi seperti pada gambar 3. Dari hasil penelitian didapatkan hasil, tidak ada perbedaan bermakna pembentukan pembuluh darah dari setiap kelompok uji.



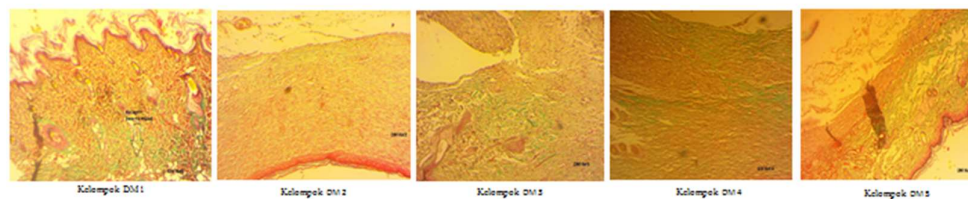
Gambar 2. Gambaran mikroskopik kapilarisasi setiap kelompok.

Kolagen adalah salah satu protein yang menyusun kulit. Serat kolagen memiliki ketahanan yang kuat terhadap tekanan. Semakin banyak kolagen yang terdapat pada jaringan menunjukkan semakin kuat jaringan tersebut terhadap tekanan. Pengamatan kolagen dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *Masson Trichrome Goldner*. Hasil pewarnaan kolagen memberikan visualisasi warna hijau

pada preparat histologi seperti pada gambar 4. Semakin banyak warna hijau yang dimunculkan menunjukkan semakin banyak jumlah kolagen yang terdapat jaringan uji.

Dari hasil analisis kolagen didapatkan hasil, adanya perbedaan bermakna ekspresi kolagen pada kelompok uji. Kelompok uji formula 5% dan formula 7,5% memiliki perbedaan yang bermakna terhadap ekspresi kolagen kelompok tanpa perlakuan. Kelompok uji pemberian basis dan formula 2,5% tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna terhadap kelompok tanpa perlakuan.

Kandungan genistein yang terdapat dalam ekstrak tempe memiliki pengaruh terhadap sintesis kolagen. Dari penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, genistein memiliki efek terhadap sintesis kolagen dengan berikatan dengan estrogen reseptor dan menghambat tyrosin kinase (Irrera et al., 2017).



Gambar 3. Gambaran mikroskopik kolagen pada setiap kelompok

Pada kondisi diabetes, kolagen yang terbentuk akan terdegradasi akibat tingginya MMP pada jaringan. Berkurangnya jumlah kolagen akan membuat jaringan menjadi lebih rapuh, sehingga luka yang sudah tertutup lebih mudah terbuka kembali. Dengan tingginya jumlah kolagen pada area luka, diharapkan meningkatkan ketahanan jaringan terhadap tekanan pada kulit.

Dari hasil pengujian penutupan luka menggunakan perlakuan basis gel, gel ekstrak tempe 2,5%, gel ekstrak tempe 5%, gel ekstrak tempe 7,5% dan tanpa perlakuan, mengindikasikan kelompok perlakuan gel ekstrak tempe 5% dan 7,5% dapat mempengaruhi penyembuhan luka diabetes pada hewan uji. Hal ini didasarkan dari hasil uji statistik kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan gel ekstrak tempe 5% dan 7,5% menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dalam mempengaruhi respon penutupan luka, epitelisasi dan pembentukan kolagen. Sedangkan hasil statistik kelompok tanpa perlakuan dengan

kelompok perlakuan basis gel tanpa ekstrak dan gel ekstrak tempe 2,5% menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dalam mempengaruhi respon penutupan luka, epitelisasi dan pembentukan kolagen. Dan hasil uji statistik dalam mempengaruhi respon kapilarisasi mengindikasikan hasil yang tidak berbeda signifikan dari semua kelompok perlakuan.

BAB V. PENUTUP

Kesimpulan dari penelitian ini adalah

Hasil pengujian penutupan luka menggunakan perlakuan basis gel, gel ekstrak tempe 2,5%, gel ekstrak tempe 5%, gel ekstrak tempe 7,5% dan tanpa perlakuan, mengindikasikan kelompok perlakuan gel ekstrak tempe 5% dan 7,5% berpengaruh signifikan dalam penyembuhan luka diabetes pada hewan uji berdasarkan hasil uji statistik. Kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan basis gel tanpa ekstrak dan gel ekstrak tempe 2,5% menunjukkan hasil uji statistik tidak berbeda signifikan dalam mempengaruhi respon penutupan luka, epitelisasi dan pembentukan kolagen. Hasil uji statistik respon kapilarisasi mengindikasikan hasil yang tidak berbeda signifikan dari semua kelompok perlakuan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih diberikan kepada DRPM-Dikti melalui kontrak No 029/Penel/LPPM-USD/IV/2019 untuk tambahan dana dalam penelitian ini. Terimakasih juga kepada Adi, Yosua dan Yolanda yang telah membantu secara teknis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Asai, J., Takenaka, H., Hirakawa, S., Sakabe, J.I., Hagura, A., Kishimoto, S., Maruyama, K., Kajiya, K., Kinoshita, S., Tokura, Y., Katoh, N., 2012. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 181, 2217–2224.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.023>

- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., Veves, A., 2014. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv. Ther.* 31, 817–836. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x>
- Barati, F., Javanbakht, J., Adib-hashemi, F., Hosseini, E., Safaie, R., Rajabian, M., Razmjoo, M., Sedaghat, R., Hassan, M.A., 2013. Histopathological and clinical evaluation of Kombucha tea and Nitrofurazone on cutaneous full-thickness wounds healing in rats : an experimental study. *Diagn. Pathol.* 8, 1–8.
- Barbosa, A.C.L., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2006. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chem.* 98, 757–766. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.014>
- Beldon, P., 2010. Basic science of wound healing. *Surgery* 28, 409–412. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.05.007>
- Campton-Johnston, S., Wilson, J., 2001. Infected wound management: advanced technologies, moisture-retentive dressings, and die-hard methods. *Crit. Care Nurs. Q.* 24, 64–77. <https://doi.org/10.1109/10.7291>
- Chadha, G., Sathigari, S., Parsons, D.L., Jayachandra Babu, R., 2011. In vitro percutaneous absorption of genistein from topical gels through human skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 498–505. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.525238>
- Chaiyasut, C., Kumar, T., Tipduangta, P., Rungseevijitprapa, W., 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African J. Biotechnol.* 9, 4120–4126.
- Cianfarani, F., Zambruno, G., Brogelli, L., Sera, F., Lacal, P.M., Pesce, M., Capogrossi, M.C., Failla, C.M., Napolitano, M., Odorisio, T., 2006. Placenta growth factor in diabetic wound healing: Altered expression and therapeutic potential. *Am. J. Pathol.* 169, 1167–1182. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051314>
- Davis, S.C., Mertz, P.M., Eaglstein, W.H., 1990. Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream. *J. Surg. Res.* 48, 245–248.

- [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(90\)90220-V](https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90220-V)
- Dong, M., Li, M., Chen, J., Fu, T., Lin, K., Ye, G., Han, J., Feng, X., Li, X., Yu, L., Fan, Y., 2016. Activation of $\alpha 7$ nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF- α Production. *Inflammation* 39, 687–699. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0295-x>
- Eaglstien, W.H., Davis, S.C., Mehle, A.L., Mertz, P.M., 1988. Optimal use of an occlusive dressing to enhance healing. Effect of delayed application and early removal on wound healing. *Arch Dermatol* 124, 392–395. <https://doi.org/10.1001/archderm.1988.01670030058022>
- EO, H., ANN, J.-Y., LIM, Y., 2015. Dietary Supplementation of Genistein Attenuates Inflammatory Responses and Oxidative Stress during Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *J. Agric. Sci.* 7, 80–92. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n2p80>
- Falanga, V., 2004. The chronic wound: Impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Mol. Dis.* 32, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.020>
- Field, C.K., Kerstein, M.D., 1994. Overview of wound healing in a moist environment. *Am. J. Surg.* 167, 2–6. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0002-9610(94)90002-7)
- Greaves, N.S., Ashcroft, K.J., Baguneid, M., Bayat, A., 2013. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 72, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>
- Gupta, B., Agarwal, R., Alam, M.S., 2011. Hydrogels for wound healing applications, *Biomedical Hydrogels: Biochemistry, Manufacture and Medical Applications*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-590-3.50009-6>
- Hamed, S., Bennett, C.L., Demiot, C., Ullmann, Y., Teot, L., Desmoulière, A., 2014. Erythropoietin, a novel repurposed drug: An innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen.* 22, 23–33. <https://doi.org/10.1111/wrr.12135>

- Hasan, A., Murata, H., Falabella, A., Ochoa, S., Zhou, L., Badiavas, E., Falanga, V., 1997. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor- β 1'. *J. Dermatol. Sci.* 16, 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(97\)00622-1](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(97)00622-1)
- Hong, G.-E., Mandal, P.K., Lim, K.-W., Lee, C.-H., 2012. Fermentation Increases Isoflavone Aglycone in Black Soybean Pulp. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 502–511.
- Irrera, N., Pizzino, G., D'Anna, R., Vaccaro, M., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Dietary management of skin health: The role of genistein. *Nutrients* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3390/nu9060622>
- Lodhi, S., Jain, A.P., Sharma, V.K., Singhai, A.K., 2013. Wound-healing effect of flavonoid-rich fraction from *Tephrosia Purpurea* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Herbs, Spices Med. Plants* 19, 191–205. <https://doi.org/10.1080/10496475.2013.779620>
- Lodhi, S., Singhai, A.K., 2013. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 253–259. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60053-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60053-X)
- Loots, M.A.M., Kenter, S.B., Au, F.L., Van Galen, W.J.M., Middelkoop, E., Bos, J.D., Mekkes, J.R., 2002. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 153–160. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00228>
- Mahmood, A., Tiwari, A.K., Şahin, K., Küçük, Ö., Ali, S., 2016. Triterpenoid saponin-rich fraction of *Centella asiatica* decreases IL-1 β and NF- κ B, and augments tissue regeneration and excision wound repair. *Turkish J. Biol.* 40, 399–409. <https://doi.org/10.3906/biy-1507-63>
- Miyazaki, K., Hanamizu, T., Iizuka, R., Chiba, K., 2002. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15, 175–183. <https://doi.org/63546>

- Moynihan, H., Crean, A., 2009. Physicochemical Basis of Pharmaceuticals, Physicochemical Basic of Pharmaceuticals. Oxford University Press.
- Nakada, M., Imai, M., Suzuki, I., 2009. Impact of ethanol addition on the solubility of various soybean isoflavones in supercritical carbon dioxide and the effect of glycoside chain in isoflavones. *J. Food Eng.* 95, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.020>
- Okan, D., Student, M., Woo, K., Clinic, W.H., Ayello, E.A., Advisor, S., Editor, C.A., Care, W., Sibbald, R.G., Sciences, P.H., Clinic, W.H., Editor, C.A., Care, W., 2007. The Role of Moisture Balance in Wound Healing. *Adv. Ski. Wound Care* 39–53.
- Park, E., Lee, S.M., Jung, I.K., Lim, Y., Kim, J.H., 2011. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.013>
- Rostagno, M. a, Palma, M., Barroso, C.G., 2007. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Anal. Chim. Acta* 597, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.006>
- Sharp, A., Clark, J., 2011. Diabetes and its effects. *Nurs. Standar* 25, 41–47.
- Signorelli, S.S., Malaponte, G., Libra, M., Di Pino, L., Celotta, G., Bevelacqua, V., Petrina, M., Nicotra, G.S., Indelicato, M., Navolanic, P.M., Pennisi, G., Mazzarino, M.C., 2005. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc. Med.* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1191/1358863x05vm582oa>
- Singh, A., Singh, P.K., Singh, R.K., 2014. Antidiabetic and Wound Healing Activity of *Catharanthus roseus* L . in Streptozotocin- Induced Diabetic Mice. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 2, 686–692.
- Song, H., Koo, T.Y., Park, J.H., Song, K.H., Kim, S.T., Choi, I.S., Choi, W.J., Mok, W.K., Min, H.S., Yoon, D.S., 2003. Inhibition of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Expression by Genistein in Breas Cancer Cell-line. *J. Korean Breast Cancer Soc.* 6, 277–282.
- Stancanelli, R., Mazzaglia, A., Tommasini, S., Calabrò, M.L., Villari, V., Guardo, M., Ficarra, P., Ficarra, R., 2007. The enhancement of isoflavones water

- solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 980–984. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.025>
- Stanley, A.C., Park, H.Y., Phillips, T.J., Russakovsky, V., Menzoian, J.O., Kent, K.C., Schanzer, H., Golden, M.A., Sidawy, A.N., Friedman, S.G., 1997. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J. Vasc. Surg.* 26, 994–1001. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(97\)70012-0](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(97)70012-0)
- Stintzing, F.C., Hoffmann, M., Carle, R., 2006. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 373–377. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500187>
- Sutrisno, S., Mastryagung, D., Khairiah, R., Tridiyawati, F., Artina, N., Hidayati, D., Noorhamdani, N., Santoso, S., 2014. The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation, and apoptosis in endometriosis cell culture. *J. Exp. Integr. Med.* 4, 299–304. <https://doi.org/10.5455/jeim.200414.or.102>
- Teoh, S.L., Latiff, A.A., Das, S., 2009. The effect of topical extract of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing in nondiabetic rats and in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 815–822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2008.03117.x>
- Tie, L., An, Y., Han, J., Xiao, Y., Xiaokaiti, Y., Fan, S., Liu, S., Chen, A.F., Li, X., 2013. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes. *J. Nutr. Biochem.* 24, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.011>
- Valsecchi, A.E., Franchi, S., Panerai, A.E., Rossi, A., Sacerdote, P., Colleoni, M., 2011. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.060>
- Velnar, T., Bailey, T.B., Smkolj, V., 2009. The Wound Healing Process : an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37,

1528–1542.

- Wiegand, K., Lange, N., Kühnert, M., 1993. The use of the HET-CAM test for the determination of the irritating effects of humic acids. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschrift* 100, 412–416.
- Young, A., McNaught, C.-E., 2011. The physiology of wound healing. *Surgery* 29, 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.011>
- Yuliani, S.H., Gani, M.R., Istyastono, E.P., Riswanto, F.D.O., 2018. Optimization of genistein and daidzein extraction from a tempeh-fermented product of soybean. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 6, 231–241.
- Zhang, E., Gao, B., Yang, L., Wu, X., Wang, Z., 2016. Notoginsenoside F1 Promotes Fibroblast Proliferation via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Benefits Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 324–332. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.229369>
- Zykova, S.N., Jenssen, T.G., Berdal, M., Olsen, R., Myklebust, R., Seljelid, R., 2000. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. *Diabetes* 49, 1451–1458. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1451>