

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus strain Wistar yang diperoleh dari LPPT IV UGM, Yogyakarta, dengan kriteria inklusi tikus jantan usia 2 bulan, diinduksi luka bakar *partial thickness*, berat badan \pm 150-200 gram setelah aklimatisasi, dan tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak. Kriteria eksklusi yang digunakan dalam penelitian ini adalah apabila tidak terjadi luka bakar *partial thickness* dan selama induksi/ perlakuan. Kriteria *drop out* adalah apabila tikus tampak sakit/ mati selama perlakuan. Tikus ditempatkan dalam kandang individual dengan suhu 28-32°C dan pencahayaan tertentu (periode 12 jam terang dan 12 jam gelap) dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

Tikus Wistar digunakan dalam penelitian ini karena struktur kulit nya mirip dengan kulit manusia. Selain itu, tikus Wistar mudah dalam pemeliharaan dan memiliki respon penyembuhan luka yang baik, serta dapat diteliti secara simultan mengenai respon penyembuhan luka, baik dari segi inflamasi, imunologi, maupun metabolik.³⁰

Jumlah subyek penelitian yang digunakan mengacu pada besar sampel menurut WHO untuk tiap kelompok minimal lima ekor hewan coba, dengan cadangan 10% (1 ekor)³⁶, sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah 6 ekor tikus untuk tiap kelompok.

Seluruh sampel penelitian dapat menjalani aklimatisasi dan perlakuan sesuai rencana dari awal hingga akhir. Tidak didapatkan hewan coba yang *drop out* selama perlakuan.

6.2 Karakteristik Metodologi Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efektivitas ekstrak daun *Moringa oleifera* dalam meningkatkan respon penyembuhan luka pada luka bakar *partial thickness* pada tikus Wistar. Variabel yang diperiksa dalam penelitian ini meliputi sebaran makrofag dan ekspresi VEGF.

Penelitian ini dilakukan di empat tempat, meliputi : proses pembuatan ekstrak daun *Moringa oleifera* di Laboratorium MIPA UNDIP, Semarang; pembuatan krim ekstrak daun *Moringa oleifera* dilakukan di Laboratorium STIFAR, Semarang; proses induksi luka bakar, perawatan, dan perlakuan (termasuk pengambilan jaringan) terhadap hewan coba dilakukan di LPPT IV UGM, Yogyakarta; proses pembuatan preparat dan pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium PA UNS, Solo.

Desain penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Randomized post test with control group*”. Sebelum dimulai perlakuan, tikus akan diaklimatisasi di laboratorium selama satu minggu dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan sekitar sehingga tidak terjadi *drop out*. Setelah melalui proses aklimatisasi, tikus akan diberi anestesi dan dilakukan induksi luka bakar *partial thickness*, untuk kemudian dilakukan random alokasi dan dibagi menjadi 4 kelompok. Setiap hari, tikus akan diberikan topikal *Moringa oleifera* 10% (I), kombinasi topikal Silver sulfadiazine dan ekstrak *Moringa oleifera* 10% (II), topikal silver sulfadiazine 1% (III), topikal vehiculum murni (IV). Pada hari ke-3, 7, dan 10, akan dilakukan penilaian terhadap status makroskopis berupa transudasi pada luka bakar tikus. Pada hari ke-7 penelitian, tikus akan diterminasi dan dilakukan pengambilan jaringan. Terminasi tikus dilakukan menggunakan obat anestesi ketamin intramuskular.

Jaringan yang diambil pada hari ke-7 dilakukan pengecatan HE untuk pembacaan sebulan makrofag dan pengecatan imunohistokimia VEGF-A untuk pembacaan ekspresi VEGF di Laboratorium PA UNS, Solo oleh dua observer.

Penelitian ini berjalan dengan lancar tanpa kendala yang berarti. Pemantauan hewan coba dilakukan setiap hari di LPPT IV UGM, Yogyakarta, oleh orang yang ahli. Pengamatan makroskopis dilakukan oleh peneliti dan petugas laboratorium LPPT IV UGM, Yogyakarta.

6.3 Diskusi

6.3.1 Efek *Moringa oleifera* terhadap Sebaran Makrofag

Penurunan jumlah PMN pada hari ke-5 proses penyembuhan luka, akan diikuti oleh penurunan jumlah makrofag. Penurunan jumlah makrofag akan mempengaruhi kecepatan penyembuhan luka.

Sebagai obat herbal yang memiliki efek antiinflamasi, *Moringa oleifera* diharapkan mampu menurunkan jumlah makrofag pada luka bakar hari ke-7.^{10,11,12}

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa rerata sebaran makrofag terendah diperoleh pada kelompok yang diberikan kombinasi topikal ekstrak *Moringa oleifera* dan *silver sulfadiazine*, sedangkan yang paling tinggi adalah pada kelompok kontrol. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada sebaran makrofag pada semua kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Bonferoni*. Dari hasil uji *Post-Hoc Bonferoni*, diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terhadap sebaran makrofag antara kelompok yang diberikan topikal kombinasi ekstrak daun *Moringa oleifera* + *silver sulfadiazine* dengan kelompok kontrol.

Beberapa penelitian terdahulu (Ulfa dkk, Amali dkk, Ndiaye dkk, Kurniawan) menyebutkan bahwa ekstrak daun dan akar *Moringa oleifera* mempunyai efek antiinflamasi terhadap luka hewan coba, baik diberikan secara topikal maupun oral. Hal ini ditinjau dari adanya penurunan parameter oedema, eritema, sitokin proinflamatori (IL-1 β , IL-6, TNF- α), dan sel inflamatori.^{19,41,42,43}

Ekstrak daun *Moringa oleifera* pada penelitian ini terbukti dapat menurunkan sebaran sel inflamatori, berupa makrofag pada luka bakar hewan coba. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa ekstrak *Moringa oleifera* memiliki potensi antiinflamasi yang cukup baik. Kandungan 4-[(2'-O-acetyl-alpha-l-rhamnosyloxy) benzyl isothiocyanate, glukosinolat, flavonoid, dan dibenzil-urea memiliki potensi inhibisi terhadap NO dan sitokin proinflamasi, sehingga akan menurunkan kejadian inflamasi pada luka. Penurunan inflamasi ini berkorelasi positif dengan penurunan sel-sel inflamasi, termasuk sebaran PMN dan makrofag. Keberadaan makrofag akan dipacu oleh sel PMN dan jumlahnya akan menurun pada hari ke-4. Hal ini sesuai dengan hasil

penelitian, di mana pada hari ke-5, didapatkan sebulan makrofag yang lebih rendah pada kelompok yang mendapatkan ekstrak daun *Moringa oleifera*.^{12,44}

6.3.2 Efek *Moringa oleifera* dalam Ekspresi VEGF

Uji hipotesis variabel ekspresi VEGF dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,550$) antar kelompok yang menggunakan topikal *Moringa oleifera* dengan yang tidak menggunakan topikal *Moringa oleifera*. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh pemeriksaan ekspresi VEGF dilakukan pada hari ke-7 dimana semua kelompok baik kelompok perlakuan maupun kontrol sudah terjadi peningkatan VEGF sehingga tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

Proses penyembuhan luka meliputi 3 fase, yakni:⁵

1. Fase koagulasi, hemostasis dan inflamasi

Fase ini berlangsung sesaat setelah terjadi luka. Dimulai dengan dikeluarkannya kemokin – kemokin pro inflamatori diikuti dengan dikeluarkannya netrofil dalam waktu 24-36 jam setelah terjadi luka. Fase inflamasi akhir, setelah 48-72 jam terjadinya luka, makrofag akan keluar untuk memulai proses fagositosis. Setelah proses fagositosis membersihkan debris, makrofag bersama *chemoattractant* lainnya akan memicu datangnya *growth factor* seperti VEGF, *fibroblas growth factor* (FGF) dan lainnya.

2. Fase proliferasi

Fase ini mulai sejak hari ke 3 dan dapat berakhir sampai 2 minggu setelahnya. VEGF memainkan peranan penting pada proses angiogenesis yang terjadi pada fase proliferasi.^{5,26}

3. Fase *remodeling*

Fase ini dimulai setelah terbentuknya jaringan granulasi dan dimulainya sintesis dari matrix ekstraselular. Fase ini dapat berlangsung sampai 1 atau 2 tahun.

6.3.3 Hubungan antara Sebukan Makrofag dan Ekspresi VEGF pada Pemberian Ekstrak Daun *Moringa oleifera*

Uji korelasi *Spearman* dilakukan untuk mengetahui hubungan antara sebukan makrofag dan ekspresi VEGF pada pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* (baik secara tunggal maupun kombinasi). Uji *Spearman* didapatkan bahwa tidak terdapat hubungan antara sebukan makrofag dan ekspresi VEGF pada pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera*.

Makrofag merupakan sel yang penting dalam angiogenesis dan penyembuhan luka. Makrofag dapat memproduksi VEGF. Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa makrofag dan VEGF tidak memiliki hubungan bermakna. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya factor-faktor lain yang merangsang pembentukan VEGF, termasuk kondisi hipoksia.⁶

6.4 Keterbatasan Penelitian

Peneliti menyadari masih terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini. Beberapa keterbatasan dalam penelitian ini adalah :

1. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini hanya satu macam, sehingga tidak dapat membandingkan antara efek dosis bertingkat
2. Penelitian hanya dilakukan dalam waktu tujuh hari
3. Sebukan sel yang diperiksa hanya dalam jaringan dan belum dilakukan pemeriksaan secara imunohistokimia terhadap mediator antiinflamasi