

HISTOPATOLOGI POTENSI PENYEMBUHAN LUKA EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* L.) YANG DIKOMBINASIKAN DENGAN MINYAK KELAPA MURNI PADA MODEL TIKUS DIABETES

Desak Made Lestari Dewi¹ · Burhannuddin² · Nur Habibah³ ·
Heri Setiyo Bekti⁴ · I Wayan Karta⁵ · Luh Ade Wilan Krisna^{6*}

^{1,2,3,4,5,6} Department of Medical Laboratory Technology, Poltekkes Kemenkes Denpasar, Indonesia
e-Mail : saklestaridw19@gmail.com
No Tlpn WA : 085936182867

ABSTRACT

Background: High blood glucose levels in diabetes mellitus (DM) impair wound healing and increase infection risk, while commercial anti-inflammatory drugs are expensive and have side effects. Virgin coconut oil (VCO) combined with Neem leaves extract has potential as an alternative therapy with anti-inflammatory effects, but the correct dose requires further research. **Aim:** This study aimed to evaluate the effectiveness of VCO combined with Neem leaves extract for wound healing in diabetic rats. **Method:** Diabetes was induced in 25 male Wistar rats using Streptozotocin (40 mg/kg BW intravenously), and circular wounds were created using a sterile punch biopsy tool. The rats were divided into five groups: VCO with Neem extract at 5% (P1), 10% (P2), and 20% (P3), povidone iodine (K+), and no treatment (K-). Wound healing was assessed histopathologically by evaluating fibroblast and lymphocyte counts and epithelial thickness. **Results:** The 10% VCO-Neem extract group (P2) demonstrated the highest efficacy, with a wound diameter of 3.01 mm, fibroblast count of 19.16, lymphocyte count of 19.22, and epithelial thickness of 173.26 μ m on day 14 ($p < 0.05$). **Conclusion:** The combination of VCO and Neem leaves extract at 10% accelerates wound healing effectively in diabetic rats.

Keywords: Diabetic ulcer, Neem leaves, Interleukin-6, Fibroblast

ABSTRAK

Kadar glukosa darah tinggi pada diabetes melitus (DM) menghambat penyembuhan luka dan meningkatkan risiko infeksi, sementara obat antiinflamasi komersial mahal dan memiliki efek samping. Virgin coconut oil (VCO) yang dikombinasikan dengan ekstrak daun Neem memiliki potensi sebagai terapi alternatif dengan efek antiinflamasi, tetapi dosis yang tepat masih memerlukan penelitian lebih lanjut. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas kombinasi VCO dan ekstrak daun Neem dalam penyembuhan luka pada tikus diabetes. **Metode:** Diabetes diinduksi pada 25 ekor tikus Wistar jantan menggunakan Streptozotocin (40 mg/kg BB secara intravena), dan luka melingkar dibuat menggunakan alat biopsi punch steril. Tikus dibagi menjadi lima kelompok: VCO dengan ekstrak daun Neem 5% (P1), 10% (P2), dan 20% (P3), povidone iodine (K+), serta tanpa perlakuan (K-). Penyembuhan luka dievaluasi secara histopatologi berdasarkan jumlah fibroblas dan limfosit serta ketebalan epitel. **Hasil:** Kelompok VCO-ekstrak daun Neem 10% (P2) menunjukkan efektivitas tertinggi dengan diameter luka 3,01 mm, jumlah fibroblas 19,16, jumlah limfosit 19,22, dan ketebalan epitel 173,26 μ m pada hari ke-14 ($p < 0,05$). **Kesimpulan:** Kombinasi VCO dan ekstrak daun Neem 10% secara efektif mempercepat penyembuhan luka pada tikus diabetes. **Kata Kunci:** ulkus diabetik, daun Neem, fibroblas, interleukin-6.

Kata Kunci: Ulkus diabetik, daun Neem, Interleukin-6, Fibroblas

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang terjadi akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya (ADA, 2017). Prevalensi DM di dunia pada tahun 2014 sekitar 387 juta jiwa dan diperkirakan akan mencapai 592 juta jiwa pada tahun 2035. Di Indonesia juga diprediksi jumlah penderita DM akan meningkat dari 2,1 juta jiwa pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta jiwa pada tahun 2035.

Diabetes melitus disebut sebagai silent killer karena dapat menyerang seluruh organ tubuh dan menimbulkan komplikasi. Komplikasi pada pasien DM terjadi apabila mengalami hiperglikemia dalam jangka waktu yang lama. Salah satu keluhan yang terjadi pada pasien DM adalah munculnya luka yang sulit sembuh yang disebut dengan ulkus diabetikum. Sekitar 15% dari total penderita diabetes di Indonesia mengalami ulkus diabetikum yang menyebabkan 23,5% dari seluruh penderita ulkus diabetikum mengalami amputasi.

Ulkus diabetikum merupakan salah satu komplikasi diabetes yang berasal dari komplikasi neuropati dan/atau penyakit arteri perifer.¹ Sekitar 20-40% penderita diabetes menderita neuropati diabetikum dan hampir 50% berkembang menjadi penyakit pembuluh darah perifer yang berujung pada amputasi (Jan et al., 2016). Biaya pengobatan ulkus diabetikum diperkirakan sekitar US\$3.096-107.900. Biaya tersebut tergantung pada tingkat keparahan ulkus.

Saat ini pemanfaatan tanaman sebagai obat diminati oleh masyarakat karena efek sampingnya yang rendah dibandingkan dengan penggunaan obat kimia dan menjadi alternatif untuk menekan tingginya biaya pengobatan. Tanaman obat tradisional di Indonesia banyak digunakan sebagai alternatif penyembuhan karena mudah digunakan dan relatif lebih aman dari segi efek samping. Daun mimba (*Azadirachta indica* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, terpena, dan tanin. Diperkirakan kandungan metabolit sekundernya sekitar 135 jenis senyawa. Daun mimba berpotensi sebagai anti mikroba terhadap mikroorganisme infeksius. Ekstrak etanol daun mimba memiliki aktivitas antiinflamasi sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengganti antibiotik yang lebih efektif dan efek sampingnya lebih sedikit. Daun mimba

(*Azadirachta indica*) memiliki sifat antiinflamasi dan antibiotik yang saling melengkapi sehingga mempercepat penyembuhan luka. Efek antiinflamasi yang ditimbulkan oleh senyawa seperti nimbin dan quercetin mampu menghambat mediator inflamasi, sehingga mengurangi pembengkakan dan kerusakan jaringan. Sementara itu, gedunin dan salanin berperan dalam aktivitas antibiotik mimba, sehingga efektif dalam melawan patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang umum ditemukan pada luka terinfeksi. Kombinasi sifat-sifat tersebut menjadikan ekstrak mimba sebagai alternatif terapi luka yang menjanjikan. Penelitian terkini, seperti Sharma et al. (2019) dan Kaur et al. (2021), menyoroti khasiat antimikroba dan antiinflamasinya, yang mendukung penerapannya dalam model luka diabetes. VCO telah terbukti menunjukkan aktivitas antiinflamasi dalam peradangan akut. Penelitian telah membuktikan bahwa VCO menunjukkan khasiat gel ekstrak etanol VCO yang disuplemen dengan ekstrak daun nimba terhadap penyembuhan luka pada punggung kelinci. Ekstrak etanol VCO yang disuplemen dengan ekstrak daun nimba juga diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi. VCO yang disuplemen dengan ekstrak daun nimba mengandung flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid. Metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid/steroid dapat digunakan untuk mempercepat penutupan luka pada tikus diabetes. Pada penelitian Karta, I. W. & Burhannudin (2022) dilaporkan bahwa diantara kelima konsentrasi suplementasi VCO dengan ekstrak daun Intaran yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%, konsentrasi 10% menunjukkan zona hambat paling besar yaitu dikategorikan kuat dalam menghambat pertumbuhan *P. acnes*. Berdasarkan penelitian yang telah disebutkan dan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan terhadap daun Mimba mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, terpene, dan tanin yang berperan sebagai antiinflamasi, anti bakteri, anti alergi yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka, maka perlu dilakukan pengujian efektivitas suplementasi VCO dengan ekstrak daun Mimba dalam mempercepat proses penyembuhan luka insisi pada tikus model diabetes.

BAHAN DAN METODE

Penelitian eksperimental ini menggunakan *Posttest Only Control Group Design* yang terdiri dari dua kelompok. Penelitian ini dilakukan di laboratorium imunologi Poltekkes Kemenkes Denpasar Jl. Sanitasi No. 1, Sidakarya, Denpasar Selatan, Kota Denpasar dan Laboratorium Pemeliharaan dan Pembiakan Mencit Bio dan Hewan Coba Tikus. Persetujuan etik untuk semua prosedur yang melibatkan hewan diberikan oleh Komite Etik Poltekkes Kemenkes Denpasar (No. DP.04.02/F.XXXII.25/0680/2023). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tikus putih jantan umur 2-3 bulan dengan berat 100-120 gr, pakan standar dan air minum, NaCl 0,9%, Streptozotocin (STZ), pembalut steril, plester penutup luka, dan bahan suplementasi seperti daun nimba, etanol, dan Virgin Coconut Oil (VCO). Pembuatan simplisia dan ekstrak daun nimba diawali dengan pencucian daun, penjemuran di udara terbuka, pemangangan selama 24 jam, penghancuran, dan ekstraksi dengan etanol selama tujuh hari. Pembuatan suplementasi VCO dilakukan dengan membuat ekstrak daun nimba dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% menggunakan rumus %b/b sehingga menghasilkan massa total campuran tiap konsentrasi sebesar 5 g (Karta & Burhannudin, 2022). Pengelompokan hewan coba meliputi 25 ekor tikus yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu kontrol negatif (NaCl 0,9%), kontrol positif (povidone iodine), dan 3 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Penimbangan berat badan dan pemberian STZ dilakukan dengan cara menimbang berat badan tikus dan menyuntikkan STZ 40 mg/kg untuk menginduksi diabetes. Pengukuran gula darah puasa dilakukan dengan mengambil darah dari vena lateralis setelah tikus dipuasakan selama 10 jam. Luka eksisi dibuat dengan cara mencukur, membersihkan, dan mensterilkan punggung tikus, kemudian dibuat luka melingkar dengan diameter 5 mm. Perlakuan dan pengukuran diameter luka dilakukan setiap hari dengan cara mengukur diameter luka secara vertikal, horizontal, dan diagonal. Preparat

histologi dibuat untuk mengukur tebal epitel, jumlah fibroblas, dan jumlah limfosit.

Preparat histologi diamati di bawah mikroskop pada 5 lapang pandang, pada keempat sudut dan tengah preparat, dengan perbesaran 100x dan 400x. Sasaran yang dibaca adalah persentase jaringan granulasi, re-epitelialisasi, infiltrasi sel radang dengan kriteria sebagai berikut: Skoring jaringan granulasi dan re-epitelialisasi, skor 0 bila tidak terdapat perubahan histologis. Skor 1 bila jaringan granulasi dan re-epitelialisasi ditemukan pada kurang dari sepertiga lapang pandang. Skor 2 bila jaringan granulasi dan re-epitelialisasi ditemukan pada sepertiga sampai dua pertiga lapang pandang. Skor 3 bila ditemukan jaringan granulasi dan re-epitelialisasi pada lebih dari dua pertiga lapang pandang. Skor infiltrasi sel inflamasi, skor 0 bila tidak ada perubahan histologis. Skor 1 bila terdapat infiltrasi sel inflamasi pada kurang dari sepertiga lapang pandang. Skor 2 bila infiltrasi sel inflamasi pada sepertiga sampai dua pertiga lapang pandang. Skor 3 bila infiltrasi sel inflamasi pada lebih dari dua pertiga lapang pandang (Yohana, 2015). Uji in vivo dianalisis menggunakan metode *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.

HASIL

Hasil rata-rata pengukuran diameter luka yang telah dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter luka di setiap kelompok.

Group	n	Wound Diameter Measurement Day (mm)			Asymp. Sig One Way Anova
		Day 1	Day 7	Day 14	
K (-)	4	5,00	4,07	1,58	0.008
K (+)	4	5,00	2,55	0,83	
P1	4	5,00	4,57	1,21	
P2	4	5,00	3,04	0,40	
P3	4	5,00	4,36	1,98	

Catatan: (K-) kontrol negatif; (K+) Povidone Iodine; (P1) Ekstrak daun Nimba 5%+VCO; (P2) Ekstrak daun Nimba 10%+VCO; (P3) Ekstrak daun Nimba 15%+VCO.

DISKUSI

Data rata-rata lama penyembuhan luka selama 14 hari pada Tabel 1 dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Hasil uji normalitas diperoleh nilai $p=0,200>0,05$ yang berarti data berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas diperoleh nilai $p=0,554>0,05$ yang berarti data bersifat homogen. Data tersebut diuji dengan *One Way ANOVA* dan diperoleh hasil signifikansi sebesar 0,028 ($p<0,05$) dan dari hasil uji F menunjukkan nilai F hitung lebih besar dari F tabel ($2,902>2,87$), selanjutnya dilakukan uji komparasi berganda (*Post Hoc test*) dengan menggunakan uji Duncan dan hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak daun mimba yang disuplemen dengan VCO konsentrasi 10% (PII) merupakan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh terhadap penyembuhan luka yang dilihat dari lama penyembuhan luka mencit yang cepat. Dari Tabel 1 terlihat bahwa rata-rata lama penyembuhan luka mencit untuk setiap perlakuan berbeda-beda. Luka yang diobati dengan konsentrasi 10% (PII) memberikan efek penyembuhan yang lebih cepat jika dibandingkan dengan pengobatan lainnya dan pengobatan konsentrasi 5% (PI) memberikan efek penyembuhan yang paling lama dari semua pengobatan. Penyembuhan luka yang normal dapat berlangsung secara alami tanpa bantuan seperti penyembuhan yang terjadi pada pengobatan kontrol negatif (K-), namun pengobatan yang diberikan pada luka seperti konsentrasi 10% (PI[^]) akan membantu dalam mempercepat penyembuhan luka karena mengandung metabolit sekunder yang memiliki efek antiinflamasi dan antibakteri seperti triterpenoid dan alkaloid. Hal ini sesuai dengan Rahman et al. (2013) yang mengatakan bahwa kecepatan proses penyembuhan luka dapat dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder seperti triterpenoid, alkaloid dan tanin yang berfungsi untuk meningkatkan perbaikan dan penguatan sel-sel kulit serta merangsang pertumbuhan jaringan ikat dan menurut Krishnaiah et al. (2009) bahwa triterpenoid merupakan komponen yang memiliki peran aktif dalam penyembuhan luka. Triterpenoid membantu memperkuat struktur kulit, meningkatkan konsentrasi antioksidan pada luka dan memulihkan jaringan

inflamasi atau radang dengan meningkatkan suplai darah ke area luka, serta membantu mempercepat proses penutupan luka.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wu et al. (2012) bahwa komponen triterpenoid pada daun pegagan sebagian besar mengandung dua glikosida yang dapat membantu mempercepat penyembuhan luka bakar dengan cara mengaktifkan faktor pertumbuhan seperti TGF- β yang akan menghasilkan fibroblas, tidak hanya meningkatkan proliferasi sel.

Adanya faktor pertumbuhan seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β) untuk menginisiasi proses pembentukan sel atau luka tersebut telah memasuki fase proliferasi. Faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh makrofag akan mendorong migrasi sel yang baru terbentuk ke area luka dan menghasilkan matriks jaringan ikat baru (Robson et al., 2001). TGF- β juga dapat meningkatkan faktor pertumbuhan keratinosit KGF (keratinocyte growth factor) pada fibroblas yang dibantu oleh interleukin IL-1. Fibroblas akan membentuk dan mensekresikan KGF-1, KGF-2, dan IL-6 yang akan merangsang keratinosit yang ada untuk menuju ke area luka, yang akan berproliferasi dan berdiferensiasi di epidermis. Penambahan vaselin atau parafin sebagai sediaan obat juga dapat membantu merawat luka dengan baik. Lapisan basal merupakan sumber utama penyembuhan bagi sel epitel, terutama dalam hal replikasi sel. Gangguan yang terjadi lebih dalam ke dermis akan membutuhkan waktu lebih lama untuk menutup luka (Prasetyono, 2009).

Dapat dilihat pada Gambar 1 bahwa setelah dilakukan pengamatan kondisi luka mencit selama 14 hari didapatkan kondisi luka pada perlakuan salep ekstrak daun mimba yang disuplemen VCO konsentrasi 5% (PI) dan konsentrasi 10% (PII) yang awalnya bengkak merah pada hari ke-1 dan ke-2 berubah menjadi merah rata-rata pada hari ke-3, namun pada perlakuan salep ekstrak daun mimba yang disuplemen VCO konsentrasi 15% (PIII), kontrol negatif (K-) dan kontrol positif (K+) perubahan kondisi luka dari bengkak merah menjadi merah rata-rata terjadi pada hari ke-5. Perubahan kondisi luka dari bengkak merah menjadi merah menunjukkan bahwa luka telah mengalami fase inflamasi, yang mana menurut Supriyanto dan Luviana (2010) bahwa inflamasi ditandai dengan adanya kemerahan (rubor), panas (calor), bengkak (tumor), dan nyeri (dolor).

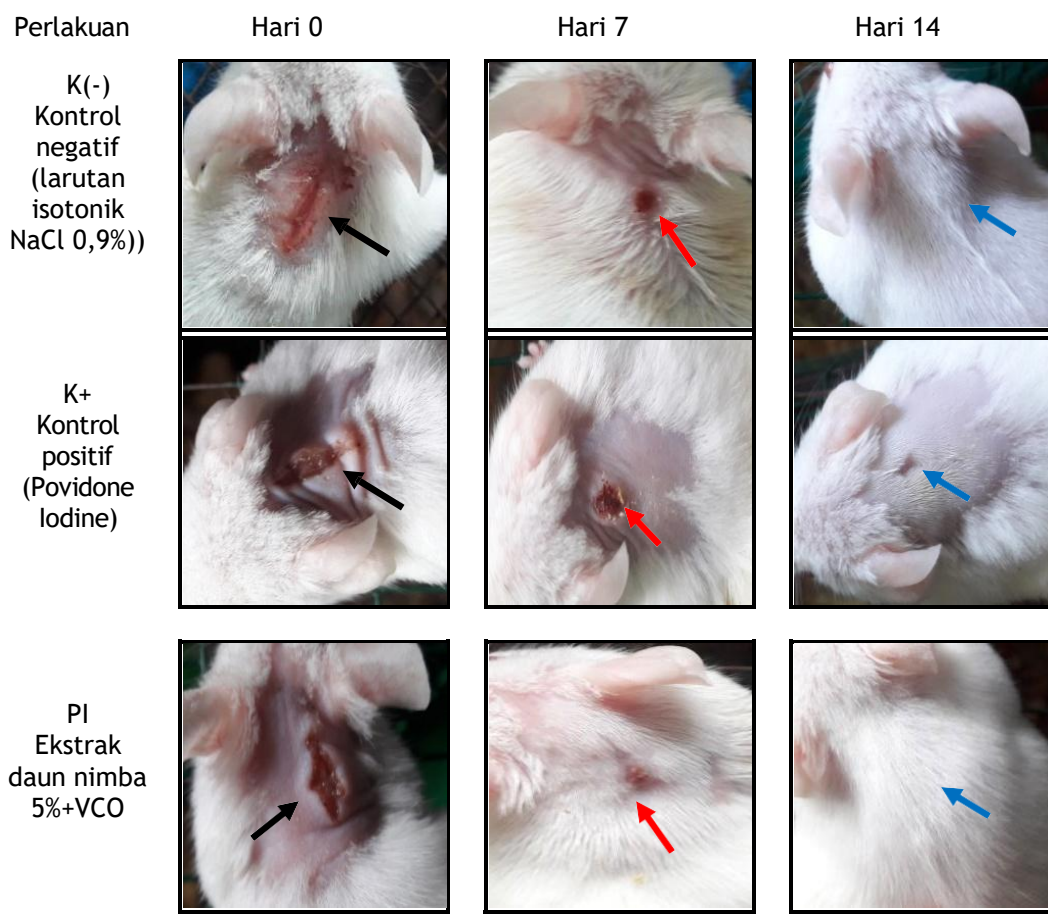
Kemerahan merupakan hal awal yang terlihat pada daerah yang mengalami peradangan disertai pembengkakan yang disebabkan oleh peningkatan cairan dan sel dari peredaran darah ke jaringan luka serta peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan pelebaran pembuluh darah. Kemungkinan pengobatan salep ekstrak daun mimba bersuplemen VCO dengan konsentrasi 10% (PII) efektif untuk mempercepat penyembuhan luka dengan mengurangi lamanya fase peradangan yang terjadi pada luka.

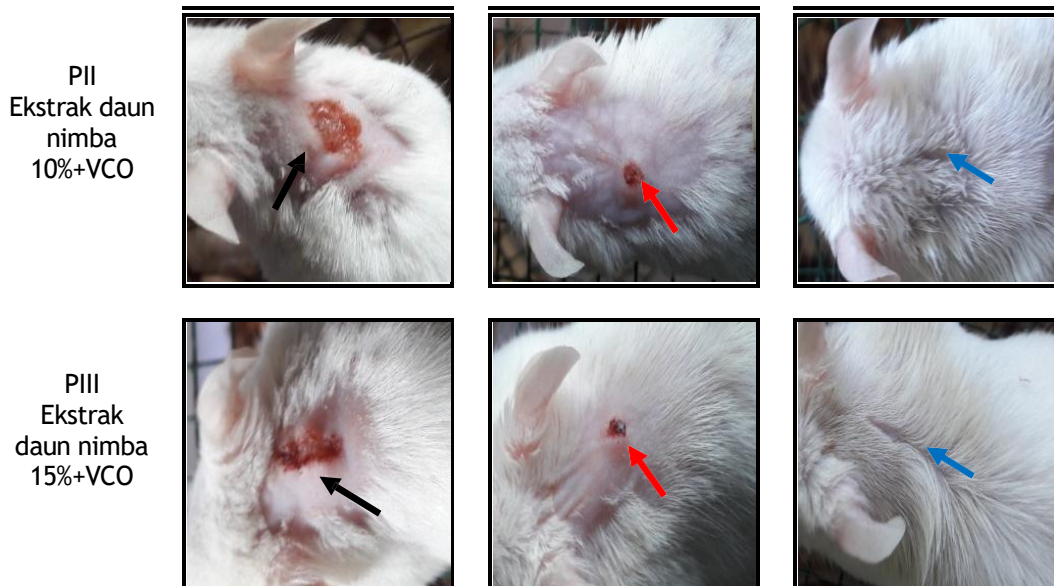
Dari hasil skrining fitokimia yang dilakukan terhadap ekstrak daun mimba bersuplemen VCO yang digunakan dalam penelitian ini, mengandung metabolit sekunder berupa triterpenoid, alkaloid dan tanin. Kandungan sebagian metabolit sekunder tersebut mempunyai efek antiinflamasi (Banno et al., 2005), antibakteri, dan antialergi (Tan et al., 2017) yang dapat mempersingkat lamanya fase inflamasi terjadi pada luka sehingga mempercepat penyembuhan luka.

Hal ini sesuai dengan Robson et al. (2001) bahwa fase inflamasi merupakan tahapan yang normal dan harus terjadi untuk membentuk kekebalan tubuh yang kuat terhadap mikroba yang mengganggu proses penyembuhan luka dimana fase hemostatik hingga fase inflamasi pada luka umumnya berlangsung sejak hari terbentuknya luka hingga seminggu. Namun menurut Setyoadi dan Sartika (2010), apabila fase inflamasi semakin luas dan berkepanjangan maka akan memperlambat proses penyembuhan luka. Mediator inflamasi juga diperlukan untuk mempercepat fase inflamasi: 1) eikosanoid (prostaglandin, lipoksin, tromboksan), 2) sitokin (limfokin, monokin, interferon, interleukin), 3) oksida nitrat dan 4) faktor pertumbuhan (Prasetyono, 2009). Mediator inflamasi ini akan terakumulasi di area luka selama respon inflamasi terjadi di luka, terjadi interaksi antara mediator inflamasi dengan sel sekitar dan matriks sel. Tanda-tanda umum inflamasi dini setelah cedera meliputi rubor, tumor, calor, dolor dan *functio laesa* sebagian besar diatur oleh mediator inflamasi (Robson et al., 2001).

Pada kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), konsentrasi 15% (PIII) menunjukkan perubahan kondisi luka yang terjadi rata-rata pada hari ke 5 lebih lama dibandingkan dengan konsentrasi 5% (PI) dan konsentrasi 10% (PII),

hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol negatif (K-) tidak diberikan perlakuan apapun yang menyebabkan kemungkinan masuknya kuman yang menginfeksi luka relatif lama. Dan pada kelompok kontrol positif (K+) lamanya penyembuhan kemungkinan disebabkan oleh infeksi kuman pada tikus yang membutuhkan waktu lebih lama untuk membunuh kuman tersebut. Hal ini sesuai dengan Kaur et al. (2014) bahwa povidone iodine hanya mengandung bahan antiseptik dan tidak memiliki kandungan antiinflamasi. Bahan antiseptik tersebut memiliki unsur yodium yang akan berinteraksi dengan enzim dan protein pada membran sel sehingga mempengaruhi struktur sel yang berujung pada kematian sel dan menurut Pratiwi et al. (2015) povidone iodine tidak hanya menyeleksi sel mikroba sebagai target, tetapi juga sel normal yang berakibat terganggunya sintesis kolagen dan mempengaruhi migrasi sel epitel ke area luka.





Gambar 1. Proses penyembuhan luka pada tikus (*Mus musculus*) dilihat dari hari ke-0 (→) luka berwarna merah, basah dan bengkak, hari ke 7 (→) luka mengecil dan mengering dan hari ke 14 (→) luka sembuh.

Berdasarkan hasil pengamatan histologi diperoleh data rata-rata jumlah fibroblas pada tikus kelompok kontrol perlakuan K-, K+, dan kelompok perlakuan PI, PII dan PIII pada hari ke-14 dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata jumlah fibroblas pada preparat histologi kulit tikus

Kelompok	Fibroblas \pm SD Hari-14
K(-)	5,24 ^a \pm 3,63
K(+)	11,16 ^b \pm 1,83
PI	15,42 ^c \pm 5,83
PII	19,16 ^{bc} \pm 3,85
PIII	14,74 ^{bc} \pm 3,55

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa nilai rata-rata jumlah fibroblas hari ke-14 tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan konsentrasi 10% (PII) sebesar 19,16 sedangkan terendah terdapat pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K-) sebesar 5,24. Berdasarkan hasil uji statistik dengan uji *One Way ANOVA* diperoleh hasil signifikan sebesar 0,002 ($p < 0,05$). Dilanjutkan dengan uji Duncan dan diperoleh hasil bahwa kelompok perlakuan konsentrasi 10% (PII) merupakan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh terhadap penyembuhan luka dilihat dari jumlah fibroblas.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan PI, PII dan PIII menunjukkan jumlah fibroblas paling tinggi dibandingkan dengan jumlah fibroblas terendah pada kelompok kontrol. Penggunaan ekstrak daun Mimba yang disuplemen VCO dapat mempengaruhi penambahan nutrisi pada area luka yang dapat mengoptimalkan penyembuhan luka dengan meningkatkan jumlah fibroblas. Rendahnya jumlah fibroblas pada kelompok kontrol kemungkinan disebabkan oleh tidak adanya tambahan zat gizi yang dibutuhkan untuk proses penyembuhan luka.

Kandungan metabolit sekunder pada daun nimba yang mungkin berperan dalam fase proliferasi adalah alkaloid dan triterpenoid. Dimana menurut Reyes et al. (1993) alkaloid dapat menginisiasi fibroblas ke area luka tanpa bantuan makrofag untuk mensintesis *transforming growth factor-β* (TGF-β), sehingga semakin banyak fibroblas di area luka akan meningkatkan sintesis matriks ekstraseluler (ECM) dan mempercepat penutupan luka. Pada penelitian yang dilakukan oleh Wu et al. (2012) bahwa komponen triterpenoid dapat membantu fibroblas untuk mensintesis kolagen tipe I dan tipe III, yang mana menurut Sabirin et al. (2013) bahwa kolagen fibrosa tipe III mulai disintesis pada fase proliferasi oleh fibroblas yang distimulasi oleh *growth factor* (TGF-β) dari sel fibroblas dan makrofag sendiri. Semakin banyak jaringan ikat pada luka, maka daya kontraksi luka akan semakin besar sehingga sisi luka akan tertarik dan menyebabkan area luka mengecil (Prasetyo et al., 2010). Fibroblas mensekresikan growth factor akan meningkat pada hari ke 7-14 pasca luka seiring dengan jumlah fibroblas pada hari ke 7 (Sabirin et al., 2013). Fibroblas mensintesis dan melepaskan glikosaminoglikan dan proteoglikan yang juga merupakan komponen penting matriks ekstraseluler. Bersamaan dengan itu terjadi angiogenesis (regenerasi vaskular) dengan terpakainya matriks yang telah lengkap. Kepadatan fibroblas pada luka akut mencapai maksimum antara hari ke 7 sampai dengan hari ke 14 pasca luka terjadi (Robson et al., 2001).

Angiogenesis atau proses pembentukan pembuluh darah terjadi untuk mensuplai nutrisi dan faktor penyembuhan pada area luka. Angiogenesis memediasi migrasi fibroblas ke dalam jaringan luka. Peningkatan jumlah fibroblas merupakan indikator proses penyembuhan luka yang lebih cepat yang

merupakan hasil dari limfokin yang diinduksi dan disekresikan oleh limfosit CD4+. Limfosit CD4+ berperan sebagai promotor penyembuhan bagi respon imun. Berkurangnya jumlah limfosit CD4+ akan menurunkan ketegangan kulit dan komponen matriks ekstraseluler (Prakoso dan Kurniasih, 2018). Angiogenesis ditandai dengan migrasi pembentukan endotel dan kapiler. Pembuluh darah baru akan terbentuk ke dalam matriks kolagen yang dibentuk oleh fibroblas (Prasetyono, 2009). Kolagen merupakan komponen protein utama jaringan ikat luka akut. Berbagai modifikasi komposisi kimia kolagen menentukan fungsinya sebagai jaringan struktural utama tubuh yang akan mengikat jaringan (Robson et al., 2001). Pada hari ke-7, sel inflamasi dan makrofag mulai bermigrasi bersama dengan sel fibroblas ke dalam jaringan luka. Fibroblas akan berproliferasi dengan bantuan faktor pertumbuhan, terutama *transforming growth factor-β* (TGF-β) dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) yang disekresikan oleh trombosit dan makrofag. Makrofag akan mengalami pengurangan jumlah sebagai akibat perbaikan jaringan yang akan dilanjutkan oleh fibroblas, sel endotel, dan keratinosit (Sabirin et al., 2013). Berdasarkan pengamatan histologis, rata-rata jumlah limfosit pada tikus pada kelompok kontrol perlakuan K-, K+, dan kelompok perlakuan PI, PII, dan PIII pada hari ke-14 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah rata-rata limfosit dalam sampel histologi kulit tikus

Kelompok	Limfosit ± SD Hari ke-14
K(-)	5,08 ^a ± 2,96
K(+)	4,08 ^a ± 2,04
PI	11,02 ^c ± 3,97
PII	19,22 ^b ± 3,63
PIII	13,45 ^b ± 4,98

Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa nilai rerata jumlah limfosit tertinggi pada hari ke-14 terdapat pada kelompok perlakuan konsentrasi 10% (PII) yaitu sebesar 19,22, sedangkan nilai rerata terendah terdapat pada kelompok perlakuan kontrol positif (K+) yaitu sebesar 4,08. Berdasarkan hasil uji statistik diperoleh hasil signifikan sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Dilanjutkan dengan uji Duncan dan hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan

konsentrasi 10% (PII) merupakan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh terhadap penyembuhan luka dilihat dari jumlah limfosit.

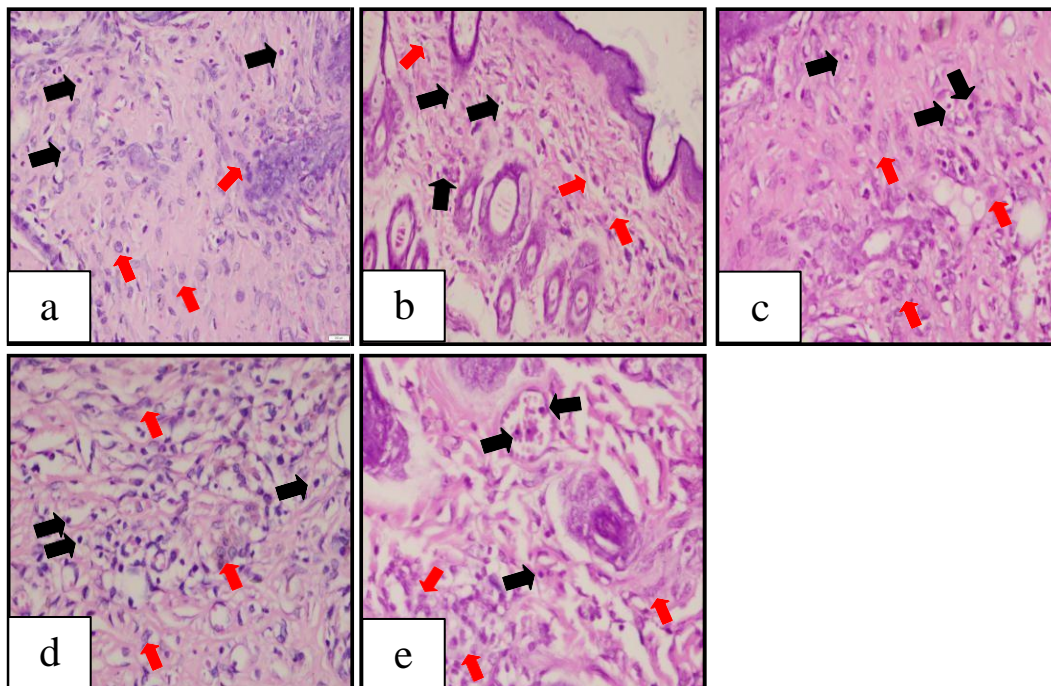
Tabel 3 menunjukkan bahwa kelompok perlakuan PI, PII dan PIII menunjukkan jumlah limfosit tertinggi dibandingkan dengan jumlah limfosit terendah pada kelompok kontrol. Pengaruh ekstrak daun mimba terhadap jumlah limfosit ditunjukkan dengan semakin rendah konsentrasi ekstrak maka jumlah limfosit semakin tinggi. Kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun nimba yang disuplemen VCO kemungkinan dapat mempercepat terjadinya fase inflamasi yang terlihat dari tingginya jumlah limfosit pada kelompok perlakuan ekstrak daun nimba yang disuplemen VCO yang dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh mikroorganisme pada area luka.

Salah satu kandungan gizi yang tinggi pada tanaman nimba adalah vitamin A (Kumar et al., 2014) yang dapat berperan dalam mempercepat fase inflamasi menuju fase proliferasi dengan cara meningkatkan monosit, limfosit dan makrofag ke area luka yang akan mengeluarkan bakteri dari area luka dan menghasilkan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk proliferasi sel fibroblas dan angiogenesis (Martin dan Muir, 1990; Negara et al., 2014). Pada kelompok kontrol negatif dan positif jumlah limfosit cukup rendah sehingga menyebabkan proses penyembuhan luka menjadi tertunda, kemungkinan hal ini disebabkan oleh munculnya infeksi yang cukup besar pada saat fase inflamasi yang disebabkan oleh adanya mikroorganisme di area sekitar luka dan infeksi kuman pada tikus yang membutuhkan waktu lebih lama untuk membunuh kuman tersebut tetapi tidak sebanding dengan jumlah limfosit yang ada.

Limfosit pada tikus muncul paling lambat 2 hari setelah luka terjadi, jumlahnya bertambah pada hari ke 7 dan akan terus berkurang saat luka masih ada atau sudah sembuh. Limfosit diperlukan untuk penyembuhan luka karena limfosit dapat menjadi pengatur fibroblas melalui makrofag. Limfosit merupakan pengatur utama aktivitas fibroblas dalam penyembuhan luka baik secara langsung maupun tidak langsung. Pada fase proliferasi, limfosit CD4+ akan menginduksi keratinosit untuk melepaskan interleukin IL-1 guna merangsang sel endotel membentuk angiogenesis dan fibroblas yang

selanjutnya akan membentuk matriks ekstraseluler (Martin dan Muir, 1990). Pada fase proliferasi, limfosit CD4+ akan menginduksi keratinosit untuk melepaskan interleukin IL-1 guna merangsang sel endotel untuk membentuk angiogenesis dan fibroblas yang selanjutnya akan membentuk matriks ekstraseluler. Keratinosit berperan penting dalam re-epitelialisasi, proliferasi dan pematangan epidermis. IL-1 yang telah dilepaskan oleh keratinosit akan menginduksi sel endotel untuk membentuk angiogenesis dan fibroblas yang akan membentuk matriks ekstraseluler (Prakoso dan Kurniasih, 2018). Pengamatan histologi dilakukan pada preparat kulit mencit pada hari ke-14 dengan mengidentifikasi keberadaan sel fibroblas dan sel limfosit menggunakan perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya.

Histologi fibroblas dan limfosit preparat kulit tikus hari ke 14 dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.:



Gambar 2. Histologi fibroblas dan limfosit kulit mencit hari ke-14 dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dan perbesaran 400x (a) kontrol negatif; (b) kontrol positif; (c) Ekstrak daun nimba yang disuplemen VCO dengan konsentrasi 5%; (d) Ekstrak daun nimba yang disuplemen VCO dengan konsentrasi 10%; (e) Ekstrak daun nimba yang disuplemen VCO dengan konsentrasi 15%, (➡) fibroblas (➡) limfosit.

Menurut Balqis et al., (2014) bahwa pada hari ke 14 penyembuhan luka pada tikus masih terlihat infiltrasi sel radang dan serat kolagen sudah menyebar. Pada jaringan normal jarang ditemukan sel fibroblas. Setelah luka terjadi, fibroblas akan aktif bermigrasi ke area luka yang akan berproliferasi menghasilkan kolagen yang berperan dalam pembentukan jaringan. menghasilkan kolagen yang berperan dalam pembentukan jaringan baru hingga kulit kembali normal. Terbentuknya kolagen yang disebabkan oleh bertambahnya jumlah fibroblas yang aktif menuju area luka menandakan bahwa luka berada pada tahap proliferasi fibroblas. Pengamatan Ketebalan Epitel pada Sediaan Histologi Kulit Mencit (*Mus musculus*) Pengamatan histologi ketebalan epitel mencit pada sediaan histologi kulit mencit dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Mikroskop Olympus BX 53) yang dihubungkan dengan kamera dan pengamatan dilakukan melalui monitor komputer. Pengamatan ketebalan epitel diukur dari lapisan stratum korneum sampai stratum basale. Data rata-rata ketebalan epitel mencit pada kelompok kontrol K-, K+, dan kelompok perlakuan PI, PII dan PIII pada hari ke-14 dapat dilihat pada Tabel 3.

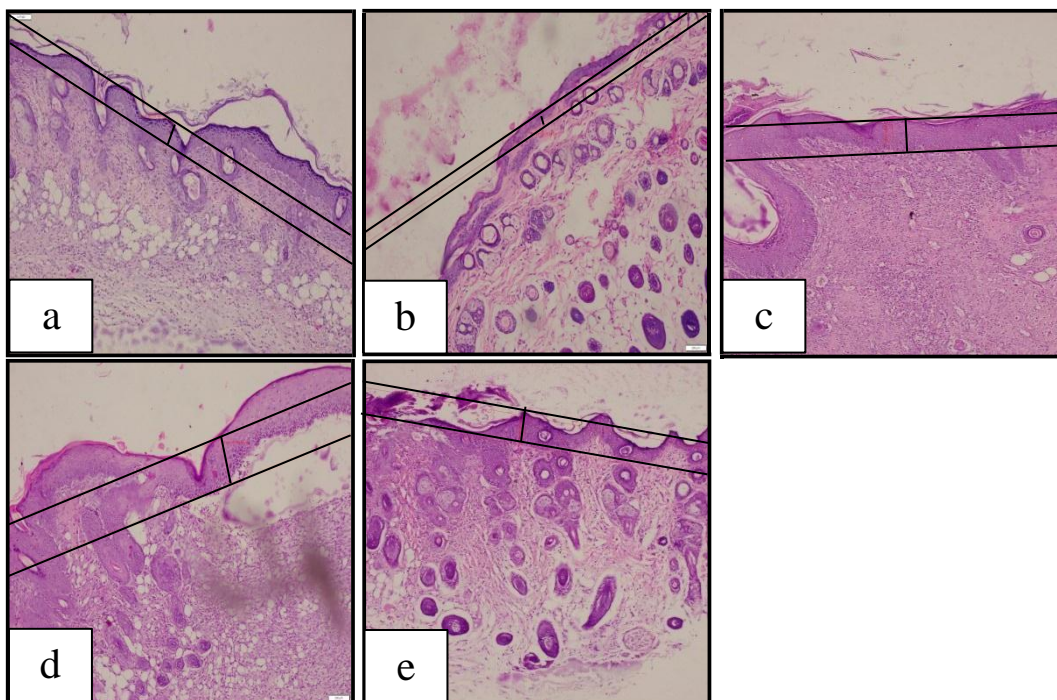
Tabel 3. Rata-rata ketebalan epitel pada preparat histologi kulit tikus

Kelompok	Ketebalan epitel \pm SD (μm) Hari ke-14
K-	85,10 ^a \pm 25,11
K+	100,90 ^{ab} \pm 39,99
PI	165,19 ^c \pm 38,22
PII	173,26 ^c \pm 40,25
PIII	156,38 ^{bc} \pm 47,60

Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa rata-rata tebal epitel kulit tikus hari ke-14 paling tinggi pada kelompok perlakuan konsentrasi 10% (PII) yaitu sebesar 173,26 μm sedangkan yang terendah pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K+) yaitu sebesar 85,10 μm . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan hasil yang signifikan sebesar 0,010 ($p < 0,05$). Dilanjutkan dengan uji Duncan dan hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan konsentrasi 10% (PII) paling berpengaruh terhadap penyembuhan luka dilihat dari tebal epitelnya.

Dari Tabel 3 bahwa tebal epitel pada kelompok kontrol negatif memiliki nilai yang rendah kemungkinan dikarenakan tidak adanya zat yang dapat menghambat bakteri pada daerah sekitar luka. Pada kelompok kontrol tidak dilakukan penambahan nutrisi pada kontrol negatif dikarenakan tidak adanya penambahan perlakuan dan kontrol positif dikarenakan tidak adanya nutrisi povidone iodine yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Kelompok perlakuan PI, PII, PIII menunjukkan ketebalan epitel yang tinggi. Ketebalan epitelisasi dapat menunjukkan proses re-epitelisasi yang lebih cepat, sehingga mempengaruhi kecepatan penyembuhan luka. Proses re-epitelisasi yang cepat pada kelompok perlakuan dapat dipengaruhi oleh kandungan senyawa kimia dalam daun nimba seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi et al. (2015) bahwa pemberian ekstrak kuncup bunga cengkeh yang mengandung eugenol, vitamin A, C, E, tanin dan saponin dapat membantu proses re-epitelisasi pada luka dengan meningkatkan diferensiasi sel epitel.

Hasil pengamatan histologi sediaan kulit mencit pada hari ke-14 dapat dilihat pada Gambar 3 berikut ini:



Gambar 3. Histologi ketebalan epitel kulit tikus pada hari ke-14 dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dan perbesaran 100x (a) kontrol negatif; (b) kontrol positif; (c) ekstrak daun nimba yang diberi suplemen VCO pada konsentrasi 5%; (d) ekstrak daun nimba yang diberi suplemen VCO pada konsentrasi 10%; (e) ekstrak daun nimba yang diberi suplemen VCO pada konsentrasi 15%

Tanaman nimba mengandung efek antioksidan dan metabolit seperti alkaloid yang memiliki efek antibakteri dan vitamin A tinggi yang dapat menjaga integritas kulit (Kumar et al., 2014), serta berperan dalam proses penyembuhan luka dengan meningkatkan pembentukan kolagen, diferensiasi sel epitel dan meningkatkan imunitas (Negara et al., 2014). Efek antioksidan dapat menebalkan lapisan epitel. Pergantian jaringan epitel terjadi pada permukaan sel epitel yang terus-menerus mengalami kematian sel. Epitel memiliki daya pertahanan yang tinggi terhadap benda asing (Yohana, 2015).

KESIMPULAN

Luka yang diberi perlakuan VCO konsentrasi 10% dikombinasikan dengan ekstrak daun nimba (PII) memberikan penyembuhan paling cepat. Rata-rata ketebalan epitel, jumlah fibroblas dan jumlah limfosit pada kelompok perlakuan VCO kombinasi ekstrak daun nimba konsentrasi 10% (P2) lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lainnya dengan hasil analisis statistik yang signifikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak sehingga penelitian ini dapat selesai sebagaimana yang diharapkan.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini.

REFRENSI

- Asrul, N. A. M., Rivai, A. T. O., Syisnawati, S., & Haristiani, R. (2023). Ekstrak Moringa Oleifera Mempercepat Proses Penyembuhan Luka: *Systematic Review*. *Jurnal Farmasetis*, 12(2), 187-194.
- Dafriani, P., Niken, N., Ramadhani, N., & Marlinda, R. (2020). Potensi Virgin Coconut Oil (VCO) Pada Minyak Herbal Sinergi (MHS) Terhadap Ulkus Diabetes. *Jurnal Kesehatan Perintis*, 7(1), 51-56.
- Dewi, A. A. L. N., Wati, N. L. C., & Dewi, N. M. A. (2017). Uji Efektivitas Larvasida Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Terhadap Larva Lalat

- Sarcophaga Pada Daging Untuk Upakara Yadnya di Bali. *JST (Jurnal Sains dan Teknologi)*, 6(1).
- Ferdina, R., Busman, B., & Putri, R. A. (2022). Penggunaan Obat Kumur Povidone Iodine Sebagai Tindakan Pra-Prosedural Untuk Mengurangi Risiko Penularan Covid-19. *Menara Ilmu: Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah*, 16(2), 77-83.
- Hafizsha, N. I., Gunanti, G., Noviana, D., & Widhyari, S. D. (2021). Konsentrasi IL-6 Serum terhadap Penyembuhan Luka Pasca Pemasangan Implan Paduan Logam pada Babi (*Sus scrofa*). *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 9(1), 21-29.
- Ibrenna, G. M., Silalahi, J., Yuandani, & Satria, D. (2023). Wound Healing Potential of Formulated Ointment by Using Virgin Coconut Oil in Combination with Ethanol Extract of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Leaves. Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(8), 3530-3534.
- Jasmine, J., Purwanto, D. S., & Kaligis, S. H. (2022). Peran Interleukin-6 sebagai Faktor Prediktif Derajat Keparahan COVID-19. *eBiomedik*, 10(1), 98-106.
- Jaharuddin, N. F. (2020). Efektivitas Aplikasi Topikal Madu Hutan dan Propolis terhadap Penyembuhan Luka Pada Mencit (*Mus musculus*). *Alami Journal (Alauddin Islamic Medical) Journal*, 4(2), 1-9.
- Karta, I. W., & Burhannudin. (2022). Suplementasi Produk Olahan Kelapa Virgin Coconut Oil (VCO) Dengan Ekstrak Daun Neem (*Azadirachta indica*) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Jerawat *Propionibacterium Acnes*. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 19(1), 1-26.
- Karta, I. W., Jannah, S. Y., & Burhannudin. (2022). Uji Fitomikia dan Uji Repellent Virgin Coconut Oil (VCO) yang Tersuplementasi Minyak Atsiri Serai Wangi (*Citronella oil*). *Meditory*, 10(1), 54-63.
- Kartika, R. W. (2015). Perawatan Luka Kronis dengan Modern Dressing. *Dunia Kedokteran*, 42-46.
- Kaur, R., Kaur, S., & Puri, S. (2021). A Comprehensive Review on Medicinal Properties of *Azadirachta indica*. *Journal of Phytochemistry and Pharmacology*, 10(4), 320-328.
- Masfufatun, M., Tania, P. O. A., Raharjo, L. H., & Baktir, A. (2018). Kadar IL-6 dan IL-10 Serum pada Tahapan Inflamasi di *Rattus norvegicus* yang terinfeksi *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 30(1), 19-23.
- Nurmalasari, Y., Nofita, N., Warganegara, E., & Sijabat, A. I. (2020). Artikel Penelitian Perbandingan Air Perasan *Daucus Carota L.* Dengan Povidone Iodine Topikal Dalam Penyembuhan Luka Insisi Mencit. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 9(2), 673-679.
- Primadina, N., Basori, A., & Perdanakusuma, D. S. (2019). Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler. *Qanun Medika: Jurnal Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya*, 3(1), 31-43.

- Sarihati, I. G. A. D., Cahyani, K. I. S., Arjani, I. A. S., Kurniawan, S. B., & Bekti, H. S. (2020). Gambaran Kadar Serum Interleukin-6 pada Perokok Aktif. *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 8(2), 109-120.
- Sharma, R., Bhatnagar, M., & Gupta, R. (2019). Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Leaves: A Review. *International Journal of Pharmacology*, 15(5), 520-526.
- Shihotang, T. F., Jayawardhita, A. A. G., & Berata, D. I. (2019). Efektivitas Pemberian Gel Ekstrak Daun Binahong terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Insisi Mencit Diabetes. *Indonesia Medicus Veterinus*, 8(2019), 456-463.
- Surya, W. A., Ali, H., & Aprilia, D. (2023). Pengaruh Ekstrak Kemangi (*Ocimum basilicum*) Terhadap Ekspresi Interleukin-6 Tikus Diabetes Melitus Gestasional. *Jurnal Ilmu Kesehatan Indonesia*, 4(2), 109-114.
- Suarni, L., & Fitarina, F. (2019). Perbandingan Penyembuhan Ulkus Diabetik dengan Menggunakan Minyak Kelapa Murni, Madu, dan Produk Farmasi. *Jurnal Kesehatan*, 10(2), 231-235.
- Zulkarnain, O., Yusra, S., & Cahyanto, H. N. (2023). Pengaruh Penggunaan Topikal Kandungan Zink terhadap Proses Penurunan Inflamasi pada Ulkus Diabetik Pasien Home Care Surabaya. *Jurnal Ilmiah Ilmu dan Teknologi Rekayasa*, 5(1), 14-20.