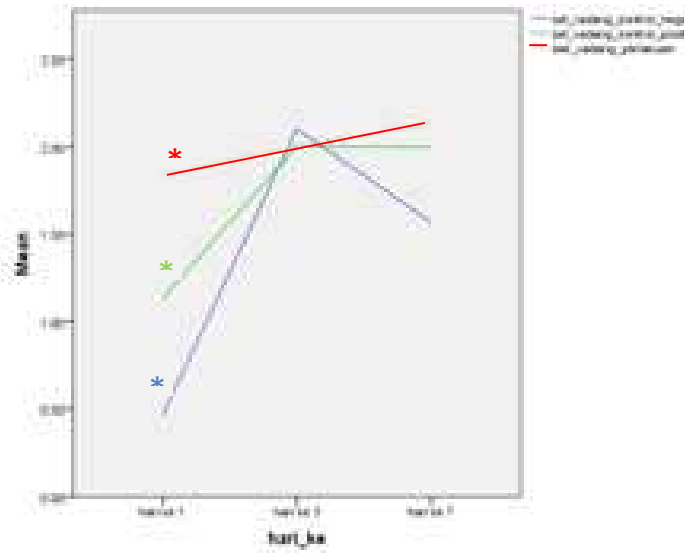


BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Jumlah Sel Radang



Gambar 6.1 Grafik perbandingan jumlah sel radang pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo (merah)

Sel radang terutama makrofag diketahui memegang peranan penting dalam proses perbaikan jaringan. Reduksi pada infiltrasi makrofag berhubungan erat dengan kejadian memanjangnya fase penyembuhan luka (Chen, Tredget, Wu, Wu, 2008). Peningkatan jumlah sel radang yang signifikan ditemui pada hari ke-1 paska perlakuan pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo dibandingkan dengan luka yang diterapi dengan minyak pelarut minyak tradisional Karo dan luka yang diterapi dengan Kasa PZ, seperti yang ditunjukkan pada gambar 6.1. Kemungkinan terjadi percepatan perubahan netrofil menjadi makrofag dalam 24 jam

pertama, tampak jumlah sel makrofag meningkat signifikan pada luka yang diterapi minyak tradisional Karo.

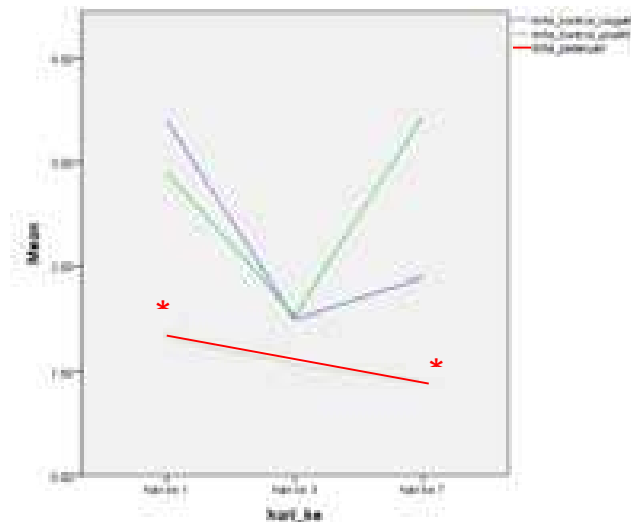
Normalnya pada luka yang diterapi dengan kasa PZ, sel radang yang keluar pertama sekali adalah sel netrofil dan hal ini akan berlangsung hingga 72 jam pertama pasca luka terjadi. Adanya sel netrofil yang memanjang pada luka akan memperpanjang fase inflamasi karena netrofil mengeluarkan enzim yang mendegradasi jaringan sehingga proses deposit matrix ekstraseluler dan sintesis kolagen untuk mengisi jaringan luka akan terhambat karena enzim dari netrofil ini mendegradasi kolagen. (Menke, Ward, Witten, Bonchev, & Diegelmann, 2007).

Sementara itu hal ini tidak terjadi pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo karena kandungan bahan aktif dari minyak ini menekan produksi sel radang netrofil dan merangsang diferensiasi sel-sel monosit menjadi sel radang makrofag, hal ini berlangsung konsisten dari hari ke-1 hingga hari ke-7 dimana pada keadaan normal mulai terjadi pada hari ke-3. Hal ini membuktikan bahwa senyawa aktif pada minyak tradisional Karo berupa senyawa monoterpene bersifat sebagai regulator fase inflamasi, anti bakteri dan jamur, antioksidan, anti *hypernociceptive* juga berfungsi sebagai *macrophage-activating substance* (Chen et al., 2008; Kummer, 2015).

Kandungan bahan aktif minyak tradisional Karo ini terbukti meregulasi fase inflamasi dengan menekan produksi sitokin inflamasi ditandai dengan rendahnya ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α dan IL-10 di hari ke-1 pasca perlakuan (Kummer, 2015), dan merangsang diferensiasi sel monosit serta produksi sel radang

makrofag tipe-2 dan mengaktifkannya, yang ditandai dengan peningkatan sitokin anti inflamasi IL-10 mulai dari hari ke-1 sampai ke-7 paska perlakuan sekaligus mengeluarkan *growth factors* yang merupakan kunci regulasi dari proses penyembuhan luka (Kim et al., 2015; Krzyszczyk, Schloss, Palmer, & Berthiaume, 2018).

6.2 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Ekspresi TNF- α



Gambar 6.2 Grafik perbandingan ekspresi sitokin TNF- α pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan Minyak tradisional Karo (merah)

Senyawa α -pinene adalah senyawa regulator inflamasi poten, yang merupakan senyawa utama dari minyak tradisional Karo meregulasi fase inflamasi melalui inhibisi makrofag tipe-1 yang mengekspresikan CD86 dan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6. Produksi sitokin pro-inflamasi, dalam hal ini diwakili oleh ekspresi sitokin TNF- α yang rendah oleh makrofag tipe-1 dari hari ke-1 post perlakuan hingga hari ke-7 post perlakuan menunjukkan trend menurun (gambar 6.2),

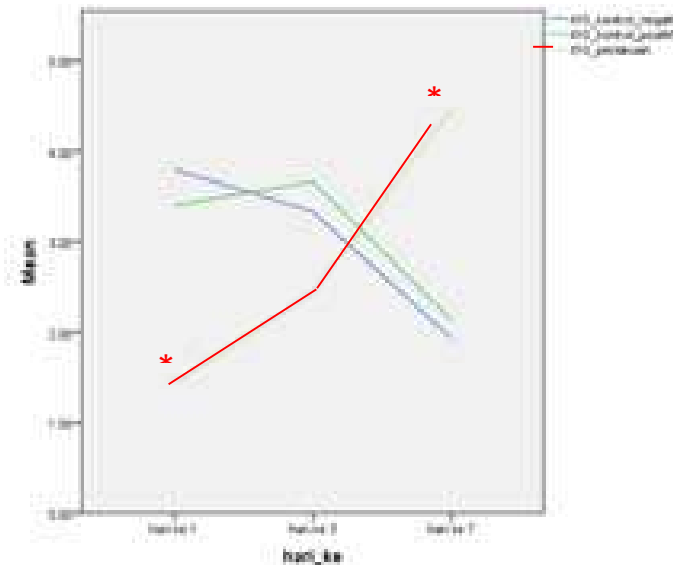
sedangkan pada kedua kelompok lainnya yang diterapi oleh minyak pelarut Minyak tradisional Karo dan kasa lembab tampak penurunan sitokin pro inflamasi TNF- α di hari ke-1 sampai hari ke-3 paska perlakuan dan cenderung meningkat kembali pada hari ke-7 paska perlakuan, seperti yang ditunjukkan pada gambar 6.2. Mekanisme kerjanya adalah senyawa α -pinene dan senyawa terpena lainnya dari minyak tradisional Karo memblokir reseptor TLR 4 pada I κ B kinase sehingga menghambat fosforilasi I κ B, hal ini menghambat aktivasi NF κ B, IKK- β , dan terjadi supresi MAPK pathway melalui penurunan fosforilasi MAPK (ERK dan JNK), sehingga ekspresi mediator pro-inflamasi seperti TNF- α salah satunya ditekan agar tidak berlebihan. (Kim et al., 2015; Krzyszczyk et al., 2018; Kummer, 2015; Lee, Ayoub, & Agrawal, 2016; Pastar et al., 2014; Rufino et al., 2014).

TNF- α dalam level tertentu ini juga ikut berperan dalam proses re-epitelialisasi melalui mekanisme menjaga stabilitas sinyal aktivasi keratinosit oleh sitokin IL-1 dan merangsang ekspresi K6 melalui transkripsi factor NF κ B dan C/EBP β , serta secara tidak langsung merangsang sekresi sitokin FGF-7 oleh sel-sel (Michopoulou & Rousselle, 2015).

6.3 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap IL-10

Kandungan senyawa *bicyclic* terpena dalam minyak tradisional Karo, dalam hal ini senyawa α -pinene, δ -3-carene, sabinene, dan camphene terbukti mempercepat resolusi reaksi inflamasi lewat peningkatan produksi makrofag tipe-2 dan senyawa anti-inflamasi yang ditandai dengan trend peningkatan ekspresi sitokin IL-10 secara

signifikan dibandingkan kedua kelompok lainnya, dari hari-1 post perlakuan sampai puncaknya di hari ke-7 post perlakuan seperti yang ditunjukkan pada gambar 6.3 dibawah ini (Krzyszczuk et al., 2018; Lee et al., 2016).



Gambar 6.3 Grafik perbandingan ekspresi sitokin IL-10 pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan Minyak tradisional Karo (kuning)

Dimana sitokin IL-10 ini adalah sitokin anti-inflamasi untuk meregulasi fase inflamasi, anti angiogenik sekaligus sebagai regulator dari deposisi matriks ekstraseluler yang menghasilkan penyembuhan luka tanpa jaringan parut (*scar-free healing*) (Werner & Grose, 2003). Dengan ditemukannya peningkatan sitokin IL-10 secara signifikan dihari ke-7 maka ada kemungkinan penyembuhan luka pada luka yang di terapi oleh minyak tradisional Karo akan lebih baik secara estetik karena menimbulkan parut yang halus.

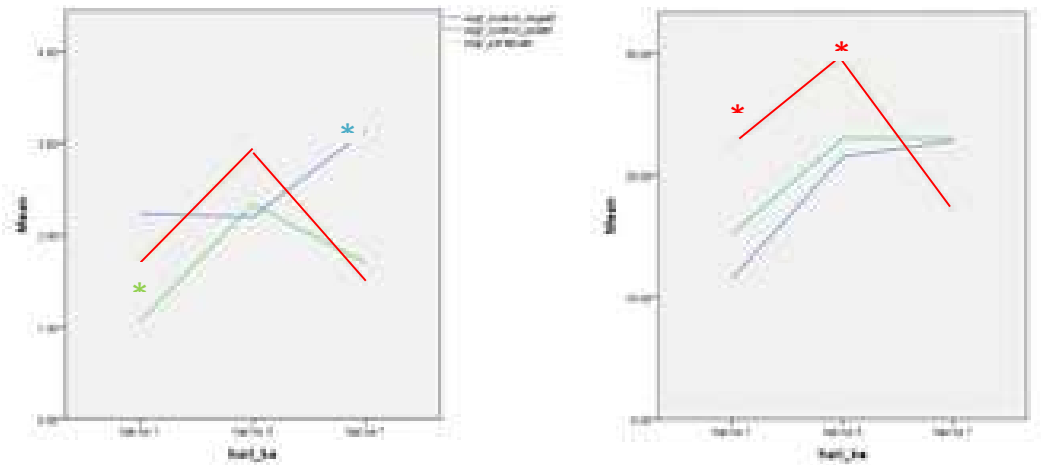
Adapun mekanisme kerjanya adalah senyawa *terpene* dari minyak tradisional Karo menstimulasi reseptor TLR 3 dan menghambat jalur COX-2 sehingga merangsang pengeluaran sitokin anti-inflamasi, hal ini merangsang polarisasi

makrofag dari tipe-1 menjadi tipe-2 dan terjadi respon anti-inflamasi dan proses penyembuhan jaringan (Lee et al., 2016). Sehingga dapat diambil suatu kesimpulan bahwa minyak tradisional Karo mempercepat proses polarisasi sel radang makrofag dari Makrofag tipe-1 yang mengekspresikan CD86 dan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6 dan INF- γ , menjadi makrofag tipe-2b dikenal juga dengan makrofag tipe-2 atau wound healing macrophage yang mengekspresikan CD 86 dan sitokin anti inflamasi IL-10 dengan trend yang meningkat secara signifikan, growth factor TGF- β , dan beberapa MMP, serta mengekspresikan sitokin pro-inflamasi TNF- α , dan IL-6 dalam jumlah kecil.

Adanya makrofag tipe 2b yang mengekspresikan IL-10 dan TGF- β akan menstimulasi makrofag tipe 2c yang mengekspresikan CD 206 dan sitokin anti-inflamasi IL-10, MMP-9 IL-1 β , dan TGF- β dalam jumlah yang besar, dan sitokin pro-inflamasi IL-12 dalam jumlah kecil, sehingga mempercepat transisi proses penyembuhan luka dari fase inflamasi ke fase proliferasi dimana pada luka yang diterapi dengan kasa PZ terjadi setelah hari ke-3 tetapi pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo mulai tampak pada hari ke-1 (Krzyszczuk et al., 2018; Lee et al., 2016; Velnar, Bailey, & Smrkolj, 2009).

6.4 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Ekspresi VEGF dan Jumlah Angiogenesis

Angiogenesis ini merupakan tahapan penting dalam proses penyembuhan luka, dimana pembentukan pembuluh darah baru diperlukan untuk pembentukan jaringan granulasi dan survival dari sel-sel keratinosit (Chen et al., 2008).



Gambar 6.4 Grafik perbandingan ekspresi sitokin VEGF (kiri) dan jumlah angiogenesis (kanan) pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan Minyak tradisional Karo (merah)

Peningkatan angiogenesis yang signifikan terjadi pada luka yang diterapi minyak tradisional Karo pada hari-1 dan hari-3 post perlakuan dibandingkan dengan luka yang diterapi dengan minyak pelarut dari minyak tradisional Karo dan kasa PZ, dan mengalami penurunan di hari ke-7 post perlakuan, hal ini akan mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan pertumbuhan serta migrasi sel-sel keratinosit pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo.

Dari analisis jalur pada bab 5 diketahui bahwa peningkatan angiogenesis yang terjadi bukan dikarenakan rangsangan dari peningkatan ekspresi sitokin VEGF karena yang menginduksi VEGF salah satunya adalah sitokin pro inflamasi seperti $TNF-\alpha$, sedangkan sitokin ini ditekan produksinya oleh senyawa aktif dari minyak tradisional Karo sehingga tidak dapat menginduksi sitokin VEGF (Joao De Masi et al., 2016; Krzyszczyk et al., 2018). Jadi peningkatan sitokin VEGF ini adalah akibat dirangsang oleh sitokin $TGF-\beta$ yang mempunyai efek merangsang terjadinya angiogenesis

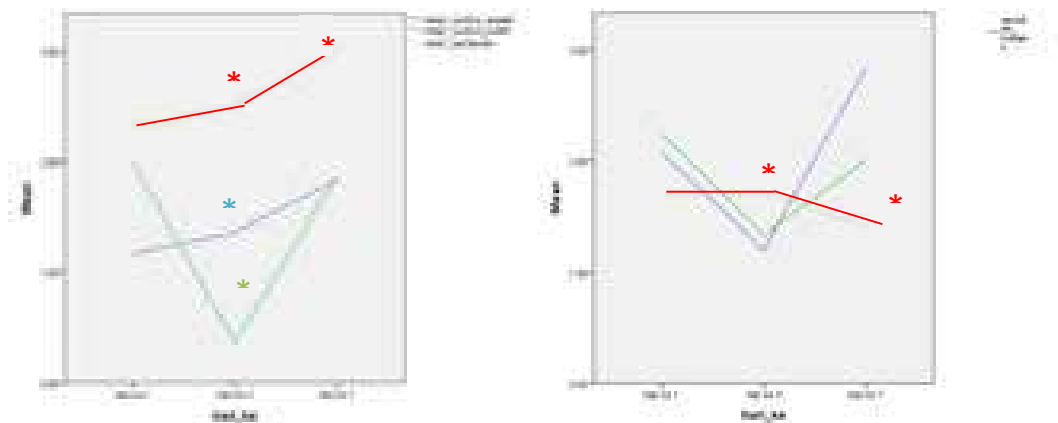
diekspresikan oleh makrofag tipe 2b seperti yang ditunjukkan oleh gambar 5.49 (Krzyszczuk et al., 2018).

Akibat ditekannya sitokin IL-10 mengakibatkan efek anti-angiogenik sitokin ini menurun dan terjadi peningkatan angiogenesis signifikan di hari pertama pada luka yang diterapi dengan Minyak tradisional Karo seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.49. Sedangkan penurunan angiogenesis di hari ke-7 paska perlakuan ini diakibatkan efek anti-angiogenik dari sitokin anti inflamasi IL-10 yang meningkat di hari ke-7 paska perlakuan yang diekspresikan oleh sel radang makrofag tipe-2b dan 2c dan penurunan kadar sitokin TGF- β akibat rangsangan dari senyawa *terpene* minyak tradisional Karo (Werner & Grose, 2003). Penurunan angiogenesis ini juga diakibatkan oleh peningkatan akumulasi kolagen dalam proses pematangan jaringan parut atau skar, sekaligus sebagai penanda bahwa proses proliferasi sudah hampir selesai sehingga produksi VEGF dan proses angiogenesis menurun agar tidak membentuk jaringan granulasi yang berlebihan (King, Balaji, Le, Crombleholme, & Keswani, 2014; Silvestre et al., 2000; Velnar et al., 2009).

Selain itu makrofag tipe-2 ini juga memposisikan diri mereka disamping pembuluh darah yang baru terbentuk untuk menambah stabilitas dan merangsang penyatuan antar sel yang menyusun pembuluh darah baru tersebut (King et al., 2014; Krzyszczuk et al., 2018). Jadi naik-turunnya proses angiogenesis pada luka yang diolesi minyak tradisional Karo seperti pada gambar 6.4 ini dipengaruhi oleh ekspresi sitokin TGF- β , IL-10 dan densitas kolagen, bukan oleh VEGF (Silvestre et al., 2000; Velnar et al., 2009).

6.5 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Ekspresi MMP-1 dan Densitas Kolagen

Senyawa *terpene* lainnya didalam minyak tradisional Karo merangsang makrofag tipe-2, sel keratinosit basal dan endotel mengekspresikan sitokin MMP-1, yang meningkat dengan signifikan mulai hari ke-1, dan cenderung meningkat sampai hari ke-7 untuk merangsang pembentukan densitas dan deposisi kolagen, sintesis serta remodeling matriks ekstraseluler pada celah luka dan berperan dalam proses siklus adesi dan retraksi sel. ekspresi MMP-1 sangat penting untuk epitelisasi yang tepat, karena endopeptidase yang mengandung multi-domain ini diperlukan untuk penyelesaian beberapa fitur regenerasi epidermis yang tepat. MMP-1 memainkan peran kunci dalam proses pengendalian migrasi dan siklus perlekatan dan retraksi keratinosit. (Michopoulou & Rousselle, 2015).



Gambar 6.5 Grafik perbandingan ekspresi sitokin MMP-1 (atas) dan densitas kolagen (bawah) pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo (merah)

Peningkatan MMP-1 dari hari ke-1 yang terlihat pada gambar 6.5 ini juga dipengaruhi oleh peningkatan sitokin TGF- β dan EGF dalam rangka merangsang peningkatan migrasi sel-sel keratinosit (Pastar et al., 2014). Hal ini membuktikan

bahwa fase proliferasi sudah dimulai pada hari ke-1 paska perlakuan pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo dan sitokin MMP-1 stabil tetap meningkat hingga hari ke-7 sehingga celah luka cepat menutup karena epitel mudah merambat akibat kolagenisasi tidak berlebihan, dibandingkan luka yang diterapi dengan minyak pelarut minyak tradisional Karo dan kasa PZ.

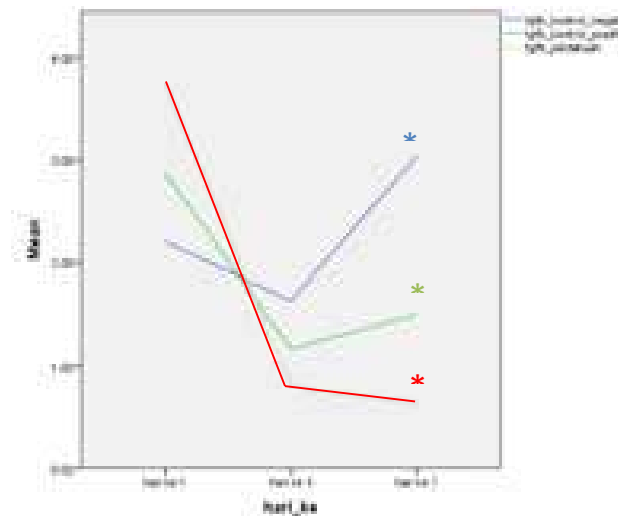
Tampak densitas kolagen yang terbentuk dari hari ke-1 sampai hari ke-7 paska perlakuan dengan minyak tradisional Karo lebih stabil dan cenderung tidak meningkat jika dibandingkan dengan Luka yang diterapi dengan kasa PZ, dimana tampak peningkatan signifikan densitas kolagen pada hari ke-7, hal ini bisa memicu terjadinya hipergranulasi, skar hipertrofik atau bahkan keloid pada luka yang diterapi dengan kasa lembab. Hal ini tidak dijumpai pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo karena keseimbangan yang diciptakan oleh peningkatan sitokin MMP-1 yang efeknya di regulasi oleh peningkatan sitokin IL-10, dan kemungkinan kadar sitokin TIMP yang juga meningkat disertai penurunan dari sitokin TGF- β yang signifikan mulai hari ke-3 paska perlakuan (Menke et al., 2007).

Kekurangan dari penelitian ini adalah belum ditelitinya kadar TIMP (*Tissue Inhibitor Metallo Proteinase*) yang menciptakan keseimbangan antara proses pembentukan kolagen dan degradasi matriks ekstraseluler provisional untuk pematangan skar. Namun jika dilihat dari grafik densitas kolagen pada luka yang di terapi oleh minyak tradisional Karo yang cenderung stabil akibat grafik ekspresi sitokin MMP-1 dan IL-10 yang sama-sama meningkat dihari ke-7. Dimana sitokin IL-10 ini adalah sitokin anti-inflamasi untuk meregulasi fase inflamasi, anti

angiogenik sekaligus sebagai regulator dari deposisi matriks ekstraseluler yang menghasilkan penyembuhan luka tanpa jaringan parut (*scar-free healing*), sehingga tercipta regulasi pembentukan dan pengaturan kolagen. Bahkan bisa jadi ekspresi TIMP juga meningkat mengimbangi ekspresi MMP-1 (Werner & Grose, 2003).

6.6 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Ekspresi TGF- β

Kandungan senyawa *terpene* pada minyak tradisional Karo merangsang ekspresi sitokin TGF- β meningkat walau tidak signifikan pada hari-1 paska pelakuan seperti pada gambar 6.6, melalui masing-masing jalur JNK atau NK- $\kappa\beta$, Smad3 dan p38 (Michopoulou & Rousselle, 2015).



Gambar 6.6 Grafik perbandingan ekspresi sitokin TGF- β pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo (kuning)

Pada 24 jam pertama pasca terjadinya luka, sitokin yang diekspresikan adalah sitokin TGF- β 1 dan TGF- β 2 dari sel platelets, sedangkan TGF- β 3 menyusul merangsang migrasi keratinosit, pembentukan jaringan granulasi dan re-epitelialisasi luka saat memasuki fase proliferasi (Werner & Grose, 2003).

Sitokin TGF- β merupakan sitokin yang berpotensi tinggi merangsang aktifitas sel-sel fibroblast dalam bermigrasi dan berproliferasi membentuk jaringan granulasi dan ekspresi protein matriks ekstraseluler dan integrin, akan tetapi sitokin ini menghambat proliferasi sel keratinosit (Lin, Kondo, Ishida, Takayasu, & Mukaida, 2003; Werner & Grose, 2003). Dengan adanya sitokin ini dalam kadar yang tinggi di hari ke-1 paska perlakuan dengan minyak tradisional Karo menandakan bahwa proses penyembuhan luka sudah dimulai karena ia merangsang peningkatan kemotaksis, mengaktifkan sel makrofag, endotel dan sel fibroblast untuk berproliferasi membentuk kolagen dan jaringan granulasi segera setelah terjadinya luka (Lin et al., 2003; Mustoe et al., 1987; Velnar et al., 2009).

Setelah itu di hari ke-3 kadarnya menurun drastis secara signifikan seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.52 karena diregulasi oleh senyawa aktif dari minyak tradisional Karo sehingga memacu proses proliferasi sel keratinosit (Lin, Kondo, Ishida, Takayasu, & Mukaida, 2003; Werner & Grose, 2003). Hal ini juga menandakan bahwa sudah terjadi polarisasi dari makrofag tipe-1 ke makrofag tipe-2 dan terjadi percepatan fase inflamasi yang hampir bersamaan masuk ke fase proliferasi di hari ke-1 post perlakuan, yang ditandai dengan proses deposisi kolagen, dan remodeling matriks ekstraseluler serta neoangiogenesis sudah dimulai sejak hari ke-1 paska perlakuan .

Peningkatan TGF- β ini kemungkinan adalah TGF- β 1 yang merangsang peningkatan neoangiogenesis secara signifikan di hari pertama, sekaligus merangsang pembentukan kolagen dan deposisi matriks ekstraseluler untuk menutupi celah luka

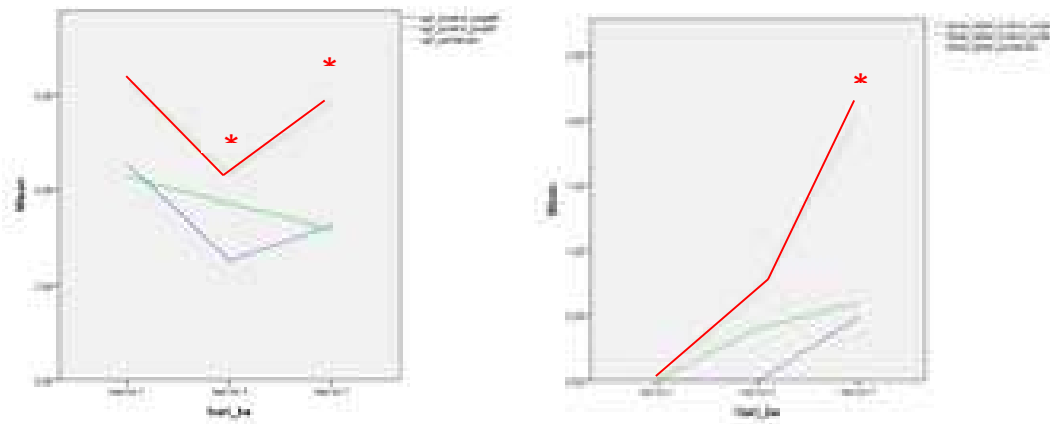
(Landen, Li, & Stahle, 2016; Mustoe et al., 1987; Velnar et al., 2009; Rousselle, Braye, & Dayan, 2018). TGF- β juga mencetuskan migrasi sel-sel keratinosit dengan merangsang produksi sitokin MMP melalui mekanisme regulasi ekspresi JUN oleh keratinosit tersebut tetapi ia menghambat proliferasinya (Michopoulou & Rousselle, 2015; Pastar et al., 2014; Werner & Grose, 2003).

Ekspresi TGF- β kemudian menurun secara signifikan dibandingkan luka yang diterapi dengan kasa lembab dan dengan minyak pelarut minyak tradisional Karo, karena proses autoregulasi yang menandakan bahwa proses proliferasi sudah selesai dan terjadi proses maturasi skar untuk mencegah terjadinya penumpukan kolagen yang berlebihan yang dapat menimbulkan keloid atau hipertrofik skar. Hal ini mungkin terjadi menurut Velnar, 2009 bahwa pada luka yang sama bisa terjadi fase penyembuhan luka yang berbeda pada satu waktu yang bersamaan (Velnar et al., 2009). Sementara pada luka yang diterapi dengan kasa lembab tampak peningkatan kadar TGF- β yang signifikan pada hari ke-7 yang menandakan luka yang diterapi dengan kasa lembab dan luka yang diterapi dengan minyak pelarut minyak tradisional Karo sedang memasuki fase proliferasi dan jika ekspresi sitokin ini meningkat terus menerus akan mengakibatkan terjadinya hipergranulasi dan berpotensi menjadi hipertrofik skar (Pastar et al., 2014; Werner & Grose, 2003).

6.7 Pengaruh Minyak Tradisional Karo Terhadap Ekspresi EGF dan Re-epitelialisasi

Tampak dalam grafik ekspresi sitokin EGF bahwa komponen minyak tradisional Karo merangsang aktivasi sel-sel keratinosit dan peningkatan sel radang

makrofag tipe-2 yang mengeluarkan *growth factor* sejak hari-1 post perlakuan, salah satu *growth factor* tersebut adalah EGF, dimana terjadi peningkatan EGF yang signifikan mulai dari hari ke-3 hingga hari ke-7 paska perlakuan. Hal ini menyebabkan hampir seluruh bagian luka sudah tertutup oleh lapisan *stratified squamous* epitel yang signifikan di hari ke-7 (gambar 6.7) dengan stratum granulosum dan stratum korneum yang intak.



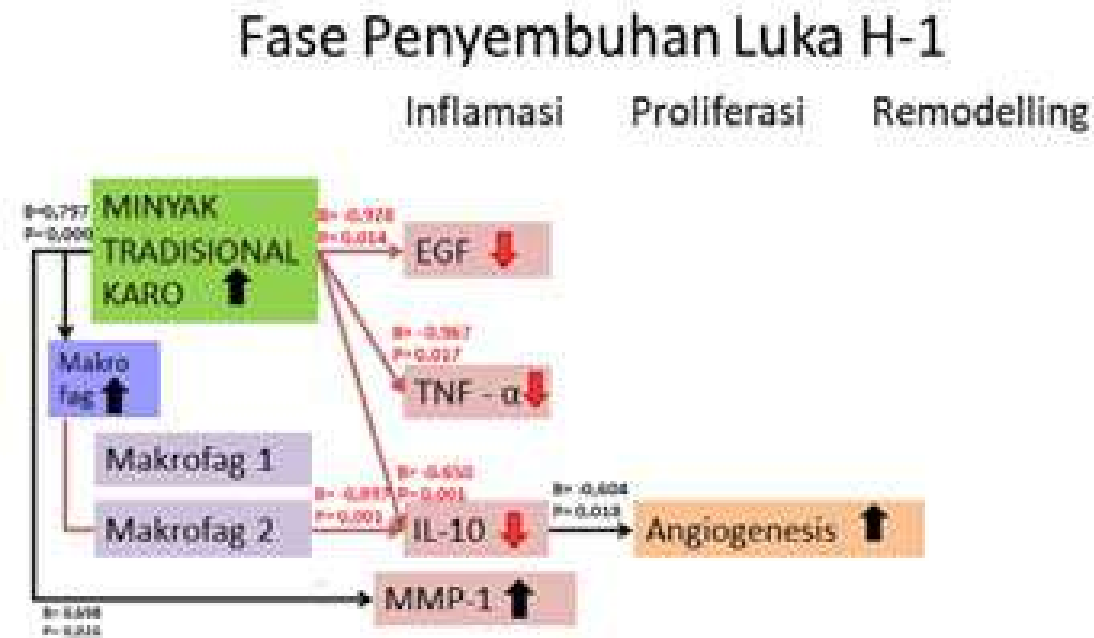
Gambar 6.7 Grafik perbandingan ekspresi sitokin EGF (atas) dan tebal epitel pada proses re-epitelialisasi (bawah) pada luka yang diterapi kasa lembab (biru), luka yang diterapi dengan minyak pelarut (hijau), dan luka yang diterapi dengan Minyak tradisional Karo (kuning)

EGF adalah salah satu sitokin yang merangsang terjadinya percepatan penyembuhan luka melalui stimulasi migrasi dan proliferasi sel keratinosit dan fibroblast pada lapisan dermis lewat aktivasi jalur signalling MAPK, dan peningkatan *tensile strength* pada luka sayat (Brown et al., 1989; Chen et al., 2008; Michopoulou & Rousselle, 2015; Pastar et al., 2014; Rosinczuk, Taradaj, Dymarek, & Sopel, 2016; Rousselle et al., 2018).

Epitelialisasi adalah komponen parameter penting dari suksesnya proses penyembuhan luka. Proses ini terjadi 16-24 jam setelah terjadinya luka, dimana

terjadi aktivasi sel keratinosit basal yang dipengaruhi *growth factors* EGF, TNF- α dan TGF- β (Pastar et al., 2014). TGF- β merangsang ekspresi K5 dan K14 yang mengaktivasi sel-sel keratinosit menjadi hiperproliferatif, sangat mudah bermigrasi, menjadi elastis dan fleksibel, memproduksi *growth factors* dan mengalami penambahan jumlah reseptor pada permukaan selnya. Hal ini ditandai dengan adanya ekspresi K6 dan K16 yang berfungsi membantu sel keratinosit bermigrasi diatas permukaan luka yang telah terisi oleh matriks ekstraseluler serta memproduksi sinyal parakrin untuk merangsang proliferasi sel fibroblast dan sinyal autokrin untuk merangsang sel-sel keratinosit yang berada di tepi luka untuk bermigrasi, menutupi luka sementara sel keratinosit yang berada dibelakang keratinosit yang bermigrasi mulai berproliferasi. (Pastar et al., 2014; Rousselle et al., 2018).

6.8 Mekanisme Kerja Minyak tradisional Karo dan Senyawa Aktif Minyak Tradisional Karo pada Hari ke-1 Post Perlakuan



Gambar 6.8 Mekanisme kerja Minyak tradisional Karo hari ke-1

Pada gambar 6.8 didapatkan hasil analisa jalur mekanisme kerja minyak tradisional Karo yang merupakan gabungan antara minyak kelapa dan senyawa aktifnya. Di hari ke-1 minyak tradisional Karo bekerja dengan :

1. meregulasi produksi EGF sangat kuat dan signifikan dengan nilai ($B = -0,928$; $p = 0,014$).

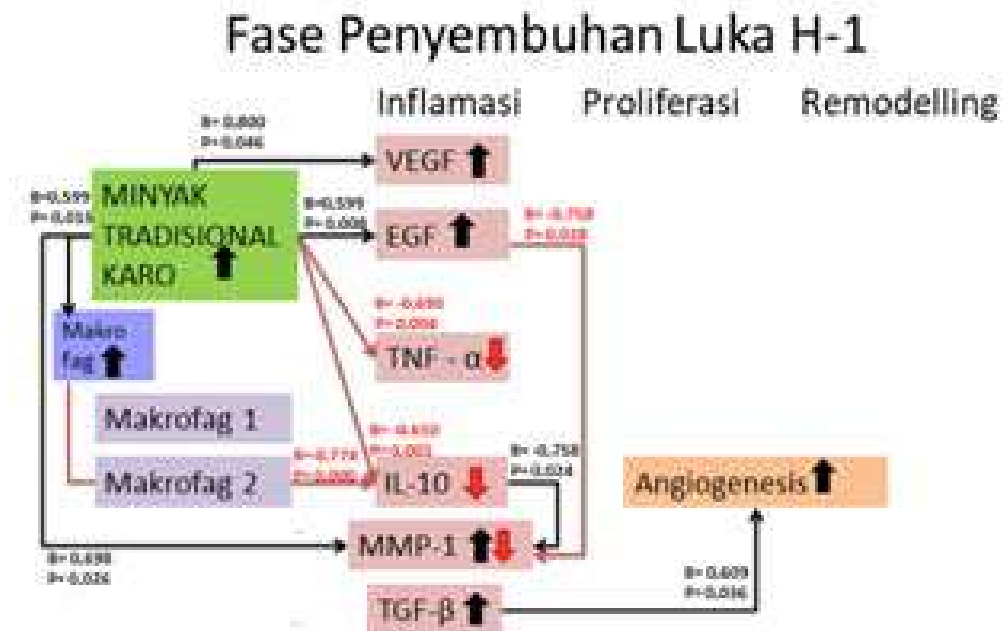
2. meregulasi produksi sitokin IL-10 oleh makrofag tipe-2 sangat kuat dan signifikan. Hal ini ditandai dengan rendahnya sitokin IL10 dan tampak perbedaan analisa jalur yang signifikan antara sel radang dengan IL-10 ($\beta = -0,897$; $p = 0,001$) (Chen et al., 2008; King et al., 2014; Krzyszczyk et al., 2018; Kummer, 2015; Lee et al., 2016).

Dengan rendahnya produksi sitokin IL-10 pada luka yang diterapi dengan Minyak

tradisional Karo efek anti-angiogeniknya akan menurun (King et al., 2014; Silvestre et al., 2000), dan merangsang peningkatan Angiogenesis dengan kuat dan sangat signifikan ($B=0,604$; $p=0,018$) di hari pertama.

3. dengan meregulasi produksi $TNF-\alpha$ oleh makrofag tipe-1 sangat kuat dan signifikan dengan nilai ($B= -0,967$; $p=0,017$)

Sedangkan Mekanisme kerja Seyawa Aktif tanpa efek Minyak Pelarut dari Minyak tradisional Karo ini di hari ke-1 dapat kita lihat pada gambar 6.9 berikut ini :



Gambar 6.9 Mekanisme kerja Senyawa Aktif dari Minyak tradisional Karo hari ke-1

Mekanisme kerja Senyawa aktif dari Minyak tradisional Karo adalah dengan :

1. Merangsang peningkatan Angiogenesis lewat merangsang produksi $TGF-\beta$, kemungkinan besar yang dirangsang adalah $TGF-\beta_1$ yang mempunyai efek merangsang terjadinya peningkatan Angiogenesis dihari ke-1 post perlakuan secara

signifikan dan berkorelasi kuat ($B=0,609$; $p=0,036$). (Landen, Li, & Stahle, 2016; Mustoe et al., 1987; Velnar et al., 2009; Werner & Grose, 2003).

2. Sementara itu senyawa aktif Minyak tradisional Karo berkorelasi kuat dan signifikan merangsang ekspresi sitokin MMP-1 secara langsung ($B=0,698$; $p=0,026$), dan lewat adanya regulasi IL-10 ($B= -0,758$; $p=0,024$) oleh makrofag tipe-2, dimana makrofag tipe-2 ini yang mengekspresikan CD 206 dan sitokin anti-inflamasi IL-10, MMP-9, MMP-1, IL-1 β , dan TGF- β dalam jumlah yang besar, sehingga tampak perbedaan signifikansi kedua analisa jalur antara IL-10 dan MMP-1 (Michopoulou & Rousselle, 2015). Peningkatan ekspresi sitokin MMP-1 ini juga diregulasi oleh peningkatan sitokin EGF ($B= -0,758$; $p=0,028$).

3. Meregulasi produksi TNF- α oleh makrofag tipe-1 sangat kuat dan signifikan dengan nilai ($B= -0,690$; $p=0,004$) dan

4. Merangsang produksi sitokin VEGF dengan nilai ($B= 0,800$; $p= 0,046$)

Jadi dapat kita simpulkan dari gambar 6.8 dan 6.9 bahwa di hari pertama mekanisme kerja Minyak tradisional Karo adalah :

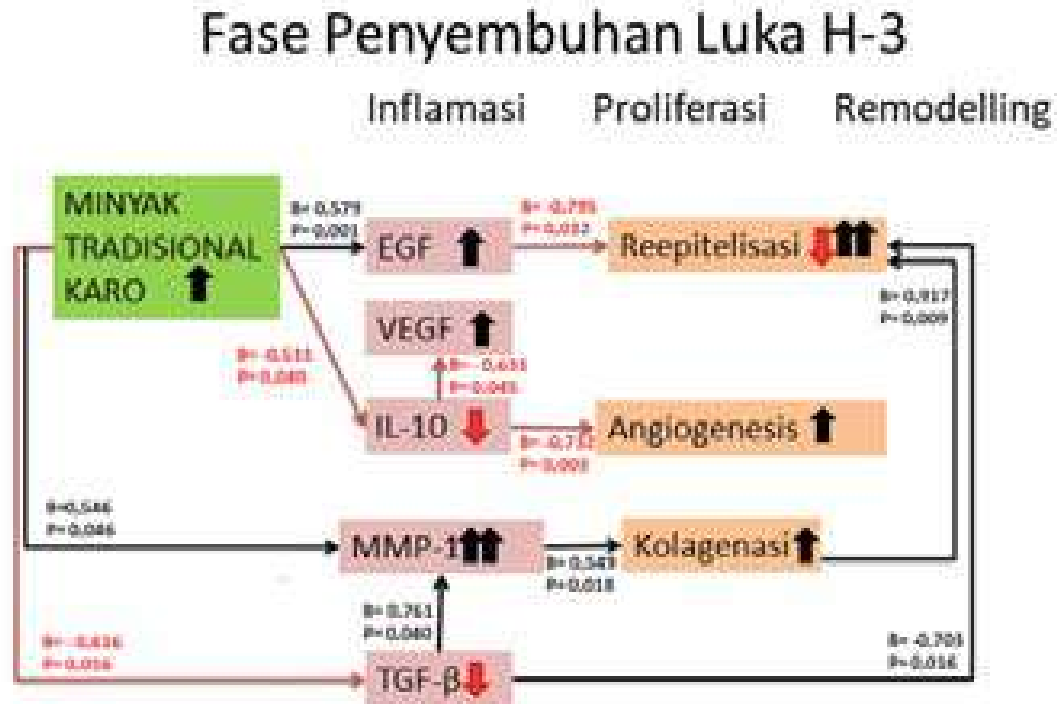
1. Meningkatkan proses Angiogenesis lewat 2 jalur yaitu, regulasi produksi sitokin IL-10 yang menurunkan efek anti-angiogenik nya (Werner & Grose, 2003), dan lewat rangsangan dari peningkatan produksi sitokin TGF- β yang merangsang terbentuknya proses neoangiogenesis. (Silvestre et al., 2000; Velnar et al., 2009).

2. Meningkatkan sitokin MMP-1 melalui 2 jalur, yang pertama langsung melalui efek senyawa aktif minyak tradisional Karo itu sendiri, yang kedua melalui regulasi

produksi sitokin IL-10 oleh makrofag tipe-2, dan diregulasi oleh peningkatan produksi sitokin EGF akibat perangsangan aktivasi sel keratinosit oleh peningkatan MMP-1 itu sendiri, karena MMP-1 juga memainkan peran kunci dalam proses pengendalian migrasi dan siklus perlekatan dan retraksi keratinosit. (Michopoulou & Rousselle, 2015). Akibat adanya regulasi produksi sitokin MMP-1 maka hal ini akan merangsang percepatan migrasi dan siklus perlekatan dan retraksi keratinosit sehingga mempercepat terjadinya penutupan luka.

3. Meregulasi produksi sitokin pro-inflamasi TNF- α lewat menghambat fosforilasi jalur NF- κ B, sehingga membuat fase inflamasi menjadi lebih singkat (Kim et al., 2015; Krzyszczyk et al., 2018; Kummer, 2015; Lee, Ayoub, & Agrawal, 2016; Pastar et al., 2014; Rufino et al., 2014). TNF- α dalam level tertentu ini juga ikut berperan dalam proses re-epitelialisasi melalui mekanisme menjaga stabilitas sinyal aktivasi keratinosit oleh sitokin IL-1 dan merangsang ekspresi K6 melalui transkripsi faktor NF κ B dan C/EBP β , serta secara tidak langsung merangsang sekresi sitokin FGF-7 oleh sel-sel (Michopoulou & Rousselle, 2015).

6.9 Mekanisme Kerja Minyak Tradisional Karo dan Senyawa Aktif Minyak Tradisional Karo pada Hari ke-3 Post Perlakuan



Gambar 6.10 Analisa jalur hari ke-3 mekanisme kerja Minyak tradisional Karo

Didapatkan hasil analisa jalur senyawa aktif Minyak tradisional Karo pada hari ke-3 bekerja dengan :

1. Meningkatkan proses re-epitelialisasi ($B= -0,703$; $p=0,016$) lewat jalur regulasi produksi sitokin TGF- β secara langsung ($B= -0,616$; $p=0,016$) yang awalnya meningkat secara signifikan di hari ke-1 hingga turun secara signifikan di hari ke-3.
2. Meningkatkan proses re-epitelialisasi ($B= 0,917$; $p= 0,009$) lewat regulasi produksi sitokin MMP-1 yang meningkat ($B=0,546$; $p=0,046$) bersama penurunan kadar TGF- β ($B= 0,761$; $p= 0,040$). Hal ini akan berimbas kepada terjadinya peningkatan densitas kolagen, dimana MMP- berfungsi melisiskan debris didaerah luka sehingga

merangsang migrasi fibroblast mengisi celah luka dan deposisi kolagen serta menyeimbangkan pembentukan kolagen agar tidak berlebihan ($B=0,549$; $p=0,018$). Peningkatan densitas kolagen ini mempercepat pengisian celah luka, sehingga migrasi sel-sel keratinosit basal yang telah teraktivasi akibat pengaruh peningkatan *growth factors* EGF dari rangsangan senyawa aktif Minyak tradisional Karo, akan dipercepat (Pastar et al., 2014). dan mempercepat proses re-epitelialisasi (Michopoulou & Rousselle, 2015).

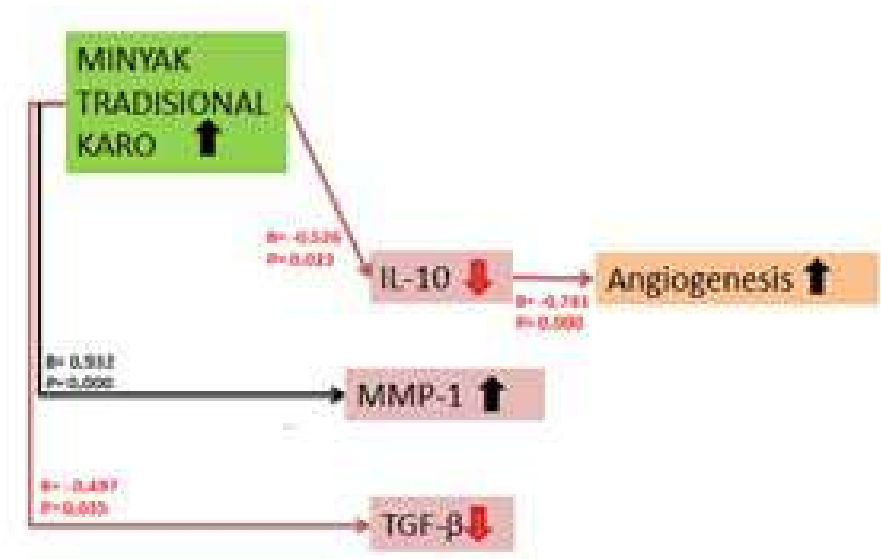
3. Meningkatkan ekspresi sitokin EGF ($B= 0,579$; $p=0,001$) lewat aktivasi sel keratinosit yang akan meregulasi pembentukan re-epitelialisasi yang meningkat akibat rangsangan kolagenasi yang meningkat ($B= -0,795$; $p=0,022$). Kadar EGF yang meningkat ini akan meregulasi migrasi dan proliferasi sel-sel keratinosit dan fibroblast pada lapisan dermis lewat aktivasi jalur signalling MAPK, sebagai respon dari meningkatnya proses kolagenasi agar tidak terbentuk kelebihan serat kolagen, sehingga mempercepat proses re-epitelialisasi ($\beta= -0,795$ $P=0,022$) (Chen et al., 2008; Pastar et al., 2014; Rosinczuk et al., 2016; Rousselle et al., 2018).

4. Meregulasi produksi sitokin IL-10 sehingga efek anti angiogeniknya berkurang dan bisa merangsang pembentukan Angiogenesis ($B= -0,732$; $p=0,003$) (Werner & Grose, 2003).

Sedangkan Mekanisme kerja Seyawa Aktif tanpa efek Minyak Pelarut dari Minyak tradisional Karo ini di hari ke-1 dapat kita lihat pada gambar 6.11 berikut ini :

Fase Penyembuhan Luka H-3

Inflamasi Proliferasi Remodelling

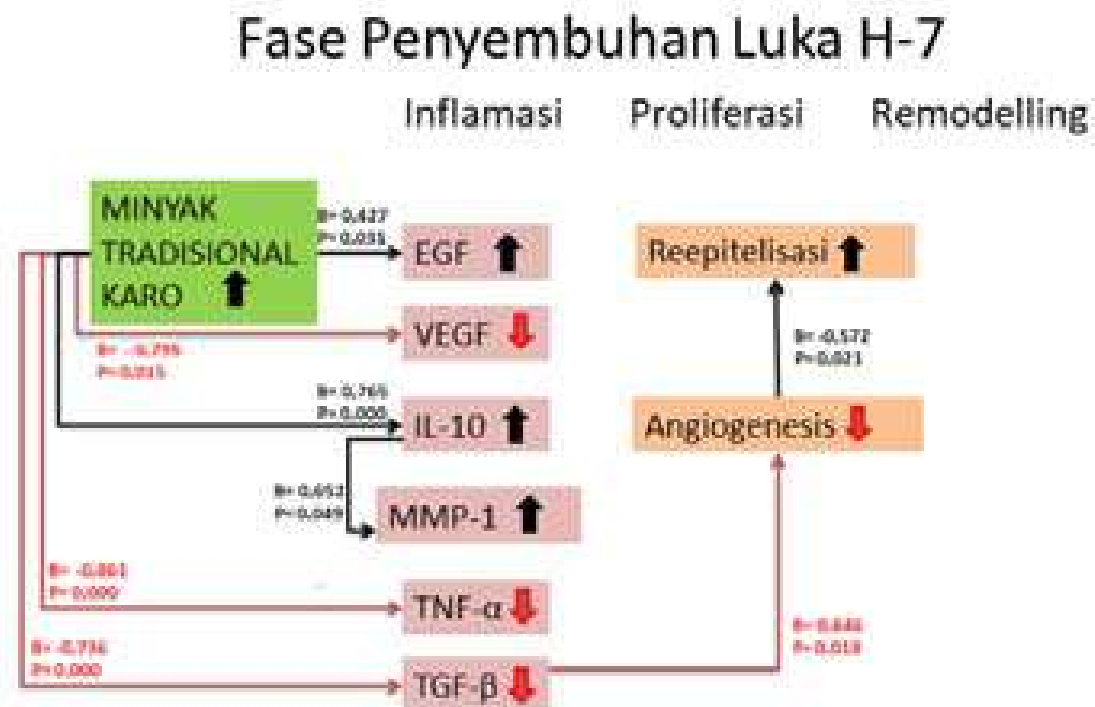


Gambar 6.11 Analisa jalur hari ke-3 mekanisme kerja Senyawa Aktif Minyak tradisional Karo

1. Meningkatkan proses angiogenesis ($B= -0,741$; $p=0,000$) lewat regulasi efek anti-angiogenik sitokin IL-10 ($B= -0,526$; $p=0,023$) (Werner & Grose, 2003).
2. Meningkatkan produksi sitokin MMP-1 yang meningkat ($B=0,932$; $p=0,000$). Hal ini akan berimbas kepada terjadinya peningkatan densitas kolagen, dimana MMP-1 berfungsi melisiskan debris-debris didaerah luka sehingga merangsang migrasi fibroblast mengisi celah luka dan deposisi kolagen serta menyeimbangkan pembentukan kolagen agar tidak berlebihan (Pastar et al., 2014).
3. Menurunkan produksi sitokin TGF- β ($B= -0,497$; $p=0,035$) untuk meregulasi pembentukan kolagen.

Jadi dapat kita simpulkan dari gambar 6.10 dan 6.11 bahwa di hari ketiga mekanisme kerja Minyak tradisional Karo adalah : Meningkatkan proses re-epitelialisasi melalui 3 jalur, regulasi produksi sitokin TGF- β , dan MMP-1 yang meningkatkan kolagenasi dan migrasi keratinosit (Pastar et al., 2014)., dan merangsang produksi sitokin EGF yang meningkatkan proliferasi keratinosit dan meningkatkan re-epitelialisasi (Chen et al., 2008; Pastar et al., 2014; Rosinczuk et al., 2016; Rousselle et al., 2018).

6.10 Mekanisme Kerja Minyak Tradisional Karo dan Senyawa Aktif Minyak Tradisional Karo pada Hari ke-7 Post Perlakuan



Gambar 6.12 Analisa jalur hari ke-7 mekanisme kerja Minyak tradisional Karo

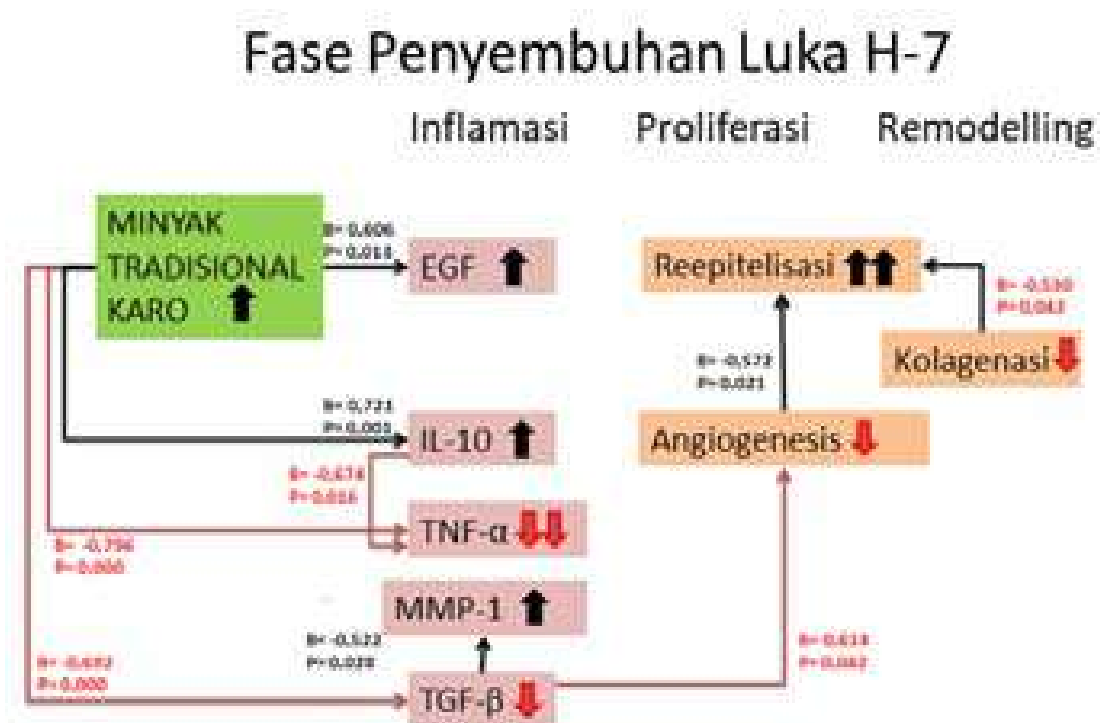
Di hari ke-7 paska perlakuan tampak bahwa fase inflamasi sudah selesai dan tahap penyembuhan luka telah sampai pada fase proliferasi dan mulai masuk ke fase resolusi. Hal ini tampak dari analisa jalur pada gambar 6.12 ditandai dengan :

1. Peningkatan re-epitelialisasi yang terjadi ($B = -0,572$; $p = 0,0021$) lewat jalur penurunan proses Angiogenesis ($B = 0,646$; $p = 0,018$) lewat penurunan produksi sitokin TGF- β ($B = -0,736$; $p = 0,000$). Terjadinya penurunan ini bisa jadi akibat proses proliferasi hampir selesai sehingga proses angiogenesis mulai diregulasi dan sitokin TGF- β yang merangsang proliferasi fibroblast dan endotel juga diregulasi menurun.
2. Minyak tradisional Karo meningkatkan sitokin IL-10 ($B = 0,765$; $p = 0,00$) dimana peningkatannya meregulasi produksi sitokin MMP-1 ($B = 0,652$; $p = 0,049$) yang akan mendegradasi kelebihan kolagen yang terbentuk di fase proliferasi, sehingga meminimalisir terjadinya jaringan granulasi dan hipertrofik skar akibat kolagenisasi yang berlebihan. Hal ini juga salah satu tanda bahwa luka mulai memasuki fase resolusi.

3. Menekan sekaligus meregulasi produksi sitokin pro-inflamasi TNF- α ($B = -0,861$; $p = 0,000$), dan penurunan kadar TNF- α ini akan merangsang produksi sitokin EGF walau pada analisa jalur ini tidak tampak adanya signifikansi (Pastar et al., 2014; Rousselle et al., 2018). TNF- α dalam level tertentu ini juga ikut berperan dalam proses re-epitelialisasi melalui mekanisme menjaga stabilitas sinyal aktivasi keratinosit oleh sitokin IL-1 dan merangsang ekspresi K6 melalui transkripsi factor NF κ B dan C/EBP β , serta secara tidak langsung merangsang sekresi sitokin FGF-7 oleh sel-sel (Michopoulou & Rousselle, 2015).

4. Minyak tradisional Karo secara langsung merangsang peningkatan sitokin EGF akan mempercepat proses re-epitelialisasi lewat peningkatan migrasi dan proliferasi sel-sel keratinosit dan fibroblast pada lapisan dermis lewat aktivasi jalur signalling MAPK, sehingga mempercepat proses re-epitelialisasi ($B= 0,471$; $p=0,031$) (Chen et al., 2008; Pastar et al., 2014; Rosinczuk et al., 2016; Rousselle et al., 2018).

Sedangkan Mekanisme kerja Seyawa Aktif tanpa efek Minyak Pelarut dari Minyak tradisional Karo ini di hari ke-7 dapat kita lihat pada gambar 6.13 berikut ini :



Gambar 6.13 Analisa jalur hari ke-7 mekanisme kerja Senyawa Aktif Minyak tradisional Karo

1. Meningkatkan re-epitelialisasi dengan cara yang sama dengan mekanisme kerja Minyak tradisional Karo di gambar 6.12 dipercepat dengan adanya regulasi kolagenisasi ($B = -0,530$; $p = 0,042$) yang menandakan luka memasuki fase resolusi.
2. Kenaikan sitokin IL-10 akan meregulasi produksi TNF- α dimana produksi sitokin TNF- α ini pada level tertentu juga ikut berperan dalam proses re-epitelialisasi melalui mekanisme menjaga stabilitas sinyal aktivasi keratinosit oleh sitokin IL-1 dan merangsang ekspresi K6 melalui transkripsi factor NF κ B dan C/EBP β , serta secara tidak langsung merangsang sekresi sitokin FGF-7 oleh sel-sel (Michopoulou & Rousselle, 2015).

Jadi dapat kita simpulkan dari gambar 6.12 dan 6.13 bahwa di hari ketiga mekanisme kerja minyak tradisional Karo di hari ke-7 adalah : Merangsang re-epitelialisasi lewat regulasi proses angiogenesis dan kolagenisasi yang sekaligus menandakan luka sudah mulai memasuki fase *remodelling*.

Dari keseluruhan tahapan proses penyembuhan luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo fase proliferasi sudah dimulai pada hari ke-1 paska perlakuan dan hari ke-7 paska perlakuan mulai memasuki fase resolusi, sedangkan normalnya fase proliferasi dimulai hari ke-4 sampai dengan 3 minggu paska terjadinya luka . Hal ini terbukti dengan luas luka yang diterapi minyak tradisional Karo yang sudah mengalami re-epitelialisasi di hari ke-3 hampir sama dengan luas luka yang diterapi dengan kasa lembab dan luas luka yang diterapi dengan minyak pelarut dari minyak tradisional Karo di hari ke-7 ($p = 0,136$; $\alpha > 0,05$), dan ketebalan

epitel. luka yang diterapi minyak tradisional Karo yang sudah mengalami re-epitelialisasi di hari ke-3 hampir sama dengan luas luka yang diterapi dengan kasa lembab dan luas luka yang diterapi dengan minyak pelarut dari minyak tradisional Karo di hari ke-7 ($p = 0,696$; $\alpha > 0,05$). Nilai p yang tidak signifikan antar kedua kelompok membuktikan tidak ada perbedaan bermakna ketebalan epitel dan luas luka yang mengalami re-epitelialisasi hari ke-3 kelompok perlakuan dengan hari ke-7 kelompok kontrol negatif.

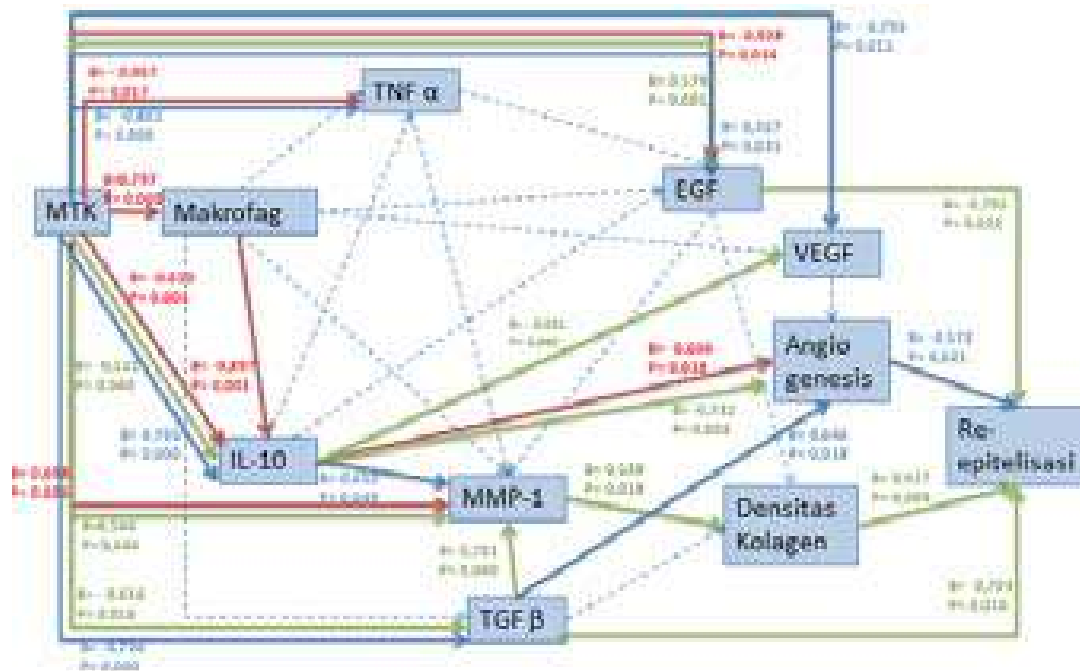
6.11 Temuan Baru

Pada penelitian ini telah ditemukan beberapa temuan baru yaitu :

Kandungan Minyak tradisional Karo, yang terdiri dari 74.47% senyawa α -pinene yang merupakan senyawa monoterpene bisiklik bersifat sebagai agen regulator inflamasi poten.

Terdapat percepatan proses re-epitelialisasi pada luka yang diterapi dengan minyak tradisional Karo dibandingkan dengan luka yang diterapi dengan kasa lembab

Mekanisme kerja Minyak tradisional Karo dalam mempercepat proses re-epitelialisasi luka terbuka adalah sebagai berikut (gambar 6.14)



Gambar 6.14 Mekanisme kerja Minyak tradisional Karo hari ke 1,3 dan 7

Minyak tradisional Karo mempercepat proses re-epiteliasasi dengan mempersingkat fase inflamasi melalui regulasi fase inflamasi dan merangsang percepatan angiogenesis pada hari ke-1 pasca perawatan. Merangsang peningkatan angiogenesis, kolagenisasi dan re-epitelialisasi pada fase proliferasi pada hari ke-3 pasca perawatan serta merangsang percepatan re-epitelialisasi pada hari ke-7 pasca perawatan dan mulai memasuki fase remodeling.

6.12 Kelemahan / Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan pengaruh minyak tradisional Karo terhadap sel keratinosit, sel endotel, proliferasi fibroblas, jenis kolagen, dan ekspresi sitokin PDGF, FGF-7 dan TIMP, sehingga masih ada jalur proses penyembuhan luka oleh minyak tradisional Karo yang belum tereksplorasi.

Belum dilakukan pemeriksaan pengaruh minyak tradisional Karo terhadap polarisasi M1 ke M2 lewat marker CD86 dan CD206

Pada penelitian ini juga belum dieksplorasi pengaruh minyak tradisional Karo terhadap fase remodeling

Perlu diadakan penelitian lanjutan tentang pengaruh Minyak tradisional Karo ini terhadap perbandingan kadar TGF- β dan MMP-1 serta kaitannya dengan bentuk permukaan luka yang telah mengalami re-epitelialisasi.

- Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger, L. J., 3rd, . . . Lynch, J. B. (1989). Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med*, *321*(2), 76-79. doi:10.1056/nejm198907133210203
- Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G., & Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS one*, *3*(4), e1886-e1886. doi:10.1371/journal.pone.0001886
- Joao De Masi, E. C., Campos, A. C., Joao De Masi, F. D., Ratti, M. A., Ike, I. S., & Joao De Masi, R. D. (2016). The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*, *82*(5), 512-521. doi:10.1016/j.bjorl.2015.09.011
- Kim, D. S., Lee, H. J., Jeon, Y. D., Han, Y. H., Kee, J. Y., Kim, H. J., . . . Hong, S. H. (2015). Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF-kappaB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *Am J Chin Med*, *43*(4), 731-742. doi:10.1142/s0192415x15500457
- King, A., Balaji, S., Le, L. D., Crombleholme, T. M., & Keswani, S. G. (2014). Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Advances in wound care*, *3*(4), 315-323. doi:10.1089/wound.2013.0461
- Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol*, *9*, 419. doi:10.3389/fphys.2018.00419
- Kummer, R., Estevão-Silva, C.F., Bastos, R.L., Rocha, B.A., Spironello, R.A., Yamada, A.N., Bersani-Amado, C.A., & Cuman, R.K. . (2015). Alpha-pinene reduces in vitro and in vivo leukocyte migration during acute inflammation. *International Journal of Applied Research in Natural Product*, *8*(4), 12-17.
- Landen, N. X., Li, D., & Stahle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci*, *73*(20), 3861-3885. doi:10.1007/s00018-016-2268-0
- Lee, D. E., Ayoub, N., & Agrawal, D. K. (2016). Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther*, *7*, 37. doi:10.1186/s13287-016-0303-6
- Lin, Z. Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., & Mukaida, N. (2003). Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*, *73*(6), 713-721.
- Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., & Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clin Dermatol*, *25*(1), 19-25. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.12.005
- Michopoulou, A., & Rousselle, P. (2015). How do epidermal matrix metalloproteinases support re-epithelialization during skin healing? *Eur J Dermatol*, *25 Suppl 1*, 33-42. doi:10.1684/ejd.2015.2553
- Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B., & Deuel, T. F. (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, *237*(4820), 1333-1336.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., . . . Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, *3*(7), 445-464. doi:10.1089/wound.2013.0473

- Rosinczuk, J., Taradaj, J., Dymarek, R., & Sopel, M. (2016). Mechanoregulation of Wound Healing and Skin Homeostasis. *Biomed Res Int*, 2016, 3943481. doi:10.1155/2016/3943481
- Rousselle, P., Braye, F., & Dayan, G. (2018). Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. doi:10.1016/j.addr.2018.06.019
- Rufino, A. T., Ribeiro, M., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M. C., Cavaleiro, C., & Mendes, A. F. (2014). Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)-alpha-pinene: structural and enantiomeric selectivity. *J Nat Prod*, 77(2), 264-269. doi:10.1021/np400828x
- Silvestre, J. S., Mallat, Z., Duriez, M., Tamarat, R., Bureau, M. F., Scherman, D., . . . Levy, B. I. (2000). Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*, 87(6), 448-452.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37(5), 1528-1542. doi:10.1177/147323000903700531
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83(3), 835-870. doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835