



## Effect of Patah Tulang Latex (*Euphorbia tirucalli* L.) on Wound Healing in Wistar Rat

Galuh Ratnawati<sup>1\*</sup>, Kurniasih Kurniasih<sup>2</sup>, Surya Amanu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu

<sup>2</sup>Departement of Pathology, FKH-UGM, Yogyakarta

<sup>3</sup>Departement of Microbiology, FKH-UGM, Yogyakarta

Submitted 17 December 2017; Revised 24 May 2019; Accepted 18 July 2019; Published 18 October 2019

\*Corresponding author: galuhratnagaluh@gmail.com

### Abstract

Wound healing process occurred on four phases such as hemostasis, inflammation, and maturation. Latex of Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) can heal the wound because of its active compound. Aim of this research was to find out the effect of ointment topical of *E. tirucalli* L. to wound healing process based on macroscopic and microscopic examination and cellular reaction on CD4<sup>+</sup> lymphocyte. Male Wistar Rat, 2 month old, 150-200 Gram of body weight, as much as 36 rats. Rats were divided into 4 groups, and were anesthetized before being punctured on the 2 sides of lateral vertebrae. Group one was used as a control, group two was given treatment with the ointment 9% of *E. tirucalli* L., group three was given with 23% of *E. tirucalli* L., and group four was given madecassol®. Treatment was given once a day for 15 days. Macroscopical and microscopical changes were observed at the fifth, tenth, and fifteenth day. Macroscopical observation was the diameter of wound. Microscopical observation consisted of epidermal thickness, number of fibroblast, using Haematoxylin and Eosin staining, and cellular reaction of CD4<sup>+</sup> lymphocyte using immunohistochemistry. The results showed that topical administration of *E. tirucalli* ointment 9% and 23% potential to accelerate wistar skin wound healing puncture wounds. There was no difference between *E. tirucalli* ointment 9% and 23% application to observed parameters.

**Keywords:** *Euphorbia tirucalli* L., injury healing, macroscopic, microscopic, lymphocyte CD4<sup>+</sup>

## Pengaruh Getah Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) Terhadap Kesembuhan Luka Pada Tikus Putih

### Abstrak

Kesembuhan luka terjadi melalui empat fase, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan maturasi. Tumbuhan patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) memiliki potensi untuk membantu proses kesembuhan luka karena kandungan beberapa senyawa aktifnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek aplikasi topikal salep *E. tirucalli* L. terhadap kesembuhan luka pungsi pada tikus putih secara makroskopik dan mikroskopik serta reaksi seluler limfosit CD4<sup>+</sup>. Tikus Wistar jantan umur 2 bulan dan berat badan antara 150-200 gram sebanyak 36 ekor dibagi kelompok masing-masing 9 ekor tikus. Tikus dianestesi, dicukur rambut dan dipungsi pada kedua sisi lateral vertebrae. Kelompok 1 digunakan sebagai kontrol, kelompok 2 diaplikasi topikal salep *E. tirucalli* L. 9%, kelompok 3 diberi salep *E. tirucalli* L. 23% dan kelompok 4 diberi salep madecassol®. Terapi diberikan sehari sekali selama 15 hari. Pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik pada hari ke-5, 10 dan 15. Pengamatan makroskopik diameter luka. Pengamatan mikroskopik ketebalan epidermis, jumlah fibroblas dengan pewarnaan Hematoxilin dan Eosin (HE) serta reaksi seluler limfosit CD4<sup>+</sup> dengan pewarnaan imunohistokimia (IHK). Hasil pengamatan menunjukkan pemberian salep *E. tirucalli* 9% dan 23% mempercepat kesembuhan luka pungsi dengan parameter makroskopik persentase area luka, mikroskopik ketebalan epidermis dan jumlah limfosit CD4<sup>+</sup>. Jumlah fibroblas tidak berbeda nyata terhadap kelompok kontrol. Tidak ada perbedaan antara pemberian salep *E. tirucalli* 9% dan 23% terhadap parameter yang diamati.

**Kata Kunci:** *Euphorbia tirucalli* L., kesembuhan luka, makroskopik, mikroskopik, limfosit CD4<sup>+</sup>

## 1. Pendahuluan

Getah *Euphorbia tirucalli* L. mengandung senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, fenol, tanin, steroid, terpenoid, glikosida, inganen, euphol, sterol,  $\alpha$ -euphorbol, taraxasterol, tirucallol.<sup>1</sup> Flavonoid dan tanin, bermanfaat untuk penanganan luka terbuka.<sup>2</sup> Aktivitas antioksidan, antiinflamasi, dan analgesik getah *E. tirucalli* L. dapat membantu dalam proses kesembuhan luka.

Proses kesembuhan luka melibatkan serangkaian fase yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi, serta maturasi dan remodelling. Kesembuhan luka terdapat 4 fase, yaitu: (1) hemostasis, (2) inflamasi, (3) proliferasi dan (4) maturasi dan remodelling.<sup>3,4</sup> Hemostasis merupakan respon cepat dari kelukaan kulit dan platelet berperan penting dalam pembentukan clot. Fase Inflamasi melibatkan berbagai sitokin, kemokin dan sel radang. Sel radang yang terlibat antara lain makrofag, neutrofil dan limfosit. Limfosit T dalam fase ini mengekspresi CD4<sup>+</sup> (T-helper) dan mengaktifkan faktor kesembuhan luka yang lain. Fase selanjutnya proliferasi ditandai dengan epitelialisasi, fibroplasia, dan angiogenesis. Remodelling adalah fase terakhir ditandai dengan terbentuknya kolagen yang terkoordinasi.<sup>3</sup>

Setelah clot terbentuk selanjutnya diikuti oleh faktor kesembuhan meliputi *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Platelet akan meningkatkan vaskularisasi suplai darah menuju ke jaringan luka dengan adanya serotonin. Serotonin meningkatkan ekstravasasi cairan ke dalam jaringan luka yang menimbulkan edema yang merupakan tahap awal fase inflamasi.<sup>4,5</sup>

Infiltrasi neutrofil di jaringan luka akan mengalami penurunan ketika agen infeksi telah terfagosit, selanjutnya sel nekrosis

dihancurkan oleh makrofag.<sup>5</sup> Makrofag akan memasuki jaringan bersama dengan komponen inflamasi yang lain seperti sitokin, PDGF, TGF- $\beta$ , leukotrin serta prostaglandin. Pada tahap ini timbul nyeri pada luka yang berlebihan akibat adanya prostaglandin pada jaringan luka.

Komponen imunologi lain yang berperan penting dalam proses kesembuhan luka adalah sel T. Permukaan sel T tersusun atas berbagai reseptör yang menjalankan fungsi dan perannya masing-masing. Permukaan sel T memberikan sinyal yang menginduksi ekspresi CD4<sup>+</sup> mengaktifkan faktor kesembuhan luka yang lain seperti IFN $\gamma$ , IL-2, IL-3, TEGF, COX dan lain sebagainya.<sup>6</sup> Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi aplikasi topikal getah *E. tirucalli* L. terhadap proses kesembuhan luka pungsi pada kulit tikus uji secara makroskopik dan mikroskopik serta reaksi seluler limfosit CD4<sup>+</sup>.

## 2. Metode

### 2.1. Pembuatan salep *E. tirucalli* L.

Batang dan cabang tumbuhan *E. tirucalli* L. dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% dan ditunggu kering, selanjutnya disayat sampai mengeluarkan getah dan ditampung dalam gelas ukur.<sup>7</sup> Salep *E. tirucalli* L. yang digunakan adalah 9% dan 23% dibuat dengan komposisi pada Tabel 1

Bahan ditimbang sesuai komposisi, vaselin diperpanaskan dalam cawan poselin diatas hotplate 100°C sampai meleleh. Cera alba diambil dari dalam vaselin, tunggu sampai leleh, dimasukkan diaduk rata hingga suhu 80°C, ditambahkan KOH, diaduk hingga larut. Mortar yang sudah dipanaskan, dimasukkan basis salep dan ditambahkan getah, diaduk cepat dengan stamper sampai merata.<sup>8</sup> Penentuan konsentrasi salep

**Tabel 1.** Komposisi salep *E. tirucalli* L<sup>8</sup>

Komposisi	Konsentrasi 9% (gram)	Konsentrasi 23% (gram)
Vaselin putih	8	8
Kalium hidroksida (KOH)	0,05	0,05
Gliserin	0,95	0,95
Cera alba	1	1
Getah <i>E. tirucalli</i> L.	1	3

didasarkan pada penelitian Qomariah dan Aisah.<sup>9,10</sup>

## 2.2. Persiapan dan pengelompokan hewan uji

Tikus putih galur Wistar jantan 2 bulan 150-200 Gram sebanyak 36 ekor dibagi 4 kelompok, masing-masing 9 ekor. Semua tikus diadaptasi selama 1 minggu sebelum perlakuan.

Tikus dianastesi menggunakan kombinasi ketamine dan xylasin dengan dosis 75 dan 5 mg/ kg BB secara intramuskuler.<sup>11</sup> Tikus dicukur rambut daerah punggung, diolesi dengan bethadine, dibuat luka pungsi 2 buah pada kedua sisi lateral vertebrae dengan diameter 4 mm dan kedalaman hingga sub kutan menggunakan *biopsy puncher* dan gunting. Luka pungsi pada tikus kelompok 1 diberi salep tanpa getah *E. tirucalli*, kelompok 2 diberi topikal salep getah *E. tirucalli* 9%, kelompok 3 diberi topikal salep getah *E. tirucalli* 23%, dan kelompok 4 diberi topikal madecassol® sekali sehari. Pengamatan proses kesembuhan luka dilakukan pada hari ke-5, 10, dan 15 setelah dilakukan pungsi.

## 2.3. Pengukuran parameter kesembuhan luka

Tikus dieutanasi menggunakan eter, dan jaringan luka difiksasi dengan phosphate buffered formalin 9% selama 24 jam, selanjutnya diproses histopatologis dengan pewarnaan Hematoxilin dan Eosin (HE), dan imunohistokimia dengan antibodi anti CD4<sup>+</sup>. Penelitian telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Ethical Clearance LPPT, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan nomor 00135/04/LPPT/XI/2017, tanggal 8 November 2017.

Parameter kesembuhan luka dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik pada

luka kulit tikus. Pengamatan makroskopik luka dengan mengukur persentase area luka berdasarkan luas area luka. Menurut Bush et al.<sup>12</sup> luas area luka dan persentase area luka dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Luas (luka berbentuk bulat)} = \pi \times d_1 \times d_2$$

Keterangan: d1 (diameter luka 1); d2 (diameter luka 2).

Luas area luka yang diperoleh selanjutnya dihitung persentasenya dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase area luka (\%)} = \left[ \frac{\text{Luas area luka hari (x)}}{\text{Luas area luka hari (0)}} \right] \times 100$$

Pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan HE dilakukan terhadap ketebalan epidermis dan jumlah fibroblas. Pengamatan mikroskopik secara imunohistokimia dengan antibodi anti CD4<sup>+</sup> dilakukan menggunakan penghitungan jumlah limfosit yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup>.

## 2.4. Analisis data

Data kesembuhan luka berupa makroskopik dan mikroskopik terdiri atas ketebalan epidermis, jumlah fibroblas, dan jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> dianalisa secara statistik menggunakan software SPSS 16.

## 3. Hasil

### 3.1. Persentase area luka

Persentase area luka kulit tikus pada pengamatan hari ke- 5, 10 dan 15 disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1.

### 3.2. Ketebalan epidermis luka kulit

Pengamatan dan pengukuran ketebalan epidermis menggunakan mikroskop dan mikrometer pada preparat histopatologi kulit

**Tabel 2.** Rata – rata ± SD persentase area luka kulit tikus hari ke- 5, 10 dan 15

Kelompok	Percentase Area Luka (Rerata ± SD hari ke-)		
	5	10	15
Kontrol	61,68 ± 4,55 <sup>a,a</sup>	36,10 ± 17,66 <sup>a,b</sup>	9,05 ± 1,13 <sup>a,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 9%	43,31 ± 14,09 <sup>b,a</sup>	3,66 ± 3,46 <sup>b,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 23%	29,60 ± 7,62 <sup>b,a</sup>	0,44 ± 0,38 <sup>b,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b,c</sup>
Madecassol	43,98 ± 14,15 <sup>b,a</sup>	10,09 ± 17,51 <sup>b,b</sup>	2,26 ± 4,12 <sup>b,c</sup>

yang diwarnai dengan hematoksilin eosin. Hasil pengukuran disajikan dalam Tabel 3.

### 3.3. Jumlah fibroblas

Jumlah fibroblas dihitung dengan menghitung rata-rata jumlah fibroblast pada 5 lapang pandang pada pengamatan preparat histopatologi. Hasil pengitungan ditampilkan dalam Tabel 4.

### 3.4. Jumlah limfosit CD4<sup>+</sup>

Jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> dihitung dengan menghitung rata-rata jumlah fibroblast pada 5 lapang pandang pada pengamatan preparat histopatologi. Hasil pengitungan ditampilkan dalam Tabel 5.

## 4. Pembahasan

Penyembuhan luka adalah proses yang vital untuk kelangsungan hidup semua organisme tingkat tinggi. Pemahaman yang lebih baik dari mekanisme seluler dan molekuler yang mendasarinya penyembuhan luka memungkinkan untuk mengembangkan metode mempercepat perbaikan luka/ proses regenerasi.<sup>13</sup>

### 4.1. Persentase area luka

Pengukuran persentase area luka dengan mengukur diameter luka pada luka berbentuk bulat seperti yang dilakukan pada penelitian ini.<sup>12</sup> Persentase area luka kulit tikus mengalami penurunan mulai hari ke 5 hingga ke 15, dan berbeda antara satu kelompok dengan kelompok lainnya. Hal tersebut dibuktikan pada hasil uji Kruskal-Wallis  $\text{sig} = 0,024$  ( $\text{sig} \leq 0,05$ ), yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan terhadap semua kelompok perlakuan. Kelompok kontrol memperlihatkan penurunan persentase area luka terjadi lebih lambat dibanding kelompok yang lain. Kelompok salep *E. tirucalli*

9%, 23% dan madecassol memperlihatkan penurunan persentase area luka yang lebih cepat pada hari ke 5 dan 10 (Gambar 1).

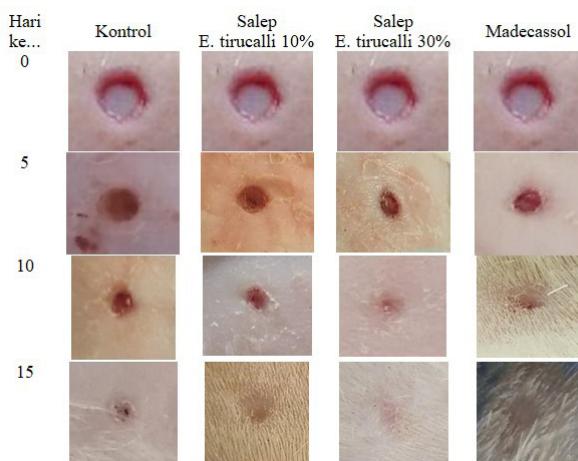
Pengamatan area luka secara rutin dapat menjadi sumber informasi perkembangan kesembuhan luka sehingga dapat menjadi panduan untuk menentukan intervensi lanjut pengobatan dan mencegah penanganan yang tidak efektif. Persentase area luka kulit tikus mengalami penurunan mulai hari ke 5 hingga ke 15, dan berbeda antara satu kelompok dengan kelompok lainnya. Hal tersebut dibuktikan pada hasil uji Kruskal-Wallis  $\text{sig} = 0,024$  ( $\text{sig} \leq 0,05$ ), yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan terhadap semua kelompok perlakuan.

Perbaikan dan kesembuhan luka umumnya membutuhkan 2 proses utama yaitu pembentukan clot yang cepat dan pembentukan keropeng untuk melindungi luka dan regenerasi jaringan lebih lanjut. Keropeng menghentikan perdarahan dan secara fisik melindungi luka dari infeksi.<sup>14</sup> Pemberian secara topikal salep *E. tirucalli* 9%, 23% menghasilkan pembentukan keropeng yang lebih cepat dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 1). Keropeng sudah terbentuk pada hari ke-5 sedangkan pada kelompok kontrol terlihat luka masih terbuka. Pada hari ke-10 keropeng baru terlihat pada kelompok kontrol, sedangkan kelompok salep *E. tirucalli* 9%, 23% dan madecassol terlihat keropeng telah terlepas dan luka telah menutup sempurna, walaupun pada kelompok salep *E. tirucalli* 9% masih terlihat bekas lepasan keropeng.

Keropeng sudah terbentuk pada hari ke-5 sedangkan pada kelompok kontrol terlihat luka masih terbuka. Pada hari ke-10 keropeng baru terlihat pada kelompok kontrol, sedangkan kelompok salep *E. tirucalli* 9%, 23% dan madecassol terlihat keropeng telah

**Tabel 3.** Rata – rata ± standar deviasi (SD) ketebalan epidermis luka kulit tikus hari ke- 5, 10 dan 15

Kelompok	Ketebalan Epidermis (Rerata ± SD hari ke-)		
	5	10	15
Kontrol	19,13 ± 6,86 <sup>a,a</sup>	24,72 ± 3,33 <sup>a,b</sup>	34,29 ± 5,97 <sup>a,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 9%	47,85 ± 10,45 <sup>b,a</sup>	43,34 ± 10,52 <sup>b,b</sup>	45,43 ± 5,48 <sup>b,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 23%	46,40 ± 10,45 <sup>b,a</sup>	47,36 ± 7,29 <sup>b,b</sup>	57,51 ± 3,64 <sup>b,c</sup>
Madecassol	31,24 ± 4,57 <sup>c,a</sup>	38,08 ± 5,76 <sup>c,b</sup>	41,81 ± 10,71 <sup>c,c</sup>

**Gambar 1.** Area luka kulit tikus hari ke 0, 5, 10 dan 15.

terlepas dan luka telah menutup sempurna, walaupun pada kelompok salep *E. tirucalli* 9% masih terlihat bekas lepasan keropeng.

Salep ekstrak batang *E. tirucalli* 9% mempercepat kesembuhan luka sayat dengan adanya pembentukan jaringan baru pada hari ke-9, sedangkan pada konsentrasi 20% pembentukan jaringan baru justru terlihat pada hari ke-139. Hal ini berbeda dengan hasil yang didapatkan pada penelitian ini, bahwa pada hari ke-10 pemberian salep getah *E. tirucalli* 9%, maupun 23% telah menunjukkan penutupan luka, meskipun penutupan luka pada kelompok tikus yang diberikan salep getah *E. tirucalli* 23% justru terlihat lebih baik. Kesembuhan luka yang lebih baik pada kelompok dengan salep *E. tirucalli* diduga karena kandungan flavonoid dan euphol yang bersifat antiinflamasi.<sup>15,16</sup>

#### 4.2. Ketebalan epidermis luka kulit

Ketebalan epidermis luka kulit tikus berdasarkan uji two-way ANOVA pada penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan nyata dengan nilai  $\text{sig} = 0,000$  ( $\text{sig} \leq 0,05$ ). Dengan uji post hoc Tukey HSD ketebalan epidermis luka kulit tikus kelompok salep

*E. tirucalli* 9%, 23% dan madecassol berbeda nyata jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $\text{sig} \leq 0,05$ ), kelompok salep *E. tirucalli* 23% berbeda nyata jika dibandingkan dengan kelompok madecassol, sedangkan perbedaan tidak nyata nampak pada kelompok salep *E. tirucalli* 9% dibandingkan dengan kelompok salep *E. tirucalli* 23% dan kelompok madecassol (Tabel 3).

Pengamatan mikroskopis preparat histopatologi menunjukkan terbentuknya klot pada epidermis pada hari ke 5 (kelompok kontrol). Epidermis terbentuk di hari ke 15, namun masih terlihat adanya clot di permukaan area luka dan hemoragi di dermis. Kelompok terapi salep *E. tirucalli* 9% dan 23% pada hari ke 15 banyak pembentukan epidermis yang baik dan dibuktikan dengan mulai terbentuknya keratin, namun masih dijumpai adanya perdarahan di dermis. Kelompok madecassol® pada hari ke 15 memperlihatkan hasil paling baik terhadap pembentukan epidermis dan keratin, serta tidak ditemukan adanya perdarahan.

Reepitelialisasi memerlukan migrasi dan proliferasi dari keratinosit. Keratinosit pada lamina basalis dari daerah luka mulai

**Tabel 4.** . Rata – rata ± standar deviasi (SD) jumlah fibroblas pada luka kulit tikus hari ke- 5, 10 dan 15

Kelompok	Jumlah Fibroblas (Rerata ± SD hari ke-)		
	5	10	15
Kontrol	314,00 ± 2,64 <sup>a,a</sup>	73,67 ± 19,42 <sup>b,a</sup>	88,67 ± 59,91 <sup>a,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 9%	11,67 ± 2,89 <sup>a,a</sup>	117,67 ± 18,93 <sup>b,a</sup>	210,67 ± 13,05 <sup>a,c</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 23%	11,00 ± 2,00 <sup>a,a</sup>	96,00 ± 13,11 <sup>b,a</sup>	175,00 ± 30,64 <sup>a,c</sup>
Madecassol	13,00 ± 7,00 <sup>a,a</sup>	110,33 ± 17,62 <sup>b,a</sup>	188,33 ± 71,84 <sup>a,c</sup>

**Tabel 5.** Rata – rata ± standar deviasi jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> pada luka kulit tikus hari ke- 5, 10 dan 15

Kelompok	Jumlah Limfosit CD4 <sup>+</sup> (Rerata ± SD hari ke-)		
	5	10	15
Kontrol	35,00 ± 12,00 <sup>a,a</sup>	32,33 ± 30,92 <sup>a,a</sup>	21,33 ± 7,50 <sup>a,a</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 9%	17,67 ± 3,78 <sup>a,b</sup>	1,67 ± 1,15 <sup>b,a</sup>	3,33 ± 2,51 <sup>a,b</sup>
Salep <i>E. tirucalli</i> 23%	13,67 ± 4,72 <sup>a,b</sup>	3,00 ± 1,73 <sup>b,a</sup>	2,33 ± 0,58 <sup>b,b</sup>
Madecassol	32,67 ± 24,19 <sup>a,a</sup>	24,19 ± 10,69 <sup>a,a</sup>	15,33 ± 3,21 <sup>a,a</sup>

berproliferasi 2-3 hari setelah terjadinya luka. Migrasi dipicu oleh hilangnya kontak hambatan dan tekanan fisik pada struktur perlekatan sel dan akan berhenti ketika sel telah terbentuk perlekatan yang baru. Reepitelialisasi distimulasi oleh makrofag, sitokin, growth factors yang disekreksikan oleh beragam sel pada luka.<sup>17</sup>

Segara setelah terjadi luka, tubuh akan merespon dengan terbentuknya clot untuk mencegah perdarahan. Clot terdiri dari kolagen, platelet, trombin, dan fibronektin.<sup>4</sup> Terbentuknya kembali epidermis dimulai dengan adanya sel yang bermigrasi dan berproliferasi. Stimulus proliferasi dan kemotaksis adalah EGF dan TGF- $\alpha$  yang diproduksi oleh platelet aktif dan makrofag. Epitelialisasi merupakan komponen penting dari penyembuhan luka dan digunakan sebagai parameter penentu keberhasilan penutupan luka. Luka tidak bisa dianggap sembuh tanpa adanya epitelialisasi ulang. Proses seluler dan molekuler yang terlibat dalam inisiasi, pemeliharaan, dan penyelesaian epitelialisasi sangat penting untuk keberhasilan penutupan luka.<sup>18</sup>

#### 4.3. Jumlah fibroblast

Jumlah fibroblast pada luka kulit tikus dalam penelitian ini memperlihatkan tidak adanya perbedaan nyata pada kelompok perlakuan. Hal tersebut ditunjukkan oleh hasil uji Kruskal-Wallis dengan nilai  $p = 0,212$  ( $p \geq 0,05$ ). Perbedaan nyata terdapat pada hasil uji antar waktu pengambilan data dimana jumlah fibroblas semakin meningkat, Tabel 4. Jumlah fibroblas yang teramat pada hari ke-5, 10, dan 15 signifikan berbeda, dengan kecenderungan semakin meningkat. Peningkatan jumlah fibroblas terjadi pada kelompok kontrol seperti pada kelompok salep *E. tirucalli* 9%, 23% dan madecassol.

Fibroblast sangat penting dalam mendukung penyembuhan luka normal, yang terlibat dalam proses-proses penting seperti memecah gumpalan fibrin, menciptakan matriks seluler ekstra baru (ECM) dan struktur kolagen untuk mendukung sel-sel lain yang terkait dengan penyembuhan luka yang efektif, serta mengontraksi luka.<sup>19,20</sup> Pada jaringan yang terluka, fibroblas diaktifkan dan berdiferensiasi menjadi myofibroblast, yang berkontraksi dan berpartisipasi dalam penyembuhan dengan mengurangi ukuran luka dan mensekresi protein ECM. Myofibroblast pada luka kulit umumnya dipercaya berasal dari rekrutmen lokal fibroblast di dermis dan jaringan subkutan yang mengelilingi luka, perisit serta sel otot polos.<sup>21</sup> Pemberian salep *E. tirucalli* 9% dan 23% menunjukkan tren yang sesuai dimana pada hari ke-10 fibroblas meningkat sampai teramat pada hari ke-15.

#### 4.4. Jumlah limfosit CD4<sup>+</sup>

Jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> pada luka kulit tikus menunjukkan adanya perbedaan nyata yang dibuktikan oleh hasil uji Kruskal-Wallis dengan nilai  $p = 0,000$  ( $p \leq 0,05$ ). Hasil uji Mann-Whitney U memperlihatkan bahwa adanya perbedaan nyata jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> kelompok kontrol dengan kelompok salep *E. tirucalli* 9%, kelompok salep *E. tirucalli* 23% ( $p \leq 0,05$ ). Penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> di jaringan luka pada kelompok salep *E. tirucalli* 9% dan 23%, kelompok kontrol dan madecassol cenderung semakin menurun. Hasil menunjukkan nampak adanya limfosit CD4<sup>+</sup> yang menginfiltasi jaringan luka pada hari ke-5. Jumlah limfosit CD4<sup>+</sup> menurun pada hari ke-10 baik pada kelompok kontrol, salep *E. tirucalli* 9%, 23% maupun kelompok madecassol.

Ketika kulit mengalami kelukaan,

antigen yang tidak dikenali mengekspresikan pada keratinosit yang rusak sehingga TCR $\gamma\delta$  memproduksi epithelial growth factors dan sitokin inflamatori.<sup>22</sup> TCR $\gamma\delta$  mengekspresikan CD3 $^+$  yang berperan sebagai transduser sinyal, dan CD4 $^+$  serta CD8 $^+$  sebagai ko-reseptor. Limfosit CD4 $^+$  dan CD8 $^+$  menginfiltrasi luka kulit secara progresif, hanya setelah neutrofil dan makrofag dan setelah luka mengalami re-epitelialisasi. Tidak adanya limfosit CD4 $^+$  dan CD8 $^+$  meningkatkan kekuatan pemecahan luka dan tingkat kolagen.<sup>23</sup> Pemberian salep *E. tirucalli* 9% dan 23% menyebabkan munculnya limfosit CD4 $^+$  lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol meskipun tidak signifikan secara statistik dan tetap tinggi sampai hari ke-15 berkebalikan dengan kelompok madecassol yang semakin menurun. Hal ini selaras dengan penelitian Avelar et. al.<sup>24</sup> bahwa inkubasi in vitro selama 4 jam leukosit darah perifer dengan getah *E. tirucalli* yang didilusi pada dimetilsufoksida meningkatkan persentase limfosit T positif CD4 $^+$  secara signifikan.

## 5. Simpulan

Pemberian topikal salep *E. tirucalli* 9% dan 23% berpotensi terhadap percepatan kesembuhan luka pungsi kulit tikus Wistar secara makroskopik berdasarkan persentase area luka, dan mikroskopik berdasarkan ketebalan epidermis dan jumlah limfosit CD4 $^+$ . Jumlah fibroblas tidak berbeda nyata terhadap kelompok kontrol. Tidak ada perbedaan antara pemberian salep *E. tirucalli* 9% dan 23% terhadap parameter yang diamati.

## Daftar Pustaka

- Manoorkar V and Gachande BD. Phytochemical analysis of some plant latex. Int. J. Of Life Science. 2015;3(1):108-110.
- Upadhyay B, Singh K, Kumar A. Ethno-medical, Phytochemical and Antimicrobial Studies of *Euphorbia tirucalli* L. Journal of Phytology. 2010;2 (4):65-77.
- Sundaramurthi D, Krishnan U, Sethuraman S. Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering. Polymer Reviews 2014;54:348-376.
- Velnar T, Bailey T, and Smrkolj V. The Wound Healing Process: an Overview of TheCellular and Molecular Mechanisms. The Journal of International Medical Research. 2009;37:1528-1542.
- Pavletic MM. Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery.3rd Ed. Iowa:Wiley-Blackwell; 2010.
- Ramirez-Pliego O, Escobar-Zarate DL, Rivera-Martinez GM, Cervantes-Badillo MG, Esquivel-Guadarrama FR, Rosas-Salgado G, Rosenstien Y, and Santana MA. CD43 Signals Induce Type One Lineage Commitment of Human CD4+ T Cells. BMC-Immunology. 2007;8(30): 1-10.
- Prabha M, Ramesh C, Kuppast I, and Mankani K. Studies on anti-inflammatory activities of *Euphorbia tirucalli* L. latex. Int. J. Chem. Sci. 2008;6(4):1781-1787.
- Anief M. Ilmu Meracik Obat Teori dan Praktik. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2008
- Qomariah, S. Efektivitas salep ekstrak batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli*) pada penyembuhan luka sayat tikus putih (*rattus norvegicus*) (Skripsi). Semarang: Universitas Negeri Semarang; 2014.
- Aisah S. Efektivitas salep ekstrak batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli*) pada penyembuhan luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Skripsi). Purwokerto:Universitas Muhammadiyah Purwokerto; 2016
- Carpenter J, Mashima Y, Rupiper D. 2001. Exotic Animal Formulary 4th edition. Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
- Bush JA, Ferguson M, Mason T, and McGrouther DA. Skin Tension or Skin Compression? Small Circular Wounds are Likely to Shrink, Not Gape. JPRAS, 2008;61: 529-534.
- Takeo M, Lee W, Ito M. Wound Healing and Skin Regeneration. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5:1-12
- Kutsukake M, Shibao H, Uematsu K, Fukatsu T. Scab formation and wound healing of plant tissue by soldier aphid.

- Proceeding of The Royal Society. 2016; B276: 1555-1563.
15. Bhagyashri C, Jogendra H, Avinash P. Plant Latex: An Inherent Spring of Pharmaceuticals. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2015;4(4): 1781-1796.
16. Lin M, Lin A, Wu D, Wang S, Chang F, Wu Y, Huang Y. Euphol from Euphorbia tirucalli selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. Food and Chemical Toxicology. 2012;50: 4333-4339.
17. Landen N, Li D, Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cell. Mol. Life Sci. 2016;73: 3861-3885.
18. Pastar I, Stojadinovic D, Yin N, Ramirez H, Nusbaum A, Sawaya A, Patel S, Khalid L, Isseroff R, Tomic-Canic M. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. Advanced in Wound Care. 2014;3(7):445-464
19. Bainbridge P. Wound Healing and The Role of Fibroblast. J Wound Care. 2013;22(8):407-412
20. Tracy L, Minasian R, Caterson E. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. Advances in Wound Care. 2014;5(3): 119-136.
21. Li B dan Wang J. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. J Tissue Viability. 2011;20(4):108-120
22. Havran W and Jameson J. Epidermal T cells and wound healing. J. Immunol. 2010;184(10): 5423-5428.
23. Chen L, Mehta N, Zhao Y, DiPietro L. Absence of CD4 or CD8 Lymphocytes Changes Infiltration of Inflammatory Cells and Profiles of Cytokines Expression in Skin Wounds, but does not impair healing. Exp. Dermatol. 2014;23(3):189-194
24. Avelar B, Lelis F, Avelar R, Weber M, Souza-Fagundes E, Lopes M, Martins-Filho O, Brito-Molo G. The crude latex of Euphorbia tirucalli modulates the cytokine response of leucocytes, especially CD4<sup>+</sup> lymphocytes. Rev. Bras. Farmacogn. 2011;21(4): 662-667