

**PENGARUH PEMBERIAN OLES MADU TERHADAP KADAR  
*TRANSFORMING GROWTH FACTOR* –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) PADA SERUM**

**Studi *in vivo* Terapi Ulkus Diabetikum pada Mencit Balb/C yang diinduksi  
Streptozotocin**

**SKRIPSI**

Untuk memenuhi salah satu persyaratan  
Guna mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

**Julia Salsa Kusuma**

**30101900109**

FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG

2023

**SKRIPSI**  
**PENGARUH PEMBERIAN OLES MADU TERHADAP KADAR**  
***TRANSFORMING GROWTH FACTOR -  $\beta$*  (TGF -  $\beta$ ) PADA**  
**SERUM**

**Studi *in vivo* Terapi Ulkus Diabetikum pada Mencit Jantan Balb/C yang**  
**diinduksi Streptozotocin**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

**Julia Salsa Kusuma**

**30101900109**

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Pada tanggal 29 Maret 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Tim Penguji**

Pembimbing 1



dr. Eko Setiawan, Sp.B

Pembimbing II



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra,  
M.si, Med

Anggota Tim Penguji I



dr. Dimas Febriarto, Sp.OT, M.Kes

Anggota Tim Penguji II



dr. Masfivah M.Si. Med.SpMK

Semarang, 30 Maret 2023

Fakultas Kedokteran  
Universitas Islam Sultan Agung  
Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF.SH

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini saya:

Nama : Julia Salsa Kusuma

NIM 30101900109

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH PEMBERIAN OLES MADU TERHADAP KADAR  
*TRANSFORMING GROWTH FACTOR* –  $\beta$  (TGF –  $\beta$ ) PADA SERUM  
(Studi *in vivo* Terapi Ulkus Diabetikum pada Mencit Jantan Balb/C yang  
diinduksi Streptozotocin)”**

Adalah hasil karya skripsi Saya dan dengan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau Sebagian besar karya tulis orang tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Semarang, 14 Maret 2023



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Julia Salsa Kusuma', is written over the banknote and QR code.

Julia Salsa Kusuma

## PRAKATA

*Assalamualaikum wr.wb.*

*Alhamdulillah* rabbi'l'alamin, puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya penulis diberikan kesempatan dan kesehatan sehingga dapat menyelesaikan Karya Tulis ilmiah yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN OLES MADU TERHADAP KADAR TRANSFORMING GROWTH FACTOR –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) PADA SERUM (Studi in vivo Terapi Ulkus Diabetikum pada Mencit Balb/C yang diinduksi streptozotocin)”** yang merupakan salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Skripsi ini tentunya tidak lepas dari bimbingan, masukan, dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar besarnya kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu dalam memberikan fasilitas dan perizinan dalam pengambilan data penelitian.
2. dr. Eko Setiawan, Sp.B dan Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.si, Med selaku dosen pembimbing I dan II yang telah memberikan waktu, tenaga, ilmu serta kesabaran dalam membimbing pada proses penyusunan karya tulis ilmiah penulis hingga dapat terselesaikan.
3. dr. Dimas Febriarto, Sp.OT, M.Kes dan dr. Masfiah M.Si. Med.Sp.MK selaku dosen penguji I dan II yang telah memberi masukan dan arahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah hingga akhir

4. Kepala Laboratorium Biomedik Terintegrasi Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan seluruh staf yang telah membantu penelitian dari awal sampai selesai.
5. Orang tua dan keluarga yang sudah memfasilitasi dan memberi dukungan kepada penulis sampai dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.
6. Keluarga Besar Laboratorium Anatomi FK Unissula
7. Kepada teman terdekat penulis yaitu Maharani Aulia, Ifcian Sabeta, Ristya Widya, dan Salma Genta serta “Moderator Band” (Hayyu Adenia, Daffa Afif, Sekar Ayu, Centha Previcreta, Annisa Dita, Mahardika Adhitya, Muhammad Bassam, dan Camila Ratnadilla)
8. Teman kelompok skripsi yaitu Corina Sinar, Muhammad Bassam, dan Niar Al Inayah
9. Seluruh pihak yang telah membantu penulis untuk menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini hingga akhir.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan demi tercapainya hasil terbaik dari penelitian ini

Akhir kata penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran.

Wassalamualaikum wr wb

Semarang, 14 Maret 2023

Julia Salsa Kusuma

## DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN.....	i
SURAT PERNYATAAN .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR SINGKATAN.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
INTISARI .....	xii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB II .....	5
TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Tinjauan Pustaka.....	5
2.1.1 <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> (TGF- $\beta$ ) .....	5
2.1.2 Madu.....	11
2.1.3 Diabetes Mellitus.....	18
2.1.4 Ulkus Diabetikum.....	21
2.2 Kerangka Teori.....	40
2.3 Kerangka Konsep .....	40
BAB III.....	42
METODE PENELITIAN .....	42
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	42

<b>3.2</b>	<b>Variabel dan Definisi Operasional.....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Variabel Penelitian .....	43
3.2.2	Definisi Operasional.....	43
<b>3.3</b>	<b>Populasi dan Sampel Penelitian .....</b>	<b>44</b>
3.3.1	Populasi Penelitian .....	44
3.3.2	Sampel Penelitian .....	44
<b>3.4</b>	<b>Instrumen Penelitian .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Instrumen Penelitian.....	45
3.4.2	Bahan Penelitian.....	46
<b>3.5</b>	<b>Cara Penelitian .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Pengajuan <i>Ethical Clearance</i> .....	46
3.5.2	Prosedur Penelitian.....	46
<b>3.6</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>51</b>
3.6.1	Tempat Penelitian.....	51
3.6.2	Waktu Penelitian .....	51
<b>3.7</b>	<b>Alur Penelitian .....</b>	<b>52</b>
<b>3.8</b>	<b>Analisa Hasil .....</b>	<b>53</b>
<b>BAB IV</b>	<b>.....</b>	<b>54</b>
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Hasil Penelitian .....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Deskripsi Kadar TGF- $\beta$ .....	54
4.1.2	Analisis perbedaan kadar TGF- $\beta$ .....	55
<b>4.2</b>	<b>Pembahasan .....</b>	<b>56</b>
<b>BAB V</b>	<b>.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran.....</b>	<b>60</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>.....</b>	<b>61</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>.....</b>	<b>64</b>

## DAFTAR SINGKATAN

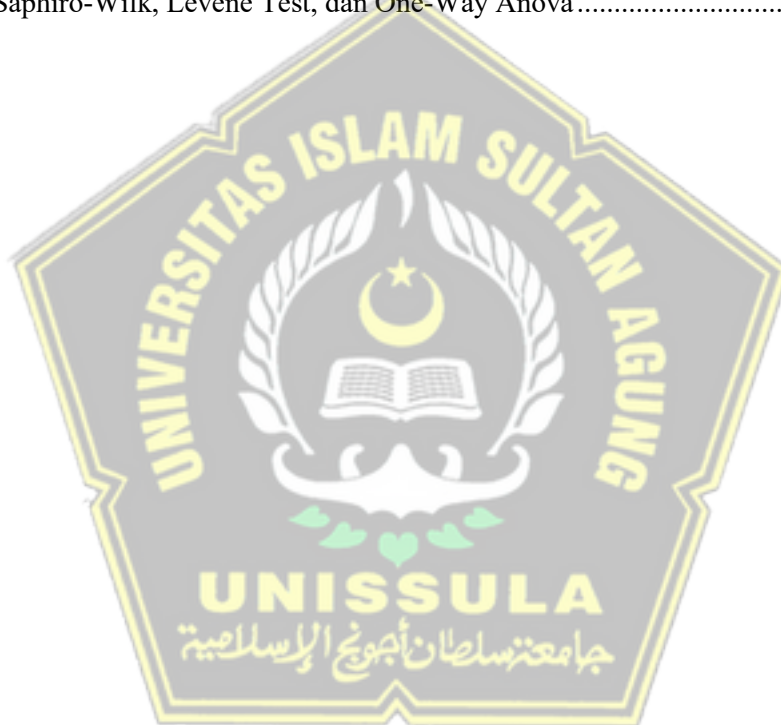
ABI	: <i>Ankle Brachial Index</i>
AGE	: <i>Advanced Glycation End Products</i>
Akt/PKB	: Protein Kinase B
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
COX <sub>2</sub>	: Cyclooxygenase-2
DCTT	: <i>Diabetes Control and Complications Trial Assay</i>
DM	: Diabetes Mellitus
ECM	: <i>Extracelullar Matrix</i>
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERK	: <i>Extracellular-Related Kinase</i>
FAK	: <i>Focal Adhesion Kinase</i>
GDP	: Gula darah puasa
GDS	: Gula Darah Sewaktu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hydrogen Peroxide
HbA1c	: Hemoglobin A1c
IFN-γ	: Interferon Gamma
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1	: Interleukin 1
IL6	: Interleukin 6
ITCC	: <i>The Instant Total Contact Casting</i>
LAP	: <i>N-terminal latency-associated peptide</i>
LLC	: <i>Large latent complex</i>
LTBP	: <i>Latent TGF-β binding protein</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein-1
MRSA	: <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>



NGF	: <i>Nerve Growth Factor</i>
IGF 1	: <i>Insulin Like Growth Factor</i>
NGSP	: <i>National Glycohaemoglobin Standarization Program</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
PaCO <sub>2</sub>	: <i>Partial Pressure of Carbon Dioxide</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PEDIS	: <i>Perfusion, Extent/Size, Depth/Tissue Loss, Infection, Sensation</i>
PERKENI	: <i>Perkumpulan Endokrinologi Indonesia</i>
PGE <sub>2</sub>	: <i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PVD	: <i>Peripheral Vascular Disease</i>
RCW	: <i>Removeable Cast Walker</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SLC	: <i>Small latent complex</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solution</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TA	: <i>TGF-β activator</i>
TBI	: <i>Toe Brachial Index</i>
TCC :	: <i>Total Contact Casting</i>
TcPO <sub>2</sub>	: <i>Transcutaneous Oxygen Pressure</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGF-βRI	: <i>TGF-β receptor I</i>
TGF-βRII	: <i>TGF-β receptor II</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TTGO	: <i>Tes Toleransi Glukosa Oral</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VRE	: <i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>

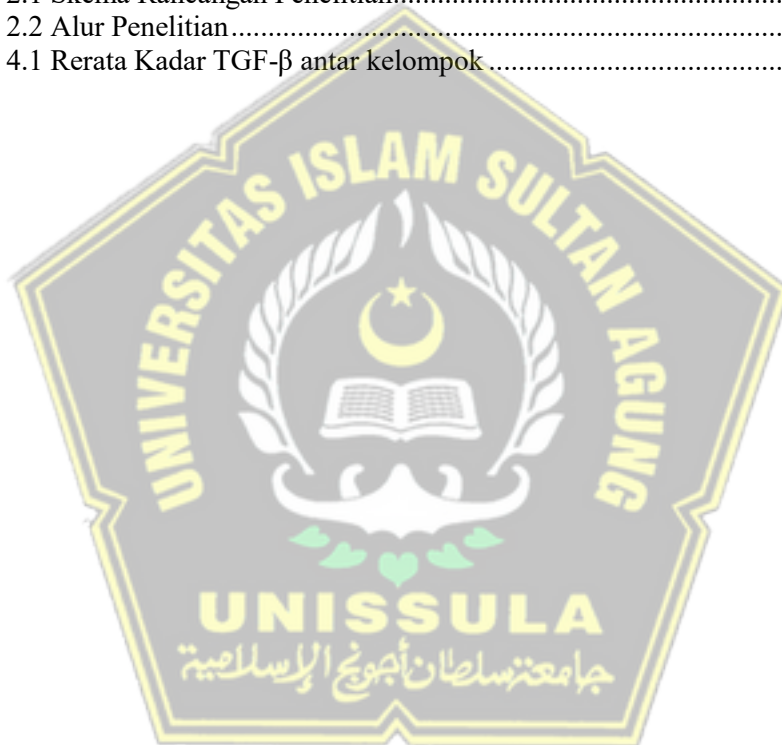
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi DM berdasarkan etiologi.....	19
Tabel 2.2 Kriteria Glukosa Darah Puasa (GDP).....	20
Tabel 2.3 Kriteria Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO .....	21
Tabel 2.4 Kriteria Hemoglobin A1c .....	21
Tabel 2.5 Klasifikasi Peripheral Vascular Disease (PVD) .....	26
Tabel 2.6 Klasifikasi Meggitt - Wagner pada Ulserasi Kaki.....	28
Tabel 2.7 Klasifikasi University of Texas pada ulkus diabetikum kaki .....	29
Tabel 2.8 Klasifikasi Sistem PEDIS.....	30
Tabel 2.9 Jenis – jenis Dressings.....	37
Tabel 2.10 Kriteria Infeksi.....	39
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Kadar TGF- $\beta$ .....	55
Tabel 4.2 Uji Saphiro-Wilk, Levene Test, dan One-Way Anova.....	56



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pembentukan Small Latent Complex (SLC) dan Large Latent Complex (LLC).....	8
Gambar 2.2 Aktivasi TGF- $\beta$ .....	9
Gambar 2.3 Jalur Pensinyalan Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ ).....	10
Gambar 2.4 Patogenesis Ulkus Diabetikum pada Kaki.....	27
Gambar 2.5 Klasifikasi Ulserasi Kaki Meggit-Wagner.....	28
Gambar 2.6 Gangguan Proses Penyembuhan Luka pada pasien DM .....	35
Gambar 2.7 Kerangka Teori .....	40
Gambar 2.8 Kerangka Konsep .....	40
Gambar 2.1 Skema Rancangan Penelitian.....	42
Gambar 2.2 Alur Penelitian.....	52
Gambar 4.1 Rerata Kadar TGF- $\beta$ antar kelompok .....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pengukuran Rerata Kadar TGF- $\beta$ .....	64
Lampiran 2. Analisis Statistik .....	66
Lampiran 3. Ethical Clearance .....	69
Lampiran 4. Surat Keterangan Penelitian Laboratorium Biomedik Terintegrasi FK Unissula Semarang.....	70
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian .....	71



## INTISARI

Madu merupakan produk alami yang diperoleh lebah madu dari nektar bunga yang bersifat antioksidan, antibakteri, anti inflamasi, dan dapat membantu penyembuhan luka. Balutan luka menggunakan madu dapat menciptakan lingkungan luka tetap lembab dan bertindak sebagai debridement alami sehingga dapat mempercepat sekresi faktor pertumbuhan salah satunya Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dan mempersingkat waktu penyembuhan luka.

Penelitian eksperimental ini menggunakan 24 ekor mencit galur Balb/C dengan ulkus diabetikum dan menggunakan desain *post-test only control group design*. Mencit diinduksi diabetes mellitus dan dilakukan pembuatan luka pada punggung mencit dengan menempelkan logam panas. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu K1 atau kelompok kontrol yang diberi NaCl 0,9%, K2 yaitu kelompok dengan pemberian oles madu 50%, dan K3 yaitu kelompok dengan pemberian oles madu 100%. Sebelum percobaan, mencit menjalani masa adaptasi selama tujuh hari. Setelah perlakuan selama 7 hari, kadar TGF- $\beta$  diukur dengan metode ELISA serum mencit.

Rerata kadar TGF- $\beta$  pada K1 ( $48,8191 \pm 12,09438$  pg/ml); K2 ( $50,3115 \pm 18,93141$  pg/ml); dan K3 ( $47,1066 \pm 1524049$  pg/ml). Analisa data diperoleh distribusi data normal ( $p \geq 0,05$ ) dan varian homogen ( $p \geq 0,05$ ), dilanjutkan dengan Uji beda *One Way Anova* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) pada rerata kadar TGF- $\beta$  ketiga kelompok. Keterbatasan penelitian ini yaitu tidak dapat mendeteksi jenis isoform TGF- $\beta$  yang spesifik yaitu TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, dan TGF- $\beta$ 3.

Pemberian oles madu tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap kadar TGF- $\beta$  pada mencit dengan ulkus diabetikum.

**Kata Kunci :** Ulkus Diabetikum; TGF- $\beta$ ; Madu

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu gangguan endokrin dikarenakan adanya abnormalitas pada sintesis insulin, kinerja insulin maupun keduanya yang dicirikan dengan adanya peningkatan gula darah yang abnormal. (PERKENI, 2021). DM dan komplikasinya terutama ulkus diabetikum dapat menjadi penyebab angka kesakitan dan kematian tertinggi di dunia (Zhang *et al.*, 2017). Proses penyembuhan ulkus diabetikum merupakan proses yang kompleks dan membutuhkan peran *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β). TGF-β disekresi oleh sel inflamasi seperti makrofag yang akan mengaktivasi dan meregulasi sel untuk berdiferensiasi dan berproliferasi. Penelitian oleh Eryun Zhang *et al* (2016) menunjukkan adanya penurunan kadar TGF-β pada pasien ulkus diabetikum karena proses penyembuhan ulkus yang berkepanjangan (Qi *et al.*, 2018).

Data dari *International Diabetes Federation* menjelaskan bahwa sebanyak 537 juta orang berusia 20 hingga 79 tahun terkena diabetes pada tahun 2021 dan diprediksikan meningkat sebanyak 643 juta orang pada tahun 2030 (Ibrahim *et al.*, 2017). Hasil data Riset Kesehatan Dasar pada tahun 2018 menunjukkan bahwa prevalensi kejadian DM di Indonesia meningkat sebanyak 0,5% dari hasil riset di tahun 2013. Kadar gula yang meningkat dalam darah pasien DM akan meningkatkan resiko komplikasi salah satunya yang paling sulit sembuh adalah ulkus diabetikum. Ulkus diabetikum pada kaki memiliki resiko terjadinya infeksi yang memerlukan rawat inap dan 20% dari infeksi ini perlu diamputasi (Ibrahim *et al.*, 2017). Prevalensi penderita DM yang mengalami ulkus di Indonesia sebesar

15% dan mengalami amputasi sebesar 30%. Lebih dari satu juta orang di Indonesia kehilangan satu kakinya dengan amputasi karena ulkus diabetikum (Oktorina et al., 2019).

Ulkus diabetikum adalah kondisi ulserasi, infeksi, atau kerusakan jaringan yang lebih dalam yang didahului dengan keadaan neuropati, iskemia, atau keduanya (Ranjitkar et al., 2018). Pasien dengan neuropati perifer atau penyakit pembuluh darah perifer akan memiliki resiko amputasi kaki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pasien tanpa kondisi tersebut (Chellan et al., 2012). Secara umum pengobatan ulkus diabetikum pada kaki meliputi pengurangan tekanan pada kaki dengan mengistirahatkan kaki atau memakai alas kaki khusus, *debridement* luka, pengendalian infeksi dan penggunaan balutan luka (*dressing*).

Pembalut luka yang baik adalah pembalut yang dapat menyerap eksudat luka yang berlebih, menjaga kelembaban luka, membantu proses debridemen autolitik, mempercepat granulasi dan menjaga luka dari kehilangan cairan dan infeksi (Saco et al., 2016). Balutan luka yang sering digunakan saat ini adalah balutan menggunakan kain kasa. Balutan ini mudah dicari tetapi kurang efektif dan memiliki banyak kerugian seperti dapat menempel pada dasar luka dan mengakibatkan perdarahan, tidak menciptakan lingkungan yang lembab, serta serat kain dapat masuk ke jaringan luka yang dapat memperlambat penyembuhan ulkus diabetikum sehingga perlu adanya pembaharuan jenis balutan luka salah satunya menggunakan balutan madu (Eleftheriadou et al., 2018).

Balutan luka menggunakan madu merupakan salah satu metode untuk merawat ulkus diabetikum. Madu telah digunakan dalam perawatan luka sejak 3000 tahun sebelum masehi. Sejak adanya pengenalan antibiotik dalam pengobatan

modern, penggunaan madu secara dioles pada luka mulai menurun, tetapi setelah adanya penelitian baru ditemukannya bakteri resisten antibiotik, madu banyak digunakan kembali sebagai pengobatan luka modern (Insani et al., 2017). Madu memiliki kandungan fruktosa (38%), glukosa (31%) dan beberapa jenis gula lainnya. Kandungan gula yang tinggi pada madu ini direkomendasikan untuk pasien diabetes karena memiliki indeks glikemik yang rendah. Salah satu madu yang dapat digunakan untuk balutan luka yaitu madu manuka. Madu manuka merupakan madu yang sensitif terhadap 11 bakteri gram negatif dan bakteri gram positif sehingga salah satu madu ini sangat efektif digunakan sebagai balutan luka (Ahmed & Othman, 2013).

Penelitian oleh Hozzein *et al* (2015) pada tikus dengan model luka sayat yang diinduksi diabetes dengan pemberian topikal propolis diperoleh kadar TGF- $\beta$  yang meningkat signifikan pada hari ke-15 dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian propolis (Hozzein et al., 2015). Penelitian oleh Rashid *et al* (2014) pada pasien ulkus diabetikum kaki dengan pemberian oles madu juga menunjukkan penyembuhan luka dalam 7-35 hari (Rashid Surahio et al., 2014). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini memiliki tujuan untuk mengamati kadar TGF- $\beta$  pada proses penyembuhan ulkus diabetikum yang dilakukan pemberian oles madu.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian oles madu terhadap kadar *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) pada serum mencit dengan ulkus diabetikum?



### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian topikal (oles) madu terhadap kadar *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) pada penyembuhan ulkus diabetikum mencit

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian oles madu terhadap peningkatan kadar *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) pada serum ulkus diabetikum mencit dengan madu 50% dan 100% yang dibandingkan dengan kontrol

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan informasi untuk perkembangan ilmu dalam merawat ulkus diabetikum

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat menjadi masukan bagi pelayanan kesehatan dalam melakukan perawatan ulkus diabetikum

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Pustaka

##### 2.1.1 *Transforming Growth Factor* $\beta$ (TGF- $\beta$ )

###### 2.1.1.1 Definisi Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

*Transforming growth factor – beta* (TGF –  $\beta$ ) adalah faktor pertumbuhan yang memengaruhi penyembuhan luka dan memiliki 3 bentuk yaitu TGF –  $\beta$ 1 hingga TGF –  $\beta$ 3. Makrofag, fibroblas, keratinosit dan trombosit merupakan sumber utama dari faktor pertumbuhan ini. TGF –  $\beta$  merupakan faktor pertumbuhan multifungsional pada penyembuhan luka dengan cara meregulasi, proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel. TGF  $\beta$  juga berfungsi untuk produksi matriks ekstraseluler dan modulasi sistem imun (Lichtman et al., 2016). TGF –  $\beta$  merupakan regulator bifungsional yang dapat menghambat ataupun merangsang proliferasi sel. TGF –  $\beta$  dapat mengatur berbagai peristiwa fisiologis secara normal, apabila terjadi gangguan pada pensinyalan TGF –  $\beta$  dapat menyebabkan penyakit seperti gangguan jaringan ikat, fibrosis, dan kanker (Morikawa et al., 2016)

TGF –  $\beta$ 1 merupakan faktor penting selama proses penyembuhan luka. TGF –  $\beta$ 1 akan di sekresikan oleh trombosit selama respon akut pada luka dan berperan menjadi kemoatraktan bagi makrofag dan fibroblas ke lokasi luka (Morikawa et al., 2016)

Penyembuhan luka yang normal merupakan proses yang kompleks dan melibatkan beberapa peristiwa yaitu (1) migrasi sel dan inflamasi, (2) proliferaso fibroblas dengan pembentukan jaringan granulasi dan deposisi matriks ekstraseluler, dan (3) remodelling jaringan parut untuk jangka waktu yang lama.

TGF –  $\beta$  diketahui dapat meregulasi beberapa peristiwa tersebut melalui kerja dari beberapa sel. Ekspresi dan aktivasi TGF –  $\beta$ 1 diinduksi dengan cepat karena adanya respon cedera. TGF –  $\beta$ 1 juga dapat menginduksi ekspresi protein ekstraseluler seperti fibronectin dan kolagen sehingga dapat mempercepat deposisi matriks ekstraseluler di tempat penyembuhan luka. TGF –  $\beta$  juga dapat menghambat degradasi matriks ekstraseluler yang disebabkan oleh menurunnya ekspresi metalloproteinase (Morikawa et al., 2016).

#### 2.1.1.2 Peran Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) memiliki beberapa peran pada proses penyembuhan luka yaitu :

##### 2.1.1.2.1 Pensinyalan TGF $\beta$ untuk Homeostasis Epidermis

Pada kulit yang sehat, TGF  $\beta$ 1 berpartisipasi dalam menjaga homeostasis jaringan dengan cara berperan sebagai sitokin penghambat pertumbuhan. Jalur TGF  $\beta$  dapat menghentikan siklus sel pada awal fase G1 melalui transkripsi yang dimediasi oleh protein smad. TGF  $\beta$  dikenal sebagai supresor tumor pada stadium awal tumorigenesis (Ramirez et al., 2014).

##### 2.1.1.2.2 Pensinyalan TGF $\beta$ pada Proses Penyembuhan Luka Akut dan Epitelisasi

TGF  $\beta$  tidak hanya penting bagi homeostasis epidermis melainkan juga berperan penting pada semua fase penyembuhan luka dengan mengatur aktivitas keratinosit, fibroblas, sel endotel, monosit, dan sel lainnya (Ramirez et al., 2014)

Semua isoform TGF  $\beta$  berperan dalam penyembuhan luka dan re epitelisasi. Setelah terjadinya cedera akut, TGF  $\beta$ 1 meningkat dan disekresi oleh keratinosit, trombosit, monosit, makrofag, dan fibroblas. TGF  $\beta$ 1 berperan penting

dalam menginisiasi fase inflamasi dan pembentukan granulasi jaringan serta menstimulasi kontraksi luka melalui induksi otot polos alfa aktin dalam fibroblas, dan menginduksi diferensiasi myofibroblas. TGF- $\beta$ 1 juga terlibat dalam angiogenesis dengan meningkatkan faktor pertumbuhan endotel vaskuler dan TGF  $\beta$ 1 juga mendorong migrasi keratinosit selama penutupan luka. Selain TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2 juga berperan dalam semua tahap penyembuhan luka dan telah terbukti dapat mempercepat re epitelisasi. TGF  $\beta$ 3 dapat membatasi pembentukan jaringan parut dan dapat meningkatkan kolagen. Beberapa studi menggunakan model luka pada hewan menunjukkan bahwa adanya peningkatan ekspresi TGF  $\beta$  dan reseptornya pada epidermis daerah luka setelah cedera (Ramirez et al., 2014).

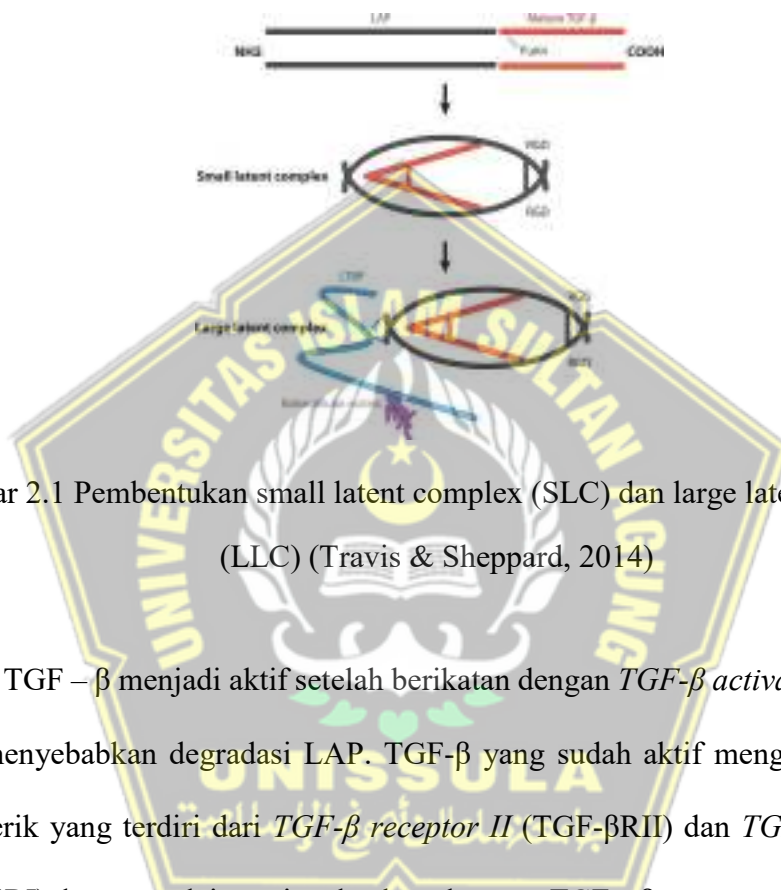
#### 2.1.1.2.3 Supresi TGF $\beta$ pada luka Kronis

Kondisi normal proses penyembuhan luka dicirikan dengan aktivasi jalur TGF  $\beta$ . Beberapa studi menyebutkan bahwa adanya penurunan ekspresi ketiga isoform TGF  $\beta$ , deregulasi gen target TGF  $\beta$  dan hilangnya protein smad2 pada luka kronis. Protein smad 7 sebagai inhibitor intrinsik TGF  $\beta$  juga menurun pada luka kronik. Penelitian terkait adanya supresi jalur TGF  $\beta$  pada epidermis luka kronis menandakan keratinosit tidak teraktivasi dan tidak berdiferensiasi dengan baik yang akan menimbulkan hiperproliferasi dan hiperkeratotik epidermis karena adanya ekspresi c-myc yang berlebih sehingga luka kronis dapat kehilangan control sitostatiknya (Ramirez et al., 2014).

#### 2.1.1.3 Aktivasi TGF – $\beta$

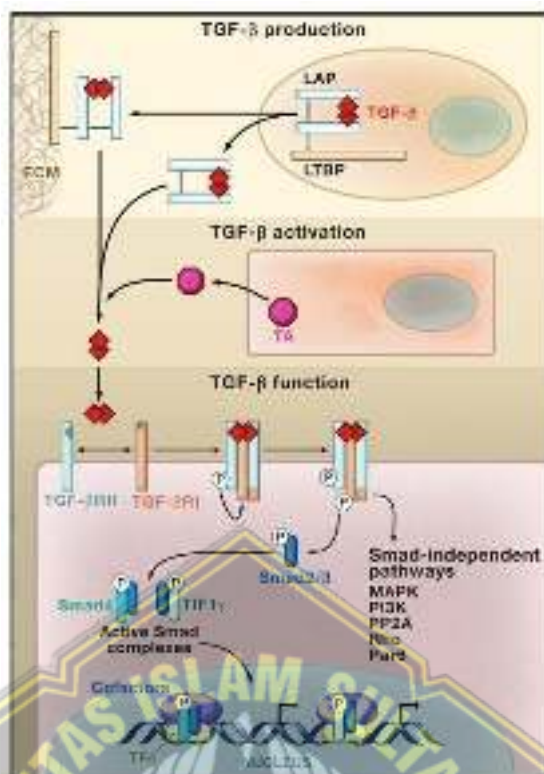
TGF-  $\beta$  dikodekan dalam struktur dimer inaktif yang terdiri dari *N-terminal latency-associated peptide (LAP)* dan *C-terminal mature cytokine*. LAP dan sitokin TGF –  $\beta$  yang matur dibelah oleh enzim furin. Bagian LAP membentuk lipatan disekitar sitokin yang matur dan menghalangi akses TGF- $\beta$  ke reseptornya yang

disebut *small latent complex* (SLC). *Small latent complex* (SLC) dapat berinteraksi dengan *latent TGF- $\beta$  binding protein* (LTBP) dan membentuk *large latent complex* (LLC). LTBP juga dapat memfasilitasi *large latent complex* (LLC) mengikat matriks ekstraseluler seperti fibrillin dan fibronektin yang dibantu oleh enzim transglutaminase (Travis & Sheppard, 2014).



Gambar 2.1 Pembentukan small latent complex (SLC) dan large latent complex (LLC) (Travis & Sheppard, 2014)

TGF- $\beta$  menjadi aktif setelah berikatan dengan *TGF- $\beta$  activator* (TA) yang akan menyebabkan degradasi LAP. TGF- $\beta$  yang sudah aktif mengikat kompleks tetramerik yang terdiri dari *TGF- $\beta$  receptor II* (TGF- $\beta$ RII) dan *TGF- $\beta$  receptor I* (TGF- $\beta$ RI) dan memulai pensinyalan ke sel target. TGF- $\beta$  receptor teraktifasi akan menginisiasi jalur pensinyalan *smad dependent pathway* yang diperantarai oleh protein smad dan *smad independent pathway* yang diperantarai oleh *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), PI3K kinase, PP2A phosphatase, *Rho family proteins*, dan protein Par 6 (Travis & Sheppard, 2014).



Gambar 2.2 Aktivasi TGF- $\beta$  (Travis & Sheppard, 2014)

#### 2.1.1.4 Jalur Pensinyalan Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Migrasi dan proliferasi keratinosit selama proses epitelisasi diregulasi oleh beberapa *growth factor* termasuk *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ). Sinyal TGF  $\beta$  pada kulit yang sehat memiliki peran dalam homeostasis jaringan melalui regulasi siklus sel keratinosit dan menghambat proliferasi. Selama penyembuhan luka, TGF  $\beta$  tidak hanya meregulasi proses epitelisasi tetapi juga meregulasi proses inflamasi, angiogenesis, dan pembentukan jaringan granulasi.

TGF  $\beta$  merupakan sitokin pluripoten yang terdiri dari 3 bentuk yaitu TGF  $\beta$ 1, 2, dan 3 dengan TGF  $\beta$ 1 yang berperan pada proses penyembuhan luka. Ketiga bentuk ini diekspresikan di tempat yang berbeda pada tiap lapisan kulit. TGF  $\beta$ 1 diekspresikan di lapisan granulosum dan lapisan corneum sementara itu TGF  $\beta$ 2 dan TGF  $\beta$ 3 diekspresikan pada stratum supra – basal yang mengindikasikan bahwa ketiga isoform tersebut memiliki fungsi yang berbeda. Semua isoform TGF  $\beta$

diekspresikan sebagai molekul pro-peptida dalam bentuk laten yang dapat diaktivasi oleh protease, integrin, thrombospondin – 1, reactive oxygen species, dan pH yang rendah. TGF  $\beta$  mengikat TGF  $\beta$  reseptor II (TGF  $\beta$ RII) transmembran, dilanjutkan dengan heterodimerisasi dan fosforilasi melalui serin/threonine kinase dari TGF  $\beta$  reseptor I (TGF  $\beta$ RI) transmembran. Mediator utama pensinyalan TGF  $\beta$  adalah protein Smad. TGF  $\beta$ -RII yang sudah aktif mengikat dan memfosforilasi reseptor spesifik smad 2 atau smad 3 dilanjutkan dengan heterodimerisasi dengan smad 4 lalu mengalami translokasi menuju nukleus. Kompleks smad yang teraktivasi menjadi faktor transkripsi pada nucleus sel yang akan meregulasi ekspresi gen target TGF  $\beta$ . Inhibitor smad 6 dan smad 7 juga diinduksi oleh TGF  $\beta$ . Inhibitor ini berfungsi untuk mencegah fosforilasi dan translokasi nucleus reseptor spesifik smad dan juga dapat mendegradasi reseptor TGF  $\beta$  sebagai umpan balik negatif (Ramirez et al., 2014).



Gambar 2.3 Jalur Pensinyalan Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ )(Ramirez et al., 2014)

## 2.1.2 Madu

### 2.1.2.1 Definisi Madu

Madu merupakan produk alami dengan rasa manis dan sering dikonsumsi karena memiliki manfaat gizi yang dapat meningkatkan kesehatan manusia dengan sifatnya sebagai antioksidan, anti inflamasi, antimikroba dan dapat membantu penyembuhan luka dan sengatan matahari. Madu diklasifikasikan dalam berbagai kategori menurut asalnya : (1) *Blossom honey*, diperoleh dari nektar bunga; (2) *Honeydew Honey*, diproduksi oleh lebah yang mengumpulkan getah dari daun, batang, dan kulit tumbuhan; (3) *Monofloral honey*, madu yang diperoleh lebah dari 1 jenis tanaman tertentu; (4) *Multifloral honey*, madu yang diperoleh lebah lebih dari 1 jenis tanaman (Alvarez-Suarez et al., 2014). Madu juga memiliki beberapa kandungan makronutrien dan mikronutrien. Kandungan makro dan mikronutrien madu bergantung pada beberapa faktor yaitu, jenis lebah, sumberbunga, faktor lingkungan dan faktor cara pengolahan. Madu memiliki kurang lebih 200 senyawa seperti gula, protein, enzim, mineral, vitamin, asam amino, dan berbagai macam polifenol. Variasi kandungan madu ini menghasilkan warna, rasa,kekentalan, dan aktivitas terapeutik yang berbeda di setiap madu (Ranneh et al., 2021).

Kandungan karbohidrat utama pada madu yaitu fruktosa diikuti dengan glukosa, disakarida, dan trisakarida. Disakarida yang paling banyak diidentifikasi pada madu adalah maltose, maltulosa, turanosa, dan sukrosa, sedangkan trisakarida yang dapat diidentifikasi pada sampel madu adalah erlosa, centosa, panosa, dan ketosa. Kandungan makronutrien madu selain karbohidrat adalah protein. Madu mengandung protein sekitar 0,2-0,5% dalam bentuk enzim dan asam amino bebas. Asam amino bebas pada madu terdiri dari 10 – 200mg/100gr madu (Ranneh et al., 2021).



Madu juga mengandung mikronutrien seperti vitamin dan mineral. Kandungan ini bervariasi menurut jenis bunga dan asal perolehan madu. Kandungan mineral yang dapat diidentifikasi pada madu adalah kalium dan natrium, sedangkan kandungan vitamin pada madu yang telah ditemukan adalah thiamin, riboflavin, niacin, dan asam askorbat (Ranneh et al., 2021).

#### 2.1.2.2 Peran Madu pada Ulkus Diabetikum

Penyembuhan luka adalah proses yang rumit dan dinamis karena melibatkan penyempurnaan kulit, lapisan jaringan dan struktur seluler yang rusak. Penyembuhan ulkus diabetikum memerlukan waktu yang lama, intensif, dan memerlukan pengeluaran biaya yang tidak kecil. Proses penyembuhan ulkus diabetikum memerlukan berbagai pendekatan, salah satunya penggunaan agentopikal atau dengan dioles, tetapi dalam penggunaannya diperlukan perhatian khusus karena banyak agen topikal yang telah dieliminasi karena dapat menyebabkan pertumbuhan yang berlebih dari pathogen yang resisten terhadap agen tersebut. Madu merupakan salah satu zat yang bisa diberikan secara topikal (dioleskan) pada ulkus diabetikum, karena madu tidak dapat menginduksi resistensi bakteri (Alam et al., 2014).

Bagian terpenting pada proses penyembuhan ulkus diabetikum pada kaki adalah proses penyembuhannya yang sangat lambat. Hipoksia pada ulkus diabetikum terjadi karena respon inflamasi yang dini dan tingginya jumlah *reactive oxygen species* (ROS) yang diinduksi karena kondisi hiperglikemia pada pasien DM. Pembentukan *advanced glycation end-products* (AGEs) pada keadaan hiperglikemia juga dapat mengganggu proses penyembuhan ulkus diabetikum. Beberapa fungsi sel yang memiliki peran dalam proses penyembuhan ulkus kaki diabetik juga mengalami penurunan pada pasien DM (Alam et al., 2014).

Pemulihan ulkus diabetikum yang lambat akan meningkatkan biaya perawatan. Biaya inilah yang membuat para ilmuwan mencari obat ulkus diabetikum yang lebih murah, alami dan berkhasiat seperti madu (Alam et al., 2014).

#### 2.1.2.2.1 Aktivitas Antimikroba

##### a. Keasaman Madu

Madu memiliki karakteristik pH antara 3,2-4,5. Keasaman madu dibentuk karena adanya *gluconolactone* atau *gluconic acid* hasil dari aktivitas enzim glukosa oksidase yang di produksi oleh lebah. Keasaman madu ini dinilai menjadi faktor antimikroba. Kandungan glukosa dan keasaman pada madu juga dapat membantu makrofag untuk membunuh bakteri (Alam et al., 2014).

Keasaman madu dapat meningkatkan proses penyembuhan luka dengan cara mencegah pembentukan biofilm mikroba dan dengan mengaplikasikan madu pada luka dapat menurunkan pH luka sehingga dapat memfasilitasi pelepasan oksigen dari hemoglobin yang dibutuhkan untuk pembentukan sel baru dan meningkatkan granulasi jaringan (Alam et al., 2014).

Madu juga dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan pH sehingga dapat menciptakan lingkungan luka yang mendukung untuk meningkatkan aktivitas fibroblas dan mengurangi kerusakan matriks untuk perbaikan jaringan (Alam et al., 2014)

##### b. Efek Osmotik

Madu merupakan zat hiperosmolar dengan kandungan air <20%. Kandungan air yang sedikit pada madu dapat membentuk lingkungan yang tidak

mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Substrat dengan osmolaritas tinggi seperti madu, glukosa, dan pasta gula dapat menghambat pertumbuhan mikroba karena molekul gula dapat mengikat molekul air sehingga mikroba tidak dapat bertahan hidup. Keadaan hiperosmolar pada madu inilah yang dapat mengurangi resiko terjadinya infeksi karena dapat mencegah pertumbuhan bakteri dan mendorong proses penyembuhan yang cepat. Keadaan hiperosmolar pada madu juga akan menarik cairan ke area luka untuk memberikan lapisan pelindung yang akan melindungi dari kontaminasi mikroorganisme (Alam et al., 2014).

### c. Hidrogen Peroksida

Madu memiliki molekul hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang diproduksi melalui oksidasi oleh enzim glukosa oksidase yang dihasilkan dari glandula hypopharyngeal lebah madu yang dapat berperan sebagai agen antibakteri. Produksi  $H_2O_2$  ini tidak bersifat sitotoksik karena konsentrasi yang dihasilkan 1000x lebih rendah dari larutan antiseptik 3%. Konsentrasi hidrogen peroksida yang rendah dapat menstimulasi fibroblas dan sel epitel (Alam et al., 2014).

Studi sebelumnya menyatakan bahwa hidrogen peroksida ini dapat menstimulasi proliferasi fibroblas *in vitro* dan angiogenesis *in vivo*. Studi ekperimental membuktikan bahwa migrasi leukosit terjadi lebih cepat ke area luka akibat dari gradien konsentrasi yang diciptakan oleh  $H_2O_2$ . Neutrophil mensekresikan ROS bakterisidal,  $H_2O_2$  membunuh bakteri dan mencegah infeksi. Makrofag yang menuju ke area luka akan mensekresikan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan faktor angiogenik yang sangat esensial dalam proses penyembuhan (Alam et al., 2014).

#### d. Oksida Nitrit

Oksida nitrit berperan penting dalam respon imun, respon inflamasi, migrasi sel, dan efektif dalam membunuh bakteri dan virus. Oksida nitrat berperan sangat aktif pada fase proliferasi penyembuhan ulkus diabetikum. Oksida nitrat juga berperan dalam proses regulasi angiogenesis, mempercepat sintesis protein, dan proses re – epitelisasi pada penyembuhan luka (Alam et al., 2014).

#### 2.1.2.2.2 Perawatan Ulkus Diabetikum

*Debridement* luka merupakan proses yang krusial dalam memfasilitasi proses penyembuhan ulkus diabetikum. Prosedur standar dalam melakukan *debridement* adalah dengan membersihkan jaringan yang mati di sekitar luka dengan analgesik lokal. Proses *debridement* ini bertujuan untuk menghilangkan jaringan atau sel tua yang sudah mati secara mekanik, kimia, pembedahan ataupun autolitik. Madu memiliki enzim protease yang akan menginduksi proses *autolytic debridement (self digestion)*. Adanya  $H_2O_2$  pada madu juga memiliki peran penting dalam aktivasi protease selama *debridement*. (Alam et al., 2014)

Protease dapat teraktivasi selama penyembuhan luka melalui 2 proses. Pertama,  $H_2O_2$  mengaktivasi matriks metalloprotease pada jaringan ikat menjadi protease aktif. Kedua,  $H_2O_2$  akan menghambat molekul inhibitor pada jaringan ulkus diabetikum yang dapat menginaktivasi neutrophil serin protease sehingga protease menjadi aktif. Aktivitas protease yang tinggi dapat menyebabkan gangguan pada proses penyembuhan ulkus diabetikum, tetapi dengan sifat anti inflamasi pada madu dapat meregulasikan jumlah aktivitas protease sehingga madu dapat disebut sebagai penyembuh ulkus diabetikum alami yang baik (Alam et al., 2014).

### 2.1.2.2.3 Mengendalikan Bau Luka

Madu mampu meminimalisirkan adanya luka yang berbau menyengat melalui efek osmotiknya yang menarik eksudat dari luka ke permukaan untuk meningkatkan kelembapan yang dibutuhkan pada *autolytic debridement* (Alam et al., 2014).

Data dari penelitian sebelumnya, madu dapat mengurangi bau luka melalui dua mekanisme. Pertama, adanya beberapa bakteri anaerob seperti *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., dan *Prevotella* spp. Kedua, bau pada luka dihasilkan karena adanya pembentukan asam amino melalui dekomposisi serum, protein jaringan, dan sel mati oleh bakteri, peran madu pada mekanisme kedua ini adalah menyediakan glukosa dalam jumlah yang banyak untuk metabolisme bakteri yang akan diubah menjadi asam laktat dibandingkan senyawa seperti ammonia, amina, dan sulfur yang menghasilkan bau tak sedap (Alam et al., 2014).

### 2.1.2.2.4 Mengurangi Pembentukan Bekas Luka

Radikal bebas yang terbentuk karena fase inflamasi yang berkepanjangan dapat menstimulasi fibroblas untuk membentuk bekas luka yang hipertrofik yang terbentuk dari serat kolagen. Madu dapat menstimulasi pertumbuhan sel epitel dan membentuk kulit dengan permukaan yang halus dan lembut (Alam et al., 2014).

Madu dapat mengurangi pembentukan bekas luka yang hipertrofik dalam tiga mekanisme : (1) produksi asam hialuronat oleh glukosa dapat mensupresi pembentukan serat kolagen; (2) pengikatan gula pada serat kolagen dapat merubah struktur; (3) glukosa menciptakan lingkungan di daerah luka agar aktivitas proteoglikan dapat bekerja tanpa memproduksi kolagen dalam jumlah yang berlebihan (Alam et al., 2014).

#### 2.1.2.2.5 Memberi Nutrisi

Madu mengandung zat tertentu seperti glukosa, fruktosa, sukrosa, vitamin dan mineral. Penelitian Molan menjelaskan bahwa kandungan tersebut sangat berpotensi untuk menstimulasi pertumbuhan jaringan. Penelitian oleh Viljanto dan Raekallio juga menjelaskan bahwa adanya hubungan antara aplikasi nutrisi secara topikal dengan peningkatan pertumbuhan jaringan. Molan juga mencatat bahwa madu membantu menstimulasi angiogenesis sehingga dapat meningkatkan distribusi oksigen dan nutrisi untuk penyembuhan luka yang baik dan cepat (Alam et al., 2014).

#### 2.1.2.2.6 Mengontrol Inflamasi

Inflamasi merupakan bagian penting dari respon normal terhadap infeksi atau cedera akibat luka. Inflamasi yang berlebihan atau berkepanjangan dapat menghambat penyembuhan ulkus diabetikum atau bahkan mengakibatkan kerusakan lebih lanjut. Peran madu dalam mengontrol inflamasi yaitu dapat mengurangi vasodilatasi sehingga dapat mengurangi terjadinya edema dan adanya eksudat sehingga proses penyembuhan dapat berjalan dengan cepat. Tekanan pada jaringan yang disebabkan oleh edema dapat mengganggu sirkulasi darah yang mengangkut oksigen dan nutrisi pada kapiler. Efek anti inflamasi pada madu ini sangat penting pada proses penyembuhan ulkus diabetikum (Alam et al., 2014).

Inflamasi yang berkepanjangan juga mengakibatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan dari aktivitas fagosit selama proses inflamasi. Radikal bebas ini dapat merusak jaringan dengan cara merusak protein, asam nukleat, komponen lipid pada membrane sel dan dapat mencegah proses penyembuhan. Efek anti inflamasi madu dapat mengurangi pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan mencegah kerusakan jaringan (Alam et al., 2014).

Madu juga berperan dalam stimulasi produksi *sitokin tumor necrosis faktor alpha* (TNF-  $\alpha$ ), *interleukin- 1 beta* (IL-1 $\beta$ ), dan *interleukin – 6* (IL-6) oleh monosit dan dapat menginduksi limfosit B dan T (Alam et al., 2014).

### 2.1.3 Diabetes Mellitus

#### 2.1.3.1 Definisi Diabetes Mellitus (DM)

DM adalah gangguan metabolik dikarenakan adanya kelainan aktivitas hormon insulin meliputi pelepasan hormon insulin, kerja hormon insulin maupun keduanya. DM dapat dicurigai pada pasien dengan gejala klasik 4P yaitu sulit menelan (polifagia), sering haus (polidipsia), sering berkemih (poliuria), dan penurunan berat badan yang tidak diketahui sebabnya (PERKENI, 2021).

#### 2.1.3.2 Klasifikasi DM

Sebagian besar DM dibagi menjadi 2 kelompok berdasarkan etiopatogenesisnya yaitu :

##### 2.1.3.2.1 DM Tipe 1

DM tipe 1 merupakan gangguan autoimun kronik yang dicirikan dengan destruksi sel beta pankreas yang mengakibatkan kekurangan hormon insulin secara absolut (Thomas, 2016). *International diabetes federation* mengatakan bahwa diabetes tipe1 dapat menyerang segala usia terutama pada anak-anak dan usia muda. Untuk mengontrol kadar gula darah pasien yang terdiagnosa diabetes tipe 1 dibutuhkan injeksi insulin. Tanpa injeksi insulin, pada pasien ini akan mengalami peningkatan kadar gula darah yang abnormal dan dapat mengakibatkan kematian.

##### 2.1.3.2.2 DM Tipe 2

DM tipe 2 didefinisikan sebagai keadaan ketidakmampuan tubuh dalam menggunakan hormon insulin yang sudah disekresikan oleh pankreas sehingga

tubuh tidak dapat menjaga kadar gula darah pada angka normal (Thomas, 2016).

DM juga dapat menjadi penyakit sekunder yang disebabkan oleh kerusakan genetik pada fungsi sel beta, kerusakan genetik pada aktivitas insulin, gangguan pada pankreas atau karena konsumsi obat-obatan tertentu (Thomas, 2016).

Tabel 2.0.1 Klasifikasi DM berdasarkan etiologi (Thomas, 2016)

<b>Tipe DM</b>	<b>Etiologi</b>
DM tipe 1	Disebabkan karena defisiensi sekresi insulin. DM tipe 1 dibedakan menjadi 2 yaitu : <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Dimediasi oleh sistem imun</li> <li>b. Idiopatik</li> </ol>
DM tipe 2	Kombinasi antara resistensi insulin dan respon kompensasi produksi insulin yang tidak baik (defisiensi insulin relatif)
DM tipe lain	<ol style="list-style-type: none"> <li>a. Kerusakan genetik pada fungsi sel beta</li> <li>b. Kerusakan genetik pada aksi insulin</li> <li>c. Gangguan pada pankreas</li> <li>d. Endokrinopati</li> <li>e. Diinduksi obat</li> <li>f. Infeksi</li> <li>g. Kelainan sistem imun</li> <li>h. Sindrom genetik lain</li> </ol>
Diabetes gestasional	Diabetes gestasional terjadi pada wanita hamil yang mengalami penurunan aktivitas insulin karena pengaruh hormon yang dihasilkan oleh plasenta



### 2.1.3.3 Kriteria Diagnostik DM

Diagnosis DM dapat ditegakkan apabila terdapat pasien dengan 4P gejala klasik DM yaitu (polifagia), sering haus (polidipsia), sering berkemih (poliuria), dan penurunan berat badan yang tidak diketahui sebabnya disertai kriteria glukosa plasma darah vena menggunakan alat glukometer dan nilai HbA1c sebagai berikut:

#### 2.1.3.3.1 Glukosa darah sewaktu (GDS)

Pemeriksaan GDS ini dilakukan tanpa waktu tertentu. Pasien didiagnosis DM apabila nilai GDS sebesar 200 mg/dl atau lebih (PERKENI, 2021)

#### 2.1.3.3.2 Glukosa darah puasa (GDP)

Menurut PERKENI, GDP normal yaitu 70 – 99 mg/dl. Nilai GDP ini bisa didapat pada darah pasien yang tidak mengonsumsi kalori minimal 8 jam.

Tabel 2.0.2 Kriteria Glukosa Darah Puasa (GDP) (PERKENI, 2021)

<b>Kriteria</b>	<b>Glukosa darah puasa (mg/dl)</b>
Diabetes	$\geq 126$
Pre – diabetes	100 – 125
Normal	70 - 99

#### 2.1.3.3.3 Glukosa plasma 2 jam setelah tes toleransi glukosa oral (TTGO)

TTGO adalah uji gula darah pasien 2 jam setelah mengonsumsi glukosa sebanyak 75 gram. Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan tubuh dalam melakukan metabolisme gula yang sudah dikonsumsi (PERKENI, 2021).

Tabel 2.0.3 Kriteria Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO (PERKENI, 2021).

Kriteria	Glukosa plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dl)
Diabetes	$\geq 200$
Pre – diabetes	140 -199
Normal	70 - 139

#### 2.1.3.3.4 Pemeriksaan HbA1c

Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengukur hemoglobin yang berikatan dengan glukosa darah dengan metode yang sudah diverifikasi oleh NGSP (*national Glycohaemoglobin Standarization Program*) dan DCTT (*diabetes control and complications trial assay*) (PERKENI, 2021).

Tabel 2.0.4 Kriteria Hemoglobin A1c (PERKENI, 2021).

Kriteria	HbA1c (%)
Diabetes	$\geq 6,5$
Pre – diabetes	5,7 – 6,4
Normal	$< 5,7$

#### 2.1.4 Ulkus Diabetikum

##### 2.1.4.1 Definisi Ulkus Diabetikum

Ulkus diabetikum merupakan kondisi adanya luka dan kerusakan pada jaringan kaki pada pasien terdiagnosa DM disertai dengan adanya abnormalitas pada sistem saraf dan gangguan vaskuler perifer pada ekstremitas inferior (van Netten et al., 2020). Kondisi neuropati diabetik dan iskemia merupakan sebagian dari penyebab terjadinya ulkus diabetikum. Jaringan kaki pasien dengan neuropati diabetik dan iskemia akan rentan terjadi infeksi (Ranjitkar et al., 2018). Ulkus diabetikum memiliki karakteristik adanya trias khas yaitu neuropati, iskemia, dan infeksi. Mekanisme metabolisme yang terganggu pada kondisi DM akan meningkatkan resiko infeksi dan penyembuhan luka yang tidak optimal karena serangkaian mekanisme meliputi penurunan respon sel, faktor pertumbuhan,

penurunan sirkulasi darah perifer, dan penurunan pembentukan pembuluh darah baru sehingga kaki rentan terhadap penyakit pembuluh darah perifer, kerusakan saraf tepi, ulserasi dan gangrene (Dinker R Pai, 2013). Ulkus diabetikum pada kaki ini merupakan komplikasi paling serius pada pasien DM. Tanpa perawatan yang tepat, ulkus diabetikum dapat menyebabkan pasien dirawat inap, amputasi, dan kematian (Buset al., 2020).

Mayoritas (60-80%) ulkus kaki akan sembuh, 10-15% akan tetap aktif, dan 5-24% memerlukan amputasi dalam waktu 6 hingga 18 bulan sesudah pemeriksaan awal (Eleftheriadou et al., 2018).

#### 2.1.4.2 Faktor Resiko Ulkus Diabetikum

Faktor yang meningkatkan kejadian ulkus diabetikum yaitu jenis kelamin lelaki, pasien mengalami DM dalam jangka waktu yang lama, adanya neuropati perifer yang dapat menyebabkan hilangnya sensasi protektif pada kaki, deformitas struktural kaki, terbatasnya mobilitas sendi, penyakit arteri perifer, komplikasi mikrovaskular, kadar HbA1c yang tinggi, dan onikomikosis (Wangnoo, 2016). Pasien DM yang merokok juga menjadi faktor resiko terjadinya ulkus diabetikum karena merokok memiliki keterkaitan yang kuat dengan penyakit arteri perifer dan neuropati (Eleftheriadou et al., 2018).

#### 2.1.4.3 Etiologi dan Patogenesis Ulkus Diabetikum

Ulkus diabetikum terjadi dikarenakan adanya 2 atau 3 faktor resiko pada pasien terdiagnosa DM dengan faktor risiko utama kejadian ulserasi kaki adalah hilangnya sensasi karena adanya neuropati diabetik dan penyakit pembuluh darah perifer (Schaper et al., 2020).

#### 2.1.4.3.1 Neuropati perifer

Neuropati adalah gangguan yang menyebabkan disfungsi sensorik, motorik dan otonom pada sistem saraf. Neuropati perifer pada diabetes ialah kondisi adanya disfungsi saraf tepi pada penderita diabetes tanpa adanya sebab lain yang menjadi salah satu sebab utama terjadinya ulkus diabetikum pada kaki (Thomas, 2016)

Kerusakan pada innervasi motorik tungkai akan menyebabkan atrofi otot yang menyebabkan ketidakseimbangan antara fleksi dan ekstensi tungkai serta menurunnya mobilitas sendi pada tungkai sehingga mengakibatkan deformitas pada tungkai, perubahan titik tumpu berat badan pada kaki, dan gangguan cara berjalan yang mengakibatkan peningkatan beban mekanik yang abnormal pada kaki dan menghasilkan tekanan tinggi pada beberapa area kaki (Schaper et al., 2020). Keadaan ini akan menyebabkan kerusakan pada kulit dan terbentuknya ulserasi. Neuropati otonom pada tungkai juga akan mengurangi aktivitas kelenjar minyak dan kelenjar keringat sehingga akan mengurangi kelembaban kaki dan kaki akan menjadi rentan terluka. Penurunan kelembaban pada kaki ini ditandai dengan adanya penebalan pada kulit kaki atau yang disebut juga kalus. Tidak hanya itu, gangguan sensorik pada pasien DM juga akan mengakibatkan penurunan sensasi terhadap nyeri, suhu dan tekanan, sehingga pada pasien DM seringkali tidak menyadari apabila terjadi luka dan tanpa penanganan yang cepat, kondisi luka akan semakin memburuk (Rosyid, 2017)

Ada 5 hipotesis yang mendasari terjadinya neuropati pada pasien DM

- a. Hipotesis stress oksidatif, adanya peningkatan pembentukan radikal bebas karena hiperglikemia akan menyebabkan disfungsi sel endotel dan

menyebabkan efek neurotoksik sehingga akan terjadi kerusakan saraf

- b. Hipotesis neurotropik, adanya penurunan *neurotrophic factors like nerve growth factor (NGF), neurotrophin – 3, neurotrophin 4/5 dan insulin like growth factor (IGF - 1)* yang diperlukan untuk sel saraf pada penderita hiperglikemia
- c. Hipotesis mikrovaskular, insufisiensi mikrovaskular karena tidak adekuatnya vasokonstriksi dan vasodilatasi yang menyebabkan terjadinya iskemia absolut dan relatif pada sistem saraf penderita DM.
- d. Hipotesis imun, adanya beberapa autoantigen yang menginduksi respon imun seperti antibody antifosfolipid dan autoantibodi terhadap ganglioside pada penderita DM
- e. Hipotesis metabolik, keadaan hiperglikemia persisten dan defisiensi insulin dapat memicu perubahan jalur sorbitol, peningkatan pembentukan *Advanced Glycosylated End Products (AGE)*, dan peningkatan stress oksidatif yang menyebabkan disfungsi sel saraf (Thomas, 2016.)

Lebih dari 60% kejadian ulkus diabetikum disebabkan karena neuropati yang dapat terjadi pada pasien diabetes mellitus tipe 1 atau tipe 2. Kondisi hiperglikemia dapat meningkatkan sekresi enzim tertentu yaitu *aldose reductase* dan *sorbitol dehydrogenase* yang dapat mengubah glukosa menjadi sorbitol dan fruktosa. Akumulasi sorbitol dan fruktosa menyebabkan penurunan sintesis myoinositol sel saraf yang akan mengganggu konduksi sistem saraf (Dinker R Pai, 2013).

#### 2.1.4.3.2 *Peripheral Vascular Disease (PVD)*

*Peripheral Vascular Disease (PVD)* merupakan keadaan menyempitnya pembuluh darah pada ekstremitas bawah sehingga pada ekstremitas bawah

mengalami kekurangan suplai darah. Penyakit ini dapat ditemukan pada pasien diabetes maupun non diabetes (Eleftheriadou et al., 2018). Kondisi ini dicirikan dengan adanya obstruksi aterosklerotik pada vaskular ekstremitas bawah yang ditemukan pada sekitar 30% pasien dengan ulkus diabetikum kaki. Perkembangan penyakit ini berawal dari adanya sumbatan pada arteri, penyempitan arteri, melemahnya dinding arteri, peradangan mikrosirkulasi yang menyebabkan penebalan kapiler sehingga menurunkan elastisitas kapiler dan berakhir dengan iskemia jaringan (Perez-Favila et al., 2019).

PVD ditandai dengan adanya klaudikasio intermiten, tidak adanya denyut perifer pada kaki, dan adanya tanda penurunan perfusi ekstremitas seperti menurunnya suhu kulit kaki, menipisnya kulit kaki, berkurangnya rambut kulit kaki, dan warna kulit yang kebiruan. Tanda klinis ini disebabkan karena ketidakseimbangan antara kesediaan dan kebutuhan darah untuk melakukan metabolisme sel (Perez-Favila et al., 2019).

Terdapat 2 sistem penilaian untuk menentukan derajat PVD yaitu sistem Fontaine dan sistem Rutherford. Kedua sistem ini menilai berdasarkan tingkat keparahan gejala dan tanda klinis seperti ulserasi maupun gangrene.

Sistem Fontaine pada PVD terbagi menjadi 4 derajat

- a. *Stage I* : asimtomatik atau adanya keluhan mati rasa dan kaki mudah lelah karena adanya stenosis a. femoralis setinggi ductus hunteri, tetapi sirkulasi darah di sisi lateral melalui a. femoralis profunda adekuat untuk kebutuhan perfusi pada tungkai
- b. *Stage II* : adanya klaudikasio intermiten, dengan subklasifikasi
  - IIa : dapat berjalan tanpa gejala selama >250m

- IIb : dapat berjalan tanpa gejala selama <250m
- c. *Stage III* : adanya nyeri saat tungkai istirahat, nyeri dapat terjadi konstan dan sangat intens terutama saat malam hari dan rasa nyeri resisten terhadap analgesik. *Stage* ini memiliki prognosis yang buruk dan setengah dari pasien pada derajat ini akan diamputasi dalam 5 tahun kedepan
- d. *Stage IV* : adanya gangren atau ulserasi (Eleftheriadou et al., 2018).

Sedangkan sistem Rutherford membagi penyakit pembuluh darah perifer menjadi 7 kategori

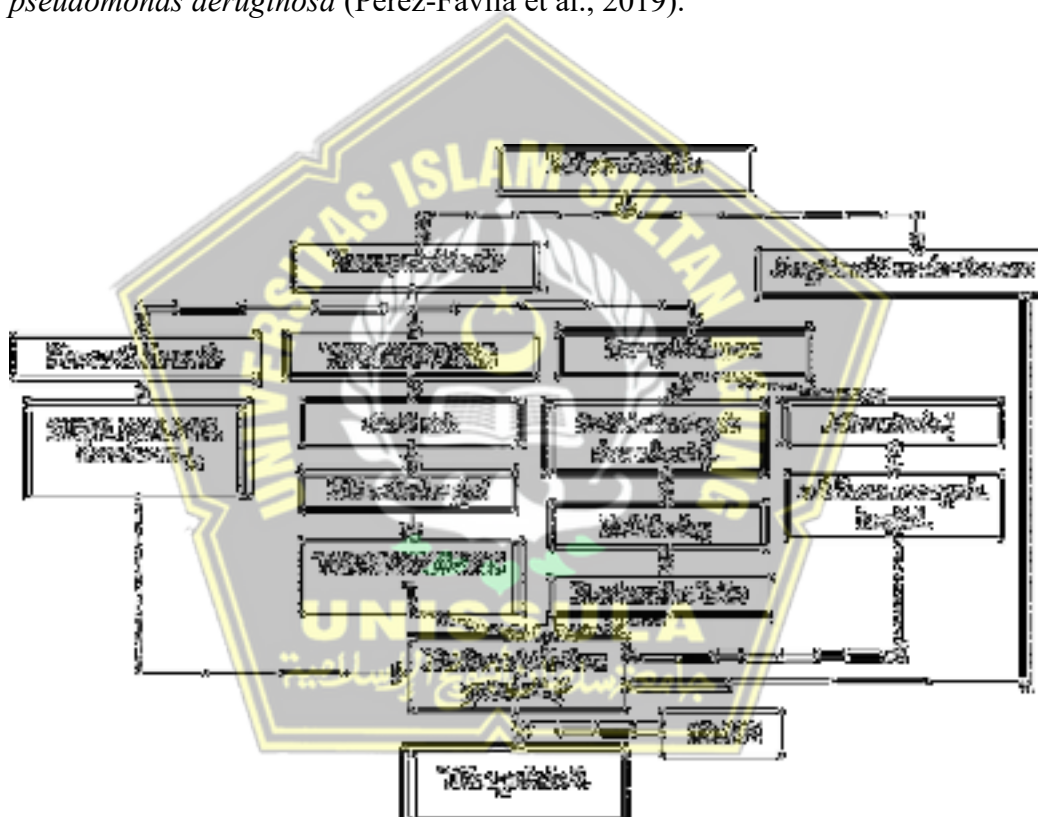
Tabel 2.0.5 Klasifikasi Peripheral Vascular Disease (PVD) : Sistem Fontaine dan Sistem Rutherford (Eleftheriadou et al., 2018)

Fontaine			Rutherford	
Stage	Deskripsi	Grade	kategori	Deskripsi
I	Asimptomatik	0	0	Asimptomatik
IIa	Klaudikasio ringan	I	1	Klaudikasio ringan
IIb	Klaudikasio ringan - berat	I	2 3	Klaudikasio sedang Klaudikasio berat
III	Nyeri saat istirahat	II	4	Nyeri saat istirahat
IV	Ulserasi atau gangren	III	5 6	Kerusakan jaringan minor Kerusakan jaringan mayor

#### 2.1.4.3.3 Infeksi

Setelah adanya ulkus pada kaki, ulkus tersebut rentan terkena infeksi dikarenakan adanya paparan lingkungan berkepanjangan. Faktor patogen yang memungkinkan adanya infeksi yaitu virulensi, defek sistem imun, gangguan fungsi kemotaksis dan fagositosis, gangguan imunitas adaptif seperti rendahnya serum faktor komplemen, dan produksi sitokin oleh monosit yang abnormal. Infeksi pada ulkus diabetikum kaki akan memperburuk proses penyembuhan luka hingga amputasi ekstremitas bawah pada pasien DM. Sekitar 58% pasien DM memiliki ulkus diabetikum kaki yang infeksi. Berbagai jenis mikroorganisme patogen dan non-patogen yang hidup di kulit manusia, 3 dari 5 mikroorganisme tersebut dapat

ditemukan pada ulkus diabetikum kaki yang terinfeksi seperti bakteri gram positif aerob (*staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium sp.*), bakteri gram positif anaerob (*enterococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *streptococcus sp.*, *peptostreptococcus sp.*, *peptococcus sp.*), bakteri gram negatif aerob (*pseudomonas aeruginosa*, *acinetobacter sp.*), bakteri gram negatif anaerob (*proteus mirabilis*, *escherichia coli*, *bacteriodes sp.*) dan jamur (*candida sp.*). Pada negara berkembang, prevalensi adanya bakteri gram negative lebih tinggi terutama *pseudomonas aeruginosa* (Perez-Favila et al., 2019).



Gambar 2.4 Patogenesis Ulkus Diabetikum pada Kaki (Eleftheriadou et al., 2018)

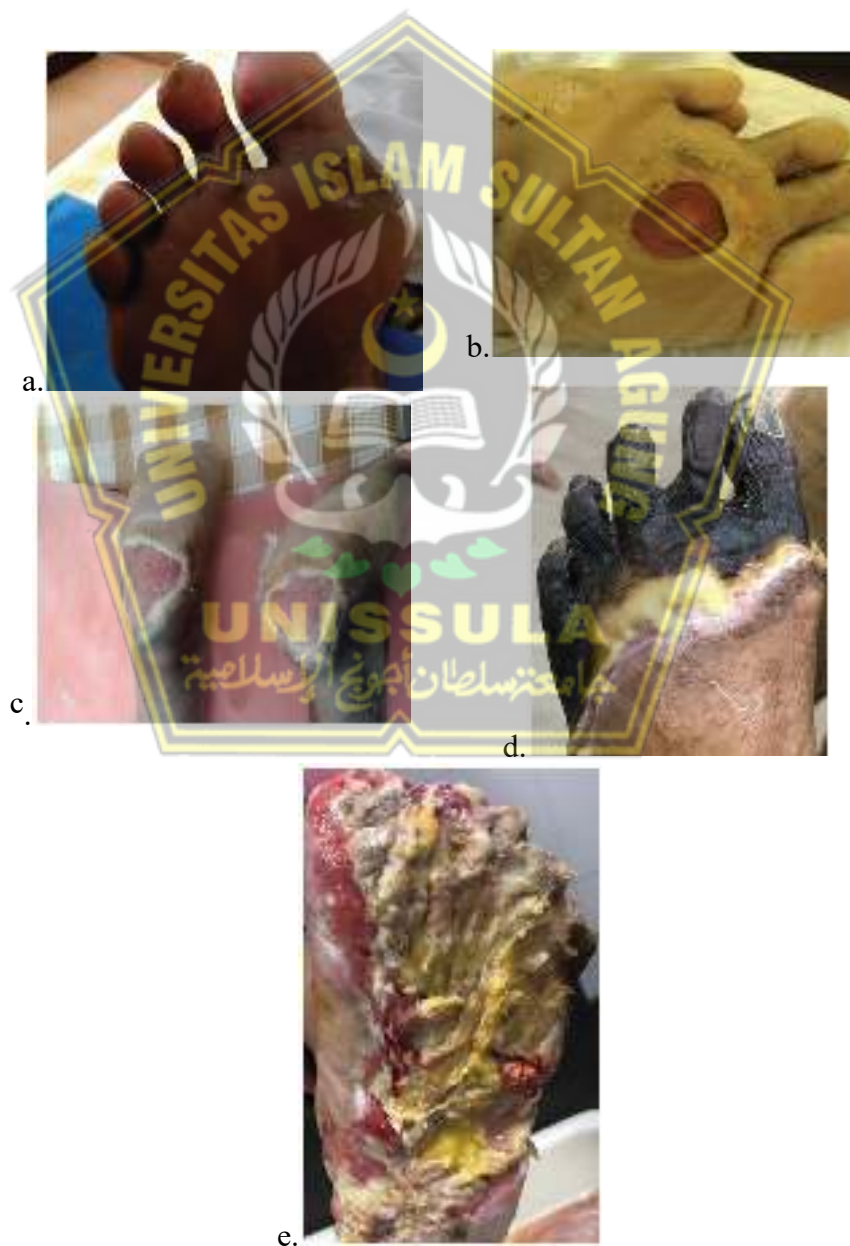
#### 2.1.4.4 Klasifikasi Ulkus Diabetikum

Klasifikasi dan penilaian derajat ulkus diabetikum dapat membantu manajemen terapi sehingga dapat menghasilkan kesembuhan yang diharapkan. Klasifikasi Meggitt-Wagner adalah klasifikasi yang paling terkenal dengan sistem penilaian yang sudah divalidasi untuk ulkus diabetikum pada kaki (Eleftheriadou et al., 2018).



Tabel 2.0.6 Klasifikasi Meggitt - Wagner pada Ulserasi Kaki (Eleftheriadou et al., 2018)

Grade	Deskripsi
Grade 0	Lesi pra atau pasca ulseratif yang sudah mengalami epitelisasi sempurna
Grade 1	Ulkus dangkal, terbatas pada dermis, tidak sampai subcutis
Grade 2	Ulkus meluas melalui subcutis dengan tendon atau tulang yang terlihat
Grade 3	Ulkus dalam dengan osteomyelitis dan abses
Grade 4	Ulkus dengan gangrene terlokalisasi
Grade 5	Ulkus dengan gangrene yang meluas



Gambar 2.5 Klasifikasi Ulserasi Kaki Meggitt-Wagner; (a) Grade 1, (b) Grade 2,

(c) Grade 3, (d). Grade 4, (e) Grade 5 (Hazari et al., 2020)

Klasifikasi Meggitt – Wagner ini dapat memberikan panduan untuk memberikan rencana perawatan, mudah digunakan, dan telah divalidasi oleh banyak studi. Namun, sistem penilaian menurut Meggitt – Wagner ini tidak dapat menilai adanya infeksi, iskemia, dan status neuropati diabetik (Eleftheriadou et al., 2018)

Universitas Texas juga melakukan pengkajian terhadap penilaian derajat ulkus diabetikum pada kaki. Sistem penilaian ini mengevaluasi dari kedalaman ulkus seperti pada sistem klasifikasi Meggitt- Wagner dan adanya infeksi serta iskemia. Ulkus tanpa komplikasi diklasifikasikan sebagai *stage A*, ulkus yang terinfeksi sebagai *stage B*, ulkus dengan iskemia sebagai *stage C* dan ulkus dengan infeksi dan iskemia sebagai *stage D*. (Eleftheriadou et al., 2018).

Tabel 2.0.7 Klasifikasi University of Texas pada ulkus diabetikum kaki (Eleftheriadou et al., 2018)

	<b>Grade 0</b>	<b>Grade 1</b>	<b>Grade 2</b>	<b>Grade 3</b>
<b>Stage A</b>	Pre atau post ulserasi dengan epitelisasi sempurna	Ulkus dangkal, tanpa melibatkan tendon, kapsul, atau tulang	Ulkus melibatkan tendon atau kapsul	Ulkus melibatkan tulang dan sendi
<b>Stage B</b>	Disertai infeksi	Disertai infeksi	Disertai infeksi	Disertai infeksi
<b>Stage C</b>	Disertai iskemia	Disertai iskemia	Disertai iskemia	Disertai iskemia
<b>Stage D</b>	Disertai infeksi dan iskemia	Disertai infeksi dan iskemia	Disertai infeksi dan iskemia	Disertai infeksi dan iskemia

Keuntungan penggunaan sistem penilaian ini, dapat mendeskripsikan ulkus diabetikum pada kaki lebih jelas, mudah digunakan, serta sudah dapat menggolongkan adanya infeksi dan iskemia (Eleftheriadou et al., 2018).

*International Working Group on The Diabetic Foot* juga menetapkan penilaian PEDIS (*P : Perfusion, E : Extent/Size, D : Depth/Tissue Loss, I : Infection, S : Sensation*) dalam menentukan derajat ulkus diabetikum pada kaki.

Tabel 2.0.8 Klasifikasi Sistem PEDIS (Eleftheriadou et al., 2018)

Indikator	Derajat
<i>Perfusion</i>	<p>Derajat 1 : Tanpa penyakit pembuluh darah perifer disertai</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Denyut arteri kaki yang teraba atau</li> <li>- ABI 0,9 – 1,1 atau</li> <li>- TBI &gt; 0,6 atau</li> <li>- TcPO<sub>2</sub> &gt; 60mmhg</li> </ul> <p>Derajat 2 : Ada ciri khas penyakit pembuluh darah perifer, tetapi tidak dalam keadaan iskemia kritis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adanya klaudikasio intermiten</li> <li>- ABI &lt;0,9 dengan <i>anklepressure</i> &gt;50mmHg atau</li> <li>- TBI &lt;0,6 dengan tekanan darah sistolik jari kaki &gt;30mmHg atau</li> <li>- TcPO<sub>2</sub> &gt;60 mmHg atau</li> <li>- Gangguan lain yang berhubungan dengan penyakit pembuluh darah perifer</li> </ul> <p>Derajat 3 : Iskemia kritis pada ekstremitas yang diartikan sebagai berikut :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tekanan darah sistolik pergelangan kaki &lt;50 mmHg atau</li> <li>- Tekanan darah sistolik jari &lt; 30mmHg</li> <li>- TcPO<sub>2</sub> &lt; 30mmHg</li> </ul>
<i>Extent/Size</i>	Ukuran luka setelah dilakukan <i>debridement</i>
<i>Depth/Tissue loss</i>	<p>Derajat 1 : Ulkus dangkal dan hanya sebatas lapisan dermis</p> <p>Derajat 2 : Ulkus dalam hingga lapisan otot atau tendon</p> <p>Derajat 3 : Ulkus hingga semualapisan dibawah kulit sampai tulang dan sendi</p>

---

*Infection*

Derajat 1 : tanpa gejala infeksi

Derajat 2 : infeksi hanya terjadi di kulit tanpa adanya tanda dan gejala sistemik atau maksimal 2 tanda dan gejala sistemik dibawah ini

- Edema lokal atau indurasi
- Kemerahan > 0,5 –2 cm disekitar ulkus
- Nyeri
- Terasa hangat
- Terdapat *discharge* purulen
- Penyebab lain inflamasi harus disingkirkan (trauma, gout, *acute charcot neuro-arthropathy*, fraktur, thrombosis, stasis vena)

Derajat 3 : kemerahan >2cm disertai 1 tanda berikut ini :

- Edema
- Terasa hangat
- Adanya *discharge*

Derajat 4 : infeksi kaki dengan 2 atau lebih tanda berikut :

- Suhu >38<sup>0</sup>C atau <36<sup>0</sup>C
- Denyut nadi >90x/menit
- Laju respirasi >20x/menit
- PaCO<sub>2</sub> < 32mmHg
- Jumlah leukosit >12.000 atau <4000 mm<sup>-3</sup>

---

*Sensation*

Derajat 1 : tidak kehilangan sensasi protektif pada kaki

Derajat 2 : hilangnya sensasi protektif pada kaki ditandai dengan tidak adanya persepsi saat dilakukannya pemeriksaan pada kaki

- Tidak adanya persepsi tekanan saat diberikan 10 gr monofilamen pada 2 atau 3 tempat di permukaan plantar kaki
- Tidak adanya sensasi getaran saat diberi getaran pada ibu jari kaki menggunakan garpu tala 128Hz

#### 2.1.4.5 Proses Penyembuhan Ulkus Diabetikum

Masalah utama ulkus diabetikum pada kaki adalah proses penyembuhannya yang tidak sama seperti proses penyembuhan luka pada orang normal. Proses penyembuhan ulkus diabetikum kaki meliputi 4 fase : hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodelling (Perez-Favila et al., 2019) .

##### 2.1.4.5.1 Hemostasis

Fase hemostasis dimulai setelah cedera terjadi dan akan dilanjutkan dengan adanya vasokonstriksi. Trombosit akan kontak dengan fibronektin dan kolagen membentuk *fibrin clot* yang akan menghentikan perdarahan dan menghalangi masuknya mikroorganisme patogen. Trombosit juga akan mensekresi *platelet derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), dan *transforming growth factor beta 1* (TGF –  $\beta$ 1) yang bertindak sebagai kemoatraktan sel inflamasi dan meningkatkan respon imun adaptif pada fase inflamasi. Proses hemostasis pada penyembuhan luka pasien DM akan terjadi hiperkoagulabilitas dan penurunan fibrinolisis (Perez-Favila et al., 2019).

##### 2.1.4.5.2 Inflamasi

Fase inflamasi dimulai dari adanya aktivasi respon sistem imun adaptif dan migrasi sel radang seperti makrofag, sel T, monosit, sel mast, dan neutrophil untuk mengontrol patogen, regulasi *reactive oxygen species* (ROS) dan mendegradasi material asing yang masuk kedalam luka. Sel sel inflamasi akan mensekresi faktor pertumbuhan, sitokin dan *reactive oxygen species* (ROS). Keseimbangan proses inflamasi ini dimediasi oleh agen pro-inflamasi dan anti- inflamasi. Neutrophil bertindak sebagai agen pro-inflamasi karena dapat memproduksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berfungsi sebagai inhibitor patogen dan dapat mensekresi kemoatraktan seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan sitokin

terutama *interleukin 6* (IL – 6), *tumor necrosis faktor alpha* (TNF  $\alpha$ ) dan *interleukin 1* (IL-1). Monosit yang sudah mengalami maturasi akan menjadi makrofag yang akan mensekresi sitokin pro inflamasi seperti IL – 1 dan TNF  $\alpha$  serta faktor pertumbuhan seperti bFGF, PDGF, dan VEGF yang akan menginisiasi proliferasi fibroblas, keratinosit, dan sel epitel melalui jalur MAPK dan PI3-AKT, PI3K-Akt-eNOS, NF-kB, dan FAK-ERK-MCP. Aktivasi faktor pertumbuhan menyebabkan sel baru membentuk jaringan serta makrofag dan sel T mensekresi sitokin anti inflamasi dan faktor pertumbuhan seperti IL – 10 dan TGF- $\beta$  untuk mensupresi respon pro inflamasi dan menyeimbangkan fase inflamasi pada daerah luka. Pasien DM dengan luka kronis memiliki ketidakseimbangan sitokin inflamasi yang menyebabkan kelebihan ROS yang dapat menginduksi fase inflamasi yang berkepanjangan (Perez-Favila et al., 2019).

#### 2.1.4.5.3 Proliferasi dan migrasi

Fase ini terdiri dari 4 proses yaitu angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, re-epitelisasi, dan kontraksi luka. Semua proses ini akan dimodulasi oleh VEGF, PDGF, bFGF, dan TGF –  $\beta$ 1 (Perez-Favila et al., 2019).

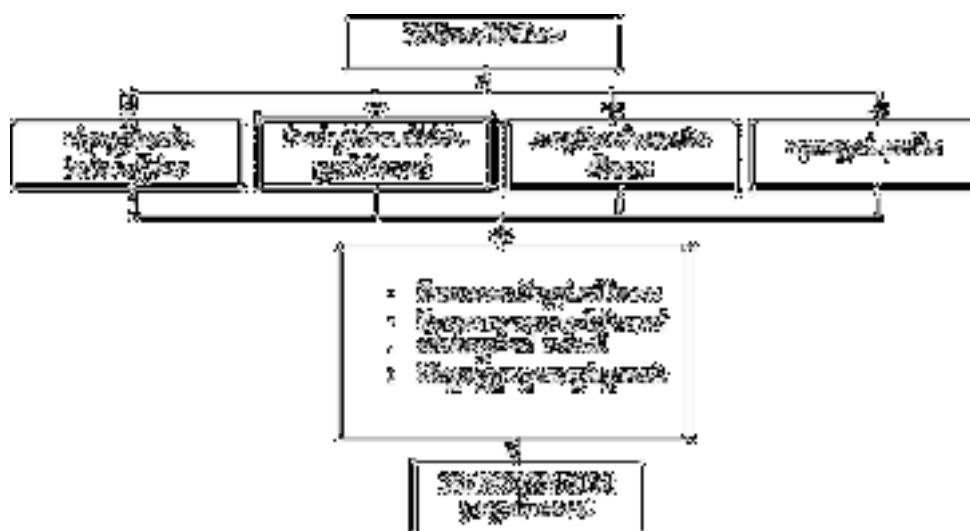
Angiogenesis merupakan proses pembentukan vaskuler baru yang berfungsi untuk menyediakan oksigen dan *growth factor* untuk menginduksi pembentukan jaringan granulasi. Angiogenesis dirangsang oleh jalur bFGF, VEGF, dan TGF –  $\beta$ . VEGF berfungsi untuk proliferasi dan migrasi endotel dan maturasi pembuluh darah melalui jalur MAPK dan PI3K-Akt-eNOS dan akan memproduksi ROS. Kadar ROS yang rendah akan merangsang proliferasi dan migrasi fibroblas serta meningkatkan produksi kolagen untuk mempersiapkan pembentukan jaringan granulasi dan penutupan luka. Pembentukan jaringan granulasi dan kolagen tipe III di stimulasi oleh bFGF dan TGF –  $\beta$  dan menyediakan tempat untuk migrasi

fibroblas, keratinosit, dan pembentukan vaskuler (Perez-Favila et al., 2019).

Re-epitelisasi merupakan proses proliferasi dan migrasi keratinosit yang akan menstimulasi penutupan luka melalui jalur MAPK, FAK-paxillin, dan PI3K-Akt-mTOR. Kondisi hiperglikemia pada pasien DM menyebabkan penurunan kapasitas proliferasi sel, migrasi fibroblas dan keratinosit (Viaña-Mendieta et al., 2021). Migrasi sel yang abnormal akan mempengaruhi proses epitelisasi luka. Proses angiogenesis pada pasien DM juga tidak sama optimal dengan orang normal sehingga akan terjadi penurunan aliran darah (Perez-Favila et al., 2019).

#### 2.1.4.5.4 Remodelling

Fase ini dimulai satu minggu setelah penyembuhan luka dan berlangsung selama enam bulan. Jaringan granulasi yang sudah terbentuk pada fase ini akan berubah menjadi jaringan parut. ROS memiliki peran aktif pada fase ini dalam meningkatkan ekspresi bFGF, memodulasi produksi kolagen, dan merombak *extracellular matrix* (ECM) sedangkan pada pasien DM, fungsi fibroblas kurang optimal dalam proses penutupan luka karena pasien DM tidak merespon aksi *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF –  $\beta$ ) dan adanya produksi matriks ekstraseluler yang abnormal (Perez-Favila et al., 2019).



Gambar 2.6 Gangguan Proses Penyembuhan Luka pada pasien DM (Rosyid,2017)

#### 2.1.4.6 Penatalaksanaan Ulkus Diabetikum

Prinsip utama dalam mengatasi ulkus diabetikum adalah menutup luka. (Rosyid, 2017). Perawatan standar untuk ulkus diabetikum pada kaki memerlukan tim dari berbagai bidang ilmu untuk mengevaluasi perfusi ke daerah ulkus yang memadai, kadar glukosa dalam darah, mengatasi infeksi, mengurangi tekanan yang dapat meningkatkan resiko ulserasi (*offloading*), melakukan perawatan luka dan *debridement*, maupun tindakan bedah untuk mencegah komplikasi yang lebih berat dan meningkatkan tingkat kesembuhan pasien. (Dinker R Pai, 2013)

##### 2.1.4.6.1 *Debridement*

Salah satu cara mempercepat penyembuhan ulkus diabetikum pada kaki adalah melakukan *debridement*. *Debridement* luka merupakan proses membuang jaringan nekrotik yang mati, benda asing, elemen bakteri, epidermal hyperkeratosis (*callus*) maupun debris yang dapat menghambat proses penyembuhan ulkus (Rosyid, 2017)

*Debridement* luka ini memakai pisau bedah dalam membersihkan semua jaringan yang tidak diinginkan seperti kalus dan jaringan yang sudah mati atau



nekrotik sehingga dapat mengontrol inflamasi, menghilangkan bau tidak sedap, dan menstimulasi pembentukan jaringan granulasi. *Debridement* merupakan langkah penting dalam menangani ulkus diabetikum untuk mengubah lingkungan luka yang kronik menjadi luka yang akut untuk merangsang proses penyembuhan luka, (Rosyid, 2017)

Ada berbagai jenis Teknik *debridement* luka pada praktek klinis saat ini seperti autolitik, enzimatik, *biodebridement*, mekanik, dan pembedahan

- a. *Autolytic Debridement*, salah satu teknik menghilangkan jaringan nekrotik dengan bantuan enzim endogen dalam tubuh, tidak menimbulkan rasa sakit, tetapi proses ini membutuhkan waktu yang lama.
- b. *Enzymatic Debridement*, salah satu teknik menghilangkan jaringan nekrotik menggunakan enzim proteolitik yang dirancang khusus seperti kolagenase, fibrinolisis, tripsin, dan kombinasi *streptokinase-streptodornase*.
- c. *Biodebridement*, teknik ini menggunakan maggot steril yang diletakkan di lokasi luka sehingga jaringan nekrotik pada luka dapat dicerna oleh maggot. Untuk terapi ini seringkali perlu dikombinasikan dengan teknik debridemen lain setelah dilakukannya *biodebridement*
- d. *Mechanic Debridement*, Teknik ini menggunakan balutan basah ke kering (*wet to dry*), tetapi pada teknik ini dapat merusak jaringan granulasi yang sehat dan dapat mengakibatkan nyeri
- e. *Surgical Debridement*, yaitu menghilangkan jaringan nekrotik dengan instrumen bedah yang dilakukan oleh tenaga yang terlatih (Madhok et al., 2013)

Pemilihan Teknik *debridement* tergantung pada berbagai faktor seperti jenis luka, ukuran luka, posisi luka, jumlah dan karakteristik eksudat, toleransi pasien, efektivitas biaya, keahlian tenaga kesehatan, serta peralatan yang dibutuhkan. Seringkali untuk mendapatkan luka yang bersih dapat dilakukan dengan lebih dari 1 jenis teknik *debridement* (Madhok et al., 2013).

#### 2.1.4.6.2 Dressings

Dressing adalah balutan dengan bahan olesan pada luka untuk menjaga luka dan mempercepat penyembuhan luka. Tujuan dilakukannya balutan ini yaitu menyediakan lingkungan luka yang lembab sehingga dapat memfasilitasi migrasi sel dan mencegah kekeringan pada luka. Penggunaan balutan ini disesuaikan dengan banyaknya eksudat pada luka (Rosyid, 2017). Berikut merupakan jenis balutan disertai dengan kelebihan dan kekurangannya.

Tabel 2.0.9 Jenis – jenis Dressings (Eleftheriadou et al., 2018)

Jenis balutan	Kelebihan	Kekurangan
Kain kasa	Murah, mudah didapat, cocok untuk lesi gangren	Dapat menempel pada dasar luka dan mengakibatkan perdarahan, tidak menciptakan lingkungan yang lembab, memberikan sedikit perlindungan terhadap kontaminasi bakteri, serat kain dapat masuk ke jaringan luka
<i>Films</i>	<i>Semi – permeable</i> , dapat Membentuk barrier agar tidak terkontaminasi bakteri, tahan lama, tahan air, perlu diganti setiap 4-5 hari	Hanya dapat digunakan pada luka yang datar dan dangkal

<i>Foams</i>	Cocok untuk ulkus dengan volume eksudat rendah – tinggi	Tiap busa memiliki daya serap yang berbeda
<i>Hydrogel</i>	Efektif, mudah digunakan, tidak merusak kulit disekitarnya, dapat menurunkan resiko infeksi, dapat menghilangkan jaringan nekrotik	Tidak cocok untuk ulkus neuroiskemik yang menghasilkan eksudat sedikit, efek sulit diukur, dapat menyebabkan maserasi kulit
Hidrokoloid	Cocok untuk lesi nekrotik dengan volume eksudat ringan – sedang, hematbiaya, dapat digunakan walaupun menggunakan alas kaki	Efek sulit diukur, membentuk gel berwarna kuning, bau tidak sedap
<i>Alginate</i>	Cocok untuk ulkus yang terinfeksi, dapat menyerap eksudat	Tidak cocok untuk ulkus dengan eksudat yang minimal
<i>Enzymatic debriders</i>	Cocok untuk luka dengan debris yang banyak, dapat mempromosikan autolisis, dapat mengurangi resiko infeksi	Mahal, perlu <i>dressing</i> tambahan, dapat terjadi iritasi
<i>Sucrose octasulfate dressings</i>	Cocok untuk ulkus neuroiskemik	Mahal, tidak cocok untuk luka terinfeksi
Properti antimikroba ( <i>sorbact</i> )	Dapat mengikat bakteri dengan cepat dan efektif, dapat mendukung penyembuhan luka secara alami, cocok untuk luka terinfeksi	Mahal
Madu	Bersifat antiinflamasi dan bakterisidal. Mengurangi pembentukan ROS, dapat mempercepat di semua fase penyembuhan luka, dapat digunakan untuk semua jenis luka kecuali gangren	Hanya dapat diberikan pada luka yang dangkal, untuk luka yang dalam diperlukan balutan tambahan
Arang aktif	Bersifat bakterisidal, dapat mengurangi bau tidak sedap, cocok untuk luka terinfeksi	Mahal, perlu balutan tambahan apabila eksudat pada luka terlalu banyak, untuk luka dengan eksudat yang minimal dapat diberi tambahan balutan paraffin pada permukaan luka untuk mencegah kekeringan

Mikrofibers	Daya serap tinggi, dapat menyerap mikroorganismenya	Mahal
-------------	---	-------

#### 2.1.4.6.3 *Off loading*

Penggunaan terapi *off loading* ini merupakan terapi yang paling penting dalam mengatasi pasien dengan ulkus neuropati dengan diabetes. Tujuan utama dari metode ini adalah menggeser tumpuan berat badan menjauhi dari sisi ulkus pada pasien yang memiliki ulkus di kaki sehingga dapat mencegah trauma jaringan dan dapat memfasilitasi proses penyembuhan luka. Studi sebelumnya juga menjelaskan bahwa terapi ini dapat menstimulasi penyembuhan ulkus diabetikum pada kaki. Beberapa metode ini juga memungkinkan pasien ulkus diabetikum pada kaki dapat berjalan selama terapi dan berguna untuk mengurangi pembengkakan yang dapat menghambat penyembuhan luka. Terapi *off loading* ini memiliki berbagai teknik seperti menggunakan gips, alas kaki khusus, tirah baring, penggunaan kursiroda dan lainnya (Rosyid, 2017).

#### 2.1.4.6.4 Mengatasi Infeksi

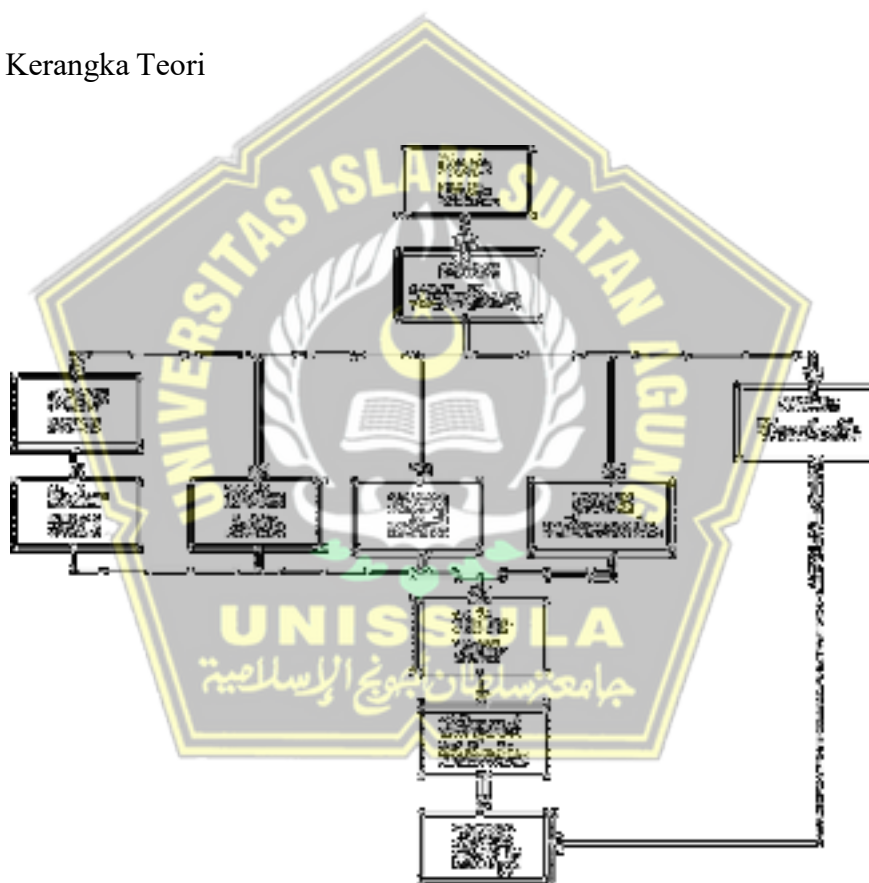
Ulkus diabetikum pada kaki sangat memungkinkan masuknya mikroorganismenya dan berakibat pada infeksi luka. Diagnosis infeksi dinilai dari kondisi klinis seperti adanya kemerahan, bengkak, nyeri, suhu meningkat, dan adanya pus. Infeksi dibagi menjadi 3 kategori yang terdiri dari infeksi ringan, sedang, dan berat (Rosyid, 2017).

Tabel 2.0.10 Kriteria Infeksi (Rosyid, 2017)

Kategori	Kriteria
Infeksi ringan ( <i>mild infection</i> )	Adanya eritema <2cm
Infeksi sedang ( <i>moderate infection</i> )	Adanya eritema >2cm
Infeksi berat ( <i>severe infection</i> )	Adanya infeksi sistemik

Infeksi ringan hingga sedang dapat disembuhkan dengan konsumsi antibiotik oral seperti *cephalexin*, *amoxilin-clavulanic*, *moxifloxin* atau *clindamycin*. Infeksi berat yang disebabkan oleh polimikroba seperti *staphylococcus*, *streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *pseudomonas*, *enterococcus* dan *anaerobic bacteria* harus dirawat inap dan diberikan antibiotik secara intravena seperti *imipenem-cilastatin*, *B-lactam*, *B-lactamase* (*ampicillin-sulbactam* dan *piperacilintazobactam*) dan *broad-spectrum cephalosporin* (Rosyid, 2017).

## 2.2 Kerangka Teori



Gambar 2.7 Kerangka Teori

## 2.3 Kerangka Konsep



Gambar 2.8 Kerangka Konsep

## 2.4 Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian oles madu terhadap kadar TGF- $\beta$  pada penyembuhan ulkus diabetikum mencit



### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan penelitian *Post-test Only Control group design* yang menggunakan 3 kelompok yaitu : 1 kelompok dengan pemberian NaCl 0,9%, 1 kelompok dengan pemberian topikal (dioleskan) madu 50%, dan 1 kelompok perlakuan dengan pemberian topikal (dioleskan) madu 100%.



Keterangan :

S : Sampel mencit jantan galur Balb/C 24 ekor

R : Randomisasi

K1 : Kelompok ulkus diabetikum + NaCl 0,9% terdiri dari 8 ekor mencit jantan galur Balb/C

K2 : Kelompok ulkus diabetikum + madu 50% terdiri dari 8 ekor mencit jantan galur Balb/C

K3 : Kelompok ulkus diabetikum + madu 100% terdiri dari 8 ekor mencit jantan galur Balb/C

O1 : Observasi kelompok ulkus diabetikum + NaCl 0,9%. Mencit diinduksi streptozotocin (STZ), dibuat luka, dialirkan NaCl 0,9%, serta diberi pakan dan minum standar

O2 : Observasi kelompok ulkus diabetikum + madu 50%. Mencit diinduksi streptozotocin (STZ), dibuat luka, dioles madu 50%, serta diberi pakan dan minum standar

O3 : Observasi kelompok ulkus diabetikum + madu 100%. Mencit diinduksi streptozotocin (STZ), dibuat luka, dioles madu 100%, serta diberi pakan dan minum standar

### 3.2 Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.2.1 Variabel Penelitian

##### 3.2.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian topikal madu 50% dan 100%

##### 3.2.1.2 Variabel Tergantung

Variable tergantung penelitian ini adalah kadar serum protein TGF- $\beta$

#### 3.2.2 Definisi Operasional

##### 3.2.2.1 Madu

Madu adalah produk alami yang diperoleh lebah madu dari nektar tanaman dan diberikan secara dioleskan menggunakan *cotton bud* sebanyak 1 kali oles. Madu yang digunakan adalah madu manuka. Penelitian ini menggunakan madu 50% dan madu 100%. Madu 50% adalah madu yang telah diencerkan aquades dengan perbandingan 1:1 dan madu 100% adalah madu murni tanpa campuran apapun.

Skala : Rasio



### 3.2.2.2 Kadar *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ )

*Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) adalah faktor pertumbuhan yang dihasilkan pada serum mencit pada ketiga kelompok lalu dianalisis melalui ELISA. Sampel ELISA menggunakan sampel darah dari sinus orbitalis mencit yang diambil menggunakan mikrohematokrit dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum. Serum dikumpulkan pada hari ke-10 setelah pembuatan luka. Pengukuran kadar TGF- $\beta$  diukur dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Skala : Rasio

## 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Balb/C yang dipelihara di Laboratorium Hewan Coba *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

### 3.3.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit putih jantan galur Balb/C dengan kriteria sebagai berikut :

#### 3.3.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Galur Mencit : Mencit Galur Balb/C
- b. Jenis Kelamin : Jantan

- c. Umur : 2 - 3 bulan
- d. Berat : 25-30 gr
- e. Makanan : pakan dan air *ad libitum*
- f. Kadar gula darah mencit  $\geq 250$ mg/dl setelah diinduksi streptozotocin (STZ)
- g. Mencit positif ulkus diabetikum setelah 3 hari pembuatan luka dinilai dari ulkus meluas meliputi dermis dan subkutis.

#### 3.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Mencit yang sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya
- b. Mencit yang tidak berespon setelah diinduksi streptozotocin (STZ)
- c. Mencit yang tidak membentuk ulkus setelah 3 hari dilakukan pembuatan luka
- d. Mencit yang sakit selama masa adaptasi

#### 3.3.2.3 Kriteria Drop Out : Mencit yang mati selama penelitian

### 3.4 Instrumen Penelitian

#### 3.4.1 Instrumen Penelitian

Instrumen pada penelitian ini yaitu : kandang mencit beserta tempat pakan dan minum, timbangan digital untuk menimbang berat mencit dan pakan mencit, jarum suntik, logam panas, glukometer, *glucose strip*, *TGF- $\beta$  ELISA kit*, mikropipet, tabung darah *Eppendorf*, dan *cotton bud*, dan *handscoen*.

### 3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan pada penelitian ini yaitu : madu, NaCl 0,9%, aquades, streptozotocin, ketamine, dan EDTA.

## 3.5 Cara Penelitian

### 3.5.1 Pengajuan *Ethical Clearence*

*Ethical clearence* penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

### 3.5.2 Prosedur Penelitian

#### 3.5.2.1 Persiapan dan Adaptasi

Mencit jantan berjumlah 24 ekor dan masuk dalam kriteria inklusi dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari 8 ekor tiap kelompok. Mencit tersebut diberikan waktu adaptasi dengan kondisi standar laboratorium dan ventilasi yang baik dengan waktu 1 minggu dengan pemberian pakan dan minum sesuai berat badan untuk menghindari hewan coba mengalami stress.

#### 3.5.2.2 Proses Pembuatan Mencit Diabetes

Sebanyak 24 ekor mencit dilakukan induksi STZ dengan cara:

- a. Mencit berjumlah 24 ekor dipuasakan selama 20 jam untuk induksi diabetes
- b. Mencit diinduksi diabetes dengan cara injeksi 2 dosis STZ
  - Dosis 1 : 40 mg/KgBB STZ diinjeksikan pada hari ke-8
  - Dosis 2 : 60 mg/KgBB STZ diinjeksikan pada hari ke-13

- c. STZ yang digunakan sudah dilarutkan dengan *citrate buffer* pH 4,5 dengan konsentrasi 0,01M
- d. Tiap ekor mencit diinjeksikan STZ sebanyak 0,1 ml secara intraperitoneal pada sisi perut

### 3.5.2.3 Proses Uji Gula Darah

Seluruh sampel yang sudah di induksi STZ dilakukan uji gula darah pada hari ke-16 dengan cara :

1. Masukkan mencit ke dalam selongsong sesuai ukuran tubuh mencit
2. Julurkan ekor mencit dari selongsong
3. Lakukan insisi 0,2-2cm dari pangkal ekor pada vena lateralis mencit dengan silet atau gunting steril
4. Teteskan darah dari ekor mencit pada glucose strip
5. Masukkan *glucose strip* pada glukometer

### 3.5.2.4 Proses Pembuatan Luka pada hewan Coba

Seluruh sampel mencit dilakukan pembuatan luka di punggung mencit dengan cara :

1. Mencit yang sudah diidentifikasi diabetes dengan gula darah  $\geq 250$  mg/dl dilakukan pembuatan luka pada sampel
2. Mencit dianestesi, dengan cara injeksi campuran 0,1 ml ketamine HCL murni + 0,ml NaCl 0,9% pada daerah pembuatan luka
3. Apabila mencit sudah tersedasi, dilakukan pencukuran rambut mencit

padapunggung yang sudah dibersihkan dengan ethanol 70%

4. Logam panas ditempelkan pada punggung mencit selama 30 detik

#### 3.5.2.5 Proses Uji Validasi sampel

Proses uji validasi ulkus diabetikum mencit dilakukan 3 hari setelah pembuatan luka pada punggung mencit. Proses ini dilakukan dengan cara menilai makroskopis ulkus. Mencit dengan ulkus diabetikum ditandai dengan adanya ulkus yang meluas meliputi jaringan dermis dan subkutis.

#### 3.5.2.6 Proses Perlakuan Sampel

Perlakuan sampel dilakukan 3 hari setelah pembuatan luka atau pada hari ke-19. Sampel dilakukan randomisasi setelah pembuatan luka dan dibagi menjadi 3 kelompok. Pada hari ke-3 setelah pembuatan luka dilanjutkan perlakuan sesuai kelompok masing-masing sebagai berikut.

- a. Kelompok 1 (K+) : Kelompok kontrol, mencit ulkus diabetikum dengan pemberian NaCl 0,9%
- b. Kelompok 2 (P1) : Kelompok perlakuan, mencit ulkus diabetikum dengan pemberian topikal (dioleskan) madu 50%
- c. Kelompok 3 (P2) : Kelompok perlakuan, mencit ulkus diabetikum dengan pemberian topikal (dioleskan) madu 100%

#### 3.5.2.7 Proses Pengambilan Sampel Darah Mencit

Sampel darah mencit diambil pada hari ke-26 dengan melukai sinus orbitalis pada mata mencit dengan cara :

- a. Pegang dan jepit bagian tengkuk mencit dengan jari tangan
- b. Kondisikan mencit senyaman mungkin
- c. Goreskan mikrohematokrit pada medial canthus mata mencit ke arah foramen optica
- d. Putar mikrohematokrit hingga sinus orbitalis mencit terlukai
- e. Tampung darah sebanyak 2 cc menggunakan tabung darah yang telah diberi EDTA.
- f. Sentrifugasi darah mencit dengan kecepatan 3000rpm dengan waktu 15 menit
- g. Pindahkan serum mencit ke tabung *Eppendorf*
- h. Sentrifugasi serum mencit dengan kecepatan 3000rpm selama 15 menit
- i. Pisahkan supernatan hasil sentrifugasi dan buang endapannya.

#### 3.5.2.8 Pengukuran Kadar TGF- $\beta$

- a. Pengukuran kadar TGF- $\beta$  dilakukan pada hari ke-26 setelah pembuatan luka menggunakan sampel serum darah mencit
- b. Sentrifugasi sampel dengan kecepatan 9000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C
- c. Spin down tub zero yang berisi standard serbuk selama 5 menit
- d. Tambahkan 1000  $\mu$ l sample dilution ke tub zero
- e. Siapkan 6 tube, tiap tube diberikan *sample dilution buffer* sebanyak 0,5 ml
- f. Tambahkan 0,3 ml larutan standar kedalam tube pertama dan lakukan

pengenceran berseri ke 5 tube lainnya.

- g. Masukkan campuran sampel dan larutan standar ke sumuran sebanyak 100  $\mu$ l, inkubasi sumuran selama 90 menit dengan suhu 37  $^{\circ}$ C
- h. Cuci sumuran sebanyak 2x menggunakan wash buffer
- i. Tambahkan 100  $\mu$ l *biotin labeled antibody working solution* pada tiap sumuran, inkubasi sumuran selama 60 menit dengan suhu 37  $^{\circ}$ C
- j. Cuci sumuran sebanyak 3x menggunakan wash buffer
- k. Tambahkan 100  $\mu$ l *SABC working solution* pada tiap sumuran, inkubasi sumuran selama 30 menit dengan suhu 37  $^{\circ}$ C
- l. Cuci sumuran sebanyak 5x menggunakan wash buffer
- m. Tambahkan 90  $\mu$ l *TMB substrate solution* pada tiap sumuran, inkubasi sumuran selama 20 menit dengan suhu 37  $^{\circ}$ C
- n. Tambahkan 50  $\mu$ l *stop solution* pada tiap sumuran
- o. Masukkan sumuran ke ELISA reader dan baca dengan gelombang 450nm
- p. Pemeriksaan ELISA dilakukan oleh analis Laboratorium Hewan Coba *Integrated Biomedical Laboratory (IBL)* FK Unissula Semarang

### 3.6 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.6.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian pembuatan mencit diabetik, perlakuan, dan penghitungan kadar TGF- $\beta$  dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

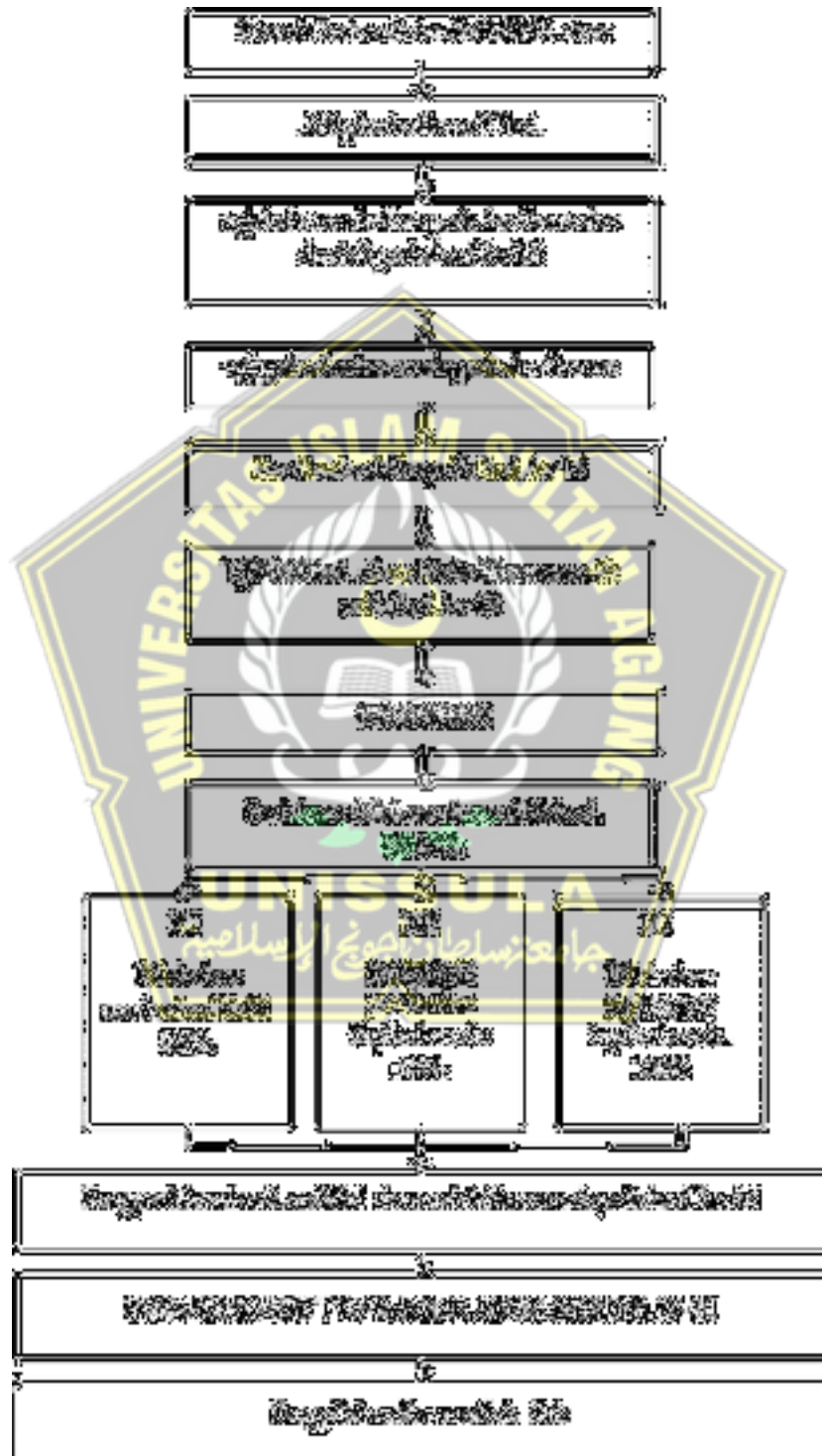
#### 3.6.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Februari 2023





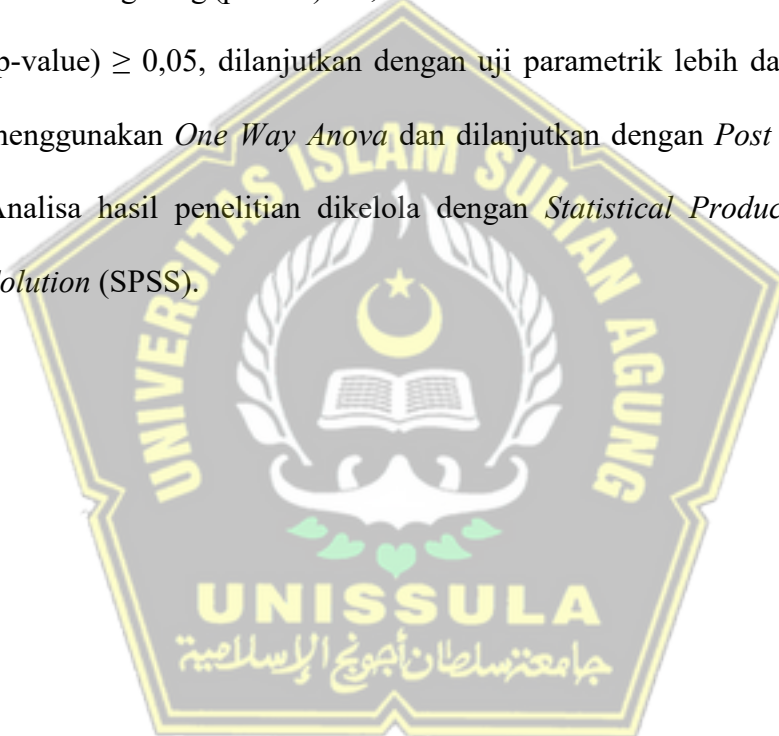
### 3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

### 3.8 Analisa Hasil

Hasil penelitian ini dikumpulkan dan dilakukan uji deskriptif yang meliputi variabel bebas dan variabel tergantung. Selanjutnya dilakukan *Shapiro Wilk test* untuk melakukan uji normalitas dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test*. Data yang didapatkan memiliki sebaran normal dengan sig (p-value)  $\geq 0,05$  dan data memiliki varian homogen dengan sig (p-value)  $\geq 0,05$ , dilanjutkan dengan uji parametrik lebih dari 2 kelompok menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc LSD test*. Analisa hasil penelitian dikelola dengan *Statistical Product and Service Solution (SPSS)*.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian oles madu terhadap kadar TGF- $\beta$  pada mencit dengan ulkus diabetikum. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Februari 2023 bertempat di Laboratorium Biomedik Terintegrasi FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang

Penelitian ini menggunakan Mencit jantan galur Balb/C sebagai subjek penelitian. Mencit diinduksi diabetes menggunakan streptozotocin, dibuat ulkus pada punggung mencit, dan diberi perlakuan. Jumlah mencit yang digunakan adalah 24 ekor dan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol atau kelompok K1 (mencit ulkus diabetikum diberi NaCl 0,9%), kelompok K2 (mencit ulkus diabetikum dioles madu 50%), dan kelompok K3 (mencit ulkus diabetikum dioles madu 100%). Setelah diberi perlakuan selama 7 hari, dilakukan pengambilan sampel serum mencit sebagai sampel untuk pembacaan kadar TGF- $\beta$  menggunakan ELISA.

##### 4.1.1 Deskripsi Kadar TGF- $\beta$

Penelitian yang sudah dilakukan diperoleh data berupa kadar TGF- $\beta$ . Sampel penelitian ini berupa serum mencit dari 3 kelompok yaitu K1 (diberikan cairan NaCl 0,9%), K2 (dioleskan madu 50%), dan K3 (dioleskan madu 100%)

Tabel 4.0.1 Hasil Pengukuran Kadar TGF- $\beta$ 

Variabel	Mean SD	Min	Max	Frekuensi (n)
K1	48,8191 $\pm$ 12,09438	34,39	68,59	8
K2	50,3115 $\pm$ 18,93141	23,48	86,81	8
K3	47,1066 $\pm$ 1524049	31,06	73,06	8

Gambar 4.1 Rerata Kadar TGF- $\beta$  antar kelompok

Berdasarkan tabel 4.1 dan gambar 4.1 memperlihatkan bahwa K2 (Madu 50%) memiliki rerata kadar TGF- $\beta$  tertinggi yaitu sebesar 50.3115 pg/ml kemudian diikuti oleh kelompok tertinggi kedua yaitu kelompok kontrol K1 (NaCl 0,9%) dengan rerata kadar TGF- $\beta$  sebesar 48.8191 pg/ml. Kelompok dengan rerata kadar TGF- $\beta$  terendah yaitu K3 (Madu 100%) dengan rerata kadar TGF- $\beta$  sebesar 47.1066 pg/ml.

#### 4.1.2 Analisis perbedaan kadar TGF- $\beta$

Perbedaan kadar TGF- $\beta$  pada ketiga kelompok penelitian ini dilakukan menggunakan uji parametrik *one way anova* pada hari ke- 10 setelah pembuatan luka. Analisis ini dilakukan karena data sudah terbukti

memiliki sebaran yang normal dan varian homogen. Rincian analisis data sebagai berikut :

Tabel 4.2 Uji Saphiro-Wilk, Levene Test, dan One-Way Anova

Kelompok	p-Value		
	<i>Shapiro-Wilk</i>	<i>Levene Test</i>	<i>One Way Anova</i>
K1	0,162	0,710	
K2	0,591	0,710	0,920
K3	0,315	0,710	

Berdasarkan tabel 4.2 memperlihatkan bahwa sebaran data kadar TGF- $\beta$  pada tiap kelompok normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Uji parametrik *one way anova* didapatkan  $p\text{-value} > 0,05$  yaitu sebesar 0,920 artinya kadar TGF- $\beta$  pada ketiga kelompok tidak memiliki perbedaan yang signifikan sehingga tidak dilakukan uji lanjutan.

#### 4.2 Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada rerata kadar TGF- $\beta$  ketiga kelompok secara statistik. Data penelitian yang didapatkan menunjukkan bahwa K2 (oles madu 50%) memiliki rerata kadar TGF- $\beta$  tertinggi yaitu sebanyak 50.3115 pg/ml. Hasil penelitian ini sependapat dengan kajian Alam *et al* (2014), bahwa lebah madu menghasilkan glukosa oksidase yang dihasilkan dari glandula hypopharyngeal lebah dan berfungsi untuk mengoksidasi glukosa menjadi hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) sebagai zat antibakteri. Glukosa oksidase yang

dihasilkan oleh lebah tidak dapat aktif pada larutan madu yang pekat atau memiliki konsentrasi tinggi dan apabila madu diencerkan, glukosa oksidase menjadi aktif dan dapat merubah glukosa menjadi hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Konsentrasi hidrogen peroksida yang rendah dapat bertindak sebagai antibakteri dan promotor penyembuhan luka (Alam et al., 2014).

Pada proses penyembuhan ulkus diabetikum, TGF- $\beta$  memiliki peran pada 3 fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi dan fase proliferasi. Fase hemostasis merupakan tahapan yang dimulai setelah cedera terjadi dan akan dilanjutkan dengan proses vasokonstriksi. Trombosit akan kontak dengan fibronectin dan kolagen membentuk *fibrin clot* yang akan menghentikan perdarahan, selain itu trombosit juga akan mensekresi PDGF, EGF, dan TGF- $\beta$  yang bertindak sebagai kemoatraktan bagi sel inflamasi dan akan meningkatkan respon imun adaptif pada fase selanjutnya yaitu fase inflamasi. Fase inflamasi merupakan fase adanya respon dari sistem imun adaptif dan migrasi sel inflamasi seperti sel T, monosit, makrofag, dan neutrophil untuk mengontrol pathogen, regulasi radikal bebas, dan mendegradasi material asing yang masuk ke dalam luka. Makrofag dan sel T pada fase inflamasi ini juga mensekresikan sitokin anti inflamasi dan faktor pertumbuhan seperti IL-10 dan TGF- $\beta$  yang berfungsi untuk mensupresi respon pro inflamasi dan menyeimbangkan proses inflamasi pada luka agar fase inflamasi ini tidak berjalan dalam waktu yang lama (Perez-Favila et al., 2019).

Kadar TGF- $\beta$  tertinggi yang ditunjukkan oleh kelompok K2 (mencit ulkus diabetikum dengan pemberian oles madu 50%) pada hari ke-10 setelah pembuatan luka merupakan tanda peran TGF- $\beta$  pada fase proliferasi. Fase proliferasi terdiri dari 4 proses yaitu angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, re-epitelisasi, dan kontraksi luka. Angiogenesis distimulasi oleh bFGF, VEGF, dan TGF- $\beta$ . VEGF berperan sebagai inisiator proliferasi dan migrasi endotel dan maturasi pembuluh darah melalui jalur MAPK dan PI3K-Akt-eNOS. Pembentukan jaringan granulasi dan kolagen tipe III distimulasi oleh bFGF dan TGF- $\beta$  memiliki peran dalam migrasi fibroblast dan keratinosit (Perez-Favila et al., 2019)

TGF- $\beta$  adalah faktor pertumbuhan yang bekerja sebagai mediator kemoatraktan bagi fibroblas untuk menstimulasi proliferasi sel, diferensiasi sel, dan angiogenesis (Rahimi et al., 2017). TGF- $\beta$  juga dapat menstimulasi produksi matriks ekstraseluler dan angiogenesis (Larson et al., 2020). Penelitian oleh Majtan *et al* (2010) menggunakan kultur keratinosit yang diinkubasi bersama madu akasia menunjukkan bahwa madu akasia dapat mempromosikan up-regulation TGF- $\beta$  (Majtan et al., 2010). Hal tersebut berlawanan dengan penelitian Rahimi *et al* (2017) yang membahas pemberian madu terhadap adhesi peritoneal dan menunjukkan bahwa kelompok tikus dengan perlakuan pembedahan dan pemberian madu memiliki rerata kadar TGF- $\beta$  lebih rendah dibandingkan dengan tikus tanpa pemberian madu (Rahimi et al., 2017). Madu memiliki kandungan polyphenol golongan flavonoid dan asam fenolik. Golongan flavonoid yang

dimiliki oleh madu adalah senyawa flavonol seperti myricetin, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, pinobanksin, rutin dan galangin (Hossen et al., 2017). Penelitian Rahimi *et al* (2017) menjelaskan bahwa beberapa polifenol dalam madu terbukti menghambat transkripsi TGF- $\beta$  sehingga kadar TGF- $\beta$  pada kelompok tikus dengan perlakuan pembedahan dan pemberian madu lebih rendah dibandingkan tikus tanpa pemberian madu (Rahimi et al., 2017).

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan yaitu penelitian ini tidak dapat mengidentifikasi jenis isoform TGF- $\beta$  yang spesifik mengingat TGF- $\beta$  memiliki 3 jenis isoform yaitu TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, dan TGF- $\beta$ 3 yang memiliki fungsi yang berbeda pada proses penyembuhan luka. TGF- $\beta$ 1 dan TGF- $\beta$ 2 memiliki fungsi dalam menstimulasi re-epitelisasi, angiogenesis, dan deposisi matriks ekstraseluler, sedangkan TGF- $\beta$ 3 memiliki peran sebaliknya. TGF- $\beta$ 3 berperan dalam menghambat transisi fibroblast menjadi miofibroblas sehingga pada proses penyembuhan luka tidak terbentuk jaringan parut (Gilbert et al., 2016).



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. Pemberian oles madu tidak memberikan perbedaan rerata kadar TGF- $\beta$  pada serum mencit dengan ulkus diabetikum yang signifikan pada K1 (pemberian NaCl 0,9%), K2 (oles madu 50%), dan K3 (oles madu 100%).
2. Rerata kadar TGF- $\beta$  pada serum mencit dengan ulkus diabetikum yang diberi NaCl 0,9% (K1) adalah 48,8191 pg/ml
3. Rerata kadar TGF- $\beta$  pada serum mencit dengan ulkus diabetikum yang diberi Madu 50% (K2) adalah 50,3115 pg/ml
4. Rerata kadar TGF- $\beta$  pada serum mencit dengan ulkus diabetikum yang diberi Madu 100% (K3) adalah 47,1066 pg/ml

#### 5.2 Saran

Mengacu pada keterbatasan penelitian ini, maka pada penelitian mendatang perlu dilakukannya studi terkait pengaruh pemberian oles madu terhadap kadar jenis isoform TGF- $\beta$  yang spesifik yaitu TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, dan TGF- $\beta$ 3 selama proses penyembuhan ulkus diabetikum mencit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S., & Othman, N. H. (2013). Review of the Medicinal Effects of Tualang Honey and a Comparison with Manuka Honey. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 20(3), 6. /pmc/articles/PMC3743976/
- Alam, F., Islam, M. A., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2014). *Honey: A Potential Therapeutic Agent for Managing Diabetic Wounds*.
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods 2014, Vol. 3, Pages 420-432*, 3(3), 420–432.
- Bus, S. A., David, |, Armstrong, G., Gooday, | Catherine, Jarl, G., Caravaggi, C. F., Vij, |, & Bus, S. A. (2020). *Guidelines on offloading foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update)*.
- Chellan, G., Srikumar, S., Varma, A. K., Mangalanandan, T. S., Sundaram, K. R., Jayakumar, R. v., Bal, A., & Kumar, H. (2012). Foot care practice – The key to prevent diabetic foot ulcers in India. *The Foot*, 22(4), 298–302.
- Dinker R Pai, S. S. (2013). Diabetic Foot Ulcer – Diagnosis and Management. *Clinical Research on Foot & Ankle*, 01(03).
- Dumville, J. C., Deshpande, S., O'Meara, S., & Speak, K. (2013). Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2013, Issue 8). John Wiley and Sons Ltd.
- Eleftheriadou I., Kokkinos A., Liatis S., Makrilakis., Tentolouris N., Tentolouris A., Tsapogas. (2019) *Atlas of the Diabetic Foot*. Oxford : Wiley Blackwell
- Endokrinologi Indonesia. (2021). *PEDOMAN PENGELOLAAN DAN PENCEGAHAN DIABETES MELITUS TIPE 2 DEWASA DI INDONESIA-2021 PERKENI*. Penerbit PB. PERKENI.
- Gilbert, R. W. D., Vickaryous, M. K., & Vilorio-Petit, A. M. (2016). Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Journal of Developmental Biology 2016, Vol. 4, Page 21, 4(2)*, 21.
- Hazari, A., Maiya, G. A. (2020). *Clinical Biomechanics and its Implications on Diabetic Foot*. Singapore : Springer.
- Hozzein, W. N., Badr, G., al Ghamdi, A. A., Sayed, A., Al-Waili, N. S., & Garraud, O. (2015). Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-beta/smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3), 940–954.
- Ibrahim, A., Sinclair, A., Dunning, T., & Colagiuri, S. (2017). *Managing older people with type 2 diabetes : global guideline*. Brussels : IDF

- Insani, I. B., Widayanti, N., & Rifki, A. (2017). Honey As A Treatment For Diabetic Foot Ulcer: A Systematic Review. *Jurnal Plastik Rekonstruksi*, 3(2), 45–51.
- Karimi, Z., Behnammoghadam, M., Rafiei, H., Abdi, N., Zoladl, M., Talebianpoor, M. S., Arya, A., & Khastavaneh, M. (2019). Impact of olive oil and honey on healing of diabetic foot: a randomized controlled trial. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 347.
- Larson, C., Oronsky, B., Carter, C. A., Oronsky, A., Knox, S. J., Sher, D., & Reid, T. R. (2020). TGF-beta: a master immune regulator. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 24, Issue 5, pp. 427–438). Taylor and Francis Ltd.
- Lichtman, M. K., Otero-Vinas, M., & Falanga, V. (2016). Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis. In *Wound Repair and Regeneration* (Vol. 24, Issue 2, pp. 215–222). Blackwell Publishing Inc.
- Madhok, B. M., Vowden, K., & Vowden, P. (2013). New techniques for wound debridement. *International Wound Journal*, 10(3), 247–251.
- Majtan, J., Kumar, P., Majtan, T., Walls, A. F., & Klaudiny, J. (2010). Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 19(8).
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 8, Issue 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Okotorina, R., Wahyuni, A., & Harahap, E. Y. (2019). Pencegahan Ulkus Diabetikum Pada Penderita Diabetes Mellitus. *REAL in Nursing Journal (RNJ)*, 2(3), 108–117.
- Perez-Favila, A., Martinez-Fierro, M. L., Rodriguez-Lazalde, J. G., Cid-Baez, M. A., De, M., Zamudio-Osuna, J., del Rosario Martinez-Blanco, M., Mollinedo-Montaña, F. E., Rodriguez-Sanchez, I. P., Castañeda-Miranda, R., & Garza-Veloz, I. (2019). medicina Current Therapeutic Strategies in Diabetic Foot Ulcers.
- Qi, M., Zhou, Q., Zeng, W., Wu, L., Zhao, S., Chen, W., Luo, C., Shen, M., Zhang, J., & Tang, C. e. (2018). Growth factors in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 23(2), 310–317.
- Rahimi, V. B., Shirazinia, R., Fereydouni, N., Zamani, P., Darroudi, S., Sahebkar, A. H., & Askari, V. R. (2017). Comparison of honey and dextrose solution on post-operative peritoneal adhesion in rat model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, 849–855.
- Ramirez, H., Patel, S. B., & Pastar, I. (2014). The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care*, 3(7), 482–491.
- Ranjitkar, S., Pradhan, E., Paudel, S., Pradhan, S., & Dhakal, S. (2018). A Diabetic

- Foot Survey. *Journal of Diabetes and Endocrinology Association of Nepal*, 2(2), 8–18.
- Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., Albuja, M., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1).
- Rashid Surahio, A., Ahmad Khan, A., Usman Farooq, M., & Fatima, I. (2014). ROLE OF HONEY IN WOUND DRESSING IN DIABETIC FOOT ULCER. In *J Ayub Med Coll Abbottabad* (Vol. 26, Issue 3).
- Rosyid, F. N. (2017). Etiology, pathophysiology, diagnosis and management of diabetics' foot ulcer. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(10), 4206.
- Saco, M., Howe, N., Nathoo, R., & Cherpelis, B. (2016). Comparing the efficacies of alginate, foam, hydrocolloid, hydrofiber, and hydrogel dressings in the management of diabetic foot ulcers and venous leg ulcers: A systematic review and meta-analysis examining how to dress for success. *Dermatology Online Journal*, 22(8), 22.
- Schaper, N. C., van Netten, J. J., Apelqvist, J., Bus, S. A., Hinchliffe, R. J., Lipsky, B. A., Editorial Board, I., & Twente, Z. (2020). *Practical Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease (IWGDF 2019 update)*.
- Thomas, N. (2016). *A practical guide to diabetes mellitus*. India : The Health Sciences Publisher
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- $\beta$  activation and function in immunity. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32, pp. 51–82). Annual Reviews Inc.
- van Netten, J. J., Bus, S. A., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Hinchliffe, R. J., Game, F., Rayman, G., Lazzarini, P. A., Forsythe, R. O., Peters, E. J., & Neatherlands É, T. (2020). *Definitions and criteria for diabetic foot disease on behalf of the International Working Group on the Diabetic Foot*. 19.
- Viaña-Mendieta, P., Mirna, |, Anchez, L. S., Benavides, J., Lorena, M., & Anchez, S. (2021). *Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants*.
- Wangnoo, S. K. (2016). Diabetic foot: Clinical presentation and management in 2015. *Journal of Indian College of Cardiology*, 6, 58–60.
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. In *Annals of Medicine* (Vol. 49, Issue 2, pp. 106–116). Taylor and Francis Ltd.