

Nano Spray *TRISWHEAT* (Teripang *Super Wound Healing Agent*) dari Ekstrak Teripang sebagai Penyembuh Luka Diabetes Mellitus yang Terinfeksi Bakteri MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

Nano Spray TRISWHEAT (Teripang Super Wound Healing Agent) Healing Agent of Diabetic Mellitus Wound Infected by MRSA(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) with Sea Cucumber's Extract

Nada Hanifah¹, Yusuf Farid Achmad¹, Mellya Permatasari¹, Marista Kurniati¹, Ditya Tiwi Syafira², Siti Isrina Salasia Oktavia^{3*}

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

³Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

*Email : isrinasalasia@ugm.ac.id

Naskah diterima : 12 Juli 2017 direvisi : 12 Februari 2018, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Sea cucumber (*Stichopus noctivagus*) belongs to *Holothuroidea* family. Sea cucumbers has lot of uses in the medicine sector, such as including to treat wounds, anti-biotic, anti-bacterial, anti-tumor, anti-coagulant. Diabetes Mellitus is a disease characterized by high blood sugar levels with metabolic disorders. This disease can cause wounds called gangrene. This research has purpose to prove the influence of giving nano spray of sea cucumber extract to the speed of wound healing progress that is divided into 3 groups : Group I (K-) no medical treatment, Group II nano spray of sea cucumber extract (T) and Group III nano spray penicillin (K+) to wistar mouse towards the speed of diabetic Mellitus wound healing which is infected by *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* bacteria. In the in vitro with dilution examination of 40% concentration of sea cucumber extract which is effective to resist the growth of *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* bacteria and examined to Wistar mouse which are already diabetic inducted with Streptozotocin (STZ) and hurt with punch biopsy wounded by biopsy punch with diameter of 0,8 cm on it's back and the wound is infected with bacteria which is intradermal injected. After it's regularly once a day given the medicine the result of Group I nano spray sea cucumber extract 40% concentration category treatment on wound healing process the diameter of wound on the 3rd day 0.8 cm, on the 7th day 0.4 cm and on the 14th day wound fully recover according to macros (wound size) and histopathology examination shows faster and better healing compared to treatment category of nano spray penicillin and control marked by score of inflammation cell and lymphocytes in small quantity. This proves that the nano spray TRISWHEAT (Teripang Super Wound Healing Agent) of sea cucumber extract with a concentration of 40% can treat diabetes mellitus type 2-infected bacteria *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

Key words : sea cucumbers, diabetes mellitus, nano spray, bacteria

Abstrak

Teripang (*Stichopus noctivagus*) termasuk dalam famili *Holothuroidea*. Teripang memiliki banyak kegunaan di bidang kesehatan, diantaranya untuk mengobati luka, anti biotik, anti bakteri, anti tumor, dan anti koagulasi. Diabetes Mellitus merupakan penyakit yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai gangguan metabolisme. Penyakit ini dapat menyebabkan luka yang dinamakan gangren. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian nano spray ekstrak teripang terhadap kecepatan kesembuhan luka yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: Kelompok I Kontrol (K) tidak diberi obat, Kelompok II nano spray ekstrak teripang (T) dan Kelompok III nano spray penicillin (K+) pada tikus Wistar terhadap kecepatan kesembuhan luka diabetes Mellitus yang terinfeksi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Uji invitro secara dilusi konsentrasi 40% ekstrak teripang efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* kemudian diujikan pada tikus Wistar yang telah diinduksi diabetes dengan Streptozotocin (STZ) dan dilukai dengan punch biopsy berdiameter 0,8 cm pada punggung kemudian luka tersebut diinfeksi dengan beakteri yang diinjeksikan intradermal. Luka yang telah diobati secara rutin selama 14 hari, hasil Kelompok II perlakuan nano spray ekstrak teripang konsentrasi 40% secara makros (ukuran luka) pada hari ke-3 0,8 cm, hari ke-7 0,4 cm dan pada hari ke 14 luka menutup sempurna. Hasil analisis histopatologi Kelompok II nano spray ekstrak teripang konsentrasi 40% menunjukkan kesembuhan yang lebih cepat dibanding kelompok perlakuan nano spray penicillin (K+) dan control (K-) ditandai dengan sel radang dan limfosit yang berjumlah sedikit. Hal ini membuktikan bahwa nano spray TRISWHEAT

(Teripang *Super Wound Healing Agent*) dari ekstrak teripang dengan konsentrasi 40% dapat mengobati luka diabetes melitus tipe 2 yang terinfeksi bakteri *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*.

Kata kunci : teripang, *diabetes mellitus*, nano spray, bakteri

Pendahuluan

Salah satu penyakit degeneratif yang menjadi masalah besar di Indonesia ialah *Diabetes Melitus* (DM), penyakit yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai gangguan metabolisme karbohidrat, lipida dan protein karena menurunnya kerja insulin yang diikuti atau tidak diikuti dengan resistensi insulin (WHO, 1999). Penyakit Diabetes Melitus itu sendiri dibedakan menjadi 2, yaitu tipe 1 dan tipe 2. DM tipe 1 merupakan penyakit DM yang disebabkan karena rusaknya sel B pankreas sehingga kadar insulin dalam tubuh menjadi rendah. Tipe ini sering menyerang pada orang yang berusia dibawah 20 tahun, dan penyakit ini tidak bersifat menurun. Sementara DM tipe 2 disebabkan karena resistensi insulin yang biasanya dapat menyerang orang pada usia diatas 40 tahun dan merupakan penyakit yang bersifat menurun. Permasalahan yang muncul yaitu ketika penderita DM tipe 2 khususnya mengalami luka. Luka diabetes adalah luka yang terjadi pada pasien diabetes yang melibatkan gangguan pada syaraf peripheral dan autonomik (Suryadi, 2004) Dalam proses penyembuhan luka, terdapat 3 fase : fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi (Ekaputra, 2013).

Untuk mengatasinya, sudah terdapat obat di pasaran yang berbentuk sediaan oral (tablet, kapsul, dan sirup), maupun topikal (krim atau salep). Di samping itu, belum tersedia sediaan semprot/ *spray* yang lebih meningkatkan kenyamanan penggunaan. Untuk memanfaatkan potensi salah satu biota laut, teripang (*Stichopus sp*) digunakan sebagai obat luka pada penderita DM tipe 2. Teripang memiliki banyak kegunaan di bidang kesehatan, salah satunya untuk mengobati luka. Teripang memiliki beberapa

kandungan yang berfungsi dalam proses penyembuhan luka, diantaranya asam lemak, kondroitin sulfat, glikosaminoglikan (GAG). (Bordbar dkk., 2011). Tujuan dari penelitian ini yaitu membuktikan *nano spray* ekstrak teripang mampu menyembuhkan luka pada penderita DM tipe 2 dan mengetahui konsentrasi optimum, sehingga diperoleh sediaan yang mudah diaplikasikan dan terjangkau untuk menyembuhkan luka.

Materi dan Metode

Ekstraksi teripang

Teripang dipotong menjadi beberapa bagian, sedangkan organ pencernaannya seperti usus besar yang berisi kotoran dan pasir dibuang. Teripang ditimbang dengan berat rata-rata 500 gr dan diekstrak menggunakan metode maserasi dengan direndam dalam larutan methanol 70% selama kurang lebih 48 jam. Filtrat yang didapat dimasukkan ke dalam labu uap kemudian diuapkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 40 derajat celcius dengan kecepatan 900 rpm hingga mengental menjadi ekstrak 100% (Nimah *et al.*, 2012).

Uji *in vitro* Preparasi bakteri (MRSA)

Methicilin Resistant Staphylococcus aureus berasal dari kultur yang ditanam pada Plat Agar Darah (PAD) *agar base* dari biakan murni pada Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Bakteri kemudian ditanam dalam *Todd Hewitt Broth* (THB) (Pronadisa, Spanyol) selama 18-24 jam, setelah divorteks, kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci dengan 10 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS), diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pelet ditambah 2 ml PBS dan ditentukan nilai *optical density* (OD)

menggunakan spektrofotometer dengan 10% absorbansi pada λ 620 nm sehingga diperoleh larutan sebanyak 10^8 sel bakteri. Suspensi yang digunakan pada infeksi luka adalah $10 \mu\text{l}$ 10^8 sel bakteri dalam PBS (Salasia *et al.*, 1994).

Pembuatan Nano Spray

Teripang hasil ekstraksi dibuat bentuk nanoemulsi tipe minyak dalam air atau o/w karena ekstrak teripang tidak larut dalam air. Dalam pembuatan fase minyak, dicampurkan ekstrak teripang sebanyak 10 gram dengan surfaktan berupa Polisorbate 20 (Tween 20) sebanyak 9 ml dan propilen glikol 1 ml, kemudian di-*stirrer* selama 5 menit, ditambahkan fase air yaitu aquadest sebanyak 25 ml dan disonifikasi selama 10 menit dengan *ultrasonic*. Maka hasil akhir akan diperoleh konsentrasi nanoemulsi dengan ekstrak teripang 40%. Karena difusi yang terjadi dari pelarut yang larut air terbentuk turbulensi diantara 2 fase sehingga membentuk 2 partikel yang lebih kecil. Bersamaan dengan berdifusinya pelarut larut air, ukuran partikel yang terbentuk semakin kecil. Selanjutnya emulsi diuji menggunakan alat *spray* apakah bisa disemprotkan atau tidak. (Soppimath *et al.*, 2001)

Uji dilusi

Ekstrak teripang diinokulasi dalam suatu seri pengenceran dalam tabung yang berisi media cair berupa akuades dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri MRSA. Kemudian pengujian dilakukan dengan mengamati tingkat kekeruhan atau pertumbuhan bakteri MRSA dalam media tabung pengenceran yang telah berisi ekstrak teripang. Pengenceran tertinggi dari media cair yang jernih dinyatakan sebagai *Minimum Inhibition Concentration* (MIC) yaitu 40%. Dari tabung yang jernih tersebut diinokulasi pada media plate agar, kemudian diinkubasi dan diamati ada tidaknya

pertumbuhan koloni pada permukaan *media plate agar* (Allen *et al.*, 2002).

Uji In Vivo

Hewan coba yang digunakan yaitu Tikus *Wistar* jantan dengan berat badan 100-160 gram berumur 3 bulan dengan jumlah 18 ekor. Selama satu minggu awal, tikus diadaptasikan di laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Tikus dipuasakan selama 12 jam supaya kadar gula dalam tubuh tetap konstan dan tidak terpengaruh dengan pakan, dan dilakukan induksi dengan *Streptozotocin* (STZ) dengan dosis 55 mg/kgBB secara intravena. STZ diencerkan dengan larutan penyangga sodium sitrat hingga pH 4. Setelah tiga hari tikus diperiksa kadar gula darahnya dengan alat *Glucose Test*. Tikus yang mempunyai kadar gula darah diatas 200 mg/dl dinyatakan diabetes dan digunakan dalam penelitian ini. Tikus kemudian ditimbang berat badannya untuk menentukan dosis yang paling tepat untuk injeksi ketamine yaitu 25mg/KgBB secara intramuskular. Setelah tikus teranestesi, punggung tikus dilukai secara insisi dengan menggunakan biopsi punch diameter 0,8 cm. Tikus kemudian diinfeksi dengan bakteri MRSA secara intradermal. Tikus kemudian dikelompokkan dengan berdasarkan 3 perlakuan perlakuan yaitu Kelompok I berjumlah 6 ekor sebagai kontrol (-) tidak diobati, Kelompok II berjumlah 6 ekor diberi perlakuan dengan *nano spray* ekstrak teripang (T), dan Kelompok III berjumlah 6 ekor sebagai kontrol (+) diberi perlakuan dengan *nano spray* penicillin. Luka tersebut diobati dengan masing-masing perlakuan satu kali setiap hari selama 14 hari berdasarkan kelompok perlakuan.

Pembuatan preparat histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dibuat dari jaringan kulit, hasil nekropsi rutin hari ke-3, 7, dan 14. Jaringan difiksasi dengan formalin 10%, kemudian diproses dan diembed dengan parafin, diiris setebal 4

mikron, dan diwarnai dengan *Hematoksilin dan Eosin* (HE). Preparat diperiksa di bawah mikroskop (*Olympus, Japan*).

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji dilusi ekstrak teripang dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 1% hingga 80% dengan kelipatan 10.

Tabel 1. Hasil Uji Dilusi Ekstrak Teripang

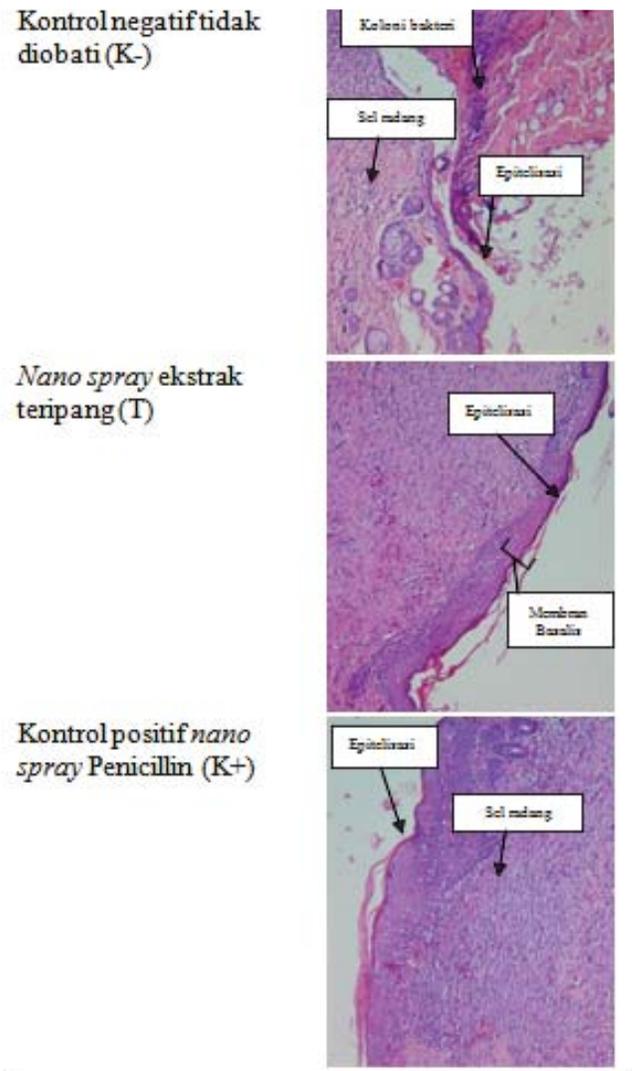
Konsentrasi Ekstrak Teripang (%)	Bakteri MRSA Tabung 1	Bakteri MRSA Tabung 2	Keterangan
1	+	+	Tumbuh
10	+	+	Tumbuh
20	+	+	Tumbuh
30	+	+	Tumbuh
40	-	-	Tidak Tumbuh
50	-	-	Tidak Tumbuh
60	-	-	Tidak Tumbuh
70	-	-	Tidak Tumbuh
80	-	-	Tidak Tumbuh

Dari tabel hasil uji dilusi diatas dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 40% ekstrak teripang sudah menghambat pertumbuhan bakteri MRSA dan digunakan sebagai MIC.

Pada preparat histopatologi kontrol negatif terlihat banyak leukosit yang menunjukkan peradangan, epitelisasi berkembang tidak sempurna, terdapat beberapa koloni bakteri MRSA. Pada kelompok perlakuan dengan *nano spray* ekstrak teripang 40% limfosit terlihat jarang dan tidak menunjukkan peradangan. Pada kelompok perlakuan dengan *nano spray* penicillin, epitelisasi tidak berkembang dengan baik, pada preparat tersebut terlihat leukosit dalam jumlah banyak hal ini menandakan bahwa masih terdapat peradangan (gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan dengan *nano spray* ekstrak teripang 40%

lebih baik dibandingkan dengan kontrol negatif maupun *nano spray* penicillin.

Selain itu dilakukan pula pengamatan diameter luka secara makroskopis.



Gambar 1. Hasil identifikasi histopatologi kulit tikus dibawah mikroskop perbesaran 40x

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa perlakuan kontrol negatif (tidak diobati) pada hari ke-3,7,dan 14 memiliki rata-rata diameter luka berturut-turut 0,85 cm; 0,9 cm ; 1 cm. Pada perlakuan dengan *nano spray* ekstrak teripang 40% diameter luka pada hari ke-3,7,dan 14 memiliki rata-rata diameter berturut-turut 0,8 cm; 0,4 cm ; 0 cm. Pada perlakuan dengan *nano spray* penicillin memiliki diameter luka pada hari ke-3,7,dan 14 sebesar 0,9 cm; 0,5 cm ; 0,3 cm.)

Perlakuan	K-	T	K+
Hari Ke 3			
Hari ke-7			
Hari ke-8			

Gambar 2. Perkembangan kesembuhan luka secara makroskopis :Keterangan: K-: kontrol negatif tidak diobati ; T :*nano spray* Ekstrak Teripang 40% ; K+: kontrol positif *nano spray* Penicillin.

Kesimpulan

Nano spray *TRISWHEAT* (Teripang *Super Wound Healing Agent*) yang terbuat dari ekstrak teripang dengan konsentrasi 40% dapat mengobati luka diabetes melitus yang terinfeksi bakteri *Methicilin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) lebih efektif dibanding *nano spray* penicillin dengan perlakuan selama 14 hari.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan UGM dan pihak-pihak yang membantu dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

Allen L. V. 2002. *The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding*. American

Pharmaceutical Association : Washington D. C.

Characteristics of Streptococcus suis Isolates From Pigs. *J. Vet. Med. B42*: 78-83

Bordbar, S. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumber for Functional Foods-A Review. *Marine Drugs Journal*. 9(1): 1772.

Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., 2001. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal Control Release*

Ekaputra, E. (2013). Evolusi Manajemen Luka. Jakarta: Trans Info Media.

Suriadi. (2004). *Perawatan Luka Edisi 1*. Jakarta :Agung Setyo.

Nimah, S., Ma'ruf, W.F., Trianto, A. 2012. Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus cereus*. *Jurnal Perikanan* 1(2): 1-9.

WHO Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Melitus and its Complications Report of a WHO Consultation Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Melitus. (1999).

Salasia, S. I. O., dan Lammler C. 1994. Distribution of Serotype, Virulence Markers and Futher