

Efek *Caffeine* Terhadap Jumlah Sel Inflamasi pada Penyembuhan Luka *Skin Graft* pada Tikus Sprague Dawley

Wahyu Haris Prabowo¹, Najatullah², Awal Prasetyo³, Neni Susilaningsih³

¹ Mahasiswa Program Studi S2 Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staff Pengajar Departemen Bedah Plastik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³ Staf Pengajar Program Studi S-2 Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Info Artikel : Diterima 24 Desember 2018 ; Disetujui 28 Februari 2019 ; Publikasi 29 April 2019

ABSTRAK

Latar Belakang: *Skin graft* terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang berkembang pesat. Sistem imunitas berperan dalam penyembuhan luka *skin graft*. Kopi mengandung *caffeine* (1,3,7-trimethylxanthine) sebagai antioksidan berperan dalam penyembuhan luka melalui sistem imun. Tujuan penelitian ini membuktikan efek *caffeine* berbagai dosis dalam meningkatkan jumlah sel inflamasi pada luka *skin graft*.

Metode: Studi eksperimental dengan "*Blinded randomized post test only controlled group design*". Seluruh sampel (Tikus Sprague Dawley) dilakukan *Skin Graft* Autologus pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 4 grup (K= Tanpa intake *caffeine*), (P1= *Caffeine* 3 mg), (P2 = *Caffeine* 6 mg), (P3 = *Caffeine* 9 mg). Perhitungan jumlah sel makrofag jaringan, sel neutrofil dan monosit darah tepi dilakukan pada hari ke 7 pasca *Skin Graft*. Data dianalisis dengan metode ANOVA, *Kruskall-Wallis* dan *Mann-Whitney Test*.

Hasil: Perbandingan jumlah makrofag jaringan didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K dengan P2 ($p = 0,011$), K dengan P3 ($p = 0,008$); P1 dengan P2 ($p = 0,009$); P1 dengan P3 ($p = 0,006$); dan P2 dengan P3 ($p = 0,008$). Perbedaan tidak bermakna didapatkan antara kelompok K dengan P1 ($p = 0,343$). Pada hasil uji neutrofil darah tepi, uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai $p = 0,961$, sehingga tidak didapatkan perbedaan bermakna. Pada hasil uji monosit, Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p = 0,160$, tidak ada perbedaan bermakna jumlah monosit darah tepi pada keempat kelompok.

Simpulan: Terdapat perbedaan bermakna jumlah sel makrofag jaringan pada penggunaan *caffeine* dosis bertingkat proses penyembuhan luka *skin graft autologus* tikus Sprague Dawley.

Kata Kunci : Sel inflamasi, *skin graft*, *caffeine*

ABSTRACT

Title: *Effect of Caffeine on Inflammatory Cells Number in Skin Graft Healing on Sprague Dawley Rats*

Background: *Skin graft* is one choice in the rapidly growing wound healing process. The immune system has an important role in healing *skin graft* wounds. Coffee contains *caffeine* (1,3,7-trimethylxanthine) as an antioxidant that has an important role in healing wounds through the immune system. The aim was to prove the effects of *caffeine* in various doses in increasing the number of inflammatory cells in *skin graft* wounds.

Method: This was an experimental study with "*Blinded randomized post test only controlled group design*". All samples (*Sprague Dawley Rats*) were carried out by *Autologous Skin Graft* at the same time. Samples were randomly divided into 4 groups (K=without *caffeine* intake), (P1=*Caffeine* 3 mg), (P2=*Caffeine* 6 mg), (P3=*Caffeine* 9 mg). Calculation of the number of tissue macrophage cells, neutrophil cells and peripheral blood monocytes was carried out on the 7th day after the *Skin Graft*. Data were analyzed by ANOVA, *Kruskall-Wallis* and *Mann-Whitney Test*.

Result: The comparison of the number of tissue macrophages was found to have a significant difference between the K group and P2 ($p = 0.011$), K with P3 ($p = 0.008$); P1 with P2 ($p = 0.009$); P1 with P3 ($p = 0.006$); and P2 with P3 ($p = 0.008$). Non-significant differences were found between the K group and P1 ($p = 0.343$). In the results of the peripheral blood neutrophils test, the *Kruskal Wallis* test obtained a value of $p = 0.961$, so that no significant differences were found. On the results of the monocyte test, the *One Way ANOVA* test results obtained $p = 0.160$, there was no significant difference in the number of peripheral blood monocytes in the four groups.

Conclusion: There were significant differences in the number of tissue macrophage cells in the use of multilevel doses of *caffeine* in the healing of *autologous skin graft* on *Sprague Dawley rats*.

Keywords : Cellular Inflammation, *Skin Graft*, *Caffeine*

PENDAHULUAN

Dalam berbagai macam modal terapi dalam penyembuhan luka, *skin graft* saat ini menjadi salah satu terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang berkembang pesat dewasa ini. Data yang dihimpun oleh Kementerian Kesehatan pada tahun 2015, menunjukkan bahwa trauma luka bakar berada di urutan ke – 6 untuk cedera yang tidak disengaja dengan total 7,7%.¹ Data di Bali khususnya pasien yang dirawat di unit luka bakar RSUP Sanglah Denpasar pada tahun 2012 sebanyak 103 orang.² Penyebab terbanyak oleh karena api, penyebab lainnya karena listrik, air panas, minyak dan zat kimia. Dari 103 orang yang dirawat, sebanyak 48 orang dilakukan tindakan *skin graft*.³

Sistem imunitas memiliki peran penting dalam penyembuhan luka *skin graft*. Aktivitas makrofag sebagai *chemoattractant* berperan untuk memanggil sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL – 6, IL – 10 untuk menimbulkan kaskade penyembuhan dengan mendorong terstimulasinya VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan memastikan suplai fibroblas dapat mencapai tujuan agar bisa menciptakan kolagen untuk perlekatan donor.⁴ Makrofag dan neutrofil sebagai sel yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh sangat membantu dalam menciptakan suasana penyembuhan luka yang terbebas dari infeksi dimana kondisi ini sangat diperlukan untuk penyembuhan luka.⁵

Dalam beberapa jam, akan terjadi pergerakan sel neutrofil menembus endotel, yang mana dipicu oleh sitokin pro inflamasi seperti IL-1, TNF- α dan IFN- γ yang akan memicu dihasilkannya molekul adhesi yang berperan dalam proses adhesi dan diapedesis leukosit, seperti *Endothelial P and E-Selectins*, ICAM 1 dan 2.⁶ Mediator lain yang ikut berperan adalah IL-8, MCP-1, dan *growth related oncogene- α* .⁷ Produk dari bakteri seperti LPS, juga dapat memperkuat proses pergerakan leukosit.⁸ Peran makrofag cukup unik dalam penyembuhan luka, sebagaimana peran mereka yang paling efektif untuk mengeliminasi neutrofil yang telah berisi debris.⁹ Makrofag memiliki berbagai cara untuk mengawal hilangnya neutrofil dari lokasi luka. Makrofag dapat memfagosit ataupun menginduksi apoptosis pada neutrofil yang dapat membantu menyelesaikan proses inflamasi pada lokasi penyembuhan luka.¹⁰ Makrofag dapat memfagosit ataupun menginduksi apoptosis pada neutrofil yang dapat membantu menyelesaikan proses inflamasi pada lokasi penyembuhan luka. Hal ini menjadi salah satu titik peralihan makrofag dari pro-inflamasi menjadi fenotip pendukung perbaikan jaringan.¹¹ Saat teraktivasi, makrofag proinflamasi memproduksi mediator dan sitokin dalam jumlah besar termasuk diantaranya IL-1, IL-6, IL-12, TNF α dan *inducible nitric oxide synthase*

(iNOS). Makrofag juga memproduksi *chemoattractant* yang akan merekrut leukosit tambahan untuk datang ke lokasi luka.¹²

Aspek nutrisi dan antioksidan mempunyai peran penting dalam penyembuhan luka pada kasus *skin graft*. Salah satu nutrien yang sudah terkenal efektivitasnya seperti *zinc*, *omega 3* telah diketahui mekanismenya dalam penyembuhan luka.¹³ Kopi memiliki kandungan *caffeine* (*1,3,7-trimethylxanthine*) sebagai antioksidan sering disebut – sebut memiliki peran yang penting dalam penyembuhan luka.¹⁴ Penelitian terdahulu mengungkapkan, bahwa *caffeine* memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor A2* dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan angiogenesis.¹⁵ Diungkapkan juga pada penelitian lain ditemukan bahwa *caffeine* dapat menghambat penyembuhan luka dengan mekanisme penghambatan epitelialisasi dan menekan proliferasi sel melalui efek anti inflamasinya dimana saat penyembuhan luka dibutuhkan mediator – mediator inflamasi untuk menstimulasi berbagai *vascular endothelial growth factor*.¹⁶

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan efek *caffeine* dosis bertingkat terhadap jumlah sel inflamasi pada penyembuhan luka *skin graft* autologus tikus *Sprague Dawley*. Tujuan khususnya adalah membuktikan adanya peningkatan jumlah makrofag jaringan, jumlah neutrofil darah tepi serta jumlah monosit darah tepi pada tikus *Sprague Dawley* yang diberi *caffeine* dosis rendah, dosis sedang, dosis tinggi dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan *caffeine*. Hipotesis penelitian ini adalah pemberian diet *caffeine* dapat meningkatkan jumlah sel inflamasi (makrofag jaringan, neutrofil darah tepi, monosit darah tepi) pada penyembuhan luka jaringan *skin graft* autologus tikus *Sprague Dawley*.

METODE

Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan “*Blinded randomized post test only controlled group design*”. Penelitian dilakukan di laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, laboratorium Patologi Anatomi, Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi dan RS Nasional Diponegoro Semarang dengan waktu penelitian April – Juni 2018. Penelitian ini juga telah mendapatkan *Ethical Clearance* dengan No.69/EC/H/DK-RSDK/VI/2018.

Seluruh sampel (Tikus *Sprague Dawley*) dilakukan *Skin Graft* Autologus pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 4 grup (K= Tanpa intake *caffeine*), (P1= *Caffeine* 3 mg), (P2 = *Caffeine* 6 mg), (P3 = *Caffeine* 9 mg). Semua sampel berasal dari LPPT Universitas

Gajah Mada Yogyakarta telah memenuhi kriteria inklusi yaitu berat badan 150 gram setelah aklimatisasi selama 7 hari, tanpa kelainan anatomis, berjenis kelamin jantan, tidak ada penampakan sakit. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis *caffeine*. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah makrofag jaringan, jumlah neutrofil darah tepi dan jumlah monosit darah tepi. Kriteria *drop out* adalah bila tikus ada penampakan sakit, *skin graft* gagal dan tikus mati selama percobaan.

Perhitungan jumlah sel makrofag jaringan, sel neutrofil dan monosit darah tepi dilakukan pada hari ke 7 pasca *Skin Graft*. Data hasil penelitian meliputi : jumlah makrofag jaringan, jumlah neutrofil darah tepi, jumlah monosit darah tepi. Untuk penilaian jumlah neutrofil, monosit pada setiap kelompok perlakuan dilakukan pemeriksaan dengan *Differential Count* dan jumlah makrofag melalui pemeriksaan *Hematoxylin & Eosin*. Sebelum dilakukan analisis dilakukan uji normalitas dengan Saphiro Wilk karena jumlah data kurang dari 50. Data dianalisis dengan metode ANOVA, *Kruskall-Wallis* dan uji post hoc *Mann-Whitney Test*. Perbedaan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $P \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%. Analisis data dilakukan dengan program yang terkomputerisasi.

HASIL

Tabel 1. Analisis Perbedaan Jumlah Makrofag

Kelompok	Median (min – max)	P	Keterangan
K	4 (3 – 5)	0,001	Signifikan
P1	4 (4 – 5)		
P2	7 (5 – 8)		
P3	14 (12 – 14)		

* Diuji dengan *Kruskal Wallis* (signifikan $p < 0,05$)

Tabel 2. Analisis *Post Hoc* Jumlah Makrofag antar kelompok

Kelompok	P1	P2	P3
K	0,343	0,011*	0,008*
P1	–	0,009*	0,006*
P2	–	–	0,008*

*Diuji dengan *Mann Whitney* (signifikan $p < 0,05$)

Neutrofil

Setelah dilakukan uji *Shapiro-Wilk*, didapatkan data tidak normal dan homogen, sehingga dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai

Makrofag

Untuk uji makrofag tidak didapatkan data normal dan homogen, sehingga dilanjutkan uji beda *Kruskal Wallis*. Uji statistik ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah sel makrofag jaringan antar kelompok penelitian. Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai $p = 0,001$ (signifikan $p < 0,05$), terdapat perbedaan bermakna jumlah makrofag jaringan pada keempat kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* dengan *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Jumlah makrofag jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,008$ ($p \leq 0,005$) . Jumlah makrofag jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,011$ ($p \leq 0,05$). Jumlah makrofag jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok dosis rendah $p = 0,009$ ($p \leq 0,005$). Jumlah makrofag jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok dosis sedang $p = 0,008$ ($p \leq 0,05$). Jumlah makrofag jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok dosis rendah $p = 0,006$ ($p \leq 0,05$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok K dengan P1 ($p = 0,343$).

$p=0,961$ (signifikan $p < 0,05$) maka dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah neutrofil darah tepi pada keempat kelompok.

Tabel 3. Analisis Perbedaan Jumlah Neutrofil

Kelompok	Median (min – max)	P	Keterangan
K	12 (7 – 21)	0,961	Tidak signifikan
P1	12 (4 – 28)		
P2	14 (0 – 34)		
P3	11 (3 – 12)		

* Diuji dengan *Kruskal Wallis* (signifikan $p < 0,05$)

Monosit

Setelah dilakukan uji *Shapiro-Wilk*, didapatkan data normal dan homogen, sehingga dilanjutkan uji beda *One Way ANOVA*. Hasil uji

One Way ANOVA didapatkan nilai $p = 0,160$ (signifikan $p < 0,05$) maka dapat disimpulkan tidak ada perbedaan bermakna jumlah monosit darah tepi pada keempat kelompok.

Tabel 4. Analisis Perbedaan Jumlah Monosit

Kelompok	Mean \pm SD	P	Keterangan
K	2,80 \pm 1,79	0,160	Tidak signifikan
P1	4,80 \pm 1,92		
P2	3,40 \pm 2,51		
P3	2,00 \pm 1,00		

* Diuji dengan *One Way ANOVA* (signifikan $p < 0,05$)

DISKUSI**Makrofag Jaringan**

Hasil penelitian menunjukkan jumlah makrofag jaringan ditemukan rerata lebih tinggi pada kelompok pemberian *caffeine* dosis tinggi dibandingkan dosis sedang maupun dosis rendah terutama dengan grup kontrol dimana tidak diberikan asupan *caffeine*. Analisis perbedaan jumlah makrofag dilakukan menggunakan uji *Kruskal Wallis* didapatkan hasil terdapat perbedaan bermakna antar kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis *Post Hoc* menggunakan *Mann Whitney* dengan hasil terdapat perbedaan signifikan.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang mengungkapkan bahwa *caffeine* memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor(A2)* dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan jumlah makrofag serta menghasilkan peningkatan regulasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) secara sinergis.¹⁶ Penelitian lain menuturkan bahwa terdapat kaitan erat dengan efek peningkatan makrofag dengan penambahan diet *caffeine* dalam proses percepatan penyembuhan luka.¹⁷ Selama proses penyembuhan luka *skin graft* sistem imunitas memiliki peran penting. Aktivitas makrofag sebagai *chemoattractan* berperan untuk memanggil sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-10 untuk menimbulkan kaskade penyembuhan dengan mendorong terstimulasinya VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan memastikan suplai fibroblas dapat mencapai tujuan agar bisa menciptakan kolagen untuk perlekatan donor. Makrofag dan neutrofil serta monosit sebagai sel yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh sangat membantu dalam menciptakan suasana penyembuhan luka yang terbebas dari infeksi dimana kondisi ini sangat diperlukan untuk penyembuhan luka.¹⁸ Salah satu fungsi penting makrofag adalah kemampuannya untuk mempromosi angiogenesis melalui inisiasi produksi VEGF. VEGF adalah faktor pro – angiogenik yang potensial dimana beberapa studi menunjukkan VEGF memiliki kontribusi 50% dalam aktivitas

angiogenesis pada luka. Interpretasi lain dari penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa makrofag memiliki efek secara direk ataupun indirek. Sebagai contoh makrofag menginisiasi produksi PDGF dimana berperan sebagai perekrut sel progenitor dan sel peradangan.¹⁹

Proses fisiologi manusia dalam hal ini khususnya penyembuhan luka merupakan salah satu yang paling kompleks. Mekanisme ini melibatkan serangkaian reaksi serta interaksi antara sel dengan mediator dimana dibagi dalam beberapa fase. Setidaknya terdapat 3 prasyarat kondisi lokal agar proses penyembuhan luka dapat berlangsung dengan normal, yaitu: 1) semua jaringan area luka dan sekitarnya harus vital, 2) tidak terdapat benda asing, 3) tidak disertai kontaminasi eksekif atau infeksi.²⁰ Terkait proses penyembuhan luka terutama kasus *skin graft*, aspek nutrisi dan antioksidan mempunyai peran penting.²⁰ Salah satu nutrien yang sudah terkenal efektivitasnya seperti *zinc*, *omega 3* telah diketahui mekanismenya dalam penyembuhan luka. Nutrien lain yaitu dalam tumbuhan kopi, memiliki kandungan *caffeine* (*1,3,7-trimethylxanthine*) sebagai antioksidan sering menjadi perbincangan memiliki peran yang penting dalam penyembuhan luka.²¹

Caffeine adalah sebuah *methylxanthine* dan anggota dari grup Alkaloid yang menjadi komponen utama pada kopi dan berbagai jenis makanan lain seperti teh dan coklat. *Caffeine* memiliki potensi untuk mempercepat *wound healing* melalui berbagai mekanisme. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *caffeine* dapat berperan sebagai antioksidan di dalam tubuh. Saat terjadi cedera jaringan, sel – sel yang rusak akan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) pada fase awal penyembuhan luka dimana antioksidan dibutuhkan untuk menghalau radikal bebas dan mempercepat penutupan luka.²²

Menggunakan mediator hewan percobaan dan manusia, bubuk kopi yang ditaburkan pada luka telah terbukti mempercepat dan mendukung *wound healing* melalui efek antibakterial dan antioksidan. Hasil menunjukkan bahwa bubuk kopi dapat digunakan untuk menutup penyembuhan luka

pada jenis luka tajam maupun luka bakar.²³ Penelitian secara *in vitro* yaitu pada sel keratinosit dan sel epidermal manusia, bahwa *caffeine* dapat menghambat proliferasi sel serta migrasi sel pada dosis tertentu.²⁴ Hal ini memperlihatkan dua fungsi *caffeine* pada proses penyembuhan luka. *Caffeine* dapat berperan sebagai *nonselective blocker* dan semua jenis reseptor adenosine. Sebuah studi memperlihatkan hasil dengan penggunaan *caffeine* pada hewan tikus percobaan selama 1 minggu, menunjukkan peningkatan yang signifikan pada jumlah angka reseptor adenosine pada membran kortikal serebri hewan coba.²⁵ Hasil penelitian lain yaitu pada studi *in vivo* menunjukkan bahwa *caffeine* menghambat *cAMP phosphodiesterase* dan menekan proses imunitas dengan meningkatkan kadar *cAMP* pada sel imunitas, yang akan menghasilkan perbaikan cedera jaringan selama proses inflamasi.²⁵ Telah ditelaah juga pada penelitian lain bahwa penggunaan *caffeine* secara kronik dapat meningkatkan regulasi reseptor adenosine A_{2A} yang akan meningkatkan peran anti inflamasi adenosine pada cedera jaringan. Aktivasi reseptor adenosine A_{2B} akan memicu peningkatan kadar *cAMP* dimana dapat terjadi penurunan inflamasi akut yang akan mencegah kerusakan jaringan tahap lanjut dan memperbaiki kerusakan jaringan. Secara menyeluruh, penggunaan *caffeine* akan meningkatkan regulasi reseptor adenosine A_{2B} dimana akan meningkatkan peran reseptor anti inflamasi saat teraktivasi melalui adenosine ekstraselular.²⁶

Neutrofil Darah Tepi

Jumlah neutrofil darah didapatkan rerata lebih tinggi pada kelompok pemberian *caffeine* dosis sedang dibandingkan kelompok pemberian *caffeine* dosis rendah, namun terjadi penurunan jumlah neutrofil pada kelompok pemberian *caffeine* dosis tinggi. Hasil analisis perbedaan antar kelompok jumlah neutrofil dilakukan menggunakan uji *Kruskal Wallis* tidak didapatkan perbedaan signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa *caffeine* mempunyai efek memodulasi jumlah sel inflamasi.²⁷ Peningkatan dalam hal ini adalah jumlah neutrofil semakin meningkat pada kelompok pemberian *caffeine* dosis rendah sampai dosis sedang, namun terjadi penurunan jumlah neutrofil pada kelompok dosis tinggi. Temuan ini sesuai dengan penelitian yang melaporkan bahwa diet *caffeine* pada model tikus percobaan dapat menurunkan angka sitokin proinflamasi.²⁷

Seperti telah dijelaskan sebelumnya bahwa *caffeine* dan adenosine saling terkait dalam proses penyembuhan luka melalui sistem imunitas. Sitokin proinflamasi terdiri dari IL-1, IL-6 dan TNF- α , dimana mereka adalah elemen utama yang terlibat dalam tahapan inflamasi pada proses penyembuhan luka. IL-1 dihasilkan secepatnya

pada saat terjadi kerusakan jaringan oleh makrofag dan neutrofil sementara TNF- α menstimulasi produksi fibroblas serta pelepasan FGF. Pelepasan IL-6 dan TNF- α dari neutrofil yang teraktivasi serta makrofag yang menginfiltrasi lokasi kerusakan pada jaringan adalah proses yang sangat esensial untuk memulai proses penyembuhan luka dan meningkatkan reepitelialisasi.²⁸ IL-6 tetap ada selama tahapan inflamasi pada *wound healing*, ia menstimulasi aktivitas proliferasi dan mitogenik pada sel keratin serta menarik neutrofil untuk datang ke lokasi kerusakan jaringan. TNF- α secara tidak langsung meningkatkan reepitelialisasi melalui stimulasi produksi VEGF.²⁹ Penelitian terdahulu mengungkapkan, bahwa *caffeine* memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor A2* dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan angiogenesis. Diungkapkan juga pada penelitian lain ditemukan bahwa *caffeine* dapat menghambat penyembuhan luka dengan mekanisme penghambatan epitelialisasi dan menekan proliferasi sel melalui efek anti inflamasinya dimana saat penyembuhan luka dibutuhkan mediator – mediator inflamasi untuk menstimulasi berbagai *vascular endothelial growth factor*.³⁰

Monosit Darah Tepi

Hasil penelitian jumlah monosit ditemukan rerata lebih tinggi pada kelompok pemberian *caffeine* dosis rendah dibandingkan berturut – turut pada kelompok pemberian *caffeine* dosis sedang dan dosis tinggi. Analisis perbedaan jumlah monosit antar kelompok menggunakan uji *One Way ANOVA*, namun tidak didapatkan perbedaan bermakna. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyebutkan bahwa *caffeine* dapat memiliki peran pada penyembuhan luka melalui proses sinyal inflamasi dan imunitas.³¹ Hasil penelitian lain mengungkapkan *caffeine* sebagai derivat *xanthine* memiliki efek menghambat proliferasi sel dalam penyembuhan luka pada sisi bersamaan melalui peningkatan dan penurunan jumlah sel inflamasi dalam sinergitas tertentu.³²

Hasil penelitian variabel jumlah monosit menunjukkan terdapat peningkatan jumlah monosit pada dosis rendah, namun seiring dengan penambahan dosis terjadi penurunan jumlah monosit. Hal yang menarik bahwa jumlah monosit pada kelompok dosis tinggi menunjukkan hasil yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sesuai dengan penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa *Caffeine* memiliki efek menghambat proliferasi sel melalui fase G0/G1 pada sel percobaan JB6.³³ Monosit akan mengalami aktivasi dan berdiferensiasi menjadi makrofag jaringan yang matur setelah meninggalkan pembuluh darah, diikuti oleh perubahan ekspresi gen, dipengaruhi oleh berbagai

mediator yang ditemukan pada lingkungan mikro di sekitar luka yang menyebabkan sel makrofag mengalami perubahan sifat sesuai dengan kebutuhan di lokasi luka. Makrofag berperan sebagai sel penyaji antigen dan fagosit selama proses penyembuhan luka, juga diduga memiliki peran dalam proses penyembuhan melalui sintesis berbagai macam faktor pertumbuhan yang paling penting seperti TGF- α , TGF- β , bFGF, PDGF dan VEGF yang akan meningkatkan proliferasi sel dan sintesis matriks ekstraseluler oleh sel kulit.³⁴ Berbagai hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa *caffeine* memiliki efek poten pada proses penyembuhan luka dengan cara memodulasi dan meregulasi sel – sel inflamasi dalam dosis bertingkat. Penggunaannya bersifat suplementatif bagi terapi primer, sebagai sumber alternatif pengobatan dengan bahan alami.

SIMPULAN

Berbagai pembahasan diatas dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna jumlah sel makrofag jaringan pada penggunaan *caffeine* dosis bertingkat proses penyembuhan luka *skin graft autologus* tikus *Sprague Dawley*. Peneliti juga menyadari masih banyak keterbatasan penelitian yang harus diperbaiki untuk melengkapi dan menyempurnakan penelitian ini. Salah satu keterbatasan penelitian ini karena diuji hanya pada beberapa mediator inflamasi. Akan lebih baik penelitian mendatang dapat dilakukan pada beberapa mediator inflamasi lain seperti IL – 6, IL – 10, TNF- α .

Penelitian ini hanya melakukan analisa dan pemeriksaan pada hari ke 7 pasca *skin graft* dikarenakan keterbatasan biaya, akan lebih baik bila pemeriksaan jumlah sel inflamasi dievaluasi pada 2 – 3 hari pasca *skin graft* dan hari ke 14 pasca *skin graft* sehingga dapat memonitor pergerakan atau penurunan jumlah sel inflamasi sesuai dengan tahapan penyembuhan luka.

Selain itu penelitian ini dilakukan pada media hewan coba tikus, tidak menutup kemungkinan mungkin media penelitian dapat ditingkatkan menjadi uji klinis melalui manusia. Hasil penelitian ini pemberian *caffeine* dapat menimbulkan efek *immunomodulator* pada proses penyembuhan luka *skin graft autologus*, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan uji klinik terhadap manusia. Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian ini diperlukan penelitian lanjutan terhadap faktor – faktor imunitas lain yang berperan dalam proses penyembuhan luka khususnya *skin graft autologus* seperti IL – 6, IL – 10, TNF – α .

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar

- Indonesia (Riskesmas) 2013 Bidang Cedera. In: Indonesia DK, editor. Jakarta: Badan Litbangkes Departemen Kesehatan RI; 2015.
2. Riyadina W. Pola dan Determinan Cedera di Indonesia. In: Indonesia DKR, editor. Jakarta: Laporan hasil analisis lanjut Riskesmas, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi; 2013.
3. Wardhana A, Basuki A. The epidemiology of burn in Indonesia's national referral burn center from 2013 to 2015. *Burns*. 2017;142(1): 67-73.
4. Syamsuhidayat R, Theddeus P, Jong WD, Riwanto I, Rudiman R. Buku ajar ilmu bedah. Jakarta.2017.EGC: 97 - 114 p.
5. Mann MW, Berk D, Popkin DL, Bayliss SJ. Handbook of dermatology a practical manual. England: Oxford Blackwell Publishing; 2009.
6. Shrycock JC, Belardinelli L. Adenosine and a adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *Am J of Cardiol*. 2007;79:2 - 10.
7. Valls MD, Cronstein B, Montesinos MC. Adenosine receptors agonist for promotion of dermal wound healing. *Biochemistry Pharmacology*. 2009;77:1117 - 24.
8. Motegi T, Katayama M, Uzuka Y, Okamura Y. Evaluation of anticancer effects and enhanced doxorubicin cytotoxicity of xanthine derivatives using canine hemangiosarcoma cell lines. *Res Vet Science*. 2013;95:600 - 5.
9. Cronstein BN. Adenosine receptors and fibrosis: A translational review. *Biol Rep*. 2011;3(21):1 - 12
10. Einfield GP, Leibovich SJ. Macrophage heterogeneity and wound healing. New Jersey: Mary Ann Liebert Inc; 2011.
11. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23.
12. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol*. 2011;178(1):19-25.
13. Bonyanian ZMR, Roselyn B. Caffeine and it's potential role in attenuating impaired wound healing. *Journal of Caffeine Research*. 2016;5(4):141 - 8.
14. Li J, Li G, Hu JL, Fu XH, Zeng YJ, Zhou YG, Xiong G. Chronic or high dose acute caffeine treatment protects mice against oleic acid-induced acute lung injury via an adenosine A2A receptor-independent mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2011;654(3):295 - 303.

15. Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells; role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res.* 2012;90:531 - 8.
16. Leibovich SJ, Chen J, Einfeld P, Elson G, Rosania A. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A2A receptor agonist and endotoxin. *Am J of Pathol.* 2002;160:2231 - 44.
17. Ojeh N, Stojadinovic O, Pastar I, Sawaya A. The effects of caffeine on wound healing. *Inter Wound J.* 2014;3(5):605 - 13.
18. Diaz MM, Salin PR. Purine molecule as hypnogenic factors role of adenosine, ATP and caffeine. *Central Nervous System Agents Medical Chemistry.* 2010;10:259 - 68.
19. Silverberg J, Patel M, Brody N, Jagdeo J. Caffeine protects human skin fibroblast from acute reactive oxygen species – induced necrosis. *Journal Drugs Dermatology.* 2012;11:1342 - 6
20. Prasetyono T. General concept of wound healing. *Med J of Indonesia.* 2009;18:208 - 16.
21. Maria C, Renato D, Luciano O. Influence of immunonutritional supplementation on skin wound healing in rats. *Bras Cir Plast.* 2014;29(3):432 – 8
22. Barcelos RP, Souza M, Amaral GP, Stefanello ST. Caffeine intake may modulate inflammation markers in trained rats. *Nutrients.* 2014;6:1678 - 90.
23. Yuwono HS. The new paradigm of wound management using coffee powder. *J Surg.* 2014;2:25 - 9.
24. Li J, Li G, Hu JL, Fu XH, Zeng YJ, Zhou YG, Xiong G. Chronic or high dose acute caffeine treatment protects mice against oleic acid-induced acute lung injury via an adenosine A2A receptor-independent mechanism. *Eur J Pharmacol.* 2011;654(3):295 - 303.
25. Sarobo C, Lacorte LM, Martins M, Rinaldi JC, Moroz A, Scarano WR, et al. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(6):429-37.
26. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-83.
27. Da-Rocha LF, Macedo SJ, Luiz CM, Santos ARS. Pharmacology of adenosine receptors and their signalling role in immunity and inflammation. *Pharm and Therapeutic J.* 2014;3:1620 - 2.
28. Grande D. Skin grafting. *Am J of Pathol.* 2006;4(11):3321 - 6.
29. Laplante AF, Germain L, Auger FA, Moulin V. Mechanisms of wound reepithelization: hints from a tissue engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J.* 2011;15:2377 - 89.
30. Barbul A, Oliver C. Immunonutrition: role in wound healing and tissue regeneration. *Adv in Wound Care J.* 2014;3(1):46 - 53.
31. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regeneration.* 2008;16:585 - 601
32. Su SH, Shu HW, Chen KM, Yeh H, Su SJ. Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose – derived stem cells and bone marrow stromal cells. *Journal of Toxicology In Vitro.* 2013;27:1830 - 7
33. Hashimoto T, Schmidt P, Yang CS, Dong Z. Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res.* 2004;64:344 - 9.
34. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, Robbins, Cotran. *Pathologic basic of disease.* Philadelphia USA: Elsevier Health Sciences; 2009. 185 - 210 p.