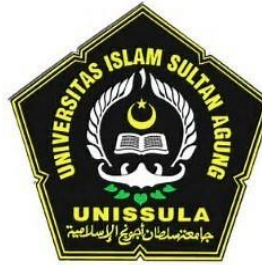


**PENGARUH KRIM EKSTRAK DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP KADAR TGF- $\beta$  DAN KADAR IL-6 PADA KULIT TIKUS WISTAR PASCA LUKA EKSISI**

**Tesis**

**Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2**



**Indah Roswita Sari**

**MBK.23.21.010353**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG 2024**

TESIS

**PENGARUH KRIM EKSTRAK DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP KADAR TGF- $\beta$  DAN KADAR IL-6 PADA KULIT TIKUS WISTAR PASCA LUKA EKSISI**


disusun oleh  
Indah Roswita Sari  
MBK.23.21.010353

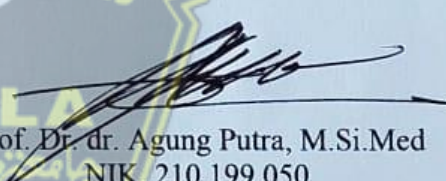
Telah dipertahankan didepan Tim Penguji  
06 Juni 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui.

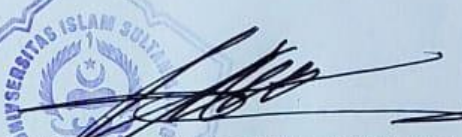
Pembimbing 1

Pembimbing 2

  
Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes  
NIK. 220.198.045

  
Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med  
NIK. 210.199.050

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

  
Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med  
NIK. 210.199.050

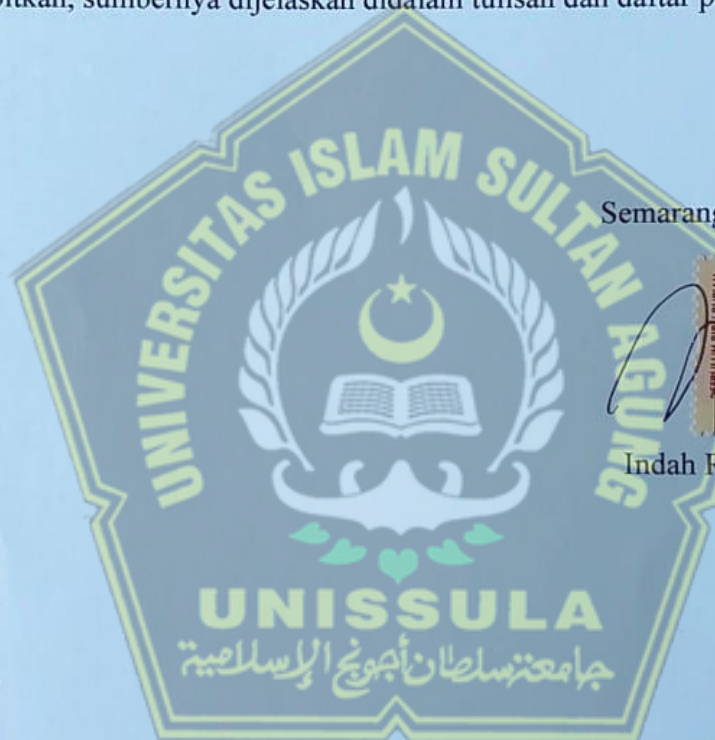
## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu perguruan tinggi dan lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 7 Juni 2024



Indah Roswita Sari



## KATA PENGANTAR

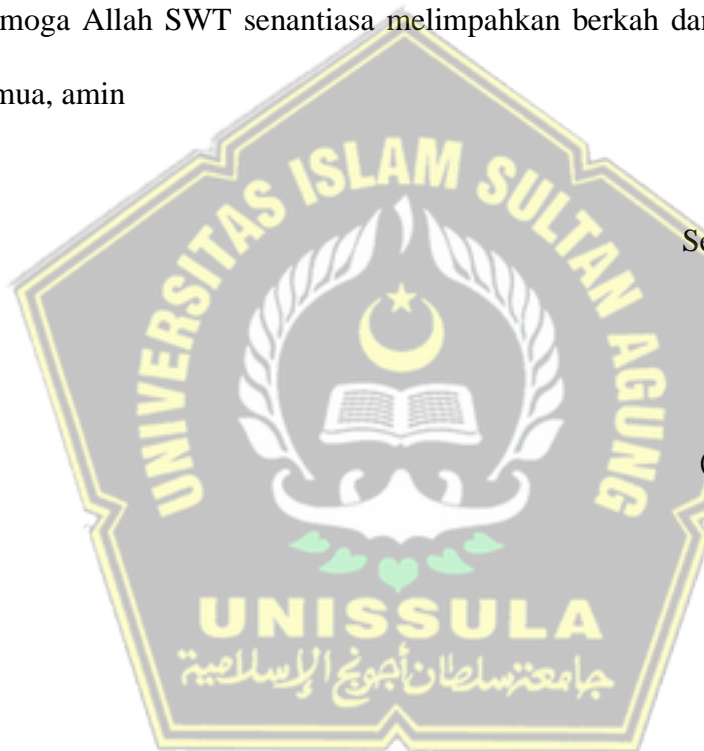
Puji syukur keadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan hasil tesis dengan judul “PENGARUH KRIM EKSTRAK DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP KADAR TGF- $\beta$  DAN KADAR IL-6 PADA KULIT TIKUS WISTAR PASCA LUKA EKSISI”

Pada penyusunan proposal tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan sekaligus sebagai pembimbing II dalam penelitian yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan hasil tesis ini
4. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Pada dosen pengajar dan staf Prody Magister Ilmu Biomedik yang banyak membantu dan memberikan saran kepada penyusun.

6. Keluarga yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga proposal tesis ini dapat terselesaikan.

Manusia tidak luput dari kesalahan karena tidak ada manusia yang sempurna, untuk itu penyusun berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan proposal tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Prody Magister Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin



Semarang, Mei 2024

(Indah Roswita Sari)

## DAFTAR ISI

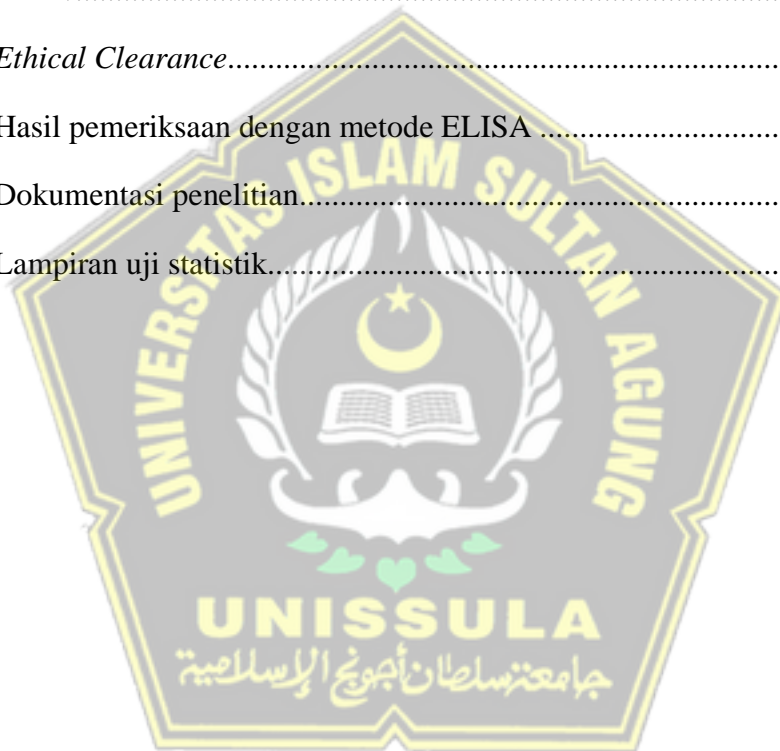
TESIS .....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
RIWAYAT HIDUP.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
ABSTRAK .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Originalitas Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Transforming Growth Factor Beta</i> (TGF-β).....	7
2.2.1 Pengertian .....	7
2.2.2 Aktivitasi jalur TGF-β .....	8
2.2.3 Peran TGF-β .....	10

2.2 <i>Interleukin-6</i> (IL-6) .....	11
2.2.1 Pengertian .....	11
2.2.1 Mekanisme aktivasi IL-6 .....	12
2.1.2 Peran IL-6 .....	13
2.3 Luka.....	14
2.3.1 Pengertian Luka .....	14
2.3.2 Luka Eksisi .....	15
2.3.3 Fase penyembuhan luka.....	16
2.3.4 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka.....	21
2.4 Delima ( <i>Punica granatum</i> ).....	22
2.4.1 Kandungan Buah Delima.....	24
2.5 Pengaruh pemberian ekstrak buah delima terhadap kadar TGF- $\beta$ dan IL-6 pada luka eksisi.....	25
<b>BAB III Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis.....</b>	<b>28</b>
3.1 Kerangka teori .....	28
3.2 Kerangka konsep.....	31
3.3 Hipotesis Penelitian.....	31
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	32
4.1.1 Jenis Penelitian dan rancangan penelitian .....	32
4.1.2 Populasi dan Sampel Penelitian .....	33
4.2 Besar Sampel Penelitian.....	34
4.3 Teknik Sampling Penelitian .....	35
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	36
4.4.1 Variabel Penelitian.....	36

4.5 Definisi Operasional.....	36
4.6 Bahan atau Materi Penelitian.....	37
4.6.1 Bahan Penelitian .....	37
4.6.2 Instrumen Penelitian .....	38
4.7 Cara Penelitian dan Alur kerja .....	38
4.7.1 Perolehan <i>Ethical Clearance</i> .....	38
4.7.2 Cara Pembuatan Ekstrak Buah Delima.....	38
4.7.3 Persiapan Hewan Uji .....	39
4.7.4 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Buah Delima .....	40
4.7.5 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit.....	40
4.7.6 Pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ dan IL-6 menggunakan Metode ELISA ....	41
4.7 Alur Penelitian.....	44
4.8 Metode Analisis Data .....	45
4.9 Tempat dan Waktu Penelitian .....	45
4.9.1 Tempat Penelitian .....	45
4.9.2 Waktu Penelitian .....	45
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>46</b>
5.1 Hasil Penelitian.....	46
5.1.1 Gambaran makroskopis luka eksisi pada tiap kelompok perlakuan .....	47
5.1.2 Hasil pemeriksaan kadar IL-6 jaringan kulit setelah hari ke 3 perlakuan .....	48
5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar IL-6 jaringan kulit setelah hari ke 7 perlakuan .....	51
5.1.4 Hasil pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ jaringan kulit setelah hari ke 3 perlakuan.....	54
5.1.5 Hasil pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ jaringan kulit setelah hari ke 7	



perlakuan.....	56
5.2 Pembahasan.....	58
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	62
6.1. Kesimpulan.....	62
6.2. Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA .....	63
LAMPIRAN.....	68
1. <i>Ethical Clearance</i> .....	68
2. Hasil pemeriksaan dengan metode ELISA .....	69
3. Dokumentasi penelitian.....	73
4. Lampiran uji statistik.....	75



## DAFTAR SINGKATAN

AKT/PI3K	: <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
CRP	: <i>C-reaktive protein</i>
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
EMT	: <i>Epitelial-mesenkimal transisi</i>
GAG	: <i>Glikosaminoglikan</i>
IL-6	: <i>Interleukin -6</i>
MAPK	: <i>Mitogen activation protein kinase</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinases</i>
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear factor-kappaB</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
ROS	: <i>Spesies oksigen reaktif</i>
SAA	: <i>Surface area analyzer</i>
SPE	: <i>Standardized pomegranate extract</i>
TGF- $\beta$	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TLRs	: <i>Toll like receptor</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur Sinyal TGF- $\beta$ .....	9
Gambar 2. 2 Buah delima.....	23
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	30
Gambar 3.2 Kerangka Konsep .....	31
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian .....	32
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	44
Gambar 5.1 Makroskopis kondisi perlakuan luka eksisi pada setiap kelompok hari pertama.....	47
Gambar 5. 2 Makroskopis kondisi perlakuan luka eksisi pada setiap kelompok hari ketujuh.....	48
Gambar 5.3 Grafik rerata kadar IL-6 antar kelompok .....	49
Gambar 5.4 Grafik rerata kadar IL-6 antar kelompok hari ke 7 setelah perlakuan.....	52
Gambar 5.5 Grafik rerata kadar TGF- $\beta$ antar kelompok setelah hari ke 3 perlakuan .....	55
Gambar 5. 6 Grafik rerata kadar TGF- $\beta$ antar kelompok perlakuan setelah hari ke 7.....	57

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 5.1 Hasil uji deskriptif rerata kadar IL-6 dan uji <i>One way anova</i> .....	49
Tabel 5.2 Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> kadar IL-6 jaringan.....	50
Tabel 5.3 Hasil uji deskriptif rerata kadar IL-6 dan uji <i>One way anova</i> .....	51
Tabel 5.4 Hasil uji <i>Post hoc LSD</i> kadar IL-6 jaringan.....	53
Tabel 5.5 Hasil uji deskriptif rerata kadar TGF- $\beta$ dan uji <i>one way anova</i> .....	54



## ABSTRAK

**Latar Belakang:** Luka merupakan proses multifase yang melibatkan respons kompleks terhadap cedera pada kulit. Perubahan pada salah satu fase ini dapat menghambat penyembuhan luka. Ekstrak kulit buah delima digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka. Memanfaatkan aplikasi topikal menggunakan bahan alami menjadi pilihan karena efek sampingnya sangat sedikit dan ketersediaannya mudah, dibandingkan dengan bahan sintetis. **Tujuan:** untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak delima (*Punica granatum*) terhadap kadar TGF- $\beta$  dan kadar IL-6 pada kulit tikus wistar pasca luka eksisi. **Metode:** experimental *in-vivo* dengan jumlah sampel 48 ekor tikus *Wistar*, dibagi menjadi 12 kelompok. Analisis dilakukan menjadi 2 tahap yaitu 6 kelompok setelah hari ke 3 perlakuan dan 6 kelompok berikutnya dilakukan setelah hari ke 7 perlakuan. Metode analisis menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). **Hasil:** terdapat pengaruh penurunan rerata kadar IL-6 di hari ke 3 setelah perlakuan dan hari ke 7 setelah perlakuan dengan uji *One Way Anova* 0,000 ( $p < 0,05$ ), pemberian krim ekstrak buah delima dosis 20% memberikan pengaruh paling efektif terhadap rerata kadar IL-6 dihari ke 7 setelah perlakuan menyamai *bioplacenton*. Peningkatan rerata kadar TGF- $\beta$  dengan pemberian krim ekstrak buah delima berpengaruh signifikan dengan uji *One way anova* 0,000 ( $< 0,05$ ) pada hari ke 3 setelah perlakuan dan pada hari ke 7 setelah perlakuan. **Kesimpulan:** krim ekstrak buah delima berpengaruh menurunkan kadar IL-6 dan meningkatkan kadar TGF- $\beta$  pada luka eksisi. Perlakuan setelah hari ke 7 dengan dosis krim ekstrak buah delima 20% menyamai perlakuan menggunakan *bioplacenton*

**Kata Kunci:** Krim buah delima, Luka eksisi, Kadar IL-6, Kadar TGF- $\beta$

## ABSTRACT

**Background:** Wound healing is a multifaceted process involving a complex response to skin injury. Disruptions in any phase of this process can impede wound healing. Pomegranate peel extract is used to expedite wound healing. Utilizing topical applications of natural ingredients is preferred due to their minimal side effects and easy availability compared to synthetic materials. **Objective:** This study aims to investigate the effect of pomegranate extract cream (*Punica granatum*) on TGF- $\beta$  and IL-6 levels in the skin of Wistar rats after excision wounds. **Method:** An in-vivo experimental study was conducted with 48 Wistar rats, divided into 12 groups. The analysis was performed in two stages: 6 groups were analyzed after 3 days of treatment, and the remaining 6 groups were analyzed after 7 days of treatment. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used for the analysis. **Results:** There was a significant reduction in mean IL-6 levels on both day 3 and day 7 after treatment, as indicated by the One-Way ANOVA test ( $p=0.000$ ,  $p<0.05$ ). A 20% dose of pomegranate extract cream had the most effective impact on reducing mean IL-6 levels on day 7, comparable to bioplacenton. The mean TGF- $\beta$  levels significantly increased with the application of pomegranate extract cream, as shown by the One-Way ANOVA test ( $p=0.000$ ,  $p<0.05$ ) on both day 3 and day 7 after treatment. **Conclusion:** Pomegranate extract cream effectively reduces IL-6 levels and increases TGF- $\beta$  levels in excision wounds. Treatment on day 7 with a 20% dose of pomegranate extract cream was comparable to treatment with bioplacenton.

**Keywords:** Pomegranate cream, Excision wounds, IL-6 levels, TGF- $\beta$  levels

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Luka merupakan proses multifase yang melibatkan respons kompleks terhadap cedera pada kulit. Perubahan pada salah satu fase ini dapat menghambat penyembuhan luka. Identifikasi dan optimalisasi faktor risiko dapat dimodifikasi dalam manajemen luka.<sup>1</sup> Penyembuhan luka mencakup berbagai reaksi seluler dan biokimia termasuk peradangan, neovaskularisasi dan deposisi kolagen.<sup>2</sup> Pensinyalan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) memiliki peran utama dalam fungsi keratinosit, regulasi re-epitelisasi luka, dan jalur TGF- $\beta$  dalam penyembuhan dan epitelisasi luka akut. Telah dibuktikan bahwa TGF- $\beta$  sangat penting untuk homeostasis epidermal serta untuk setiap tahap penyembuhan luka.<sup>3</sup> Respon inflamasi yang dimediasi *Nuclear factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B) menyebabkan peradangan kulit, melepaskan sitokin proinflamasi seperti *Interleukin -6* (IL-6).<sup>4,5</sup> Dalam proses penyembuhan luka, sitokin IL-6 sangatlah penting.<sup>6</sup> Berkurangnya peradangan dikaitkan dengan tingkat penyembuhan luka yang lebih cepat.<sup>7</sup> Ekstrak kulit buah delima digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka.<sup>8</sup> Dengan memanfaatkan aplikasi topikal menggunakan bahan alami menjadi pilihan karena efek sampingnya sangat sedikit dan ketersediaannya mudah, dibandingkan dengan bahan sintetis.<sup>9</sup> Namun masih sedikit yang melaporkan hasil pengamatan menggunakan parameter molekuler terhadap penyembuhan luka.<sup>8</sup>

Lebih dari 90 persen masyarakat di negara maju percaya bahwa tanaman obat dapat diandalkan.<sup>10,11</sup> Sebanyak 32% Kulit buah digunakan dalam produksi obat,

diikuti biji (22%) dan bunga (20%), tanaman utuh (9%), pucuk (7%), kulit akar (6%), kulit biji dan akar (6%), dan seluruh tanaman (9%).<sup>8</sup> Pengetahuan tentang jamu farmasi menambah cakrawala baru dalam dunia kedokteran. Obat-obatan herbal lebih hemat biaya dan lebih aman dibandingkan dengan obat sintetik.<sup>8</sup> Buah delima telah digunakan dalam pengobatan tradisional untuk menyembuhkan banyak penyakit.<sup>8,12</sup> Buah delima digunakan untuk mengobati penyakit akibat parasit, biji dan kulit buah untuk mengobati diare, bunga delima untuk mengatasi diabetes, kulit kayu, dan akar untuk menghentikan pendarahan dan menyembuhkan luka. Demikian pula, daunnya digunakan untuk mengendalikan peradangan dan pengobatan gangguan pencernaan.<sup>13</sup>

Beberapa penelitian telah membuktikan *P granatum* meningkatkan proses perbaikan luka. Nayak dkk menilai proses perbaikan luka kulit buah delima penurunan luas luka sebesar 95% dilaporkan pada hewan yang diobati dengan ekstrak dibandingkan dengan 84% pada kelompok kontrol.<sup>11</sup> Dalam sebuah penelitian menggunakan salep ekstrak metanol *P granatum* pada 10% dan 15% b/b untuk mengetahui efek penyembuhan luka pada model luka sayatan tikus. Hasilnya sama seperti salep *nitrofurazone*. Aktivitas kontraksi luka 10% dan 15% Salep *P. granatum* masing-masing sebesar 97,8% dan 98,4%, ekstrak metanol buah delima terbukti berpotensi sebagai agen penyembuhan luka.<sup>8</sup>

IL-6 memainkan peran sentral dalam peradangan akut dan diperlukan untuk penyembuhan luka dengan cepat. Dilepaskan lebih awal sebagai respons terhadap cedera, IL-6 menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag, keratinosit, sel endotel, dan sel stroma yang tinggal di jaringan. IL-6 juga ditemukan



menginduksi kemotaksis leukosit pada luka. Ketika peradangan berkembang, sinyal IL-6 bertanggung jawab untuk beralih ke lingkungan reparatif. Regulasi penyembuhan luka sangat penting, sinyal proinflamasi yang tidak tepat dapat menyebabkan luka membutuhkan waktu lebih lama untuk sembuh dan berisiko terkena infeksi.<sup>14</sup> Beberapa faktor pertumbuhan terlibat dalam penyembuhan luka, salah satunya adalah TGF- $\beta$ , memberikan efek pleiotropik pada penyembuhan luka dengan mengatur proliferasi sel, diferensiasi, matriks ekstraseluler dan memodulasi respon imun.<sup>15</sup>

*Pomegranate rind extract* (PRE) mempunyai efek anti-inflamasi yang signifikan pada kulit *ex vivo*, memastikan bahwa PRE meregulasi COX-2 pada epidermis yang aktif.<sup>12</sup> Penelitian menggunakan *pomegranate standardized extract* (PSE) dengan asam ellagic 40% diolah menjadi salep. SPE 10% mempercepat penyembuhan luka bakar derajat dua dalam luka. buah delima yang distandarisasi dengan asam ellagic 40% merupakan ramuan yang menjanjikan untuk penyembuhan luka pada kulit.<sup>10</sup> Buah delima mempunyai potensi sebagai pendekatan baru dalam memperbaiki penyakit peradangan dan nyeri yang berhubungan dengan berbagai kondisi kulit.<sup>12</sup> Namun pengaruh pemberian krim ekstrak yang diambil dari buah delima (*Punica Granatum*) terhadap ekspresi TGF- $\beta$  dan IL-6 pada kulit tikus wistar pasca luka eksisi masih harus dijelaskan secara mendalam.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak delima (*Punica granatum*) terhadap kadar TGF- $\beta$  dan IL-6 pada kulit tikus *Wistar* pasca luka eksisi?.

### 1.3 Tujuan penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak delima (*Punica granatum*) terhadap kadar TGF- $\beta$  dan kadar IL-6 pada kulit tikus wistar pasca luka eksisi.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak delima (*Punica granatum*) terhadap kadar TGF- $\beta$  pada kulit tikus Wistar pasca luka eksisi antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak kulit delima (*Punica granatum*) terhadap kadar IL-6 pada kulit tikus Wistar pasca luka eksisi antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol

### 1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

	<b>Peneliti</b>	<b>Judul Penelitian</b>	<b>Metode</b>	<b>Hasil Penelitian</b>
1	Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. <sup>12</sup>	<i>Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin</i>	Ekperimental <i>In Vivo</i>	Aplikasi topikal dari (PRE) <i>Pomegranate rind extract</i> ke kulit <i>ex vivo</i> menurunkan regulasi ekspresi COX-2, mempunyai efek anti-inflamasi yang signifikan, memastikan bahwa PRE menembus kulit dan memodulasi regulasi COX-2 pada epidermis yang aktif, Memperbaiki penyakit peradangan dan nyeri yang berhubungan dengan berbagai

			kondisi kulit, termasuk luka.
2	Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. <sup>11</sup>	<i>Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum</i>	Ekperimental <i>In Vivo</i> Analisis fitokimia ekstrak kulit buah <i>P. granatum</i> menunjukkan adanya saponin, triterpen, tanin, alkaloid, dan flavonoid. Uji aktivitas penyembuhan lukanya pada tikus menggunakan model luka eksisi. Hewan yang diberi ekstrak menunjukkan pengurangan area luka sebesar 95% bila dibandingkan dengan kontrol (84%), yang secara statistik signifikan ( $P < 0,01$ ). Buah Delima mendorong penyembuhan luka yang signifikan pada tikus.
3	Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. <sup>10</sup>	<i>Evaluation of wound healing potential of pomegranate (Punica granatum) whole fruit extract on skin burn wound in rats (Rattus norvegicus).</i>	Ekperimental. <i>In Vivo</i> <i>Pomegranate standardized extract</i> (PSE) dengan asam ellagic 40% diolah menjadi salep. SPE 10% mempercepat penyembuhan luka bakar derajat dua dalam luka. buah delima yang distandarisasi dengan asam ellagic 40% merupakan ramuan yang menjanjikan untuk penyembuhan luka bakar pada kulit.
4	Mahdi M, Nassireslami E, Asadi M, Dadpay M. <sup>2</sup>	<i>Evaluation of wound healing activities of pomegranate (Punica granatum-Lythraceae) peel and pulp.</i>	Ekperimental. <i>In Vivo</i> Berbagai bagian kulit buah delima mempunyai efek yang berbeda-beda terhadap penyembuhan luka. Ekstrak lapisan atas kulit buah secara signifikan meningkatkan proses penyembuhan luka, sedangkan ekstrak daging buahnya tidak menunjukkan efek yang menjanjikan. Oleh karena itu, lapisan atas kulitnya disarankan untuk penelitian lebih lanjut mengenai penyembuhan luka.
5	Busman B, Novera Y. <sup>16</sup>	Efektifitas Ekstrak Kulit Buah Delima ( <i>Punicagranatum</i> ) Secara Topikal Terhadap Proses	Ekperimental <i>In Vivo</i> Rata-rata pembentukan osteoblas dan osteoklas pada tikus lebih banyak pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 75% dan terdapat manfaat kandungan

---

Pembentukan Kembali (Remodelling) Pada Fraktur Tulang Paha Tikus Putih Galur Wistar Betina ( <i>Rattus norvegicus</i> ).	ekstrak kulit buah delima terhadap proses pembentukan kembali ( <i>remodelling</i> ) pada fraktur tulang paha pada tikus putih <i>Galur wistar</i> dengan nilai $p=0,000<0,05$ .
--	--

---

## 1.5 Manfaat Penelitian

### a. Manfaat Teoritis

Penelitian ini bertujuan membuktikan teori dari berbagai sumber dalam penanganan luka eksisi menggunakan ekstrak buah delima.

### b. Manfaat Praktis

1. Memberikan manfaat kepada masyarakat luas tentang penggunaan buah delima terhadap penyembuhan, sebagai referensi penelitian berikutnya menggunakan parameter yang berbeda.
2. Sebagai acuan untuk pembuatan produk kosmetik yang bernilai jual tinggi dan melakukan uji klinis penggunaan krim ekstrak buah delima terhadap penyembuhan luka.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)*

##### 2.2.1 Pengertian

TGF-β adalah sitokin multifungsi yang berperan penting dalam proses seluler termasuk proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan apoptosis untuk mempertahankan homeostasis jaringan.<sup>17</sup> Disekresikan dari bermacam jenis sel, seperti makrofag, denritik sel, sel B, dan sel T. TGF-β sebagai penekan kekebalan dalam peradangan.<sup>18</sup> Keluarga TGF-β, yang memiliki tiga isoform TGF-β1, TGF-β2, dan TGF-β3 adalah sitokin pluripotent. Khususnya, TGF-β1 sangat penting untuk proses penyembuhan luka kulit.<sup>19</sup> Ketiga anggota keluarga TGF-β memiliki struktur peptida yang relatif sama. TGF-β1 terdiri dari 390 asam amino, TGF-β2 terdiri dari 412 asam amino, dan TGF-β3 terdiri dari 412 asam amino. Ketiga anggota keluarga TGF-β memiliki peptida N-terminal yang panjangnya 20-30 asam amino.<sup>18</sup>

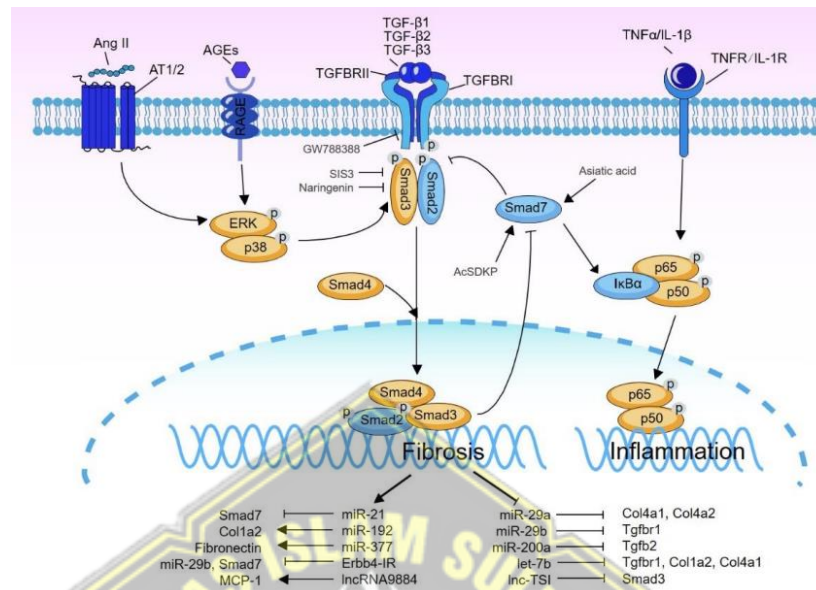
Sel induk dewasa memiliki lebih dari sekedar reseptor TGF-β pada permukaannya, bisa menjadi tidak aktif selama beberapa bulan. Faktor lingkungan tertentu dapat menyebabkan sel induk memasuki kembali siklus sel. Hal ini tidak sama dengan diferensiasi sel secara umum dan keadaan penuaan. Untuk menjaga sel induk sensitif terhadap perubahan fisiologi jaringan, anggota superfamili TGF-β harus mampu menjaga keseimbangan antara peristiwa siklus sel yang dapat dibalik dan pertumbuhan sel aktif.<sup>20</sup>

### 2.2.2 Aktivitasi jalur TGF- $\beta$

Awalnya diproduksi sebagai protein prekursor yang lebih besar, ligan TGF- $\beta$  dilepaskan sebagai ligan terminal-C yang matang dalam bentuk homodimer ketika bagian terminal-N-nya dibelah. Ligan terminal-C dan peptida terminal-N (LAP) yang terpecah terhubung secara fisik satu sama lain. Dikenal sebagai TGF- $\beta$  laten, protein pengikat TGF- $\beta$  laten (LTBPs) menempel pada homodimer TGF- $\beta$  dewasa dan menghambat aktivitasnya. Lingkungan mikro yang asam atau pencernaan enzimatik dapat melepaskan TGF- $\beta$  aktif.<sup>21</sup> Setelah dilepaskan dari LAP, TGF- $\beta$  aktif terikat pada transmembran TGFBR2 tipe 2, yang berfungsi sebagai serin/treonin kinase untuk mengikat dan mengaktifkan TGFBR1 (juga dikenal sebagai kinase 5 karena berkaitan erat dengan reseptor aktivin, ALK5) melalui fosforilasi. TGFBR1 yang diaktifkan kemudian mendenaturasi Smads yang merupakan reseptor terpotong (R-Smad), menghasilkan pembentukan Smad2 dan Smad3 pada residu terminal C-nya. Smad2 dan Smad3 merupakan transkripsi faktor eksekutif yang mempunyai tingkat kemiripan tinggi dalam urutan asam amino. Saat diaktifkan, R-Smads dapat membentuk kompleks dengan Smad4 (juga dikenal sebagai Co-Smad) dan menerjemahkan ke nukleus untuk melakukan transkripsi gen target.

Untuk mencegah fosforilasi Smad2 dan Smad3, terdapat juga penghambat Smad7 yang diaktifkan oleh Smad3 dan berikatan secara kompetitif dengan TGFBR1. Selain itu, dengan menggunakan E3 ubiquitin ligase Smurf2, Smad7 juga dapat bekerja untuk menghancurkan TGFBR1. Akibatnya, mekanisme umpan balik negatif Smad7 secara negatif mengubah sinyal TGF-

$\beta$ .<sup>22</sup>



Gambar 2.1 Jalur Sinyal TGF- $\beta$ .<sup>22</sup>

TGFBR3 dan endoglin yang terikat membran ekstra membantu pengikatan ligan TGF- $\beta$  aktif ke reseptor. Pensinyalan TGF- $\beta$  menjadi lebih sensitif ketika Betaglikan menawarkan ligan TGF- $\beta$  ke TGFBRII dalam bentuk kompleks terner. Untuk membuat betaglikan yang larut, betaglikan juga dapat dibebaskan dari membran. Betaglikan terlarut mencari aktivitas sinyal TGF- $\beta$ , berbeda dengan betaglikan yang terikat membran. Smad2/3 dapat diaktifkan/difosforilasi melalui crosstalk dengan jalur MAPK ERK/p38 selain transduksi sinyal dari ligan TGF- $\beta$  ke reseptor yang terikat membran..<sup>22</sup>

TGF- $\beta$ 1 juga dapat mengaktifkan berbagai jalur independen Smad, disebut sebagai pensinyalan non-Smad, Jalur non-Smad ini termasuk AKT, jalur pensinyalan GTPase, dan TAK1.<sup>23</sup> Jalur independen Smad ini dapat mengontrol respons seluler hilir baik secara mandiri atau bersamaan dengan pensinyalan Smad. Untuk mengilustrasikan kerumitan pensinyalan TGF- $\beta$ , pertimbangkan

cara TGFBR1 digabungkan dengan TGF- $\beta$ 1 secara langsung memfosforilasi protein polaritas sel Par6, yang pada gilirannya menarik E3 ubiquitin ligase Smurf1 untuk memecah GTPase RhoA kecil dan memulai epitelial mesenkim transisi(EMT).<sup>22</sup>

### 2.2.3 Peran TGF- $\beta$

Sekresi TGF- $\beta$  bergantung pada jenis sel serta ekspresi dan dosis ligan. TGF- $\beta$  mempengaruhi proses biologis seperti kematian sel, migrasi, diferensiasi, dan proliferasi secara pleiotropik dan terkadang antagonis.<sup>20</sup> Kehadiran sitokin lain merupakan salah satu dari banyak faktor yang mempengaruhi efek TGF- $\beta$ . Dalam keadaan tertentu, sitokin mitogenik TGF- $\beta$  mengatur efek biologisnya. Fungsinya menjamin bahwa SCF mendukung kelangsungan hidup sel induk hematopoietik dan mencegah efek penghambatan TGF- $\beta$  pada sel-sel tersebut dengan membalikkan efek penghambatan TGF- $\beta$ .<sup>24</sup>

Sifat pleiotropik TGF- $\beta$  memiliki implikasi pada proses patologis ketika jalur aktivasinya dideregulasi, TGF- $\beta$  juga berperan dalam regulasi homeostatis.<sup>25</sup> Melalui pengendalian ekspresi gen yang terlibat dalam perbaikan jaringan dan proliferasi sel, jalur pensinyalan TGF- $\beta$  mempunyai dampak besar pada diferensiasi sel. Inhibitor dan jalur pensinyalan merupakan contoh variabel eksternal yang mempengaruhi proses perkembangan sel induk, termasuk pembaharuan diri dan diferensiasi sel. Faktor internal yang mempengaruhi proses ini meliputi epigenetika dan faktor transkripsi kunci. Sinyal yang terkait dengan proliferasi sel diaktifkan oleh TGF- $\beta$ .<sup>25</sup>



## 2.2 Interleukin-6 (IL-6)

### 2.2.1 Pengertian

Sitokin proinflamasi IL-6 diproduksi sebagai respons terhadap infeksi atau kerusakan jaringan dan berperan dalam respons imun bawaan dan adaptif. Sebagai bagian dari mekanisme pertahanan inang untuk memberantas sel yang terinfeksi atau jaringan yang rusak, sel imun bawaan, seperti makrofag, melepaskan IL-6 ketika diidentifikasi oleh *damage-associated molecular pattern* (DAMPs) atau *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Gangguan inflamasi kronis mungkin timbul akibat produksi IL-6 yang berlebihan.<sup>26</sup> IL-6 berfungsi sebagai mediator inflamasi dan terlibat dalam beberapa penyakit inflamasi akut. Ketika terjadi peradangan akut, berbagai sel imun, termasuk monosit dan makrofag, serta sel nonimun, seperti fibroblas, sel mesenkim, dan sel endotel vaskular, memproduksi IL-6 sebagai respons terhadap rangsangan dari PAMPs/DAMPs atau sumber lain.<sup>26</sup>

Peradangan akut sebagian besar dimediasi oleh IL-6, yang juga diperlukan untuk penyembuhan luka. Sitokin proinflamasi dilepaskan oleh makrofag jaringan, keratinosit, sel endotel, dan sel stroma ketika IL-6 dilepaskan pada awal respons terhadap cedera. Juga ditemukan bahwa IL-6 menyebabkan leukosit bermigrasi menuju luka. Pensinyalan IL-6 bertugas memicu transisi ke lingkungan reparatif saat peradangan meningkat. Sinyal proinflamasi yang tidak tepat dapat menyebabkan luka lebih lambat sembuh dan meningkatkan risiko infeksi. Pengaturan penyembuhan luka sangat penting.<sup>27 28</sup>

### 2.2.1 Mekanisme aktivasi IL-6

IL-6 memainkan peran sentral dalam peradangan akut dan diperlukan untuk penyembuhan luka tepat waktu. Dirilis lebih awal sebagai respons terhadap cedera, IL-6 menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag jaringan, keratinosit, sel endotel, dan sel stroma. IL-6 juga ditemukan menginduksi kemotaksis leukosit ke dalam luka.<sup>29</sup> *Toll like receptor* (TLRs) merangsang beberapa jalur pensinyalan, termasuk NFκB, dan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin inflamasi seperti IL-6, TNF-α, dan IL-1b. TNF-α dan IL-1b kemudian merangsang faktor transkripsi untuk menghasilkan IL-6.<sup>30</sup>

IL-6 juga mengirimkan sinyal peringatan saat terjadi kegagalan jaringan pada inflamasi non-infeksi. Peningkatan kadar IL-6 dalam serum mendahului perubahan suhu tubuh dan kadar protein fase akut, DAMPs yang dihasilkan oleh sel yang rusak atau sekarat menyebabkan inflamasi baik secara langsung maupun tidak langsung.<sup>31</sup> IL-6 diproduksi dengan cepat dan spontan sebagai respons terhadap infeksi dan cedera jaringan, mendorong hematopoiesis, respons imunologis, dan respons fase akut, membantu tubuh mempertahankan diri.<sup>32</sup> Lesi lokal menghasilkan IL-6 saat peradangan pertama kali muncul. IL-6 kemudian dibawa ke hati melalui sirkulasi, di mana ia dengan cepat menyebabkan produksi banyak protein fase akut, seperti protein C-reaktif (CRP), serum amiloid A (SAA), fibrinogen, haptoglobin, dan *antichymotrypsin*.<sup>33</sup>

### 2.1.2 Peran IL-6

Respon inflamasi sangat penting dalam penutupan luka, dan gangguan pada jalur sinyal IL-6 dapat menghambat penyembuhan luka. Oleh karena itu, peran IL-6 dalam penyembuhan luka kulit tidak dapat diabaikan. Karena makrofag M1 adalah pengekspres IL-6 utama pada luka, peningkatan rasio M1:M2 akibat sinyal inflamasi yang persisten dapat menghambat penyembuhan luka. IL-6 mengatur polarisasi M2 dengan menginduksi produksi IL-4 sel Th2 dan IL-4R pada makrofag. Makrofag M2 khususnya adalah sekretor utama sitokin proliferasif VEGF dan TGF- $\beta$ .<sup>34</sup>

Pada kondisi kulit profibrotik melibatkan loop umpan balik IL-6/TGF- $\beta$ , yang berfungsi dalam loop autokrin positif pada fibroblas. Peningkatan deposisi kolagen dan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, yang berkontraksi untuk bergabung dengan tepi luka, dimungkinkan oleh IL-17A. Peningkatan vaskularisasi merupakan prasyarat untuk penyakit fibrotik, yang disebabkan oleh stimulasi IL-6 yang meningkatkan kelangsungan hidup myofibroblast dan meningkatkan produksi VEGF oleh endotel jaringan, keratinosit, fibroblas, dan makrofag.<sup>34</sup>

IL-6 adalah sitokin yang menampilkan aktivitas pleiotropik, menginduksi sintesis protein fase akut seperti CRP, serum amiloid A, fibrinogen, dan hepcidin di hepatosit, sedangkan itu menghambat produksi albumin. IL-6 juga memainkan peran penting dalam respon imun didapat melalui stimulasi produksi antibodi dan pengembangan sel T efektor. Selain itu, IL-6 dapat mendorong diferensiasi atau proliferasi beberapa sel nonimun. Karena aktivitas pleiotropik,

produksi IL-6 yang tidak teratur secara terus-menerus menyebabkan timbulnya atau berkembangnya berbagai penyakit. Treg, sel T pengatur RANKL, aktivator reseptor NF-kB, VEGF.<sup>35</sup>

## 2.3 Luka

### 2.3.1 Pengertian Luka

Luka adalah hilangnya integritas, struktur, dan fungsi normal kulit akibat faktor fisik, kimia, atau mekanis. Kulit merupakan bagian mendasar dari tubuh manusia, organ terbesar, dan pertahanan pertama terhadap lingkungan. Organ ini mempertahankan homeostatis sebagai reservoir nutrisi, mekanisme pertahanan, dan respon cedera, terdiri dari beberapa lapisan jaringan ektodermal yang melindungi otot, tulang, ligamen, dan organ dalam tubuh.<sup>36</sup>

Beberapa jenis luka antara lain:

- a) Luka memar merupakan cedera pembuluh darah akibat robeknya jaringan pembuluh darah akibat benturan, kemudian berpindah ke jaringan perivaskular, mengubah warna lapisan luar kulit.
- b) Luka lecet atau abrasi yaitu kerusakan lapisan epidermis yang lebih dalam tidak terpengaruh oleh cedera permukaan. Salah satu penyebab abrasi yang paling umum adalah gesekan permukaan kulit dengan permukaan yang tidak rata.
- c) Luka robek atau laserasi berhubungan dengan kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma parah, sehingga menimbulkan kesan luka terbuka pada kulit dan jaringan lunak.
- d) Luka iris atau insisi sayatan biasanya dilakukan bersamaan dengan

prosedur medis dan dilakukan dengan menggunakan alat tajam, seperti pisau atau silet. luka yang cukup parah hingga merusak pembuluh darah dan jaringan, baik panjang maupun dalamnya. Kecenderungan luka sayatan memiliki tepi yang lurus dan rata, tidak ada memar, dan tidak ada lecet merupakan ciri khasnya.

### 2.3.2 Luka Eksisi

Luka eksisi adalah luka di mana permukaan kulit dan lapisan bawahnya terpotong sampai kedalaman yang berbeda, yang dapat terjadi secara sengaja atau tidak sengaja.<sup>37</sup> Kerja sama berbagai strain sel dan produknya diperlukan untuk penyembuhan luka kulit, yang merupakan fungsi fisiologis penting. Tahap awal peradangan adalah waktu penyembuhan lesi yang disebabkan oleh agresivitas lokal. Kolagen disimpan dan beregenerasi, menyebabkan perbaikan yang melibatkan penggantian struktur khusus. Proses ini dipicu oleh proses proliferasi dan diferensiasi sel posterior melalui jaringan sel induk.<sup>38</sup> Setelah lesi kulit, regenerasi dan perbaikan dapat terjadi pada jaringan yang sama, bergantung pada strain sel yang terganggu oleh cedera.<sup>39</sup>

Regenerasi dan penyembuhan jaringan terjadi setelah perkembangan lesi, baik sebagai akibat dari kelainan klinis tertentu atau trauma. Lesi tunggal terbentuk oleh semua rangsangan yang merusak kontinuitas fisik jaringan yang berfungsi. Lesi dapat disebabkan oleh berbagai rangsangan, termasuk rangsangan termal, kimia, listrik, dan fisik. Selain itu, lesi dapat merusak organ tertentu atau sel itu sendiri.<sup>40</sup> Faktor pertumbuhan merangsang proliferasi sel dalam penyembuhan jaringan, sebuah proses linier sederhana

yang mengintegrasikan perubahan dinamis yang melibatkan mediator terlarut, sel darah, sintesis matriks ekstraseluler, dan proliferasi sel parenkim.

### **2.3.3 Fase penyembuhan luka**

Tiga fase membentuk proses penyembuhan kulit, yang merupakan peristiwa biologis dan biokimia dalam perbaikan luka: respon inflamasi, proliferasi sel dan pembentukan matriks ekstraseluler, dan fase remodeling.<sup>41</sup>

#### **2.3.3.1 Tahap inflamasi**

Selama respon inflamasi vaskular, pembuluh darah yang terkena menyempit dan kebocoran darah menggumpal, menjaga integritas pembuluh darah. Trombosit berkumpul dalam jaringan fibrin selama koagulasi, yang dipicu oleh rangsangan tertentu yang menyebabkan sel-sel ini aktif dan berkumpul.<sup>42</sup> Jaringan fibrin mengatur matriks sementara yang diperlukan untuk migrasi sel, mendapatkan kembali homeostatis dan menciptakan penghalang terhadap kuman invasif. Ini menjaga integritas kulit dan mengembalikan fungsi pelindung kulit.<sup>40</sup>

Setelah cedera kulit, fase inflamasi berlangsung hingga lima hari. Hemostasis dan menghindari kolonisasi bakteri atau infeksi bergantung pada tahap ini.<sup>43</sup> Selama fase inflamasi, koagulasi disebabkan oleh pelepasan faktor kemotaktik dari jaringan sekitar dan plasma darah, seperti kallikrein dan peptida fibrin. Faktor nekrosis tumor, protease, histamin, sitokin, dan leukotrien disekresi oleh sel mast, yang menginduksi migrasi sel inflamasi. Monosit dan neutrofil adalah jenis sel kekebalan pertama yang berpindah ke jaringan yang terluka.<sup>44</sup>

TNF- $\alpha$ , prostaglandin, IL-1, C5a, TGF- $\beta$ , dan produk pemecahan bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) dapat mendorong neutrofil bermigrasi ke jaringan yang terluka dan mengisi jaringan. Diapedesis ini antara lain disebabkan oleh peningkatan permeabilitas sel endotel pembuluh darah di kapiler. Permeabilitas kapiler disebabkan oleh pelepasan histamin dan serotonin oleh sel mast. Melalui fagositosis terhadap mikroba berbahaya dan jaringan mati, neutrofil yang bermigrasi di jaringan yang terluka membantu mencegah infeksi. Konsentrasi neutrofil pada jaringan yang rusak pada akhirnya menurun akibat proses regenerasi jaringan. Luka jangka panjang dengan jumlah neutrofil yang tinggi menunjukkan konversi dari infeksi.<sup>45</sup>

Setelah neutrofil sampai ke lokasi tersebut, monosit yang akan berkembang menjadi makrofag akan tiba dalam waktu 48 hingga 72 jam dan mengambil alih sebagai sel dominan pada hari ketiga setelah kerusakan kulit. Makrofag membantu fagositosis bakteri kerusakan jaringan. Selain itu, makrofag berkontribusi pada sintesis banyak faktor pertumbuhan yang merangsang fibroblas untuk menghasilkan matriks ekstraseluler dan mendorong neovaskularisasi melalui mesenkim jaringan, yang pada akhirnya membantu penyembuhan luka.<sup>43</sup>

Reaktif oksigen spesies (ROS) diproduksi oleh neutrofil dan makrofag selain fagositosis dan pelepasan sitokin inflamasi. Karena ROS adalah radikal bebas, mereka membantu pencegahan infeksi bakteri. Di sisi lain, kadar ROS yang berlebihan dapat menghambat regenerasi

jaringan dan secara bertahap menyebabkan apoptosis pada sel-sel tubuh. Selain itu, ROS mempunyai peran dalam resintesis mediator inflamasi termasuk prostaglandin dan leukotrien serta aktivasi dan pemeliharaan kadar asam arakidonat. Peradangan berkepanjangan yang menyebabkan kerusakan jaringan dapat disebabkan oleh pertumbuhan dan proliferasi mediator inflamasi.<sup>45</sup>

Pada luka pasca-trauma, sel mast dan limfosit muncul pada hari ke 5 hingga 7. Kedua jenis sel ini mendorong penyembuhan jaringan yang terluka dan mengendalikan peradangan yang berkepanjangan. Namun demikian, mekanisme yang mengendalikan peradangan terus-menerus dan mendorong perbaikan jaringan yang terluka masih belum diketahui oleh para peneliti.<sup>43</sup> Perkembangan jaringan granulasi kemerahan yang lembut dan granular akan menandakan berakhirnya fase inflamasi. Kaya akan fibroblas dan neovaskularisasi kapiler, jaringan granulasi yang berkembang menawarkan lingkungan metabolisme yang mendorong penyembuhan luka.<sup>46</sup>

### **2.3.3.2 Fase Proliferasi**

Hari keempat sampai hari kedua puluh satu merupakan fase proliferasi. Kemampuan sel-sel epitel jaringan untuk melakukan epitelisasi ulang membedakan fase ini. Fase epitelisasi dimulai pada tepi luka ketika terjadi migrasi keratinosit, epitelisasi akan menyebabkan luka sembuh dalam 5-7 hari. Membran dasar pada akhirnya akan berkembang antara dermis dan epidermis. Membran basal terbentuk melalui



rangsangan angiogenesis dan fibrogenesis yang memperkuat struktur lapisan dermis di bawahnya. Pada fase ini matriks fibrin didominasi oleh trombosit dan makrofag, akhirnya digantikan oleh jaringan granulasi yang dibuat oleh kelompok jaringan fibroblas, dan matriks ekstraseluler dibuat pada akhir proses tersebut.<sup>43</sup>

Fibroblas sangat penting untuk periode proliferasi. Fibroblas adalah sel yang menghasilkan protein matriks ekstraseluler seperti kolagen dan fibrin. Rongga jaringan luka diisi dengan matriks ekstraseluler, yang juga berperan sebagai tempat migrasi keratinosit. Faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi fibroblas dan produksi matriks ekstraseluler termasuk TGF- $\beta$  dan PDGF.<sup>43</sup>

Fibroblas akan memecah fibrin dengan bantuan *matriks metalloproteinase* (MMP) dan menggantinya dengan kolagen tipe III dan *glikosaminoglikan* (GAG). Kolagen tipe I kemudian akan menggantikan kolagen tipe III selama fase pematangan.<sup>47</sup> Faktor proangiogenik yang menginduksi angiogenesis sel endotel meliputi trombospondin, *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan angiopentin-1. Faktor-faktor ini diproduksi oleh makrofag. Semua aktivitas seluler pada fase proliferasi yang dijelaskan di atas akan berhenti setelah regenerasi epitel selesai dan remodeling kolagen terjadi. Setelah matriks kolagen mengisi ruang luka, fibroblas akan hilang, dan apoptosis akan menandakan berakhirnya proses neovaskularisasi. Ketidakmampuan mengatur proses re-epitelisasi akan menyebabkan

penyakit fibrotik, termasuk hipertrofi dan keropeng.<sup>43</sup>

### 2.1.3.3 Fase Maturasi

Masa pematangannya bisa memakan waktu satu hingga dua tahun, atau 18 hingga 21 hari. Fase maturasi dimulai ketika jaringan granulasi dan matriks ekstraseluler mengisi rongga luka, dan kolagen tipe I menggantikan kolagen tipe III. Selama tahap ini, sel dan matriks ekstraseluler matang.<sup>44</sup> Karakteristik fase matang meliputi remodeling kolagen dan kontraksi luka. Aktivitas myofibroblast meningkatkan kontraksi luka. Mikrofilamen aktin yang terletak di dalam sel fibroblas memberikan kemampuan miofibroblas untuk berkontraksi dan menarik jaringan di sekitarnya. Melalui aktivitas matriks metalloproteinase (MMP) yang disebabkan oleh fibroblas, sel endotel, dan makrofag jaringan, kolagen tipe I pada akhirnya akan menggantikan fase kolagen tipe III sebelumnya.<sup>43</sup>

Dari awal fase pematangan hingga berakhirnya, proses sintesis dan pemecahan kolagen berlangsung secara bersamaan, meskipun pada tingkat yang berbeda. Enzim kolagenase memecah kolagen ekstra dan menyerapnya ke jaringan sekitarnya. Jaringan parut yang pucat, lembut, tipis, dan mudah digerakkan terbentuk pada akhir fase ini.<sup>48</sup> Karena kolagen yang baru terbentuk tersusun tidak menentu, ikatan silang antara serat kolagen tercipta melalui konversi lisin menjadi hidroksilisin, yang memerlukan adanya lisil hidrolase. Kekuatan tarik dihasilkan oleh ikatan silang serat kolagen yang menutupi luka agar tidak mudah robek

meskipun terjadi kerusakan ringan. Bagi kebanyakan orang, kekuatan tarik akan meningkat dalam enam minggu pertama dan kemudian secara bertahap selama satu hingga dua tahun berikutnya. Kekuatan tarik kulit dan fascia biasanya hanya mencapai 80% dari nilai normal dan jarang mencapai 100%.<sup>47</sup>

#### **2.3.4 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka.**

Penyembuhan luka dipengaruhi oleh usia. Penuaan dapat mempengaruhi sintesis faktor pembekuan, potensi regenerasi jaringan, dan respon inflamasi. Derajat dan jenis kerusakan jaringan mempengaruhi seberapa cepat luka sembuh. Penyembuhan luka dipengaruhi oleh jenis, lokasi, dan derajat kerusakan jaringan pada lokasi luka. Semakin parah cederanya, semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk pulih.<sup>49,50</sup>

Satu hal yang menghentikan penyembuhan luka adalah infeksi. Infeksi menyebabkan perluasan area luka, dan produk samping metaboliknya dapat merusak jaringan kulit dan memengaruhi respons peradangan. Pentingnya peran ketersediaan makro dan mikronutrien dalam proses fisiologis penyembuhan luka, status gizi memainkan peran utama dalam penyembuhan luka. Glukokortikoid atau steroid memiliki kekuatan untuk menghentikan siklus arakidonat, yang menyebabkan peradangan.<sup>51</sup>

## 2.4 Delima (*Punica granatum*)

Delima merupakan buah terkenal dengan sejarah panjang di Iran dan Timur Tengah. Seringkali tanaman ini tumbuh dengan mudah di daerah beriklim kering di tepi gurun.

Klasifikasi atau taksonomi dari pohon delima, sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*,  
 Filum : *Tracheophyta*,  
 Kelas : *Magnoliopsida*,  
 Ordo : *Myrtales*,  
 Family : *Lythraceae*,  
 Genus : *Punica*,  
 Spesies : *Punica granatum*.<sup>52</sup>

Buah delima toleran terhadap beberapa jenis tanah dan dapat tumbuh subur dalam berbagai situasi lingkungan. Delima rentan terhadap drainase tanah yang buruk, dalam keadaan seperti ini pertumbuhannya lambat dan menghasilkan buah berkualitas rendah. Lempung berpasir dalam sangat ideal untuk budidaya buah delima; musim panas yang berkepanjangan meningkatkan kapasitas tanah untuk pertumbuhan, produktivitas, dan kualitas produk jadi. Hingga sekitar 1600 meter di atas permukaan laut, produk ini dapat dibudidayakan.<sup>53</sup>

Delima tumbuh dengan baik di dataran rendah untuk spesies tertentu dan di dataran tinggi untuk spesies lain. Budidaya buah delima memiliki beberapa kendala utama, salah satunya adalah kerentanannya terhadap dingin. Buah delima memerlukan musim panas yang panjang dan terik agar bisa matang karena akan rusak jika suhunya di bawah 12°C. Akibatnya, buah delima manis lebih sensitif dibandingkan buah delima asam.<sup>53</sup>



Gambar 2. 2 Buah delima.<sup>53</sup>

Delima merupakan tanaman perdu yang tumbuh setinggi 1,5 hingga 5 meter. memiliki daun mengkilap dan kadang-kadang asimetris, cabang berduri yang menyerupai dedaunan gugur di daerah beriklim sedang dan dedaunan hijau di daerah beriklim dingin.<sup>54</sup> Famili *Punicaceae* yang terdiri dari satu genus dan dua spesies buah delima merupakan famili tumbuhan terkecil. Anggota keluarga ini termasuk yang berikut: Delima dapat dimakan berasal dari Iran dan wilayah Mediterania, sedangkan delima *Punica protopunica* yang tidak dapat dimakan adalah endemik di pulau Socotra di Samudra Pasifik. Pada cabang yang baru muncul, daun-daun saling muncul dan bergabung menjadi spora. Ada satu sampai lima bunga, salah satunya terminal, sedangkan yang lainnya marginal, pendek, atau tidak bertangkai. Mereka berkelamin dua, tidak berbau, dan sebagian besar berwarna merah. Pada spesies tertentu, buah kadang-kadang berwarna ungu tua, meskipun seringkali berwarna merah jambu hingga kuning kehijauan. Beratnya

antara kurang dari 200 dan lebih dari 800 gram, dan diameternya berkisar antara 5 hingga 20 cm. Sejumlah besar biji berbentuk segitiga, dan bebas albumin.<sup>53</sup>

#### **2.4.1 Kandungan Buah Delima**

Buah dan pohon delima memiliki beberapa bagian yang mengandung berbagai jenis gula, asam organik, flavonoid, antosianin, asam lemak, alkaloid, vitamin, dan lain sebagainya. Ekstrak buah delima mengandung gula utama berikut: glukosa, fruktosa, sukrosa, dan maltosa. Ini juga mengandung beta karoten, vitamin C, B1, dan B2. Selain itu, asam organik utama yang terdapat pada buah delima antara lain asam fumarat, asam oksalat, asam suksinat, asam sitrat, dan asam tartarat. Asam ellagic, asam galat, asam klorogenat, asam sinamat, asam hidroksi asam protocatechuic, asam hidroksi benzoat, asam caffeic, asam ferulat, asam kumarat, asam p-kumarat, dan asam o-kumarat, peletierin, isopelletierine, metilpelletierine, pseudopelletierine, punicalagin, punicalin, phloridzin, quercetin, dan catchin termasuk alkaloid yang terdapat pada kulit buah delima.<sup>53</sup>

Glikosida luteolin, kaempferol, dan narigenin adalah flavonoid yang ada dalam buah delima. Zat antosianin bertanggung jawab memberi warna pada buah delima. Enam antosianin yang memberi warna merah pada bagian buah delima yang dapat dimakan adalah gonidin (warna oranye dan merah), sianidin (warna merah dan merah tua), dan delphinidin (biru dan ungu). Antosianin ini juga dikenal sebagai 3,5-diglukosida delphinidin, 3-glikosida delphinidin, 3,5-diglukosida sianidin, 3-glikosida pelargonidin, dan 3-glikosida pelargonidin; keenam antosianin ini dilepaskan dari buah delima.<sup>53</sup>

Buah delima semakin berubah warna seiring dengan kematangannya. Namun perubahan warna ini terjadi secara bertahap, dan semakin intensif setelah setengah matang. Jumlah antosianin diglukosida tampaknya lebih besar pada tahap awal pengembangan dibandingkan dalam bentuk mono glukosida; namun, pada akhir fase perkembangan dan pematangan, polanya berbalik. Keanekaragaman kultivar juga mempengaruhi jumlah dan jenis antosianin. Aktivitas antioksidan menurun seiring dengan pertumbuhan buah karena kadar asam askorbat dan fenolik menurun.<sup>55</sup> Tingkat aktivitas antioksidan pada berbagai jenis tanaman delima dikendalikan oleh asam askorbat dan senyawa fenolik.<sup>56-58</sup> Dua asam lemak utama yang ditemukan dalam kultivar delima yang paling banyak diteliti adalah asam linolenat (74–88%) dan asam linoleat (5%-16%). Selain itu, banyak ditemukan jenis buah delima yang mengandung berbagai asam lemak, seperti asam oleat, asam palmitat, asam stearat, asam palmitoleat, asam arakidonat, asam laurat, dan asam kaprilat.<sup>53,54</sup>

## **2.5 Pengaruh pemberian ekstrak buah delima terhadap kadar TGF- $\beta$ dan IL-6 pada luka eksisi**

Ekstrak tumbuhan lebih banyak digunakan dalam dermatologi dan kosmetik dibandingkan sebelumnya, khasiatnya dalam bidang penyakit kulit didasarkan pada penelitian ilmiah terhadap delima. Ekstrak delima digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka.<sup>8</sup> Proses penyembuhan yang terdiri dari beberapa tahap, Dalam 5-7 hari luka akan tertutup akibat reepitelisasi, membran dasar akan terbentuk antara epidermis dan dermis. Faktor pertumbuhan seperti TGF- $\beta$ , merangsang aktivitas fibroblas dengan

menyebabkannya berproliferasi dan menghasilkan matriks ekstraseluler.<sup>43</sup> Respon tubuh mengaktifkan sitokin IL-6 sebagai modulator kunci dari proses inflamasi dan reparatif.<sup>59</sup> Diferensiasi myofibroblast yang terganggu akibat peningkatan ROS disebabkan oleh berkurangnya aktivitas antioksidan melalui pensinyalan TGF- $\beta$ , menyebabkan berkurangnya neovaskularisasi, rekrutmen neutrofil yang abnormal, penurunan proliferasi fibroblas, dan gangguan fibroblas menjadi myofibroblast.<sup>60</sup>

Respon inflamasi sangat penting dalam penutupan luka, jalur sinyal IL-6 dapat menghambat penyembuhan luka. Karena makrofag M1 adalah pengeksresi IL-6 utama pada luka, peningkatan rasio M1:M2 akibat sinyal inflamasi yang persisten. IL-6 mengatur polarisasi M2 dengan menginduksi produksi IL-4 sel Th2 dan IL-4R pada makrofag. Makrofag M2 khususnya adalah sekretor utama sitokin proliferaatif TGF- $\beta$ .<sup>34</sup> Monosit dan neutrofil adalah Sel kekebalan pertama yang bermigrasi ke jaringan yang terluka.<sup>44</sup> *Prostaglandin*, *IL-1*, *TNF- $\alpha$* , *C5a*, *TGF- $\beta$* , dan *LPS* akan merangsang neutrofil ke dalam jaringan yang terluka dan mengisi rongga luka.<sup>45</sup> IL-6 bertindak sebagai mediator dalam berbagai situasi darurat, diproduksi pada lesi infeksius, dan mengaktifkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh.<sup>18</sup> ROS yang berlebihan mempunyai efek memperlambat angiogenesis.<sup>61</sup> Buah delima memiliki kandungan fitokimia yang tinggi, terutama flavonoid polifenol dan ellagitannin, yang mengandung asam ellagic dan punicalagin.<sup>8</sup> Enzim antioksidan yang melimpah di kulit, berperan besar dalam detoksifikasi ROS di kulit selama proses penyembuhan luka.<sup>61</sup>



Antioksidan mencegah oksidasi bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah.<sup>62</sup> Antioksidan memiliki fungsi dalam proses oksidatif, antara lain sebagai pengikat ion logam, penyembuhan kerusakan oksidatif, penyerapan radikal lipid peroksil, dan penangkal radikal bebas secara kimia atau enzimatis. Dengan menarik atau melepaskan elektron, antioksidan menetralkan ROS dan menstabilkan radikal bebas untuk mencegah oksidasi dan melindungi sel dari stres oksidatif.<sup>63</sup>



## BAB III

### Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis

#### 3.1 Kerangka teori

Proses penyembuhan terdiri dari beberapa tahap, Dalam 5-7 hari luka akan tertutup akibat reepitelisasi, membran dasar akan terbentuk antara epidermis dan dermis. Faktor pertumbuhan seperti TGF- $\beta$ , merangsang aktivitas fibroblas dengan menyebabkannya berproliferasi dan menghasilkan matriks ekstraseluler.<sup>43</sup> Respon tubuh mengaktifkan sitokin IL-6 sebagai modulator kunci dari proses inflamasi dan reparatif.<sup>59</sup> Diferensiasi myofibroblast yang terganggu akibat peningkatan ROS disebabkan oleh berkurangnya aktivitas pensinyalan TGF- $\beta$ , menyebabkan berkurangnya neovaskularisasi, rekrutmen neutrofil yang abnormal, penurunan proliferasi fibroblas, dan gangguan fibroblas menjadi myofibroblast.<sup>60</sup>

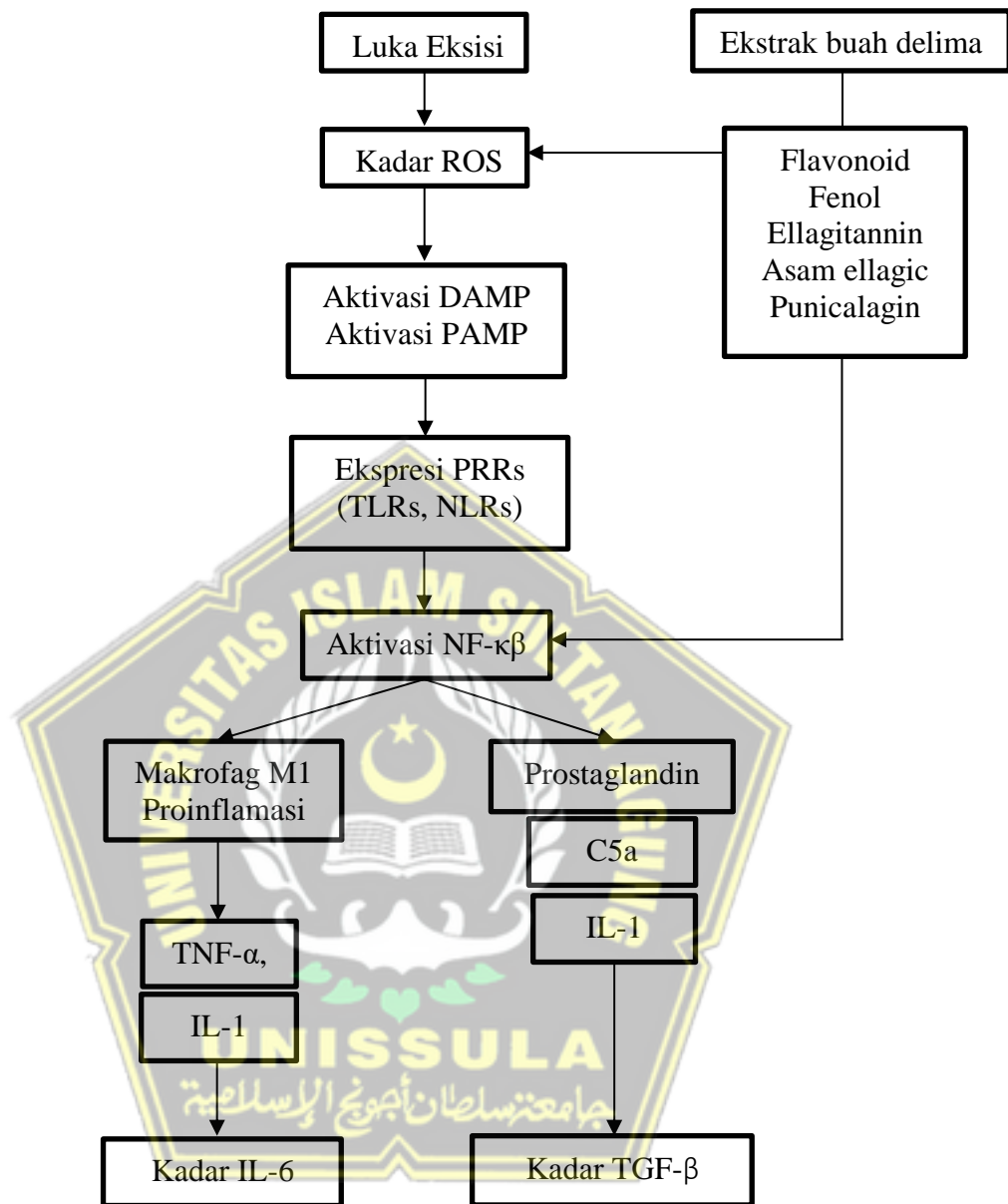
Makrofag, sel dendritik, dan neutrofil, mengekspresikan *pattern recognition receptor* (PRR) yang mendeteksi berbagai komponen mikroba PAMPs, mengaktifkan DAMPs oleh sel nekrotik dan jaringan rusak. PRR mengaktifkan jalur NF- $\kappa\beta$  untuk induksi transkripsi sitokin proinflamasi, kemokin, dan mediator inflamasi tambahan pada berbagai jenis sel imun bawaan. Monosit dan neutrofil adalah Sel kekebalan pertama yang bermigrasi ke jaringan yang terluka.<sup>44</sup> *Prostaglandin*, *IL-1*, *TNF- $\alpha$* , *C5a*, dan *TGF- $\beta$*  akan merangsang neutrofil ke dalam jaringan yang terluka dan mengisi rongga luka.<sup>45</sup> *IL-6* bertindak sebagai mediator dalam berbagai situasi darurat, diproduksi pada lesi infeksius, dan mengaktifkan sinyal peringatan ke seluruh

tubuh.<sup>18</sup> ROS yang berlebihan mempunyai efek memperlambat angiogenesis.<sup>61</sup>

Pengikatan IL-6 dan IL-6R menginduksi homodimerisasi gp130 dan fosforilasi JAKs. Selain itu, *Signal transducer and activator of transkripsi* (STAT) memainkan peran sentral dalam jalur transduksi sinyal sitokin, terutama melalui STAT3. *suppresors of cytokine signalling* (SOCS) dan penghambat protein STAT teraktivasi IL-6 adalah penginduksi kuat produksi kolagen pada fibroblas, IL-6 menginduksi ekspresi mRNA prokolagen melalui fosforilasi JAK, kinase yang diatur sinyal ekstraseluler dan protein kinase yang diaktifkan mitogen. IL-6 juga meningkatkan TGF- $\beta$ , yang merupakan penginduksi kuat produksi kolagen. IL-6 secara signifikan meningkatkan sintesis TIMP-1 melalui fosforilasi STAT3, menghasilkan akumulasi kolagen.<sup>64</sup>

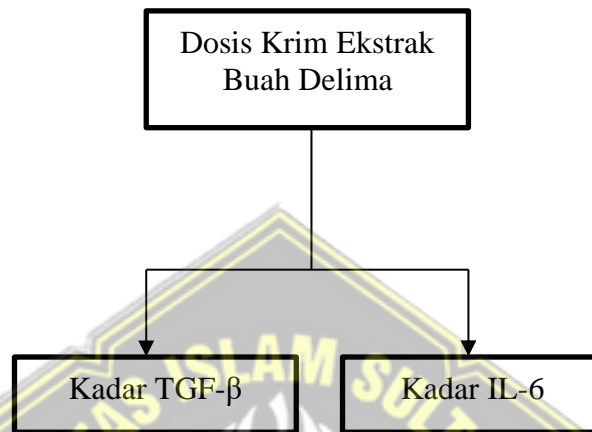
Buah delima memiliki kandungan fitokimia yang tinggi, terutama flavonoid polifenol dan ellagitannin, yang mengandung asam ellagic dan punicalagin.<sup>8</sup> Enzim antioksidan yang melimpah di buah delima, berperan besar dalam detoksifikasi ROS di kulit selama proses penyembuhan luka.<sup>61</sup>

Berdasarkan uraian diatas, dapat di buat kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 3.1 Kerangka Teori

### 3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

### 3.3 Hipotesis Penelitian

- a. Pemberian ekstrak buah delima (*Punica granatum*) meningkatkan kadar TGF- $\beta$  pada kulit tikus wistar pasca luka eksisi antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol
- b. Pemberian ekstrak buah delima (*Punica granatum*) menurunkan kadar IL-6 pada kulit tikus wistar pasca luka eksisi antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol

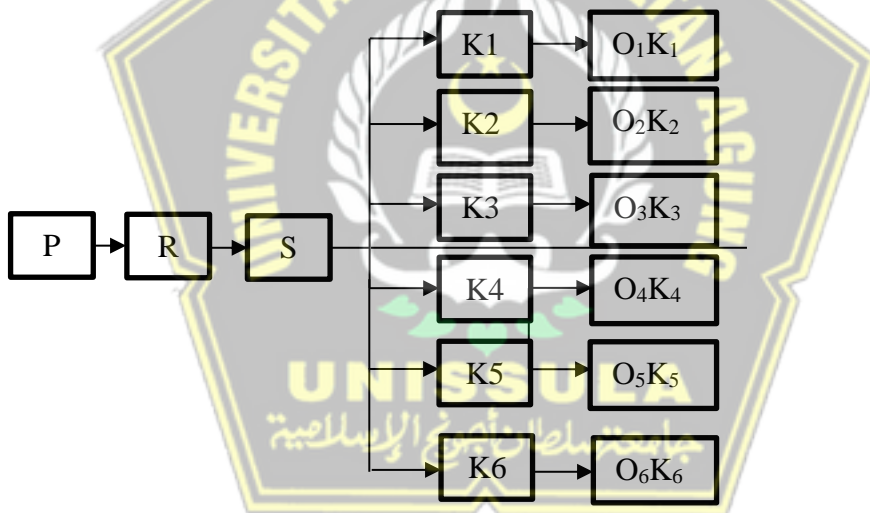
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

##### 4.1.1 Jenis Penelitian dan rancangan penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen yang menggunakan rancangan *post test only control group design*. subjek pada penelitian ini adalah Tikus jantan galur Wistar dengan bobot badan 190-210 gr. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

P = Populasi

R = Randomisasi

S = Sampel

Kelompok perlakuan ini terdiri atas:

- a. Kelompok Normal (K1): Tikus sehat tanpa perlakuan selama 3 hari,

- b. Kelompok *sham* (K2): tikus luka eksisi tanpa dioles krim selama 3 hari,
- c. Kelompok kontrol negatif (K3): Tikus luka eksisi dan diberikan base krim selama 3 hari,
- d. Kelompok kontrol positif (K4): Tikus luka eksisi dan diberikan bioplacenton selama 3 hari
- e. Perlakuan 1 (K5): Tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 10% selama 3 hari
- f. Perlakuan 2 (K6): Tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 20% selama 3 hari.
- g. Kelompok Normal (K7): Tikus sehat tanpa perlakuan selama 7 hari,
- h. Kelompok *sham* (K8): Tikus luka eksisi tanpa dioles krim selama 7 hari,
- i. Kelompok kontrol negatif (K9): Tikus luka eksisi dan diberikan base krim selama 7 hari,
- j. Kelompok kontrol positif (K10): Tikus luka eksisi dan diberikan bioplacenton selama 7 hari
- k. Perlakuan 1 (K11): Tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 10% selama 7 hari
- l. Perlakuan 2 (K12): Tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 20% selama 7 hari.

#### **4.1.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **4.1.2.1 Subjek Penelitian**

Pada penelitian ini menggunakan subjek tikus Wistar yang berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 190-210 gram yang dinyatakan

sehat dan layak digunakan untuk penelitian. Tikus Wistar menjalani adaptasi selama 7 hari. Tikus ditempatkan pada kandang terpisah dengan suhu tetap dan diberi pakan normal.

#### 4.1.2.2 Sampel Penelitian

##### 1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

- a. Tikus jantan galur wistar dengan mengalami inflamasi akibat perlakuan model luka eksisi
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Kondisi sehat
- d. Berat badan 190-210 gram

##### 2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria :

Tikus yang mati selama penelitian.

#### 4.2 Besar Sampel Penelitian

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 12 kelompok. Sampel diambil dari populasi berjumlah 48 ekor, besarnya ditentukan berdasarkan rumus Federer.

Rumus Federer :  $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

Keterangan : n = Jumlah sampel

: t = Jumlah kelompok

Banyak Kelompok : 5 kelompok (t =)

Sampel tiap kelompok :  $(n-1) \times (t-1) \geq 15$



$$(n-1) \times (12-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 11 \geq 15$$

$$11 \times 11 \geq 15$$

$$n \geq (15+11)/11$$

$$n \geq 2,36$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 2,36 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 3 ekor tikus perkelompok.

Penelitian ini dilakukan pada 12 kelompok perlakuan, yang disetiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus, dengan total keseluruhan berjumlah 48 ekor tikus Wistar. Setiap kelompok akan ditambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan apabila ada sampel yang *drop out*.

#### 4.3 Teknik Sampling Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan teknik *probability sampling* yaitu dengan cara pengambilan sampel dalam populasi yang mempunyai kesempatan yang sama untuk di pilih menjadi sampel. Sistem yang digunakan yaitu pengambilan sampel secara acak yang sangat sederhana (*simple random sampling*). Semua tikus wistar yang memenuhi kriteria untuk penelitian berjumlah 48 tikus yang dibagi menjadi 12 kelompok perlakuan secara random. Terdapat satu kelompok kontrol dan lainnya sebagai kelompok perlakuan.

## 4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.4.1 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel Bebas

Pada variabel ini menggunakan krim ekstrak buah delima dengan dosis 10% dan 20%

#### 2. Variabel Prakondisi

Variabel ini menggunakan tikus dengan model luka eksisi

#### 3. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini:

a) Kadar TGF- $\beta$

b) Kadar IL-6

## 4.5 Definisi Operasional

### 4.5.1. Ekstrak buah delima

Ekstrak buah delima adalah krim ekstrak buah delima menggunakan pelarut etanol 70% yang dibuat melalui tahap pembuatan simplisia, maserasi dan evaporasi menggunakan *rotary evaporator*; lalu ekstrak dibuat sediaan krim dengan bahan *Asam stearate, Trietanolamin, Glycerine, Borax, aquadest* dan *tween* dengan konsentrasi 10% dan 20%. Pada buah delima diketahui mengandung antioksidan yang tinggi.

Hasil pengukuran dengan mg dan menggunakan skala nominal

### 4.5.2. Kadar TGF- $\beta$

Kadar TGF- $\beta$  adalah jumlah kadar TGF- $\beta$  yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel tikus Wistar setelah perlakuan luka eksisi dengan diameter

6mm dan kedalaman 2mm, diberikan krim buah delima dosis 10% dan 20% secara topikal 1x/hari pada bagian luka sebanyak 0,5gr selama 3 hari dan 7 hari. Sampel jaringan kulit diambil pada hari ke-4 dan ke 8. Jumlah kadar didapat dengan analisis menggunakan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) dengan prosedur menyesuaikan sampel dari jaringan kulit secara lokal. Hasil pengukuran dengan presentase dan skala rasio

#### **4.5.3. Kadar IL-6**

Kadar IL-6 adalah jumlah kadar IL-6 yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel tikus Wistar setelah perlakuan luka eksisi dengan diameter 6mm dan kedalaman 2mm, diberikan krim buah delima dosis 10% dan 20% secara topikal 1x/hari pada bagian luka sebanyak 0,5gr selama 3 hari dan 7 hari. Sampel jaringan kulit diambil pada hari ke-4 dan hari ke 8. Jumlah kadar didapat dengan analisis menggunakan metode ELISA dengan prosedur menyesuaikan sampel dari jaringan kulit secara lokal. Hasil pengukuran dengan presentase dan skala rasio

### **4.6 Bahan atau Materi Penelitian**

#### **4.6.1 Bahan Penelitian**

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

Menggunakan ekstrak ethanol buah delima, alkohol 70%, 80%, parafin, ketamine, Akuades, Fine test ELISA kit Rat TGF- $\beta$  dan menggunakan fine test ELISA kit Rat IL-6.

#### 4.6.2 Instrumen Penelitian

1. Kandang berukuran 55 x 22 x 22 cm dilengkapi dengan tempat pakan dan minum..
2. Alat-alat penunjang pembuatan sediaan krim: cawan porselen, pemanas air, mortar.
3. Lampu UV-B,
4. Alat-alat ekstraksi buah delima: oven, botol maserasi, *rotary evaporator*.
5. Alat untuk membuat sampel pemeriksaan (pisau scalpel),
6. Pipa pvc.
7. Spuit 3 dan 5 ml.
8. Timbangan digital.

#### 4.7 Cara Penelitian dan Alur kerja

##### 4.7.1 Perolehan *Ethical Clearance*

*Ethical clearance* penelitian diajukan kepada komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

##### 4.7.2 Cara Pembuatan Ekstrak Buah Delima

1. Sampel buah delima sebanyak 2 kg, bagian yang digunakan adalah daging buahnya.
2. Sampel dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C dan dihaluskan. Hasilnya dilakukan pemeriksaan kadar air dengan *moisture balance*, jika hasil kadar air dibawah 10% maka hasil pengeringan dianggap baik.

3. Buah delima yang sudah dihaluskan. Kemudian diayak dengan ayakan ukuran 20 mesh.
4. 500 gram buah delima diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml.
5. Serbuk simplisia buah delima dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap secara terpisah. Kemudian simplisia direndam menggunakan pelarut etanol selama 5 hari dan sesekali dikocok 3 kali sehari.
6. setelah 3 hari kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi ulang selama 2 hari dengan etanol 70% sebanyak 1250 ml. pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali.
7. Filtrat yang terkumpulkan kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

#### 4.7.3 Persiapan Hewan Uji

Subjek penelitian berjumlah 48 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*), berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 190-210 gr, yang terbagi menjadi 12 kelompok, masing-masing berjumlah 4 ekor tikus. Tikus yang sudah diadaptasi selama 7 hari dibius dengan campuran ketamin (60 mg/kgbb) dan *xylazine* (20mg/bb), permukaan kulit yang telah bersih menggunakan *bioplacenton* untuk menghindari infeksi selama pembuatan luka. Pembuatan luka dilakukan dengan menggunakan eksisi *punch biopsy* melingkar dengan ketebalan penuh dengan diameter 6 mm. Hari berikutnya tikus kemudian diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Diberikan perlakuan secara topikal sebanyak satu kali sehari selama 7 hari pasca luka

eksisi. Perlakuan luka eksisi divalidasi secara makroskopis untuk dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter luas percepatan pada penutupan luka.

#### 4.7.4 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Buah Delima

Pembuatan sediaan krim ekstrak buah delima dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Siapkan *vanishing cream* dengan komposisi dalam 50 gram dengan komposisi (*Asam stearate, Trietanolamin, Glycerine, Potasium hidroksida*, dan *aquadest*)
2. Panaskan air dalam beerglass, lalu masukkan asam stearate 14,5gram dalam cawan porselin dan letakkan diatas air mendidih, Aduk sampai mencair
3. Tambahkan secara berurutan *Potasium hidroksida* 125mg kemudian homogenkan, tambahkan *Trietanolamin* 1,5 ml, *Glycerine*10 ml, dan *aquadest* 25ml sampai tercampur rata.
4. Pembuatan krim dalam 20gram dilakukan dengan menimbang ekstrak buah delima 0,6gram kemudian dimasukkan dalam mortir, tambahkan *Tween* secukupnya untuk sambil dihomogenkan
5. Tambahkan *vanishing cream* 20 gram, aduk rata sampai homogen, *Krim* ekstrak buah delima dimasukkan kedalam pot.<sup>65</sup>

#### 4.7.5 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit

Setelah pemberian perlakuan, hari ke 8 dilakukan pengambilan jaringan. Sebelumnya semua tikus Wistar diterminasi terlebih dahulu dengan pembiusan pada tikus. Buat sayatan jaringan pada bagian kulit yang

mengalami luka, menggunakan gunting dan pinset. Sampel jaringan dipotong dan di timbang, selanjutnya jaringan ditambahkan dengan PBS (PH 7,4). Kemudian sampel jaringan di homogenisasi dalam kondisi dingin pada suhu 4°C. selanjutnya setrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 rpm, dengan waktu selama 20 menit. Substrat hasil sentrifugasi yang memiliki bobot jenis yang lebih rendah diambil dan digunakan sebagai sampel uji.

#### 4.7.6 Pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ dan IL-6 menggunakan Metode ELISA

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis kadar TGF- $\beta$  dan IL-6 menggunakan metode ELISA. Analisis ELISA TGF- $\beta$  dan IL-6 dilakukan sesuai prosedur yang dilampirkan dalam produk. Analisis kadar TGF- $\beta$  dan IL-6 menggunakan alat *microplater reader* dengan panjang gelombang 450nm.

Tahap pemeriksaan metode ELISA yaitu sebagai berikut:

1. Pembuatan standard

Sepuluh sumuran pada mikropate disiapkan untuk standard. Ditambahkan *Capture* antibodi pada tiap sumuran. Kemudian dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.

2. Persiapan *wash solution* kemudian larutkan *wash solution* 30x dengan aquadest (1 ml wash solution ditambahkan 29 ml aquadest).

3. Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3.

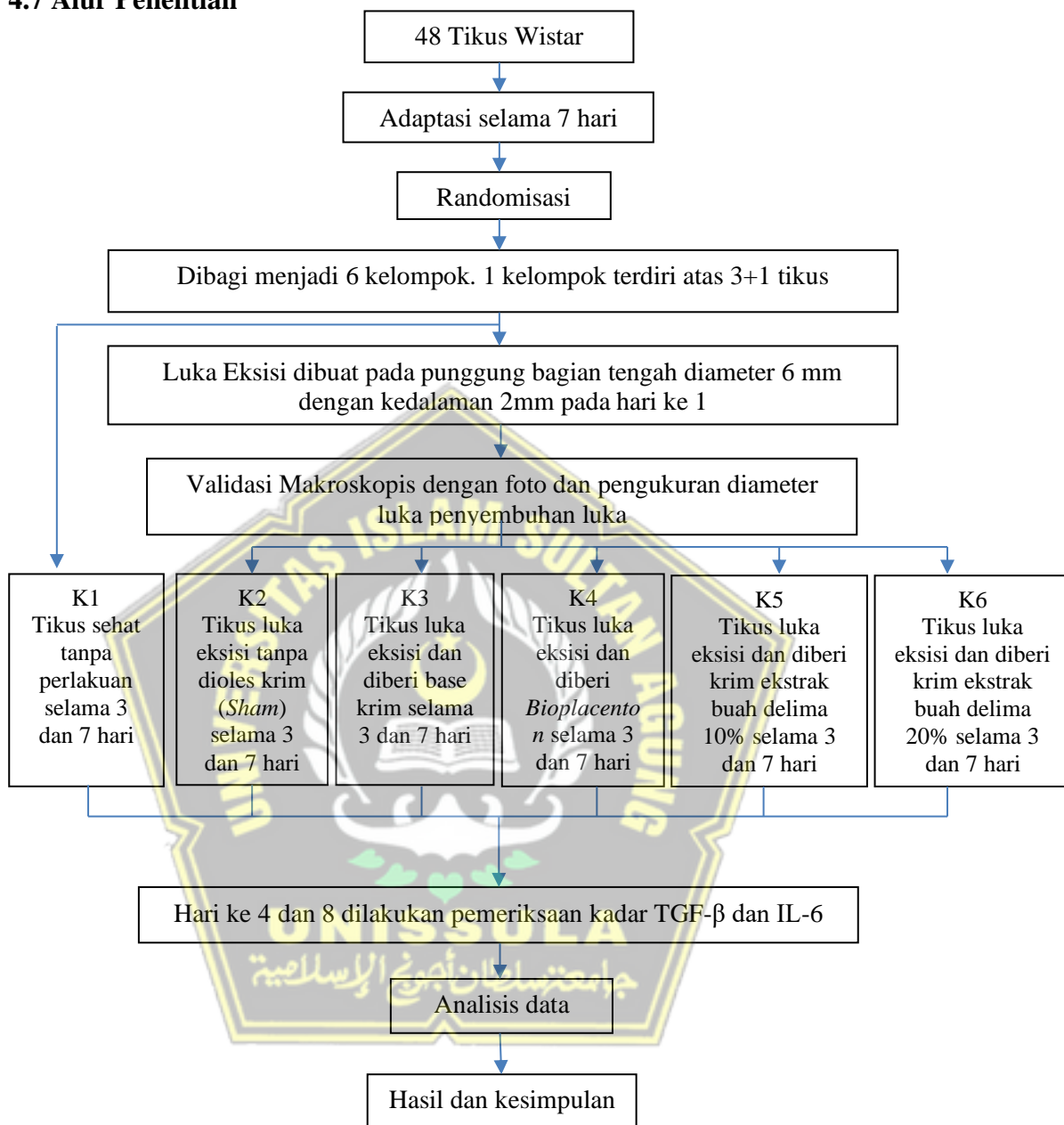
4. Ditambahkan *blocking buffer*, untuk membuat antigen pada sampel menempel pada plate.
5. Inkubasi plate selama 60 menit, pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C, Masukkan 10 ul sampel dan 40 ul sampel diluent ke tiap sumuran. Sampel sebaiknya langsung dimasukkan ke dasar sumuran. Selanjutnya, dilakukan pencampuran sehingga sampel dan sampel diluent tercampur dengan baik.
6. Inkubasi plate selama 120 menit pada suhu ruangan, Tambahkan 100 ul biotinylated antibodi pada tiap sumuran.
7. Inkubasi plate selama 60 menit, pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.
8. Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3.
9. Tambahkan 100 ul ABC solution pada tiap sumuran, Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3.
10. Tambahkan 90 ul HRP-conjugate dan 90 ul TMB pada tiap sumuran, Inkubasi plate selama 30 menit, pada suhu 37°C, Selanjutnya ditambahkan 100 ul stop solution pada tiap sumuran, sehingga akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning.
11. Baca nilai OD (*optical density*) pada panjang gelombang 450 nm pada ELISA reader



12. Didapatkan hasil dari sampel jaringan kulit yang diberikan krim ekstrak buah delima.



#### 4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

#### 4.8 Metode Analisis Data

Data penelitian dilakukan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan homogenitas data dengan uji *Levene test*. Data yang dihasilkan normal dan homogen ( $P > 0,05$ ), maka dilakukan uji beda *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Data hasil yang didapat normal tetapi tidak homogen, maka dilakukan uji parametrik *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Namun hasil data tidak normal dan varian tidak homogen, keputusan untuk diterima atau ditolak hipotesis berdasarkan  $\alpha$  5 %. Pengolahan analisis data dengan menggunakan aplikasi SPSS seri ke 26.

#### 4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

##### 4.9.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang Jawa Tengah

##### 4.9.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Mei 2024

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

Penelitian melakukan analisis pengaruh krim ekstrak buah delima terhadap kadar TGF- $\beta$  dan IL-6 pada tikus model luka eksisi dengan total subjek berjumlah 48 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi 12 kelompok, terdiri dari 4 ekor tikus tiap kelompok. Subjek dibagi menjadi 6 kelompok pemeriksaan setelah perlakuan hari ke 3 dan 6 kelompok setelah perlakuan hari ke 7 perlakuan.

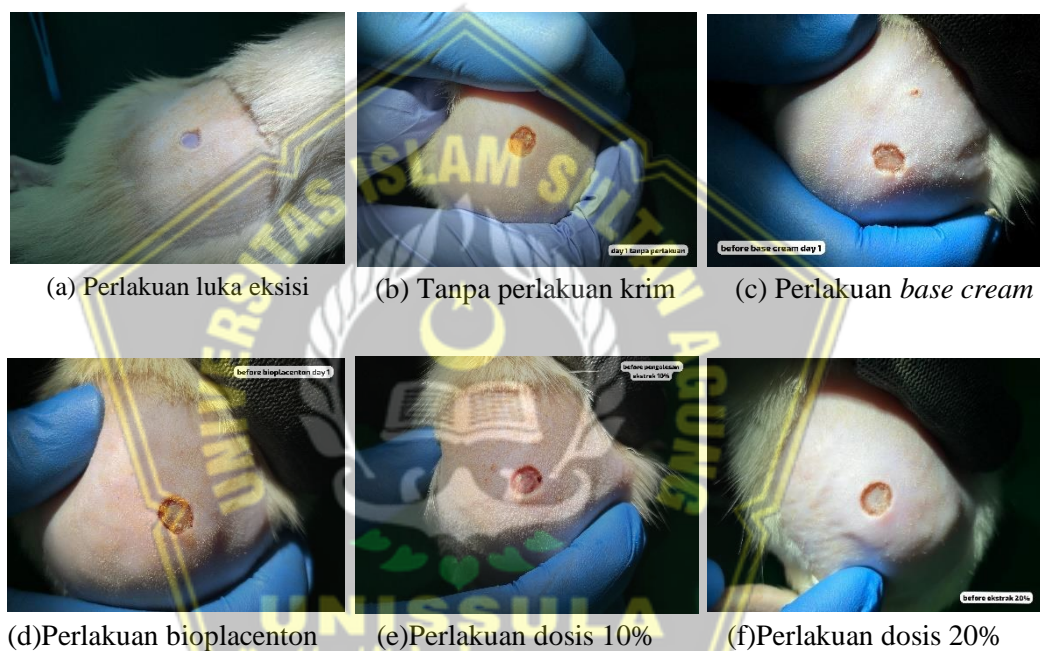
Pemeriksaan setelah perlakuan hari ke 3 terdiri atas kelompok normal (K1) tikus sehat tanpa perlakuan selama 3 hari, kelompok *sham* (K2) tikus luka eksisi tanpa dioles krim selama 3 hari, kelompok kontrol negatif (K3) tikus luka eksisi dan diberikan base krim selama 3 hari, kelompok kontrol positif (K4) tikus luka eksisi dan diberikan bioplacenton selama 3 hari, perlakuan 1 (K5) tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 10% selama 3 hari, dan perlakuan 2 (K6) tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 20% selama 3 hari. Sampel jaringan kulit diambil pada hari ke 4 untuk dilakukan pemeriksaan kadar TGF- $\beta$  dan IL-6.

Pemeriksaan setelah perlakuan hari ke 7 terdiri atas kelompok normal (K7) tikus sehat tanpa perlakuan selama 7 hari, Kelompok *sham* (K8) tikus luka eksisi tanpa dioles krim selama 7 hari, kelompok kontrol negatif (K9) tikus luka eksisi dan diberikan base krim selama 7 hari, kelompok kontrol positif (K10) tikus luka eksisi dan diberikan bioplacenton selama 7 hari, perlakuan 1 (K11) tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 10% selama 7 hari, Perlakuan 2 (K12) tikus

luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 20% selama 7 hari. Sampel jaringan kulit diambil pada hari ke 8 untuk dilakukan pemeriksaan kadar TGF- $\beta$  dan IL-6.

### 5.1.1 Gambaran makroskopis luka eksisi pada tiap kelompok perlakuan

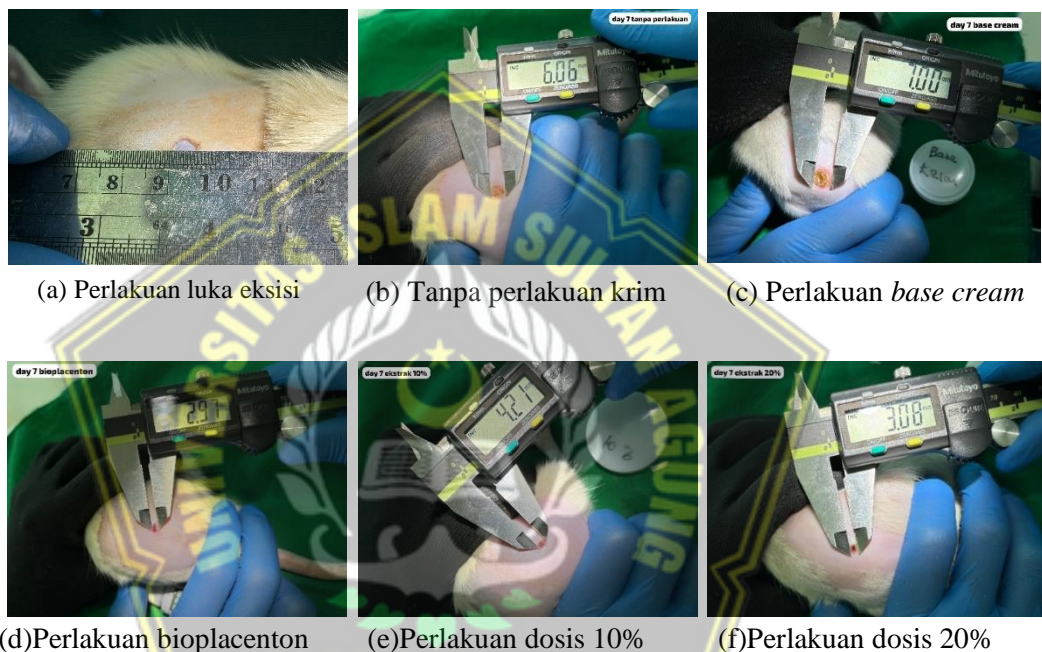
Gambaran makroskopis secara umum kondisi perlakuan luka eksisi pada setiap kelompok pada hari pertama seperti pada gambar 5.1 berikut:



Gambar 5.1 Makroskopis kondisi perlakuan luka eksisi pada setiap kelompok hari pertama

Gambaran makroskopis pengukuran luas luka eksisi setelah hari ke 7 perlakuan menunjukkan perbedaan pada kelompok luka eksisi tanpa perlakuan gambar (b) dengan diameter luas luka 6,06 mm, kelompok yang diberikan base cream gambar (c) dengan diameter luas luka 7,00mm, kelompok yang diberikan bioplacenta gambar (d) dengan diameter luas luka 2,97mm, kelompok yang diberikan krim ekstrak buah delima 10% gambar (e) dengan

diameter luka 4,21 mm, dan kelompok yang diberikan krim ekstrak buah delima 20% gambar (f) dengan diameter luka 3,08mm. Secara makroskopis pemberian ekstrak buah delima 20% mempercepat penutupan luas luka mendekati diameter dengan pemberian bioplacenton pada hari ke 7 setelah perlakuan, seperti pada gambar 5.2 berikut



Gambar 5. 2 Makroskopis kondisi perlakuan luka eksisi pada setiap kelompok hari ketujuh

### 5.1.2 Hasil pemeriksaan kadar IL-6 jaringan kulit setelah hari ke 3 perlakuan

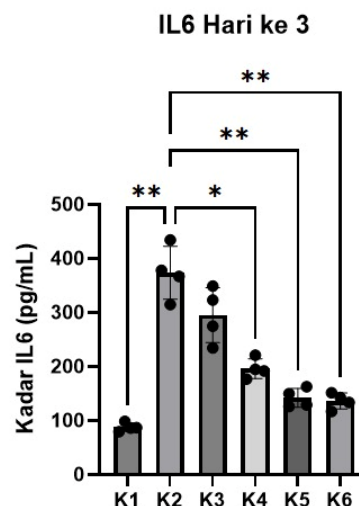
Hasil analisis rerata kadar IL-6 setelah hari ke 3 perlakuan pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil uji deskriptif rerata kadar IL-6 dan uji *One way anova* setelah hari ke 3 perlakuan

Kelompok	Tikus sehat K1	Tikus Sham K2	Base cream K3	Bioplac enton K4	Dosis 10% K5	Dosis 20% K6	P value
<b>Kadar IL-6 pg/mL</b>							
Mean	87,73	372,59	295,29	196,15	141,89	136,20	
SD	±7,94	±48,93	±50,85	±18,23	±17,64	±14,75	
<i>Shapiro-Wilk</i>	*0,567	*0,894	*0,823	*0,671	*0,423	*0,883	
<i>Leuvene Test</i>							0,043
<i>One way anova</i>							*0,000

Keterangan: \* *Shapiro-Wilk* = Normal ( $p > 0,05$ )  
 \* *Leuvene Test* = Homogen ( $p > 0,05$ )  
 \* *One way anova* = Signifikan ( $p < 0,05$ )

Hasil rerata kadar IL-6 dilakukan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil pada semua kelompok terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas data dengan *Leuvene Test* memiliki varian data yang tidak homogen dengan hasil 0,043 ( $p > 0,05$ ). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, dilakukan uji *One way anova* dengan hasil 0,000 ( $< 0,05$ ) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan kadar IL-6 antar kelompok perlakuan pada hari ke 3 setelah perlakuan.



Gambar 5.3 Grafik rerata kadar IL-6 antar kelompok setelah hari ke 3 perlakuan

Perbandingan antar kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok K1 dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan dengan peningkatan rerata kadar IL-6, Kelompok sham K2 menunjukkan perbedaan signifikan terjadinya penurunan rerata kadar IL-6 dengan kelompok perlakuan krim ekstrak 10% (K5) dan kelompok 20% (K6).

Perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan, kemudian dibuktikan dengan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingan antar kelompok yang paling berpengaruh. Hasil uji *Post hoc tamhane* ditunjukkan pada tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2 Hasil uji *Post hoc Tamhane* kadar IL-6 jaringan kulit tikus pasca luka eksisi setelah perlakuan hari ke 3

Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,002	0,051	0,550	*0,020	*0,343
K2	-	0,856	0,302	*0,051	*0,023
K3	-	-	0,942	0,838	0,401
K4	-	-	-	1,000	1,000
K5	-	-	-	-	0,969

Keterangan: \* Bermakna  $p < 0,05$

Perbandingan rerata kadar IL-6 kelompok tikus tanpa perlakuan krim (K2) berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 10% (K5) 0,051 ( $p < 0,05$ ) dan kelompok perlakuan yang diberikan krim ekstrak buah delima dosis 20% (K6) 0,051 ( $p < 0,05$ ). Kelompok (K5) menunjukkan perbedaan paling signifikan dengan rerata kadar IL-6 paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima memberikan pengaruh menurunkan kadar IL-6 di hari ke 3 setelah perlakuan.



### 5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar IL-6 jaringan kulit setelah hari ke 7 perlakuan

Hasil analisis rerata kadar IL-6 setelah hari ke 7 perlakuan pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.3 Hasil uji deskriptif rerata kadar IL-6 dan uji *One way anova* setelah hari ke 7 perlakuan

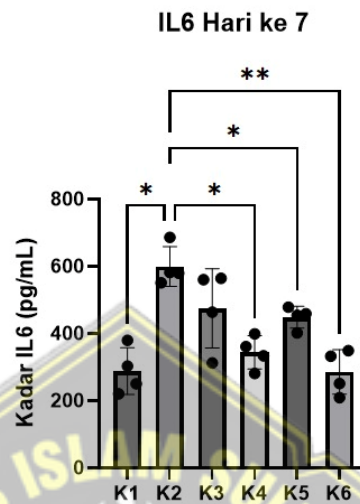
Kelompok	Tikus sehat K1	Tikus Sham K2	Base cream K3	Bioplac enton K4	Dosis 10% K5	Dosis 20% K6	<i>P value</i>
<b>Kadar IL-6 pg/mL</b>							
Mean	288,20	599,66	475,09	343,77	448,23	285,48	
SD	±69,76	±59,54	±118,08	±49,62	±32,73	±66,45	
<i>Shapiro-Wilk</i>	*0,761	*0,149	*0,242	*0,972	*0,375	*0,471	
<i>Leuvene Test</i>							*0,228
<i>One way anova</i>							0,000

Keterangan: \* *Shapiro-Wilk* = Normal ( $p > 0,05$ )  
 \* *Leuvene Test* = Homogen ( $p > 0,05$ )  
 \* *One way anova* = Signifikan ( $p < 0,05$ )

Hasil rerata kadar IL-6 dilakukan uji *Shapiro wilk* didapatkan hasil data rerata terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas data dengan *Leuvene test* memiliki varian data yang homogen 0,228 ( $p > 0,05$ ). Hasil data yang terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji *One way anova* dengan hasil 0,000 ( $< 0,05$ ) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan terhadap kadar IL-6 antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan tabel 5.3 menunjukkan bahwa hasil rerata kadar IL-6 setelah perlakuan hari ke 7 pada kelompok sehat (K7) sebesar 288,20 pg/mL, kelompok *sham* (K8) 599,65 pg/mL, kelompok *base cream* (K9) 475,09 pg/mL, kelompok *bioplacenton* (K10) 343,77 pg/mL, kelompok dosis 10% (K11) 448,22 pg/mL dan kelompok dosis 20% (K12) 285,47 pg/mL. Kadar IL-

6 paling rendah pada kelompok tikus sehat (K12) dan kadar IL-6 paling tinggi pada kelompok *sham* (K8).



Gambar 5.4 Grafik rerata kadar IL-6 antar kelompok hari ke 7 setelah perlakuan

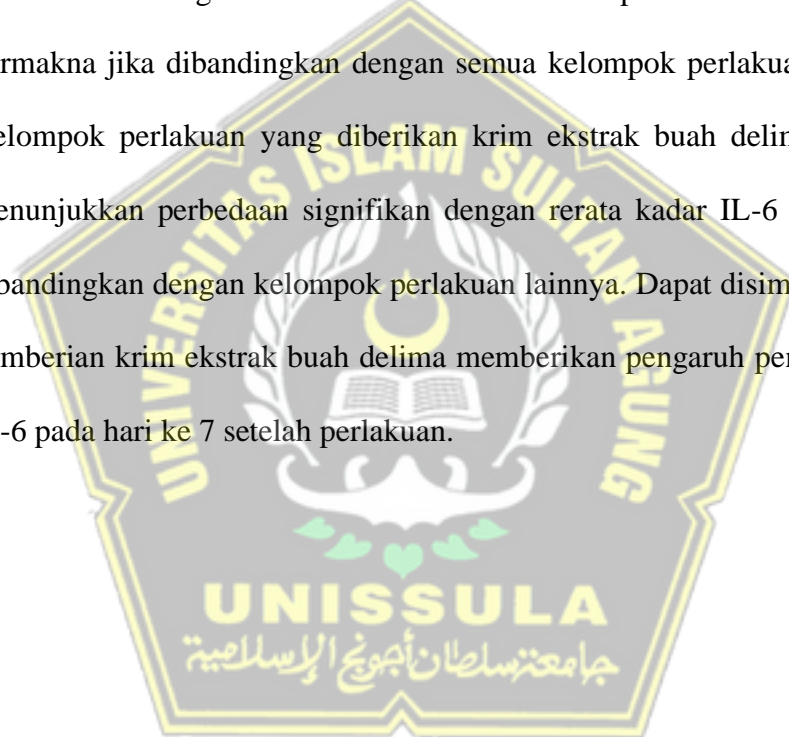
Perbandingan antar kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan kelompok tikus sehat dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan yang mengalami peningkatan rerata kadar IL-6, Kelompok perlakuan krim ekstrak 20% menunjukkan hasil rerata kadar IL-6 paling rendah, sama dengan kelompok perlakuan dengan bioplacenton dengan nilai uji *Post hoc LSD* 0,000 ( $<0,05$ ). Dapat disimpulkan pemberian krim ekstrak buah delima efektif menurunkan kadar IL-6 sama dengan perlakuan dengan pemberian bioplacenton pada hari ke 7 setelah perlakuan, seperti terlampir pada tabel 5.4 berikut ini:

Tabel 5.4 Hasil uji *Post hoc* LSD kadar IL-6 jaringan kulit tikus pasca luka eksisi setelah perlakuan hari ke 7

<b>Kelompok</b>	<b>K2</b>	<b>K3</b>	<b>K4</b>	<b>K5</b>	<b>K6</b>
<b>K1</b>	*0,000	*0,002	0,283	*0,005	0,957
<b>K2</b>	-	*0,023	*0,000	*0,007	*0,000
<b>K3</b>		-	*0,018	0,600	*0,001
<b>K4</b>			-	*0,052	0,261
<b>K5</b>				-	*0,005

Keterangan: \* Bermakna  $p < 0,05$

Perbandingan rerata kadar IL-6 kelompok tikus sehat berbeda bermakna jika dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan luka eksisi. Kelompok perlakuan yang diberikan krim ekstrak buah delima dosis 20% menunjukkan perbedaan signifikan dengan rerata kadar IL-6 paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima memberikan pengaruh penurunan kadar IL-6 pada hari ke 7 setelah perlakuan.



#### 5.1.4 Hasil pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ jaringan kulit setelah hari ke 3 perlakuan

Hasil analisis rerata kadar TGF- $\beta$  setelah hari ke 3 perlakuan pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada tabel 5.5 sebagai berikut:

Tabel 5.5 Hasil uji deskriptif rerata kadar TGF- $\beta$  dan uji *one way anova* setelah hari ke 3 perlakuan

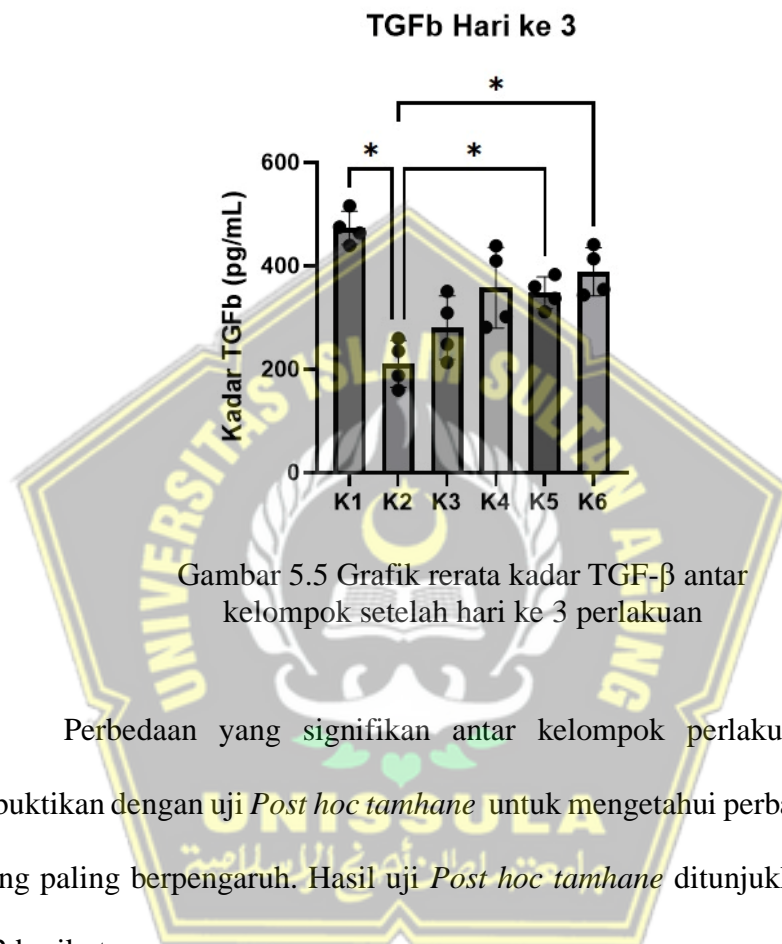
Kelompok	Tikus sehat K1	Tikus Sham K2	Base cream K3	Bioplac enton K4	Dosis 10% K5	Dosis 20% K6	P value
<b>Kadar TGF-<math>\beta</math> pg/mL</b>							
Mean	473,65	210,57	280,38	357,78	347,88	388,36	
SD	$\pm 31,95$	$\pm 45,24$	$\pm 61,39$	$\pm 78,08$	$\pm 30,89$	$\pm 46,75$	
<i>Shapiro-Wilk</i>	*0,831	*0,760	*0,819	*0,309	*0,985	*0,421	
<i>Leuvene Test</i>							0,012
<i>One way anova</i>							*0,000

Keterangan: \* *Shapiro-Wilk* = Normal ( $p > 0,05$ )  
 \* *Leuvene Test* = Homogen ( $p > 0,05$ )  
 \* *One way anova* = Signifikan ( $p < 0,05$ )

Rerata kadar TGF- $\beta$  dilakukan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas data dengan uji *Leuvene Test* memiliki variasi data yang tidak homogen dengan hasil 0,012 ( $p > 0,05$ ). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, dilakuakn uji *One way anova* dengan hasil 0,000 ( $< 0,05$ ) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan terhadap rerata kadar TGF- $\beta$  antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan tabel 5.5 menunjukkan bahwa hasil rerata kadar TGF- $\beta$  setelah perlakuan hari ke 3 pada kelompok sehat (K1) sebesar 473,65 pg/mL, kelompok *sham* (K2) 210,57 pg/mL, kelompok *base cream* (K3) 280,38 pg/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 357,78 pg/mL, kelompok dosis 10% (K5)

347,88 pg/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 388,36 pg/mL. Kadar TGF- $\beta$  paling rendah pada kelompok sham (K2) dan kadar TGF- $\beta$  paling tinggi pada kelompok krim ekstrak buah delima dosis 10% (K5).



Perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan, kemudian dibuktikan dengan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingan dosis yang paling berpengaruh. Hasil uji *Post hoc tamhane* ditunjukkan pada tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.6 Hasil uji *tamhane* kadar TGF- $\beta$  jaringan kulit tikus pasca luka eksisi setelah perlakuan hari ke 3

Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,016	*0,049	*0,005	*0,064	*0,042
K2	-	0,654	0,043	*0,017	*0,019
K3		-	0,303	0,084	0,084
K4			-	0,076	*0,037
K5				-	1,000

Keterangan: \* Bermakna  $p < 0,05$

Perbandingan rerata kadar TGF- $\beta$  kelompok tikus sehat berbeda

bermakna jika dibandingkan dengan semua kelompok K1, K2, dan K4. Kelompok perlakuan yang diberikan krim ekstrak buah delima dosis 20% menunjukkan peningkatan rerata kadar TGF- $\beta$  paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima memberikan pengaruh peningkatan kadar TGF- $\beta$  pada hari ke 3 setelah perlakuan.

### 5.1.5 Hasil pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ jaringan kulit setelah hari ke 7 perlakuan

Hasil analisis rerata kadar TGF- $\beta$  setelah hari ke 7 perlakuan pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada tabel 5.7 sebagai berikut:

Tabel 5.7 Hasil uji deskriptif rerata kadar TGF- $\beta$  dan uji *one way anova* setelah hari ke 7 perlakuan

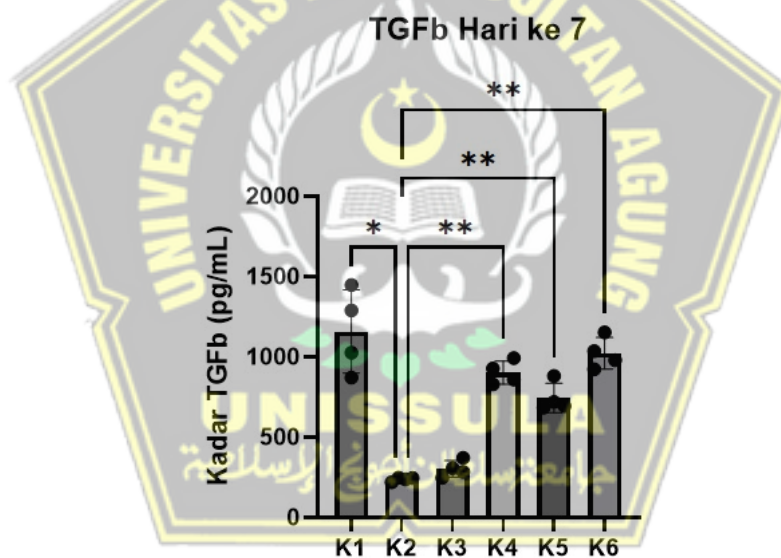
Kelompok	Tikus sehat K1	Tikus Sham K2	Base cream K3	Bioplac enton K4	Dosis 10% K5	Dosis 20% K6	P value
<b>Kadar TGF-<math>\beta</math> pg/mL</b>							
Mean	1158,27	237,15	302,11	901,76	744,61	1022,57	
SD	$\pm 258,69$	$\pm 12,89$	$\pm 51,77$	$\pm 73,06$	$\pm 91,77$	$\pm 98,53$	
Shapiro-Wilk	*0,804	*0,378	*0,890	*0,769	*0,051	*0,827	
Leuvene Test							0,000
One way anova							* 0,000

Keterangan: \* Shapiro-Wilk = Normal ( $p > 0,05$ )  
 \* Leuvene Test = Homogen ( $p > 0,05$ )  
 \* One way anova = Signifikan ( $p < 0,05$ )

Rerata kadar TGF- $\beta$  dilakukan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas data dengan *Leuvene Test* memiliki variasi data yang tidak homogen dengan hasil 0,000 ( $p > 0,05$ ). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, dilakuakn uji *One way*

*anova* dengan hasil 0,000 ( $<0,05$ ) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan terhadap kadar TGF- $\beta$  antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan tabel 5.7 menunjukkan bahwa hasil rerata kadar TGF- $\beta$  setelah perlakuan hari ke 7 pada kelompok sehat (K7) sebesar 1158,27 pg/mL, kelompok *sham* (K8) 237,15 pg/mL, kelompok *base cream* (K9) 302,11 pg/mL, kelompok *bioplacenton* (K10) 901,77 pg/mL, kelompok dosis 10% (K5) 744,61 pg/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 1022,57 pg/mL. Kadar TGF- $\beta$  paling rendah pada kelompok *sham* (K2) dan kadar TGF- $\beta$  paling tinggi pada kelompok tikus sehat (K7).



Gambar 5. 6 Grafik rerata kadar TGF- $\beta$  antar kelompok perlakuan setelah hari ke 7

Perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan, kemudian dibuktikan dengan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingan dosis yang paling berpengaruh. Hasil uji *Post hoc tamhane* ditunjukkan pada tabel 5.8 berikut:

Tabel 5.8 Hasil uji *tamhane* kadar TGF- $\beta$  jaringan kulit tikus pasca luka eksisi setelah perlakuan hari ke 7

Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,000	*0,000	*0,000	*0,000	*0,001
K2	-	*0,009	1,000	*0,003	*0,000
K3		-	*0,013	*0,012	*0,012
K4			-	*0,000	*0,006
K5				-	1,000

Keterangan: \* Bermakna  $p < 0,05$

Perbandingan rerata kadar TGF- $\beta$  kelompok tikus sehat (K7) berbeda bermakna jika dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan luka eksisi. Kelompok perlakuan yang diberikan krim ekstrak buah delima menunjukkan perbedaan paling signifikan dengan rerata kadar TGF- $\beta$  paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima memberikan pengaruh peningkatan kadar TGF- $\beta$  pada hari ke 7 setelah perlakuan.

## 5.2 Pembahasan

Hasil penelitian secara makroskopis dengan pemberian ekstrak buah delima 20% mempercepat penutupan luas luka mendekati diameter dengan kelompok yang diberikan *bioplacenton*. Luka yang dimulai dengan fase homeostasis, mencakup drainase sistem limfatik dan mencegah pendarahan. Kemudian, fase inflamasi berlangsung selama 1 hingga 3 hari, dan fase proliferasi yang berlangsung hari ke 4 hingga hari 14.<sup>66</sup> Pengamatan pada transisi dari fase inflamasi yang dilakukan di hari ke 3 setelah perlakuan dan fase proliferasi di hari ke 7 setelah perlakuan dianggap tepat untuk dilakukan analisis pada parameter IL-6 dan TGF- $\beta$ .

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh penurunan kadar IL-6 di hari ke



3 setelah perlakuan, pemberian krim ekstrak buah delima dosis 20% memberikan pengaruh paling rendah dibandingkan kelompok lainnya. Pemeriksaan pada hari ke 7 setelah perlakuan juga menunjukkan penurunan dengan pemberian krim ekstrak buah delima menyamai kelompok perlakuan dengan *bioplacenton*. Sejalan dengan penelitian menggunakan ekstrak kulit buah delima yang diuji aktivitas penyembuhan lukanya pada tikus menggunakan model luka eksisi. Hewan yang diberi ekstrak menunjukkan pengurangan area luka, luka yang diberi ekstrak ternyata mengalami epitelisasi lebih cepat dibandingkan dengan kontrol.<sup>11</sup>

Transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi merupakan fase yang sangat penting dalam penyembuhan luka.<sup>67</sup> Peradangan akut sebagian besar dimediasi oleh IL-6, yang juga diperlukan untuk penyembuhan luka. Sitokin proinflamasi dilepaskan oleh makrofag jaringan, keratinosit, sel endotel, dan sel stroma ketika IL-6 dilepaskan pada awal respons terhadap cedera. Juga ditemukan bahwa IL-6 menyebabkan leukosit bermigrasi menuju luka. Pensinyalan IL-6 bertugas memicu transisi ke lingkungan reparatif saat peradangan meningkat.<sup>27 28</sup> Respon inflamasi sangat penting dalam penutupan luka, dan gangguan pada jalur sinyal IL-6 dapat menghambat penyembuhan luka. Oleh karena itu, peran IL-6 dalam penyembuhan luka kulit sangat penting. Karena makrofag M1 adalah pengeksresi IL-6 pada luka, IL-6 mengatur polarisasi M2 dengan menginduksi produksi IL-4 sel Th2 dan IL-4R pada makrofag. Makrofag M2 khususnya adalah sekretor utama sitokin proliferasi seperti TGF- $\beta$ .<sup>34</sup>

Hasil rerata kadar TGF- $\beta$  dengan pemberian krim ekstrak buah delima memberikan pengaruh peningkatan pada hari ke 3 setelah perlakuan dan bertahan pada hari ke 7 setelah perlakuan. Kelompok *sham* (K8) dan kelompok *base cream* (K9) mengalami penurunan rerata kadar TGF- $\beta$  pada hari ke 7 setelah perlakuan, namun mengalami peningkatan pada kelompok lainnya (K10, K11 dan K12), Peningkatan kadar TGF- $\beta$  pada perlakuan krim ekstrak buah delima dosis 20% menunjukkan peningkatan paling efektif dibandingkan dengan kelompok *bioplacenton* yang disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima 20% terhadap kadar TGF- $\beta$  lebih baik dari *bioplacenton*.

Fase proliferasi yang berlangsung selama 4-14 hari yaitu pada hari ke 7 setelah perlakuan menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan hari ke 3 setelah perlakuan. Fase reparatif dipengaruhi oleh perpindahan makrofag M1 ke M2. Proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur, setidaknya sebagian, dikontrol oleh produksi faktor pertumbuhan untuk reepitelisasi luka.<sup>68</sup> TGF- $\beta$  mempengaruhi proses kematian sel, migrasi, diferensiasi, dan proliferasi secara pleiotropik.<sup>20</sup> Jalur pensinyalan TGF- $\beta$  mempunyai dampak besar pada diferensiasi sel. Sinyal yang terkait dengan proliferasi sel diaktifkan oleh TGF- $\beta$ .<sup>25</sup>

Deteksi tahap awal terjadinya luka, serta pemberian intervensi menggunakan krim ekstrak buah delima dapat menjadi pengganti atau alternatif yang menjanjikan, namun penelitian ini tidak mengamati akhir fase proliferasi di hari ke 14, dan tidak mengamati timbulnya bekas luka maupun pembentukan keloid yang terjadi. Penelitian ini tidak melakukan uji klinis pada

manusia sehingga penelitian selanjutnya dapat dilakukan uji klinis menggunakan krim ekstrak buah delima.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

6.1.1. Pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) berpengaruh terhadap peningkatan kadar TGF- $\beta$  pada tikus pasca luka eksisi

6.1.2. Pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) berpengaruh terhadap penurunan kadar IL-6 pada tikus pasca luka eksisi

#### 6.2. Saran

6.2.1. Penelitian berikutnya perlu dilakukan dengan mengganti formulasi krim ekstrak buah delima dengan formulasi gel atau serum untuk membandingkan efektifitas penyembuhan pada kondisi luka kronis

6.2.2. Penelitian berikutnya dapat melakukan uji klinis dengan penggunaan krim ekstrak buah delima, maupun pada kondisi luka kronis dengan perlakuan yang lebih lama serta mengamati dan memantau timbulnya bekas luka maupun pembentukan keloid terhadap parameter yang dianalisis

## DAFTAR PUSTAKA

1. Almadani YH, Vorstenbosch J, Davison PG, Murphy AM. Wound Healing: A Comprehensive Review. *Semin Plast Surg.* 2021;35(3):141-144. doi:10.1055/s-0041-1731791
2. Mahdi M, Nassireslami E, Asadi M, Dadpay M. Evaluation of wound healing activities of pomegranate (*Punica granatum*-Lythraceae) peel and pulp. *Journal of Research in Medical and Dental Science* /. 2018;6(3). doi:10.24896/jrmds.20186336
3. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):482-491. doi:10.1089/wound.2013.0466
4. Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- $\kappa$ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-92941-2
5. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- $\alpha$  production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994-1001. doi:10.1038/jid.2008.332
6. Ayu K, Erika A, Mas A, Batari UA, Watampone T. Pengaruh Pemberian Krim Topikal Ekstrak Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) Pada Luka Akut Terhadap Kadar Interleukin-6 Fase Inflamasi Pada Wistar.; 2018. <https://www.researchgate.net/publication/323545270>
7. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/9158016
8. Akbarnejad F. Dermatology Benefits of *Punica Granatum*: A Review of the Potential Benefits of *Punica Granatum* in Skin Disorders. *Asian Journal of Green Chemistry.* 2023;7(3):208-222. doi:10.22034/ajgc.2023.388077.1388
9. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon.* 2023;9(3). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13580
10. Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. Evaluation of wound healing potential of pomegranate (*Punica granatum*) whole fruit extract on skin burn wound in rats (*Rattus norvegicus*). *J Adv Vet Anim Res.* 2019;6(2):202-207. doi:10.5455/javar.2019.f333
11. Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. *J Med Food.* 2013;16(9):857-861. doi:10.1089/jmf.2012.0229
12. Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. Anti-inflammatory

- activity of *Punica granatum* L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;112:30-37. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.014
13. Wu S, Tian L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*punica granatum*). *Molecules*. 2017;22(10). doi:10.3390/molecules22101606
  14. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
  15. Kiritsi D, Nyström A. The role of TGF $\beta$  in wound healing pathologies. *Mech Ageing Dev*. 2018;172:51-58. doi:10.1016/j.mad.2017.11.004
  16. Busman B, Novera Y. Efektifitas Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punicagranatum*) Secara Topikal Terhadap Proses Pembentukan Kembali (Remodelling) Pada Fraktur Tulang Paha Tikus Putih Galur Wistar Betina (*Rattusnorvegicus*). *Menara Ilmu*. 2019;XIII(10).
  17. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, et al. TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS Journal*. Published online June 1, 2016:2219-2232. doi:10.1111/febs.13665
  18. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
  19. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):482-491. doi:10.1089/wound.2013.0466
  20. Oshimori N, Fuchs E. The harmonies played by TGF- $\beta$  in stem cell biology. *Cell Stem Cell*. 2012;11(6):751-764. doi:10.1016/j.stem.2012.11.001
  21. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(1):47-63. doi:10.1002/wdev.86
  22. Wang L, Wang HL, Liu TT, Lan HY. TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15). doi:10.3390/ijms22157881
  23. Zhang YE. Non-Smad signaling pathways of the TGF- $\beta$  family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(2). doi:10.1101/cshperspect.a022129
  24. Salm S, Burger PE, Wilson EL. TGF- $\beta$  and stem cell factor regulate cell proliferation in the proximal stem cell niche. *Prostate*. 2012;72(9):998-1005. doi:10.1002/pros.21505
  25. Aisyah R, Jatmiko SW. Jalur Sinyal TGF- $\beta$  Berperan Dalam Self Renewal, Diferensiasi, Dan Proliferasi Stem Cell. *Saintika Medika*. 2019;15(1):50. doi:10.22219/sm.vol15.smumm1.8002
  26. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med*. 2021;53(7):1116-1123. doi:10.1038/s12276-021-00649-0
  27. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and

- IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2014;53(7):1321-1331. doi:10.1093/rheumatology/keu035
28. Shen TNY, Kanazawa S, Kado M, et al. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PLoS One*. 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0178232
  29. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
  30. Nishimoto N, Yoshizaki K, Tagoh H, et al. *Elevation of Serum Interleukin 6 Prior to Acute Phase Proteins on the Inflammation by Surgical Operation*. Vol 50.; 1989.
  31. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603
  32. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
  33. Heinrich PC, Castell J V, Andust T. *And the Acute Phase Response*. Vol 265.; 1990.
  34. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
  35. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
  36. Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, Fan C. Wound healing and the use of medicinal plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/2684108
  37. Prastika DD, Setiawan B, Saputro AL, Yudaniayanti IS, Wibawati PA, Fikri F. Effect of Shrimp Chitosan Topically on Collagen Density as Excision Wound Healing Parameter in Albino Rats. *Jurnal Medik Veteriner*. 2020;3(1):101-107. doi:10.20473/jmv.vol3.iss1.2020.101-107
  38. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(3):514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
  39. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741
  40. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122(18):3209-3213. doi:10.1242/jcs.031187
  41. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2009;6(3):351-356.

- doi:10.1093/ecam/nem127
42. Martin P. *Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration*. <http://science.sciencemag.org/>
  43. Gurtner G, Wong VW. Wound healing: normal and abnormal. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 2007;6:15-22.
  44. Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012;45(2):364-373. doi:10.4103/0970-0358.101319
  45. Lima A, Silva J, Oliveira LS, et al. *Ascorbic Acid for the Healing of Skin Wounds in Rats*. Vol 69.; 2009.
  46. Anderson J. The cellular cascades of wound healing. *Bone Engineering*. Published online 2000:81-94.
  47. Bennett MNT, Schultz PGS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *The American journal of surgery*. Published online 1993:74-81.
  48. Murphy PS, Evans GRD. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plast Surg Int*. 2012;2012:1-8. doi:10.1155/2012/190436
  49. Almadani YH, Vorstenbosch J, Davison PG, Murphy AM. Wound Healing: A Comprehensive Review. *Semin Plast Surg*. 2021;35(3):141-144. doi:10.1055/s-0041-1731791
  50. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741
  51. Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A. Skin wound healing and phytomedicine: A review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(6):303-310. doi:10.1159/000357477
  52. Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *J Nutr Metab*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/5297162
  53. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on Punica granatum L. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016;21(3):221-227. doi:10.1177/2156587215598039
  54. Akbarnejad F. Dermatology Benefits of Punica Granatum: A Review of the Potential Benefits of Punica Granatum in Skin Disorders. *Asian Journal of Green Chemistry*. 2023;7(3):208-222. doi:10.22034/ajgc.2023.388077.1388
  55. Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum. *J Med Food*. 2013;16(9):857-861. doi:10.1089/jmf.2012.0229
  56. Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;112:30-37. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.014
  57. Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. Evaluation of wound healing potential of pomegranate (Punica



- granatum) whole fruit extract on skin burn wound in rats (*Rattus norvegicus*). *J Adv Vet Anim Res.* 2019;6(2):202-207. doi:10.5455/javar.2019.f333
58. Mahdi Mirghazanfari S, Nassireslami E, Sheikh Asadi M, Dadpay M. Evaluation of wound healing activities of pomegranate (*Punica granatum*-Lythraceae) peel and pulp. *Journal of Research in Medical and Dental Science* /. 2018;6(3). doi:10.24896/jrmds.20186336
  59. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines.* 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
  60. Fujiwara T, Duscher D, Rustad KC, et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency impairs wound healing in advanced age by reducing neovascularization and fibroblast function. *Exp Dermatol.* 2016;25(3):206-211. doi:10.1111/exd.12909
  61. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol.* 2015;3(2):57-70. doi:10.3390/jdb3020057
  62. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *JKK.* 2017;4(1):39-48.
  63. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology.* 2018;217(6):1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007
  64. Kawaguchi Y. Contribution of interleukin-6 to the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* 2017;2:S6-S12. doi:10.5301/jsrd.5000258
  65. Sari N, Samsul E, Narsa AC. Pengaruh Trietanolamin pada Basis Krim Minyak dalam Air yang Berbahan Dasar Asam Stearat dan Setil Alkohol. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences.* 2021;14:70-75. doi:10.25026/mpc.v14i1.573
  66. Putra A, Alif I, Hamra N, et al. MSC-Released TGF- $\beta$  Regulate  $\alpha$ -SMA Expression of Myofibroblast during Wound Healing. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine.*; 2020.
  67. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/9158016
  68. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(2):65-78. doi:10.1089/wound.2014.0608