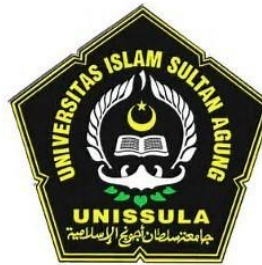


**PENGARUH KRIM TOPIKAL EKSTRAK DELIMA
(*Punica granatum*) TERHADAP KADAR SOD DAN
TNF- α PADA TIKUS WISTAR
MODEL LUKA EKSISI**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Retta Adhimarta Atmaja

MBK.23.21.010370

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

TESIS

**PENGARUH KRIM TOPIKAL EKSTRAK DELIMA
(*Punica granatum*) TERHADAP KADAR SOD DAN
TNF- α PADA TIKUS WISTAR
MODEL LUKA EKSISI**

disusun oleh

Retta Adhimarta Atmaja

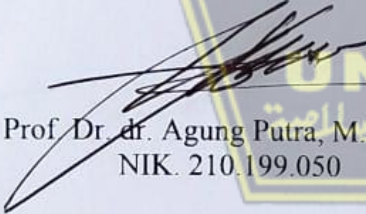
MBK.23.21.010370


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

Menyetujui.

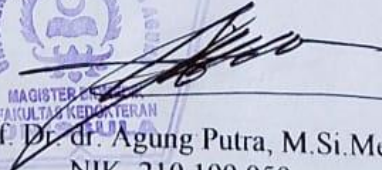
Pembimbing 1

Pembimbing 2


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


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

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



Retta Adhimarta Atmaja

KATA PENGANTAR

Puji syukur keadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul **“PENGARUH KRIM TOPIKAL EKSTRAK DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP KADAR SOD DAN TNF- α PADA TIKUS WISTAR MODEL 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:

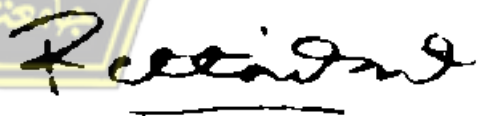
1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA dan selaku penguji III 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 I dalam penelitian yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini
4. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E, FINSADV, FAADV selaku penguji I yang memberikan arahan serta saran dalam

menyelesaikan proposal tesis ini.

6. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B selaku penguji II yang memberikan arahan serta saran dalam menyelesaikan tesis ini.
7. Pada dosen pengajar dan staf Prodi Magister Ilmu Biomedik yang banyak membantu dan memberikan saran kepada penyusun.
8. dr. Miftahul Huda, MARS selaku 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 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



(Retta Adhimarta Atmaja)

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
KATA PENGANTAR	iii
RIWAYAT HIDUP.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Tumor necrosis factor alpha</i> (TNF- α).....	7
2.1.1 Jalur aktivasi TNF- α	8
2.2 <i>Superoxide dismutase</i> (SOD)	10
2.2.1 Mekanisme kerja SOD.....	10
2.3 Luka Eksisi	12

2.3.1 Proses penyembuhan luka.....	13
2.3.2 Klasifikasi Luka.....	14
2.3.3 Mekanisme molekuler pada Luka.....	16
2.3.4 Fisiologis penyembuhan luka	17
2.4 Delima (<i>Punica granatum</i>).....	23
2.4.1 Kandungan Buah Delima.....	25
2.5 Pengaruh pemberian krim ekstrak buah delima terhadap kadar SOD dan TNF- α pada luka eksisi.....	27
BAB III Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis	30
3.1 Kerangka teori	30
3.2 Kerangka konsep	33
3.3 Hipotesis Penelitian	33
BAB IV METODE PENELITIAN	34
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	34
4.1.1 Jenis dan rancangan penelitian	34
4.1.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	35
4.2 Besar Sampel.....	36
4.3 Teknik Sampling Penelitian	37
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	37
4.4.1 Variabel Penelitian.....	37
4.5 Definisi Operasional.....	37
4.6 Bahan dan reagen penelitian.....	38
4.6.1 Bahan Penelitian	38
4.6.2 Peralatan Penelitian.....	38
4.7 Cara Penelitian dan Alur Kerja.....	39

4.7.1 Perolehan izin etik penelitian.....	39
4.7.2 Cara Pembuatan Ekstrak Buah Delima.....	39
4.7.3 Persiapan Hewan Uji	40
4.7.4 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak buah delima.....	40
4.7.5 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit.....	41
4.7.6 Pemeriksaan Kadar SOD dan TNF- α Menggunakan Metode ELISA..	41
4.8 Alur Penelitian.....	44
4.9 Metode Analisa Data	45
4.10 Tempat dan Waktu Penelitian	45
4.10.1 Tempat Penelitian	45
4.10.2 Waktu Penelitian.....	45
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	46
5.1 Hasil Penelitian.....	46
5.1.1 Hasil pemeriksaan kadar TNF- α jaringan kulit pada hari ke 3.....	46
5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar TNF- α jaringan kulit pada hari ke 7.....	48
5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar SOD jaringan kulit pada hari ke 3.....	51
5.1.4 Hasil pemeriksaan kadar SOD jaringan kulit pada hari ke 7.....	53
5.1.1 Gambaran makroskopis pada luka eksisi antar kelompok.....	55
5.2 Pembahasan	56
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1. Kesimpulan.....	62
6.2. Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	68
1. Izin etik penelitian/ <i>Ethical Clearance</i>	68

2. Hasil pemeriksaan dengan metode ELISA	69
3. Lampiran uji statistik menggunakan SPSS 27.0	73
4. Dokumentasi penelitian.....	80

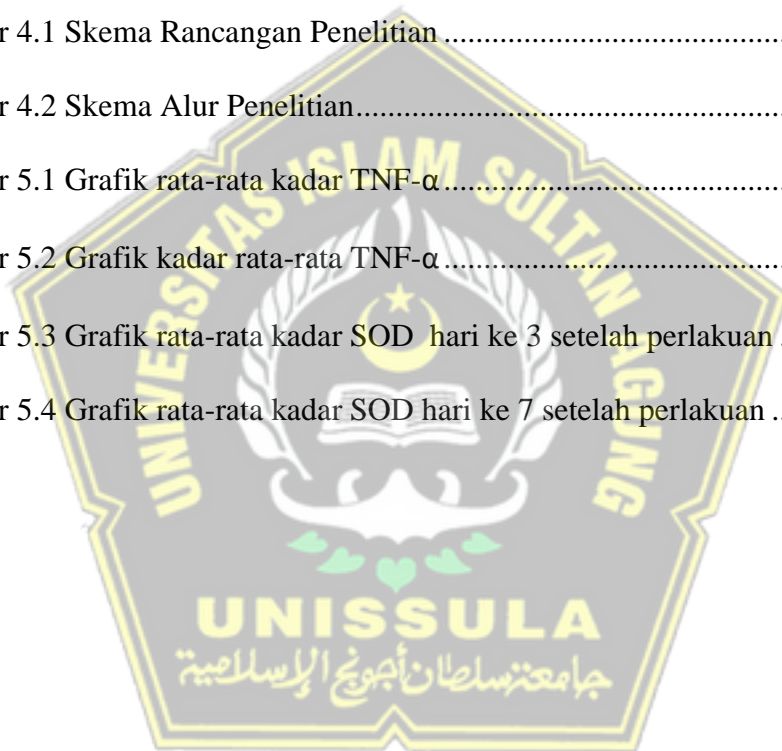


DAFTAR SINGKATAN

ADP	: <i>Adenosina difosfat</i>
AMP	: <i>Antimicrobial peptida</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
DISS	: <i>Dominance, influence, conscitieous, steadiness</i>
GST	: <i>Glutathione-S-transferase</i>
ICAM	: <i>Incident cause analysis method</i>
MAPK	: <i>Mitogen activation protein kinase</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinases</i>
NF-κB	: <i>Nuclear factor-kappaB</i>
NLR	: <i>Neutrofil limfosit ratio</i>
Nrf	: <i>Nuclear factor erythroid</i>
ROS	: <i>Spesies oksigen reaktif</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
TACE	: <i>Transcatheter arterial chemoembolization</i>
TGF-β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TLRs	: <i>Toll like receptor</i>
TNF-α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VCAM	: <i>Vascular cell adhesion molecule</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur pensinyalan TNF- α	9
Gambar 2.2 Alur molekuler penyembuhan luka.....	18
Gambar 2.3 Buah delima.....	25
Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori.....	32
Gambar 3.2 Skema Kerangka konsep.....	33
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	34
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	44
Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar TNF- α	47
Gambar 5.2 Grafik kadar rata-rata TNF- α	49
Gambar 5.3 Grafik rata-rata kadar SOD hari ke 3 setelah perlakuan.....	52
Gambar 5.4 Grafik rata-rata kadar SOD hari ke 7 setelah perlakuan.....	54



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1 Uji deskriptif rata-rata kadar TNF- α dan uji <i>One way anova</i>	46
Tabel 5.2 Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> hari 3 setelah perlakuan	48
Tabel 5.3 Uji deskriptif rata-rata kadar TNF- α dan uji <i>One way anova</i>	49
Tabel 5.4 Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> hari 7 setelah perlakuan	50
Tabel 5.5 Uji deskriptif rata-rata kadar SOD dan uji <i>One way anova</i>	51
Tabel 5.6 Uji deskriptif rata-rata kadar SOD dan uji <i>One way anova</i>	53
Tabel 5.7 Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> hari 7 setelah perlakuan	55



ABSTRAK

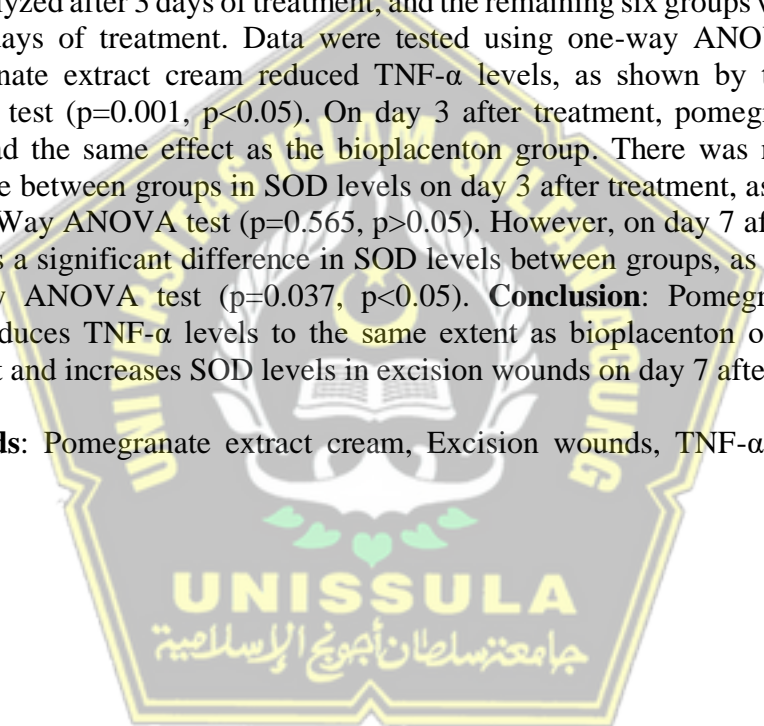
Latar Belakang: luka mengakibatkan kerusakan atau hilangnya komponen jaringan kulit. luka eksisi yang diakibatkan terpotongnya jaringan oleh goresan benda tajam, merespon dan memicu proses penyembuhan luka. Pemberian antioksidan secara eksogen menjadi penting salah satunya bersumber dari buah delima. Ekstrak buah delima memiliki kandungan antioksidan flavonoid, alkaloid, tanin, triterpen, dan saponin, berpotensi menjadi pengobatan baru untuk inflamasi. **Tujuan:** untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) terhadap kadar SOD dan TNF- α pada tikus wistar model luka eksisi. **Metode:** Eksperimen in-vivo dilakukan dengan membagi 48 tikus Wistar menjadi 12 kelompok dan melakukan analisis dalam dua tahap: enam kelompok dilakukan setelah hari ketiga perlakuan dan enam kelompok lagi dilakukan setelah hari ketujuh perlakuan. Data diuji dengan one-way anova. **Hasil:** Krim ekstrak buah delima menurunkan kadar TNF- α dengan uji *One Way Anova* 0,001 ($p < 0,05$) Pada hari ke 3 setelah perlakuan krim ekstrak buah delima memiliki pengaruh yang sama dengan kelompok yang menggunakan bioplacenton. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok terhadap kadar SOD di hari ke 3 setelah perlakuan dengan uji *One way anova* $p = 0,565$ ($< 0,05$), sedangkan pada hari ke 7 setelah perlakuan dengan uji *One way anova* 0,037 ($< 0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan kadar SOD antar kelompok. **Kesimpulan:** krim ekstrak buah delima menurunkan kadar TNF- α sama dengan bioplacenton dihari ke 3 setelah perlakuan dan meningkatkan kadar SOD luka eksisi pada hari ke 7 setelah perlakuan.

Kata Kunci: Krim ekstrak buah delima, Luka eksisi, Kadar TNF- α , Kadar SOD

ABSTRACT

Background: Wounds cause damage or loss of skin tissue components. Excision wounds, caused by cuts from sharp objects, trigger the wound healing process. The exogenous administration of antioxidants, such as those found in pomegranates, is crucial. Pomegranate extract contains antioxidants like flavonoids, alkaloids, tannins, triterpenes, and saponins, which have the potential to be a new treatment for inflammation. **Objective:** To investigate the effect of pomegranate extract cream (*Punica granatum*) on SOD and TNF- α levels in Wistar rats with 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: six groups were analyzed after 3 days of treatment, and the remaining six groups were analyzed after 7 days of treatment. Data were tested using one-way ANOVA. **Results:** Pomegranate extract cream reduced TNF- α levels, as shown by the One-Way ANOVA test ($p=0.001$, $p<0.05$). On day 3 after treatment, pomegranate extract cream had the same effect as the bioplacenton group. There was no significant difference between groups in SOD levels on day 3 after treatment, as indicated by the One-Way ANOVA test ($p=0.565$, $p>0.05$). However, on day 7 after treatment, there was a significant difference in SOD levels between groups, as shown by the One-Way ANOVA test ($p=0.037$, $p<0.05$). **Conclusion:** Pomegranate extract cream reduces TNF- α levels to the same extent as bioplacenton on day 3 after treatment and increases SOD levels in excision wounds on day 7 after treatment.

Keywords: Pomegranate extract cream, Excision wounds, TNF- α levels, SOD levels



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka mengakibatkan kerusakan atau hilangnya komponen jaringan kulit.¹ Salah satu jenis luka adalah luka eksisi yang diakibatkan terpotongnya jaringan oleh goresan benda tajam. Tubuh akan merespon dan memicu proses penyembuhan luka.² Neutrofil akan memicu mediator pro-inflamasi *Necrosis factor alpha* (TNF- α) yang bermanfaat untuk memulai inflamasi.³ Buah delima sebagai sumber antioksidan, berpotensi menjadi pengobatan baru untuk inflamasi yang disebabkan oleh berbagai kelainan kulit.⁴ Enzim antioksidan memiliki peran untuk setiap proses penyembuhan luka.⁵ *Reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan bersifat sitotoksik, keseimbangan redoks harus dikontrol secara ketat untuk mencapai penyembuhan luka yang normal. ROS yang dihasilkan oleh beberapa oksidase dan respirasi mitokondria harus direduksi terutama oleh enzim antioksidan seperti *Superoxide dismutase* (SOD).⁵ Pemberian antioksidan secara eksogen menjadi penting salah satunya bersumber dari buah delima. Ekstrak buah delima memiliki kandungan antioksidan flavonoid, alkaloid, tanin, triterpen, dan saponin.⁶ Diketahui ekstrak delima dapat mempercepat penyembuhan luka, namun masih sedikit yang melaporkan sampai tingkat molekuler.

Produk alami merupakan sumber obat herbal dan masih menjadi salah satu pilihan dalam sistem pelayanan kesehatan. Aspek penting dari penggunaan obat-obatan dan tanaman tradisional dalam pengobatan luka selain meningkatkan penyembuhan sekaligus mengurangi beban keuangan bagi pasien.⁷ Pengobatan dan

obat-obatan modern masih sulit diakses dan tidak terjangkau oleh sebagian besar masyarakat. Pengobatan tradisional masih menjadi pilihan utama, bahkan seringkali menjadi satu-satunya pengobatan bagi banyak orang. Dengan pemahaman yang lebih luas terhadap praktik-praktik tradisional, muncullah apresiasi dan kemanfaatnya bagi lebih banyak orang di dunia.⁸

Penelitian oleh Lukiswanto menggunakan ekstrak buah delima terstandar dengan asam ellagic 40% dalam bentuk salep. Dosis 10% mempercepat penyembuhan luka bakar derajat dua dalam luka, buah delima merupakan ramuan yang menjanjikan untuk penyembuhan luka bakar pada kulit.⁹ Menurut data Kementerian Kesehatan RI (2016), terdapat sekitar 3.922 kasus rawat inap dengan luka berat akibat bencana, dan 41.034 kasus luka ringan atau rawat jalan. Obat antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka.¹⁰ Penyembuhan luka melalui beberapa fase yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling.¹ Dalam epitelisasi, sel-sel epitel berproliferasi dan menyebar ke seluruh permukaan luka. Kontraksi luka terjadi saat myofibroblast berkontraksi. Trombosit melepaskan faktor pertumbuhan dan sitokin lainnya.⁷ Kadar ROS yang optimal berbeda-beda pada setiap proses penyembuhan luka. Oleh karena itu, setiap enzim antioksidan perlu ditingkatkan, sesuai kebutuhan untuk menurunkan tingkat ROS dalam setiap proses penyembuhan luka.⁵

Penelitian melaporkan potensi pemanfaatan buah delima di bidang dermatologi.⁹ Ekstrak tumbuhan lebih banyak digunakan dalam industri kosmetik dibandingkan sebelumnya, khasiat dalam bidang dermatologi didasarkan pada

penelitian ilmiah terhadap buah delima.¹⁰ Penelitian yang dilakukan oleh Nema dengan model luka eksisi ini menyimpulkan bahwa salep ekstrak metanol konsentrasi (10%, dan 15%) menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang signifikan. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan yang signifikan dalam laju kontraksi luka dan peningkatan epitelisasi luka eksisi efek dari buah delima.⁷ Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Mahdi menyebutkan penyembuhan luka pada kulit buah delima mempunyai efek yang berbeda-beda terhadap penyembuhan luka.¹¹

Stres oksidatif serta peradangan mengaktifkan kompleks NF- κ B, yang pada gilirannya berhubungan dengan keadaan redoks seluler.¹² NF- κ B aktif bertranslokasi ke nukleus dan mengaktifkan gen target.¹³ NF- κ B menginduksi ekspresi sitokin inflamasi seperti TNF- α , jalur NF- κ B juga memiliki fungsi dan target antioksidan seperti Superoksida dismutase (SOD).¹² SOD merupakan pertahanan antioksidan yang sangat penting melawan stres oksidatif dalam tubuh. Enzim ini bertindak sebagai agen terapi yang baik terhadap penyakit yang dimediasi oleh *spesies oksigen reaktif* (ROS).¹⁴ SOD digunakan dalam kosmetik dan produk perawatan pribadi sebagai bahan anti penuaan dan antioksidan karena kemampuannya mengurangi kerusakan akibat radikal bebas pada kulit, sehingga mencegah kerutan, garis halus, dan bintik-bintik penuaan, serta membantu penyembuhan luka, melindungi dari sinar UV, dan mengurangi tanda-tanda penuaan lainnya.¹⁴

Ekstrak delima secara signifikan meningkatkan proses penyembuhan luka.¹¹ Namun pendalaman analisis tentang bagaimana krim ekstrak buah delima dapat

mempercepat penyembuhan luka eksisi dan berpengaruh terhadap kadar SOD dan TNF- α perlu dilakukan, sehingga hasil penelitian ini dapat menjadi sebuah alternatif baru yang mendukung pengobatan terhadap luka secara topikal, Penelitian ini akan melihat pengaruh krim ekstrak buah delima terhadap kadar SOD dan TNF- α pada tikus wistar model luka eksisi.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada pengaruh pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica Granatum*) terhadap kadar SOD dan TNF- α pada tikus wistar model luka eksisi?.

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) terhadap kadar SOD dan TNF- α pada tikus wistar model luka eksisi.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) terhadap kadar SOD pada tikus wistar model luka eksisi antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol
- b. Membuktikan pengaruh krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) terhadap kadar TNF- α pada tikus wistar model luka eksisi antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini bertujuan membuktikan dari berbagai sumber ekstrak buah delima dalam mempercepat penyembuhan luka dan melihat gambaran parameter molekuler untuk menambah referensi kepustakaan.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat menjadi informasi penambah nilai guna untuk pembuatan produk kesehatan yang bernilai dan memiliki banyak manfaat dengan harga yang terjangkau.

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
1 Mahdi M, Nassireslami E, Asadi M, Dadpay M. ¹¹	<i>Evaluation of wound healing activities of pomegranate (Punica granatum-Lythraceae) peel and pulp.</i>	Ekperiment <i>In Vivo</i>	Efek kulit buah delima terhadap penyembuhan luka berbeda-beda, lapisan atas ekstrak kulit buah sangat mempercepat proses penyembuhan luka. Oleh karena itu, disarankan untuk melakukan penelitian tambahan mengenai penyembuhan luka pada lapisan atas kulit.
2 Nema N, Arjariya S, Bairagi SM, Jha M, Kharya MD. ⁷	<i>In Vivo Topical Wound Healing Activity of Punica Granatum Peel Extract on Rats</i>	Ekperiment <i>In Vivo</i>	Menggunakan 10% dan 15% b/b ekstrak salep dalam basis salep sederhana. Waktu penutupan luka lebih singkat dan persentase kontraksi luka jauh lebih besar pada kelompok yang diberi salep ekstrak 15% b/b. Kedua konsentrasi ekstrak metanol salep Punica granatum menunjukkan respon yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan demikian ekstrak metanol Punica granatum

			terbukti berpotensi sebagai agen penyembuhan luka.
3	Bogdan C, Iurian S, Tomuta I, Moldovan M. ¹⁵	<i>Improvement of skin condition in striae distensae: Development, characterization and clinical efficacy of a cosmetic product containing Punica granatum seed oil and Croton lechleri resin extract.</i>	Ekperimental <i>In Vivo</i> Studi kemanjuran klinis pada formulasi optimal menunjukkan peningkatan nilai ketebalan, hidrasi dan elastisitas dermis pada kedua kelompok setelah 6 minggu pengaplikasian krim. Krim mengandung minyak biji <i>P. granatum</i> dan ekstrak resin <i>C. lechleri</i> dapat membantu dalam mencegah atau memperbaiki perubahan kulit.
4	Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. ⁶	<i>Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum</i>	Ekperimental <i>In Vivo</i> Pemeriksaan fitokimia ekstrak kulit buah <i>P. granatum</i> menunjukkan adanya kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, triterpen, dan saponin. Menggunakan model luka eksisi untuk menguji kemampuannya menyembuhkan luka pada tikus. Dibandingkan dengan kontrol (84%), hewan yang diobati dengan ekstrak menunjukkan penurunan luas luka sebesar 95%, sebuah temuan yang signifikan secara statistik ($P < 0,01$). Pada tikus, <i>P. granatum</i> secara signifikan mempercepat penyembuhan luka.
5	Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. ⁴	<i>Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin</i>	Ekperimental <i>In Vivo</i> Menerapkan PRE (ekstrak kulit buah delima) secara topikal pada kulit <i>ex vivo</i> mengurangi ekspresi COX-2, memiliki efek anti-inflamasi yang kuat, memastikan PRE mencapai permukaan kulit dan menyesuaikan regulasi COX-2 pada epidermis aktif, dan meringankan rasa sakit yang terkait dengan sejumlah kondisi kulit, termasuk luka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α)

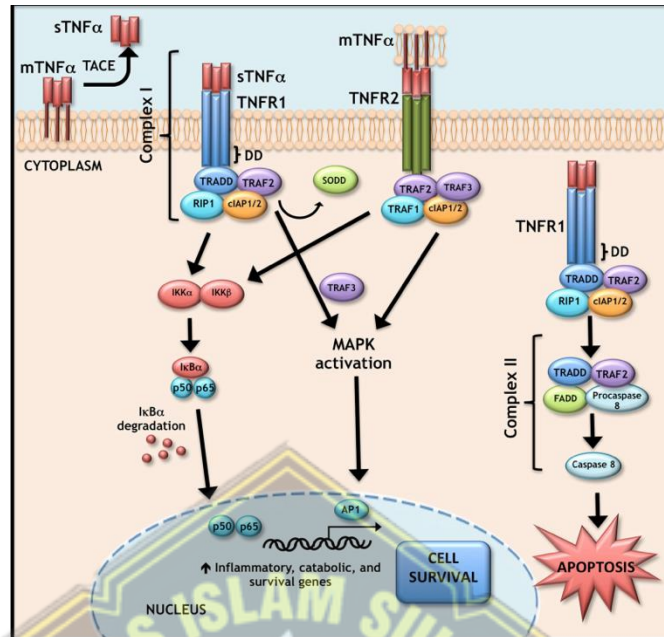
Sel menghasilkan TNF- α sebagai mTNF, protein transmembran tipe II yang berbobot 26 kDa. *Tumor necrosis- α -converting metalloproteinase* (TACE), kadang-kadang disebut sebagai ADAM *metallopeptidase domain 17* (ADAM17), memecah bentuk terikat membran ini menjadi bentuk larut 17 kDa, sTNF. Meskipun bentuk monomer dan dimerik mTNF dan sTNF juga aktif secara fisiologis, versi trimeriknya lebih aktif.¹⁶

TNF- α berinteraksi dengan salah satu dari dua reseptor, TNFR1 dan TNFR2, yang merupakan anggota superfamili reseptor faktor nekrosis tumor (TNFR). Meskipun sTNF hanya dapat berikatan dengan TNFR1, mTNF dapat berikatan dengan reseptor apa pun. Ketika TNF- α mengaktifkan TNFR1, dua kompleks pensinyalan TNF yang berbeda terbentuk: Sementara Kompleks II/kompleks pensinyalan penginduksi kematian (DISC) memicu apoptosis setelah internalisasi reseptor, Kompleks I memiliki peran anti-apoptosis. Di sisi lain, TNFR2 tidak memiliki domain kematian intraseluler. Akibatnya, komunikasi melalui kompleks ini dianggap anti-apoptosis. Jalur TNFR1 dan TNFR2 dapat berinteraksi sebagai akibat dari kemampuan TNFR2 untuk menyebabkan penurunan faktor terkait reseptor TNF (TRAF2), menurut penelitian baru. Jalur faktor nuklir κ B (NF- κ B) dan protein kinase teraktivasi mitogen (MAPK) dipicu oleh pensinyalan melalui Kompleks I.¹⁶

2.1.1 Jalur aktivasi TNF- α

Cedera kulit yang terlokalisasi disebabkan oleh sel-sel endotel yang dirangsang oleh TNF- α yang disekresikan untuk menarik sel-sel kekebalan yang bersirkulasi, melepaskan MMP, dan mendorong penghancuran serat kolagen.¹⁷ Jalur transduksi sinyal yang terlibat dalam aktivasi NF- κ B distimulasi oleh TNF- α . Pada kulit manusia, MT1-MMP menginduksi aktivasi pro-MMP-2 dan aktivasi NF- κ B diperlukan untuk produksi MMP-9 pada fibroblas dermal. Lebih lanjut, setelah aktivasi NF- κ B pada sinoviosit mirip fibroblas, terlihat ekspresi berlebih dari MMP-1 dan MMP-13. Ekspresi berlebih MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas juga memerlukan aktivasi NF- κ B. Oleh karena itu, dengan menghambat ekspresi MMP melalui inaktivasi NF- κ B, photoaging kulit dapat dihindari.^{17,18}

TNF- α yang diproduksi melalui epidermis menempel pada reseptor khususnya, TNFR yang sebagian besar diekspresikan di jaringan kulit. Kemudian memasukkan TRADD, protein yang berinteraksi dengan reseptor 1 (RIP1), dan protein TRAF2 yang merupakan mediator penting dalam jalur pensinyalan yang dikendalikan oleh TNFR1. TRAF2 termasuk dalam keluarga TRAF adaptor sitoplasma dan protein perancah yang diekspresikan secara luas. Ia memiliki kemampuan untuk melakukan oligomerisasi baik secara homo- atau hetero-merik dengan TRAF1, TRAF5, dan TRAF6. Melalui wilayah C-terminal domain TRAF, TRAF2 secara langsung berikatan dengan wilayah sitoplasma CD27, CD30, CD40, dan TNFR2.¹⁸



Gambar 2.1 Jalur pensinyalan TNF- α .¹⁸

Metalloproteinase TACE/ADAM-17 mengubah TNF yang terikat membran (mTNF) menjadi bentuk larut (sTNF). Ketika sTNF- α atau mTNF- α berikatan dengan reseptor TNFR1 transmembran, protein penghambat SODD dilepaskan karena perubahan konformasi. Pengikatan menyebabkan perekrutan beberapa komponen, seperti cIAP 1 dan 2, RIP1, TRAF2, TRADD, dan seterusnya. Hal ini mengarah pada terciptanya kompleks I, yang kemudian memberi sinyal untuk mengaktifkan p65 atau AP1 melalui jalur NF- κ B atau MAPK. Transkripsi gen pro-survival (cIAP1 dan 2, cFLIP, TRAF1, TRAF2), gen inflamasi (kemokin, sitokin), dan matriks katabolik (MMPs, ADAMTSs) disebabkan oleh pensinyalan kompleks I. Alternatifnya, aktivasi reseptor TNFR2 oleh mTNF- α dapat menghasilkan pembentukan kompleks yang sebanding dan kaskade pensinyalan selanjutnya. Kadang-kadang TNFR1 yang melekat pada sTNF- α dapat diinternalisasi dan memulai produksi Kompleks II

atau DISC, yang menyebabkan pembelahan procaspase 8 dan akhirnya kematian sel.¹⁸

2.2 *Superoxide dismutase (SOD)*

SOD merupakan antioksidan dan metaloenzim enzimatik yang mengkatalisis proses reduksi radikal anion superoksida menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Enzim ini dapat disimpan pada suhu $5^\circ C$ hingga 5 tahun tanpa kehilangan aktivitasnya; namun, ia tidak stabil terhadap panas dan stabil dalam kondisi basa (PH 6,5–7,5). Untuk memerangi radikal bebas internal dan eksternal, tubuh manusia menghasilkan SOD, suatu antioksidan endogen. Antioksidan berbasis enzim, juga dikenal sebagai antioksidan sekunder, adalah antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikannya menghasilkan radikal baru.¹⁹

Tubuh memiliki tiga isoform berbeda dari enzim antioksidan SOD. Isoform ini, yang diturunkan dari gen berbeda, mengkatalisis reaksi yang sama—yaitu transformasi anion superoksida (O_2^-) menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Tiga isoform SOD adalah CuZn-SOD ekstraseluler (EC-SOD atau SOD3), SOD sitosol atau tembaga-seng (CuZn-SOD atau SOD1), dan SOD mangan (Mn-SOD atau SOD2) yang ditemukan di mitokondria. SOD banyak diekspresikan dalam sitoplasma berperan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif.²⁰

2.2.1 Mekanisme kerja SOD

Menggabungkan mekanisme enzimatik dan non-enzimatik, sistem pertahanan antioksidan pada kulit manusia melindungi terhadap ROS. Katalase, glutathione peroksidase, dan superoksida dismutase (SOD) adalah contoh

antioksidan enzimatik. Antioksidan berfungsi melalui enzim untuk menstabilkan H₂O₂. H₂O₂ yang kurang reaktif terhadap ROS diproduksi oleh enzim superoksida dismutase. Hidrogen peroksida akan terus terurai menjadi air dan oksigen karena *katalase* dan *glutathione peroksidase*.²¹

Antioksidan diproduksi oleh tubuh sebagai tindakan perlindungan terhadap spesies oksigen reaktif (ROS). Molekul yang dikenal sebagai antioksidan mencegah oksidasi bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah.²¹ Antioksidan bekerja dalam proses oksidatif melalui berbagai cara, antara lain sebagai pengikat ion logam, menyerap radikal lipid peroksil, memperbaiki kerusakan oksidatif, dan menjebak radikal bebas secara enzimatis atau kimia. Antioksidan menetralkan ROS dan menstabilkan radikal bebas untuk menghentikan oksidasi dengan menarik atau melepaskan elektron. Dalam penggunaan praktisnya, antioksidan diklasifikasikan menjadi enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik yang terdapat di kulit termasuk katalase, glutathione peroksidase (GSH peroksidase), dan superoksida dismutase (SOD). Sedangkan ubiquinone, vitamin C (asam askorbat), vitamin E (alfa tokoferol), dan vitamin A (retinoid) merupakan contoh antioksidan non-enzimatik.²¹

Sel-sel kulit menciptakan spesies oksigen reaktif (ROS) sebagai respons terhadap bahan kimia eksogen dan endogen, dan tingkat ROS yang berlebihan dapat merusak sel. Ketika ROS berdampak pada jalur pensinyalan MAP, NF-κB dan AP-1 (aktivator protein-1), dua faktor transkripsi, diaktifkan. merangsang respons inflamasi, meningkatkan sintesis prokolagen dengan memblokir sinyal TGF-β/SMAD, dan meningkatkan pemecahan kolagen melalui degenerasi

matriks dan produksi MMP. Lebih jauh lagi, dengan melampaui keap-1, penghambat sitoplasma faktor nuklir Nrf2, ROS memungkinkan Nrf2 bertranslokasi ke nukleus dan memulai transkripsi gen antioksidan. Selain itu, ROS mendorong pembentukan α -MSH, yang pada gilirannya memicu jalur bergantung Nrf2 dan meningkatkan produksi gen antioksidan. Jalur Nrf2 diaktifkan di sel kulit selain melanosit dan keratinosit, seperti fibroblas.^{22,23}

Kadar ROS yang tinggi secara terus-menerus merusak struktur protein, lipid, dan DNA serta mengaktifkan jalur kematian sel, hal ini mengakibatkan kerusakan sel yang ireversibel, malfungsi, dan kematian organisme. Terutama diekspresikan di dinding arteri, SOD3 adalah isoenzim SOD yang meningkatkan bioavailabilitas oksida nitrat selain membersihkan superoksida. Aktivitas oksida nitrat meningkat dan homeostasis kontraktilitas pembuluh darah ditingkatkan ketika kadar superoksida diturunkan karena SOD3 membatasi interaksi cepat oksida nitrat dengan superoksida untuk menghasilkan peroksinirit. Peradangan perivaskular dipicu oleh hilangnya SOD3. Dermis dan epidermis keduanya mengandung SOD3.²⁴

2.3 Luka Eksisi

Luka menyebabkan jaringan biologis, seperti kulit, selaput lendir, dan organ, kehilangan integritasnya dan mengganggu kapasitas organ untuk berfungsi sebagaimana mestinya. Hilangnya kontinuitas jaringan epitel setelah cedera dapat mengganggu kapasitas kulit untuk melindungi jaringan lain.²⁵ Luka eksisi adalah luka di mana permukaan kulit dan lapisan bawahnya terpotong sampai kedalaman yang berbeda. Ini dapat terjadi secara sengaja atau

tidak sengaja.²⁶

Penyembuhan luka kulit adalah proses fisiologis penting yang bergantung pada kolaborasi beberapa strain sel dan produk sampingannya. Ketika lesi lokal akibat agresi mulai sembuh, itulah tanda pertama peradangan. Perbaikan melibatkan penggantian struktur tertentu dan difasilitasi oleh deposisi dan regenerasi kolagen, yang berkorelasi dengan proses proliferasi dan diferensiasi sel di bagian posterior jaringan sel.²⁷

2.3.1 Proses penyembuhan luka

Setelah lesi berkembang, jaringan beregenerasi dan sembuh. baik akibat trauma atau kondisi klinis tertentu. Semua rangsangan yang mengganggu kelangsungan fisik jaringan hidup bergabung menghasilkan satu lesi. Berbagai pemicu stres, termasuk rangsangan termal, kimia, listrik, dan fisik, dapat menyebabkan lesi. Lesi juga dapat merusak organel tertentu atau sel itu sendiri.²⁸ Setelah lesi kulit, tergantung pada strain sel yang terkena cedera, regenerasi dan perbaikan dapat terjadi pada jaringan yang sama. Pendekatan-pendekatan ini tidak harus digunakan secara bersamaan.²⁹

Faktor pertumbuhan menginduksi proses linier langsung dalam penyembuhan jaringan yang menggabungkan perubahan dinamis yang melibatkan sel darah, mediator terlarut, pembentukan matriks ekstraseluler, dan proliferasi sel parenkim. Peristiwa biologis dan biokimia dalam penyembuhan luka adalah proses penyembuhan kulit. Respon inflamasi, proliferasi sel, sintesis matriks ekstraseluler, dan fase remodeling adalah tiga fase proses penyembuhan kulit.³⁰

2.3.2 Klasifikasi Luka

Ciri-ciri anatomi, jenis, masa penyembuhan, dan proses penyembuhan semuanya dapat digunakan untuk mengkategorikan luka. Secara anatomi, ada tiga jenis luka: luka dengan ketebalan penuh, luka dengan ketebalan lokal, dan luka superfisial. Luka yang diklasifikasikan sebagai luka superfisial meluas hingga ke epidermis, lapisan kulit terluar, dan kadang-kadang bahkan sampai ke dermis. Luka yang mengenai dermis dan epidermis disebut luka ketebalan lokal. Sebaliknya, luka dengan ketebalan penuh mencakup seluruh lapisan kulit, termasuk dermis, lapisan lemak, fasia, dan epidermis.³¹

Luka abrasi, memar, sayatan, laserasi, luka tembak, tusukan, dan jenis luka lainnya diklasifikasikan menurut sifatnya. Luka abrasi yang disebut juga dengan lecet adalah luka yang tidak menembus jaringan subkutan karena adanya gesekan antara luka dengan benda lain, biasanya benda tumpul. Memar atau memar adalah cedera umum yang disebabkan oleh pukulan benda tumpul yang merusak kapiler. Luka akibat sayatan benda tajam disebut dengan luka sayatan. Luka yang tepinya tidak rata disebut laserasi. Luka masuk dan luka keluar merupakan ciri-ciri luka tembak yang disebabkan oleh suatu benda seperti peluru. Sebaliknya, luka tusuk timbul dari lesi kecil yang sulit dilihat di bagian dasarnya. Luka tusuk adalah luka kecil yang sulit dilihat yang dasarnya tertusuk paku atau benda tajam lainnya.

Luka dibagi menjadi tiga kategori berdasarkan cara penyembuhannya: penyembuhan primer, sekunder, dan tersier. Penyembuhan primer, juga dikenal sebagai penyembuhan dengan niat, terjadi ketika luka dibersihkan dan

disembuhkan dari dalam ke luar. Ketika luka sayatan sembuh hingga tepinya dapat menyatu kembali, luka tampak bersih, dan tidak ada jaringan yang hilang, hal ini disebut penyembuhan luka primer. Luka penyembuhan primer sembuh lebih cepat dan menutup lebih cepat bila jahitan digunakan.

Fase penyembuhan akan dibiarkan terjadi secara alami sehingga proses penyembuhan luka akan dimulai setelah terbentuknya jaringan granulasi pada dasar luka dan sekitarnya. Pada penyembuhan luka sekunder (healing by Secondary Intention), sebagian jaringan luka hilang, luka kotor, dan membutuhkan waktu lama untuk sembuh. Sebaliknya, penyembuhan luka tersier, disebut juga penyembuhan primer tertunda, terjadi secara perlahan karena luka harus dibiarkan terbuka selama empat hingga tujuh hari sebelum dilanjutkan dengan penjahitan karena tidak dapat segera dijahit karena adanya kontaminasi atau infeksi.²³

Luka dibedakan menjadi dua kategori berdasarkan lama waktu penyembuhannya: luka akut dan luka kronis. Luka akut akan sembuh sesuai dengan proses penyembuhan luka secara fisiologis, sehingga memungkinkan waktu pemulihan yang dapat diprediksi. Dalam dua hingga tiga minggu, lukanya akan sembuh dengan sedikit atau tanpa bekas luka. Luka akut sebagian besar sembuh melalui penyembuhan primer, meskipun luka yang ujung-ujungnya tidak dapat disambung juga dapat melalui fase penyembuhan sekunder. Selama lebih dari empat hingga enam minggu, tidak ada gejala penyembuhan pada luka kronis, yang termasuk dari luka kronik meliputi keganasan, ulkus tungkai, ulkus dekubitus, dan ulkus yang diakibatkan dari

gangguan metabolisme seperti diabetes melitus.

2.3.3 Mekanisme molekuler pada Luka

Jalur pensinyalan intraseluler yang melibatkan miR-21 dan p38 adalah satu. miR-21 memiliki efek yang bervariasi pada berbagai pemain seluler yang terlibat dalam penyembuhan luka. Promotor adalah rumah bagi tiga situs untuk protein aktivator 1 (AP1), satu untuk PU, dan satu lagi untuk faktor nuklir kappa B (NF- κ B). MiR-21 penting untuk perubahan fenotip makrofag dari inflamasi menjadi antiinflamasi. Baik PAMP dan DAMP mengaktifkan jalur stres p38/Jun, yang menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi termasuk IL-1, TNF, dan IL-6 misalnya.³²

Fungsi makrofag dalam penyembuhan luka bermacam-macam. Pada awal proses penyembuhan, makrofag menghasilkan sitokin inflamasi yang mengaktifkan dan menarik lebih banyak leukosit, sehingga mengintensifkan respon inflamasi. Selain itu, makrofag memainkan peran penting dalam menghilangkan sel-sel apoptosis dari luka dan mendisinfeksi luka dari mikroorganisme, sehingga membantu mengurangi peradangan dan memulai fase proliferasi penyembuhan luka. Makrofag mengalami perubahan fenotipik menjadi keadaan anti-inflamasi, regulasi, dan reparatif seiring dengan perubahan lingkungan tempat tidur luka. Pergeseran respons ini mengaktifkan keratinosit, fibroblas, dan sel endotel untuk memfasilitasi regenerasi jaringan. Makrofag memfasilitasi peralihan dari fase pertama penyembuhan ke fase proliferasi. Transformasi makrofag ini dari M1 ke M2 difasilitasi oleh sejumlah jalur, termasuk aktivasi TLR, IL-4, IL-13, pensinyalan adenosin, CXCL1, dan

CCL18. Selain itu, miRNA-21 menargetkan fosfatase dengan motif tensin (PTEN), dan akibatnya penurunan PTEN memperpanjang aktivasi AKT, yang menghambat peradangan dan mendorong aktivitas anti-inflamasi.³²

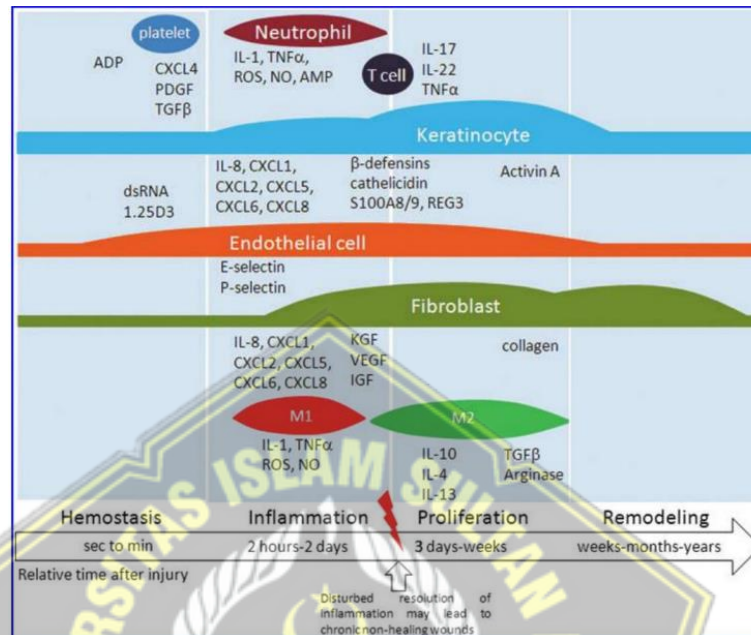
2.3.4 Fisiologis penyembuhan luka

Peradangan dipicu oleh agregasi trombosit, yang juga melepaskan ADP, PDGF, TGF- β , dan CXCL4. Sel-sel lokal, seperti keratinosit dan fibroblas, diaktifkan, begitu pula kaskade imunologis. Jenis sel utama epidermis, keratinosit, mengeluarkan peptida dan protein antimikroba (AMP) serta sitokin proinflamasi. Dengan membawa neutrofil dan makrofag ke dalam dasar luka, respon imun ini bekerja sama untuk membersihkan dasar luka. Sel pembunuh profesional mikroba, neutrofil, dan makrofag melepaskan AMP, NO, dan spesies oksigen reaktif (ROS). Sementara itu, selektin E dan P diekspresikan oleh sel endotel di venula dermal, yang mengarahkan leukosit ekstrasvasasi untuk menggelinding dan menempel pada dasar luka.

Melalui produksi IL-17, IL-22, dan TNF- α , yang meningkatkan respons pertahanan tubuh, baik sel T yang tinggal di kulit maupun sel T yang menyerang berkontribusi pada tahap inflamasi. Selain itu, limfosit T yang ditemukan di kulit memiliki kemampuan untuk menciptakan faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi keratinosit. Remisi peradangan mengikuti sterilisasi luka dengan aktivasi neutrofil, keratinosit, dan makrofag. Pada titik ini, penutupan luka dirangsang oleh pertumbuhan fibroblas dan keratinosit. Fase ini dikendalikan oleh perubahan lingkungan mikro sitokin luka dan modulasi aktivitas reparatif dibandingkan inflamasi. Makrofag M1, atau makrofag aktif pada fase inflamasi,

berubah secara fenotip menjadi fenotip M2 reparatif dan anti inflamasi.

Pergantian ini dikontrol dengan ketat.³²



Gambar 2.2 Alur molekuler penyembuhan luka.³²

2.3.4.1 Tahap inflamasi

Bekuan darah yang bocor dan pembuluh darah yang menyempit adalah akibat dari respons peradangan pembuluh darah, yang melindungi integritas pembuluh darah. Selama koagulasi, yang disebabkan oleh rangsangan tertentu yang mendorong sel-sel ini untuk aktif dan berkumpul, trombosit dan trombosit berkumpul dalam jaringan fibrin.³³ Melalui pemulihan homeostatis dan pembentukan penghalang terhadap serangan patogen, jaringan fibrin mengatur matriks sementara yang diperlukan untuk migrasi sel, sehingga memulihkan peran pelindung kulit dan menjaga integritas kulit.²⁸

Fase inflamasi setelah cedera kulit mungkin berlangsung hingga lima hari. Hemostasis dan menghindari kolonisasi bakteri atau infeksi bergantung

pada fase ini.³⁴ 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 bermigrasi ke jaringan yang terluka.³⁵

Produk pemecahan bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) dan prostaglandin, IL-1, TNF- α , C5a, dan TGF- β dapat merangsang migrasi neutrofil ke jaringan luka dan menyebabkan rongga yang ditinggalkan luka membesar. Peningkatan permeabilitas kapiler sel endotel vaskular berkontribusi terhadap diapedesis ini. Sel mast mengeluarkan histamin dan serotonin, yang menyebabkan permeabilitas kapiler. Neutrofil yang bermigrasi ke jaringan yang terluka berkontribusi pada pencegahan infeksi dengan memfagosit patogen dan jaringan mati. Proses regenerasi jaringan menyebabkan neutrofil pada jaringan yang rusak secara bertahap menjadi kurang terkonsentrasi.³⁶

Dalam waktu 48 hingga 72 jam setelah neutrofil mencapai lokasi tersebut, monosit—yang akan matang menjadi makrofag—tiba dan menjadi sel dominan pada hari ketiga setelah cedera kulit. Ketika cedera jaringan terjadi, makrofag membantu memfagosit mikroorganisme dan kotoran. Lebih lanjut, makrofag membantu pembentukan beberapa faktor pertumbuhan yang mengaktifkan fibroblas untuk menghasilkan matriks ekstraseluler dan mendorong neovaskularisasi melalui mesenkim jaringan, yang keduanya

pada akhirnya membantu penyembuhan luka.³⁴

ROS diproduksi oleh neutrofil dan makrofag selain fagositosis dan sintesis sitokin inflamasi. Bantuan ROS dalam pencegahan infeksi bakteri. Paparan spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan pada akhirnya dapat menyebabkan apoptosis pada sel-sel tubuh, yang memperlambat proses regenerasi jaringan. ROS juga membantu sintesis dua mediator inflamasi yang diproduksi kembali, prostaglandin dan leukotrien, serta aktivasi dan pemeliharaan kadar asam arakidonat. Karena proliferasinya dan peningkatan kadar mediator inflamasi, peradangan kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan.³⁶

Sel mast dan limfosit mulai muncul pada luka pasca trauma pada hari kelima hingga ketujuh. Kedua jenis sel ini mengatur peradangan kronis dan membantu perbaikan jaringan yang rusak. 32 Fase inflamasi akan berakhir ketika jaringan granulasi lunak berwarna kemerahan berkembang. Jaringan granulasi yang dihasilkan kaya akan fibroblas dan neovaskularisasi kapiler, yang membentuk lingkungan metabolisme yang memfasilitasi penyembuhan luka.³⁷

2.3.4.2 Tahap Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung dari hari keempat hingga hari kedua puluh satu. Fase ini berbeda karena kemampuan sel epitel jaringan untuk melakukan epitelisasi ulang. Migrasi keratinosit dekat tepi luka memulai re-epitelisasi. Dalam lima hingga tujuh hari, epitelisasi ulang akan menyebabkan luka sembuh. Setelah selesai, membran basal akan bertindak sebagai penghalang

antara dermis dan epidermis. Angiogenesis dan fibrogenesis berkontribusi pada pembentukan membran basal dengan memperkuat lapisan dermis di bawahnya. Pada tahap ini, trombosit dan makrofag mendominasi matriks fibrin. Pada akhir prosedur, jaringan granulasi yang terdiri dari agregat jaringan fibroblas secara bertahap menggantikan jaringan ini untuk membuat matriks ekstraseluler.³⁴

Fibroblas diperlukan selama fase proliferasi. Sel yang disebut fibroblas bertanggung jawab untuk memproduksi protein matriks ekstraseluler termasuk fibrin dan kolagen. Matriks ekstraseluler mengisi kekosongan pada jaringan luka, bertindak sebagai lokasi migrasi keratinosit. TGF- β dan PDGF merupakan faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi fibroblas dan pembentukan matriks ekstraseluler.³⁴ Dengan bantuan matriks metalloproteinase, fibroblas akan memecah fibrin dan menggantinya dengan kolagen tipe III dan glikosaminoglikan (GAG) (MMP). Selama fase pematangan, kolagen tipe I akan menggantikan kolagen tipe III.³⁸

Makrofag menghasilkan faktor proangiogenik, yang meliputi trombospondin, fibroblast growth factor-2 (FGF-2), faktor endotel vaskular (VEGF), dan angiopentin-1. Faktor-faktor ini memfasilitasi angiogenesis sel endotel.³⁴ Setelah regenerasi epitel selesai dan remodeling kolagen terjadi, seluruh aktivitas seluler dalam fase proliferasi yang disebutkan di atas berakhir. Setelah hilangnya fibroblas akibat matriks kolagen yang mengisi rongga luka, proses neovaskularisasi akan berakhir pada apoptosis. Ketidakmampuan mengendalikan proses re-epitelisasi akan mengakibatkan

masalah fibrotik seperti keropeng dan hipertrofi.³⁴

2.3.4.3 Tahap *Remodeling*

Tahap pematangan atau rekonstruksi dapat berlangsung antara satu hingga dua tahun, atau 18 hingga 21 hari. Setelah rongga luka terisi matriks ekstraseluler dan jaringan granulasi, kolagen tipe I mulai menggantikan kolagen tipe III, menandai dimulainya fase maturasi. Matriks dan sel ekstraseluler berkembang pada tahap ini.³⁵ Dua karakteristik fase maturasi meliputi kontraksi luka dan remodeling kolagen. Aktivitas myofibroblast mempercepat kontraksi luka. Myofibroblast adalah sel fibroblas yang memiliki mikrofilamen aktin intraseluler, yang memungkinkannya berkontraksi dan mengeraskan jaringan di sekitarnya. Aktivitas matriks metalloproteinase (MMP) yang diinduksi oleh makrofag jaringan, sel endotel, dan fibroblas secara bertahap akan menggantikan fase kolagen tipe III sebelumnya dengan kolagen tipe I.³⁴

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. Meskipun pada tingkat yang berbeda, proses produksi dan degradasi kolagen terjadi secara bersamaan dari awal fase pematangan hingga akhir fase pematangan. Kelebihan kolagen dipecah dan diserap ke jaringan sekitarnya oleh enzim kolagenase. Pada akhir tahap ini, terbentuk jaringan parut yang pucat, rapuh, tipis, dan mudah

digerakkan.³⁹

Susunan asimetris dari kolagen yang baru dihasilkan memerlukan konversi lisin menjadi hidroksilisin, yang hanya dapat dicapai dengan adanya lisil hidrolase, untuk membentuk ikatan silang antara serat kolagen. Untaian kolagen yang menutupi luka dan menciptakan kekuatan tarik dihubungkan secara silang untuk mencegah cedera kecil sekalipun sehingga jaringan robek. Kekuatan tarik biasanya akan meningkat dalam enam minggu pertama bagi kebanyakan orang dan kemudian secara bertahap selama satu hingga dua tahun berikutnya. Kulit dan fascia jarang mencapai 100% nilai kekuatan tarik normal; sebaliknya, seringkali nilai tersebut hanya mencapai 80% dari nilai tersebut.³⁸

2.4 Delima (*Punica granatum*)

Punica granatum merupakan salah satu anggota famili Punicaceae yang terkenal, yang terdiri dari dua spesies, *Punica granatum* (asli wilayah Mediterania dan Iran) dan *Punica protopunica* (endogen kepulauan Socotra). Ini banyak dibudidayakan di seluruh Asia Tengah, Himalaya, Timur Tengah, Barat Daya Amerika, dan wilayah Mediterania dan diyakini berasal dari Iran dan Afghanistan. Pohon delima adalah pohon berumur panjang yang biasanya dapat tumbuh hingga 12 hingga 16 kaki dan hidup lebih dari 200 tahun.⁴⁰ Klasifikasi atau taksonomi dari pohon delima secara ilmiah, Sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> ,
Filum	: <i>Tracheophyta</i> ,
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> ,
Ordo	: <i>Myrtales</i> ,

Family : *Lythraceae*,
 Genus : *Punica*,
 Spesies : *Punica granatum*.⁴⁰

Buah delima yang diameternya berkisar antara 5 hingga 12 cm ini bentuknya menyerupai buah buni. Warna buahnya bermacam-macam, yang pertama kali terlihat dari warna bunganya. Bercak kulit yang menonjol yang warnanya lebih gelap dari warna dasar buah menutupi kulit. Daging buah delima rasanya asam dan manis serta banyak mengandung air. Biji buah ini berwarna putih, ditutupi daging buah. Bentuk bijinya bermacam-macam, termasuk bulat, lonjong, agak persegi, dan pipih. Tekstur biji kecil yang kasar dan tidak rata disertai dengan ukurannya.⁴¹ 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.⁴² Buah sebagian besar berwarna merah, pada spesies tertentu, buah kadang-kadang berwarna ungu tua, meskipun seringkali berwarna merah jambu hingga kuning kehijauan.⁴³

Buah delima mudah tumbuh subur didaerah kering karena dapat tumbuh di berbagai jenis tanah dan kondisi cuaca, buah delima mudah beradaptasi. Beberapa spesies dapat tumbuh dengan baik di dataran rendah, sementara spesies lainnya tumbuh lebih baik di dataran tinggi. Sensitivitas buah delima terhadap dingin merupakan salah satu tantangan utama dalam produksinya. Karena rusak oleh suhu di bawah 12°C, buah delima membutuhkan musim panas yang panjang dan terik agar bisa matang.⁴³

2.4.1 Kandungan Buah Delima

Delima diketahui menunjukkan aktivitas anti-virus terhadap virus herpes dan virus influenza, Digunakan secara luas sebagai agen astringen, hemostatik, dan antimikroba dalam pengobatan tradisional Iran. Bubuk kulitnya membantu dalam pengobatan periodontitis dan memiliki sifat antihelminik. Dalam pengobatan tradisional, biji delima dilaporkan dapat mengatur keluarnya urin dan mengendalikannya sensasi terbakar pada urin, dan telah digunakan untuk pengobatan bronkitis, diare, masalah pencernaan, luka yang terinfeksi, dan diabetes, ekstrak kulit tanaman telah digunakan menyembuhkan asma, diare kronis, disentri kronis, dan cacingan.⁴¹



Gambar 2. 3 Buah delima.⁴¹

Buah delima dikenal karena sifat astringen dan anti-inflamasinya yang kuat serta terapi untuk pendarahan traumatis, bisul dan infeksi, diare, disentri, plak gigi, dan sebagai obat kumur dan agen enema. Air rebusan buahnya telah digunakan untuk pengobatan penyakit aphthae dan ulkus di India, Tunisia, dan Guatemala. Kulitnya juga banyak digunakan dalam pengobatan tradisional.

Pengobatan Tiongkok karena kemanjurannya dalam meningkatkan hemostasis, membunuh parasit, dan mengatasi hiperasiditas, bersama dengan kemampuan penyembuhan luka yang ampuh, terapi diabetes, kanker, dan pengendalian tekanan darah. Selain itu, penelitian menemukan bahwa kulit delima menghambat pelepasan racun oleh bakteri dan membantu mengurangi pertumbuhan.⁴¹

Beragam komponen pohon dan buah delima antara lain gula, asam organik, flavonoid, antosianin, asam lemak, alkaloid, vitamin, dan banyak lagi. Gula utama yang ditemukan dalam ekstrak buah delima adalah glukosa, fruktosa, sukrosa, dan maltosa. Selain itu, ia memiliki vitamin beta-karoten, C, B1, dan B2. Selain itu, asam fumarat, asam oksalat, asam suksinat, asam sitrat, dan asam tartarat merupakan asam organik utama yang terdapat pada buah delima. Kulit buah delima mengandung alkaloid seperti asam ellagic, asam galat, asam klorogenat, asam sinamat, asam hidroksi asam protocatechuic, asam hidroksi benzoat, asam *caffeic*, asam *ferulic*, asam *coumaric*, asam *p-coumaric*, dan asam *o-coumaric*, *peletierin*, *isopelletierine*, *metilpelle tierine*, *pseudopelletierine*, *punicalagin*, *punicalin*, *phloridzin*, *quercetin*, dan *catchin*.⁴³

Delima mengandung flavonoid yang disebut luteolin, kaempferol, dan glikosida narigenin. Buah delima mendapatkan warnanya dari senyawa yang disebut antosianin. Gonidin oranye dan merah, sianidin merah dan merah tua, serta delphinidin biru dan ungu adalah enam antosianin yang memberi warna merah pada bagian buah delima yang dapat dimakan. Enam antosianin dilepaskan dari buah delima dan diberi nama berbeda: 3,5-diglucoside

delphinidin, 3-glikosida delphinidin, 3,5-diglucoside cyanidin, 3-glikosida pelargonidin, dan 3-glikosida pelargonidin.⁴³ Tingkat aktivitas antioksidan pada berbagai jenis tanaman delima dikendalikan oleh asam askorbat dan senyawa fenolik.⁴⁴⁻⁴⁶

2.5 Pengaruh pemberian krim ekstrak buah delima terhadap kadar SOD dan TNF- α pada luka eksisi

Krim adalah bentuk sediaan semi padat berbasis emulsi yang mengandung satu atau lebih zat terapeutik.⁴⁷ Pemberian antioksidan secara eksogen menjadi penting salah satunya bersumber dari buah delima. Ekstrak buah delima memiliki kandungan antioksidan flavonoid, alkaloid, tanin, triterpen, dan saponin.⁶ Ekstrak delima secara signifikan meningkatkan proses penyembuhan luka.¹¹

Aktivitas SOD menurun selama penyembuhan luka dengan berkurangnya aktivitas SOD total pada lesi luka.⁴⁸ Sebaliknya produksi TNF- α meningkat akibat inflamasi karena respons fase akut.⁴⁹ Penggunaan krim ekstrak buah delima diharapkan meningkatkan aktivitas antioksidan dengan meningkatkan kadar SOD dan meredam inflamasi pada luka dengan menurunkan kadar TNF- α . Selama fase inflamasi, kebutuhan oksigen meningkat, makrofag dan neutrofil melepaskan radikal bebas.^{48,50} Antioksidan yang berfungsi sebagai pemulung terhadap stres oksidatif yang sudah ada sebelumnya dapat mengurangi atau menghambat radikal bebas. Kandungan flavonoid pada ekstraknya dapat mendetoksifikasi ROS karena flavonoid merupakan antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas dengan cara mendonorkan satu elektronnya sehingga

menghasilkan radikal bebas yang relatif stabil.⁵⁰

Tubuh manusia sebagian besar menghasilkan ROS sebagai konsekuensi dari rantai transpor elektron. penting untuk apoptosis, kekebalan, proses diferensiasi, fosforilasi protein, dan permulaan banyak faktor transkripsi. Namun, ketika ROS berinteraksi dengan molekul seperti lipid, protein, atau asam nukleat, hal tersebut juga mengakibatkan stres oksidatif. Kerusakan membran sel disebabkan oleh peroksidasi lipid yang diinduksi ROS. Dengan muatan positif di luar sel dan muatan negatif di dalam, membran ini mempunyai potensi. Kematian sel terjadi akibat perubahan tekanan osmotik dan potensial membran sel yang rusak.⁵¹

SOD banyak diekspresikan dalam sitoplasma, berperan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif.²⁰ Sistem pertahanan antioksidan kulit manusia terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) terdiri dari proses enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan menstabilkan H₂O₂, membuatnya kurang reaktif terhadap ROS yang dihasilkan oleh enzim SOD. Katalase dan GSH (*glutathione peroksidase*) akan terus memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.²¹

Flavonoid memicu jalur antioksidan dengan efek anti-inflamasi. Mereka menghentikan pelepasan asam arakidonat dan enzim yang mengurangi reaksi inflamasi, seperti lisozim dan β -glukuronidase. Flavonoid seperti *quercetin*, *genistein*, *apigenin*, *kaempferol*, dan *epigallocatechin 3-gallate* diketahui memodulasi ekspresi dan aktivasi sitokin, seperti IL-1 β , TNF- α , IL-6, dan IL-8. Mengatur ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi, seperti NF- κ B, aktivator protein-1 (AP-1), molekul adhesi antar sel-1 (ICAM), molekul adhesi sel

vaskular-1 (VCAM). Enzim proinflamasi dihambat oleh flavonoid, termasuk *lipoksigenase*, *siklooksigenase -2*, dan *nitric oxide synthase* yang dapat diinduksi.⁵²

Dengan kemampuannya berinteraksi dengan beberapa molekul yang terlibat dalam jalur inflamasi, flavonoid dengan karakteristik anti inflamasi juga dapat menurunkan aktivitas enzim inflamasi, kemokin, dan sitokin. Dalam flavonoid, apigenin telah terbukti mengurangi kadar mRNA yang diinduksi TNF- α , yang pada gilirannya mengurangi ekspresi E-selectin, VCAM-1, dan interseluler adhesi molekul-1 (ICAM-1) pada sel endotel. Selain itu, sel yang diberi perlakuan awal apigenin terbukti menyebabkan penekanan TNF- α , IL-1 β , IL-6, dan prostaglandin E2.⁵²

Flavonoid mengurangi peradangan melalui penargetan ERK, Akt, MAPK, dan NF- κ B. Sitokin inflamasi termasuk TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-17, dan IFN- γ semuanya dapat diturunkan oleh flavonoid. Selain itu, mereka bekerja dengan baik dalam produksi enzim lipozim, glukuronidase, COX2, dan iNOS. Berdampak pada pertumbuhan Nrf2, AMPK, dan enzim antioksidan termasuk *glutathione-S-transferase* (GST), *heme-oxygenase-1*, SOD, dan CAT. Mereka juga rentan terhadap apoptosis dan kematian.⁵²

BAB III

Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis

3.1 Kerangka teori

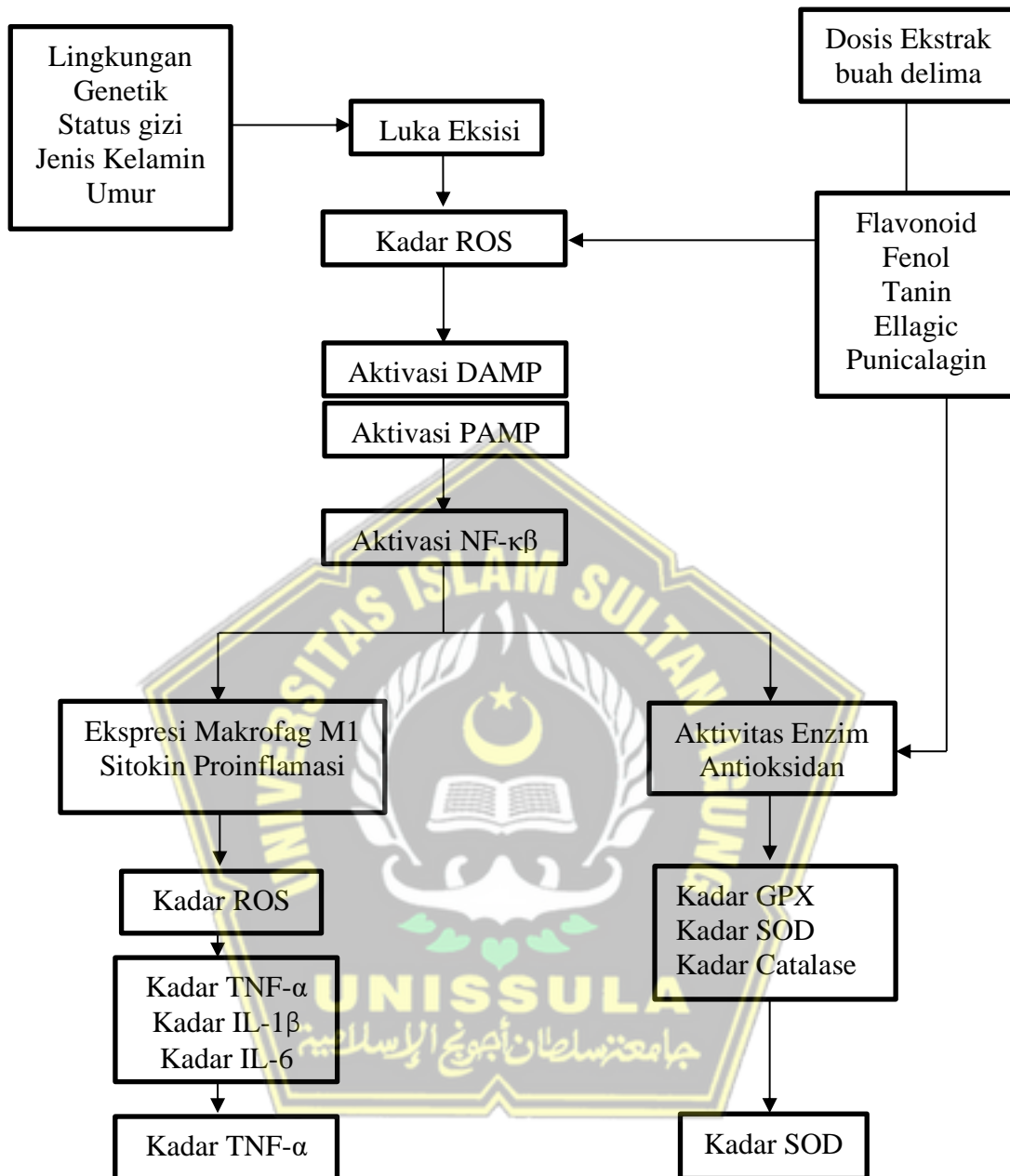
Penyembuhan luka terdiri dari proses rumit dengan reaksi yang berurutan. Proses penyembuhan dibagi menjadi empat fase: (1) Fase hemostasis; (2) Fase inflamasi; (3) Fase proliferasi; dan (4) Fase maturasi dan remodeling, meskipun keduanya juga saling tumpang tindih.⁵³

Segera setelah cedera, trombosit pertama-tama mulai berkumpul, dan membentuk trombus pada pembuluh darah yang rusak untuk menutup pendarahan untuk sementara. Pada saat yang sama proses inflamasi dimulai, dan berbagai sel kekebalan tertarik pada lesi luka. Sel-sel kekebalan mengeluarkan sitokin pro-inflamasi, sel-sel inflamasi, terutama neutrofil, juga memproduksi ROS dalam jumlah besar, yang penting untuk melindungi tubuh terhadap infeksi, namun jika jumlahnya berlebihan, dapat secara bersamaan merusak jaringan di sekitarnya.¹² Tingginya kadar ROS berefek memperlambat angiogenesis, Enzim antioksidan yang melimpah di kulit, berperan besar dalam detoksifikasi ROS di kulit selama proses penyembuhan luka.⁴⁸

Sel kulit menghasilkan ROS akibat zat endogen dan eksogen, mengaktifkan Faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1, ROS menghambat sitoplasma faktor nuklir Nrf2, sehingga Nrf2 dapat bertranslokasi ke nukleus dan memulai transkripsi gen antioksidan. Selain itu, α -MSH didorong oleh ROS, meningkatkan produksi gen antioksidan dengan mengaktifkan jalur yang

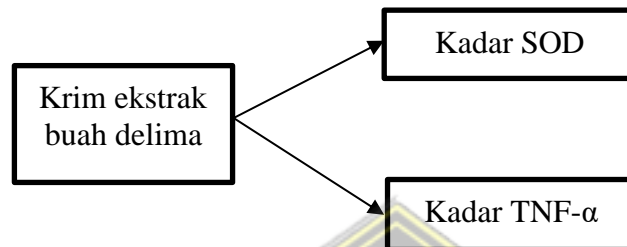
bergantung pada Nrf2. Sel kulit lainnya, seperti fibroblas, menunjukkan aktivasi jalur Nrf2 selain melanosit dan keratinosit.^{22,23}

SOD merupakan pertahanan antioksidan yang sangat penting terhadap stres oksidatif dalam tubuh. Beberapa penelitian telah dilakukan yang mengungkap potensi terapeutik dan pentingnya fisiologis SOD.¹⁴ Enzim tersebut dapat berfungsi sebagai agen antiinflamasi dan juga dapat mencegah perubahan sel prakanker. Tingkat SOD alami dalam tubuh menurun seiring bertambahnya usia dan karenanya seiring bertambahnya usia, seseorang menjadi lebih rentan terhadap penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif.¹² SOD digunakan dalam kosmetik dan produk perawatan pribadi sebagai bahan anti penuaan dan antioksidan karena kemampuannya mengurangi kerusakan akibat radikal bebas pada kulit, sehingga mencegah kerutan, garis halus, dan bintik-bintik penuaan, serta membantu penyembuhan luka, melembutkan jaringan parut, melindungi dari sinar UV, dan mengurangi tanda-tanda penuaan lainnya.⁵ Kulit buah delima memiliki kandungan fitokimia yang tinggi, terutama flavonoid polifenol dan ellagitannin, yang mengandung asam ellagic dan punicalagin.⁵⁴ Berdasarkan paparan teori diatas, maka di buat kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori

3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.2 Skema Kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

- a. Terdapat peningkatan kadar SOD dengan pemberian ekstrak buah delima (*Punica granatum*) pada tikus wistar model luka eksisi antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Terdapat penurunan kadar TNF- α dengan pemberian ekstrak buah delima (*Punica granatum*) pada tikus wistar model luka eksisi antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol

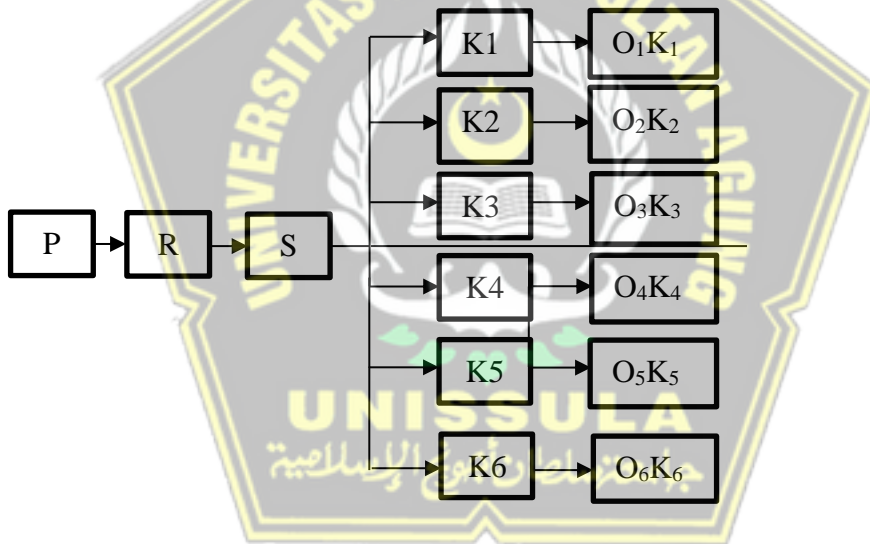
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan 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:

- Kelompok Normal (K1): Tikus sehat tanpa perlakuan selama 7 hari,
- Kelompok *sham* (K2): tikus luka eksisi tanpa dioles krim selama 7 hari,

- c. Kelompok kontrol negatif (K3): Tikus luka eksisi dan diberikan base krim selama 7 hari,
- d. Kelompok kontrol positif (K4): Tikus luka eksisi dan diberikan bioplacenton selama 7 hari
- e. Perlakuan 1 (K5): Tikus luka eksisi dan diberikan krim ekstrak buah delima 10% selama 7 hari
- f. Perlakuan 2 (K6): 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 190-250gram 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 inflamasi akibat luka eksisi
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Kondisi sehat
- d. Berat badan 190-250 gram

2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria :

- a. Memiliki kelainan anatomi
- b. Sudah pernah menjadi objek penelitian sebelumnya.

3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.2 Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok. Sampel diambil dari populasi berjumlah 36 ekor, besarnya ditentukan berdasarkan rumus *Federer*.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 5 \geq 15$$

$$n \geq (15+4)/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq \approx 5$$

Keterangan: t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan.

Perhitungan rumus dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 4,75 ekor perkelompok. Jumlah minimal jumlah sampel yang diperlukan ialah 25 ekor tikus. Sampel ditambah satu sebagai cadangan setiap kelompok untuk menghindari adanya sakit atau mati, sehingga total sampel menjadi 36 ekor tikus Wistar.

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 36 tikus yang dibagi menjadi 5 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
Menggunakan krim ekstrak buah delima 10% dan 20%
2. Variabel Terikat
Menggunakan kadar SOD dan kadar TNF- α
3. Variabel Prakondisi
Menggunakan tikus dengan pengkondisian model luka eksisi

4.5 Definisi Operasional

Ekstrak buah delima adalah krim ekstrak buah delima menggunakan pelarut etanol 70% yang dibuat sediaan krim dengan konsentrasi 10% dan 20%. Pada buah delima diketahui mengandung antioksidan yang tinggi. Hasil ukuran mg dengan skala ordinal.

Kadar SOD adalah jumlah kadar SOD yang diekspresikan pada jaringan

kulit sampel tikus setelah perlakuan luka eksisi dan diberikan krim buah delima. Pengukuran kadar SOD pada jaringan kulit metode ELISA dengan hasil berbentuk presentase dengan skala rasio

Kadar TNF- α adalah jumlah kadar TNF- α yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel tikus setelah perlakuan luka eksisi dan diberikan krim buah delima. Pengukuran kadar TNF- α pada jaringan kulit metode ELISA dengan hasil berbentuk presentase dengan skala rasio

4.6 Bahan dan reagen penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Ekstrak ethanol buah delima
2. Akuades
3. Alkohol 70%,80%, parafin
4. Ketamine
5. ELISA kit Rat SOD
6. ELISA kit Rat TNF- α

4.6.2 Peralatan Penelitian

1. Kandang tikus dilengkapi dengan tempat pakan dan minum.
2. Alat-alat ekstraksi buah delima: oven, botol maserasi, *rotary evaporator*.
3. Alat-alat penunjang pembuatan sediaan krim: cawan porselen, pemanas air, mortar.
4. Alat untuk membuat sampel pemeriksaan,

5. Timbangan digital.

4.7 Cara Penelitian dan Alur Kerja

4.7.1 Perolehan izin etik penelitian

Ethical clearance atau izin etik 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. 500gram buah delima diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml.
5. Serbuk simplisia buahdelima dimasukkan ke dalam botol bewarna gelap secara terpisah. Kemudian simplisia direndam menggunakan pelarut etanol selama 5 hari dan sesekali dihomogenkan sebanyak 3 kali setiap sehari.
6. 3 hari berikutnya 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° hingga diperoleh ekstrak kental.

4.7.3 Persiapan Hewan Uji

Subjek penelitian berjumlah 36 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*), berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 190-250 gr, yang terbagi menjadi 6 kelompok, masing-masing berjumlah 6 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 eksisi dilakukan dengan menggunakan *punch biopsy* melingkar dengan diameter 6mm. Hari berikutnya tikus kemudian diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Diberikan perlakuan secara topikal sebanyak satu kali sehari selama 7 hari pasca pembuatan model luka eksisi. Sampel kulit pada kelompok validasi diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dengan pewarnaan *Hematoksilin dan Eosin* (H&E).

4.7.4 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak buah delima

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

1. Menyiapkan 50 *vanishing cream* yang terdiri dari *Asam stearate*, *Trietanolamin*, *Glycerine*, *Borax*, dan *aquadest*
2. Tahapan dimulai dengan memanaskan air dalam *beaker glass*, lalu masukkan asam *stearate* 14,5gram ke dalam cawan porselin dan letakkan

diatas air mendidih, Aduk sampai cair

3. Tambahkan secara berurutan *Borax* 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 sambil dihomogenkan
5. Tambahkan *vanishing cream* 20gram, aduk rata sampai homogen, *Krim* ekstrak buah delima dimasukkan kedalam pot.

4.7.5 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit

Setelah pemberian perlakuan, dilakukan pengambilan jaringan. Sebelumnya semua tikus Wistar dimatikan terlebih dahulu dengan pembiusan. Buat sayatan jaringan pada bagian kulit yang mengalami luka, menggunakan gunting dan pinset. Sampel jaringan dipotong dan di timbang, jaringan ditambahkan dengan PBS (PH 7,4). Kemudian sampel jaringan di homogenisasi (dihancurkan) dalam kondisi dingin, 4°C, selanjutnya setrifus dengan kecepatan 2000-3000 rpm, selama 20 menit. Kemudian supernatan yaitu substansi hasil sentrifugasi yang memiliki bobot jenis yang lebih rendah diambil dan digunakan sebagai sampel uji, sampel dapat disimpan pada suhu -20°C.

4.7.6 Pemeriksaan Kadar SOD dan TNF- α Menggunakan Metode ELISA

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis kadar SOD dan TNF- α menggunakan metode ELISA. Analisis ELISA SOD dan

TNF- α dilakukan sesuai prosedur yang terdapat dalam petunjuk reagensia. Analisis kadar SOD dan TNF- α menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 450nm. Tahap pemeriksaan metode ELISA yaitu sebagai berikut:

1. Pembuatan standard

Sepuluh sumuran pada mikroplate 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.

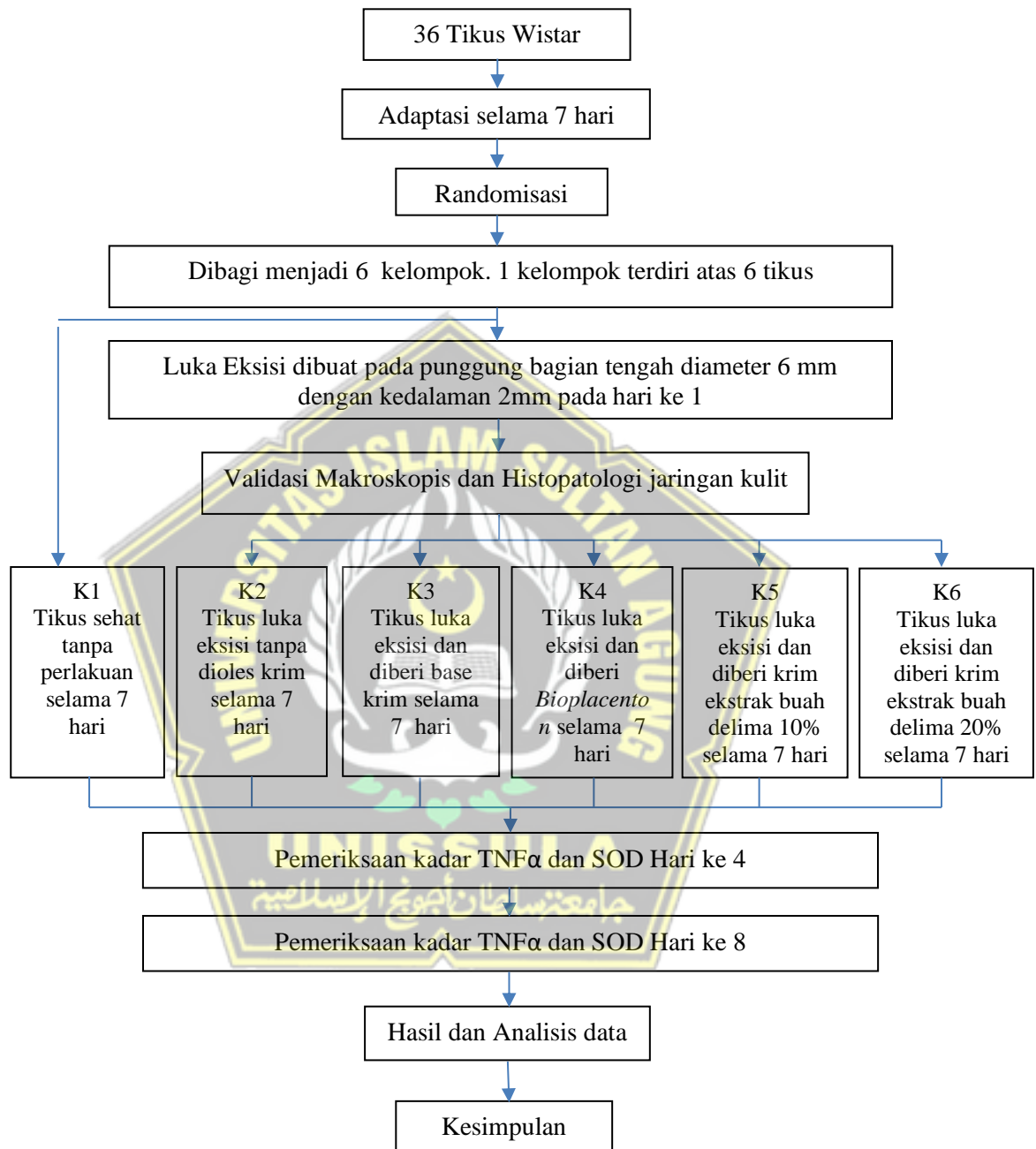
2. Persiapkan *wash solution*, larutkan wash solution 30x dengan aquadest (1 ml wash solution ditambahkan 29 ml aquadest). Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3.

3. Tambahkan *blocking buffer*, untuk membuat antigen pada sampel menempel pada plate, Inkubasi plate selama 60 menit, pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.

4. 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. Inkubasi plate selama 120 menit pada suhu ruangan, tambahkan 100 ul *biotinylated* antibodi pada tiap sumuran.

5. Inkubasi plate selama 60 menit, pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.
6. Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3, Tambahkan 100 ul ABC solution pada tiap sumuran, inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
7. Buang cairan dari sumuran dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3. Kemudian ditambahkan 90 ul HRP-conjugate dan 90 ul TMB pada tiap sumuran. Inkubasi plate selama 30 menit, pada suhu 37°C.
8. Selanjutnya, ditambahkan 100 ul stop solution pada tiap sumuran, sehingga akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Baca nilai OD (*optical density*) pada panjang gelombang 450 nm pada ELISA reader
9. Didapatkan hasil dari sampel jaringan kulit yang diberikan krim ekstrak buah delima.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

4.9 Metode Analisa Data

Hasil data pada penelitian dilakukan uji statistik deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*, Kemungkinan hasil deskriptif yang diperoleh. Data yang dihasilkan normal dan homogen ($P>0,05$), maka dilakukan uji beda uji One Way Anova dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing masing kelompok. Data yang dihasilkan normal dan tidak homogen ($P>0,05$).

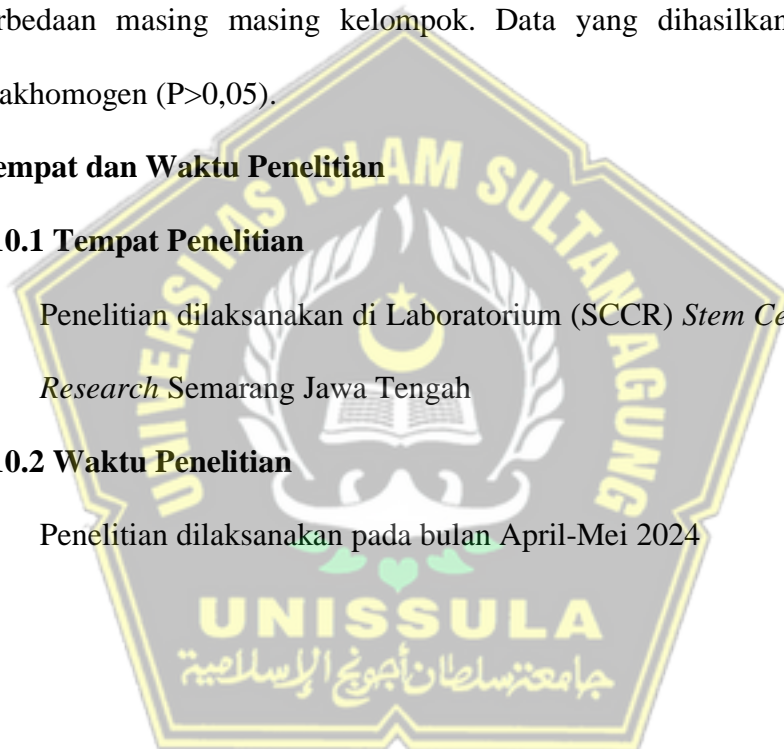
4.10 Tempat dan Waktu Penelitian

4.10.1 Tempat Penelitian

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

4.10.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2024



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Analisis terhadap kadar TNF- α dan SOD pada jaringan kulit tikus wistar pasca luka eksisi untuk melihat pengaruh pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica granatum*) secara eksperimental *In Vivo* dilakukan pada bulan April- Mei 2024 di di Laboratorium (SCCR) *Stem Cell and Cancer Research* Semarang. Total sampel dalam penelitian berjumlah 36 ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 6 kelompok, terdiri dari 6 ekor tikus tiap kelompok.

5.1.1 Hasil pemeriksaan kadar TNF- α jaringan kulit pada hari ke 3

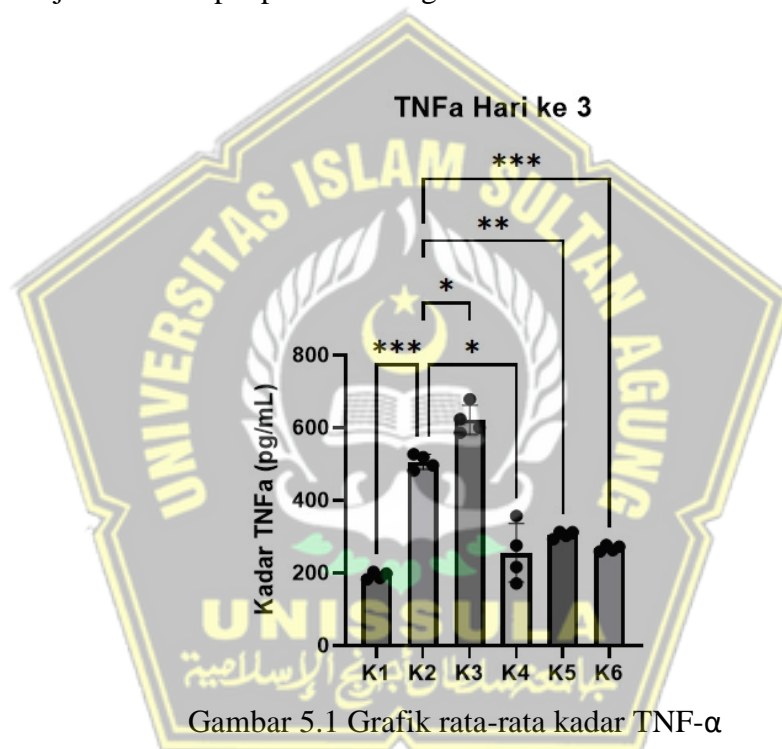
Hasil analisis rerata kadar TNF- α pada tiap kelompok hari ke 3 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1 Uji deskriptif rata-rata kadar TNF- α dan uji *One way anova* shari ke 3 setelah perlakuan

Kelompok	Tikus sehat (K1)	Tikus Sham (K2)	Base cream (K3)	Bioplac enton (K4)	Dosis 10% (K5)	Dosis 20% (K6)	P value
Kadar TNF-α pg/mL							
Mean	192,43	505,95	622,09	255,04	305,27	267,77	
SD	$\pm 9,64$	$\pm 20,85$	$\pm 40,47$	$\pm 80,34$	$\pm 9,42$	$\pm 8,29$	
Shapiro-Wilk	*0,536	*0,654	*0,507	*0,894	*0,384	*0,714	
Leuvene Test							0,004
One way anova							*0,001

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

Hasil rerata kadar TNF- α 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 $p=0,004$ ($p>0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, kemudian dilakuakn uji *One way anova* dengan hasil $p=0,001$ ($<0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan kadar TNF- α antar kelompok.



Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar TNF- α

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar TNF- α pada kelompok sehat (K1) sebesar 192,43 pg/mL, kelompok *sham* (K2) 505,95 pg/mL, kelompok *base cream* (K3) 622,09 pg/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 255,04 pg/mL, kelompok dosis 10% (K5) 305,27 pg/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 267,77 pg/mL. Perbandingan antar kelompok menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok (K1) dibandingkan dengan lainnya. Peningkatan rata-rata kadar TNF- α pada kelompok luka eksisi tanpa intervensi

(*sham*) paling signifikan dan mengalami penurunan paling rendah pada kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplacenton* (K4), selanjutnya secara berurutan penurunan pada dosis krim ekstrak buah delima 20% (K6) dan dosis 10% (K5).

Perbedaan yang signifikan antar kelompok dilakukan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingan antar kelompok yang paling berpengaruh. Hasil perbandingan rata-rata kadar TNF- α antar kelompok menunjukkan perbedaan bermakna, kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplacenton* (K4) dibandingkan dengan kelompok luka eksisi yang diberikan krim ekstrak buah delima dosis 20% (K6) tidak berbeda bermakna. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak buah delima dosis 20% menurunkan kadar TNF- α sama dengan kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplasenton* di hari ke 3 setelah perlakuan. Seperti yang ditunjukkan pada tabel hasil uji *Post hoc tamhane* tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2 Hasil uji *Post hoc Tamhane* hari 3 setelah perlakuan terhadap kadar TNF- α jaringan

Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,001	*0,001	0,794	*0,001	*0,001
K2	-	*0,042	*0,042	*0,001	*0,001
K3		-	*0,007	*0,002	*0,002
K4			-	0,910	1,000
K5				-	*0,011

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar TNF- α jaringan kulit pada hari ke 7

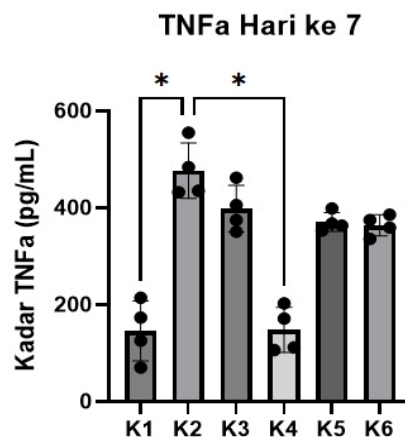
Hasil analisis rerata kadar TNF- α pada tiap kelompok hari ke 7 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.3 Uji deskriptif rata-rata kadar TNF- α dan uji *One way anova* hari ke 7 setelah perlakuan

Kelompok	Tikus sehat (K1)	Tikus Sham (K2)	Base cream (K3)	Bioplac enton (K4)	Dosis 10% (K5)	Dosis 20% (K6)	P value
Kadar TNF-α pg/mL							
Mean	145,73	476,64	398,34	148,11	370,72	363,90	
SD	$\pm 62,10$	$\pm 57,44$	$\pm 48,14$	$\pm 46,84$	$\pm 19,59$	$\pm 21,63$	
Shapiro-Wilk	*0,951	*0,277	*0,775	*0,340	*0,374	*0,850	
Leuvene Test							0,004
One way anova							*0,001

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

Hasil rerata kadar TNF- α 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 $p = 0,004$ ($p > 0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, kemudian dilakuakn uji *One way anova* dengan hasil 0,001 ($< 0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan rata-rata kadar TNF- α antar kelompok.



Gambar 5.2 Grafik kadar rata-rata TNF- α

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar TNF- α pada kelompok sehat (K7) sebesar 145,73 pg/mL, kelompok *sham* (K2) 476,64 pg/mL, kelompok *base cream* (K3) 398,34 pg/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 148,11 pg/mL, kelompok dosis 10% (K5) 370,72 pg/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 363,90 pg/mL. Perbandingan antar kelompok menunjukkan peningkatan rata-rata kadar TNF- α pada kelompok luka eksisi tanpa intervensi (*sham*) (K2), kelompok *base cream* (K3), kelompok dosis 10% (K5) dan dosis 20% (K6) pada hari ke 7 setelah perlakuan, namun kelompok yang diberikan *bioplacenton* (K4) dan kelompok tikus sehat (K1) tidak mengalami peningkatan rata-rata kadar TNF- α

Perbedaan yang signifikan antar kelompok dilakukan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingan antar kelompok yang paling berpengaruh. Hasil perbandingan rata-rata kadar TNF- α antar kelompok menunjukkan perbedaan bermakna, kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplacenton* (K4) memiliki pengaruh paling efektif pada hari ke 7 setelah perlakuan dibandingkan kelompok lainnya dengan rata-rata kadar TNF- α sebanding dengan kelompok tikus sehat. Seperti pada tabel hasil uji *Post hoc tamhane* tabel 5.4 berikut:

Tabel 5.4 Hasil uji *Post hoc Tamhane* hari 7 setelah perlakuan terhadap rata-rata kadar TNF- α

Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,002	*0,008	1,000	*0,024	*0,025
K2	-	0,527	*0,001	0,184	0,154
K3		-	*0,003	*0,007	*0,007
K4			-	*0,007	1,000
K5				-	1,000

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

5.1.3 Hasil pemeriksaan kadar SOD jaringan kulit pada hari ke 3

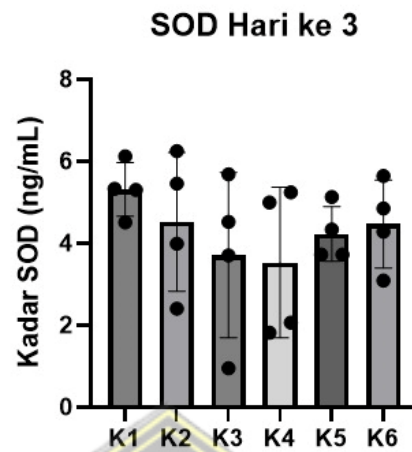
Hasil analisis rerata kadar SOD pada tiap kelompok hari ke 3 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.5 Uji deskriptif rata-rata kadar SOD dan uji *One way anova* shari ke 3 setelah perlakuan

Kelompok	Tikus sehat (K1)	Tikus Sham (K2)	Base cream (K3)	Bioplac enton (K4)	Dosis 10% (K5)	Dosis 20% (K6)	P value
Kadar SOD ng/mL							
Mean	5,31	4,52	3,71	3,53	4,23	4,46	
SD	±0,66	±1,69	±2,01	±1,83	±0,66	±1,07	
<i>Shapiro-Wilk</i>	*0,734	*0,821	*0,678	*0,094	*0,248	*0,948	
<i>Leuvene Test</i>							*0,098
<i>One way anova</i>							0,565

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

Hasil rerata kadar SOD dilakukan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil pada semua kelompok terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas data dengan uji *Leuvene Test* memiliki varian data yang homogen dengan hasil $p = 0,098$ ($p > 0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan homogen, kemudian dilakuakn uji *One way anova* dengan hasil $p = 0,565$ ($< 0,05$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan kadar SOD antar kelompok.



Gambar 5.3 Grafik rata-rata kadar SOD hari ke 3 setelah perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar SOD pada kelompok sehat (K1) sebesar 5,31 ng/mL, kelompok *sham* (K2) 4,52 ng/mL, kelompok *base cream* (K3) 3,71 ng/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 3,53 ng/mL, kelompok dosis 10% (K5) 4,23 ng/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 4,46 ng/mL. Perbandingan antar kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar semua kelompok.

5.1.4 Hasil pemeriksaan kadar SOD jaringan kulit pada hari ke 7

Hasil analisis rerata kadar SOD pada tiap kelompok hari ke 7 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.6 sebagai berikut:

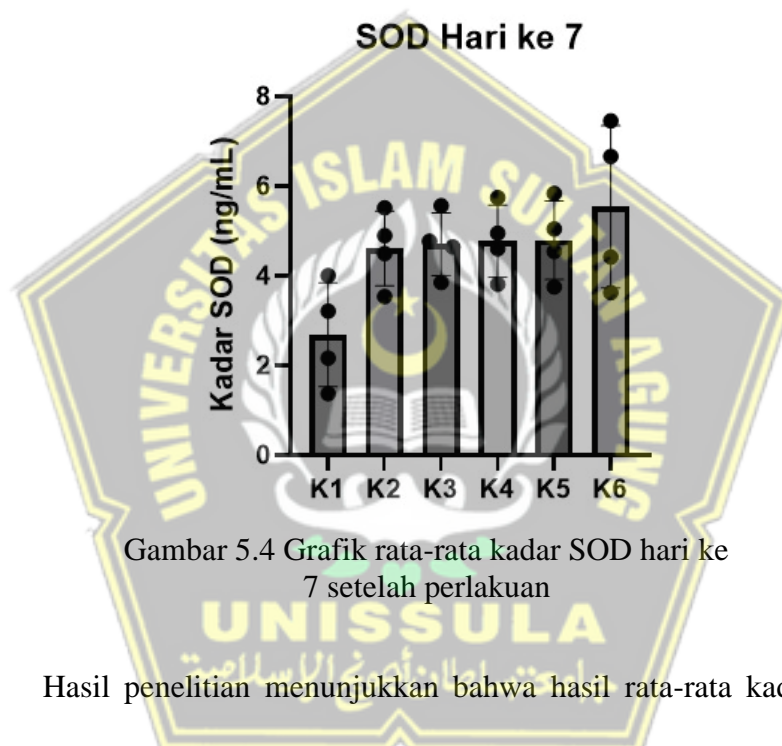
Tabel 5. 6 Uji deskriptif rata-rata kadar SOD dan uji *One way anova* hari ke 7 setelah perlakuan

Kelompok	Tikus sehat (K1)	Tikus Sham (K2)	Base cream (K3)	Bioplac enton (K4)	Dosis 10% (K5)	Dosis 20% (K6)	P value
Kadar SOD ng/mL							
Mean	2,69	4,61	4,70	4,77	4,79	5,53	
SD	±1,16	±0,83	±0,70	±0,80	±0,877	±181	
<i>Shapiro-Wilk</i>	*0,903	*0,926	*0,867	*0,988	*1,000	*0,516	
<i>Leuvene Test</i>							0,043
<i>One way anova</i>							*0,037

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

Hasil rata-rata kadar SOD 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 $p = 0,043$ ($p > 0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, kemudian dilakuakn uji *One way anova* dengan hasil 0,037 ($< 0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan rata-rata kadar SOD antar kelompok.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar SOD pada kelompok sehat (K) sebesar 5,31 ng/mL, kelompok *sham* (K2) 4,52 ng/mL, kelompok *base cream* (K3) 3,71 ng/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 3,53 ng/mL, kelompok dosis 10% (K5) 4,23 ng/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 4,46 ng/mL. Perbandingan antar kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar semua kelompok.



Gambar 5.4 Grafik rata-rata kadar SOD hari ke 7 setelah perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar SOD pada kelompok sehat (K7) sebesar 2,68 ng/mL, kelompok *sham* (K2) 4,61 ng/mL, kelompok *base cream* (K3) 4,70 ng/mL, kelompok *bioplacenton* (K4) 4,77 ng/mL, kelompok dosis 10% (K5) 4,79 ng/mL dan kelompok dosis 20% (K6) 5,53 ng/mL. Perbandingan antar kelompok menunjukkan peningkatan rata-rata kadar SOD pada kelompok luka eksisi yang diberikan krim ekstrak buah delima dosis 20% (K6), rata-rata kadar SOD paling rendah pada kelompok tikus sehat. Kelompok K2, K3, K4 memiliki kadar rata-rata yang berbeda,

untuk melihat perbedaan yang signifikan antar kelompok dilakukan uji *Post hoc tamhane* untuk mengetahui perbandingannya.

Hasil perbandingan rata-rata kadar SOD antar kelompok menunjukkan perbedaan bermakna, dosis krim buah delima 20% menunjukkan peningkatan rata-rata kadar paling tinggi yang menunjukkan peningkatan kadar SOD pada hari ke 7 setelah perlakuan, tergambar pada hasil hasil uji *Post hoc tamhane* tabel 5.7 berikut ini:

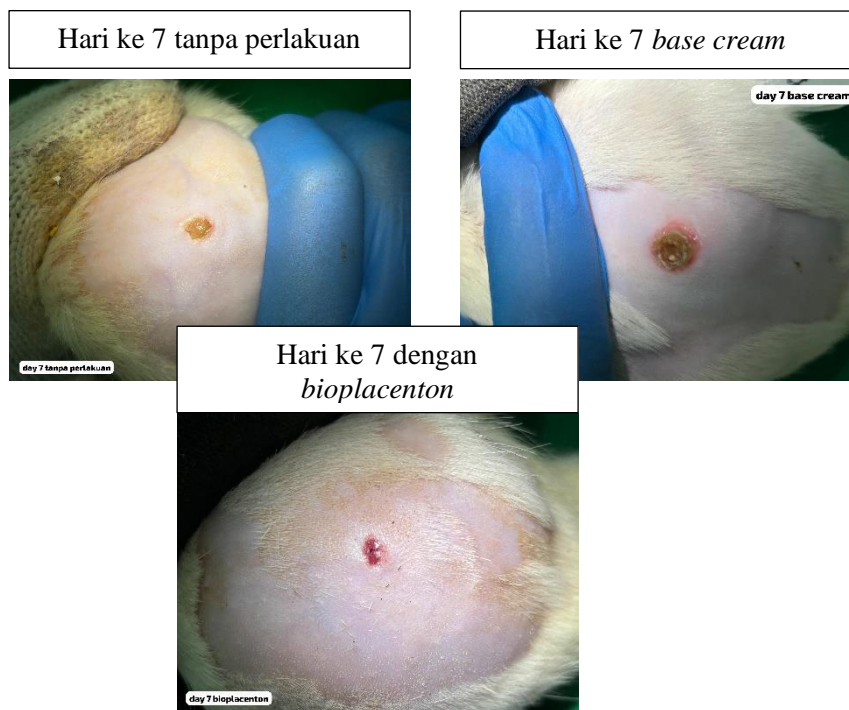
Tabel 5.7 Hasil uji *Post hoc Tamhane* hari 7 setelah perlakuan terhadap rata-rata kadar SOD

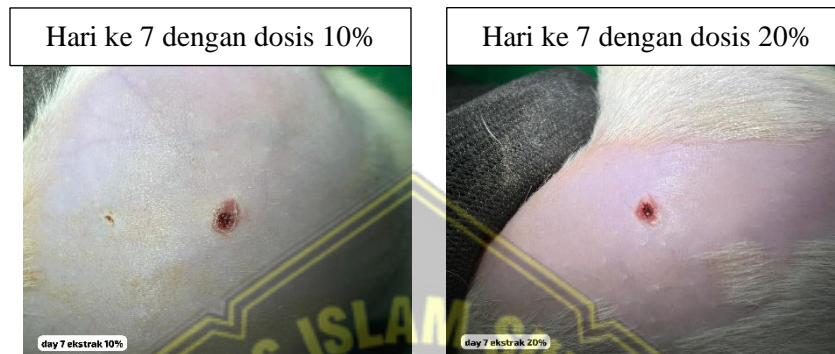
Kelompok	K2	K3	K4	K5	K6
K1	*0,035	0,285	*0,38	*0,037	*0,026
K2	-	0,257	*0,973	0,986	0,196
K3	-	-	0,271	0,263	0,866
K4	-	-	-	0,985	0,201
K5	-	-	-	-	0,201

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

5.1.1 Gambaran makroskopis pada luka eksisi antar kelompok

Pengamatan makroskopis pada subjek tikus pasca luka eksisi menunjukkan percepatan penyembuhan dan penutupan luka seperti pada gambar berikut:





Gambaran makroskopis kelompok perlakuan pada hari ke 7 menunjukkan percepatan penyembuhan dan penutupan luka, kelompok luka eksisi yang diberikan krim ekstrak buah delima 20% memiliki diameter luka 3,08mm secara makroskopis mendekati kelompok yang diberikan bioplacenton dengan diameter luas luka 2,97mm. kelompok luka eksisi yang diberikan krim ekstrak buah delima 10% diameter luka 4,21mm, juga menunjukkan percepatan penyembuhan dan penutupan luka dibandingkan kelompok tanpa perlakuan (K2) diameter luas luka 6,06 mm maupun yang diberikan *base cream* (K3) diameter luas luka 7,00mm. Dapat disimpulkan bahwa gambaran secara makroskopis luas luka eksisi setelah hari ke 7 dengan pemberian ekstrak buah delima dosis 20% mempercepat penutupan luas luka mendekati diameter dengan pemberian *bioplacenton*.

5.2 Pembahasan

Penyembuhan luka diawali dengan terbentuknya jaringan granulasi seperti

jaringan fibrovaskuler yang terdiri dari fibroblast, kolagen, dan pembentukan pembuluh darah. Komponen vaskuler sangat bergantung pada angiogenesis, pembuluh darah baru mulai muncul pada hari ketiga setelah terjadinya luka, akan memberi nutrisi dan mediator untuk proses penyembuhan luka. Peran makrofag sangat penting dalam proses selanjutnya. Makrofag akan menghasilkan berbagai macam sitokin, salah satunya ialah TNF- α yang merupakan sitokin penting dalam proses penyembuhan luka. Makrofag juga melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain untuk mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi.⁵⁵

Hasil penelitian menunjukkan peningkatan rata-rata kadar TNF- α pada kelompok luka eksisi tanpa intervensi (*sham*) paling signifikan dan mengalami penurunan paling rendah pada kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplacenton*, selanjutnya secara berurutan penurunan pada dosis krim ekstrak buah delima 20% dan dosis 10%. Pemberian krim ekstrak buah delima dosis 20% menurunkan kadar TNF- α sama dengan kelompok luka eksisi yang diberikan *bioplasenton* di hari ke 3 setelah perlakuan. Perbandingan antar kelompok menunjukkan peningkatan rata-rata kadar TNF- α pada kelompok luka eksisi tanpa intervensi (*sham*) (K2), kelompok *base cream* (K3), kelompok dosis 10% (K5) dan dosis 20% (K6) pada hari ke 7 setelah perlakuan, namun kelompok yang diberikan *bioplacenton* (K4) kelompok tikus sehat (K1) tidak mengalami peningkatan rata-rata kadar TNF- α .

TNF- α merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang berperan dalam signaling pada proses inflamasi. TNF- α diproduksi oleh makrofag dan diaktifkan oleh sel T limfosit, antigen, sel Natural Killer (NK), dan sel Mast pada fase akut.

TNF- α bertindak untuk menginduksi dan mengendalikan peradangan. TNF- α memainkan peran penting untuk melindungi luka dari infeksi, menginduksi proliferasi fibroblast, keratinosit dan regenerasi folikel rambut. Makrofag mencapai puncaknya pada hari ke 3, peningkatan tersebut berjalan lurus dengan peningkatan TNF- α . Teori tersebut terbukti karena terdapat peningkatan bermakna ekspresi TNF- α pada hari ke 3.⁵⁶

Hasil rata-rata kadar SOD antar kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan pada hari ke 3 setelah perlakuan, namun pada hari ke 7 setelah perlakuan hasil perbandingan rata-rata kadar SOD antar kelompok menunjukkan perbedaan bermakna, dosis krim buah delima 20% menunjukkan peningkatan rata-rata kadar paling tinggi yang menunjukkan peningkatan kadar SOD pada hari ke 7 setelah perlakuan.

Kadar ROS yang tinggi secara terus-menerus merusak struktur protein, lipid, dan DNA serta mengaktifkan jalur kematian sel, hal ini mengakibatkan kerusakan sel yang ireversibel, malfungsi, dan kematian organisme. Terutama diekspresikan di dinding arteri, SOD3 adalah isoenzim SOD yang meningkatkan bioavailabilitas oksida nitrat selain membersihkan superoksida. Aktivitas oksida nitrat meningkat dan homeostasis kontraktilitas pembuluh darah ditingkatkan ketika kadar superoksida diturunkan karena SOD3 membatasi interaksi cepat oksida nitrat dengan superoksida untuk menghasilkan peroksinirit. Peradangan perivaskular dipicu oleh hilangnya SOD3. Dermis dan epidermis keduanya mengandung SOD3.²⁴

Antioksidan diproduksi oleh tubuh sebagai tindakan perlindungan terhadap spesies oksigen reaktif (ROS). Molekul yang dikenal sebagai antioksidan mencegah

oksidasi bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah.²¹ Antioksidan bekerja dalam proses oksidatif melalui berbagai cara, antara lain sebagai pengikat ion logam, menyerap radikal lipid peroksid, memperbaiki kerusakan oksidatif, dan menjebak radikal bebas secara enzimatis atau kimia. Antioksidan menetralkan ROS dan menstabilkan radikal bebas untuk menghentikan oksidasi dengan menarik atau melepaskan elektron.⁵⁷

Antioksidan enzimatis yang terdapat di kulit termasuk katalase, glutathione peroksidase (GSH peroksidase), dan superoksida dismutase (SOD).²¹ Sel-sel kulit menciptakan ROS sebagai respons terhadap bahan kimia eksogen dan endogen, dan tingkat ROS yang berlebihan dapat merusak sel. Ketika ROS berdampak pada jalur pensinyalan MAP, NF- κ B dan AP-1 (aktivator protein-1), dua faktor transkripsi, diaktifkan. merangsang respons inflamasi, meningkatkan sintesis prokolagen dengan memblokir sinyal TGF- β /SMAD, dan meningkatkan pemecahan kolagen melalui degenerasi matriks dan produksi MMP.^{22,23}

Peradangan dan respon imun yang diperantarai sel berhubungan dengan pensinyalan TNF- α . Pensinyalan TNF- α mengatur proses seluler seperti imunomodulasi, peredaran leukosit, apoptosis, dan efek anti-mikroba.⁵⁸ Proliferasi makrofag M1 dirangsang oleh TNF α , aktivasi TLR, IL-1, dan interferon. Dekontaminasi luka yang efektif menghasilkan berakhirnya fase inflamasi dan dimulainya tahap reparatif, yang ditandai dengan proliferasi keratinosit dan fibroblas. Regulasi fase reparatif sebagian besar diatur oleh transisi makrofag M1 ke makrofag mirip M2 dan berbagai peran AMP. Dibutuhkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang terkendali setidaknya sebagian dibantu oleh

sintesis faktor pertumbuhan dan AMP agar reepitelisasi luka dapat terjadi.³² Deposisi dan regenerasi kolagen, yang berhubungan dengan proses proliferasi dan diferensiasi sel di daerah posterior jaringan sel, mendorong perbaikan, yang memerlukan penggantian komponen tertentu.²⁷

ROS sebagai metabolit tereduksi sebagian oksigen yang memiliki kemampuan oksidasi yang kuat, merusak sel pada konsentrasi tinggi tetapi pada konsentrasi rendah (konsentrasi pastinya masih belum ditentukan), ROS melayani fungsi sinyal yang kompleks. ROS merugikan, karena mengoksidasi konstituen sel protein dan lipid dan merusak DNA. Pada "konsentrasi fisiologis," ROS berfungsi sebagai molekul pemberi sinyal yang mengatur pertumbuhan adhesi sel terhadap sel lain, diferensiasi, penuaan, dan apoptosis.⁵⁹

Produksi ROS yang berlebihan selanjutnya dapat menyebabkan disfungsi protein, interaksi seluler yang tidak normal, kerusakan asam deoksiribonukleat (DNA)/asam ribonukleat (RNA), dan apoptosis sel. ROS juga memiliki kemampuan mengatur pembentukan pembuluh darah (angiogenesis) di lokasi luka dan perfusi darah yang optimal ke area penyembuhan luka. ROS berperan dalam pertahanan inang melalui fagosit yang menginduksi ledakan ROS ke patogen yang terdapat pada luka, sehingga menyebabkan kehancurannya, dan selama periode ini, kebocoran ROS berlebih ke lingkungan sekitar menimbulkan efek bakteristatik lebih lanjut.⁶⁰

Antioksidan mengatasi keterbatasan ini dengan menghambat oksidasi molekul dan mengembalikan tingkat fisiologis ROS yang normal. Namun, antioksidan ini terhambat oleh rendahnya bioavailabilitas dan bioaktivitas ketika

diberikan langsung pada luka. Penggabungan antioksidan ke dalam biomaterial memiliki potensi yang signifikan dalam merancang terapi penyembuhan luka. Pemberian antioksidan menjadi penting salah satunya bersumber dari buah delima.⁶ Ekstrak delima secara signifikan meningkatkan proses penyembuhan luka.¹¹ Radikal bebas dapat dihambat atau dikurangi dengan antioksidan yang bertindak sebagai pemulung terhadap kerusakan oksidatif. Komponen antioksidan ekstrak buah delima menyumbangkan satu elektron ke radikal bebas, menetralsirkannya dan menciptakan radikal bebas yang relatif stabil, sehingga dapat mendetoksifikasi ROS.⁵⁰ Penelitian ini membuktikan bahwa penggunaan krim ekstrak buah delima meningkatkan aktivitas antioksidan dengan meredakan inflamasi dengan menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar SOD yang mempercepat penyembuhan luka. Mendorong penyembuhan luka dan remodeling jaringan.⁶¹ SOD mempercepat proses perbaikan jaringan dan regenerasi jaringan.⁶²

Penelitian ini tidak melakukan perlakuan dosis krim ekstrak buah delima dengan meningkatkan dosis lebih besar terhadap parameter molekulernya, penelitian selanjutnya dapat dilakukan pada kondisi luka kronis dengan perlakuan lebih lama dengan mengamati kadar TNF- α dan SOD. Faktor yang mempengaruhi hasil seperti lingkungan, genetik, maupun nutrisi dapat menjadi perhatian agar menghindari bias pada penelitian.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

6.1.1. Pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica Granatum*) menurunkan kadar TNF- α jaringan kulit tikus wistar pasca luka eksisi

6.1.2. Pemberian krim ekstrak buah delima (*Punica Granatum*) meningkatkan kadar SOD jaringan kulit tikus wistar pasca luka eksisi

6.2. Saran

6.2.1. Analisis terhadap krim ekstrak buah delima dengan variasi dan konsentrasi lebih besar untuk diamati bagaimana reaksi terhadap terhadap kadar TNF- α dan kadar SOD maupun parameter molekuler lainnya.

6.2.2. Melakukan pengamatan pada kondisi luka kronis dengan perlakuan lebih lama untuk melihat tingkat penyembuhan dari krim ekstrak buah delima.

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. Cahya RW, Yudaniyanti IS, Wibawati PA, Yunita MN, Triakoso N, Saputro AL. The Effect of Sukun Leaf (*Artocarpus altilis*) Extract on Collagen Density of Excision Wound Healing in Albino Rats (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medik Veteriner.* 2020;3(1):25-30. doi:10.20473/jmv.vol3.iss1.2020.25-30
3. Huang R, Hu J, Qian W, Chen L, Zhang D. Recent advances in nanotherapeutics for the treatment of burn wounds. *Burns Trauma.* 2021;9. doi:10.1093/burnst/tkab026
4. 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
5. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol.* 2015;3(2):57-70. doi:10.3390/jdb3020057
6. 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
7. Nema N, Arjariya S, Bairagi SM, Jha M, Kharya MD. *In Vivo Topical Wound Healing Activity of Punica Granatum Peel Extract on Rats.*; 2013. www.ajpct.org
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. Zhang W, Chen L, Xiong Y, et al. Antioxidant Therapy and Antioxidant-Related Bionanomaterials in Diabetic Wound

- Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9. doi:10.3389/fbioe.2021.707479
13. Zhang F, Qiao S, Li C, Wu B, Reischl S, Neumann PA. The immunologic changes during different phases of intestinal anastomotic healing. *J Clin Lab Anal.* 2020;34(11). doi:10.1002/jcla.23493
 14. Younus H. *Therapeutic Potentials of Superoxide Dismutase. International Journal of Health Sciences.*; 2018.
 15. Bogdan C, Iurian S, Tomuta I, Moldovan M. Improvement of skin condition in striae distensae: Development, characterization and clinical efficacy of a cosmetic product containing Punica granatum seed oil and Croton lechleri resin extract. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:521-531. doi:10.2147/DDDT.S128470
 16. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, Shapiro IM, Risbud M V. *Disc in Flames: Roles of TNF- α and IL-1 β in Intervertebral Disc Degeneration.*; 2016.
 17. Grine L, Dejager L, Libert C, Vandenbroucke RE. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(1):25-33. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.10.009
 18. Lee KJ, Park KH, Hahn JH. Alleviation of ultraviolet-B radiation-induced photoaging by a TNFR antagonistic peptide, TNFR2-SKE. *Mol Cells.* 2019;42(2):151-160. doi:10.14348/molcells.2018.0423
 19. Nahhas AF, Abdel-Malek ZA, Kohli I, Braunberger TL, Lim HW, Hamzavi IH. The potential role of antioxidants in mitigating skin hyperpigmentation resulting from ultraviolet and visible light-induced oxidative stress. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2019;35(6):420-428. doi:10.1111/phpp.12423
 20. 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
 21. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *JKK.* 2017;4(1):39-48.
 22. Gęgotek A, Skrzydlewska E. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(5):385-396. doi:10.1007/s00403-015-1554-2
 23. Altobelli GG, Van Noorden S, Balato A, Cimini V. Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. *Front Med (Lausanne).* 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.00183
 24. 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
25. Nourian Dehkordi A, Mirahmadi Babaheydari F, Chehelgerdi M, Raeisi Dehkordi S. Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1212-2
 26. 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
 27. 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
 28. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(18):3209-3213. doi:10.1242/jcs.031187
 29. 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
 30. 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
 31. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association.* 2018;81(2):94-101. doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002
 32. 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
 33. Martin P. *Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration.* <http://science.sciencemag.org/>
 34. Gurtner G, Wong VW. Wound healing: normal and abnormal. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 2007;6:15-22.
 35. 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
 36. Lima A, Silva J, Oliveira LS, et al. *Ascorbic Acid for the Healing of Skin Wounds in Rats.* Vol 69.; 2009.
 37. Anderson J. The cellular cascades of wound healing. *Bone Engineering.* Published online 2000:81-94.
 38. 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.
 39. 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
40. 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
 41. Khwairakpam AD, Bordoloi D, Thakur KK, et al. Possible use of Punica granatum (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacol Res.* 2018;133:53-64. doi:10.1016/j.phrs.2018.04.021
 42. 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
 43. 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
 44. 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
 45. 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
 46. 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
 47. Lewa S, Gugule S. Cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) Bark Essential Oil as Raw Material for Skin Cream and Anti-Bacterial. *Acta Chimica Asiana.* 2022;5(1):158-165. doi:10.29303/aca.v5i1.80
 48. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol.* 2015;3(2):57-70. doi:10.3390/jdb3020057
 49. 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
 50. Arief H, Aris M, Bagian W, et al. *Peranan Stres Oksidatif Pada Proses Penyembuhan Luka.* Vol 5.; 2018.
 51. Ullah A, Munir S, Badshah SL, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules.* 2020;25(22). doi:10.3390/molecules25225243

52. Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph B V., Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*. 2022;27(9). doi:10.3390/molecules27092901
53. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. *Advances in Skin Grafting and Treatment of Cutaneous Wounds*.
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. Pereira LDP, Mota MRL, Brizeno LAC, et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . *J Ethnopharmacol*. 2016;187:213-223. doi:10.1016/j.jep.2016.04.043
56. van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(5):289-303. doi:10.1038/s41577-022-00792-3
57. Ikrima K, Amalia R, Levita J. *PERAN SPESIES OKSIGEN REAKTIF PADA INFLAMASI SERTA ANTIOKSIDAN ALAMI SEBAGAI FITOTERAPI*. Vol 17.
58. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(4):745-751. doi:10.1007/s12079-018-0486-y
59. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(7):1126-1167. doi:10.1089/ars.2012.5149
60. Dunnill C, Patton T, Brennan J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*. 2017;14(1):89-96. doi:10.1111/iwj.12557
61. Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(2):105-122. doi:10.1038/s41571-018-0115-y
62. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S. The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells*. 2021;10(11). doi:10.3390/cells10113242