

**PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN MENGGKUDU
(*Morinda Citrifolia L*) TERHADAP KADAR IL-6
DAN VEGF
(Studi Eksperimental Pada Tikus Galur
Wistar Dengan Luka Iris)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Enike Putri Ananto

MBK.23.22.010403

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2025**

TESIS
PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN MENGGKUDU
(*Morinda Citrifolia L*) TERHADAP KADAR IL-6
DAN VEGF
(Studi Eksperimental Pada Tikus Galur Wistar Dengan Luka Iris)

disusun oleh:

Enike Putri Ananto

MBK.23.22.010403

yang dipertahankan didepan Tim Penguji

Januari 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF
NIK. 210199049



Dr. dr. Danis Pertiwi M.Si. Med,Sp.PK
NIK. 210199051

Mengetahui,

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



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS
NIK 210 113 160

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 di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 18 Januari 2025



Enike Putri Ananto
MBK .23.22.010403

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN MENGGKUDU (*Morinda Citrifolia L*) TERHADAP KADAR IL-6 DAN VEGF (Studi Eksperimental Pada Tikus Galur Wistar Dengan Luka Iris)”.

Tujuan penulisan proposal tesis ini adalah untuk memenuhi syarat dalam mencapai derajat Magister Biomedik pada Program Studi Pasca Sarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dalam proses penulisan proposal tesis ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak sehingga penyusunan laporan tesis ini dapat terselesaikan tepat waktu. Oleh karena itu, ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M.Hum. Selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang sekaligus sebagai pembimbing I yang telah memberikan arahan serta dukungan dalam penyusunan tesis ini.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan dukungan dalam penyusunan tesis ini.
4. Dr. dr. Danis Pertiwi M.Si. Med,Sp.PK selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta motivasi selama

penyusunan tesis ini.

5. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS, Prof. Dr. Dra. Atina Husaana, Msi. Apt dan Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes selaku team penguji proposal tesis yang banyak memberikan masukan, kritik serta saran untuk perbaikan tesis ini.
6. Orang tua dan anak tercinta yang telah banyak memberikan doa, semangat, dukungan materil maupun immateril sehingga proposal tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.
7. Seluruh staf dan pengajar Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah banyak membantu selama penyusunan proposal tesis ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam penyusunan tesis ini. Untuk itu saran dan masukannya akan sangat membantu agar tesis ini dapat menjadi lebih baik. Akhirnya penulis mengucapkan banyak terima kasih, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan berkah kepada kita semua.

Bukittinggi, Desember 2024

Enike Putri Ananto
MBK.23.22.010403

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Originalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	6
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.5.2. Manfaat Praktis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Luka Iris.....	7
2.1.1. Definisi	7
2.1.2. Fase Penyembuhan Luka	7
2.1.3. Patomekanisme Penyembuhan Luka Iris Secara Molekuler	13
2.2. <i>Interleukin 6 (IL-6)</i>	16

2.2.1.	Aktivasi IL-6.....	17
2.2.2.	Peran IL-6 dalam Proses Penyembuhan Luka	18
2.2.3.	Faktor yang Mempengaruhi Kadar IL-6.....	19
2.3.	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF).....	20
2.3.1.	Aktivasi VEGF	20
2.3.2.	Mekanisme Jalur VEGF	24
2.3.3.	Faktor yang Mempengaruhi Kadar VEGF	26
2.3.4.	Metode Pemeriksaan Kadar IL-6 dan VEGF Jaringan Kulit Dengan Metode ELISA	26
2.4.	Krim Ekstrak Daun Mengkudu (EDM).....	27
2.4.1.	Definisi Tanaman Mengkudu	27
2.4.2.	Taksonomi Tanaman Mengkudu	28
2.4.3.	Kandungan dan Khasiat Mengkudu.....	29
2.4.4.	Proses Pembuatan Ekstrak Daun Mengkudu Hingga Menjadi Krim.....	30
2.4.5.	Kelebihan Krim Ekstrak Daun Mengkudu	31
2.5.	Pengaruh pemberian krim EDM terhadap kadar IL-6 dan VEGF.....	32
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....		36
3.1.	Kerangka Teori.....	36
3.2.	Kerangka Konsep	41
3.3.	Hipotesis	41
BAB IV METODE PENELITIAN		42
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	42
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	43
4.2.1.	Variabel Bebas	43
4.2.2.	Variabel Terikat	43
4.2.3.	Definisi Operasional	43
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	44
4.4.	Teknik Pengambilan Sampel Penelitian	45
4.5.	Besar sampel.....	45
4.6.	Alat dan Bahan	45

4.7. Cara Penelitian.....	46
4.7.1. Perizinan <i>Ethical Clearance</i>	46
4.7.2. Persiapan Sampel.....	46
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian.....	53
4.9. Analisa Data	54
4.10. Alur Penelitian.....	55
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	56
5.1. Hasil Penelitian.....	56
5.1.1. Gambaran Makroskopis Luka Iris	56
5.1.2. Hasil Analisis Kadar IL-6 Jaringan Kulit Tikus Dengan Luka Iris	57
5.1.3. Hasil Analisis Kadar VEGF Jaringan Kulit Tikus.....	61
5.2. Pembahasan	64
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	69
6.1. Kesimpulan.....	69
6.2. Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN.....	78



DAFTAR SINGKATAN

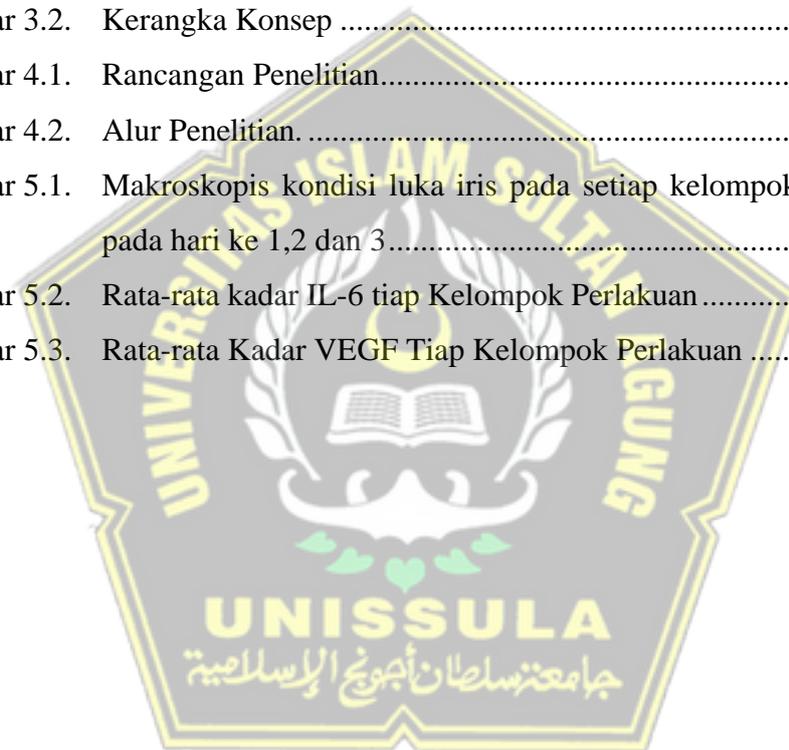


AKT	: <i>Protein kinase B</i>
AMP	: <i>Antimicrobial peptide</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
EG-VEGF	: <i>Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast growth factor-2</i>
Flk-1	: <i>Fetal liver kinase-1</i>
GAG	: <i>Glycosaminoglycan</i>
IHC	: <i>Immunohistochemistry</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
KDR	: <i>Kinase insert domain receptor</i>
KGF	: <i>Keratinocyte growth factor</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	: <i>Mitogen activation protein kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP-1 β	: <i>Macrophage inflammatory protein-1 beta</i>
MiR-21	: <i>MicroRNA-21</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger ribo nucleic acid</i>
NF κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>

NGF	: <i>Nerve growth factor</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NP-1	: <i>Neuropilin-1</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PIGF	: <i>Placental growth factor</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	: <i>Protein kinase C</i>
PK1	: <i>Prokineticin 1</i>
PLC γ	: <i>Phospholipase c-gamma</i>
PRR	: <i>Pattern recognition receptors</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RTKs	: <i>Receptor tyrosine kinases</i>
SAA	: <i>Serum amyloid A</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TLRs	: <i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-1	: <i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Proses penyembuhan luka.....	14
Gambar 2.2.	Mekanisme penyembuhan luka akut.	16
Gambar 2.3.	Aktivasi IL-6.....	18
Gambar 2.4.	Jalur aktivasi VEGF.....	25
Gambar 2.5.	Buah dan daun mengkudu.....	29
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	40
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	41
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian.....	42
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.	55
Gambar 5.1.	Makroskopis kondisi luka iris pada setiap kelompok perlakuan pada hari ke 1,2 dan 3.....	57
Gambar 5.2.	Rata-rata kadar IL-6 tiap Kelompok Perlakuan	59
Gambar 5.3.	Rata-rata Kadar VEGF Tiap Kelompok Perlakuan	62



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian	4
Tabel 5.1.	Rata-rata Kadar IL-6 dan uji <i>One Way Anova</i>	58
Tabel 5.2.	Hasil Uji Post Hoc Tamhane Kadar IL-6 Jaringan Kulit Tikus.....	58
Tabel 5.3.	Rata-rata Kadar VEGF dan Uji <i>One Way Anova</i>	61
Tabel 5.4.	Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> Kadar VEGF Jaringan Kulit Tikus Setelah Perlakuan Hari Ke 3	62



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	78
Lampiran 2. Keterangan dan Hasil Penelitian	79
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian	82
Lampiran 4. Uji Statistik	83



ABSTRAK

Latar Belakang: Proses penyembuhan luka sering kali memakan waktu yang lama. Metode konvensional menggunakan bahan sintesis memiliki efek samping seperti iritasi dan biaya yang tinggi. Diperlukan alternatif bahan alami yang efektif dan aman untuk mempercepat penyembuhan luka. Daun mengkudu (*Morinda Citrifolia L*) terbukti meningkatkan proses perbaikan dan penurunan luas luka.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian krim EDM (Ekstrak Daun Mengkudu) terhadap kadar IL-6 dan VEGF jaringan kulit tikus dengan luka iris

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium menggunakan *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian adalah 30 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi 5 kelompok. Kelompok tikus sehat tanpa luka iris (K1), Kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan basis krim (K2), Kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone iodine* (K3), Kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4), Kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40 % (K5), perlakuan dilakukan selama 3 hari. Pada hari ke 4 jaringan kulit pada luka iris dianalisis kadar IL-6 dan VEGF dengan metode ELISA.

Hasil: Terdapat perbedaan signifikan rata-rata kadar IL-6 antar kelompok dengan Uji *One way anova p* (0,000). Kadar IL-6 lebih rendah pada K4, dan kadar IL-6 lebih tinggi pada K5. Terdapat perbedaan bermakna kelompok K5 dibandingkan dengan kelompok K4. Terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata kadar VEGF semua kelompok (*p* 0,000). kadar VEGF tertinggi pada kelompok K5 dan terendah pada kelompok K2.

Kesimpulan: Pemberian krim EDM berpengaruh terhadap kadar IL-6 dan kadar VEGF dimana krim EDM menurunkan kadar IL-6 dan meningkatkan kadar VEGF pada luka iris.

Kata Kunci: Luka iris, IL-6, VEGF, daun mengkudu

ABSTRACT

Background: The wound healing process often takes a long time. Conventional methods using synthetic materials have side effects such as irritation and high costs. Alternative natural materials are needed that are effective and safe to accelerate wound healing. Noni leaves (*Morinda Citrifolia L*) have been shown to increase the repair process and reduce wound area.

Purpose: This study aims to determine the effect of administering EDM cream (Mengkudu Leaf Extract) on IL-6 and VEGF levels in skin tissue of mice with incised wounds.

Method: Laboratory experimental research using Post Test Only Control Group Design. The research sample was 30 male Wistar rats divided into 5 groups. Healthy rat group without incisions (K1), Rat group with incisions applied with cream base (K2), Rat group with incisions applied with povidone iodine (K3), Rat group with incisions applied with 20% EDM cream (K4), Rat group with incisions applied with 40% EDM cream (K5), the treatment was carried out for 3 days. On the 4th day, the skin tissue on the incision was analyzed for IL-6 and VEGF levels using the ELISA method.

Results: There was a significant difference in the average IL-6 levels between groups with One way anova test p (0.000). IL-6 levels were lower in K4, and IL-6 levels were higher in K5. There was a significant difference in the K5 group compared to the K4 group. There was a significant difference in the average VEGF levels of all groups (p 0.000). The highest VEGF levels were in the K5 group and the lowest in the K2 group.

Conclusion: Administration of EDM cream affects IL-6 and VEGF levels where EDM cream reduces IL-6 levels and increases VEGF levels in incised wounds.

Keywords: Incision wounds, IL-6 levels, VEGF levels, mengkudu leaf extract cream

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyembuhan luka yang cepat dan memuaskan secara estetika menjadi keinginan pasien.¹ Proses penyembuhan luka sering kali memakan waktu yang lama, metode konvensional menggunakan bahan sintetis memiliki efek samping seperti iritasi, resistensi mikroba, serta biaya yang tinggi. Oleh karena itu, diperlukan alternatif bahan alami yang efektif dan aman untuk mempercepat penyembuhan luka.^{2,3} Terapi berbasis bahan alam yang potensial lebih aman, efektif, dan terjangkau dibandingkan dengan obat sintetis.^{4,5} Daun mengkudu (*Morinda Citrifolia L*) terbukti meningkatkan proses perbaikan dan penurunan luas luka.^{6,7} Formulasi topikal krim berbasis Ekstrak Daun Mengkudu (EDM) memungkinkan aplikasi langsung pada luka, meningkatkan efektivitas lokal, dan meminimalkan efek sistemik. Sediaan krim memiliki daya lekat yang baik dengan konsistensi yang kental paling mudah meresap ke dalam kulit.⁸ Daun mengkudu mengandung senyawa fitokimia alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpen, dan kumarin, memiliki sifat antioksidan, dan anti-inflamasi, yang dapat mempercepat penyembuhan luka.^{4,9,10}

Luka menjadi masalah medis umum yang mempengaruhi individu di seluruh dunia. Frekuensi luka meningkat setiap tahunnya.¹¹ Luka akut menyebabkan 17,2 juta orang harus dirawat di rumah sakit pada tahun 2014. 42,2% dari kunjungan tersebut merupakan kunjungan rawat inap, sedangkan sisanya 57,8%, merupakan kunjungan rawat jalan ke rumah sakit. Kementerian Kesehatan RI (2016) merilis

data yang menunjukkan bahwa 41.034 kejadian luka ringan atau rawat jalan dan sekitar 3.922 kasus rawat inap dengan luka berat berkaitan dengan bencana.¹² Pengobatan herbal masih dapat diperoleh melalui produk alami dalam sistem pelayanan kesehatan. Mengurangi beban keuangan pasien sekaligus mendorong penyembuhan adalah manfaat utama penggunaan obat-obatan dan tanaman tradisional dalam perawatan luka.¹³

Luka iris adalah luka yang disebabkan oleh benda tajam, seperti pisau, yang permukaannya tampak bagus, namun menimbulkan efek merugikan pada tubuh pasien, seperti nyeri dan peradangan.¹⁴ Luka iris memicu inflamasi pada jaringan yang terluka ditandai dengan peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi.¹⁵ Aktivasi jalur p38/Jun oleh *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dan *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), menyebabkan sekresi sitokin inflamasi salah satunya IL-6. Penghentian inflamasi fase penyembuhan luka dan dimulainya fase perbaikan proliferasi pada fase makrofag M2 yang akan mengaktifasi sitokin anti inflamasi dan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF).¹⁶ EDM yang mengandung bahan kimia aktif terbukti memiliki sifat anti inflamasi dan antioksidan sehingga membantu mempercepat penyembuhan luka dan mengurangi peradangan.^{17,18}

Penelitian menunjukkan efisiensi penyembuhan luka sediaan herbal yang diformulasikan dari EDM pada tikus. Aplikasi topikal sediaan EDM pada kelompok perlakuan meningkatkan kontraksi luka secara signifikan selama 11 hari pengobatan. Krim yang mengandung ekstrak 1% tidak hanya mampu memperkecil ukuran luka secara signifikan tetapi juga meregenerasi struktur histologi kulit di

area luka. Krim ini terbukti aman pada studi iritasi kulit menggunakan subjek kelinci.¹⁹ Penelitian lain membandingkan tikus yang diberi gentamisin (standar) atau gliserin (kontrol) pada hari ke 3 dan 5, tikus yang diberi EDM menunjukkan penurunan luas luka. Dibandingkan dengan standar dan kontrol, kontraksi yang lebih baik terlihat pada hari ke 7 dan 9, ekstrak etanol 70% daun mengkudu kesembuhan mencapai 92,45% (EDM 1%) dan 87,18% (EDM 5%) dibandingkan kontrol (54,46%) dalam waktu 11 hari.²⁰

Pengobatan dengan bahan alami yang diformulasi dalam bentuk krim EDM menjadi alternatif untuk meredakan inflamasi dan mempercepat penyembuhan pasca luka iris. Sejauh ini belum ada penelitian yang melaporkan pengaruh pemberian krim EDM terhadap kadar IL-6 dan VEGF pada jaringan kulit tikus model luka iris, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian krim EDM berpengaruh terhadap kadar IL-6 dan VEGF jaringan kulit tikus *Wistar* model luka iris?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian krim EDM terhadap kadar IL-6 dan VEGF jaringan kulit tikus *Wistar* model luka iris.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui rata-rata kadar IL-6 dan VEGF pada tikus yang tidak diberi luka iris

2. Mengetahui rata-rata kadar IL-6 dan VEGF pada tikus luka iris yang diberi basis krim
3. Mengetahui rata-rata kadar IL-6 dan VEGF pada tikus luka iris yang diberi *povidon iodine*
4. Mengetahui rata-rata kadar IL-6 dan VEGF pada tikus luka iris yang diberi krim EDM 20%
5. Mengetahui rata-rata kadar IL-6 dan VEGF pada tikus luka iris yang diberi krim EDM 40%
6. Menganalisis perbedaan kadar IL-6 dan VEGF jaringan kulit tikus antar kelompok

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Trieu LH, Quynh DNN, Oanh NTK, et al. ¹⁹	<i>Wound-healing potential of topical application of preparations from Noni (Morinda citrifolia L.) leaf extract.</i>	eksperimen tal <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i>	Krim EDM konsentrasi 1% menunjukkan kemampuan paling efektif dalam mempercepat penyembuhan luka dan regenerasi kulit. Memiliki efek antioksidan in vitro yang baik serta kandungan senyawa flavonoid total dan rutin dalam formula topikal potensial menunjukkan kontribusi terhadap aktivitas penyembuhan luka.
Ly HT, Pham Nguyen MT, TKO, Bui TPQ, Ke X, Le VM. ²⁰	<i>Phytochemical Analysis and Wound-Healing Activity of Noni (Morinda citrifolia) Leaf Extract.</i>	eksperimental <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i>	Dengan ekstrak etanol 70% daun mengkudu tingkat kesembuhan mencapai 92,45% (EDM 1%) dan 87,18% (EDM 5%) dibandingkan control (54,46%) dalam waktu 11 hari, menunjukkan penurunan luas luka dibandingkan tikus

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
			yang mendapat perlakuan gentamisin atau gliserin. Pengamatan visual juga menunjukkan penurunan ukuran luka secara bertahap pada kelompok tikus tersebut.
Sinambela GN, Tandanu E, Ikhtiari R. ⁵	<i>The wound healing effect of Morinda citrifolia leaf extract and biomolecular analysis on inflammation and proliferation stages in Wistar rats.</i>	Eksperimen tal, <i>In vivo</i>	Terdapat pengaruh <i>Noni's leaf extract</i> (NLEE) 20%, 25%, dan 30% terhadap jumlah fibroblas, diameter luka, waktu penyembuhan, TNF-a, IL-1, PDGF, dan TGF-β. Dosis 20% paling ideal untuk setiap terapi. Konsentrasi flavonoid EDM sebesar 10,88 mgQE/g. Sejumlah senyawa fenolik, piperazine, vitamin E, dan metil ester asam lemak jenuh merupakan zat bioaktif yang berkontribusi terhadap penyembuhan luka pada tikus wistar.
Parmadi A, Rejeki S, Hastuti S, Bhakti P, Sukoharjo M. ²¹	<i>Formulation and Development Physical Test of Leaf Ethanol Extract Cream Noni (Morinda citrifolia L) As a Wound Healer.</i>	eksperimen tal <i>In Vivo</i>	EDM memenuhi kriteria evaluasi formulasi krim dan dapat diformulasikan menjadi bentuk sediaan krim. Krim EDM bermanfaat untuk penyembuhan luka, dengan persentase daya penyembuhan luka sebesar 7,69% untuk krim EDM 5%, 17,26% untuk krim 10%, dan 29,35% untuk krim 15%.
Haestidyatami VL, Sugiritama IW, Linawati NM. ¹⁷	Pengaruh ekstrak krim Morinda citrifolia terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka tikus Wistar	eksperimen tal <i>In Vivo</i>	Kelompok kontrol yang menggunakan krim ekstrak mengkudu 5%, 10%, dan 20% berbeda nyata dalam jumlah sel fibroblas. Krim yang mengandung ekstrak 10% menunjukkan jumlah rata-rata sel fibroblas tertinggi. Krim ekstrak 20% memiliki rata-rata jumlah sel fibroblas yang sama dengan kelompok kontrol.

Berbeda dari penelitian-penelitian di atas, penelitian ini berfokus pada proses pengembangan terapi alternatif dalam mengatasi peradangan pada luka dan mempercepat penyembuhan pada jaringan kulit tikus wistar model luka iris dengan mengamati parameter molekuler, khususnya kadar sitokin IL-6 dan *Growt Factor* VEGF.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Untuk memberikan literasi tambahan tentang pengaruh pemberian EDM dalam mempercepat penyembuhan luka serta gambaran kadar IL-6 dan kadar VEGF pada jaringan kulit tikus model luka iris.

1.5.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar dalam pengembangan manfaat daun mengkudu sebagai agen anti-inflamasi dalam mengurangi peradangan dan mempercepat penyembuhan pada luka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Luka Iris

2.1.1. Definisi

Luka iris merupakan jenis luka yang mengalami kerusakan jaringan cukup luas, Luka iris merujuk pada luka yang terjadi ketika jaringan dipotong oleh benda tajam menembus area dermis. Luka iris yang berbentuk garis dengan ciri permukaan luka tampak teratur, sudut luka tajam, tidak ada jembatan jaringan, tidak terdapat membran pada area sekitar luka, dan kedalaman luka lebih kecil dibanding panjang luka. Tipe luka iris yang paling umum adalah sayatan garis tengah dan sayatan melintang.¹⁴

Proses fisiologi penyembuhan luka adalah suatu proses yang rumit dan dinamis yang bertujuan untuk mengganti dan mengembalikan struktur serta fungsi jaringan luka agar kembali seperti semula. Proses ini melibatkan serangkaian peristiwa yang saling terkait dan saling berhubungan, namun bergantung satu sama lain, sehingga menciptakan suatu proses penyembuhan yang efektif melalui empat fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling.²²

2.1.2. Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan kulit merupakan peristiwa biologis dan biokimia dalam pemulihan luka, tiga tahap proses penyembuhan kulit

meliputi reaksi inflamasi, proliferasi sel dan pembentukan matriks ekstraseluler, serta fase remodeling setelahnya.²⁰

2.1.2.1. Fase inflamasi

Fase inflamasi dalam penyembuhan luka adalah tahap awal dari proses reparasi jaringan yang dimulai segera setelah luka terjadi dan berlangsung selama 24 hingga 48 jam, meskipun dapat berlanjut hingga beberapa hari tergantung pada kondisi luka dan individu. Tahap ini sangat penting untuk membersihkan jaringan luka dari patogen, sel-sel mati, dan puing-puing yang dapat menghambat penyembuhan.²³ Jaringan fibrin mengembalikan peran kulit sebagai pelindung dan menjaga integritas kulit dengan membangun kembali homeostatis dan menciptakan penghalang terhadap patogen *invasive*, mengatur matriks sementara yang diperlukan untuk migrasi sel.²⁴

Fase inflamasi berlangsung hingga lima hari, tahap ini penting untuk hemostasis dan mencegah kolonisasi atau infeksi bakteri. Selama fase inflamasi, koagulasi disebabkan oleh pelepasan faktor kemotaktik dari jaringan sekitar dan plasma darah, seperti kallikrein dan peptida fibrin. Tumor nekrosis faktor alpha (TNF- α), protease, histamin, sitokin, dan leukotrien disekresi oleh sel mast, yang menginduksi migrasi sel inflamasi. Monosit dan neutrofil adalah jenis sel kekebalan pertama yang berpindah ke jaringan yang terluka.^{13,25}

Prostaglandin, IL-1, TNF- α , C5a, TGF- β , dan produk pemecahan bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) dapat mendorong neutrofil bermigrasi ke jaringan luka dan membengkakkan rongga yang ditinggalkan luka. Diapedesis ini sebagian disebabkan oleh peningkatan permeabilitas kapiler oleh sel endotel pembuluh darah. Permeabilitas kapiler disebabkan oleh serotonin dan histamin yang dilepaskan oleh sel mast. Dengan memfagositosis mikroba berbahaya dan jaringan mati, neutrofil yang bermigrasi ke jaringan yang terluka membantu mencegah infeksi. Neutrofil pada jaringan yang terluka akhirnya menjadi kurang terkonsentrasi akibat proses regenerasi jaringan, pada luka kronis, konsentrasi neutrofil yang tinggi menunjukkan adanya konversi dari infeksi.²⁶

Monosit akan berkembang menjadi makrofag akan tiba dalam waktu 48 hingga 72 jam dan mengambil alih sebagai sel dominan pada hari ketiga setelah kerusakan kulit. Makrofag membantu fagositosis bakteri dan puing-puing pada kerusakan jaringan. Selain itu, makrofag berkontribusi pada sintesis banyak faktor pertumbuhan yang merangsang fibroblas untuk menghasilkan matriks ekstraseluler dan mendorong neovaskularisasi melalui mesenkim jaringan, yang pada akhirnya membantu penyembuhan luka.^{11,27}

Fagositosis dan produksi sitokin inflamasi, neutrofil dan

makrofag menghasilkan ROS. ROS membantu mencegah infeksi bakteri. kadar ROS yang berlebihan dapat menyebabkan sel-sel tubuh akhirnya mengalami apoptosis sehingga memperlambat proses regenerasi jaringan. Prostaglandin dan leukotrien, dua mediator inflamasi yang diproduksi kembali, serta aktivasi dan pemeliharaan kadar asam arakidonat, juga difasilitasi oleh ROS. Peradangan kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan akibat proliferasi dan peningkatan mediator inflamasi.²⁸

Sel mast dan limfosit muncul pada hari ke 5 hingga 7, pada luka pasca-trauma, kedua jenis sel ini mendorong penyembuhan jaringan yang terluka dan mengendalikan peradangan yang berkepanjangan. Perkembangan jaringan granulasi kemerahan yang lembut dan granular akan menandakan berakhirnya fase inflamasi. Kaya akan fibroblas dan neovaskularisasi kapiler, jaringan granulasi yang dihasilkan menciptakan lingkungan metabolisme yang mendorong penyembuhan luka.²⁹

2.1.2.2. Fase Proliferasi

Hari keempat hingga hari kedua puluh satu merupakan saat terjadinya fase proliferasi. Aktivitas re-epitelisasi sel epitel jaringan inilah yang membedakan fase ini. Re-epitelisasi dipicu oleh migrasi keratinosit di dekat tepi luka. Luka akan sembuh karena re-epitelisasi dalam lima sampai tujuh hari. Setelah selesai, dermis dan epidermis akan dipisahkan oleh membran

dasar. Pertumbuhan membran basal dibantu oleh angiogenesis dan fibrogenesis, sehingga memperkuat struktur lapisan dermis di bawahnya. Pada titik ini, matriks fibrin didominasi oleh trombosit dan makrofag. Secara bertahap, jaringan ini digantikan oleh jaringan granulasi yang terdiri dari agregat jaringan fibroblas, yang membentuk matriks ekstraseluler pada akhir proses.³⁰

Fibroblas sangat penting untuk periode proliferasi. Fibroblas adalah sel yang menghasilkan protein matriks ekstraseluler seperti kolagen dan fibrin. Rongga jaringan luka diisi dengan matriks ekstraseluler, yang juga berperan sebagai tempat migrasi keratinosit. Faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi fibroblas dan produksi matriks ekstraseluler termasuk TGF- β dan PDGF.³¹

Fibrin akan terpecah oleh fibroblast dengan bantuan matriks metalloproteinase (MMP), dan digantikan dengan kolagen tipe III, Glikosaminoglikan (GAG), Matriks Metalloproteinase (MMP). Kolagen tipe I kemudian akan menggantikan kolagen tipe III selama fase pematangan.³² Faktor proangiogenik, yang mendorong angiogenesis sel endotel, diproduksi oleh makrofag dan mencakup faktor endotel vaskular (VEGF), faktor pertumbuhan fibroblas-2 (FGF-2), angiopentin-1, dan trombospondin.³³ Semua aktivitas seluler pada fase proliferasi yang dijelaskan di atas berhenti setelah regenerasi

epitel selesai dan remodeling kolagen terjadi. Proses neovaskularisasi akan berakhir dengan apoptosis setelah matriks kolagen memenuhi rongga luka sehingga menyebabkan hilangnya fibroblas. Masalah fibrotik termasuk keropeng dan hipertrofi akan timbul dari ketidakmampuan mengatur proses re-epitelisasi.³⁴

2.1.2.3. Fase Remodeling

Fase *remodeling* atau maturasi dapat berlangsung dari 18-21 hari hingga 1-2 tahun. Fase maturasi dimulai ketika jaringan granulasi dan matriks ekstraseluler mengisi rongga luka, dan kolagen tipe I menggantikan kolagen tipe III. Selama tahap ini, sel dan matriks ekstraseluler matang.³⁵ Fase maturasi ditandai dengan remodeling kolagen dan kontraksi luka. Kontraksi luka dipercepat oleh aktivitas myofibroblast. Sel fibroblas yang memiliki mikrofilamen aktin intraseluler, yang memungkinkannya berkontraksi dan memberikan kekuatan pada jaringan di sekitarnya, dikenal sebagai myofibroblast. Kolagen tipe I secara progresif akan menggantikan fase sebelumnya dari kolagen tipe III karena aktivitas matriks metalloproteinase (MMP) yang distimulasi oleh makrofag jaringan, sel endotel, dan fibroblas.³⁶

Pada fase maturasi, proses sintesis dan degradasi kolagen terjadi secara bersamaan tetapi dengan derajat yang bervariasi

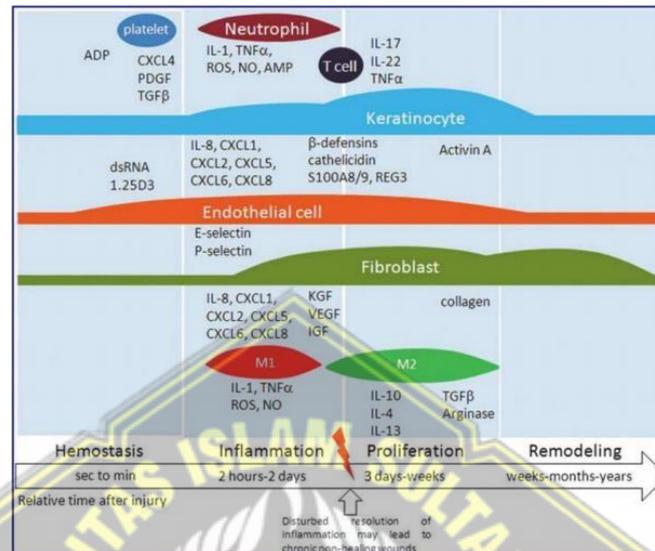
dari awal hingga akhir fase maturasi. Kelebihan kolagen terdegradasi dan diserap oleh jaringan di sekitarnya oleh enzim kolagenase. Fase ini diakhiri dengan terbentuknya jaringan parut yang pucat, lunak, tipis, dan mudah digerakkan ke bawah

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.³⁷ Karena kolagen yang baru terbentuk tersusun tidak menentu, ikatan silang antara serat kolagen tercipta melalui konversi lisin menjadi hidroksilisil, yang memerlukan adanya lisil hidrolase. Kekuatan tarik dihasilkan oleh ikatan silang serat kolagen yang menutupi luka agar tidak mudah robek meskipun terjadi kerusakan ringan. Bagi kebanyakan orang, kekuatan tarik akan meningkat dalam enam minggu pertama dan kemudian secara bertahap selama satu hingga dua tahun berikutnya. Kekuatan tarik kulit dan fascia biasanya hanya mencapai 80% dari nilai normal dan jarang mencapai 100%.³⁸

2.1.3. Patomekanisme Penyembuhan Luka Iris Secara Molekuler

Penyembuhan luka adalah proses dinamis yang rumit, dan berbagai peristiwa terjadi secara teratur dan tumpang tindih, termasuk hemostasis,

inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Kegagalan satu atau beberapa proses seluler menyebabkan penyembuhan luka yang buruk.³⁹



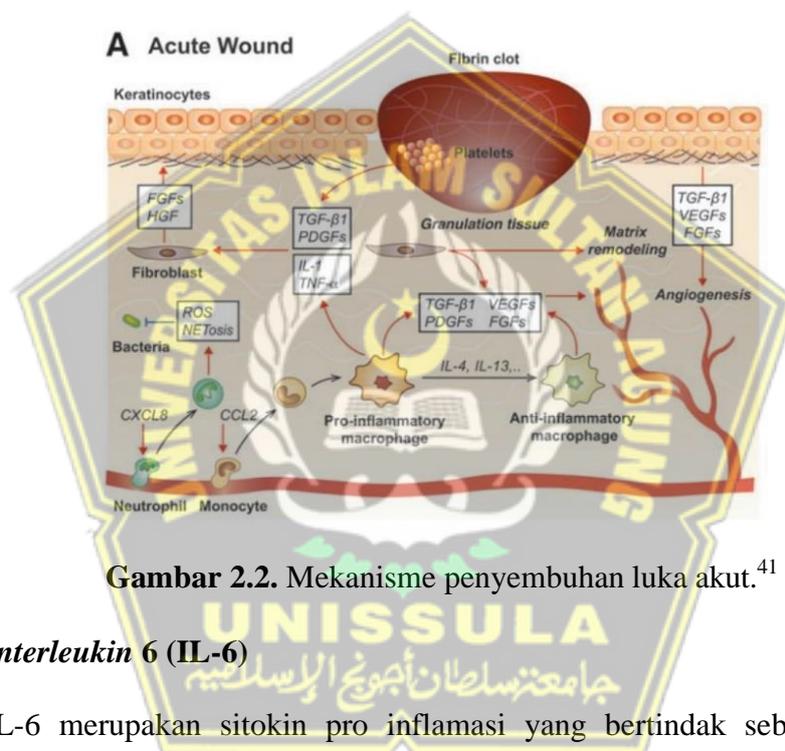
Gambar 2.1. Proses penyembuhan luka.²⁴

Agregasi platelet dan pelepasan ADP, PDGF, TGFβ, dan CXCL4 mengaktifkan sel lokal (fibroblas dan keratinosit) dan sel imun untuk memulai inflamasi. Keratinosit dan jenis sel utama epidermis, melepaskan sitokin proinflamasi dan peptida dan protein antimikroba (AMP), respon imun ini bertujuan mendekontaminasi dasar luka dengan merekrut neutrofil dan makrofag ke dalam dasar luka. Neutrofil serta makrofag adalah sel pembunuh mikroba profesional yang memunculkan spesies oksigen reaktif (ROS), oksida nitrat (NO), dan AMP. Sel endotel di venula dermal mengekspresikan E dan P- selektin, yang memandu penggulungan dan penarikan leukosit ekstravasasi ke dasar luka. Sel T residen kulit di satu sisi dan sel T infiltrasi di sisi lain berpartisipasi dalam tahap inflamasi melalui produksi interleukin (IL) -17, IL- 22, dan TNF-α yang semakin

memperkuat respons pertahanan inang. Sel T residen kulit juga dapat menghasilkan faktor pertumbuhan, yang merangsang proliferasi keratinosit. Aktivasi makrofag, neutrofil, dan keratinosit menyebabkan sterilisasi luka dan kemudian resolusi peradangan. Pada saat ini, proliferasi keratinosit dan fibroblas merangsang penutupan luka. Langkah ini diarahkan melalui regulasi yang halus dari proses inflamasi ke proses reparatif dan peralihan dalam lingkungan mikro sitokin luka. Makrofag, yang aktif dalam fase inflamasi, disebut makrofag M1, mengalami peralihan fenotipik menjadi fenotipe M2 anti-inflamasi dan reparatif. Peralihan ini diatur secara ketat oleh sitokin dan molekul lain. Makrofag M2 mengaktifkan fibroblas untuk menghasilkan faktor pertumbuhan yang merangsang proliferasi dan migrasi keratinosit.²⁴

Kulit memiliki kapasitas untuk memperbaiki jaringan yang rusak atau hilang dengan meregenerasi jaringan dan membentuk bekas luka. Proses ini disebut penyembuhan luka dan terdiri dari fase koagulasi, inflamasi, proliferasi dan remodeling, di mana berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan, seperti IL-1 β , TNF- α , TGF- β , EGF, PDGF dan bFGF diproduksi. Sel imun dan sel non-imun, termasuk makrofag, neutrofil, fibroblas, sel endotel vaskular dan keratinosit, terlibat dalam proses ini. Di antara sitokin ini, TNF- α adalah yang cepat dilepaskan oleh sel endotel vaskular, keratinosit dan fibroblas di area luka, dan ini memulai fase inflamasi dengan mendorong rekrutmen leukosit inflamasi ke dalam jaringan yang terluka. Pada fase inflamasi, sebagian besar bersifat seluler

sumber $\text{TNF-}\alpha$ diubah menjadi neutrofil dan makrofag yang direkrut, dan proses ini menghasilkan sirkuit amplifikasi positif untuk memperluas respons inflamasi. Selain itu, $\text{TNF-}\alpha$ mengatur aktivitas fibroblas, sel endotel vaskular dan keratinosit, dan sintesis protein matriks ekstraseluler dan matriks metalloproteinase, yang erat terlibat dalam penyembuhan jaringan yang terluka.⁴⁰



Gambar 2.2. Mekanisme penyembuhan luka akut.⁴¹

2.2. Interleukin 6 (IL-6)

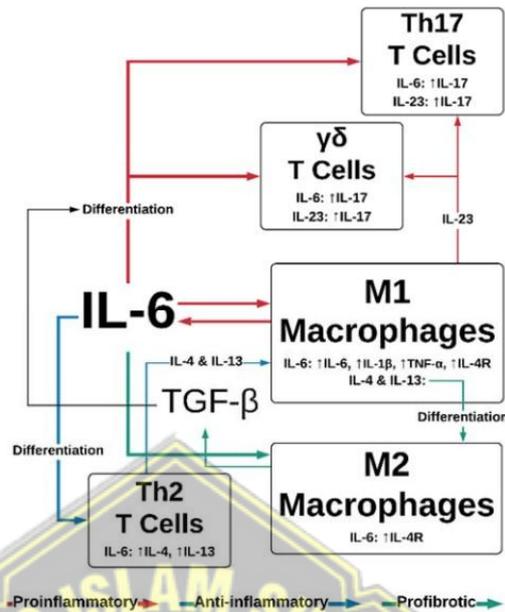
IL-6 merupakan sitokin pro inflamasi yang bertindak sebagai mediator dalam keadaan darurat, diproduksi pada lesi infeksius, dan mengaktifkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh. Reseptor sel imun seperti monosit dan makrofag memiliki *Pattern recognition receptors* (PRR) yang mengenali pola molekuler spesifik patogen asing di area yang terinfeksi.⁴² IL-6 memainkan peran sentral dalam peradangan akut dan diperlukan untuk penyembuhan luka tepat waktu. Dirilis lebih awal sebagai respons terhadap cedera, IL-6 menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag jaringan, keratinosit, sel endotel, dan sel

stroma. IL-6 juga ditemukan menginduksi kemotaksis leukosit ke dalam luka.⁴² *Toll like receptor* (TLRs) merangsang beberapa jalur pensinyalan, termasuk NFκB, dan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin inflamasi seperti IL-6, TNF-α, dan IL-1b. TNF-a dan IL-1b kemudian merangsang faktor transkripsi untuk menghasilkan IL-6.⁴³

2.2.1. Aktivasi IL-6

IL-6 diproduksi dengan cepat dan spontan sebagai respons terhadap infeksi dan cedera jaringan, mendorong hematopoiesis, respons imunologis, dan respons fase akut yang terjadi pada 1-3 hari, membantu tubuh mempertahankan diri. Proses transkripsi dan pasca transkripsional mengontrol ekspresi IL-6, dan produksi IL-6 yang tidak teratur berdampak buruk pada gangguan autoimun dan peradangan kronis.⁴² Lesi lokal menghasilkan IL-6 saat peradangan pertama kali muncul. IL-6 kemudian dibawa ke hati melalui sirkulasi. IL-6 juga menyebabkan produksi banyak protein fase akut, seperti protein C-reaktif (CRP), serum amiloid A (SAA), fibrinogen, haptoglobin, dan *al-antichymotrypsin* dengan cepat.³

IL-6 juga mengirimkan sinyal peringatan saat terjadi kegagalan jaringan pada inflamasi non-infeksi, seperti luka bakar atau trauma, Peningkatan kadar IL-6 dalam serum mendahului perubahan suhu tubuh dan kadar protein fase akut, *damage-associated molecular pattern* (DAMPs) yang dihasilkan oleh sel yang rusak atau sekarat menyebabkan inflamasi baik secara langsung maupun tidak langsung.⁴²



Gambar 2.3. Aktivasi IL-6.⁴²

2.2.2. Peran IL-6 dalam Proses Penyembuhan Luka

Respon inflamasi berperan penting dalam proses penutupan luka, dan gangguan jalur sinyal IL-6 dapat menghambat penyembuhan luka. Oleh karena itu, fungsi IL-6 dalam penyembuhan luka kulit tidak dapat diabaikan. Makrofag M1 adalah pengeksresi utama IL-6 pada luka, dan sinyal inflamasi kronis dapat menghambat penyembuhan luka karena peningkatan rasio M1:M2. IL-6 memberikan kendali atas polarisasi M2 melalui stimulasi pelepasan IL-4 oleh sel Th2 dan IL-4R pada makrofag. Khususnya, makrofag M2 adalah sekretor utama sitokin proliferatif TGF- β dan VEGF.⁴⁴

Patofisiologi berbagai kondisi kulit profibrotik melibatkan loop umpan balik IL-6/TGF- β , yang berfungsi dalam loop autokrin positif pada fibroblas. IL-17A membantu dalam proses ini dengan mendorong deposisi

kolagen dan diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblast, yang berkontraksi untuk menyatukan tepi luka. Stimulasi oleh IL-6 meningkatkan kelangsungan hidup myofibroblast, ekspresi VEGF oleh jaringan endotel, keratinosit, fibroblas, dan makrofag sebagai respons terhadap IL-6 berkontribusi terhadap penyakit fibrotik, yang bergantung pada peningkatan vaskularisasi.⁴⁴

2.2.3. Faktor yang Mempengaruhi Kadar IL-6

Stres oksidatif merupakan mekanisme yang diduga kuat sebagai penyebab utama penuaan kulit. Penuaan kulit merupakan proses kompleks yang melibatkan faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik yang berperan adalah genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal. Faktor ekstrinsik seperti radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan ikut berperan pada penuaan kulit.^{45,46} Lapisan epidermis menipis pada penuaan kulit secara instrinsik sehingga daerah kontak permukaan dermis dan epidermis menipis dan pertukaran nutrisi ke epidermis berkurang. Kulit mudah lecet dan robek setelah trauma ringan yang di akibatnya. Kemampuan proliferasi sel basal semakin menurun. Di lapisan dermis, jumlah sel mast dan fibroblas lebih sedikit dibandingkan di kulit muda dan hal tersebut juga terjadi pada serat kolagen serta serat elastin.⁴⁶

Produksi prokolagen tipe 1 di kulit menua berkurang karena penurunan sinyal TGF- β /Smad dan penurunan faktor pertumbuhan jaringan ikat. Degenerasi terjadi komponen matriks ekstraseluler (elastin,

kolagen, fibrilin) dan dioligosakarida yang memengaruhi kemampuan kulit menahan air. Mekanisme yang mendasari penuaan kulit selalu berkembang sehingga penting untuk mengetahui mekanisme molekular terbaru, serta perubahan yang terjadi akibat penuaan dapat menentukan tata laksana yang tepat untuk mencegah dan mengobati penuaan kulit. Terdapat dua faktor yang berperan dalam terjadinya penuaan kulit, yaitu faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik adalah genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal. Radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan merupakan faktor ekstrinsik yang mempercepat penuaan kulit.⁴⁵

2.3. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

2.3.1. Aktivasi VEGF

VEGF bertindak sebagai agen kemotaksis, pengatur angiogenesis dan vaskulogenesis, serta mitogen untuk sel endotel. Menjadi faktor angiogenesis yang kuat, VEGF dapat menyebabkan pertumbuhan dan metastasis tumor, degenerasi makula, retinopati diabetik, proses inflamasi dan iskemik, dan preeklamsia, di antara kelainan patologis lainnya, yang dimulai dan berlanjut pada periode pascakelahiran. Limfangiogenesis, proses asal dan perkembangan pembuluh limfatik, telah menjadi subjek penelitian terbaru. Bagian dari keluarga gen VEGF/faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF), umumnya dikenal sebagai superfamili faktor pertumbuhan simpul sistin, gen VEGF manusia terletak pada kromosom 6p21.3. Glikoprotein heterodimerik 40 kDa yang dikenal sebagai VEGF.

Keberadaan disposisi jembatan bisulfida tertentu dalam struktur protein memberikan motif simpul sistin. Mirip dengan VEGF, PDGF, Nerve Growth Factor (NGF), dan Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) termasuk dalam keluarga yang sama.^{47,48}

Faktor pertumbuhan endotel vaskular yang diturunkan dari kelenjar endokrin (EG-VEGF) adalah tambahan terbaru pada keluarga VEGF, yang kini berjumlah tujuh anggota: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (viral VEGF, pada parapoxvirus 1), VEGF-F (racun ular VEGF), dan faktor pertumbuhan plasenta (PIGF). Zat yang paling signifikan dan efektif untuk mendorong angiogenesis adalah VEGF, umumnya dikenal sebagai VEGF-A.⁴⁹

VEGF-A terdiri dari delapan ekson dan tujuh intron. Pengkodean mRNA VEGF dapat menghasilkan panjang isoform yang berbeda melalui penyambungan alternatif. Karena efeknya terhadap proliferasi sel, penekanan apoptosis, peningkatan permeabilitas kapiler, vasodilatasi, dan rekrutmen sel inflamasi di lokasi cedera atau peradangan, VEGF-A terlibat dalam vaskulogenesis dan neoangiogenesis. Reseptor VEGFR-1 sepuluh kali lebih larut dalam VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅,

VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, dan VEGF₂₀₆ dibandingkan di VEGFR-2. Sel tumor, makrofag, trombosit, keratinosit, sel mesangial, sel T teraktivasi, leukosit, sel dendritik, sel epitel pigmen retina, astrosit, osteoblas, sel epitel bronkus dan alveolar, dan sebagainya melepaskan

VEGF sebagai reaksi terhadap kekurangan oksigen.⁵⁰

VEGF-B diidentifikasi pada tahun 1995. Ini diekspresikan pada tahap awal perkembangan dan terdapat di banyak organ orang dewasa, termasuk pankreas, otot rangka, dan miokardium. Dua isoform, VEGF-B₁₆₇ dan VEGF-B₁₈₆, diproduksi melalui penyambungan gen alternatif dan eksklusif untuk reseptor VEGFR-1. VEGF-B tidak berkontribusi signifikan terhadap vaskulogenesis, meskipun berperan dalam perkembangan sistem kardiovaskular dan pembangunan miokardium selama periode embrionik.³⁴

VEGF-C tidak terlalu terlibat dalam angiogenesis karena diekspresikan dalam jaringan embrionik pada awal perkembangan pembuluh limfa, dan juga diekspresikan pada masa dewasa di jantung, ovarium, plasenta, usus, dan tiroid. VEGF-C memiliki afinitas yang tinggi terhadap reseptor VEGFR-3, tetapi afinitasnya lemah terhadap reseptor VEGFR-2. Sebanding dengan VEGF-C, VEGF-D berikatan dengan VEGFR-3 dan NP-2 dengan afinitas dan berkontribusi pada limfangiogenesis tetapi tidak pada angiogenesis. Karena terdiri dari protein virus dari berbagai strain virus Orf (infeksi parapoxvirus pada kambing dan domba), VEGF-E juga dikenal sebagai virus VEGF. Berperan dalam meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan memiliki afinitas khusus terhadap reseptor VEGFR-2 tetapi tidak untuk VEGFR-1 atau VEGFR-3.^{51,52}

Faktor pertumbuhan plasenta (PIGF) adalah anggota keluarga faktor pertumbuhan yang awalnya ditemukan di jaringan plasenta manusia. PIGF hadir di epitel luminal kelenjar rahim dan mukosa rahim. Melalui aktivasi tidak langsung VEGFR-2, yang berikatan dengan VEGF-A, afinitas VEGF terhadap reseptor VEGFR-1 meningkatkan permeabilitas kapiler, migrasi, dan proliferasi sel.^{51,52}

EG-VEGF, juga dikenal sebagai prokinektin (PK1), terlibat dalam proses angiogenesis yang sehat dan patologis dan ditemukan di jaringan plasenta dan kelenjar endokrin yang menghasilkan hormon steroid. Reseptor tirosin-kinase, yang berisi tiga domain domain intraseluler dengan aktivitas tirosin kinase, domain trans membran, dan domain ekstraseluler untuk berikatan dengan VEGF terikat pada VEGF. Aktivitas tirosin kinase distimulasi dalam domain intraseluler reseptor ketika VEGF berikatan dengan domain ekstraselulernya. Fosforilasi residu tirosin kinase dalam domain ini memulai banyak jalur pensinyalan intraseluler. VEGFR-1 (flt-1/fms-tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1/fetal liver kinase-1), dan VEGFR-3 (Flt-4) adalah tiga bentuk reseptor VEGF yang berbeda.⁵³

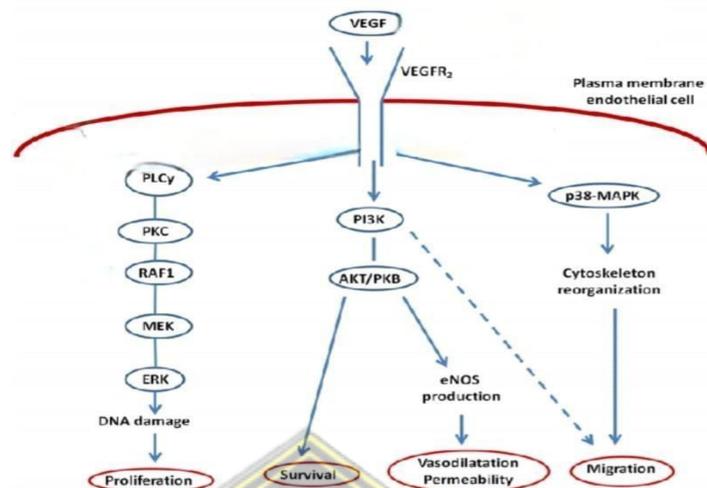
Anggota *family* VEGF juga bisa berinteraksi dengan protein yang lain yaitu: neuropilin, integrin, cadherins, *heparan sulphat proteoglycans*. Ko- reseptor neuropilin-1 (NP-1) dan neuropilin-2 (NP-2) secara eksklusif berikatan dengan sub tipe VEGF tertentu, seperti VEGF-A165, dan bukan merupakan reseptor tirosin kinase. Neuropilin mengatur angiogenesis dan

migrasi sel endotel dengan mengaktifkan VEGFR-2 dan VEGFR-3. VEGFR-1, juga dikenal sebagai FLT-1/FMS-tyrosine kinase-1, adalah anggota keluarga tyrosine-kinase (RTKs) dengan kekuatan 180 kDa. Ini adalah penyebab utama angiogenesis patologis pada orang dewasa, yang meliputi tumor, peradangan, iskemia, dan preeklampsia. Ia memiliki penerimaan yang tinggi terhadap VEGF-A, VEGF-B, dan VEGF-F dan memainkan peran penting dalam diferensiasi dan migrasi sel endotel, monosit, makrofag, dan sel induk hematopoietik.

2.3.2. Mekanisme Jalur VEGF

VEGF mulai muncul pada hari kedua hingga ketiga setelah terjadinya luka, bertepatan dengan peralihan dari fase inflamasi ke fase proliferasi dalam penyembuhan luka. VEGF memiliki peran penting dalam proses angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru) yang diperlukan untuk suplai oksigen dan nutrisi ke jaringan yang sedang memperbaiki diri.³⁴

Berperan dalam migrasi sel dan kemotaksis dengan mengaktifkan banyak jalur pensinyalan, seperti jalur p38-MAPK/ERK1/2 dan rute protein kinase teraktivasi mitogen (MAPK)/kinase yang diatur sinyal ekstraseluler (ERK). Ketika domain tirosin kinase VEGFR-1 diaktifkan dalam kondisi patologis angiogenesis, sel inflamasi lebih mudah bermigrasi dan melepaskan sitokin inflamasi seperti TNF- α , interleukin-1beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, chemoattractant monosit. protein-1 (MCP-1), dan protein inflamasi makrofag-1beta (MIP-1 β).⁵⁴



Gambar 2.4. Jalur aktivasi VEGF.⁵⁵

VEGFR-2 (KDR/Flk-1/*fetal liver kinase-1*), *kinase insert domain receptor* (KDR) pada manusia dan *fetal liver kinase-1* pada tikus. VEGFR-2 memiliki afinitas yang kuat terhadap VEGF-A dan VEGF-E, dengan berat molekul 200-230 kDa. VEGFR-2 diekspresikan pada sel endotel vaskular dan limfatik.

Ketika domain ekstraseluler VEGFR-2 berikatan dengan VEGF, ia memicu autofosforilasi residu tirosin dan mengaktifkan jalur sinyal spesifik, seperti jalur Ras/Raf/ERK/MAPK dan fosfolipase-C γ (PLC γ)/protein kinase C (PKC), yang terkait dengan proliferasi sel endotel. VEGFR-2 juga berkontribusi terhadap kelangsungan hidup sel endotel dan anti-apoptosis dengan mengaktifkan jalur PI3K/Akt. Ini juga mengaktifkan integrin tertentu yang menyebabkan kerusakan kohesi sel dan memulai migrasi sel. Dengan berat molekul 195 kDa, VEGFR-3 (Flt-4) memiliki preferensi terhadap VEGF-C dan berfungsi dalam morfogenesis pembuluh limfatik baik selama perkembangan embrio

maupun selama pembentukan pembuluh limfatik baru di masa dewasa.⁵⁵

2.3.3. Faktor yang Mempengaruhi Kadar VEGF

Variabel yang mempengaruhi regulasi VEGF termasuk paparan keratinosit, faktor pertumbuhan keratinosit (KGF), faktor pertumbuhan epidermal (EGF), TGF- β , TGF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, PGE2, dan IGF-1, melepaskan mRNA VEGF. TNF- α adalah pro-inflamasi yang meningkatkan ekspresi RNA messenger VEGF. Gen VEGF diekspresikan secara berbeda tergantung pada tahap diferensiasi sel. Sementara mRNA VEGF meningkat selama diferensiasi miogenik, ekspresi gen VEGF juga menurun atau ditekan selama proses diferensiasi sel pheochromocytoma menjadi sel mirip neuron non-ganas.⁵⁰

Faktor terkait kadar VEGF yang mempengaruhi yaitu usia, jenis kelamin, ras, penggunaan alkohol, status merokok, hipertensi, dan dislipidemia juga dimasukkan karena faktor-faktor penting secara klinis.⁵⁶ Jurnal lain menyebutkan faktor risiko yang bermakna secara klinis maupun statistik terhadap ekspresi VEGF adalah umur, ukuran lesi, dan jenis histologi.⁵⁷

2.3.4. Metode Pemeriksaan Kadar IL-6 dan VEGF Jaringan Kulit Dengan Metode ELISA

Pengukuran kadar IL-6 dan VEGF dapat dilakukan pada spesimen jaringan maupun plasma. Kadar IL-6 dan VEGF diukur menggunakan metode *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Pengukuran IL-6

dan VEGF dari spesimen jaringan kulit, jaringan diambil dengan cara punch biopsy dan dibekukan dalam larutan nitrogen, kemudian ditempatkan ke dalam buffer lisis sitoplasma yang mengandung inhibitor protease dan dihancurkan menggunakan Fast Prep. Inti adalah dipisahkan dari protein sitoplasma dan disentrifugasi.⁵⁸

2.4. Krim Ekstrak Daun Mengkudu (EDM)

2.4.1. Definisi Tanaman Mengkudu

Tanaman mengkudu berasal dari Asia Tenggara, Australia Tropis, dan Oceania, dan tersebar dari Polinesia ke India. Tanaman mengkudu tumbuh di seluruh daerah tropis, dan dibudidayakan secara komersial di Amerika Latin, dari Meksiko ke Columbia dan Venezuela, serta di Costa Rika, Panama, Kenya, Florida, dan India Barat. Tanaman mengkudu tumbuh secara liar di India, di daerah pesisir Kerala, Karnataka, Tamil Nadu, dan Orissa.⁵⁹

Genus tanaman mengkudu yang disebut *Morinda* berasal dari dua kata Latin: *Morus*, yang berarti mulberry, dan *Indicus*, yang berarti India. Ini mengacu pada persamaan tanaman mengkudu dengan murberi asli (*Morus alba*). Sementara nama spesies tanaman mengkudu menunjukkan bahwa dedaunan mereka mirip dengan dedaunan jeruk. Mengkudu adalah pohon cemara atau semak yang bisa mencapai ketinggian tiga hingga enam meter. Daunnya memiliki ujung yang berkilau dan tegak. Bilahnya adalah membran bulat panjang atau elips (bulat seperti telur) dengan panjang 20 hingga 45 cm dan vena menonjol pada panjang 7 hingga 25 cm.

Daun berukuran gemuk dengan panjang 1,5–2 cm.⁵⁹

2.4.2. Taksonomi Tanaman Mengkudu

Daun mengkudu berbentuk bervariasi, tepi bergelombang, pangkal pasak, dan warna hijau mengilap. Panjangnya berkisar antara 22,8-27.4 cm dan lebarnya antara 12–14.9 cm, dengan urat menyirip. Bunga mengkudu memiliki bentuk seperti bonggol dan biasanya tumbuh di ketiak atau stipula daun penumpu. Bonggol bunga itu berubah menjadi buah yang berukuran bervariasi, panjangnya 9.2 hingga 11.5 cm dan lebarnya 5.1 hingga 5.7 cm. Buahnya memiliki biji-biji di dalamnya dan permukaannya yang unik, bersekat dan berbintik.⁶⁰

Klasifikasi tanaman mengkudu sebagai berikut:

- Filum : *Angiospermae*
 Subfilum : *Dicotyledonae*
 Divisi : *Lignosae*
 Famili : *Rubiaceae*
 Genus : *Morinda*
 Spesies : *Morinda citrifolia*.⁵⁹



Gambar 2.5. Buah dan daun mengkudu.⁵⁹

2.4.3. Kandungan dan Khasiat Mengkudu

Mengkudu mengandung senyawa fitokimia, diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, triterpenes, dan coumarins.⁴ Alkaloid adalah senyawa alami yang bersifat basa dengan satu atau lebih atom nitrogen. Alkaloid dapat diklasifikasikan menurut prekursor molekuler, struktur, atau jalur metabolisme dalam pembentukan molekulnya. Alkaloid berfungsi sebagai antimikroba dengan mempersingkat periode epitelisasi.⁶¹

Flavonoid, metabolit sekunder polifenol, ditemukan pada tumbuhan dan memiliki sifat anti-oksidatif, anti-inflamasi, anti-mutagenik, dan anti-karsinogenik. Flavonoid juga dapat mengontrol enzim seluler utama.⁹ Struktur dasar flavonoid terdiri dari dua cincin aromatik C₆ yang terhubung oleh sebuah cincin benzena unit C₃. Penempatan cincin katekol pada cincin benzene merupakan faktor yang membedakan flavonoid (2-fenilkromana) dari isoflavonoid (3-fenilkromana).⁶² Dengan strukturnya, flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan antiproliferative.⁹

Saponin adalah glikosida yang terdiri dari triterpen dan steroid dan memiliki kemampuan untuk membuat busa seperti sabun. Saponin bersifat amfifilik dan berasal dari struktur yang mengandung aglikon yang berasal dari isoprenoid-derived aglycone, juga dikenal sebagai sapogenin, yang terikat pada satu atau lebih rantai gula melalui ikatan eter atau ester.⁶³ Dua kelompok utama saponin adalah saponin triterpenoid dan saponin steroid. Berdasarkan aktivitas biologisnya, saponin berfungsi sebagai imunostimulan, antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi, serta mempengaruhi pertumbuhan dan permeabilisasi membran.^{64,65}

Tanin, dengan berat molekul antara 500 dan 3000, adalah polifenol yang dapat larut dalam air dan dapat mengendapkan protein serta membentuk kompleks dengan polisakarida. Tanin berfungsi sebagai zat penyusut, menghentikan keluarnya cairan dan perdarahan kecil, mempercepat penyembuhan luka.¹⁰

2.4.4. Proses Pembuatan Ekstrak Daun Mengkudu Hingga Menjadi Krim

Daun mengkudu segar diambil dan diolah menjadi ekstrak menggunakan metode ekstraksi pelarut organik dengan etanol 70%. Sampel daun mengkudu sebanyak 1 kg, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Hasilnya dilakukan pemeriksaan kadar air dengan *moisture balance*, hingga kadar air dibawah 10%. Simplisia kemudian dilakukan sortasi, dipotong kecil-kecil dan ditimbang. Lalu diblender menjadi serbuk. Kemudian diayak dengan ayakan ukuran 20 mesh. Serbuk daun mengkudu setengah tua yang telah halus diekstraksi dengan

menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pada proses perendaman sesekali dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan larutan selama proses perendaman dan mempercepat kontak antara pelarut dan sampel.⁶⁶

Pada proses maserasi dilakukan proses remaserasi karena ada senyawa yang tertinggal atau belum tersektraksi adanya senyawa yang tertinggal dikarenakan pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi telah mencapai titik jenuh. Bahan- bahan dalam fase minyak (asam stearat, setil alkohol, propil paraben dan sorbitan monostearat) dicampurkan dalam cawan penguap lalu dipanaskan pada suhu 80°C hingga mencair dengan menggunakan waterbath. Metil Paraben, larutan sorbitol 70% polisorbat 60 yang merupakan fase air dilarutkan dalam aquades yang telah dipanaskan pada suhu 80°C dalam breaker gelas. Campuran fase air tersebut diaduk hingga larut sempurna menggunakan batang pengaduk.⁶⁶

Campuran fase minyak dan fase air dimasukkan pada suhu 800 C ke dalam mortir panas. EDM dimasukkan ke dalam basis tersebut pada suhu 45°C kemudian dibiarkan pada suhu kamar. Krim yang sudah jadi dimasukkan ke dalam wadah.⁶⁶

2.4.5. Kelebihan Krim Ekstrak Daun Mengkudu

Selama ini masyarakat mengenal mengkudu hanya buahnya yang bisa dijadikan obat, akan tetapi buah mengkudu sudah ada yang membuat menjadi obat kimia atau fitofarmaka, sementara daun mengkudu masih banyak masyarakat yang belum mengetahui khasiat penyembuhan yang di

kandung pada daunnya padahal daun mengkudu tidak kalah khasiatnya dengan buahnya.⁶⁷ Daun mengkudu memiliki kandungan saponin, flavonoid, polifenol, tannin, dan triterpen. Zat aktif tersebut bersifat bakterisidal dan memiliki metode tersendiri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada daun mengkudu terdapat senyawa aktif yang berfungsi sebagai zat antibakteri. Daun mengkudu yang berkhasiat untuk mengatasi peradangan, mencegah stroke dan menjaga kesehatan kulit.⁶⁸

Hasil penelitian Aini Qurratul (2022) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun mengkudu (*Morindacitrifolia* L.) dengan nilai IC₅₀ 83,7 µg/mL. EDM memiliki kandungan senyawa Alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid.⁶⁸ EDM diformulasikan dalam bentuk sediaan krim. Sediaan krim dipilih karena mudah di aplikasikan, lebih nyaman digunakan, tidak lengket dan mudah dicuci dengan air dibandingkan dengan sediaan salep, gel maupun pasta. Sediaan semi padat biasanya di gunakan pada kulit dan umumnya sediaan tersebut di gunakan sebagai pelindung dari sinar ultraviolet.⁶⁶ Sediaan yang banyak tersedia dipasaran dan diminati oleh konsumen adalah bentuk sediaan krim karena banyak keuntungannya salah satunya adalah mudah dalam pengaplikasiannya di kulit, lebih nyaman digunakan pada wajah, dapat dicuci dengan air.⁶⁹

2.5. Pengaruh pemberian krim EDM terhadap kadar IL-6 dan VEGF.

Proses penyembuhan luka kulit sangat penting, deposisi dan regenerasi kolagen, yang berhubungan dengan proses proliferasi dan diferensiasi sel di

daerah posterior jaringan sel, mendorong perbaikan, yang memerlukan penggantian komponen tertentu.²⁴ Pemberian antioksidan secara eksogen menjadi penting salah satunya daun mengkudu yang meningkatkan proses perbaikan dan penurunan luas luka.^{6,7}

Pemberian krim EDM memiliki aktivitas antioksidan yang berperan dalam memodulasi proses inflamasi dan angiogenesis, yang merupakan fase kritis dalam penyembuhan luka, menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga mengurangi produksi IL-6. Penurunan kadar IL-6 membantu meredakan fase inflamasi, sehingga memungkinkan proses penyembuhan beralih ke fase proliferasi lebih cepat.⁷⁰ Antioksidan mengurangi ROS yang dapat menginaktivasi *Nitric Oxide* (NO), molekul penting untuk angiogenesis, mendukung pembentukan pembuluh darah baru melalui stimulasi ekspresi VEGF. Antioksidan mencegah degradasi HIF-1 α akibat ROS, sehingga meningkatkan ekspresi VEGF untuk mendukung angiogenesis. Peningkatan kadar VEGF mendukung pembentukan pembuluh darah baru, menyediakan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk regenerasi jaringan luka.³⁴

Penyembuhan luka ditandai dengan aktivasi sistem kekebalan tubuh bawaan yang bertujuan untuk membunuh mikroba patogen dengan sukses melalui penyebaran molekul efektor anti mikroba yang disebut AMP, Aktivasi *Toll-like receptor* (TLR) dan patogen lain atau reseptor pengenalan bahaya menyebabkan aktivasi sitokin inflamasi (IL-6) serta respons peptida antimikroba. aktivasi TLR, dan interferon (IFN) γ , serta TNF α mendorong diferensiasi makrofag M1. Setelah dekontaminasi luka berhasil, fase inflamasi menghilang dan tahap

reparatif, yang ditandai dengan proliferasi keratinosit dan fibroblas, dimulai. Peralihan dari makrofag M1 ke makrofag mirip M2 serta fungsi AMP yang berbeda merupakan pengatur penting fase reparatif. Reepitelisasi luka membutuhkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur, dipandu, setidaknya sebagian, melalui produksi faktor pertumbuhan dan AMP.⁷¹

Tahap awal penyembuhan luka, makrofag melepaskan sitokin inflamasi yang meningkatkan respon inflamasi dengan merekrut dan mengaktifkan leukosit tambahan. Makrofag juga penting untuk mendekontaminasi luka dari mikroba dan membersihkan sel-sel apoptosis, sehingga membuka jalan bagi resolusi peradangan dan awal fase proliferasi penyembuhan luka. Saat lingkungan mikro berubah di dasar luka, makrofag mengalami peralihan fenotipik ke keadaan anti-inflamasi, regulasi, dan reparatif, yang merangsang keratinosit, fibroblas, dan endotel. sel untuk mendorong regenerasi jaringan. Melalui cara ini makrofag mempromosikan transisi ke fase penyembuhan proliferasi. Banyak jalur penting dalam makrofag ini beralih dari M1 ke M2 dan memasukkan IL-4, IL-13, Stimulasi TLR, pensinyalan adenosin, CXCL1, dan CCL18. Lebih-lebih lagi, miRNA-21 menargetkan *Phosphatase with a tensin motif* (PTEN) dan selanjutnya pengurangan PTEN memperluas aktivasi *protein kinase B* (AKT) yang mematikan keadaan peradangan dan meningkatkan keadaan anti-inflamasi.

Salah satu jalur sinyal intraseluler mengendalikan saklar fenotipik melibatkan p38 dan miR-21. Di dalam makrofag, miR-21 memainkan peran penting dalam transisi dari inflamasi menjadi anti-inflamasi fenotip. Jalur stres p38/Jun diaktifkan oleh PAMPs dan DAMPs, menyebabkan sekresi sitokin

inflamasi, seperti IL-1, TNF, dan IL-6. Menginduksi miR-21, salah satu targetnya adalah PTEN. Pengurangan PTEN memperluas aktivasi AKT yang mematikan peradangan menyatakan dan meningkatkan keadaan anti-inflamasi. Fibroblas dan keratinosit menunjukkan respons terhadap peningkatan miR-21 yang berbeda dari makrofag dan merangsang migrasi. Hal ini sangat penting untuk permulaan pembentukan jaringan granulasi dan penutupan luka. miR-21 terlibat dalam penghentian inflamasi fase penyembuhan luka dan dimulainya fase perbaikan proliferasif, Pada fase makrofag M2 akan mengaktifasi sitokin anti inflamasi dan *growth faktor* (IL-10, VEGF dan TGF- β).⁷¹

Penelitian ini mengintegrasikan pendekatan berbasis molekuler dengan fokus pada pengaruh krim EDM terhadap dua mediator kunci IL-6 sebagai penanda inflamasi yang memainkan peran penting dalam fase awal penyembuhan luka dan VEGF sebagai mediator utama angiogenesis, yang krusial dalam pembentukan pembuluh darah baru untuk mendukung regenerasi jaringan. Kombinasi fokus pada dua biomarker spesifik ini memberikan kebaruan dibandingkan penelitian sebelumnya yang mungkin hanya mengevaluasi efek daun mengkudu secara umum tanpa pendekatan biomolekuler mendalam. Penelitian ini membawa kebaruan dalam eksplorasi molekuler daun mengkudu (pengaruh pada IL-6 dan VEGF) dengan pendekatan formulasi topikal sediaan krim yang praktis. Urgensinya terletak pada potensi pemanfaatan bahan alam lokal untuk mengatasi kebutuhan terapi penyembuhan luka yang efektif, aman, dan berbasis bukti ilmiah.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Perlakuan luka iris menyebabkan peningkatan kadar ROS, mengaktifkan sistem imun bawaan, bertujuan untuk membunuh mikroba patogen dengan menyebarkan molekul efektor antimikroba yang disebut *Antimicrobial peptide* (AMP), mengaktifkan *Toll-Like Receptors* (TLR) dan reseptor patogen atau pengenalan bahaya lainnya, seperti *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMP) dan *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) yang mengaktifkan peradangan dan respons peptida antimikroba, mengaktifkan *Toll-Like Receptors* (TLR), dan mendorong diferensiasi makrofag M1.

Penyembuhan luka ditandai dengan aktivasi sistem imun bawaan, bertujuan untuk membunuh mikroba patogen dengan menyebarkan molekul efektor antimikroba yang disebut *Anti Microbial Peptide* (AMP), mengaktifkan TLR dan reseptor patogen atau pengenalan bahaya lainnya, yang mengaktifkan peradangan dan respons peptida antimikroba, mengaktifkan TLR, dan mendorong diferensiasi makrofag M1. Setelah dekontaminasi luka yang efektif, fase inflamasi berakhir dan tahap reparatif, yang ditandai dengan pertumbuhan keratinosit dan fibroblas, dimulai. Transisi makrofag M1 ke makrofag M2 dan berbagai peran yang dimainkan oleh AMP merupakan modulator penting pada fase reparatif. Proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur diperlukan untuk reepitelisasi luka; proses-proses ini, setidaknya sebagian, dibantu oleh sintesis faktor pertumbuhan dan AMP.

Stres oksidatif akibat produksi ROS yang berlebihan dapat merusak DNA, protein, dan membran sel imun. Flavonoid bertindak sebagai scavenger ROS, melindungi sel imun dari kerusakan oksidatif, terutama limfosit, makrofag, dan neutrofil. Flavonoid tidak hanya menekan inflamasi berlebih, tetapi juga mengatur aktivitas sistem imun untuk mendukung penyembuhan luka, mempercepat peralihan dari makrofag M1 (proinflamasi) ke makrofag M2 (antiinflamasi dan regeneratif) melalui modulasi sitokin dan jalur molekuler seperti PI3K/Akt. Transisi makrofag M1 ke makrofag mirip M2 dan berbagai peran yang dimainkan oleh AMP merupakan modulator penting pada fase reparatif. Proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur diperlukan untuk reepitelisasi luka; proses-proses ini, setidaknya sebagian, dibantu oleh sintesis faktor pertumbuhan dan AMP. Reseptor sel imun seperti monosit dan makrofag memiliki *Pattern Recognition Receptors* (PRR) yang mengenali pola molekuler spesifik patogen asing di area yang terinfeksi. Dirilis lebih awal sebagai respons terhadap cedera, IL-6 menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag jaringan, keratinosit, sel endotel, dan sel stroma. IL-6 juga ditemukan menginduksi kemotaksis leukosit ke dalam luka.⁴²

Toll Like Receptor (TLR) merangsang beberapa jalur pensinyalan, termasuk *Nuclear Factor-Kappa B* (NFκB), dan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin inflamasi seperti IL-6, TNF-α, dan IL-1b. TNF-α dan IL-1b kemudian merangsang faktor transkripsi untuk menghasilkan IL-6.⁴³ Pada awal proses penyembuhan, makrofag menghasilkan sitokin inflamasi yang mengaktifkan dan menarik lebih banyak leukosit, sehingga mengintensifkan respon inflamasi.

Makrofag memfasilitasi peralihan ke fase penyembuhan proliferaatif dengan cara ini. Banyak jalur penting dalam makrofag ini berubah dari M1 menjadi M2. Selain itu, miRNA-21 menargetkan *Phosphatase Tensin and Homolog* (PTEN) dan akibatnya penurunan PTEN memperpanjang aktivasi *Protein Kinase-B* (AKT) yang mematikan keadaan inflamasi dan meningkatkan keadaan anti-inflamasi.

Jalur pensinyalan intraseluler yang mengontrol pergeseran fenotipik melibatkan p38 dan miRNA-21. Transisi fenotip makrofag dari inflamasi menjadi antiinflamasi bergantung pada miRNA-21. Salah satu target miRNA-21 adalah PTEN. Pengurangan PTEN menghasilkan aktivasi AKT yang lebih besar, yang menekan kondisi inflamasi dan meningkatkan kondisi anti-inflamasi. Berbeda dengan makrofag, fibroblas dan keratinosit merespons peningkatan miRNA-21 dengan mendorong migrasi. Hal ini penting untuk dimulainya pembentukan jaringan granulasi dan penutupan luka. miRNA-21 berperan dalam memulai fase perbaikan proliferaatif penyembuhan luka dan menghentikan fase inflamasi. Ini merangsang faktor pertumbuhan VEGF, serta sitokin anti-inflamasi, selama fase makrofag M2.¹⁶

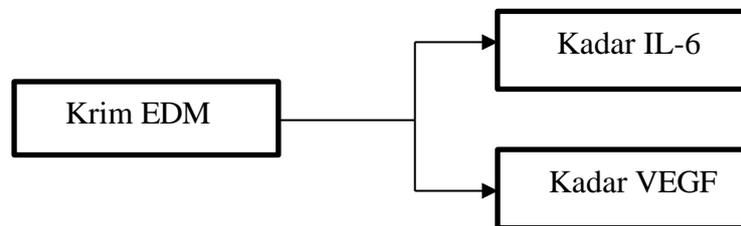
Pemberian krim EDM memiliki aktivitas antioksidan yang berperan dalam memodulasi proses inflamasi dan angiogenesis, yang merupakan fase kritis dalam penyembuhan luka, menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga mengurangi produksi IL-6. Penurunan kadar IL-6 membantu meredakan fase inflamasi, sehingga memungkinkan proses penyembuhan beralih ke fase proliferasi lebih cepat.⁷⁰ Antioksidan mengurangi ROS yang dapat menginaktivasi *Nitric Oxide* (NO), molekul penting untuk angiogenesis, mendukung pembentukan pembuluh darah

baru melalui stimulasi ekspresi VEGF. Antioksidan mencegah degradasi HIF-1 α akibat ROS, sehingga meningkatkan ekspresi VEGF untuk mendukung angiogenesis. Peningkatan kadar VEGF mendukung pembentukan pembuluh darah baru, menyediakan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk regenerasi jaringan luka.³⁴

Mekanisme ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan, genetik, jenis kelamin, usia, hormonal, serta nutrisi. Diharapkan dengan pemberian EDM yang memiliki antioksidan kuat salah satunya flavonid dan fenol dapat mempercepat penyembuhan luka iris dengan menurunkan kadar IL-6 dan meningkatkan kadar VEGF.



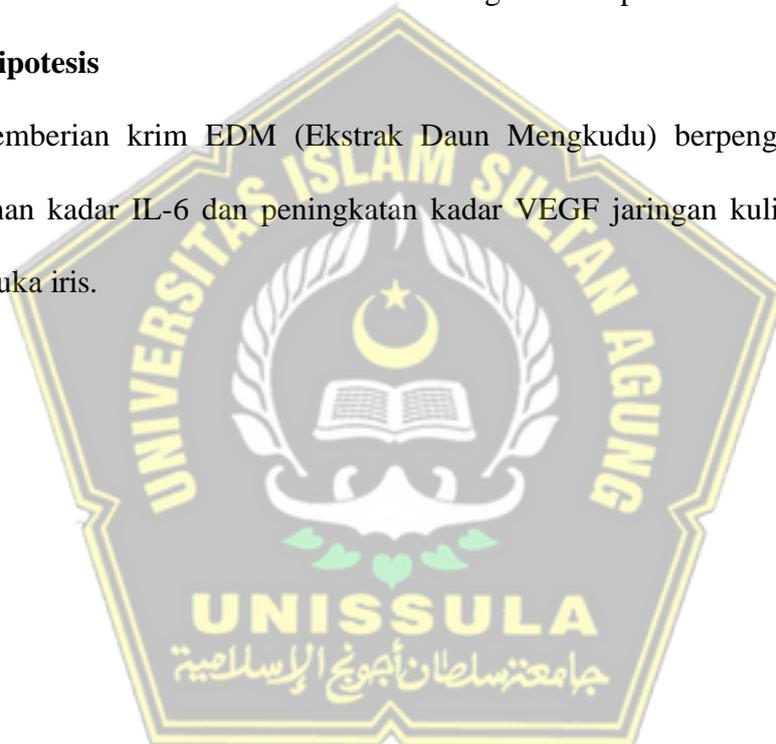
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Pemberian krim EDM (Ekstrak Daun Mengkudu) berpengaruh terhadap penurunan kadar IL-6 dan peningkatan kadar VEGF jaringan kulit tikus *Wistar* model luka iris.

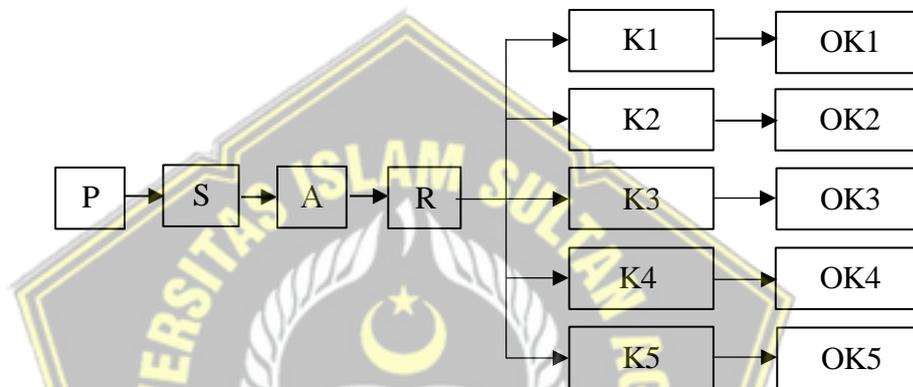


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *post test only control group design* menggunakan hewan coba tikus Wistar.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan:

P : Populasi

A : Adaptasi

R : Randomisasi

S : Sampel

K1 : Kelompok tikus normal/sehat

K2 : Kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus dengan luka iris dan diolesi basis krim selama 3 hari

K3 : Kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* selama 3 hari

K4 : Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang diolesi krim EDM 20% selama 3 hari

K5 : Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% selama 3 hari

OK1 : Observasi kelompok normal

OK2 : Observasi kontrol negatif

OK3 : Observasi kelompok kontrol positif

OK4 : Observasi kelompok perlakuan 1

OK5 : Observasi kelompok perlakuan 2

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Berikut adalah variabel penelitian dan definisi operasional yang terdapat pada penelitian:

4.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis krim EDM.

4.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar IL-6 dan VEGF jaringan kulit.

4.2.3. Definisi Operasional

a. Ekstrak Daun Mengkudu (EDM)

EDM yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari proses ekstraksi daun mengkudu menggunakan pelarut etanol 70% dengan tahap pembuatan simplisia, maserasi dan evaporasi, dibuat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*. Ekstrak dibuat sediaan krim konsentrasi 20% dan 40%. Krim dioleskan secara topikal 1 kali sehari pada bagian luka iris sebanyak 0,2 gram selama 3 hari.

Skala: Ordinal

b. Kadar IL-6

Kadar IL-6 adalah banyaknya IL-6 pada sampel jaringan kulit tikus setelah perlakuan luka iris dan diberikan krim EDM selama 3 hari yang dinyatakan dalam satuan pg/mL. Kadar IL-6 dianalisis dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), menggunakan

ELISA kit reagen *Rat IL-6 ELISA* merk *Elabscience* di laboratorium SCCR.

Skala: Rasio.

c. Kadar VEGF

Kadar VEGF adalah kadar VEGF dalam sampel jaringan kulit tikus setelah perlakuan luka iris dan diberikan krim EDM selama 3 hari yang dinyatakan dalam satuan pg/mL. Sampel jaringan kulit diambil pada hari ke-4. Pemeriksaan kadar VEGF dengan metode ELISA, menggunakan *ELISA* kit reagen *Rat VEGF ELISA* merk *Elabscience* di laboratorium SCCR.

Skala: Rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang dipelihara di laboratorium SCCR yang memenuhi kriteria:

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus berusia 2-3 bulan
2. Berat badan antara 180-220 gram
3. Tikus sehat (Gerak aktif, makan minum cukup, tidak ada kelainan morfologis yang tampak)

b. Kriteria *Drop Out*

Tikus sakit atau mati selama penelitian.

4.4. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil secara acak dengan teknik *simple random sampling*, dimana setiap tikus memiliki peluang yang sama untuk mewakili populasinya.

4.5. Besar sampel

Besar sampel minimal berdasarkan kriteria WHO adalah sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus Wistar yang terbagi dalam 5 kelompok, sehingga masing-masing terdiri dari 5 ekor sampel. Untuk menghindari *lost of follow*, jumlah sampel ditambah satu ekor tikus masing-masing kelompok, sehingga sampel menjadi 30 ekor tikus.

4.6. Alat dan Bahan

Berikut beberapa alat yang dapat digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

1. Kain bersih untuk memegang tikus
2. Alkohol 70%
3. Pisau bedah
4. *Centrifuge*
5. Spektrofotometer UV-Vis
6. Oven
7. Inkubator
8. Timbangan analitik
9. Blender

10. Gelas kimia
11. Cawan petri
12. Reagen *Rat IL-6 ELISA kit* merk *Elabscience*
13. Reagen *Rat VEGF ELISA kit* merk *Elabscience*
14. Mikroplate/ ELISA reader
15. Vortex Mixer
16. Timer

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tikus putih jantan galur Wistar
2. Krim EDM

4.7. Cara Penelitian

4.7.1. Perizinan *Ethical Clearance*

Penelitian terhadap hewan percobaan dilakukan setelah mendapatkan *ethical clearance* dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.7.2. Persiapan Sampel

Tikus putih galur wistar sebanyak 30 ekor disiapkan di Laboratorium SCCR Semarang. Pada kelompok perlakuan, area luka iris pada tikus diberikan EDM, sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan/plasebo/larutan buffer/pengobatan standar. Kemudian tikus diaklimatisasi selama 7 hari di lingkungan yang telah disiapkan, dan diberikan pakan dan air secara *ad libitum*.

1. Prosedur Pembuatan EDM
 - a. Daun mengkudu diambil dan diolah menjadi ekstrak menggunakan metode ekstraksi pelarut organik dengan etanol 70%.
 - b. Ekstrak kemudian diuji kualitasnya dengan menggunakan metode spektrofotometri dan aktivitas antioksidan flavonoid.
 - c. Sampel daun mengkudu sebanyak 1 kg, dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40° C.
 - d. Simplisia dicek kadar airnya dengan *moisture balance*. Hasil pengeringan simplisia dianggap baik jika kadar air di bawah 10%.
 - e. Simplisia kemudian dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal selama proses pengeringan, dipotong kecil-kecil, dan ditimbang kemudian dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk daun mengkudu diayak dengan ayakan ukuran 20 mesh.
 - f. Timbang 450gram serbuk simplisia daun mengkudu diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1.500 ml.
 - g. Serbuk simplisia dimasukkan kedalam botol berwarna gelap secara terpisah. Kemudian direndam menggunakan pelarut etanol selama 3 hari dan sesekali diaduk 3 kali sehari, setelah 3 hari kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi ulang selama 2 hari dengan etanol 70% sebanyak 1.500ml.
 - h. Pengulangan dilakukan sebanyak dua kali. Filtrat yang terkumpul kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu

40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

- i. EDM yang diperoleh dihitung rendemennya, kemudian dibuat dalam bentuk sediaan krim dengan dosis 20% dan 40%.⁴

2. Komposisi dan Prosedur Pembuatan Krim EDM

Formulasi krim dengan EDM, bahan-bahan utama meliputi:

- a. Fase Minyak: *Stearic acid*: 10–15% (emulsifier dan pengental), *Cetyl alcohol*: 2–3% (pengemulsi tambahan), Minyak kelapa/*mid-chain triglycerides* (MCT): 5–10% (pelembap).
- b. Fase Air: Gliserin: 5% (humektan) dan Air demineralisasi: sisa hingga 100%.
- c. EDM sesuai konsentrasi yang diinginkan 20% atau 40%
- d. Pengawet yaitu *Methylparaben* atau *phenoxyethanol*: 0,2–0,5% (untuk mencegah kontaminasi mikroba).

Prosedur Pembuatan Krim EDM sebagai berikut:

- a. Persiapan Fase Minyak, Panaskan *stearic acid*, *cetyl alcohol*, dan minyak kelapa dalam wadah tahan panas hingga mencair sempurna (70–75°C).
- b. Persiapan Fase Air dengan mencampurkan air demineralisasi dan gliserin, kemudian panaskan hingga suhu yang sama (70– 75°C).
- c. Pencampuran fase minyak dan air dengan memasukkan fase minyak ke fase air secara perlahan sambil diaduk menggunakan mixer kecepatan sedang hingga terbentuk emulsi.
- d. Penambahan EDM dengan menurunkan suhu emulsi hingga 40–

50°C, lalu tambahkan EDM secara perlahan. Untuk konsentrasi 20%, tambahkan 20 gram ekstrak per 100 gram krim dan untuk konsentrasi 40%, tambahkan 40 gram ekstrak per 100 gram krim.

- e. Penambahan Pengawet dan Pewangi dengan menambahkan pengawet dan pewangi ke dalam emulsi.
- f. Aduk campuran hingga homogen dan suhu turun ke suhu kamar.
- g. Tuangkan krim ke dalam wadah steril, seperti pot krim atau tube, dan simpan di tempat yang sejuk dan kering.

3. Pembuatan Luka Iris

Luka iris dilakukan pada area kulit punggung tikus yang sebelumnya telah diberikan anestesi. Luka iris tersebut dibuat dengan panjang 1cm kedalam 2 mm menggunakan pisau bedah.⁷²

4. Penetapan Dosis

Dosis pemberian krim EDM secara topikal pada penelitian ini menggunakan dosis 20% dan 40%. Dasar dari penetapan dosis diambil dari literatur dimana pada penelitian yang dilakukan sebelumnya, krim EDM 20% memiliki rata-rata jumlah sel fibroblas yang sama dengan kelompok kontrol.¹⁷ EDM dosis 20% adalah konsentrasi yang ideal untuk setiap terapi.⁵ Penggunaan topikal krim EDM dilakukan setiap hari sebanyak 0,2 gram/tikus untuk kedua konsentrasi diatas.

5. Pemberian krim EDM

Krim EDM diberikan pada kelompok perlakuan di area luka iris selama 3 hari.

6. Pengambilan sampel jaringan kulit tikus setelah pemberian perlakuan

Jaringan kulit pada area luka iris diambil pada hari ke-4 setelah pembuatan luka iris dan setelah pemberian ekstrak mengkudu, dengan prosedur sebagai berikut:

- a. Anestesi dan eutanasi tikus sesuai protokol etis, jaringan kulit diambil dari area luka dengan menggunakan gunting dan pinset steril.
- b. Potong jaringan kulit dengan hati-hati, pastikan menghindari jaringan lain seperti otot atau lemak.
- c. Cuci jaringan kulit menggunakan buffer PBS dingin untuk menghilangkan darah dan kontaminan.
- d. Simpan sementara, jika jaringan tidak dapat segera diproses, bekukan dengan snap freezing menggunakan nitrogen cair, lalu simpan di freezer (-80°C).

7. Prosedur Preparasi jaringan kulit tikus sebelum analisis metode ELISA
Prosedur preparasi jaringan sebelum analisis ELISA sebagai berikut:

- a. Homogenisasi jaringan dengan menyiapkan buffer lisis dingin (RIPA buffer) dengan menambahkan protease inhibitor sesuai dosis rekomendasi produsen.
- b. Potong jaringan menjadi potongan kecil (1–2 mm) dengan gunting steril untuk mempermudah homogenisasi.
- c. Masukkan potongan jaringan ke dalam tabung mikrocentrifuge

yang berisi 500–1000 μL buffer lisis dingin.

- d. Melakukan homogenisasi jaringan dengan:
 - 1) Mortar dan pestle: Menambahkan nitrogen cair untuk menjaga suhu dingin.
 - 2) Homogenizer elektrik dengan kecepatan sedang-tinggi hingga jaringan menjadi halus.
- e. Melakukan Inkubasi homogenat pada suhu 4°C selama 30–60 menit dengan pengocokan berkala (vortex setiap 10 menit).
- f. Melakukan sentrifugasi homogenat pada 12.000–14.000 rpm selama 15–20 menit pada suhu 4°C .
- g. Setelah sentrifugasi, akan terbentuk tiga lapisan:
 - 1) Supernatan (mengandung protein terlarut, termasuk IL-6 dan VEGF).
 - 2) Lapisan tengah (debris jaringan).
 - 3) Pelet (material tidak larut).
- h. Pengambilan Supernatan:
 - 1) Mengambil supernatan secara hati-hati menggunakan pipet steril, lalu hindari mengganggu lapisan debris atau pelet.
 - 2) Memindahkan supernatan ke tabung mikrocentrifuge baru.
- i. Menyimpan supernatan di freezer (-80°C) hingga siap dianalisis menggunakan ELISA.

8. Prosedur Analisis kadar IL-6 dan VEGF dengan metode ELISA

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis

kadar IL-6 dan VEGF menggunakan metode ELISA, mengikuti prosedur yang dilampirkan dalam produk, menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang 450nm. Tahapan pemeriksaanya sebagai berikut:

a. Membuat standard dengan cara :

- 1) Menyiapkan sepuluh sumuran pada mikroplate
- 2) Memasukkan 100 μL cairan standar dan 50 μL diluent standar pada sumuran 1 dan 2, kemudian dicampur.
- 3) Memasukkan 100 μL cairan dari sumuran 1 dan 2 dan 50 μL diluent standar pada sumuran 3 dan 4, kemudian dicampur.
- 4) Memasukkan 100 μL cairan dari sumuran 3 dan 4 dan 50 μL diluent standar pada sumuran 5 dan 6, kemudian dicampur.
- 5) Memasukkan 100 μL cairan dari sumuran 5 dan 6 dan 50 μL diluent standar pada sumuran 7 dan 8, kemudian dicampur.

b. Menambahkan antibodi dan inkubasi selama tiga puluh menit pada suhu 37°C , kemudian mencampurkan larutan pencuci dengan aquadest sebanyak tiga puluh kali, dan mencuci sumuran sebanyak lima kali dengan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap 3.

- 1) Menambahkan buffer penghalang agar antigen menempel pada plat selama 60 menit pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C .
- 2) Memasukkan sample sebanyak 100 μL ke tiap sumuran, kemudian di Inkubasi selama 120 menit pada suhu

ruangan.

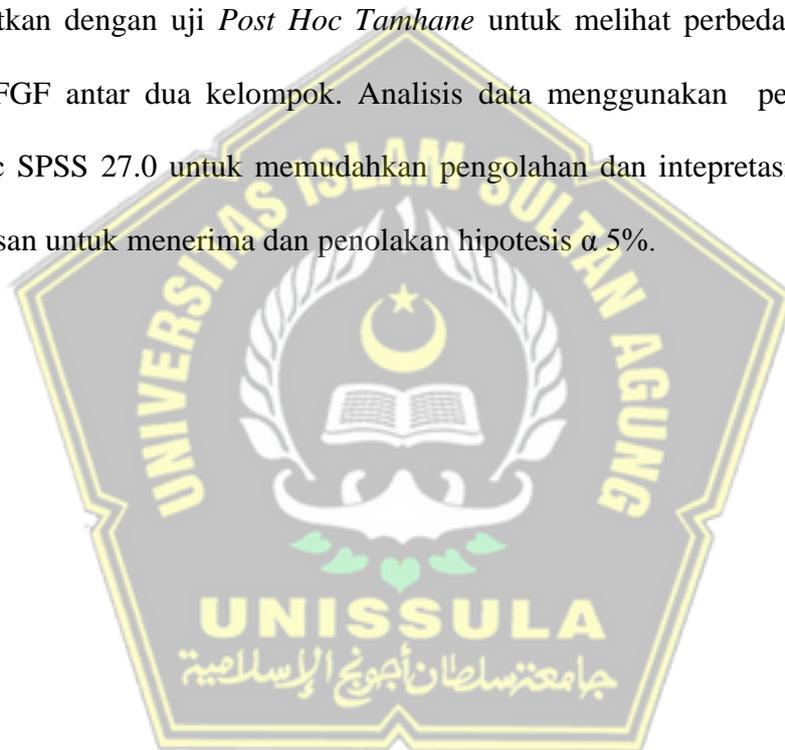
- 3) Menambahkan antibodi pada tiap sumuran sebanyak 100 μ L biotinylated antibodi pada tiap sumuran.
- 4) Melakukan inkubasi plate selama 60 menit pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C, kemudian melakukan pencucian sumuran sebanyak 5 kali dan ditambahkan 100 μ L ABC solution pada setiap sumuran lalu inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C.
- 5) Menambahkan 100 μ L HRP-conjugate dan 100 μ L TMB pada tiap sumuran dan Inkubasi selama 30 menit dengan pada suhu 37°C.
- 6) Menambahkan 100 μ L stop solution pada tiap sumuran, sampai terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning
- 7) Pembacaan nilai OD (optical density) pada panjang gelombang 450 nm pada alat ELISA reader dan didapatkan hasil kadar IL-6 dan VEGF.

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

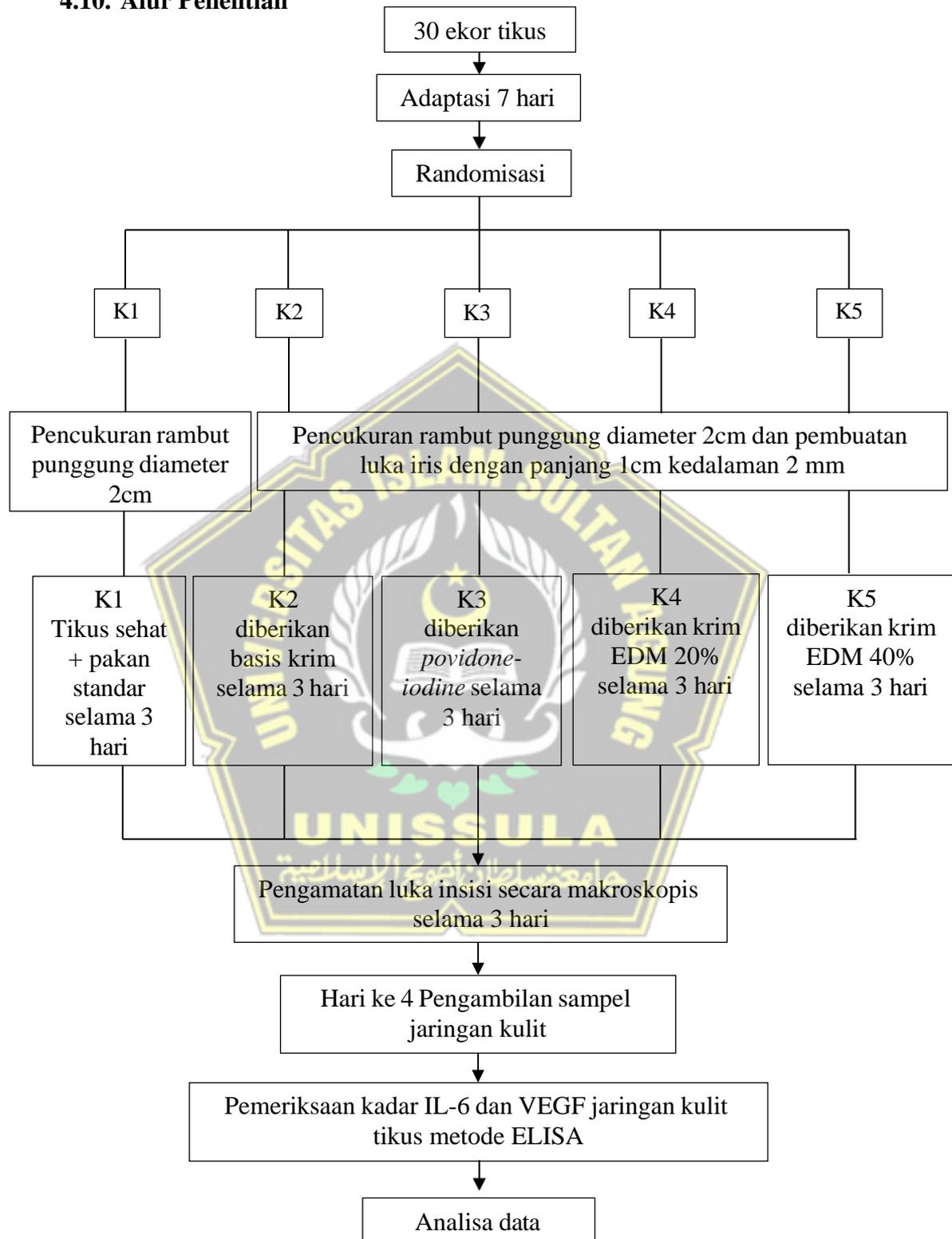
Penelitian akan dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang dalam jangka waktu 4 minggu, dari mulai persiapan hingga Analisa data pada bulan Desember 2024-Januari 2025.

4.9. Analisa Data

Data penelitian diolah dalam bentuk deskriptif, kemudian dilakukan pengujian normalitas data menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas data dengan *Levene test*. Hasil data didapatkan terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan analisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk melihat perbedaan kadar IL-6 dan kadar VEGF antar semua kelompok dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk melihat perbedaan kadar IL-6 dan VEGF antar dua kelompok. Analisis data menggunakan perangkat lunak statistic SPSS 27.0 untuk memudahkan pengolahan dan interpretasi hasil dengan keputusan untuk menerima dan penolakan hipotesis α 5%.



4.10. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian.

BAB V

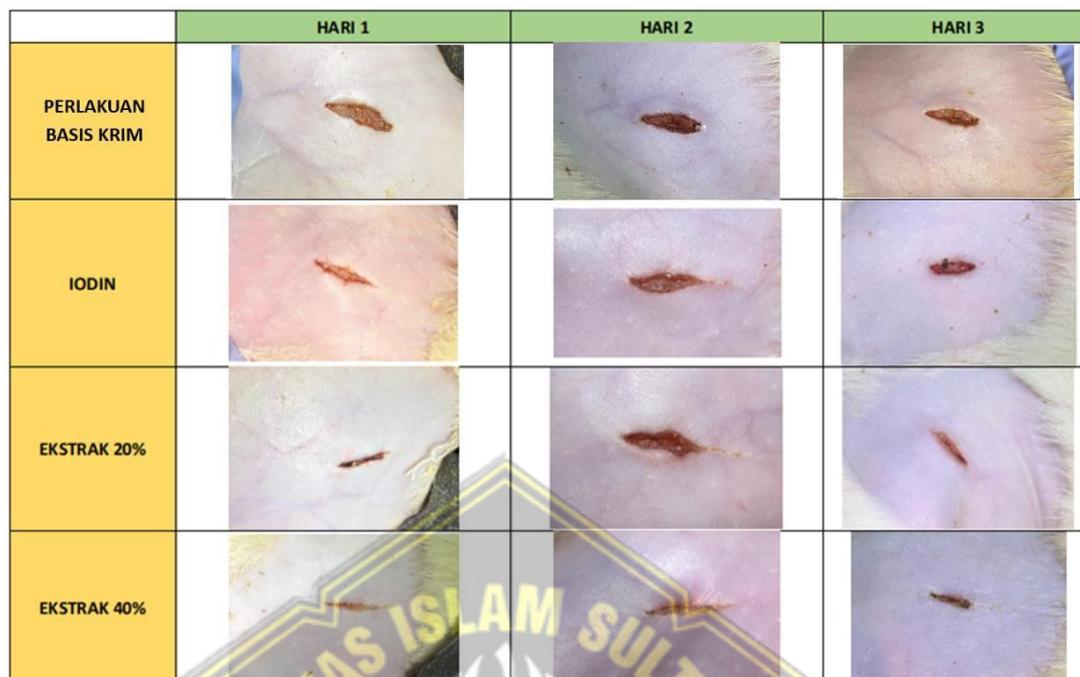
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang. Total sampel penelitian berjumlah 30 ekor tikus *Wistar* dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah 6 ekor tiap kelompok. Kelompok K1 tikus normal/sehat, Kelompok K2 kontrol negatif yaitu kelompok tikus dengan luka iris dan diolesi basis krim, kelompok K3 kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine*, kelompok perlakuan 1 (K4) tikus dengan luka iris yang diolesi krim EDM 20%, dan kelompok perlakuan 2 (K5) tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40%, perlakuan dilakukan selama 3 hari, hari ke 4 sampel jaringan kulit diambil untuk dianalisis kadar IL-6 dan VEGF dengan metode *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Gambaran Makroskopis Luka Iris

Gambaran makroskopis luka iris pada setiap kelompok perlakuan hari pertama sampai hari ketiga menunjukkan perbedaan. Penyembuhan luka iris pada kelompok yang diberi krim EDM 20% dan 40% menunjukkan penutupan luka iris yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif, seperti tampak pada gambar 5.1. Penggunaan krim EDM 40% memberikan penyembuhan luka iris paling baik.



Gambar 5.1. Makroskopis kondisi luka iris pada setiap kelompok perlakuan pada hari ke 1,2 dan 3

5.1.2. Hasil Analisis Kadar IL-6 Jaringan Kulit Tikus Dengan Luka Iris

Hasil analisis rata-rata kadar IL-6 pada masing-masing kelompok penelitian ditunjukkan pada tabel 5.1. Rata-rata kadar IL-6 paling rendah yaitu kelompok tikus sehat K1 sebesar $9,34 \text{ pg/mL} \pm 6,01$, sementara yang memiliki kadar IL-6 paling tinggi yaitu kelompok basis krim (K2) sebesar $100,8 \text{ pg/mL} \pm 26,99$. Pemberian krim EDM dosis 20% dan 40% kadar IL-6 lebih rendah dibandingkan basis krim masing-masing sebesar $19,80 \text{ pg/mL} \pm 15,95$ dan $75,18 \text{ pg/mL} \pm 6,99$. Dari hasil uji *One way anova* menghasilkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan signifikan kadar IL-6 antar semua kelompok.

Tabel 5.1. Rata-rata Kadar IL-6 dan uji *One Way Anova*

Kelompok	K1 Tikus Sehat	K2 Basis Krim	K3 <i>povidone- iodine</i>	K4 Dosis 20%	K5 Dosis 40%	<i>p</i> <i>Value</i>
Rata-rata ±SD (pg/mL)	9,34± 6,01	100,8± 26,99	29,54± 19,26	19,80± 15,95	75,18±6 ,99	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,899	0,606	0,273	0,152	0,987	
<i>Lavene Test</i>						0,011
<i>One way Anova</i>						0,000*

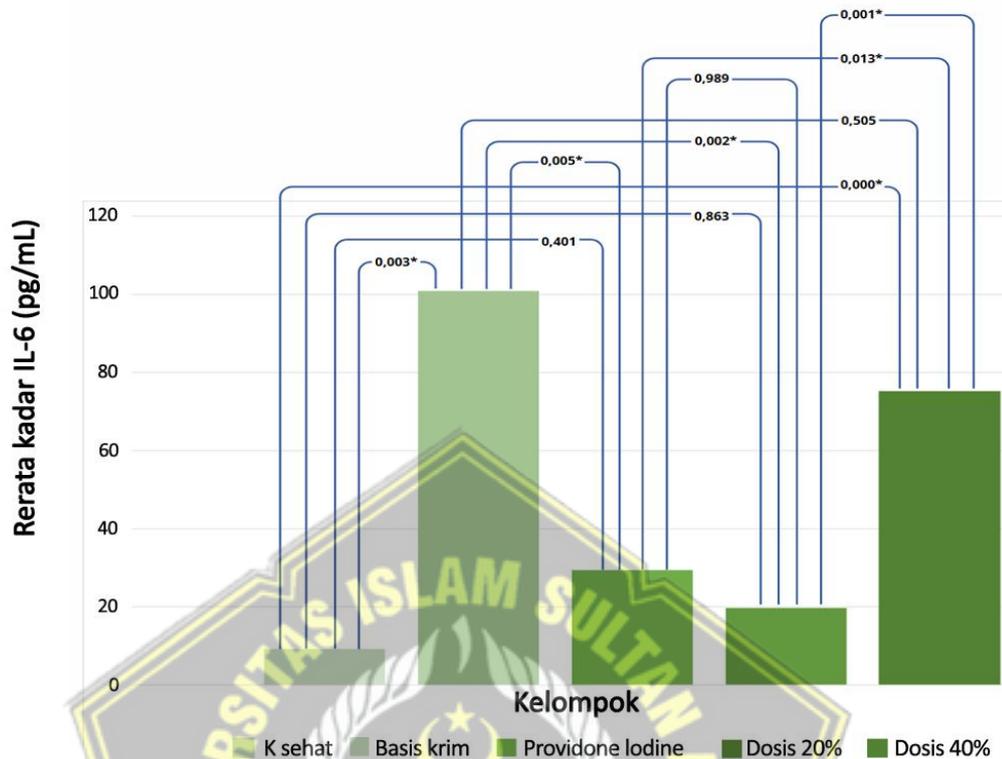
Keterangan * : Signifikan $p < 0,05$)

Hasil uji *Post hoc Tamhane* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan kadar IL-6 antar kelompok terhadap jaringan kulit, ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil Uji Post Hoc Tamhane Kadar IL-6 Jaringan Kulit Tikus

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	*0,003	0,401	0,863	*0,000
K2	*0,003	-	*0,005	*0,002	0,505
K3	0,401	*0,005	-	0,989	*0,013
K4	0,863	*0,002	0,989	-	*0,001
K5	*0,000	0,505	*0,013	*0,001	-

*Uji *Post Hoc Tamhane* dengan nilai signifikan $p < 0,05$



Gambar 5.2. Rata-rata kadar IL-6 tiap Kelompok Perlakuan

Uji *Post hoc Tamhane* terhadap kadar IL6 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok basis krim (K2) dengan nilai p value 0,003 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) nilai p value 0,000 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2) dengan kelompok sehat (K1) nilai p value 0,003 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2) dengan kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) nilai p value 0,005 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2)

dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) nilai p value $0,002(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) dengan kelompok basis krim (K2) nilai p value $0,005(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) nilai p value $0,013(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) dengan kelompok basis krim (K2) nilai p value $0,002(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) nilai p value $0,001(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) dengan kelompok sehat (K1) nilai p value $0,000(p<0,05)$.

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) nilai p value $0,013(p<0,05)$. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) nilai p value $0,001(p<0,05)$.

Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian krim

EDM dosis 20% dan 40% berpengaruh secara signifikan terhadap kadar IL-6 pada tikus wistar dengan luka iris, sehingga pernyataan hipotesis diterima.

5.1.3. Hasil Analisis Kadar VEGF Jaringan Kulit Tikus

Hasil rata-rata kadar VEGF pada tiap kelompok ditunjukkan pada table 5.3 sebagai berikut:

Tabel 5.3. Rata-rata Kadar VEGF dan Uji *One Way Anova*

Kelompok	K1 Tikus Sehat	K2 Basis Krim	K3 <i>povidone- iodine</i>	K4 Dosis 20%	K5 Dosis 40%	<i>p</i> <i>value</i>
Rata-rata \pm SD (pg/mL)	37,92 \pm 9,18	21,43 \pm 10,59	51,24 \pm 21,36	45,41 \pm 8,37	59,76 \pm 9,39	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,159	0,608	0,221	0,584	0,282	
<i>Lavene Test</i>						0,012
<i>One way Anova</i>						0,000*

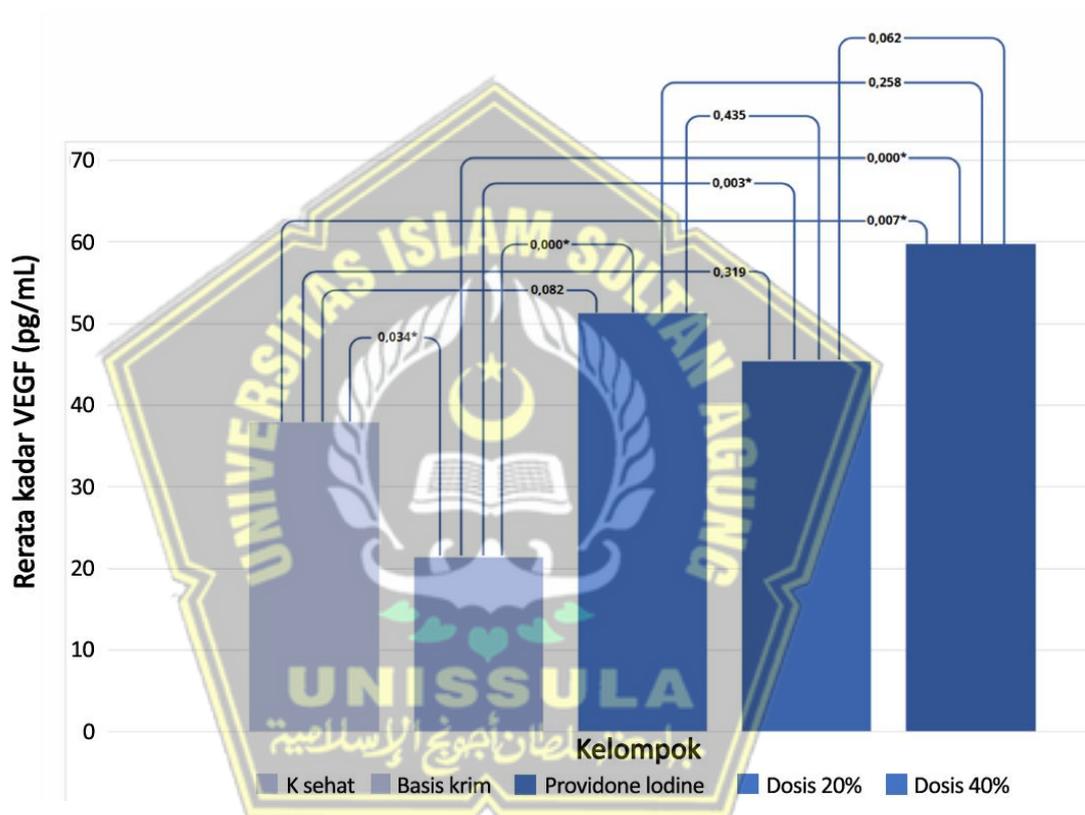
Keterangan * : Signifikan $p < 0,05$)

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa hasil rata-rata kadar VEGF pada kelompok K1 sebesar 37,92 pg/mL, kelompok K2 sebesar 21,43 pg/mL, kelompok K3 sebesar 51,24 pg/mL, kelompok K4 sebesar 45,41 pg/mL, dan kelompok K5 sebesar 59,76 pg/mL. Kelompok basis krim memiliki kadar VEGF paling rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya sedangkan kelompok yang diolesi krim EDM 40% memiliki kadar VEGF paling tinggi.

Tabel 5.4. Hasil uji *Post hoc Tamhane* Kadar VEGF Jaringan Kulit Tikus Setelah Perlakuan Hari Ke 3

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	*0,034	0,082	0,319	*0,007
K2	*0,034	-	*0,000	*0,003	*0,000
K3	0,082	*0,000	-	0,435	0,258
K4	0,319	*0,003	0,435	-	0,062
K5	*0,007	*0,000	0,258	0,062	-

*Uji *Post Hoc Tamhane* dengan nilai signifikan $p < 0,05$



Gambar 5.3. Rata-rata Kadar VEGF Tiap Kelompok Perlakuan

Uji *Post hoc Tamhane* kadar VEGF menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok basis krim (K2) dengan nilai p value 0,034 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) nilai p value 0,007 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis

krim (K2) dengan kelompok sehat (K1) nilai p value 0,034($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2) dengan kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) nilai p value 0,000($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) nilai p value 0,003($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok basis krim (K2) dengan kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) nilai p value 0,000($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan *povidone-iodine* (K3) dengan kelompok basis krim (K2) nilai p value 0,000($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 20% (K4) dengan kelompok basis krim (K2) nilai p value 0,003($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) dengan kelompok sehat (K1) nilai p value 0,007($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok tikus dengan luka iris yang dioleskan krim EDM 40% (K5) dengan kelompok basis krim (K2) nilai p value 0,000($p < 0,05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian krim EDM dosis 20% dan 40% berpengaruh secara signifikan terhadap kadar VEGF pada tikus wistar dengan luka iris, sehingga pernyataan hipotesis diterima.

5.2. Pembahasan

Penyembuhan luka ditandai dengan aktivasi sistem imun yang bertujuan untuk membunuh mikroba patogen melalui penyebaran molekul *Peptide Anti Micoba* (AMP) , Aktivasi *Toll-Like Receptor* (TLR) dan patogen lain atau reseptor pengenalan bahaya menyebabkan aktivasi sitokin inflamasi (IL-6) serta respons peptida antimikroba. aktivasi TLR, dan Interferon (IFN) γ , serta TNF α mendorong diferensiasi makrofag M1. Setelah dekontaminasi luka berhasil, fase inflamasi menghilang dan tahap reparatif , yang ditandai dengan proliferasi keratinosit dan fibroblas dimulai. Peralihan dari makrofag M1 ke makrofag M2 serta fungsi AMP yang berbeda merupakan pengatur penting fase reparatif. Reepitelisasi luka membutuhkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur, dipandu, setidaknya sebagian, melalui produksi faktor pertumbuhan dan AMP.⁷¹ T

tahap awal pada penyembuhan luka makrofag melepaskan sitokin inflamasi yang meningkatkan respon inflamasi dengan merekrut dan mengaktifkan leukosit tambahan. Makrofag juga penting untuk mendekontaminasi luka dari mikroba dan membersihkan sel-sel apoptosis, sehingga membuka jalan bagi resolusi peradangan dan awal fase proliferasi penyembuhan luka. Saat lingkungan mikro berubah di dasar luka, makrofag mengalami peralihan fenotipik ke keadaan anti-inflamasi, regulasi, dan reparatif, yang merangsang keratinosit, fibroblas, dan endotel. sel untuk mendorong regenerasi jaringan. Dengan cara ini, makrofag mempromosikan transisi ke fase penyembuhan proliferasi. Banyak jalur penting dalam makrofag ini beralih dari M1 ke M2 dan memasukkan IL-4, IL-13,

Stimulasi TLR, pensinyalan adenosin, CXCL1, dan CCL18. Lebih-lebih lagi , miRNA-21 menargetkan *Phosphatase Tensin and Homolog* (PTEN) dan selanjutnya pengurangan PTEN memperluas aktivasi *Protein Kinase-B* (AKT) yang mematikan keadaan peradangan dan meningkatkan keadaan anti-inflamasi.

Salah satu jalur sinyal intraseluler mengendalikan saklar fenotipik melibatkan p38 dan miRNA-21. Di dalam makrofag, miRNA-21 memainkan peran penting dalam transisi dari inflamasi menjadi anti-inflamasi fenotip. Jalur stres p38/Jun diaktifkan oleh PAMP dan DAMP , menyebabkan sekresi sitokin inflamasi, seperti IL-1, TNF, dan IL-6. Menginduksi miRNA-21, salah satu targetnya adalah PTEN. Pengurangan PTEN memperluas aktivasi AKT yang mematikan peradangan menyatakan dan meningkatkan keadaan anti-inflamasi. Fibroblas dan keratinosit menunjukkan respons terhadap peningkatan miRNA-21 yang berbeda dari makrofag dan merangsang migrasi. Hal ini sangat penting untuk permulaan pembentukan jaringan granulasi dan penutupan luka. miRNA-21 terlibat dalam penghentian inflamasi fase penyembuhan luka dan dimulainya fase perbaikan proliferasi, Pada fase makrofag M2 akan mengaktifasi sitokin anti inflamasi dan *growt faktor* (IL-10, VEGF dan TGF- β).⁷¹

Luka iris menyebabkan VEGF dan IL-6 memainkan peran penting dalam setiap fase penyembuhan luka. Hubungan antara kadar VEGF dan IL-6 pada luka iris berperan penting dalam proses penyembuhan luka. IL-6, sebagai sitokin proinflamasi, dan VEGF sebagai faktor pertumbuhan angiogenik utama, memiliki interaksi yang kompleks untuk mendukung proses regenerasi jaringan.^{34,37}

Hasil analisis menunjukkan pengaruh pemberian krim EDM 20% lebih tinggi menurunkan kadar IL-6 dibandingkan dosis EDM 40%. Hal ini diduga kandungan senyawa aktif yang dihasilkan diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, triterpenes, dan coumarins pada pemberian krim EDM dapat mengaktivasi antioksidan yang berperan dalam memodulasi proses inflamasi dan angiogenesis, yang merupakan fase kritis dalam penyembuhan luka, menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga mengurangi produksi IL-6. Penurunan kadar IL-6 membantu meredakan fase inflamasi, sehingga memungkinkan proses penyembuhan beralih ke fase proliferasi lebih cepat.⁷⁰ Dosis ini dapat menjaga kadar IL-6 dalam batas normal, sehingga mengurangi risiko inflamasi berlebihan, memberikan efek antiinflamasi optimal tanpa merangsang respons imun yang berlebihan, aktivitas ini menghasilkan pengurangan inflamasi tanpa memicu efek samping. Kadar IL-6 yang lebih tinggi pada dosis 40% mungkin diperlukan untuk mempromosikan proses inflamasi awal yang penting dalam penyembuhan luka, senyawa dalam EDM memicu respons inflamasi adaptif, mekanisme ini dikenal sebagai efek hormesis, di mana dosis lebih tinggi dapat merangsang sel imun tertentu untuk menghambat IL-6 sebagai bagian dari regulasi penyembuhan luka. Penelitian ini sejalan dengan laporan Sinambela *et al*, 2022 menggunakan *Noni's Leaf Extract* (NLEE) 20%, 25%, dan 30% terhadap jumlah fibroblas, diameter luka, waktu penyembuhan, TNF-a, IL-1, PDGF, dan TGF- β , dimana dosis 20% didapatkan hasil paling ideal untuk setiap terapi.⁵

Hasil analisis terhadap kadar VEGF menunjukkan hasil paling tinggi pada kelompok yang dioleskan krim EDM 40%, dibandingkan dengan kelompok yang

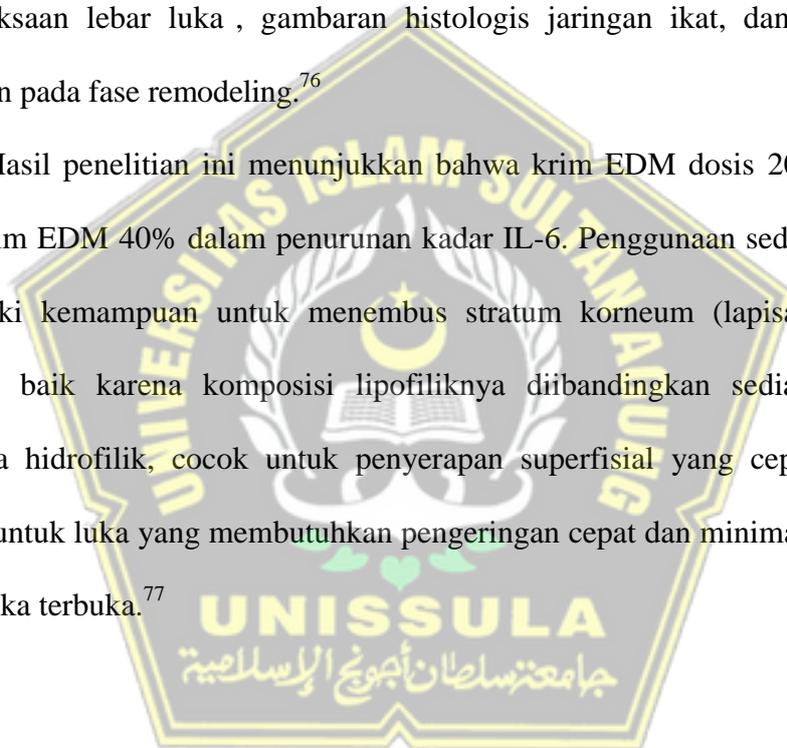
dioleskan krim EDM 20%. Hal ini diduga kandungan senyawa aktif yang dihasilkan diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, triterpenes, dan coumarins pada pemberian krim EDM dapat mengaktifasi Antioksidan sehingga dapat mengurangi ROS yang dapat menginaktivasi *Nitric Oxide* (NO), molekul penting untuk angiogenesis, mendukung pembentukan pembuluh darah baru melalui stimulasi ekspresi VEGF. Antioksidan mencegah degradasi HIF-1 α akibat ROS, sehingga meningkatkan ekspresi VEGF untuk mendukung angiogenesis. Peningkatan kadar VEGF mendukung pembentukan pembuluh darah baru, menyediakan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk regenerasi jaringan luka.³⁴

Kadar IL-6 dan VEGF saling berhubungan dalam penyembuhan luka iris. IL-6 bertindak sebagai mediator inflamasi awal yang memicu produksi VEGF untuk angiogenesis dan regenerasi jaringan. Hubungan ini menciptakan sinergi dalam mempercepat proses penyembuhan luka dengan memastikan suplai oksigen, nutrisi, dan pembentukan jaringan baru secara optimal. Regulasi kadar IL-6 penting untuk mencegah inflamasi kronis yang dapat menghambat proses penyembuhan. Angiogenesis dan pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada, merupakan ciri utama dari fase penyembuhan proliferasi. Proses ini menyebabkan peningkatan sementara jumlah pembuluh darah di lokasi cedera. Pengiriman oksigen dan nutrisi dari pembuluh darah baru ini merupakan bagian penting dari proses perbaikan, dan kerusakan pada angiogenesis sering dikaitkan dengan keterlambatan penyembuhan luka. Berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, dan mediator lipid yang dihasilkan sebagai respons

terhadap cedera dapat merangsang angiogenesis.^{30,75}

Beberapa penelitian sebelumnya mendukung hasil penelitian formula gel ekstrak topikal yang dapat membantu penyembuhan luka pada kulit dan mukosa mulut lebih cepat dibandingkan dengan larutan povidone-iodine. Formula pasta topikal ekstrak etanol daun mengkudu juga dapat mempercepat penyembuhan luka mukosa mulut dibandingkan dengan formula gel. Hasil ini diperoleh melalui pemeriksaan lebar luka, gambaran histologis jaringan ikat, dan kadar MDA jaringan pada fase remodeling.⁷⁶

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa krim EDM dosis 20% lebih baik dari krim EDM 40% dalam penurunan kadar IL-6. Penggunaan sediaan krim yang memiliki kemampuan untuk menembus stratum korneum (lapisan atas kulit) dengan baik karena komposisi lipofiliknya dibandingkan sediaan gel yang sifatnya hidrofilik, cocok untuk penyerapan superfisial yang cepat. Gel lebih cocok untuk luka yang membutuhkan pengeringan cepat dan minimal risiko iritasi pada luka terbuka.⁷⁷



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian krim EDM terhadap penurunan kadar
2. IL-6 dan peningkatan kadar VEGF jaringan kulit tikus wistar dengan luka iris.
3. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 dan kadar VEGF pada kelompok tikus wistar sehat atau tidak mendapat perlakuan.
4. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 dan kadar VEGF pada jaringan kulit tikus wistar dengan luka iris tanpa intervensi atau basis krim.
5. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 dan kadar VEGF pada jaringan kulit tikus wistar dengan luka iris yang diberi povidone iodine.
6. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 dan kadar VEGF pada jaringan kulit tikus wistar dengan luka iris yang dioles krim EDM 20%.
7. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 dan kadar VEGF pada jaringan kulit tikus wistar dengan luka iris yang dioles krim EDM 40%.
8. Terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-6 yang bermakna antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

6.2. Saran

1. Melakukan pemeriksaan penelitian dengan metode analisis yang berbeda selain metode ELISA untuk mengetahui efektifitas krim EDM pada Tikus Wistar dengan luka iris misalnya IHC.

2. Melakukan penelitian dengan membandingkan sediaan gel untuk memperkuat hasil analisis terhadap efek krim daun mengkudu secara molekuler.



DAFTAR PUSTAKA

1. Jourdan M, Madfes DC, Lima E, Tian Y, Seité S. Skin care management for medical and aesthetic procedures to prevent scarring. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2019;12:799-804. doi:10.2147/CCID.S218134
2. Pal M, Saxena R, Kanya R, et al. A Detailed Analysis of Herbal Cosmetics. *NeuroQuantology*. ;20(15):6367. Published online 2022. doi:10.48047/NQ.2022.20.15.NQ88637
3. Safitri A, Sarosa H, Pertiwi D. The Effect of Sapodilla Leaf Extract on IL-6 and TGF- β Levels of Skin Tissue (Experimental Study on Male White Rats of Wistar Strain Exposed to UV Light). *International Journal of Multidisciplinary Research and Analysis*. 2024;07(02):799-805. doi:10.47191/ijmra/v7-i02-49
4. Erliani Mugita Sari D, Happy Ernanda T, Studi Farmasi P, Tinggi Ilmu Kesehatan Cendekia Utama Kudus S. Uji aktivitas antioksidan krim EDM (*Morinda citrifolia* L.) berbasis vanishing cream. *Jurnal Ilmiah Jophus : Journal of Pharmacy UMUS*. 2021;03(01):10-18.
5. Sinambela GN, Tandanu E, Ikhtiari R. The wound healing effect of *Morinda citrifolia* leaf extract and biomolecular analysis on inflammation and proliferation stages in Wistar rats. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 2022;11(2):52-59. doi:10.29238/teknolabjournal.v11i2.369
6. Abou Assi R, Darwis Y, Abdulbaqi IM, Khan AA, Vuanghao L, Laghari MH. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(5):691-707. doi:10.1016/j.arabjc.2015.06.018
7. Chen LY, Huang CN, Liao CK, et al. Effects of rutin on wound healing in hyperglycemic rats. *Antioxidants*. 2020;9(11):1-13. doi:10.3390/antiox9111122
8. Hagavane S, Sonawane S, Katkale A, Kunde V. Review on cream as topical drug delivery system. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* www.pharmacyjournal.in-2022. 2022;7(1):21-30.
9. Slika H, Mansour H, Wehbe N, et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022;146. doi:10.1016/j.biopha.2021.112442
10. Mabruroh A. Uji aktivitas antioksidan ekstrak tanin dari daun rumput bambu (*lophatherum gracile brongn*) dan identifikasinya (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim). Published

online 2015.

11. 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
12. 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
13. Kumar T, Malik R, Zahrah Maqbool S. Herbal plant with potential of wound healing activity: a review article. *www.wjpps.com* |. 2015;12:333. doi:10.20959/wjpps20233-24260
14. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research.* 2017;58(1-2):81-94. doi:10.1159/000454919
15. Gao Y, Xu X, Feng J, et al. Effects of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 RNA interference in dendritic cells on inflammatory cytokine release and T- cell proliferation. *Mol Med Rep.* 2016;14(6):5685-5692. doi:10.3892/mmr.2016.5946
16. 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
17. Haestidyatami VL, Sugiritama IW, Linawati NM. Pengaruh ekstrak krim *Morinda citrifolia* terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka tikus Wistar. *Intisari Sains Medis.* 2019;10(3). doi:10.15562/ism.v10i3.487
18. Heryanto R, Arlianti T, Wahyuni S, Purwiyanti S. Observation and morphological character of Noni (*Morinda citrifolia L.*) in Ciampea, Bogor Regency. In: *E3S Web of Conferences.* Vol 373. EDP Sciences; 2023. doi:10.1051/e3sconf/202337303017
19. Trieu LH, Quynh DNN, Oanh NTK, et al. Wound-healing potential of topical application of preparations from Noni (*Morinda citrifolia L.*) leaf extract. *Indian J Nat Prod Resour.* 2023;14(2):255-269. doi:10.56042/ijnpr.v14i2.4210
20. Ly HT, Pham Nguyen MT, Nguyen TKO, Bui TPQ, Ke X, Le VM. Phytochemical Analysis and Wound-Healing Activity of Noni (*Morinda Citrifolia*) Leaf Extract. *J Herbs Spices Med Plants.* 2020;26(4):379-393. doi:10.1080/10496475.2020.1748159
21. Parmadi A, Rejeki S, Hastuti S, Bhakti P, Sukoharjo M. Formulation Development and Physical Test of Leaf Ethanol Extract Cream Noni

- (*Morinda citrifolia* L) As a Wound Healer. 2018;1(1):20-26.
22. 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
 23. Martin P. *Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration.* <http://science.sciencemag.org/>
 24. 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
 25. Bigliardi PL, Alsagoff SAL, El-Kafrawi HY, Pyon JK, Wa CTC, Villa MA. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery.* 2017;44:260-268. doi:10.1016/j.ijssu.2017.06.073
 26. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1). doi:10.1101/cshperspect.a023267
 27. Akita S. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24). doi:10.3390/ijms20246328
 28. Tampa M, Neagu M, Caruntu C, Constantin C, Georgescu SR. Skin Inflammation—A Cornerstone in Dermatological Conditions. *J Pers Med.* 2022;12(9):10-13. doi:10.3390/jpm12091370
 29. Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J.* 2016;13:5-15. doi:10.1111/iwj.12623
 30. Soliman AM, Barreda DR. Acute Inflammation in Tissue Healing. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1). doi:10.3390/ijms24010641
 31. Hossain MR, Ansary TM, Komine M, Ohtsuki M. Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083970
 32. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD. dkk. Aktivitas kolagenase-1 diperlukan untuk migrasi keratinosit pada matriks kolagen tipe I. *J Cell Biol.* 2017; 137 :1445–1457.
 33. Shams F, Moravvej H, Hosseinzadeh S, et al. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. *Sci Rep.* 2022;12(1). doi:10.1038/s41598-022-23304-8

34. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. In: *Advances in Surgical and Medical Specialties*. Taylor and Francis; 2023:341-370. doi:10.1098/rsob.200223
35. Kanno E, Tanno H, Masaki A, et al. Defect of interferon γ leads to impaired wound healing through prolonged neutrophilic inflammatory response and enhanced MMP-2 activation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22). doi:10.3390/ijms20225657
36. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL- 6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
37. Krizanova O, Penesova A, Sokol J, Hokynkova A, Samadian A, Babula P. Signaling pathways in cutaneous wound healing. *Front Physiol*. 2022;13. doi:10.3389/fphys.2022.1030851
38. Jian K, Yang C, Li T, et al. PDGF-BB-derived supramolecular hydrogel for promoting skin wound healing. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(1). doi:10.1186/s12951-022-01390-0
39. Ritsu M, Kawakami K, Kanno E, et al. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*. Published online 2017;(1):14-9.
40. Jackson CJ, Tønseth KA, Utheim TP. Cultured epidermal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1-7. doi:10.1186/s13287-017-0587-1
41. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL- 6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
42. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(7):399-409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
43. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL- 6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
44. Yusharyahya SN. Mekanisme Penuaan Kulit sebagai Dasar Pencegahan dan Pengobatan Kulit Menua. *eJournal Kedokteran Indonesia*. 2021;9(2):150. doi:10.23886/ejki.9.49.150
45. Ahmad Z, Damayanti. Penuaan Kulit : Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology*. 2018;30(03):208-215.

doi:<https://doi.org/10.20473/bikk.V30.3.2018.208-215>

46. Stanca Melincovici C, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2). <http://www.rjme.ro/>
47. Wiszniak S, Schwarz Q. Exploring the intracrine functions of vegf- α . *Biomolecules*. 2021;11(1):1-13. doi:10.3390/biom11010128
48. Parikh U, Masri L, Saravanan S, Li H, Miao Q, Balaji S. Role of cytokines and chemokines in wound healing. In: *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*. Elsevier; 2020:197-235. doi:10.1016/B978-0-12-816413-6.00011-3
49. Birkenhauer E, Neethirajan S. A double-edged sword: The role of VEGF in wound repair and chemoattraction of opportunist pathogens. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):7159-7172. doi:10.3390/ijms16047159
50. Nur Rosyid F, Dharmana E, Suwondo A, Seno KHNH. VEGF: structure, biological activities, regulations and roles in the healing of diabetic ulcers. *Int J Res Med Sci*. 2018;6(7):2184. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20182801
51. Castillo MFR, Cohen A, Edberg D, et al. Vascular endothelial growth factor in bipolar depression: A potential biomarker for diagnosis and treatment outcome prediction. *Psychiatry Res*. 2020;284. doi:10.1016/j.psychres.2020.112781
52. Wautier JL, Wautier MP. Vascular Permeability in Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7). doi:10.3390/ijms23073645
53. Ghahramani M, Razavi Majd Z. The Effect of Physical Activity on VEGF and HIF-1 Signaling. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences*. 2020;9(2). doi:10.5812/jcrps.98493
54. Ribatti D. The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system. *Mech Dev*. 2019;160. doi:10.1016/j.mod.2019.103579
55. Shahidatul-Adha M, Zunaina E, Aini-Amalina MN. Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) level in the tears and serum of age-related macular degeneration patients. *Sci Rep*. 2022;12(1):1-9. doi:10.1038/s41598-022-08492-7
56. Mayasari AC, Wratsangka R. Hubungan antara ekspresi vascular endothelial growth factor (VEGF) jaringan dengan respon kemoradiasi pada pasien kanker serviks. *Jurnal Biomedika dan Kesehatan*. 2020;3(2):63-69. doi:10.18051/JBiomedKes.2020.v3.63-pISSN

57. Rosyid FN. Role of TNF- α in Diabetic Ulcer Healing Process. *Proceeding ISETH (International Conference on Science, Technology, and Humanity)*. Published online 2016:142-149. <https://publikasiilmiah.ums.ac.id/bitstream/handle/11617/7473/13-Fahrhun.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
58. Abnaz & Levita. Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) dan Teori Uji Toksisitas. *Farmaka*. 2018;16:213-221.
59. Heryanto R, Arlianti T, Wahyuni S, Purwiyanti S. Observation and morphological character of Noni (*Morinda citrifolia* L.) in Ciampea, Bogor Regency. In: *E3S Web of Conferences*. Vol 373. EDP Sciences; 2023. doi:10.1051/e3sconf/202337303017
60. Kristanti H, Tunjung WAS. Detection of alkaloid, flavonoid, and terpenoid compounds in bread (*Artocarpus communis* Forst.) leaves and pulps. *KnE Life Sciences*. *KnE Life Sciences*. 2015;2(1):129. doi:10.18502/cls.v2i1.131
61. Mitra S, Nguyen LN, Akter M, Park G, Choi EH, Kaushik NK. Impact of ROS generated by chemical, physical, and plasma techniques on cancer attenuation. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7). doi:10.3390/cancers11071030
62. Cui Y, Liu B, Sun X, et al. Protective effects of alfalfa saponins on oxidative stress-induced apoptotic cells. *Food Funct*. 2020;11(9):8133-8140. doi:10.1039/d0fo01797c
63. Di Meo F, Cuciniello R, Margarucci S, et al. Ginkgo biloba prevents oxidative stress-induced apoptosis blocking p53 activation in neuroblastoma cells. *Antioxidants*. 2020;9(4). doi:10.3390/antiox9040279
64. Juang YP, Liang PH. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules*. 2020;25(21). doi:10.3390/molecules25214974
65. Herlina. Formulasi Krim EDM (*Morinda citrifolia* L .) Sebagai Sediaan Kulit terdiri atas 2 lapisan utama yaitu dermis dan epidermis . Tubuh manusia mempunyai beberapa cara untuk melakukan pertahanan , terutama dengan adanya kulit yang merupakan o. *Jurnal Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat*. 2017;9(2):109-119.
66. Adnan J, Karim A, Wandawati. Noni (*Morinda citrifolia* L.) Leaves Extract Gel Formulation with Variation of Carbopol 940 Concentration as Gelling Agent. *Jurnal Farmasi Pelamonia*. 2021;01(1):11-15.
67. Irfayanti NA, Hasan T, Mazriatii M. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia* L) DENGAN METODE DPPH UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK

- ETANOL DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia* L) DENGAN METODE DPPH. *Journal of Pharmaceutical Science and Herbal Technology*. 2023;1 (1)(1):5-9.
68. Zaky M, Junaidin J, Yulyianti R. POTENSI KRIM EKSTRAK ETANOL DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacopolium*. 2023;6(1):1-12. doi:10.36465/jop.v6i1.1080
69. Arief H, Aris M, Bagian W, et al. *Peranan Stres Oksidatif Pada Proses Penyembuhan Luka*. Vol 5.; 2018.
70. 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
71. Fannani MZ, Nugroho T. *Pengaruh Salep Ekstrak Etanol Daun Sirih (Piper Betle) Terhadap Penyembuhan Luka Iris Pada Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus)*. *JKKI: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 20-27. Vol 6.; 2014.
72. Putra A, Alif I, Hamra N, et al. *MSC-Released TGF- β Regulate α -SMA Expression of Myofibroblast during Wound Healing*. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*.; 2020.
73. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/9158016
74. 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
75. Sabirin IPR, Yuslianti ER. Effect of Topical Noni (*Morinda citrifolia* L.) Leaf Extract Paste in Carrageenan-induced Paw Edema on Wistar Rats. *Global Medical & Health Communication (GMHC)*. 2019;7(2):116-122. doi:10.29313/gmhc.v7i2.4087
76. Sharma GS, Anusha L, Kiran RS, Geetha K, Rao TR. A REVIEW ON PHARMACEUTICAL GELS 2021(12):1338-1351.