

Pengaruh Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) dan Aloe Vera (*Aloe barbadensis*) Terhadap Kadar TNF- α dan Glutathione (GSH)
(Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Model Luka Bakar Derajat II)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Nurul Hasanah

MBK.24.23.010458

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

HALAMAN PENGESAHAN
TESIS
PENGARUH GEL KOMBINASI EKSTRAK DAUN SIRIH
(PIPER BETLE) DAN ALOE VERA (ALOE BARBADENSIS)
TERHADAP KADAR TNF-A DAN GLUTATHIONE (GSH)
(Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Model Luka Bakar Derajat II)

Disusun oleh

Nurul Hasanah

MBK.24.23.010458

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 27 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan Sp. D.V.E.,
Subsp.D.K.E, FINS DV, FAADV

NIDN. 8951110021

Pembimbing II



Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes

NIK. 210198046

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 di dalamnya 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, 27 Agustus 2025



(Nurul Hasanah)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Nurul Hasanah

Tempat tanggal lahir : Jakarta, 17 November 1978

Agama : Islam

Jenis kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Aisyah cabang Tebet : Lulus tahun 1984
2. SDN Tebet Barat 03 Pagi : Lulus tahun 1990
3. SMPN 15 Jakarta : Lulus tahun 1993
4. SMAN 26 Jakarta : Lulus tahun 1996
5. S1 Fakultas Universitas YARSI : Lulus tahun 2001
6. Profesi Dokter FK YARSI : Lulus tahun 2004

C. Riwayat Keluarga

Suami :

Anak : Abigail Najya Audienna

Theodore Aqilla Marchiano

Radhika Athallah Januarsha

Nabilla Uzmasophia Raihanna

KATA PENGANTAR

Dengan penuh rasa syukur, penulis menyampaikan terima kasih atas segala berkat, kesempatan, dan dukungan yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan naskah tesis dengan judul " Pengaruh Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) dan Aloe Vera (*Aloe barbadensis*) terhadap Kadar TNF- α dan Glutathione (GSH) (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Model Luka Bakar Derajat II)" ini dengan baik.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M.H.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., S.H.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E., SUBSp.D.K.E., selaku pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan dukungan selama proses penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes., selaku pembimbing kedua yang telah

memberikan banyak masukan, saran, dan waktu dalam proses penyusunan ini.

6. Prof. Dr. Dra. Atina Husaana, M.Si., Apt., selaku Penguji I, atas segala waktu, perhatian, dan masukan yang berharga dalam proses penyelesaian penelitian ini.
7. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes, selaku Penguji II, yang telah memberikan pengetahuan, saran, dan bimbingan yang sangat membantu dalam memperbaiki kualitas karya ilmiah ini.
8. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS, selaku Penguji III, yang telah memberikan kritik konstruktif dan wawasan mendalam yang memperkaya penelitian ini.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang atas ilmu, arahan, dan semangat yang diberikan selama masa perkuliahan.
10. Staf administrasi Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang atas bantuan dan dukungan administrasi.
11. Serta semua pihak yang telah memberikan bantuan, baik secara langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang.

Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang biomedik.

Semarang, 27 Agustus 2025

Penulis,



Nurul Hasanah



ABSTRAK

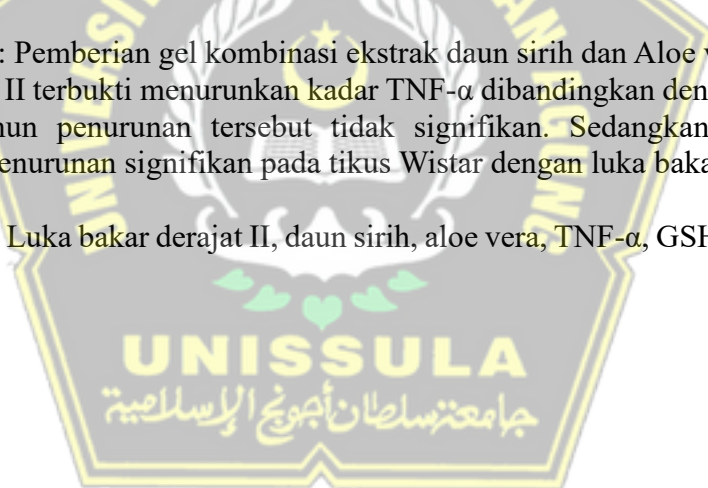
Latar Belakang: Luka bakar derajat II memerlukan penanganan yang tepat. Terapi topikal dengan kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera dapat mempercepat penyembuhan luka dengan menurunkan TNF- α dan meningkatkan kadar glutathione (GSH). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas terapi kombinasi tersebut dalam mempercepat penyembuhan luka bakar derajat II.

Metode: Metode penelitian ini menggunakan *post-test only control group design* dengan objek penelitian tikus jantan galur Wistar. Sebanyak 20 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok: K1 (base gel), K2 (gel daun sirih 20%), K3 (gel Aloe vera 3%), dan K4 (kombinasi gel daun sirih 10% + Aloe vera 1,5%). Luka bakar derajat II diinduksi dan diberi perlakuan topikal sekali sehari selama 6 hari. Pengukuran TNF- α dan GSH dilakukan pada hari ke-7 setelah perlakuan.

Hasil: Kelompok gel kombinasi ekstrak daun sirih dan Aloe vera menghasilkan kadar TNF- α terendah, yaitu $89,15 \pm 27,12$ ng/L. Namun, penurunan kadar ini tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,494$). Kelompok gel kombinasi ekstrak daun sirih dan Aloe vera juga menghasilkan kadar GSH terendah sebesar $109,50 \pm 25,71$ mg/L yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol ($p<0,001$).

Kesimpulan: Pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan Aloe vera pada luka bakar derajat II terbukti menurunkan kadar TNF- α dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun penurunan tersebut tidak signifikan. Sedangkan, kadar GSH mengalami penurunan signifikan pada tikus Wistar dengan luka bakar derajat II.

Kata Kunci: Luka bakar derajat II, daun sirih, aloe vera, TNF- α , GSH, antioksidan.



ABSTRACT

Background: Second-degree burns require proper management. Topical therapy using a combination of betel leaf extract (*Piper betle*) and Aloe vera can accelerate wound healing by reducing TNF- α and increasing glutathione (GSH) levels. This study aims to evaluate the effectiveness of this combination therapy in accelerating second-degree burn healing.

Methods: This study used a post-test only control group design with male Wistar strain rats as subjects. A total of 20 rats were divided into 4 groups: K1 (base gel), K2 (20% betel leaf gel), K3 (3% Aloe vera gel), and K4 (10% betel leaf gel + 1.5% Aloe vera gel combination). Second-degree burns were induced and treated topically once daily for 6 days. TNF- α and GSH levels were measured on day 7 after treatment.

Results: The combination gel of betel leaf extract and Aloe vera resulted in the lowest TNF- α level at 89.15 ± 27.12 ng/L. However, this reduction was not significant compared to the control group ($p=0.494$). The combination gel also resulted in the lowest GSH level at 109.50 ± 25.71 mg/L, which was significantly different from the control group ($p<0.001$).

Conclusion: The combination gel of betel leaf extract and Aloe vera for second-degree burns reduced TNF- α levels compared to the control group, but the reduction was not significant. Meanwhile, the GSH level showed a significant decrease in Wistar rats with second-degree burns.

Keywords: Second-degree burn (II), betel leaf, Aloe vera, TNF- α , GSH, antioxidants.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. TNF- α	8
2.1.1. Mekanisme Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α).....	10
2.1.2. Faktor yang mempengaruhi TNF- α	13
2.1.3. Alat Ukur TNF- α	15
2.2. GSH.....	16
2.2.1. Mekanisme Aktivasi GSH pada kondisi tinggi ROS	19

2.3. Luka Bakar	20
2.4. Fase Penyembuhan Luka Bakar	23
2.4.1. Fase Hemostasis	24
2.4.2. Fase Inflamasi	25
2.4.3. Fase Proliferasi	26
2.4.4. Fase Remodelling	28
2.5. Daun Sirih (<i>Piper betle</i>)	28
2.5. Aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i>)	31
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	34
3.1. Kerangka Teori	34
3.2. Kerangka Konsep	37
3.3. Hipotesis Penelitian	38
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	39
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	40
4.2.1. Variable Penelitian	40
4.2.2. Definisi Operasional	42
4.3. Populasi dan Sampel	43
4.3.1. Populasi dan Sampel	43
4.3.2. Besar Sampel	44
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	45
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	45
4.4.1. Alat	45
4.4.2. Bahan	46
4.5. Prosedur Penelitian dan Alur Kerja	47
4.5.1. Perolehan Ethical Clearance	47
4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Daun Sirih dan Aloe Vera	47
4.5.3. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Daun Sirih dan Aloe Vera	48
4.5.4. Penetapan Dosis	50
4.5.5. Cara Persiapan Sebelum Perlakuan	50
4.5.6. Cara Pemberian Luka Bakar Derajat II	51

4.5.7. Pemberian Perlakuan Gel.....	52
4.6. Alur Penelitian.....	59
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian	60
4.8. Analisis Data	61
BAB V.....	62
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	62
5.1. Hasil Penelitian	62
5.1.1. Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Serum Darah	63
5.1.2. Hasil Pemeriksaan Kadar GSH pada Serum Darah	66
5.1.3. Gambaran Makroskopis pada Luka Eksisi Antar Kelompok.....	70
5.2. Pembahasan.....	74
BAB VI	85
KESIMPULAN DAN SARAN.....	85
6.1 Kesimpulan	85
6.2 Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA.....	87
LAMPIRAN.....	94



DAFTAR SINGKATAN

AE	Aloe-Emodin
Akt	Protein Kinase B
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine Aminotransferase
AP-1	Activator Protein-1
AST	Aspartate Aminotransferase
ATP	Adenosine Triphosphate
BSS	Balanced Salt Solution
BPOM	Badan Pengawas Obat dan Makanan
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8+	Cluster of Differentiation 8
CMC	Carboxymethylcellulose
COA	Certificate of Analysis
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Disulfide
GST	Glutathione S-Transferase

HMGB1	High Mobility Group Box 1
IKK	I κ B Kinase
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IRAK4	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4
LD50	Lethal Dose 50%
LDH	Lactate Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehyde
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSDS	Material Safety Data Sheet
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Reduced Form)
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NO	Nitric Oxide
OD	Optical Density
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PRRs	Pattern Recognition Receptors

PXR	Peroxioredoxin
RA	Rheumatoid Arthritis
RBC	Red Blood Cell
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SCF	Stem Cell Factor
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxide Dismutase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
TLR	Toll-Like Receptor
TLR-4	Toll-Like Receptor 4
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
UV-Vis	Ultraviolet–Visible Spectrophotometry

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran hubungan proses penyembuhan luka dan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) Superoksida ini memainkan peran penting dalam menghancurkan patogen dan mengendalikan respons inflamasi ²⁸	18
Gambar 2.2 GSH (A) dan GSSG (B) ²⁶	18
Gambar 2.3 Peningkatan oksidan (ROS) dan penurunan GSH ³²	20
Gambar 2.4 Klasifikasi luka bakar ³⁶	21
Gambar 2.5 Ringkasan sel-sel imun dan regeneratif utama yang terlibat dalam penyembuhan luka bakar pada berbagai tahap penyembuhan	28
Gambar 2.6 Daun Sirih ⁴³	30
Gambar 2.7 Phytochemical Daun sirih (<i>Piper betle</i>) ⁴⁵	31
Gambar 2.8 Aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i>) ⁴⁷	32
Gambar 2.9 Phytochemical Aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i>) ⁴⁸	33
Gambar 3.1 Kerangka Teori	37
Gambar 3.2 Kerangka Konsep	37
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian	39
Gambar 4.2 Alur Penelitian	59
Gambar 5.1 Diagram Batang Kadar GSH	69
Gambar 5.2 Gambaran Makroskopis Hari ke-0 (H0) dan Gambaran Makroskopis Luka Bakar II pada Hari ke-7 (H7) Antar Kelompok Perlakuan (K1: Luka Bakar + Base Gel; K2: Luka Bakar + Gel Daun Sirih 20%; K3: Luka Bakar + Gel Aloe Vera 3%; K4: Luka Bakar + Gel Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%	71

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	6
Tabel 5.1 Uji Deskriptif Rata-rata Kadar TNF- α dan One Way ANOVA	644
Tabel 5.2 Uji Deskriptif Rata-rata Kadar GSH dan Uji One-Way ANOVA	66
Tabel 5.3 Hasil Uji Post Hoc Tukey HSD setelah Perlakuan terhadap Rata-rata Kadar GSH	68



DAFTAR LAMPIRAN

1. CoA Ekstrak Daun Sirih (<i>Piper betle</i>)	94
2. MSDS Ekstrak Daun Sirih (<i>Piper betle</i>).....	95
3. CoA Ekstrak Aloe Vera (<i>Aloe barbadensis</i>).....	97
4. MSDS Ekstrak Aloe Vera (<i>Aloe barbadensis</i>)	98
5. CoA Gel Daun Sirih 20%.....	100
6. MSDS Gel Daun Sirih 20%	101
7. CoA Gel Aloe Vera 3%	102
8. MSDS Gel Aloe Vera 3%.....	103
9. CoA Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%.....	104
10. MSDS Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%	105
11. <i>Ethical Clearance</i>	106
12. Surat Keterangan Hewan.....	107
13. Surat Izin Penelitian	109
14. Surat Keterangan Hasil ELISA TNF- α dan GSH.....	110
15. Hasil SPSS	111

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka bakar derajat II merupakan salah satu jenis luka yang mencakup kerusakan hingga lapisan dermis dalam, dan secara klinis membutuhkan perhatian serius karena potensi infeksi, kehilangan cairan, dan inflamasi berkepanjangan. Proses penyembuhan luka pada kondisi ini sangat penting untuk dilakukan secara efektif, guna mempercepat regenerasi jaringan dan mengurangi inflamasi sistemik yang berlebihan. Inflamasi yang berlebihan dapat menghambat proses penyembuhan dan menyebabkan kerusakan jaringan tambahan.

Salah satu penanda utama dalam respons inflamasi adalah peningkatan sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), yang berperan dalam aktivasi sel imun dan reaksi oksidatif¹. Selain itu, *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terbentuk selama proses inflamasi dapat memperburuk cedera jaringan dengan merusak DNA, protein, dan lipid seluler. Sistem antioksidan endogen tubuh, seperti glutathione (GSH), berperan untuk menetralkan ROS, namun pada kondisi luka bakar, kadar GSH cenderung menurun, yang memperburuk kerusakan jaringan dan memperlambat proses penyembuhan².

Upaya untuk mengatasi tantangan tersebut diperlukan terapi topikal berbasis bahan alami yang memiliki sifat antiinflamasi dan antioksidan. Ekstrak daun sirih (*Piper betle*) diketahui memiliki efek antimikroba,

antiinflamasi, dan antioksidan yang kuat serta mampu menghambat produksi TNF- α secara signifikan³. Senyawa aktif seperti eugenol dan flavonoid dalam daun sirih berperan dalam menekan kadar sitokin proinflamasi dan mempercepat pembentukan jaringan baru pada luka bakar⁴. Sementara itu, *Aloe vera* juga dikenal luas dalam praktik penyembuhan luka karena kandungan polisakarida dan glikoproteinnya yang mampu menstimulasi proliferasi fibroblas, meningkatkan sintesis kolagen, serta meningkatkan kadar GSH dengan menginduksi aktivitas enzim antioksidan endogen^{5,6}.

Kombinasi ekstrak *Piper betle* dan *Aloe vera* diyakini mampu memberikan efek sinergis dalam mempercepat penyembuhan luka melalui mekanisme penghambatan TNF- α dan peningkatan kadar GSH, sehingga memperbaiki keseimbangan antara proses inflamasi dan antioksidan. Studi terbaru menunjukkan bahwa terapi kombinasi ini secara signifikan menurunkan tingkat sitokin proinflamasi dan meningkatkan kapasitas antioksidan dalam model hewan luka bakar, serta berkontribusi terhadap percepatan regenerasi jaringan dan penutupan luka^{7,8}. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera secara topikal terhadap kadar TNF- α dan glutathione (GSH) pada luka bakar derajat II pada tikus Wistar.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan aloe vera (*Aloe barbadensis*) secara topikal mampu menurunkan kadar TNF-

α dan meningkatkan kadar Glutathione (GSH) pada tikus Wistar dengan luka bakar derajat II?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera secara topikal terhadap kadar TNF- α dan glutathione (GSH) pada luka bakar derajat II pada tikus Wistar secara *in vivo*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk:

1. Mengukur kadar TNF- α pada luka bakar derajat II pada tikus Wistar setelah pemberian gel kombinasi daun sirih dan aloe vera menggunakan metode ELISA.
2. Mengukur kadar glutathione (GSH) pada luka bakar derajat II setelah pemberian gel kombinasi menggunakan metode ELISA.
3. Membandingkan kadar TNF- α dan GSH antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis dan kelompok dosis.
4. Menganalisis efektivitas gel kombinasi dalam menurunkan inflamasi (TNF- α) dan meningkatkan kapasitas antioksidan (GSH) sebagai indikator percepatan penyembuhan luka.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memperdalam pemahaman tentang peran antioksidan dari ekstrak Daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*), khususnya dalam mengatasi stres oksidatif dan peradangan pada luka. Dengan meneliti efek kombinasi kedua bahan ini terhadap kadar TNF- α dan glutathione (GSH), penelitian ini memperkaya wawasan tentang mekanisme antioksidan herbal dalam terapi luka bakar derajat II.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini digunakan sebagai dasar ilmiah untuk pengembangan produk topikal berbasis bahan alam yang aman, efektif, dan terjangkau sebagai terapi tambahan dalam manajemen luka bakar. Gel kombinasi ini berpotensi dikembangkan sebagai produk fitoterapi untuk meningkatkan regenerasi jaringan dan mencegah komplikasi inflamasi serta stres oksidatif pada luka bakar.

1.5. Originalitas Penelitian

Penelitian sebelumnya yang mendalami penyembuhan luka menggunakan ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) telah banyak dilakukan, namun sebagian besar meneliti efek masing-masing ekstrak secara terpisah. Sejumlah studi sebelumnya telah meneliti efek penyembuhan luka dari ekstrak daun sirih secara individual, seperti yang dilakukan oleh Darmawan et al. (2021) dalam kajian sistematisnya, yang menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih 3% dapat menurunkan kadar IL-1 β secara signifikan pada

hari ke-3 penyembuhan luka melalui mekanisme antiinflamasi dan peningkatan kolagenisasi serta angiogenesis. Studi lain oleh Suharto et al. (2021) menggunakan desain true experimental dengan tikus putih dan menemukan bahwa dosis 20% ekstrak daun sirih merupakan yang paling efektif dalam mempercepat penutupan luka insisi secara signifikan ($p = 0,000$). Selain itu, penelitian oleh Budiman et al. (2018) menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak daun sirih dan Aloe vera dalam formulasi gel dapat meningkatkan regenerasi jaringan, mengurangi eritema dan edema, serta mempercepat perbaikan jaringan luka bakar. Namun, penelitian tersebut hanya mengevaluasi parameter makroskopik penyembuhan luka tanpa melihat mekanisme molekuler, seperti regulasi sitokin inflamasi atau kapasitas antioksidan.

Berbeda dari penelitian sebelumnya, studi ini berfokus pada peran biokimiawi dan imunologis dalam penyembuhan luka, dengan menilai kadar TNF- α sebagai indikator utama inflamasi serta GSH sebagai biomarker aktivitas antioksidan dalam jaringan luka. Penelitian ini juga menggunakan desain eksperimental in vivo dengan metode post-test only control group, yang memberikan keunggulan dalam mengukur perubahan kadar biomarker spesifik setelah pemberian perlakuan. Dalam konteks luka bakar atau luka inflamasi kronis, peningkatan kadar TNF- α sering dikaitkan dengan kerusakan jaringan lebih lanjut, perpanjangan fase inflamasi, dan penurunan kapasitas penyembuhan, sementara peningkatan kadar GSH berperan dalam menetralkan stres oksidatif dan mendukung regenerasi jaringan yang lebih optimal. Oleh karena itu, kombinasi ekstrak daun sirih dan Aloe vera diharapkan mampu

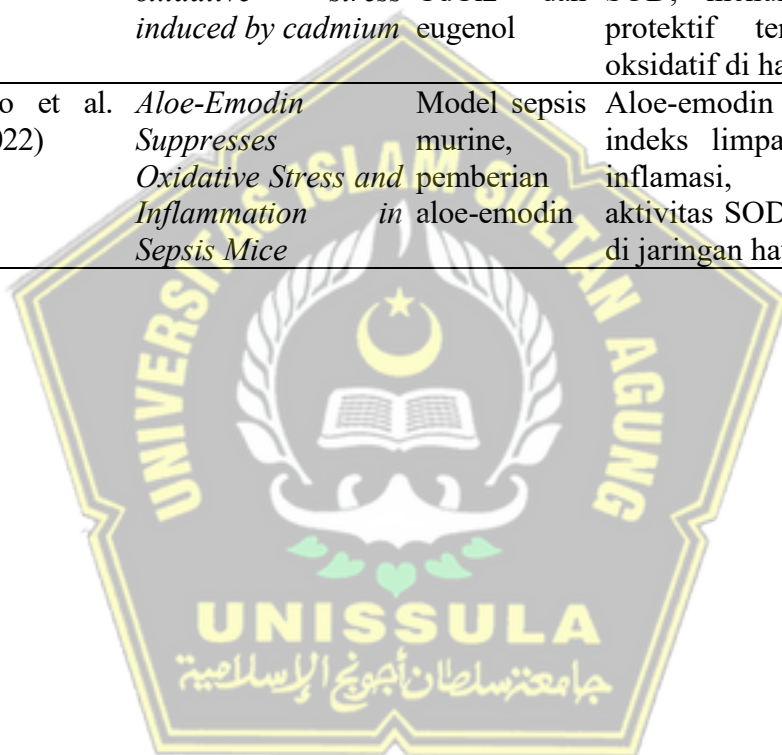
menyeimbangkan proses inflamasi dan antioksidatif, sehingga mempercepat pemulihan luka secara lebih efektif dibandingkan dengan penggunaan ekstrak tunggal.

Dengan demikian, penelitian ini menawarkan perspektif baru dalam strategi terapi luka melalui pendekatan kombinasi agen fitoterapi yang bekerja secara sinergis dalam menekan inflamasi dan meningkatkan kapasitas antioksidan jaringan, yang belum banyak dijelaskan dalam studi terdahulu. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar bagi pengembangan terapi topikal berbasis herbal yang lebih efektif dalam mempercepat proses penyembuhan luka serta mencegah komplikasi inflamasi yang berkepanjangan.

Tabel Error! Use the Home tab to apply 0 to the text that you want to appear here.1 Originalitas Penelitian

No.	Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
1	Darmawan et al. (2021)	<i>Betel Leaf Extract Efficacy on Wound Healing: A Systematic Review</i>	Review sistematis, uji A IL-1 β dan SOD	Ekstrak daun sirih 3% menurunkan kadar IL-1 β secara signifikan ($p < 0,002$), meningkatkan pembuluh darah dan kolagen, serta aktivitas SOD. ⁹
2	Suharto et al. (2021)	<i>Betel Leaf Extract's Effect on The Healing Process of Incision Wounds in Rats</i>	Eksperimen pada tikus, uji Kruskal-Wallis	Dosis 20% paling efektif mempercepat penyembuhan luka insisi ($p = 0,000$), menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok. ¹⁰
3	Budiman et al.	<i>Wound-healing test of Piper betle and Aloe vera in gel preparation</i>	Formulasi gel Piper betle 3% dan Aloe vera 2%	Gel kombinasi mempercepat regenerasi kulit, mengurangi inflamasi, dan mempercepat perbaikan jaringan luka bakar. ¹¹
4	Aliahmat et al. (2012)	<i>Antioxidant enzyme activity and MDA levels modulated by Piper betle in aging</i>	Studi in vivo pada tikus C57BL/6	Piper betle meningkatkan aktivitas katalase, glutathione peroksidase (GPx), dan SOD pada

	<i>mice</i>	kelompok tikus muda hingga tua. ¹²
5 Erna et al. (2022)	<i>The Effect of Aloe Vera Topical Gel Extraction on TGF-β1 Expression in luka bakar tikus</i>	Pemberian Aloe vera, model luka bakar tikus Aloe vera dosis tinggi (40%) meningkatkan kadar TGF- β 1 secara signifikan, mendukung angiogenesis dan percepatan penyembuhan luka. ¹³
6 Kumar et al. (2021)	<i>Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium</i>	In vivo, tikus jantan, paparan CdCl ₂ dan eugenol Eugenol menurunkan TNF- α , IL-6, NO, serta meningkatkan kadar GSH, SOD; menunjukkan efek protektif terhadap stres oksidatif di hati. ¹⁴
7 Gao et al. (2022)	<i>Aloe-Emodin Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in Sepsis Mice</i>	Model sepsis murine, pemberian aloe-emodin Aloe-emodin menurunkan indeks limpa dan sitokin inflamasi, meningkatkan aktivitas SOD dan GSH-Px di jaringan hati. ¹⁵



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TNF- α

TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) adalah sitokin pro-inflamasi yang sangat penting dalam respons imun tubuh terhadap berbagai jenis cedera, termasuk infeksi, trauma, dan peradangan. TNF- α terutama diproduksi oleh makrofag, tetapi juga dapat dihasilkan oleh beberapa jenis sel lainnya, seperti limfosit T, sel NK (*Natural Killer*), neutrofil, mastosit, serta beberapa sel non-imun seperti sel endotel dan fibroblas. Sitokin pro-inflamasi adalah molekul pensinyalan yang berperan penting dalam regulasi respons imun dan inflamasi tubuh. Sitokin ini memainkan peran utama dalam memediasi respons terhadap patogen, cedera, dan penyakit inflamasi kronis, termasuk rheumatoid arthritis dan psoriasis. Interleukin-1 beta (IL-1 β), *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α), dan Interleukin-6 (IL-6) merupakan beberapa sitokin pro-inflamasi utama yang bertanggung jawab dalam berbagai proses inflamasi melalui pengaktifan jalur pensinyalan yang kompleks, yang mengarah pada aktivasi sel imun dan amplifikasi respon inflamasi ¹⁶.

Sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , TNF- α , dan IL-6, dalam pengobatan berbagai kondisi inflamasi kronis dan penyakit terkait, termasuk kanker dan rheumatoid arthritis (RA). Sitokin-sitokin ini diketahui memicu kaskade inflamasi yang berkontribusi pada kerusakan jaringan dan memperburuk penyakit ¹⁷. Penelitian terbaru di tahun 2024 mengungkapkan pentingnya

pengendalian sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , TNF- α , dan IL-6 dalam proses penyembuhan luka bakar. Sitokin ini, yang dilepaskan sebagai respons terhadap cedera, memainkan peran sentral dalam memicu fase inflamasi awal, yang sangat penting untuk membersihkan jaringan dari patogen dan memulai penyembuhan. Pada luka bakar parah, peningkatan kadar IL-1 β dan TNF- α terbukti memperburuk peradangan dengan merangsang inflammasom pada makrofag dan menginduksi kerusakan jaringan. Penelitian menunjukkan bahwa pengendalian sitokin dapat mengurangi kadar sitokin pro-inflamasi, meningkatkan proliferasi sel fibroblast, serta mempercepat fase proliferaatif dalam penyembuhan luka.

Sitokin pro-inflamasi yang dikendalikan pada luka bakar tidak hanya mengurangi komplikasi seperti infeksi dan jaringan parut, tetapi juga mempercepat proses regenerasi jaringan. Pendekatan ini sangat menjanjikan sebagai bagian dari terapi modern yang lebih efektif untuk manajemen luka bakar yang kompleks.

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) adalah salah satu sitokin pro-inflamasi utama yang memainkan peran penting dalam respon imun tubuh terhadap infeksi dan peradangan. Diproduksi terutama oleh makrofag dan sel-sel imun lainnya, TNF- α memiliki kemampuan untuk memicu kaskade inflamasi yang sangat kuat melalui aktivasi berbagai jalur sinyal seperti NF- κ B dan JAK/STAT. TNF- α berfungsi dengan merangsang produksi sitokin pro-inflamasi lainnya, menginduksi kematian sel apoptosis, serta meningkatkan permeabilitas pembuluh darah ¹⁷.

Aktivasi dan produksi TNF- α merupakan proses yang kompleks, dimulai dari pengenalan molekul patogen atau sinyal kerusakan seluler oleh reseptor pengenalan pola (*Pattern Recognition Receptors* atau PRRs). Molekul patogen seperti PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) dan molekul kerusakan seluler atau DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), termasuk HMGB1, asam urat, dan ATP ekstraseluler, terdeteksi oleh reseptor seperti TLRs (*Toll-like Receptors*) yang memicu serangkaian jalur pensinyalan intraseluler¹⁸.

Jalur pensinyalan yang penting dalam produksi TNF- α melibatkan aktivasi NF- κ B dan MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Setelah TLR mengenali DAMPs atau PAMPs, adaptor molekul seperti MyD88 diaktifkan, memulai kaskade pensinyalan yang melibatkan aktivasi kinase seperti IRAK4 dan TRAF6, yang kemudian mengarah pada aktivasi IKK kompleks dan pelepasan NF- κ B ke nukleus. NF- κ B menginduksi transkripsi gen TNF- α , sedangkan MAPK mengaktifkan faktor transkripsi seperti AP-1, yang juga berkontribusi pada kadar TNF- α ^{18,19}.

2.1.1. Mekanisme Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)

Mekanisme *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) melibatkan pengaktifan serangkaian jalur pensinyalan molekuler yang berfungsi untuk memediasi berbagai respons inflamasi dan imun tubuh. TNF- α adalah sitokin pro-inflamasi utama yang diproduksi oleh makrofag dan sel imun lainnya sebagai respons terhadap infeksi, cedera, atau rangsangan inflamasi lainnya

1. **Inisiasi Respon Inflamasi:** Setelah terjadinya luka bakar, sel-sel imun seperti makrofag dan monosit di area cedera segera mengeluarkan TNF- α . TNF- α berfungsi sebagai mediator utama yang memulai kaskade inflamasi dengan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan merekrut neutrofil serta leukosit lainnya ke lokasi cedera. Proses ini penting untuk membersihkan jaringan dari patogen dan debris seluler.
2. **Aktivasi Jalur Sinyal Seluler:** *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) berikatan dengan reseptor spesifiknya, yaitu TNFR1 dan TNFR2, yang terdapat pada permukaan sel target. Ikatan tersebut memicu aktivasi jalur sinyal intraseluler, seperti NF- κ B dan MAPK. Aktivasi NF- κ B kemudian merangsang ekspresi gen proinflamasi, misalnya IL-1 β dan IL-6, sehingga memperkuat respons inflamasi serta memperluas efek biologis TNF- α .
3. **Induksi Apoptosis dan Nekrosis:** TNF- α dapat memicu kematian sel terprogram (apoptosis) atau kematian sel tidak terprogram (nekrosis) pada sel-sel yang rusak akibat luka bakar. Mekanisme ini melibatkan aktivasi protein caspase dan faktor-faktor lain yang menyebabkan degradasi DNA dan protein seluler. Sementara apoptosis membantu menghilangkan sel-sel yang tidak dapat diperbaiki, nekrosis dapat memperparah inflamasi karena pelepasan DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns).

4. Pengaruh pada Jaringan Sekitar dan Sistemik: TNF- α tidak hanya mempengaruhi area luka bakar tetapi juga dapat memasuki sirkulasi sistemik, terutama pada luka bakar yang luas. Peningkatan kadar TNF- α dalam sirkulasi dapat memicu terjadinya *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), yang ditandai dengan gejala demam, takikardia, serta hipotensi. Keadaan ini berpotensi menimbulkan komplikasi berat, termasuk kegagalan multiorgan.
5. Modulasi Proses Penyembuhan Luka: Meskipun TNF- α penting dalam fase inflamasi awal, kadar yang berlebihan atau durasi inflamasi yang terlalu lama dapat menghambat proses penyembuhan. TNF- α dapat mengganggu proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen, yang esensial dalam fase proliferasi dan remodeling. Oleh karena itu, regulasi kadar TNF- α menjadi fokus penting dalam terapi luka bakar untuk meningkatkan penyembuhan dan mengurangi jaringan parut .

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) memainkan peran penting dalam mekanisme penyembuhan luka bakar melalui pengaturan respon inflamasi awal yang sangat diperlukan untuk membersihkan jaringan yang rusak dan memulai proses regenerasi. TNF- α diproduksi oleh sel imun seperti makrofag dan monosit di lokasi cedera, dan bertindak sebagai mediator yang mengaktifkan

kaskade pensinyalan inflamasi di area luka bakar (Summer et al., 2024).

2.1.2. Faktor yang mempengaruhi TNF- α

Kadar normal TNF- α dalam tubuh bervariasi tergantung pada kondisi fisiologis dan kesehatan individu. Secara umum, pada individu sehat, kadar TNF- α dalam serum atau plasma biasanya sangat rendah, dengan kisaran antara 0-8 pg/mL. Namun, dalam kondisi inflamasi akut atau kronis, kadar ini dapat meningkat secara signifikan. Peningkatan kadar TNF- α sering terlihat pada penyakit inflamasi seperti rheumatoid arthritis, infeksi bakteri, serta luka bakar luas ²⁰.

1. Respon Imun dan Infeksi: TNF- α dilepaskan oleh makrofag, monosit, dan sel T sebagai bagian dari respon imun tubuh terhadap patogen. Pada infeksi, kadar TNF- α dapat meningkat untuk membantu melawan mikroorganisme. Sitokin ini berfungsi meningkatkan permeabilitas pembuluh darah serta merekrut sel imun ke lokasi infeksi. Pada kondisi sepsis atau infeksi sistemik, kadar TNF- α dapat meningkat tajam dan berperan dalam memicu terjadinya *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)*²¹.
2. Usia dan Kondisi Kesehatan: Faktor usia dan kondisi kesehatan juga mempengaruhi kadar TNF- α dalam tubuh. Pada kelompok lanjut usia, kadar TNF- α biasanya lebih tinggi dibandingkan individu yang lebih muda, karena respons imun bersifat lebih kronis dan kurang efektif dalam mengendalikan peradangan. Selain itu, kondisi seperti

diabetes, obesitas, dan penyakit autoimun berhubungan dengan peningkatan kadar TNF- α yang berkepanjangan, yang dapat memperburuk peradangan kronis dan memicu komplikasi kesehatan lainnya ²⁰.

3. Faktor Genetik: Variasi dalam gen TNF juga mempengaruhi kadar TNF- α yang diproduksi oleh tubuh. Polimorfisme genetik pada promotor gen TNF dapat meningkatkan kadar TNF- α , yang dapat membuat individu lebih rentan terhadap penyakit inflamasi seperti rheumatoid arthritis dan penyakit Crohn. Beberapa individu memiliki varian gen yang menyebabkan over-produksi TNF- α , sehingga meningkatkan risiko inflamasi yang berlebihan ²⁰.
4. Faktor Lingkungan dan Gaya Hidup: Selain faktor genetik, gaya hidup seperti kebiasaan merokok, konsumsi makanan tinggi lemak, dan stres dapat meningkatkan kadar TNF- α dalam tubuh. Penelitian menunjukkan bahwa pola makan tidak sehat serta gaya hidup sedentari berkontribusi pada peningkatan peradangan sistemik, yang kemudian memicu produksi TNF- α dan sitokin proinflamasi lainnya. Sebaliknya, aktivitas fisik teratur dan pola makan kaya antioksidan terbukti mampu menurunkan kadar TNF- α ²⁰.
5. Pengaruh Terapi Medis: Pengobatan tertentu, seperti penggunaan penghambat TNF- α (misalnya, etanercept atau infliximab), secara signifikan menurunkan kadar TNF- α pada pasien dengan penyakit inflamasi kronis. Terapi ini telah berhasil mengurangi gejala pada

pasien dengan rheumatoid arthritis, penyakit Crohn, dan psoriasis dengan menghalangi efek TNF- α berlebih. Pengobatan ini secara efektif mengontrol kadar TNF- α agar tetap dalam batas normal, sehingga mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut akibat inflamasi²⁰.

2.1.3. Alat Ukur TNF- α

Pengukuran TNF- α dalam konteks penelitian ilmiah dan medis biasanya dilakukan menggunakan teknik berbasis imunologi dan biomolekuler yang sangat presisi dan spesifik. Metode-metode ini dirancang untuk mendeteksi dan mengukur sitokin dengan sensitivitas tinggi dalam berbagai jenis sampel biologis seperti serum, plasma, atau sel yang ditumbuhkan dalam kultur²².

1. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk pengukuran kuantitatif TNF- α . ELISA melibatkan penggunaan antibodi yang sangat spesifik terhadap TNF- α untuk mendeteksi sitokin dalam sampel, memungkinkan analisis kuantitatif yang akurat. Keunggulan metode ini terletak pada sensitivitasnya yang tinggi serta kemampuannya untuk menganalisis banyak sampel sekaligus. Metode ini telah menjadi standar emas dalam studi klinis untuk mengevaluasi respons inflamasi²³.
2. *Multiplex Assay* memungkinkan pengukuran simultan beberapa jenis sitokin dalam satu sampel, termasuk TNF- α . Menggunakan

manik-manik berlabel fluoresen yang terikat pada antibodi spesifik, teknik ini memfasilitasi deteksi berbagai sitokin seperti IL-1 β dan IL-6 secara bersamaan, sehingga memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai profil inflamasi tubuh ²³.

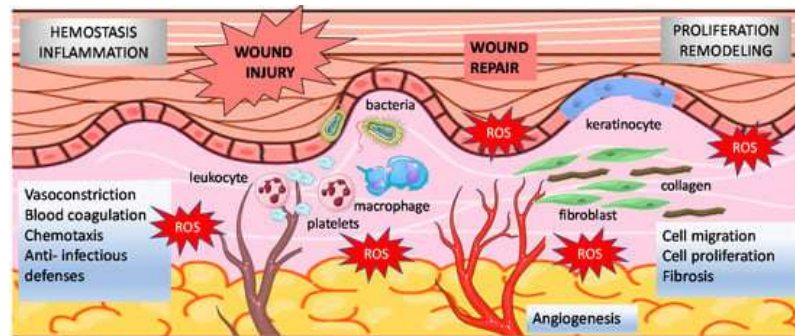
3. *Western Blotting* adalah teknik semi-kuantitatif yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur kadar protein TNF- α dalam jaringan atau sel. Protein diekstraksi, dipisahkan melalui elektroforesis, dan kemudian dideteksi menggunakan antibodi spesifik. Meskipun tidak sekuantitatif ELISA, teknik ini sangat bermanfaat untuk memastikan keberadaan dan bentuk molekuler TNF- α yang diekspresikan ²⁴.
4. *Quantitative Real-Time PCR* (RT-qPCR) digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi mRNA TNF- α , bukan protein langsungnya. Metode ini mendeteksi transkrip gen TNF- α dalam sel atau jaringan, memberikan wawasan tentang tingkat aktivitas genetik yang berkaitan dengan produksi sitokin ini. RT-qPCR sangat sensitif dalam mendeteksi perubahan ekspresi gen yang dapat terjadi akibat inflamasi atau cedera ²⁵.

2.2. GSH

Glutathione (GSH) adalah tripeptida universal yang terdiri dari L-gamma-Glutamyl Acid-L-Cysteinyl-glycine, ditemukan dalam konsentrasi milimolar di banyak kompartemen dan organel seluler, dan diproduksi di semua organ, terutama di hati. Glutathione ada dalam dua bentuk, yaitu bentuk tereduksi

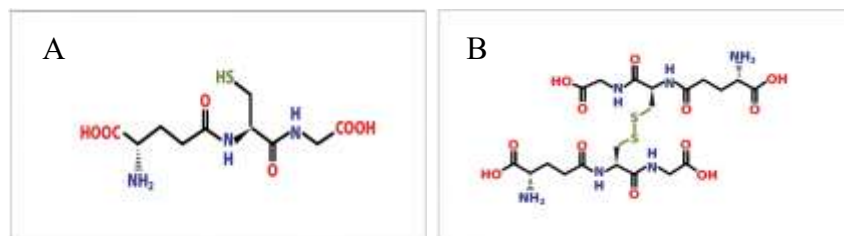
(GSH) dan bentuk teroksidasi (GSSG). Organ utama yang terlibat dalam homeostasis GSH meliputi hati, ginjal, paru-paru, dan otot rangka. Sel darah merah (RBC) juga menjadi sumber kaya antioksidan, termasuk GSH dan asam askorbat, untuk menyeimbangkan efek berbahaya yang potensial dari hemoglobin. Struktur GSH unik karena memiliki ikatan gamma-peptida, yang melibatkan rantai samping karbonil dari asam glutamat, sehingga membuatnya resisten terhadap peptidase. Gugus fungsional GSH adalah tiol dari residu sistein. Dalam jaringan, GSH terutama ditemukan dalam bentuk tereduksi, sementara sebagian kecilnya teroksidasi menjadi GSSG (disulfida GSH), dengan rasio normal GSH/GSSG sekitar 100:1. GSH yang teroksidasi terus-menerus diregenerasi oleh enzim GSSG reduktase menggunakan NADPH sebagai kofaktor²⁶.

Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan endogen untuk mengatasi efek berbahaya *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang secara alami dihasilkan dalam proses metabolisme seluler. Enzim-enzim seperti glutathione peroxidase (GPx) merupakan pertahanan utama dalam mencegah kerusakan oksidatif. SOD, yang terdiri dari tiga isoform (SOD1, SOD2, dan SOD3), berfungsi mengkatalis konversi radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sehingga mengurangi risiko kerusakan sel. Hidrogen peroksida yang terbentuk kemudian ditangani oleh enzim catalase atau GPx. GPx menggunakan glutathione (GSH) sebagai kofaktor untuk mendetoksifikasi hidrogen peroksida dan peroksida lipid, menjaga integritas membran sel dan organel seperti mitokondria²⁷.



Gambar 2.1 Gambaran hubungan proses penyembuhan luka dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) Superoksida ini memainkan peran penting dalam menghancurkan patogen dan mengendalikan respons inflamasi²⁸

Kombinasi aktivitas SOD dan GPx memainkan peran penting dalam mempertahankan keseimbangan redoks di dalam sel dan mencegah akumulasi ROS, yang dapat memicu stres oksidatif dan penyakit degeneratif. Dalam kondisi tertentu seperti luka bakar, aktivitas kedua enzim ini sangat penting untuk mengurangi kerusakan jaringan dan mendukung proses penyembuhan yang efektif. Penelitian terbaru menekankan pentingnya strategi terapi berbasis antioksidan untuk meningkatkan aktivitas SOD dan GPx, terutama dalam kondisi stres oksidatif yang parah. Penggunaan antioksidan eksogen bersama enzim ini dianggap dapat mempercepat pemulihan dan melindungi jaringan dari kerusakan lebih lanjut²⁹.



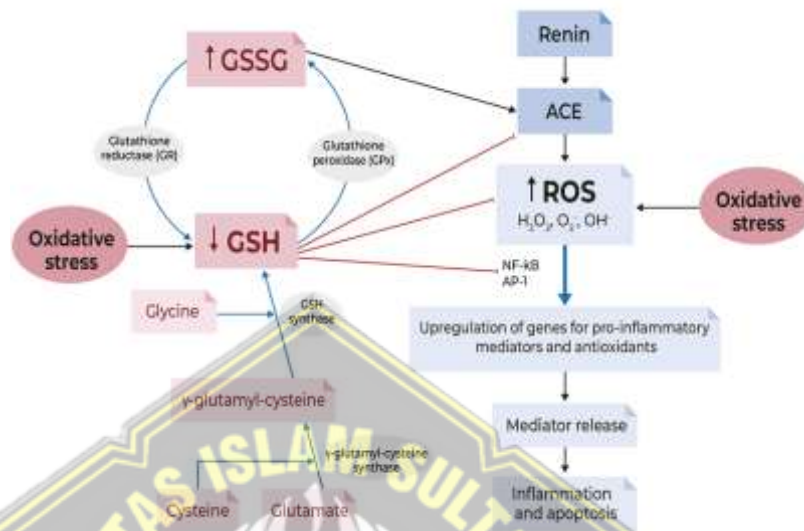
Gambar 2.2 GSH (A) dan GSSG (B)²⁶.

Dalam tubuh, GSH digunakan dalam berbagai proses, termasuk detoksifikasi ROS oleh GSH peroksidase (GPx) dan konjugasi kovalen dengan senyawa toksik melalui glutathione S-transferase (GST). Homeostasis GSH melibatkan sintesis, transportasi, dan pemanfaatan GSH, serta katabolisme dan regenerasinya. Enzim gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GT), yang terikat pada membran di hati dan saluran empedu, berperan penting dalam katabolisme GSH, melepaskan dipeptida sisteinil-glisin yang kemudian dipecah oleh peptidase normal³⁰.

2.2.1. Mekanisme Aktivasi GSH pada kondisi tinggi ROS

Rasio GSH/GSSG merupakan penentu penting potensi redoks suatu sel. GSH secara langsung menetralkan berbagai oksidan seluler, termasuk superoksida anion, radikal hidroksil, oksida nitrat, dan radikal karbon. Selain itu, melalui aksi enzim GSH peroksidase (GPX) dan peroksiredoksin (PXR), GSH secara katalitik mendetoksifikasi hidroperoksida, peroksinitrit, dan peroksida lipid. Akumulasi GSSG akibat stres oksidatif bersifat toksik bagi sel, memicu apoptosis melalui aktivasi jalur SAPK/MAPK. Kadar GSH dalam inti sel memiliki peran dalam mengatur proliferasi sel, memengaruhi aktivitas telomerase dan fungsi histon melalui kontrol epigenetik. Oleh karena itu, glutathione memiliki posisi unik, tidak hanya memberikan perlindungan seluler terhadap stres oksidatif dan xenobiotik, tetapi juga secara langsung mengatur aktivitas seluler, termasuk

pengendalian siklus sel dan induksi apoptosis pada sel yang rusak parah²⁶³¹.

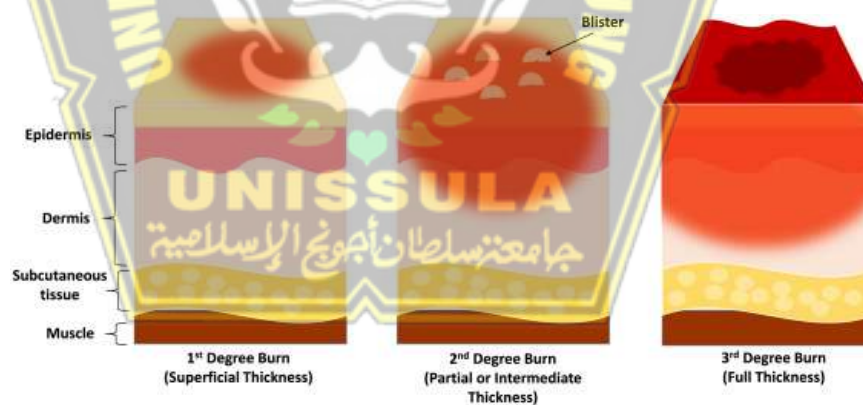


Gambar 2.3 Peningkatan oksidan (ROS) dan penurunan GSH³².

2.3. Luka Bakar

Luka bakar merupakan cedera akibat paparan panas yang menyebabkan kerusakan jaringan kulit, baik secara lokal maupun sistemik, tergantung pada luas dan kedalaman cedera. Kondisi ini menjadi tantangan klinis karena melibatkan proses inflamasi yang kompleks, stres oksidatif, serta risiko infeksi yang tinggi. Penyembuhan luka bakar berlangsung melalui tiga fase utama, yaitu fase inflamasi, proliferasi, dan remodelling, yang terjadi secara berurutan namun saling tumpang tindih⁶. Pada fase awal, respon imun mengaktifasi pelepasan berbagai mediator proinflamasi, termasuk sitokin seperti TNF- α , yang menjadi penanda utama terjadinya inflamasi akut dan modulator penting dalam proses penyembuhan luka⁷.

Luka bakar dibagi menjadi beberapa tingkatan berdasarkan kedalaman kerusakannya. Luka bakar derajat I hanya mengenai epidermis dan ditandai dengan eritema, nyeri, tanpa lepuh, serta sembuh cepat tanpa jaringan parut, umumnya disebabkan oleh sinar matahari atau kontak singkat dengan panas³³. Luka bakar derajat II mencakup epidermis dan sebagian dermis, dan terbagi menjadi superfisial parsial yang menimbulkan lepuh, kemerahan, dan nyeri, serta dalam parsial yang melibatkan dermis lebih dalam, tampak pucat atau merah tua, dengan risiko parut lebih tinggi³⁴. Luka bakar derajat III atau luka bakar tebal penuh (*full-thickness*) melibatkan kerusakan seluruh epidermis dan dermis, bahkan hingga jaringan subkutan, sering tampak putih atau hitam, tidak nyeri akibat rusaknya ujung saraf, dan membutuhkan penanganan medis seperti eksisi dan cangkok kulit³⁵.



Gambar 2.4 Klasifikasi luka bakar³⁶

Pada luka bakar derajat II, terjadi kerusakan jaringan yang signifikan yang menyebabkan pelepasan mediator inflamasi, termasuk peningkatan produksi sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α). TNF- α berperan penting dalam memediasi respons inflamasi akut dengan

meningkatkan permeabilitas vaskuler, merekrut sel imun ke area cedera, serta merangsang produksi sitokin lain yang memperparah peradangan dan kerusakan jaringan.

Luka bakar derajat II secara spesifik merusak lapisan epidermis dan sebagian besar dermis retikular, menyebabkan luka yang dalam, nyeri hebat, dan sering kali membutuhkan waktu penyembuhan lebih dari 21 hari. Luka ini ditandai dengan pembentukan lepuh, eksudat cairan, serta hipersensitivitas karena ujung saraf masih utuh sebagian. Selain itu, fase inflamasi pada luka bakar derajat II cenderung lebih lama dibandingkan luka bakar superfisial, yang menyebabkan peningkatan kadar TNF- α dalam jaringan yang terluka. TNF- α berperan dalam meningkatkan permeabilitas vaskular, menarik leukosit ke lokasi luka, serta memicu pelepasan ROS (*Reactive Oxygen Species*) secara berlebihan⁸.

Peningkatan ROS dalam jaringan luka akan mengganggu keseimbangan redoks seluler dan memperparah kerusakan jaringan melalui peroksidasi lipid, denaturasi protein, serta kerusakan DNA. Salah satu mekanisme proteksi tubuh terhadap ROS adalah keberadaan sistem antioksidan endogen, seperti glutathione (GSH). GSH berfungsi sebagai scavenger utama ROS dan terlibat dalam detoksifikasi serta perbaikan kerusakan oksidatif pada jaringan. Namun, pada luka bakar, terutama derajat II, terjadi penurunan kadar GSH akibat stres oksidatif yang berlebihan, yang pada akhirnya menghambat proses regenerasi jaringan dan memperlambat penyembuhan luka³⁷.

Penggunaan agen topikal berbasis tanaman mulai banyak diteliti dalam upaya menyeimbangkan kondisi proinflamasi dan stres oksidatif. Ekstrak tanaman seperti daun sirih (*Piper betle*) dan *Aloe vera* menunjukkan potensi farmakologis yang mendukung pemulihan luka melalui modulasi TNF- α dan peningkatan kadar GSH. Kedua bahan ini dilaporkan mampu menurunkan kadar sitokin proinflamasi serta meningkatkan kadar enzim antioksidan seperti glutathione peroksidase, sehingga mendukung perbaikan jaringan kulit yang rusak^{1,3}.

2.4. Fase Penyembuhan Luka Bakar

Luka bakar derajat II merupakan jenis luka bakar dalam parsial (*deep partial-thickness*) yang mempengaruhi lapisan dermis retikular secara signifikan. Pembentukan blister (lepuhan) merupakan hal yang umum terjadi dan lepuhan ini biasanya masih utuh saat pertama kali dievaluasi. Setelah lepuhan dibuka, dasar luka yang terlihat umumnya berwarna bercak-bercak (*mottled*) dan akan memucat secara lambat saat diberi tekanan, mencerminkan kompromi vaskularisasi pada lapisan dermis dalam. Luka bakar derajat IIb biasanya menimbulkan sensasi nyeri ringan atau nyeri hanya saat diberi tekanan, karena sebagian ujung saraf telah rusak. Penyembuhan dapat terjadi tanpa intervensi bedah, namun berlangsung lebih lama dibanding luka derajat IIa, yakni hingga 3 minggu atau lebih, dan sering kali meninggalkan jaringan parut yang jelas.

Luka bakar dengan ketebalan parsial yang dalam melibatkan lapisan dermis retikular yang lebih dalam. Sama seperti luka bakar superfisial dengan

ketebalan parsial, luka bakar jenis ini juga dapat menunjukkan lepuhan yang masih utuh. Setelah lepuhan tersebut diangkat, dasar luka tampak berbercak (*mottled*) dan memucat perlahan ketika diberi tekanan. Pada jenis luka bakar ini, rasa nyeri umumnya ringan dan muncul terutama saat mendapat tekanan yang dalam. Luka dapat sembuh tanpa pembedahan, tetapi prosesnya lebih lama dan pembentukan jaringan parut hampir tidak terhindarkan. Penyembuhan luka bakar derajat II merupakan rangkaian proses fisiologis yang kompleks dan berlangsung dalam empat fase yang berurutan namun saling tumpang tindih: hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodelling. Setiap fase memiliki karakteristik serta mekanisme penting untuk memulihkan jaringan dan mengembalikan fungsi kulit yang terdampak. Berikut adalah uraian lebih rinci mengenai patomekanisme penyembuhan luka bakar derajat II ^{38,39}.

2.4.1. Fase Hemostasis

Fase hemostasis terjadi pada waktu beberapa jam setelah cedera, yaitu fase pertama yang dimulai segera setelah terjadinya luka bakar. Pada luka bakar derajat 2, yang biasanya melibatkan epidermis dan sebagian dermis, tubuh segera berusaha untuk mengontrol perdarahan dan mencegah kehilangan cairan tubuh. Proses hemostasis dimulai segera setelah terjadinya cedera dan berperan penting dalam menghentikan perdarahan serta memulai proses penyembuhan. Tahap pertama dalam hemostasis adalah vasokonstriksi, di mana pembuluh darah yang rusak akan menyempit untuk mengurangi aliran darah dan mengontrol perdarahan. Selanjutnya, platelet atau trombosit akan

teraktivasi dan berkumpul di lokasi cedera, membentuk trombus atau gumpalan darah yang menutup luka, sehingga perdarahan dapat dihentikan. Selain itu, trombosit ini juga melepaskan berbagai faktor pertumbuhan, seperti platelet-derived growth factor (PDGF), yang merangsang migrasi dan proliferasi sel-sel yang terlibat dalam penyembuhan, termasuk fibroblas dan sel-sel epitel. Proses hemostasis ini berlangsung dalam beberapa jam pertama setelah cedera dan menjadi langkah awal yang krusial dalam memulai fase inflamasi, yang diperlukan untuk pemulihan jaringan lebih lanjut.³⁸

2.4.2. Fase Inflamasi

Fase inflamasi dimulai segera setelah hemostasis, 1-3 hari setelah cedera dan bertujuan untuk membersihkan luka dari kuman, debris seluler, dan jaringan mati, serta untuk memulai perbaikan jaringan. Pada luka bakar derajat 2, inflamasi berlangsung dalam waktu 1–3 hari dan melibatkan berbagai jenis sel imun³⁸. Salah satu mediator utama yang dilepaskan selama fase ini adalah Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). TNF- α diproduksi secara cepat sebagai respons terhadap kerusakan jaringan, infeksi, atau keberadaan debris seluler. Sel-sel yang paling berperan dalam sintesis TNF- α adalah makrofag, neutrofil, dan keratinosit yang teraktivasi. Sintesis TNF- α dimediasi melalui aktivasi reseptor pola pengenalan (Pattern Recognition Receptors/PRRs) seperti TLRs (Toll-Like Receptors), yang menginduksi aktivasi jalur transkripsi NF- κ B. Aktivasi NF- κ B

kemudian meningkatkan kadar gen TNF- α , yang menghasilkan sekresi protein sitokin ini ke lingkungan luka. TNF- α memiliki peran kunci dalam memperkuat respon inflamasi, meningkatkan permeabilitas vaskuler, memicu ekspresi molekul adhesi sel endotel, dan merekrut lebih banyak leukosit ke lokasi cedera.

Pada luka bakar derajat II, peningkatan kadar TNF- α tercatat mulai terjadi dalam beberapa jam setelah trauma dan mencapai puncaknya sekitar hari ke-1 hingga hari ke-3 pasca-cedera. Konsentrasi TNF- α yang tinggi pada periode ini penting untuk inisiasi fase inflamasi akut, namun kadar yang berlebih atau perpanjangan fase ini dapat memperburuk kerusakan jaringan dan memperlambat transisi ke fase proliferasi. Oleh karena itu, pemilihan waktu pemeriksaan kadar TNF- α secara optimal dilakukan pada hari ke-3 setelah luka bakar, saat TNF- α berada dalam fase puncak, untuk mendapatkan gambaran yang representatif terhadap tingkat inflamasi yang terjadi. Penurunan kadar TNF- α setelah intervensi akan menjadi indikator keberhasilan terapi dalam menekan inflamasi dan mempercepat penyembuhan luka ⁴⁰.

2.4.3. Fase Proliferasi

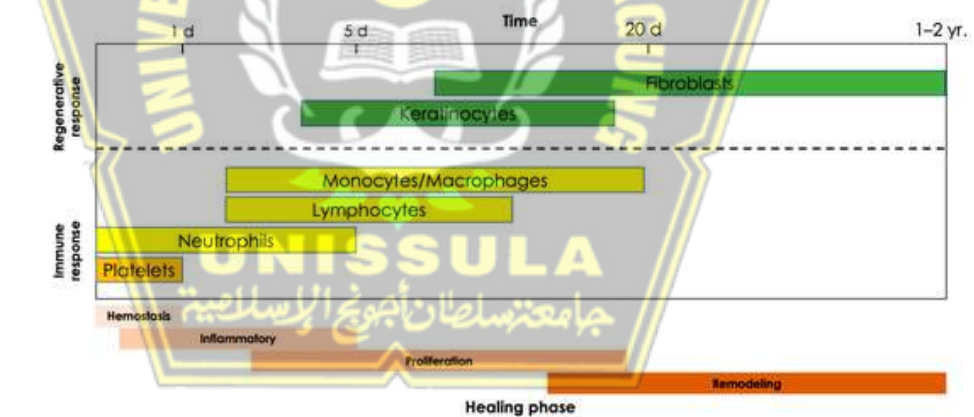
Pada fase proliferasi, tubuh mulai membangun kembali jaringan yang hilang dengan pembentukan jaringan granulasi yang kaya akan fibroblas, pembuluh darah baru (angiogenesis), dan kolagen. Fase ini bertujuan untuk menggantikan jaringan yang rusak dengan jaringan

yang baru dan fungsional. Fase proliferasi dalam penyembuhan luka melibatkan serangkaian proses yang mendukung pembentukan jaringan baru dan pemulihan struktur kulit. Salah satu faktor penting dalam fase ini adalah peran antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione (GSH). SOD, sebagai enzim yang berfungsi mengkonversi superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, memainkan peran kunci dalam mengurangi stres oksidatif pada area luka. Stres oksidatif yang terkontrol dengan baik memungkinkan lingkungan yang lebih stabil untuk regenerasi jaringan. Selain itu, glutathione (GSH), yang merupakan antioksidan utama dalam tubuh, berperan dalam melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif dan mendukung fungsi normal fibroblas serta keratinosit selama proses penyembuhan. Proses migrasi keratinosit juga berperan penting, di mana sel-sel keratinosit dari tepi luka bergerak untuk membentuk lapisan epitel baru yang menutupi permukaan luka. Selama fase ini, fibroblas dalam jaringan granulasi mulai mensintesis kolagen, terutama kolagen tipe III, yang membentuk dasar matriks ekstraseluler, memberikan kekuatan dan struktur pada jaringan yang sedang dipulihkan. Jaringan granulasi yang terbentuk merupakan jaringan baru yang kaya akan pembuluh darah, fibroblas, dan kolagen tipe III. Jaringan ini mengisi dasar luka dan mendukung pembentukan epitel baru, yang akhirnya menutup permukaan luka. Dengan demikian, SOD dan GSH berperan penting dalam mengatur keseimbangan oksidatif selama fase proliferasi, memastikan bahwa

proses regenerasi jaringan berjalan dengan efektif dan aman.^{38,41}. Fase proliferasi berlangsung sekitar 4 hingga 21 hari setelah cedera, tergantung pada ukuran dan kedalaman luka bakar.

2.4.4. Fase Remodelling

Fase remodelling adalah tahap akhir dalam proses penyembuhan luka bakar, yang dapat berlangsung hingga satu tahun atau lebih. Pada tahap ini, jaringan yang terbentuk selama fase proliferasi mengalami pematangan sehingga menjadi lebih kuat dan elastis. Meskipun kolagen tipe I menggantikan kolagen tipe III yang awalnya terbentuk, jaringan parut yang terbentuk sering kali tidak memiliki kekuatan dan elastisitas yang setara dengan kulit asli³⁹.



Gambar 2.5 Ringkasan sel-sel imun dan regeneratif utama yang terlibat dalam penyembuhan luka bakar pada berbagai tahap penyembuhan

2.5. Daun Sirih (*Piper betle*)

Daun sirih (*Piper betle* L.), tanaman herbal dari keluarga Piperaceae, sangat populer di Indonesia dan beberapa negara Asia lainnya karena manfaatnya untuk kesehatan. Tanaman ini telah menjadi komponen penting

dari pengobatan tradisional dan kebudayaan etnis di berbagai daerah Indonesia. Menurut beberapa penelitian ilmiah, daun sirih mengandung sejumlah senyawa bioaktif yang memiliki efek farmakologis yang baik. Fenol, seperti hidroksikavikol, yang memiliki sifat antioksidan dan antimikroba; eugenol, yang merupakan analgesik dan antiseptik alami; dan flavonoid, tanin, dan saponin, yang berfungsi sebagai antioksidan, antijamur, dan memperkuat sistem kekebalan tubuh.

Studi lebih lanjut juga mengungkapkan bahwa komunitas di berbagai wilayah Indonesia, seperti Sumatra, Jawa, Kalimantan, dan Papua, memiliki cara khusus dalam menggunakan daun sirih untuk kebutuhan kesehatan. Di Papua dan Sulawesi, misalnya, daun sirih sering digunakan sebagai obat alami untuk mengatasi infeksi dan luka, termasuk peradangan kulit. Pemanfaatan ini mencerminkan sinergi antara praktik kesehatan tradisional dan pengetahuan ilmiah modern, membuka peluang bagi pengembangan produk farmasi dan kosmetik berbasis bahan alami⁴².



Gambar 2.6 Daun Sirih⁴³

Klasifikasi Daun Sirih (*Piper betle*) :

Kingdom : *Plantae*

Clade : *Tracheophytes*

Clade : *Angiosperms*

Clade : *Magnoliids*

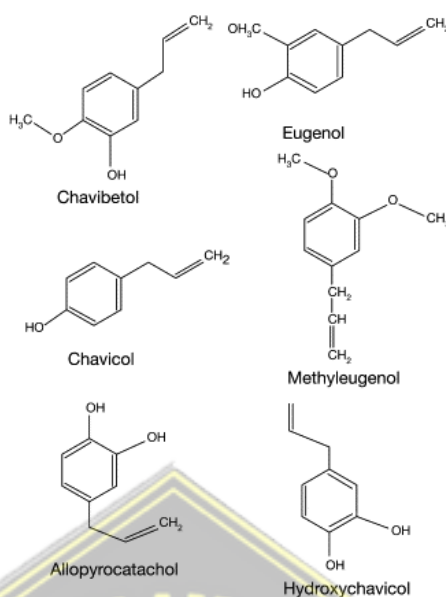
Order : *Piperales*

Family : *Piperaceae*

Genus : *Piper*

Species : *P. betle*

Komponen utama minyak atsiri daun sirih meliputi safrole (48.7%), chavibetol acetate (12.5%), allylpyrocate choldiacetate (34.0%), p-cymene, 4-terpinol, eugenol, dan β -caryophyllene. Sesquiterpenes, cadinene, caryophyllene, safrole (52.7%), eugenyl acetate (5.8%), allylpyrocatecholdiacetate (15.4%), dan eugenol (6.4%)⁴⁴.



Gambar 2.7 Phytochemical Daun sirih (*Piper betle*)⁴⁵

2.5. Aloe vera (*Aloe barbadensis*)

Di Indonesia, aloe vera telah lama digunakan sebagai tanaman obat, terutama dalam perawatan kulit, gangguan pencernaan, dan pengobatan luka bakar. Berdasarkan penelitian, aloe vera mengandung sejumlah senyawa bioaktif seperti acemannan, aloe-emodin, aloin, flavonoid, dan saponin, yang masing-masing memiliki sifat anti-inflamasi, antibakteri, dan penyembuhan luka. Oleh karena itu, sangat populer digunakan dalam produk kosmetik. Pemulihan luka pada kulit dan perbaikan fungsi pencernaan, berkat sifat anti-inflamasi dan regeneratifnya, adalah beberapa manfaat utamanya⁴⁶.

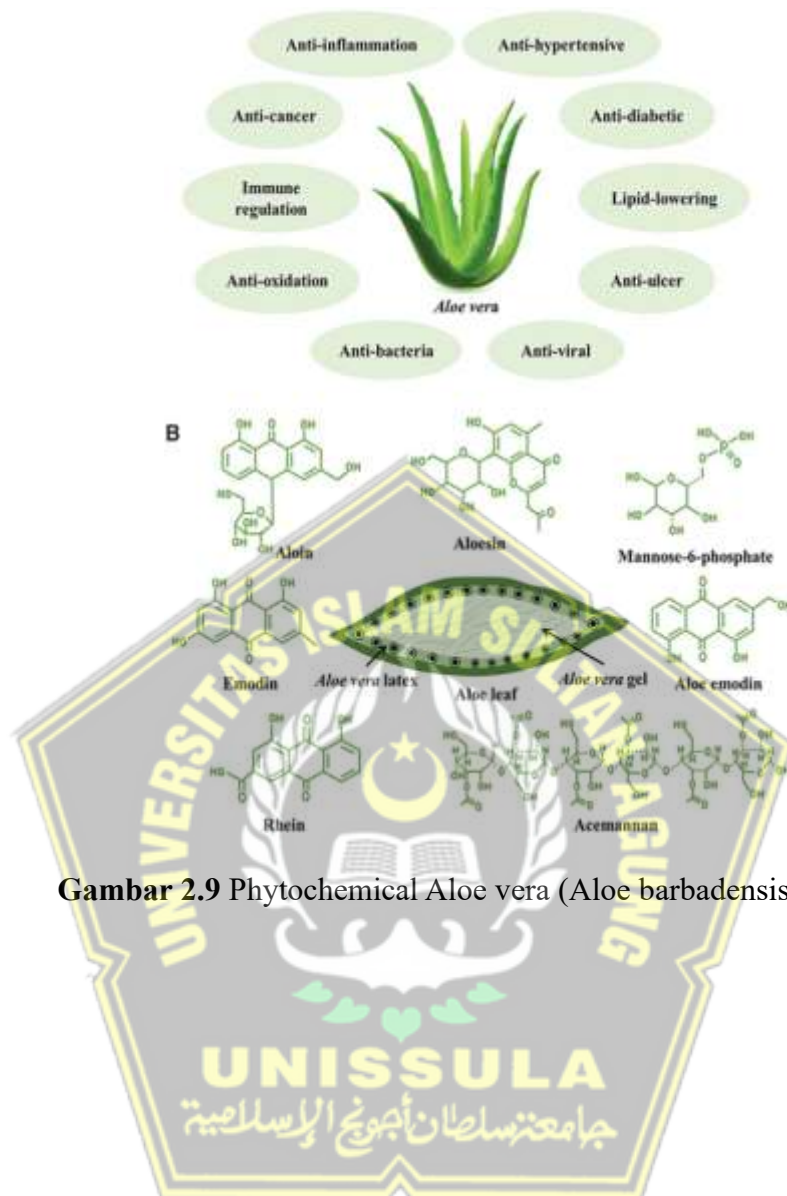


Gambar 2.8 Aloe vera (*Aloe barbadensis*)⁴⁷

Klasifikasi Aloe vera (*Aloe barbadensis*),

Kingdom : *Plantae*
Clade : *Tracheophytes*
Clade : *Angiosperms*
Clade : *Monocotyledons*
Order : *Asparagus*
Family : *Asphodelaceae*
Genus : *Aloe*
Species : *A. vera*

Lebih dari 75 jenis senyawa dapat ditemukan dalam Aloe Vera. Ini termasuk mineral seperti kalsium, seng, tembaga, selenium, dan selenium, serta vitamin (A, C, E, dan B12). Selain itu, gula dapat berupa polisakarida (seperti glukomanan) atau monosakarida (seperti manosa-6-fosfat). Antrakuinon, seperti aloin dan emodin, yang berfungsi sebagai antiinflamasi dan antimikroba, dan asam lemak, seperti lupeol dan campesterol, adalah bahan aktif lainnya. Tanaman ini juga menghasilkan senyawa bioaktif seperti saponin, asam salisilat, dan lignin, serta hormon seperti auksin dan giberelin⁴⁶.



Gambar 2.9 Phytochemical Aloe vera (*Aloe barbadensis*)⁴⁸

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Penyembuhan luka merupakan proses kompleks yang berlangsung secara bertahap melalui beberapa fase berurutan, yaitu: (1) Fase hemostasis, (2) Fase inflamasi, (3) Fase proliferasi, dan (4) Fase maturasi dan remodeling. Pada luka bakar derajat II, yang melibatkan kerusakan epidermis dan sebagian dermis, proses penyembuhan luka dimulai dengan fase hemostasis. Trombosit segera berkumpul di area luka untuk membentuk trombus dan menutup pembuluh darah yang rusak, mengurangi perdarahan awal. Setelah hemostasis, dimulailah fase inflamasi, di mana neutrofil dan makrofag bermigrasi ke area luka.

Luka bakar derajat II menyebabkan kerusakan jaringan yang signifikan dan memicu pelepasan molekul *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) dari sel yang rusak. Molekul DAMPs dikenali oleh reseptor TLR-4 pada permukaan sel imun, seperti makrofag dan neutrofil, yang kemudian mengaktifasi jalur pensinyalan inflamasi, termasuk jalur NF- κ B dan MAPK. Aktivasi jalur ini menyebabkan peningkatan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , yang memperburuk respons inflamasi dan memperlambat proses penyembuhan luka.⁴⁹

Neutrofil dan makrofag yang teraktivasi juga memicu ekspresi kompleks enzim NADPH oksidase, yang menghasilkan radikal bebas (*Reactive Oxygen Species*, ROS). ROS dalam jumlah tinggi menyebabkan stres oksidatif,

memperburuk kerusakan jaringan, dan menghambat regenerasi sel.⁵⁰ ROS juga menurunkan kadar antioksidan endogen seperti glutathione (GSH), yang berfungsi sebagai penyeimbang redoks dan pelindung sel dari kerusakan oksidatif. Proses ini cenderung mempertahankan makrofag dalam fenotipe proinflamasi M1, yang ditandai dengan ekspresi mTOR dan produksi sitokin proinflamasi⁵¹.

Penurunan kadar ROS dan peningkatan GSH berperan dalam polarisasi makrofag M1 ke M2, yaitu transisi dari fenotipe proinflamasi menjadi antiinflamasi. Makrofag M2 mempercepat penyembuhan luka melalui sekresi faktor pertumbuhan dan mediasi imun yang lebih tenang.

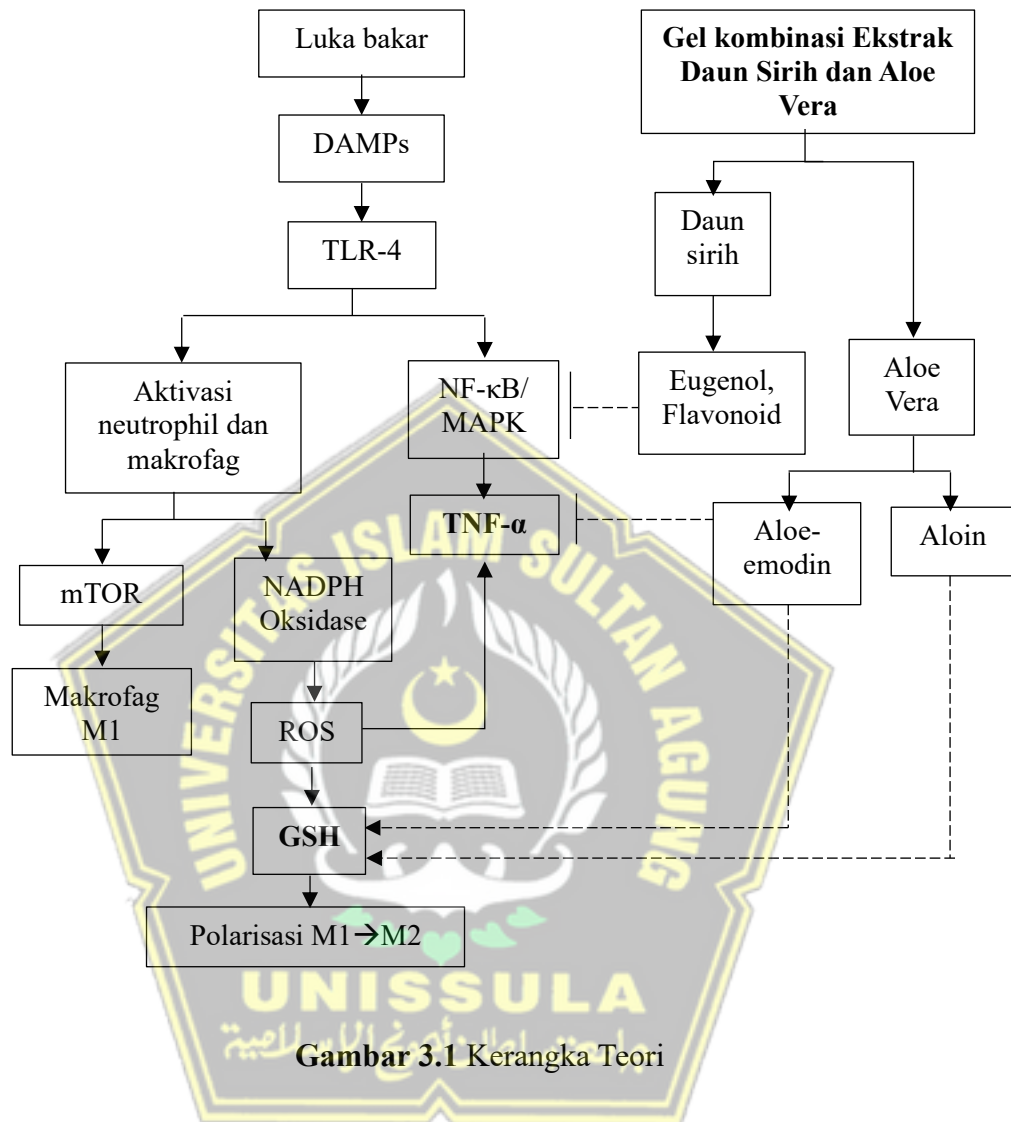
Gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) berperan penting dalam menghambat mekanisme inflamasi tersebut. Daun sirih mengandung senyawa aktif seperti eugenol dan flavonoid yang diketahui mampu menekan kadar NF- κ B, MAPK, serta menurunkan kadar TNF- α , sekaligus meningkatkan aktivitas antioksidan endogen melalui modulasi GSH.^{12,52} Flavonoid juga dapat menekan produksi ROS dan menghambat jalur NADPH oksidase, serta menghambat aktivasi mTOR yang mempertahankan makrofag dalam fenotipe M1.

Sementara itu, Aloe vera mengandung senyawa seperti aloemodin dan aloin, yang berkontribusi pada penghambatan peradangan dan peningkatan regenerasi jaringan. Aloemodin bekerja dengan menghambat jalur NF- κ B serta menginduksi kadar antioksidan termasuk GSH, sehingga mampu menetralkan ROS.¹⁵ Aloe vera juga diketahui mampu menurunkan kadar

TNF- α dan mempercepat polarisasi makrofag ke M2, mendukung penyembuhan luka yang lebih cepat dan efektif.⁵³

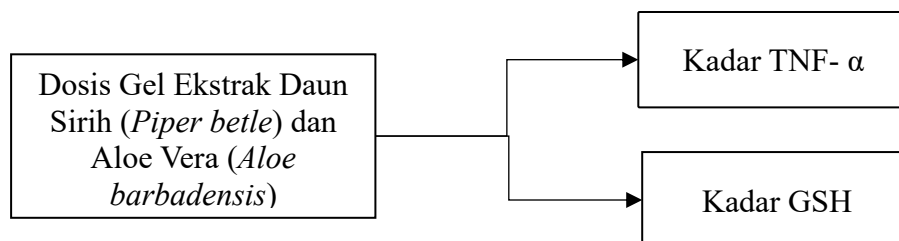
Kombinasi kedua ekstrak tersebut dalam bentuk gel topikal bekerja secara sinergis: menurunkan kadar TNF- α , meningkatkan kadar GSH, dan menghambat ROS, sehingga mendorong perubahan makrofag dari M1 ke M2, mempercepat penyembuhan luka bakar derajat II dan mengurangi risiko inflamasi kronik.





Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis Penelitian

Terdapat pengaruh pemberian kombinasi gel ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) pada kadar TNF- α dan Glutathione (GSH) pada luka bakar derajat II dibandingkan dengan kelompok kontrol

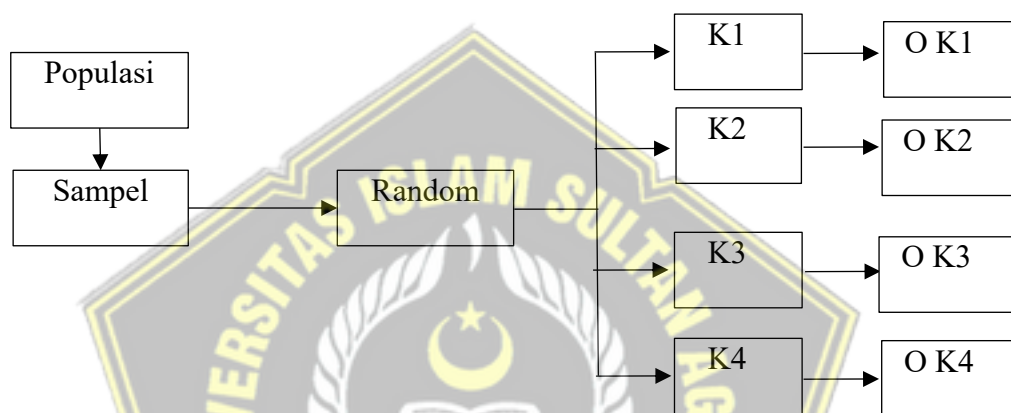


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang digunakan adalah metode *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan objek penelitian tikus jantan galur wistar.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- a. K1 : Kontrol Negatif secara topikal, yaitu tikus diberi paparan luka bakar dengan pemberian base gel.
- b. K2 : Tikus diberi pakan *standard* dan paparan luka bakar derajat II dan diberikan gel ekstrak daun sirih (*Piper betle*) 20% secara topikal.
- c. K3 : Tikus diberi pakan *standard* dan paparan luka bakar derajat II dan diberikan gel ekstrak Aloe vera (*Aloe barbadensis*) 3% secara topikal.
- d. K4 : Tikus diberi pakan *standard* dan paparan luka bakar derajat II dan diberikan gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) 10% dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) 1,5% secara topikal.

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variable Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis gel ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) dengan variasi dosis rendah, sedang dan tinggi.

a. Dosis Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*)

Konsentrasi efektif terendah dimulai pada dosis 3% dengan signifikansi peningkatan kadar IL- β , peningkatan waktu penyembuhan luka dibandingkan dengan Vaseline dan Bioplasenton⁵⁴, dan konsentrasi tertinggi efektif pada dosis 20% dalam pengujian efikasi penutupan luka sayatan pada tikus Wistar⁵⁵. Dosis letal (LD50) pada ekstrak daun sirih lebih tinggi dari 5000 mg/Kg berat badan⁵⁶. Uji toksisitas akut dan sub akut serta genotoksitas sudah dilakukan menggunakan ekstrak alkohol daun sirih pada tikus dan model sel, dan tidak ditemukan efek negatif yang merugikan. Daun sirih dinyatakan aman berdasarkan parameter hematotoksitas, hepatotoksitas, genotoksitas, berat organ, morfologi makroskopis, serta respons stres dan perilaku agresif pada tikus. Studi lain juga mengonfirmasi bahwa ekstrak etanol daun sirih tidak menunjukkan efek toksik terhadap fibroblas dermal normal manusia⁵⁶.

b. Dosis Ekstrak Aloe vera (*Aloe barbadensis*)

Konsentrasi merujuk pada penelitian dengan pengukuran kadar CD4 dan CD8+ Limfosit menggunakan cream Aloe vera 1% dan 2% pada tikus *sprague-Dawley* dengan menggunakan Madecassol sebagai pembanding⁵⁷. Cream 1% dan 2% Aloe vera mengaktifkan fase proliferasi dan angiogenesis secara maksimal pada hari ke-5, yang mengindikasikan percepatan proses penyembuhan.

- i. K2 : gel ekstrak daun sirih (*Piper betle*) 20%
- ii. K3 : gel ekstrak Aloe vera (*Aloe barbadensis*) 3%
- iii. K4 : gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) 10 % dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) 1,5%

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar TNF- α dan Glutathione (GSH).

4.2.1.3. Variabel Pra Kondisi

Variabel prakondisi dikontrol secara ketat untuk memastikan bahwa perbedaan kadar TNF- α dan GSH hanya dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan, bukan oleh faktor lain. Hal ini penting untuk menjaga validitas internal dan menghindari bias hasil eksperimen.

- a. Spesies dan strain hewan: Tikus Wistar jantan, umur dan berat standar.

- b. Derajat luka bakar: Luka bakar derajat II, diinduksi dengan metode standar logam panas.
- c. Durasi terapi: Lama pemberian gel 1x/hari selama 6 hari.
- d. Volume dan cara aplikasi gel: Gel dioleskan secara merata dengan volume yang sama di setiap kelompok.
- e. Kondisi lingkungan: Temperatur ruangan, sirkulasi udara, pencahayaan, dan akses makanan/minum dijaga konsisten.
- f. Metode pengukuran TNF- α dan GSH: Sama untuk semua kelompok, menggunakan metode ELISA dengan prosedur yang seragam.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*)

Gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) merupakan sediaan topikal berbentuk gel yang dibuat dari hasil ekstraksi daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) menggunakan pelarut air. Gel ini diberikan dalam dua formulasi, yaitu kombinasi daun sirih 10% dan Aloe vera 1,5%, serta sediaan tunggal sirih 20% dan Aloe vera 3% sebagai pembanding. Gel dioleskan topikal sebanyak 0,5 cc pada area luka bakar derajat II di punggung tikus Wistar jantan, satu kali sehari selama 6 hari berturut-turut.

Satuan : % konsentrasi ekstrak

Skala : Ordinal.

4.2.2.2. TNF- α

TNF- α merupakan sitokin proinflamasi utama yang dihasilkan oleh makrofag aktif dan terlibat dalam proses inflamasi akut pada jaringan luka. Pengukuran dilakukan pada hari ke-7 pascainduksi luka bakar dan perlakuan. Analisis dilakukan dengan alat *Human TNF- α Quantikine ELISA Kit*.

Satuan : pg/ml.

Skala : Rasio.

4.2.2.3. Glutathione (GSH)

GSH adalah antioksidan intraseluler utama yang berperan dalam netralisasi stres oksidatif akibat luka bakar. Sampel darah diambil dari area luka pada hari ke-7 setelah perlakuan. Kadar GSH dianalisis menggunakan metode ELISA.

Satuan : $\mu\text{mol/L}$

Skala : rasio.

4.3. Populasi dan Sampel

4.3.1. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian yaitu tikus jantan galur Wistar berumur 10-12 minggu, dengan berat 150-200 gram. Tikus dipelihara dengan pakan pellet yang terstandar dan air minum berupa air putih suhu ruangan pemeliharaan berkisar $28^{\circ} - 32^{\circ} \text{ C}$ dengan ventilasi dan ruangan yang cukup. Tikus kemudian dilakukan adaptasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.

4.3.1.1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus Wistar jantan dengan berat badan 150-200 gram.
- b. Tikus dalam kondisi sehat dan bebas dari penyakit kulit.
- c. Tikus memenuhi persyaratan sampel penelitian dan telah menjalani masa adaptasi selama 7 hari.
- d. Secara makroskopis tikus tidak ada kelainan morfologi

4.3.1.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang menunjukkan tanda-tanda penyakit selama masa adaptasi.
- b. Tikus yang menunjukkan gejala stress pada masa adaptasi di Laboratorium. Memiliki kelainan anatomis

4.3.1.3. Drop Out

- a. Tikus mati saat penelitian berlangsung
- b. Tikus yang menunjukkan tanda-tanda sakit selama masa penelitian.

4.3.2. Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan : n = Jumlah sampel

: t = Jumlah kelompok

Banyak Kelompok : 4 kelompok (t=4)

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

$$(n-1) \times (4-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 3 \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq (15+3)/3$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Frederer, ditetapkan bahwa jumlah minimal hewan percobaan yang diperlukan adalah 6 ekor tikus per kelompok. Penelitian ini terdiri atas empat kelompok perlakuan, dengan masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor tikus, sehingga total keseluruhan hewan percobaan yang digunakan berjumlah 24 ekor tikus Wistar.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan teknik *simple random sampling* dalam pengambilan sampel. Sebanyak 24 ekor tikus jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dibagi secara acak sederhana menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri atas 6 ekor. Satu kelompok sebagai kontrol, sedangkan tiga kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat

1. Microplate 96 sumur
2. Wash bottle / Microplate washer
3. Inkubator
4. Pipet otomatis

5. Reagen ELISA
6. Vortex mixer
7. Microcentrifuge
8. ELISA reader
9. Timer digital
10. Kandang tikus dengan tempat pakan (ukuran: panjang 40 cm, lebar 30 cm, tinggi 30 cm)
11. Timbangan tikus “Nigushi scale”
12. Sarung tangan
13. Pipet tetes
14. Tabung Eppendorf
15. Mikropipet
16. Alat pencukur
17. Sduit dan needle
18. Plat lingkaran stainless steel diameter 2 cm
19. Labu Erlenmeyer
20. Pemanas
21. Hot plate + stirrer
22. Termometer
23. Waterbath
24. Tabung reaksi

4.4.2. Bahan

1. Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*): diperoleh dari PT

Phytochemindo Reksa

2. Ekstrak Aloe Vera (*Aloe barbadensis*): diperoleh dari PT
Phytochemindo Reksa
3. Aquabides
4. ELISA analysis kit
5. Base gel
6. Alkohol swab 70%
7. Ketamin 10%
8. Reagen kit
9. Larutan buffer (Coating buffer, Washing buffer, Blocking buffer)
10. Substrat enzim/TMB (Tetramethylbenzidine)
11. Asam sulfat
12. PBS (Phosphate Buffer Saline)

4.5. Prosedur Penelitian dan Alur Kerja

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Protokol yang digunakan disusun berdasarkan prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), yang bertujuan untuk meminimalkan penderitaan hewan serta menjaga integritas ilmiah dan etika dari data yang dihasilkan.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Daun Sirih dan Aloe Vera

Sampel daun sirih segar (*Piper betle*) dan daun *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) masing-masing seberat 500 gram dicuci bersih, kemudian

dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga kadar airnya mencapai kurang dari 10%. Setelah proses pengeringan, bahan diklasifikasi ulang, dihaluskan menggunakan blender, dan disaring menggunakan ayakan 20 mesh untuk memperoleh serbuk simplisia yang seragam.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Serbuk simplisia direndam dalam pelarut selama tiga hari dengan pengadukan teratur tiga kali sehari. Setelah itu, larutan disaring, kemudian ampas dimaserasi kembali selama dua hari dengan tambahan etanol sebanyak 1500 mL. Proses ini diulang dua kali untuk memperoleh ekstrak secara maksimal. Selanjutnya, filtrat gabungan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental.

Untuk menjamin mutu dan konsistensi bahan aktif dalam penelitian ini, ekstrak *Piper betle* dan *Aloe barbadensis* juga diperoleh dari PT Phytochemindo Reksa, yang telah tersertifikasi dengan *Certificate of Analysis* (COA) dan *Material Safety Data Sheet* (MSDS). Penggunaan ekstrak bersertifikat ini dimaksudkan untuk memastikan kualitas, keamanan, serta stabilitas bahan aktif yang digunakan, sekaligus meningkatkan validitas hasil penelitian.

4.5.3. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Daun Sirih dan Aloe Vera

Pembuatan gel kombinasi ekstrak *Piper betle* dan *Aloe barbadensis* menggunakan Base Gel Cream dari PT Derma Elok Farma, yang telah memiliki *Certificate of Analysis* (COA) dan *Material Safety Data Sheet* (MSDS) untuk menjamin mutu, keamanan, dan kestabilan sediaan topikal.

Sediaan dasar gel tersebut memiliki karakteristik fisik berupa tekstur gel berwarna bening hingga putih pucat dengan aroma khas yang ringan, memiliki rentang pH antara 6,0–7,0, viskositas berkisar 33.000–43.000 cPs, dan densitas sekitar 0,95–1,01 g/mL. Produk ini telah mendapat nomor notifikasi dari BPOM (NA18200106292) dan diformulasikan khusus untuk kulit berminyak hingga mudah berjerawat, dengan kemampuan meresap cepat dan memberikan efek hidrasi ringan.

Komposisi base gel meliputi Aqua, Glycerin, Polyacrylamide, Trilaureth-4 Phosphate, C13-14 Isoparaffin, Phenoxyethanol, Laureth-7, serta Ethylhexylglycerin. Produk ini dirancang untuk memberikan hidrasi ringan, cepat meresap, dan cocok untuk formulasi kulit berminyak hingga acne-prone.

Tahapan formulasi sediaan gel dilakukan sebagai berikut:

1. Persiapan Gel Dasar: Gel cream dasar diaduk secara perlahan menggunakan spatula steril guna memastikan penyebaran komponen yang merata.
2. Penambahan Ekstrak Aktif: Ekstrak dari *Piper betle* dan *Aloe barbadensis*, yang diperoleh dari PT Phytochemindo Reksa dan telah memenuhi standar COA dan MSDS, ditimbang sesuai konsentrasi yang ditetapkan, kemudian secara bertahap dicampurkan ke dalam basis gel sambil dilakukan pengadukan untuk menjaga homogenitas.
3. Pencampuran dan Homogenisasi: Pencampuran dilakukan menggunakan teknik folding di dalam piala gelas memakai spatula *stainless steel* dalam kondisi aseptik. Jika diperlukan, dapat digunakan alat homogenizer

berkecepatan rendah untuk memastikan ekstrak aktif tersebar merata dalam seluruh sistem gel.

4. Penyesuaian pH dan Viskositas: Setelah pencampuran selesai, dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter digital dengan target rentang 5,5–6,5 untuk keamanan sediaan kulit. Jika pH tidak sesuai, penyesuaian dilakukan menggunakan larutan NaOH 0,1 N atau larutan asam sitrat 10%. Viskositas diukur menggunakan viskometer tipe Brookfield untuk menjamin stabilitas dan kenyamanan penggunaan.
5. Pengemasan dan Penyimpanan: Sediaan gel yang telah homogen dikemas dalam wadah tertutup steril, kemudian disimpan di tempat sejuk dan kering serta terlindung dari paparan cahaya langsung untuk mempertahankan stabilitas bahan aktif.

4.5.4. Penetapan Dosis

Dosis ditentukan berdasarkan hasil ekstraksi. Tikus diberi gel sebanyak 0,5 g pada area luka bakar derajat II setiap hari selama 6 hari.

4.5.5. Cara Persiapan Sebelum Perlakuan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2–3 bulan dengan berat badan 150–200 gram. Sebelum diberi perlakuan, seluruh hewan uji diaklimatisasi di laboratorium selama 7 hari. Tikus dipelihara dalam kondisi lingkungan dengan suhu ruangan yang dikontrol antara 28–32°C serta pencahayaan alami. Selama masa adaptasi dan percobaan, tikus diberi akses pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.

Sampel penelitian terdiri atas 24 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan dipilih dengan metode acak sederhana. Hewan uji tersebut dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing berjumlah enam ekor. Pembagian kelompok meliputi satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Seluruh tikus dipelihara dalam kandang berkelompok sesuai protokol dan dipastikan dalam kondisi sehat sebelum menerima perlakuan.

Pakan standar yang diberikan kepada hewan terdiri atas komposisi nutrisi seimbang, yaitu: protein sebesar 20–25%, karbohidrat (pati) 45–55%, lemak 10–12%, dan serat kasar sekitar 4%. Air minum yang diberikan adalah air putih bersih dengan jenis dan jumlah yang sama setiap hari untuk seluruh hewan uji.

4.5.6. Cara Pemberian Luka Bakar Derajat II

Proses induksi luka bakar derajat II dilakukan pada tikus Wistar jantan yang telah menjalani masa adaptasi selama 7 hari. Sebelum tindakan dilakukan, hewan uji diberikan anestesi melalui injeksi intraperitoneal menggunakan kombinasi ketamin (75 mg/kg berat badan) dan xylazine (10 mg/kg berat badan) untuk memastikan hewan tidak mengalami nyeri maupun pergerakan selama prosedur berlangsung.

Setelah dipastikan bahwa tikus dalam kondisi anestesi total, yaitu tidak memberikan respon terhadap rangsangan nyeri, area punggung (dorsal) dengan luas sekitar 5x5 cm dicukur bersih dan disterilkan menggunakan kapas alkohol 70%. Luka bakar derajat II diinduksi dengan

menempelkan logam silinder berdiameter ± 2 cm yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu minimal 80–100°C selama beberapa menit.

Logam panas tersebut ditempelkan secara perlahan pada kulit punggung tikus dengan tekanan ringan dan stabil selama 3–5 detik, tanpa dilakukan geseran atau tekanan berlebih. Perlakuan ini bertujuan untuk menimbulkan cedera termal yang mengenai lapisan epidermis hingga sebagian dermis, sesuai karakteristik luka bakar derajat II. Luka yang terbentuk ditandai dengan kemerahan, munculnya lepuhan (bula), dan kerusakan jaringan kulit bagian superfisial hingga dermis dalam.

4.5.7. Pemberian Perlakuan Gel

Sediaan gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan *Aloe barbadensis* diberikan secara topikal satu kali sehari selama 6 hari berturut-turut langsung pada area luka bakar derajat II. Aplikasi dilakukan menggunakan spatula plastik steril, dengan volume gel yang disesuaikan berdasarkan berat badan hewan uji dan luas luka yang diperkirakan sebesar $\pm 3,14$ cm², untuk memastikan penyebaran sediaan yang merata di seluruh permukaan luka.

Selama periode perlakuan, tikus diamati setiap hari untuk menganalisis progres penyembuhan luka, kondisi umum hewan, serta kemungkinan munculnya reaksi lokal seperti iritasi atau inflamasi. Kebersihan kandang dipelihara secara rutin, dan suhu ruangan dijaga tetap stabil dalam rentang fisiologis guna mendukung proses regenerasi jaringan.

Pada hari ke-7, seluruh tikus dianestesi dan dilakukan terminasi sesuai dengan pedoman etik penggunaan hewan laboratorium. Sampel darah diambil secara aseptik melalui pengambilan darah terminal dari vena kava/retroorbital. Darah ditampung dalam tabung tanpa antikoagulan, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh serum. Serum yang dihasilkan dipindahkan ke dalam *cryotube* steril dan disimpan pada suhu -20°C hingga waktu analisis. Selanjutnya, sampel dianalisis menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) untuk mengukur kadar biomarker TNF- α dan Glutathione (GSH) sesuai protokol kit yang digunakan.

4.5.7.1. Pengukuran Kadar GSH Menggunakan ELISA

Kadar Glutathione (GSH) ditentukan menggunakan metode ELISA melalui tahapan berikut:

1. Persiapan Sampel

Sampel darah yang digunakan untuk pengukuran kadar GSH dapat berupa darah utuh, serum, atau plasma. Sebelum digunakan, sampel darah harus disentrifugasi untuk memisahkan plasma atau serum, tergantung pada jenis pengukuran yang diinginkan. Setelah pemisahan, ambil volume yang sesuai dari plasma atau serum untuk diuji dan pipet ke dalam sumur mikroplate yang telah disiapkan.

2. Persiapan Kit ELISA

Gunakan kit ELISA yang sesuai untuk pengukuran GSH. Kit ini biasanya sudah dilengkapi dengan reagen yang diperlukan. Pastikan untuk mengikuti petunjuk dari produsen kit dalam menyiapkan reagen dan bahan lainnya.

3. Penambahan Sampel ke Mikroplate

Tambahkan sampel ke dalam sumur mikroplate sesuai dengan volume yang telah ditentukan. Inkubasi sampel pada suhu dan waktu yang disarankan oleh petunjuk penggunaan kit. Selama inkubasi, GSH dalam sampel akan berikatan dengan antibodi yang terikat pada permukaan sumur mikroplate.

4. Pencucian Sampel

Setelah inkubasi, lakukan pencucian menggunakan buffer untuk menghilangkan komponen yang tidak terikat pada antibodi, seperti reagen yang tidak berikatan dengan GSH. Proses pencucian ini penting untuk meminimalkan gangguan dari reagen yang tidak terikat.

5. Penambahan Antibodi Sekunder

Tambahkan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim (biasanya HRP atau ALP). Inkubasi kembali sampel dengan antibodi sekunder selama waktu yang disarankan untuk memastikan antibodi sekunder berikatan dengan kompleks antigen-antibodi pertama.

6. Pencucian Kembali

Lakukan pencucian sampel untuk menghilangkan antibodi sekunder yang tidak terikat pada kompleks antigen-antibodi. Pencucian ini bertujuan untuk meningkatkan akurasi hasil pengukuran.

7. Penambahan Substrat Enzim

Tambahkan substrat yang sesuai dengan enzim konjugat, seperti TMB untuk HRP atau pNPP untuk ALP. Substrat ini akan bereaksi dengan enzim untuk menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur.

8. Pembacaan Hasil

Setelah reaksi selesai, ukur perubahan warna dengan menggunakan mikrotiter plate reader pada panjang gelombang yang sesuai (misalnya 450 nm untuk TMB). Perubahan warna ini berbanding lurus dengan konsentrasi GSH dalam sampel.

9. Perhitungan Kadar GSH

Gunakan nilai absorbansi yang diukur untuk menghitung kadar GSH dalam sampel. Perhitungan ini dilakukan dengan membandingkan hasil absorbansi dengan kurva standar yang sudah disiapkan dengan menggunakan konsentrasi GSH yang diketahui.

4.5.7.2. Pengukuran Kadar TNF- α dengan Metode ELISA

Pengukuran kadar TNF- α dilakukan menggunakan metode ELISA, dengan tahapan berdasarkan petunjuk reagensia kit sebagai berikut:

1. Pembuatan Larutan Standar

Sebanyak 120 μ L standar TNF- α (800 ng/L) dicampurkan dengan 120 μ L pengencer standar sehingga diperoleh larutan stok 400 ng/L. Campuran tersebut diinkubasi selama 15 menit sambil diaduk perlahan. Selanjutnya dilakukan pengenceran serial 1:2 untuk menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi 200 ng/L, 100 ng/L, 50 ng/L, dan 25 ng/L. Pengencer standar digunakan sebagai kontrol nol (0 ng/L). Sisa larutan dapat disimpan dalam kondisi beku pada suhu -20°C .

2. Persiapan Wash Buffer

Encerkan 20 mL larutan konsentrat Wash Buffer 25 $\times$ dengan air deionisasi hingga mencapai 500 mL Wash Buffer 1 $\times$. Bila terdapat kristal, aduk perlahan hingga larut sempurna.

3. Persiapan Reagen dan Sampel

Seluruh reagen, larutan standar, dan sampel didiamkan terlebih dahulu pada suhu ruang sebelum digunakan. Pemeriksaan dilakukan pada suhu ruang yang stabil untuk mempertahankan reaktivitas.

4. Persiapan Microplate

Tentukan jumlah strip sumur yang diperlukan, pasang ke dalam bingkai pelat. Strip yang tidak digunakan disimpan pada suhu 2–8°C dalam kemasan asli.

5. Penambahan Larutan Standar

Tambahkan 50 µL larutan standar ke setiap sumur standar.

Catatan: tidak perlu menambahkan antibodi terbiotinilasi ke sumur standar karena komponen tersebut sudah terkandung dalam larutan.

6. Penambahan Sampel dan Reagen Deteksi

Tambahkan 40 µL sampel serum ke setiap sumur sampel, kemudian tambahkan 10 µL antibodi anti-SCF. Setelah itu, masukkan 50 µL larutan streptavidin-HRP ke seluruh sumur sampel dan standar (kecuali blanko). Aduk perlahan, tutup pelat dengan *plate sealer*, lalu inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.

7. Proses Pencucian Plate

Lepaskan *sealer*, lalu cuci setiap sumur sebanyak lima kali dengan 300 µL *Wash Buffer* 1×. Setiap tahap pencucian dibiarkan selama 30 detik hingga 1 menit. Setelah selesai, keringkan pelat menggunakan tisu laboratorium yang bersih.

8. Penambahan Substrat A dan B

Tambahkan masing-masing 50 µL larutan substrat A dan B ke setiap sumur. Tutup kembali pelat dengan sealer dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C dalam kondisi gelap.

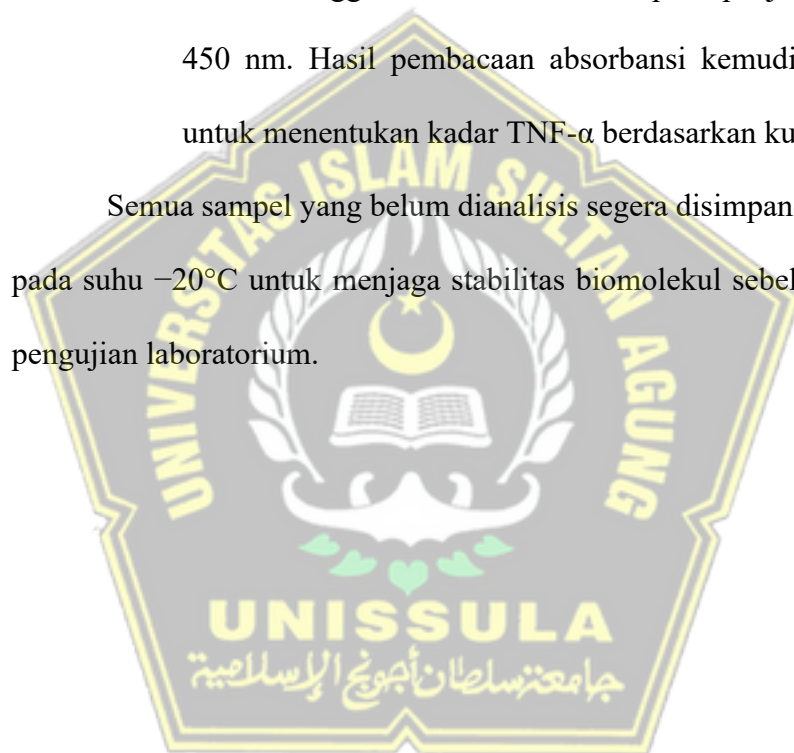
9. Penambahan Stop Solution

Tambahkan 50 μ L larutan penghenti (biasanya asam sulfat 1N) ke setiap sumur. Warna reaksi berubah dari biru menjadi kuning, menandakan reaksi telah berhenti.

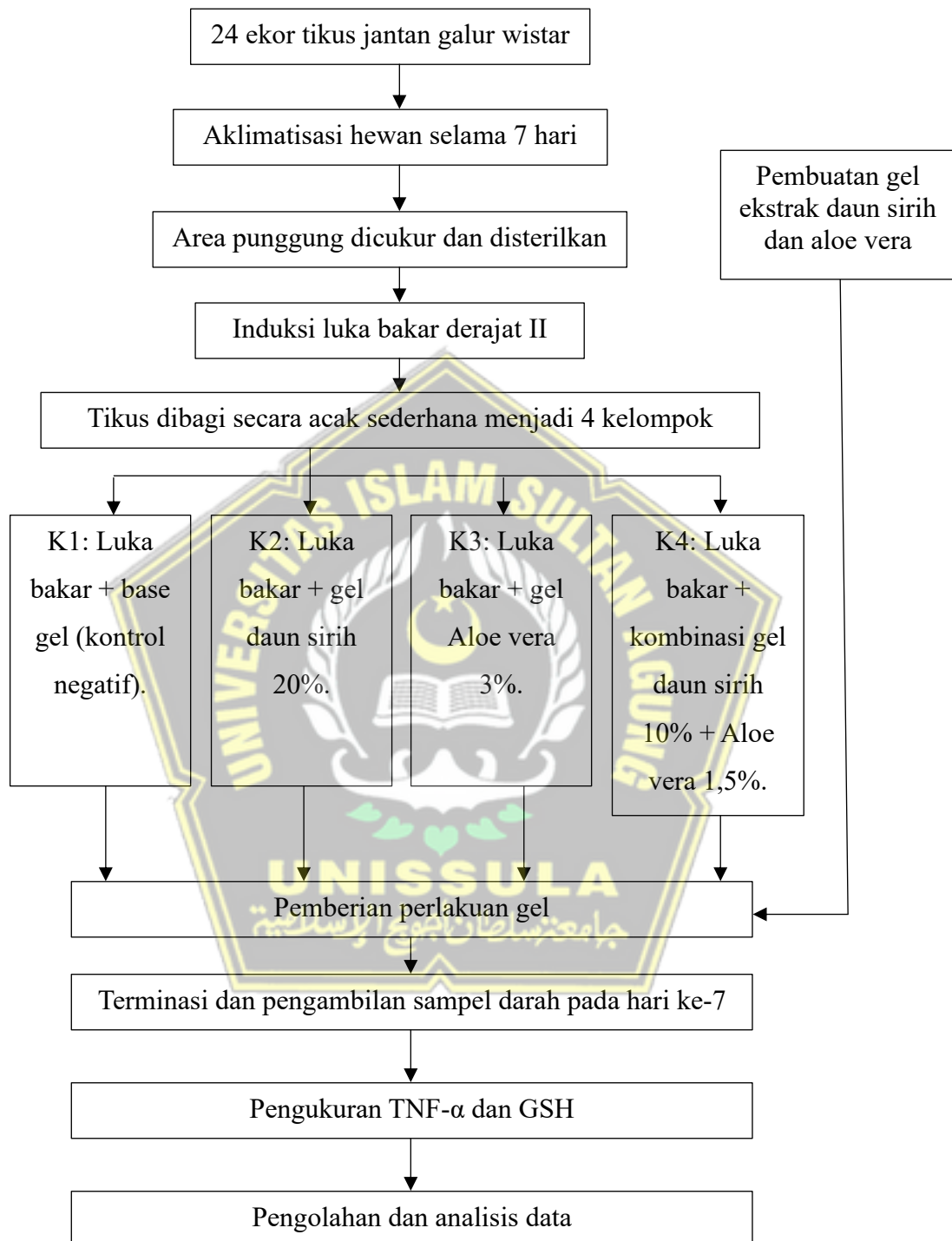
10. Pembacaan Absorbansi (OD)

Sepuluh menit setelah penambahan larutan *stop*, absorbansi diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pembacaan absorbansi kemudian digunakan untuk menentukan kadar TNF- α berdasarkan kurva standar.

Semua sampel yang belum dianalisis segera disimpan dalam freezer pada suhu -20°C untuk menjaga stabilitas biomolekul sebelum dilakukan pengujian laboratorium.



4.6. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.7.Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2025 di tiga lokasi utama, yaitu:

1. Laboratorium Penelitian dan Pemeliharaan Hewan Coba, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA), Semarang. Kegiatan yang dilakukan mencakup aklimatisasi tikus, prosedur induksi luka bakar derajat II, pemberian perlakuan gel secara topikal, serta proses terminasi dan pengambilan sampel serum. Pemeriksaan biomarker TNF- α dan GSH dilakukan di Laboratorium Biomedik FK UNISSULA menggunakan metode ELISA.
2. Laboratorium Riset dan Pengembangan (R&D) PT Derma Elok Farma, Jakarta. Pembuatan sediaan gel dilakukan di fasilitas ini menggunakan basis gel siap pakai yang telah memiliki izin edar BPOM, serta dilengkapi dengan dokumen *Certificate of Analysis* (COA) dan *Material Safety Data Sheet* (MSDS). PT Derma Elok Farma merupakan industri kosmetik yang telah tersertifikasi Cara Pembuatan Kosmetik yang Baik (CPKB), sehingga menjamin mutu, keamanan, dan kestabilan sediaan yang digunakan dalam penelitian.
3. Laboratorium Produksi dan Riset Ekstrak, PT Phytochemindo Reksa. Proses pembuatan ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) dilakukan di fasilitas ini menggunakan metode ekstraksi terstandar yang sesuai dengan prinsip *Good Laboratory Practice* (GLP). PT Phytochemindo Reksa telah memiliki *Certificate of Analysis* (COA) dan *Material Safety Data Sheet* (MSDS) untuk bahan baku yang digunakan, serta dilengkapi peralatan

ekstraksi yang mendukung validitas hasil. Adanya sertifikasi dan dokumentasi ini menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan memiliki kualitas, keamanan, dan kestabilan yang terjaga sebagai bahan aktif dalam formulasi gel.

4.8. Analisis Data

Data yang telah diperoleh selanjutnya melalui tahap pengolahan, penyuntingan, pen-tabulasian, dan pembersihan untuk memastikan kelayakan analisis. Analisis awal dilakukan dengan uji deskriptif untuk menggambarkan karakteristik data. Uji normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk*, sedangkan uji homogenitas varians menggunakan *Levene's test*. Apabila data berdistribusi normal dan varians antar kelompok homogen, perbedaan antar kelompok dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan signifikan antar pasangan kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dan varians tidak homogen, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*, yang selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* sebagai uji banding antar kelompok. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *SPSS for Windows*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan Aloe vera (*Aloe barbadensis*) terhadap kadar TNF- α dan Glutathione (GSH) pada tikus Wistar dengan luka bakar derajat II. Penelitian ini dilaksanakan pada periode Juli-Agustus 2025, dengan kegiatan laboratorium tersebar di tiga lokasi, yaitu PT Phytochemindo Reksa untuk pembuatan ekstrak daun sirih dan Aloe vera, PT Derma Elok Farma untuk formulasi sediaan gel, dan *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang untuk pengujian hewan uji.

Penelitian ini dilakukan dalam durasi tujuh hari, dimulai dari induksi luka bakar derajat II pada tikus Wistar hingga pengambilan sampel pada hari ke-7. Sebanyak 24 ekor tikus jantan galur Wistar berusia 10-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram dan kondisi sehat serta telah menjalani masa adaptasi selama 7 hari digunakan sebagai hewan uji. Namun, hanya 20 ekor yang dianalisis menggunakan ELISA karena sebagian hewan tidak memenuhi kriteria akhir penelitian atau mengalami kematian/penurunan kondisi selama percobaan. Tikus-tikus tersebut dibagi ke dalam empat kelompok perlakuan, yaitu:

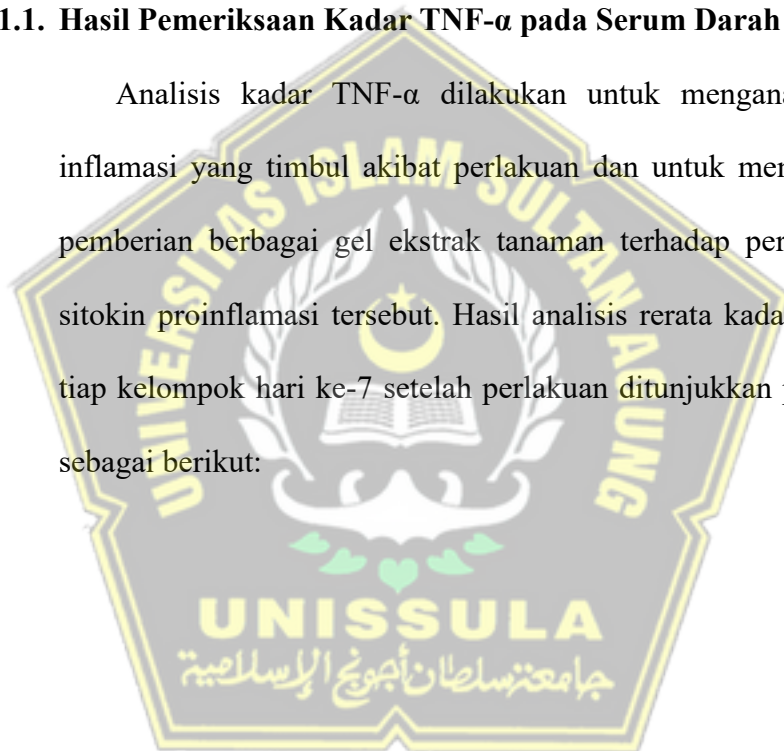
- K1: Kontrol negatif, diinduksi luka bakar derajat II dan diolesi base gel.
- K2: Diinduksi luka bakar derajat II dan diolesi gel ekstrak daun sirih 20%.
- K3: Diinduksi luka bakar derajat II dan diolesi gel ekstrak Aloe vera 3%.
- K4: Diinduksi luka bakar derajat II dan diolesi gel kombinasi ekstrak daun sirih

10% dan Aloe vera 1,5%.

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-7 setelah perlakuan, dengan pengukuran kadar TNF- α dan GSH menggunakan metode ELISA. Prosedur ini memastikan bahwa data yang diperoleh dapat mewakili perubahan yang terjadi selama proses penyembuhan luka, serta memberikan gambaran yang jelas mengenai efektivitas terapi yang diberikan.

5.1.1. Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Serum Darah

Analisis kadar TNF- α dilakukan untuk menganalisis respons inflamasi yang timbul akibat perlakuan dan untuk menilai pengaruh pemberian berbagai gel ekstrak tanaman terhadap perubahan kadar sitokin proinflamasi tersebut. Hasil analisis rerata kadar TNF- α pada tiap kelompok hari ke-7 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:



Tabel 5.1 Uji Deskriptif Rata-rata Kadar TNF- α dan One Way ANOVA

Kelompok	Base Gel (K1)	Gel Daun Sirih 20% (K2)	Gel Aloe Vera 3% (K3)	Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4)	<i>p</i> <i>value</i>
Kadar TNF-α ng/L					
Mean	106,77	118,83	97,25	89,15	
SD	27,81	43,90	21,76	27,12	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,259	0,176	0,975	0,248	
<i>Levene Test</i>					0,328
<i>One Way ANOVA</i>					0,494

Keterangan:

Shapiro-Wilk = Data berdistribusi normal ($p > 0,05$)

Levene Test = Data homogen ($p > 0,05$)

One Way ANOVA = Tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p > 0,05$)

Berdasarkan hasil pengukuran kadar TNF- α pada kelompok perlakuan yang diuji, terlihat bahwa kelompok dengan perlakuan Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4) memiliki kadar TNF- α terendah, yaitu sebesar $89,15 \pm 27,12$ ng/L. Kelompok ini diikuti oleh kelompok Gel Aloe Vera 3% (K3) yang memiliki kadar TNF- α sedikit lebih tinggi, yakni $97,25 \pm 21,76$ ng/L. Sementara itu, kelompok Base Gel (K1) memiliki kadar TNF- α $106,77 \pm 27,81$ ng/L. Sedangkan kelompok Gel Daun Sirih 20% (K2) menghasilkan kadar TNF- α tertinggi, yaitu $118,83 \pm 43,90$ ng/L.

Uji normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk*, yang menghasilkan nilai signifikansi antara 0,176 hingga 0,975 untuk setiap kelompok. Karena seluruh nilai *p* lebih besar dari 0,05, ini

menunjukkan bahwa data dari setiap kelompok terdistribusi normal dan memenuhi asumsi untuk analisis parametrik.

Selanjutnya, uji homogenitas varians dengan Levene Test menunjukkan nilai p sebesar 0,328, lebih besar dari 0,05. Hasil ini menandakan bahwa varians antar kelompok bersifat homogen, sehingga sebaran data relatif seragam dan memenuhi asumsi homogenitas yang diperlukan untuk analisis berikutnya.

Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan pada nilai rata-rata kadar TNF- α di antara kelompok-kelompok yang diuji. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai p sebesar 0,494, yang lebih besar dari 0,05. Nilai p yang besar ini mengindikasikan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan yang diuji. Dengan kata lain, meskipun terdapat variasi dalam kadar TNF- α antar kelompok, pemberian perlakuan seperti gel Aloe Vera 3%, daun sirih, atau kombinasi keduanya tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap kadar TNF- α pada subjek percobaan.

Secara keseluruhan, meskipun kelompok dengan perlakuan Gel Aloe Vera 3% (K3) dan Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4) memiliki kadar TNF- α yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan tersebut tidak signifikan. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian perlakuan yang diuji tidak memberikan perbedaan

signifikan terhadap kadar TNF- α pada kelompok percobaan ini. Meskipun demikian, hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan tersebut masih memiliki potensi yang dapat dieksplorasi lebih lanjut dalam penelitian selanjutnya.

5.1.2. Hasil Pemeriksaan Kadar GSH pada Serum Darah

Hasil analisis rerata kadar GSH pada tiap kelompok hari ke-7 setelah perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.2 sebagai berikut:

Tabel 5.2 Uji Deskriptif Rata-rata Kadar GSH dan Uji One-Way ANOVA

Kelompok	Base Gel (K1)	Gel Daun Sirih 20% (K2)	Gel Aloe Vera 3% (K3)	Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4)	<i>p value</i>
Kadar GSH mg/L					
Mean	440,98	370,86	164,62	109,50	
SD	133,94	64,05	50,86	25,71	
Shapiro-Wilk	0,951	0,064	0,311	0,333	
Levene Test					0,153
One-Way ANOVA					<0,001

Keterangan:

Shapiro-Wilk = Data berdistribusi normal ($p > 0,05$)

Levene Test = Data homogen ($p > 0,05$)

One-Way ANOVA = Terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$)

Analisis deskriptif terhadap kadar GSH untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan tubuh dalam melawan stres oksidatif yang terjadi akibat luka bakar derajat II. Berdasarkan Tabel 5.2 kadar GSH tertinggi ditunjukkan oleh Kelompok Base Gel (K1) dengan rata-rata $440,98 \pm 133,94$ mg/L. Hal ini dipengaruhi oleh sifat kelembapan gel yang mendukung proses penyembuhan luka bakar. Kelompok Gel Daun Sirih 20% (K2) memiliki kadar GSH rata-rata $370,86 \pm 64,05$ mg/L

yang menunjukkan peningkatan signifikan sebagai respons terhadap luka bakar karena sifat antioksidan yang terkandung dalam ekstrak daun sirih.

Kelompok Gel Aloe Vera 3% (K3) menunjukkan kadar GSH yang lebih rendah, yaitu $164,62 \pm 50,86$ mg/L yang menunjukkan bahwa meskipun Aloe vera memiliki sifat anti-inflamasi namun efeknya terhadap kadar GSH tidak sekuat kelompok-kelompok sebelumnya. Kadar GSH rata-rata terendah ditunjukkan oleh kelompok Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4) yaitu $109,504 \pm 25,71$ mg/L.

Selanjutnya dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk menguji distribusi data pada setiap kelompok. Hasil uji ini menunjukkan bahwa data pada kelompok terdistribusi normal, dengan nilai p bervariasi antara 0,064 hingga 0,951 ($p > 0,05$). Kemudian dilakukan uji *Levene Test* untuk mengetahui apakah varians antar kelompok homogen atau tidak. Hasil uji *Levene Test* menunjukkan nilai $p = 0,153$ ($p > 0,05$) yang menandakan bahwa varians antar kelompok tidak berbeda secara signifikan. Dengan demikian, data antar kelompok dapat dianggap homogen dan memenuhi asumsi untuk dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan uji *One-Way ANOVA*.

Uji *One-Way ANOVA* digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata antara beberapa kelompok perlakuan. Hasil uji *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa nilai p yang diperoleh adalah $< 0,001$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara

kelompok-kelompok yang diuji. Analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan signifikan terhadap kadar GSH.

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey HSD* setelah Perlakuan terhadap Rata-rata Kadar GSH

Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,521	<0,001*	<0,001*
K2		-	0,004*	<0,001*
K3			-	0,697
K4				-

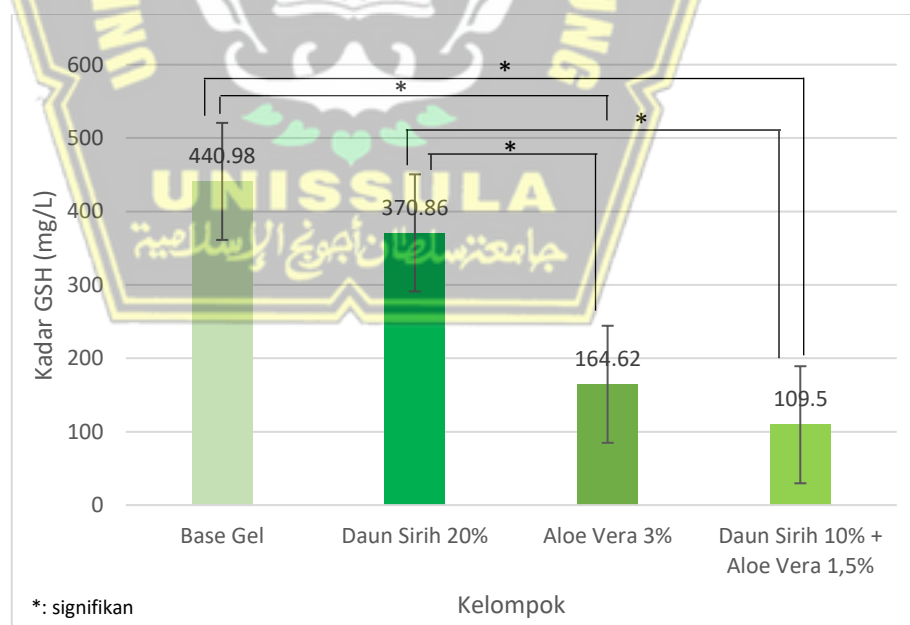
Keterangan: *Bermakna $p < 0,05$

Berdasarkan hasil uji *post hoc Tukey HSD* yang ditunjukkan pada Tabel 5.3, terdapat perbedaan signifikan dalam kadar GSH antar kelompok perlakuan. Kelompok K1 (Base gel) menunjukkan perbedaan signifikan dengan Kelompok K3 (Gel Aloe Vera 3%) dan K4 (Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%) dengan nilai p keduanya <0,001.

Perbedaan signifikan selanjutnya ditemukan pada Kelompok K2 (Gel Daun Sirih 20%) dengan Kelompok K3 (Gel Aloe Vera 3%) dan Kelompok K4 (Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%). Pada perbandingan K2 vs K3, nilai p yang diperoleh adalah 0,004, yang menunjukkan bahwa Gel Daun Sirih 20% (K2) memberikan peningkatan kadar GSH yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan Gel Aloe Vera 3% (K3). Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 20% memiliki efek yang

lebih kuat dalam merangsang produksi GSH, yang merupakan respons tubuh terhadap stres oksidatif akibat luka bakar derajat II.

Demikian pula, pada perbandingan K2 vs K4, nilai p yang diperoleh adalah $<0,001$, yang juga menunjukkan perbedaan signifikan. Gel Daun Sirih 20% (K2) menunjukkan kadar GSH yang lebih tinggi dibandingkan dengan Kombinasi Ekstrak Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4). Meskipun Kombinasi Daun Sirih dan Aloe Vera memiliki potensi antioksidan, gel daun sirih dengan konsentrasi yang lebih tinggi memberikan efek yang lebih tinggi dalam meningkatkan kadar GSH. Hal ini disebabkan oleh kandungan antioksidan yang lebih kuat pada Daun Sirih 20% yang dapat lebih berpengaruh dalam mengurangi stres oksidatif pada luka bakar.



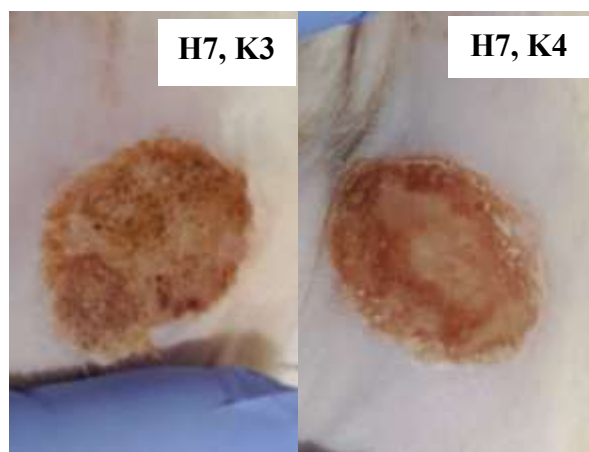
Gambar 5.1 Diagram Batang Kadar GSH

Secara keseluruhan, Base Gel (K1) dan Gel Daun Sirih 20% (K2) memberikan peningkatan kadar GSH yang signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan Gel Aloe Vera 3% (K3) dan Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4). Konsentrasi dan formulasi yang lebih optimal pada K3 dan K4 diperlukan agar dapat meningkatkan kadar GSH lebih optimal.

5.1.3. Gambaran Makroskopis pada Luka Eksisi Antar Kelompok

Pengamatan luka bakar secara makroskopis dilakukan untuk mengevaluasi kondisi luka pada setiap kelompok, baik sebelum maupun setelah perlakuan. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memastikan bahwa prosedur pembuatan luka bakar dilakukan secara seragam pada semua hewan uji, sehingga luka memiliki ukuran, bentuk, dan lokasi yang konsisten. Pengukuran dilakukan setiap hari, dimulai dari hari ke-0 (H0) hingga hari ke-7 (H7).





Gambar 5.2 Gambaran Makroskopis Hari ke-0 (H0) dan Gambaran Makroskopis Luka Bakar II pada Hari ke-7 (H7) Antar Kelompok Perlakuan (K1: Luka Bakar + Base Gel; K2: Luka Bakar + Gel Daun Sirih 20%; K3: Luka Bakar + Gel Aloe Vera 3%; K4: Luka Bakar + Gel Kombinasi Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5%)

Gambar 5.2 menunjukkan perbandingan kondisi luka bakar pada hari ke-0 (H0) dan hari ke-7 (H7) pada empat kelompok perlakuan yang berbeda. Pada hari ke-0, semua kelompok perlakuan (K1-K4) menunjukkan kondisi luka bakar yang serupa, dengan karakteristik yang terlihat jelas pada setiap gambar. Luka bakar tersebut menunjukkan area kulit yang terbakar dengan ukuran dan bentuk yang hampir sama di masing-masing kelompok. Kulit di area luka terlihat kemerahan dan meradang, dengan bagian tengah luka yang lebih terang, menandakan adanya kerusakan jaringan pada lapisan epidermis.

Pada bagian tepi luka, terdapat sedikit pembengkakan dan perubahan warna menjadi lebih gelap, yang menunjukkan bahwa pembuluh darah di bawah kulit mengalami kerusakan akibat paparan panas. Area tersebut juga tampak sedikit basah, yang disebabkan oleh

cairan tubuh yang merembes akibat cedera pada lapisan kulit. Meskipun luka bakar ini terjadi pada semua kelompok, tidak ada perbedaan mencolok antara kelompok perlakuan pada hari ke-0, karena semua luka masih dalam tahap awal penyembuhan, dengan tanda-tanda peradangan dan kerusakan jaringan yang serupa di setiap kelompok.

Pada kelompok K1, luka terlihat lebih kering dan permukaan luka tampak lebih halus dibandingkan pada kelompok yang tidak dirawat. Gel tersebut memberikan lapisan pelindung yang membantu menjaga kelembapan luka, sekaligus mengurangi pembengkakan dan peradangan yang terjadi di sekitar luka. Sifat menenangkan dari Base Gel memberikan efek yang positif pada kulit, meredakan rasa panas dan nyeri yang biasa muncul pada luka bakar. Meskipun ada tanda-tanda perbaikan, peradangan masih tampak jelas di sekitar tepi luka, menunjukkan bahwa proses penyembuhan masih berlangsung dan luka membutuhkan waktu lebih lanjut untuk pulih sepenuhnya.

Pada kelompok K2, yang dirawat dengan Gel Daun Sirih 20%, perbedaan mulai terlihat lebih jelas. Gel daun sirih memberikan efek anti-inflamasi yang membantu mengurangi pembengkakan dan peradangan, meskipun luka masih menunjukkan tanda-tanda kerusakan pada lapisan kulit. Bagian tengah luka mulai menunjukkan tanda-tanda pengelupasan, yang menunjukkan adanya proses penyembuhan awal. Namun, inflamasi di sekitar tepi luka masih tampak cukup jelas, yang menunjukkan bahwa luka masih dalam fase awal pemulihan. Gel daun

sirih mulai bekerja untuk menenangkan luka, namun efek maksimalnya baru akan terlihat dalam beberapa hari mendatang.

Kelompok K3, yang mendapatkan perlakuan dengan Gel Aloe Vera 3%, memperlihatkan permukaan luka tampak lebih kering dan lebih halus dengan adanya lapisan pelindung dari Aloe Vera yang mempercepat proses penyembuhan. Meskipun ada perbaikan pada bagian tengah luka, tepi luka masih menunjukkan kemerahan dan sedikit pembengkakan, yang menandakan bahwa peradangan belum sepenuhnya hilang. Aloe Vera membantu menjaga kelembapan luka, yang penting untuk proses regenerasi sel kulit, namun luka ini masih dalam fase penyembuhan.

Pada kelompok K4, yang mendapatkan perlakuan dengan kombinasi Gel Daun Sirih 10% dan Aloe Vera 1,5%, luka bakar menunjukkan perkembangan yang cukup signifikan meskipun masih dalam tahap penyembuhan. Berdasarkan gambar, permukaan luka tampak lebih kering dibandingkan sebelumnya, dengan lapisan yang mulai mengeras dan sedikit mengelupas, menunjukkan bahwa jaringan yang rusak mulai terangkat. Warna luka pada bagian tengah terlihat lebih terang, dengan sedikit kekuningan di sekitarnya, yang menandakan bahwa proses regenerasi kulit sudah berjalan. Meskipun ada tanda-tanda penyembuhan, peradangan di sekitar tepi luka masih terlihat, meskipun tidak sebanyak pada tahap sebelumnya. Gel kombinasi ini bekerja dengan baik untuk membantu menenangkan

peradangan dan menjaga kelembapan luka, mempercepat penyembuhan, dan mengurangi risiko infeksi.

Berdasarkan pengamatan yang ada, meskipun terdapat perbaikan yang signifikan pada luka bakar di setiap kelompok perlakuan, proses penyembuhan yang optimal masih memerlukan waktu lebih lama. Penggunaan berbagai jenis gel, seperti Base Gel, Gel Daun Sirih, dan Aloe Vera, menunjukkan perkembangan yang berbeda pada setiap kelompok, namun luka masih menunjukkan tanda-tanda peradangan, pengelupasan, dan perubahan warna yang menandakan bahwa penyembuhan belum sepenuhnya tercapai. Oleh karena itu, untuk memastikan bahwa luka benar-benar sembuh dan bebas dari risiko infeksi atau komplikasi lainnya, diperlukan perpanjangan durasi pengamatan pada penelitian selanjutnya untuk memantau perkembangan luka secara menyeluruh dan mengevaluasi efektivitas perlakuan dalam jangka panjang.

5.2. Pembahasan

Luka bakar adalah cedera pada kulit atau jaringan organik lainnya yang disebabkan oleh panas atau akibat radiasi, radioaktivitas, listrik, gesekan, atau kontak dengan bahan kimia. Luka bakar terjadi ketika sebagian atau seluruh sel di kulit atau jaringan lainnya dihancurkan oleh berbagai sumber panas, seperti cairan panas yang dapat menyebabkan luka bakar akibat percikan (*scalds*), benda padat panas yang menimbulkan luka bakar akibat kontak langsung (*contact burns*), dan api yang menyebabkan luka bakar akibat nyala api (*flame burns*).⁵⁸

Proses penyembuhan luka bakar melibatkan respon inflamasi yang kompleks, dengan tahap-tahap peradangan, proliferasi, dan remodeling. Selama tahap peradangan, terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan pelepasan mediator inflamasi, seperti sitokin, yang berfungsi untuk membersihkan jaringan yang rusak. Proses ini sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor internal, seperti sitokin pro-inflamasi TNF- α dan mekanisme pertahanan antioksidan tubuh seperti glutathione (GSH) yang berperan dalam mengatasi kerusakan oksidatif akibat peradangan.^{59,60}

TNF- α mengaktifkan jalur inflamasi, meningkatkan produksi sitokin dan molekul adhesi yang mendukung sistem kekebalan tubuh dalam menangani cedera. Namun, produksi TNF- α yang berlebihan dapat memperburuk kerusakan jaringan dan menghambat penyembuhan dengan menyebabkan peradangan kronis.^{61,62} Di sisi lain, GSH (glutathione) adalah antioksidan yang melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang dihasilkan selama peradangan pada luka bakar. GSH membantu pemulihan sel yang rusak dan menjaga keseimbangan redoks tubuh.⁶³ Keseimbangan antara TNF- α dan GSH sangat penting dalam proses penyembuhan luka bakar, karena meningkatnya TNF- α dapat meningkatkan kerusakan oksidatif yang dapat dikontrol oleh GSH, mempercepat proses penyembuhan dan mengurangi risiko infeksi.

Pada penelitian ini, kelompok yang diberi kombinasi ekstrak Daun Sirih 10% dan Aloe Vera 1,5% (K4) menunjukkan nilai TNF- α terendah, yaitu $89,15 \pm 27,12$ ng/L. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kedua bahan alam tersebut memiliki potensi dalam menurunkan kadar TNF- α , yang merupakan salah satu

sitokin pro-inflamasi utama yang berperan dalam proses peradangan pada luka bakar. Penurunan kadar TNF- α pada kelompok ini mengindikasikan bahwa kombinasi daun sirih dan aloe vera dapat memiliki efek sinergis dalam mengatur respon imun dan inflamasi tubuh yang selanjutnya mendukung proses penyembuhan luka bakar.

Kombinasi daun sirih dan aloe vera menghasilkan nilai TNF- α yang rendah karena kedua bahan alami tersebut memiliki sifat anti-inflamasi dan antioksidan yang dapat bekerja secara sinergis dalam mengurangi respon peradangan yang berlebihan. Daun sirih memiliki kemampuan untuk menghambat produksi TNF- α melalui penghambatan jalur pensinyalan NF- κ B. Penurunan kadar TNF- α ini dimediasi oleh penghambatan translokasi protein NF- κ B p65 dari sitoplasma ke inti sel, yang mengurangi aktivitas transkripsi gen yang mengarah pada produksi sitokin inflamasi.⁶⁴ Selain itu, daun sirih juga mengandung flavonoid yang memiliki efek antioksidan, yang membantu mengurangi kerusakan oksidatif yang sering terjadi pada luka bakar, yang juga berkontribusi pada peningkatan kadar TNF- α .

Di sisi lain, Aloe Vera telah lama dikenal karena kemampuannya dalam mengurangi peradangan dan meningkatkan penyembuhan luka. *Aloe vera* telah terbukti menghambat jalur pensinyalan NF- κ B dan MAPK dalam proses penyembuhan luka bakar. Penghambatan jalur NF- κ B ini mengurangi kadar sitokin proinflamasi seperti TNF- α , yang dapat memperburuk peradangan dan memperlambat proses penyembuhan. Selain itu, Aloe vera juga memodulasi jalur MAPK, khususnya p38 MAPK, yang berperan dalam regulasi inflamasi dan stres

oksidatif, sehingga mempercepat proses penyembuhan luka dengan mengurangi reaksi peradangan yang berlebihan.⁶⁵

Kombinasi sinergi dari daun sirih dan aloe vera mengarah pada pengurangan peradangan dan stres oksidatif pada luka bakar, yang pada akhirnya berkontribusi pada penurunan kadar TNF- α . Hal ini terlihat dari kadar TNF- α yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Gel Daun Sirih 20% menunjukkan kadar TNF- α yang paling tinggi, bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapat gel atau kelompok yang mendapat base gel. Meski demikian, peningkatan TNF- α pada awal penyembuhan luka bukan merupakan hasil yang buruk. Meningkatnya kadar TNF- α pada kelompok Gel Daun Sirih 20% dapat dijelaskan melalui potensi senyawa aktif seperti eugenol dan flavonoid yang memiliki efek imunostimulan dan meningkatkan respon inflamasi akut secara terkontrol.⁶⁶

Peningkatan produksi TNF- α dalam tubuh dapat dijelaskan melalui aktivasi jalur TLRs-NF- κ B-NLRP3. Aktivasi *Toll-like receptors* (TLRs) oleh senyawa bioaktif, seperti flavonoid atau eugenol yang terdapat pada daun sirih, memicu aktivasi jalur NF- κ B. Ketika TLRs teraktivasi, proses ini mengaktifkan IKK (*I κ B Kinase*) yang menyebabkan degradasi I κ B, inhibitor yang menahan NF- κ B di dalam sitoplasma. Setelah degradasi I κ B, NF- κ B dapat berpindah ke inti sel dan mengaktifkan transkripsi gen pro-inflamasi, termasuk TNF- α .⁶⁷

Peningkatan TNF- α melalui jalur ini berfungsi untuk memperkuat aktivitas sel imun, seperti makrofag dan neutrofil, yang bekerja dalam melawan patogen serta memperbaiki jaringan yang rusak akibat cedera atau infeksi. Aktivasi NF- κ B

dalam jalur TLRs-NF- κ B-NLRP3 memastikan bahwa produksi TNF- α terkoordinasi dengan baik, menjaga keseimbangan antara merangsang respons imun dan mencegah kerusakan jaringan yang berlebihan. Hal ini berperan penting dalam mempercepat pemulihan tubuh dan mengatasi kerusakan jaringan yang lebih luas. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak tanaman dengan kandungan flavonoid tinggi dapat meningkatkan aktivitas sel imun selama fase inflamasi awal untuk mempercepat eliminasi debris dan patogen.^{68,69}

Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai TNF- α tidak berbeda signifikan antar kelompok yang ditunjukkan dengan hasil uji *One Way Anova* dengan nilai $p=0,494$ ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel Gel Daun Sirih 20% (K2), Gel Aloe Vera 3% (K3), dan Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4), serta kelompok yang hanya diberi Base Gel (K1) tidak memberikan pengaruh yang cukup besar terhadap kadar TNF- α , sehingga efeknya tidak cukup signifikan untuk membedakan antara kelompok-kelompok tersebut.

Hasil yang tidak signifikan terhadap kadar TNF- α dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh perbedaan respons biologis antar individu. Variasi dalam sistem imun antara subjek penelitian dapat menyebabkan perbedaan dalam produksi TNF- α , meskipun perlakuan yang diberikan serupa. Selain itu, metode pengukuran yang digunakan untuk menilai kadar TNF- α juga dapat memengaruhi hasil. Beberapa faktor tetap dapat mempengaruhi hasil penelitian meskipun ELISA merupakan metode yang sensitif untuk mengukur kadar TNF- α . Konsentrasi sampel yang tidak sesuai, proses persiapan sampel, termasuk

pengambilan dan penyimpanan yang tidak tepat, bisa menyebabkan kontaminasi atau kesalahan dalam pengolahan yang berdampak pada hasil. Senyawa aktif dalam ekstrak daun sirih dan Aloe Vera dapat berinteraksi dengan komponen lain dalam sampel, mengurangi pengaruhnya terhadap TNF- α atau mengganggu proses antigen-antibodi dalam ELISA.⁷⁰

Pada penelitian ini, ditemukan bahwa kelompok yang diberi Gel Daun Sirih 20% (K2) memiliki nilai TNF- α tertinggi yang juga diikuti oleh nilai GSH yang relatif lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Meskipun terdapat penurunan relatif pada kadar GSH dibandingkan dengan kontrol negatif, kelompok K2 (Gel Daun Sirih 20%) menunjukkan kadar GSH yang lebih tinggi dibandingkan kelompok K3 dan K4, menjadikannya sebagai kelompok dengan kadar GSH tertinggi di antara kelompok perlakuan yang diuji. GSH sebagai antioksidan utama berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan yang dihasilkan oleh radikal bebas dan peradangan.⁷¹ Meskipun peradangan tetap berlangsung, GSH berperan dalam membantu tubuh mengelola dampak peradangan tersebut dengan cara menetralkan stres oksidatif yang terjadi selama proses inflamasi.⁷²

Mekanisme yang mendasari penurunan GSH pada kelompok Gel Daun Sirih 20% (K2) dapat berkaitan dengan sifat antioksidan dari senyawa aktif dalam daun sirih, seperti eugenol dan flavonoid, yang dapat merangsang peningkatan produksi GSH dalam tubuh.⁷³ Eugenol dapat mengaktivasi jalur Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*), yang merupakan faktor transkripsi penting dalam regulasi respons antioksidan dalam sel. Aktivasi jalur Nrf2 ini memicu kadar gen-gen yang berperan dalam meningkatkan kapasitas detoksifikasi seluler, termasuk

sintesis GSH.⁷⁴ Namun, meskipun ada mekanisme peningkatan GSH, efek ini tidak cukup untuk mengembalikan kadar GSH ke level yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif.

Selain itu, ketika Nrf2 teraktivasi, ia meningkatkan kadar berbagai enzim antioksidan, termasuk glutathione peroxidase dan glutathione S-transferase, yang bekerja sama untuk mempertahankan keseimbangan redoks dalam sel dan melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS.⁷⁴ Meskipun TNF- α tidak menunjukkan penurunan yang signifikan, peningkatan GSH dibandingkan kelompok perlakuan yang lain memberikan gambaran bahwa Gel Daun Sirih 20% berpotensi berperan dalam menyeimbangkan sistem redoks tubuh, yang penting untuk mengelola respon inflamasi dan membantu proses penyembuhan luka bakar.

Namun, nilai GSH tertinggi justru ditemukan pada kelompok K1, yang hanya diberi base gel pada luka bakar. Temuan ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor yang berkaitan dengan karakteristik base gel itu sendiri. kemampuannya menciptakan lingkungan lembap yang mempercepat penyembuhan dengan mengurangi pembentukan jaringan parut dan mengelola eksudat luka. Gel juga memberikan efek pendinginan yang meredakan rasa sakit dan peradangan, serta mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut.⁷⁵

Sementara itu, kelompok yang diberi Gel Daun Sirih 10% + Aloe Vera 1,5% (K4) menunjukkan nilai GSH yang paling rendah yaitu $109,504 \pm 25,71$ mg/L. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi senyawa aktif dalam kombinasi tersebut. Kombinasi daun sirih dengan Aloe Vera

pada konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini belum optimal dalam meningkatkan GSH, meskipun dapat menurunkan TNF- α .

Penelitian mengenai konsentrasi optimal daun sirih dan Aloe Vera dalam penyembuhan luka bakar menunjukkan bahwa konsentrasi yang tepat sangat mempengaruhi hasil yang dicapai. Beberapa penelitian menemukan bahwa konsentrasi daun sirih yang paling optimal dalam penyembuhan luka bakar adalah 15%.^{76,77} Pada konsentrasi ini, senyawa aktif dalam daun sirih dapat bekerja lebih optimal dalam mengurangi peradangan dan merangsang proses regenerasi jaringan. Di sisi lain, gel Aloe Vera memberikan hasil terbaik dalam penyembuhan luka bakar pada konsentrasi antara 2,5% hingga 5%.⁷⁸ Konsentrasi ini cukup untuk memanfaatkan sifat antiinflamasi dan menenangkan dari Aloe Vera, yang membantu mempercepat proses penyembuhan tanpa menimbulkan iritasi pada kulit yang terluka.

Berdasarkan hasil penelitian ini, walaupun Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirih dan Aloe Vera menunjukkan kadar TNF- α terendah, namun kelompok ini belum menunjukkan kadar GSH yang meningkat, terlihat dari kadar GSH yang paling rendah diantara seluruh kelompok. Gel Daun Sirih 20% (K2) dapat dianggap sebagai kelompok yang paling optimal dalam penyembuhan luka bakar. Meskipun kadar TNF- α pada kelompok ini lebih tinggi dibanding kelompok lainnya namun perbedaan tersebut tidak signifikan, yang menunjukkan bahwa peningkatan kadar TNF- α ini tidak berdampak besar pada proses penyembuhan luka. Keunggulan Gel Daun Sirih 20% terletak pada tingginya kadar GSH dibandingkan kelompok perlakuan yang lain, yang menunjukkan kemampuan

tubuh mengelola stres oksidatif dengan lebih efisien, sehingga menjadikannya kelompok yang paling optimal dalam mendukung proses penyembuhan luka bakar secara keseluruhan.

Kadar TNF- α dan GSH pada kelompok Gel Daun Sirih 20% mencerminkan proses penyembuhan luka yang lebih baik. Hal ini dapat dikaitkan dengan tampilan makroskopis luka bakar yang menunjukkan bahwa luka pada kelompok ini paling kering dibandingkan dengan kelompok lainnya. Kondisi luka yang lebih kering menunjukkan bahwa Gel Daun Sirih 20% dapat mengurangi peradangan dan mempercepat proses penyembuhan.

Penelitian ini menggunakan serum darah sebagai sampel penelitian karena serum darah merupakan representasi yang lebih mudah diakses dan memberikan gambaran sistemik mengenai respon tubuh terhadap peradangan dan stres oksidatif, termasuk interaksi antara sistem kekebalan tubuh dan respons inflamasi sistemik yang penting dalam penelitian terkait penyembuhan luka bakar.^{79,80} Dengan mengukur kadar TNF- α dan GSH dalam serum, kita dapat memperoleh data yang lebih komprehensif mengenai perubahan biologis yang terjadi di seluruh tubuh sebagai respons terhadap luka bakar dan perlakuan yang diberikan. Selain itu, pengambilan serum darah relatif lebih sederhana, tidak invasif, dan memungkinkan untuk pemantauan berulang tanpa menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada jaringan tubuh.

Penelitian ini menggunakan GSH (Glutathione) sebagai indikator utama untuk mengukur stres oksidatif karena perannya sebagai antioksidan utama dalam tubuh yang melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. GSH berfungsi

langsung dalam mereduksi radikal bebas dan mendetoksifikasi sel-sel dari senyawa berbahaya, sehingga penurunannya sering kali menunjukkan adanya stres oksidatif yang tinggi. Meskipun GPx (*Glutathione Peroxidase*) juga berperan dalam mengatasi stres oksidatif dengan memanfaatkan GSH sebagai kofaktor, pengukuran GSH lebih relevan dalam penelitian ini karena memberikan gambaran langsung tentang kemampuan tubuh dalam mengelola stres oksidatif secara keseluruhan. Selain itu, pengukuran kadar GSH lebih praktis dan mudah dilakukan dibandingkan dengan pengukuran aktivitas enzimatik GPx, yang memerlukan prosedur yang lebih kompleks. Oleh karena itu, pengukuran GSH dianggap lebih tepat untuk menilai dampak peradangan dan kerusakan oksidatif dalam tubuh.⁸¹

Penelitian ini memiliki keterbatasan yang dapat menyebabkan hasil yang diperoleh berbeda dari yang diharapkan. Salah satunya adalah konsentrasi bahan aktif dalam gel yang digunakan, yang belum optimal untuk memberikan efek yang signifikan pada pengurangan TNF- α dan peningkatan GSH. Walaupun konsentrasi bahan seperti daun sirih dan Aloe Vera sudah cukup tinggi, masing-masing senyawa aktif dalam kedua bahan tersebut bisa berinteraksi dengan cara yang berbeda dalam tubuh, mempengaruhi seberapa efektif senyawa-senyawa tersebut dalam mengatur peradangan dan stres oksidatif.

Variabilitas biologis antar individu juga dapat memengaruhi hasil, karena setiap subjek memiliki respons yang berbeda terhadap perlakuan, baik dari segi kekuatan sistem kekebalan tubuh, metabolisme senyawa aktif, maupun faktor-faktor lain yang memengaruhi proses penyembuhan.⁸² Faktor lain yang dapat

mempengaruhi hasil adalah kondisi luka bakar pada tikus, karena perbedaan tingkat keparahan luka dapat menyebabkan respons tubuh yang berbeda terhadap peradangan dan proses penyembuhan. Pengaruh dari faktor eksternal, seperti lingkungan, diet, atau tingkat stres oksidatif yang sudah ada sebelum perlakuan, juga dapat memengaruhi hasil penelitian ini. Semua faktor ini dapat berkontribusi pada hasil yang tidak sesuai dengan yang diharapkan atau tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan.

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan agar dilakukan optimasi formula gel, khususnya daun sirih dan Aloe Vera, untuk mengoptimalkan efek terapeutik yang dihasilkan dalam proses penyembuhan luka bakar. Penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun konsentrasi bahan aktif yang digunakan sudah cukup tinggi, namun terdapat potensi untuk meningkatkan efektivitasnya dengan meningkatkan dosis atau mengubah formulasi gel agar lebih optimal dalam menurunkan $\text{TNF-}\alpha$ dan meningkatkan GSH. Selain itu, perlu juga untuk memperhatikan variabilitas biologis antar subjek dengan melibatkan lebih banyak sampel untuk memastikan hasil yang lebih representatif. Peneliti dapat mempertimbangkan untuk mengontrol faktor eksternal seperti kondisi lingkungan, diet, dan tingkat stres oksidatif sebelum perlakuan agar hasil penelitian lebih konsisten.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

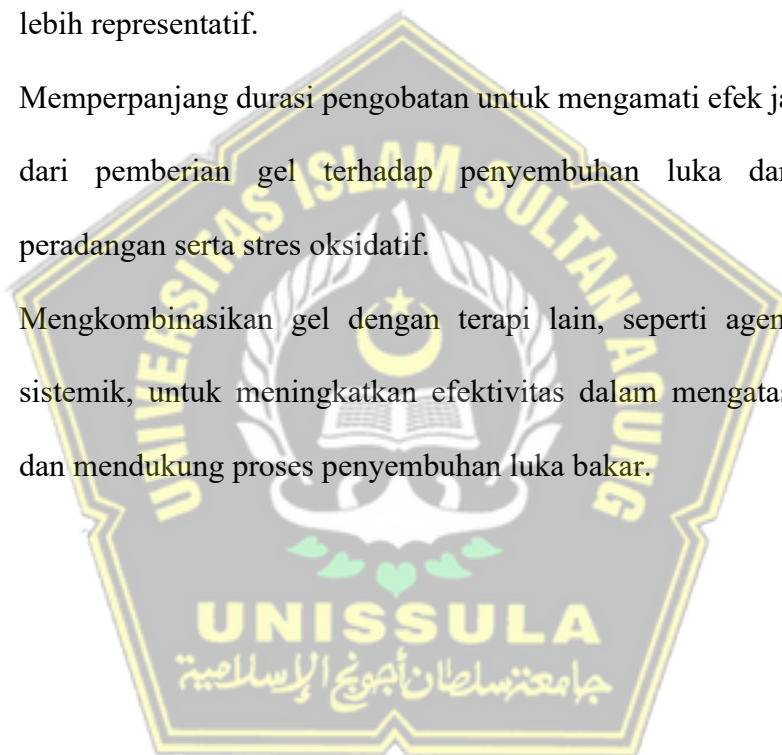
1. Terdapat pengaruh signifikan pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera terhadap kadar GSH pada tikus Wistar dengan luka bakar derajat II, namun tidak terdapat pengaruh terhadap kadar TNF- α .
2. Terdapat penurunan terhadap kadar TNF- α pada luka bakar derajat II setelah pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera, namun penurunan tersebut tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Terdapat penurunan signifikan terhadap kadar GSH pada luka bakar derajat II setelah pemberian gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera dibandingkan dengan kelompok kontrol.
4. Terdapat penurunan terhadap kadar TNF- α dan GSH pada kelompok perlakuan dosis dibandingkan dengan kelompok kontrol.
5. Gel kombinasi ekstrak daun sirih dan aloe vera terbukti tidak dapat menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar GSH secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2 Saran

1. Mengontrol faktor eksternal seperti kondisi lingkungan, diet, dan tingkat stres oksidatif yang sudah ada sebelum perlakuan agar hasil lebih konsisten.
2. Menganalisis interaksi antara senyawa aktif daun sirih dan Aloe Vera

dalam tubuh untuk memahami pengaruhnya terhadap peradangan dan stres oksidatif

3. Mengoptimasi formula gel daun sirih dan Aloe Vera untuk meningkatkan efek terapeutik dalam penyembuhan luka bakar
4. Menambah jumlah sampel untuk mengurangi variabilitas biologis dan meningkatkan kekuatan statistik penelitian, sehingga hasil yang diperoleh lebih representatif.
5. Memperpanjang durasi pengobatan untuk mengamati efek jangka panjang dari pemberian gel terhadap penyembuhan luka dan pengaturan peradangan serta stres oksidatif.
6. Mengkombinasikan gel dengan terapi lain, seperti agen topikal atau sistemik, untuk meningkatkan efektivitas dalam mengatasi peradangan dan mendukung proses penyembuhan luka bakar.



DAFTAR PUSTAKA

1. Matei CE, Visan AI, Cristescu R. Aloe Vera Polysaccharides as Therapeutic Agents: Benefits Versus Side Effects in Biomedical Applications. *Polysaccharides*. 2025;6(2):36. doi:10.3390/polysaccharides6020036
2. Hekmatpou D, Mehrabi F, Rahzani K, Aminiyan A. *The Effect of Aloe Vera Clinical Trials on Prevention and Healing of Skin Wound: A Systematic Review*. Vol 44.; 2019.
3. Rahmawati E, Fawzy A. The Potential Effect of Daun Sirih (Piperaceae Leaf) on the Burn Wound Healing: A Literature Review. *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*. 2024;04(11). doi:10.47191/ijmscrs/v4-i11-30
4. Swastini DA, Martien R, Fachiroh J, Nugroho AE. Ethnopharmacology and bioactive evidence of medicinal plants for wound healing in Indonesia: A scoping review. *J Appl Pharm Sci*. 2025;15(6):10-30. doi:10.7324/JAPS.2025.211952
5. Atiba A, Abdo W, Ali E, et al. Topical and oral applications of Aloe vera improve healing of deep second-degree burns in rats via modulation of growth factors. *Biomarkers*. 2022;27(6):608-617. doi:10.1080/1354750X.2022.2085800
6. Zhou T, Zhang C, Wang X, et al. Research on traditional Chinese medicine as an effective drug for promoting wound healing. *J Ethnopharmacol*. 2024;332:118358. doi:10.1016/J.JEP.2024.118358
7. Sharma D, Jain S, Mishra AK, Sharma R, Tanwar A. Medicinal Herbs from Phytoinformatics: An Aid for Skin Burn Management. *Curr Pharm Biotechnol*. 2022;23(12):1436-1448. doi:10.2174/1389201023666220310141308/CITE/REFWORKS
8. Pattnaik S, Mohanty S, Sahoo SK, Mohanty C. A mechanistic perspective on the role of phytoconstituents-based pharmacotherapeutics and their topical formulations in chronic wound management. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2023;84:104546. doi:10.1016/J.JDDST.2023.104546
9. Darmawan A, Yusuf S, Tahir T, Syahriyani S. STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan Betel Leaf Extract Efficacy on Wound Healing: A Systematic review STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan. *STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan*. 2021;10(1):526-536. doi:10.30994/sjik.v10i1.666
10. Suharto IPS, Ramayanti ED, Yunalia EM, Ulfa N. Betel Leaf Extract's Effect (Piper Batle Linn) on The Healing Process of Incision Wounds in Rats (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Pendidikan Keperawatan Indonesia*. 2021;7(2):123-128. doi:10.17509/jpki.v7i2.40359
11. Budiman A, Khoerunnisa R, Alfauziah T. Wound-healing test of piper betle leaf extract and aloe vera in gel preparation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2018;10:86-91. doi:10.22159/ijap.2018v10i3.24408

12. Aliahmat NS, Noor MRM, Yusof WJW, Makpol S, Ngah WZW, Yusof YAM. Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and Chlorella vulgaris in aging C57BL/6 mice. *Clinics*. 2012;67(12):1447-1454. doi:10.6061/clinics/2012(12)16
13. Erna R, Wulan K, Saleh MgsI. The Effect of Aloe Vera Topical Gel Extraction on Tgf-B1 Expression in Thermal Burn Eyelid Grade II Rats Model. *Sriwijaya Journal of Medicine*. 2022;5(3):130-136. doi:10.32539/sjm.v5i3.197
14. Kumar A, Siddiqi NJ, Alrashood ST, Khan HA, Dubey A, Sharma B. Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium in male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111588. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111588
15. Gao H, Ren Y, Liu C. Aloe-Emodin Suppresses Oxidative Stress and Inflammation via a PI3K-Dependent Mechanism in a Murine Model of Sepsis. 2022;2022.
16. Pradeep A, Mathew AI, Vemula PK, Bhat SG, Narayanan S. Investigating the pro-inflammatory differentiation of macrophages with bacterial ghosts in potential infection control. *Arch Microbiol*. 2024;206(8):361. doi:10.1007/s00203-024-04089-y
17. Tylutka A, Walas Ł, Zembron-Lacny A. Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2024;15(March):1-12. doi:10.3389/fimmu.2024.1330386
18. Comish PB, Carlson D, Kang R, Tang D. Damage-Associated Molecular Patterns and the Systemic Immune Consequences of Severe Thermal Injury. *The Journal of Immunology*. 2020;205(5):1189-1197. doi:10.4049/jimmunol.2000439
19. Bolourani S, Brenner M, Wang P. The interplay of DAMPs, TLR4, and proinflammatory cytokines in pulmonary fibrosis. *J Mol Med*. 2021;99(10):1373-1384. doi:10.1007/s00109-021-02113-y
20. Summer M, Ali S, Fiaz U, Hussain T, Khan RRM, Fiaz H. Revealing the molecular mechanisms in wound healing and the effects of different physiological factors including diabetes, age, and stress. *J Mol Histol*. 2024;55(5):637-654. doi:10.1007/s10735-024-10223-3
21. Tayyeb JZ, Guru A, Kandaswamy K, Jain D, Manivannan C. Synergistic effect of zinc oxide-cinnamic acid nanoparticles for wound healing management: in vitro and zebrafish model studies. Published online 2024.
22. Kapoulea V, Zhou C, Lei F, et al. Anti-TNF- α treatment in skin burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(9):2664.
23. Pohanka M, Keresteš O, Žáková J. A 3D-Printed Do-It-Yourself ELISA Plate Reader as a Biosensor Tested on TNF α Assay. *Biosensors (Basel)*. 2024;14(7). doi:10.3390/bios14070331
24. Berguetti TS, Maia RC, de Souza PS. Detection of TNF- α Protein in Extracellular Vesicles Derived from Tumor Cells by Western Blotting

- BT - The TNF Superfamily: Methods and Protocols. In: Bayry J, ed. Springer US; 2021:251-258. doi:10.1007/978-1-0716-1130-2_19
25. Wetthasinghe L, Ng HF, Ngeow YF, Chew KS, Lee WS. Navigating the intricacies of RT-qPCR data analysis in gene expression studies. *Funct Integr Genomics*. 2024;24(4):115. doi:10.1007/s10142-024-01393-0
 26. Pizzorno JE, Katzinger JJ. Glutathione: Physiological and Clinical Relevance. *J Restor Med*. 2013;1(1):24-37. doi:10.14200/jrm.2012.1.1002
 27. Yang S, Jensen MK, Rimm EB, Willett W, Wu T. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase activities and risk of coronary heart disease in generally healthy women: A prospective study. *Am J Epidemiol*. 2014;180(9):901-908. doi:10.1093/aje/kwu195
 28. Sanchez MC, Lancel S, Boulanger E, Nevriere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: A systematic review. *Antioxidants*. 2018;7(8):1-14. doi:10.3390/antiox7080098
 29. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54(4):287-293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001
 30. Georgiou-Siafis SK, Tsiftoglou AS. The Key Role of GSH in Keeping the Redox Balance in Mammalian Cells: Mechanisms and Significance of GSH in Detoxification via Formation of Conjugates. *Antioxidants*. 2023;12(11). doi:10.3390/antiox12111953
 31. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Journal of Nutrition*. 2004;134(3):489-492. doi:10.1093/jn/134.3.489
 32. Cazzola M, Page CP, Wedzicha JA, Celli BR, Anzueto A, Matera MG. Use of thiols and implications for the use of inhaled corticosteroids in the presence of oxidative stress in COPD. *Respir Res*. 2023;24(1):1-14. doi:10.1186/s12931-023-02500-8
 33. Volety R, J B J. Classification of Burn Images into 1st, 2nd, and 3rd Degree Using State-of-the-Art Deep Learning Techniques. *ECS Trans*. 2022;107(1):18323. doi:10.1149/10701.18323ecst
 34. Ji S, Xiao S, Xia Z, Association CB. Consensus on the treatment of second-degree burn wounds (2024 edition) Tissue Repair of Burns and Trauma Committee, Cross-Straits Medicine Exchange Association of China. *Burns Trauma*. 2024;12:61. <https://academic.oup.com/burnstrauma/article/doi/10.1093/burnst/tkad061/7604422>
 35. Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S. Burn injury. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1). doi:10.1038/s41572-020-0145-5
 36. Suha SA, Sanam TF. A deep convolutional neural network-based approach for detecting burn severity from skin burn images. *Machine*

- Learning with Applications.* 2022;9:100371. doi:https://doi.org/10.1016/j.mlwa.2022.100371
37. Upadhyay R. Nutraceutical, therapeutic, and pharmaceutical potential of Aloe vera: A review. *International Journal of Green Pharmacy.* 2018;12.
 38. Landén NX, Li D, Stähle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2016;73(20):3861-3885. doi:10.1007/s00018-016-2268-0
 39. Korkmaz HI, Flokstra G, Waasdorp M, et al. The Complexity of the Post-Burn Immune Response: An Overview of the Associated Local and Systemic Complications. *Cells.* 2023;12(3):1-21. doi:10.3390/cells12030345
 40. Burgess M, Valdera F, Varon D, Kankuri E, Nuutila K. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury. *Cells.* 2022;11(19). doi:10.3390/cells11193073
 41. Lestari T, Syukur S, Revilla G, Sukma Rita R, Rustini R. The Burn Wound Healing Process : A Review. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies.* 2023;40(1):77. doi:10.52155/ijpsat.v40.1.5565
 42. Widowati L, HAndayani L, Mujahid R. The use of betel (Piper betle) leaves for maintaining the health of women and children at various ethnic groups in Indonesia. *Nusantara Bioscience.* 2020;12(2):120-126. doi:10.13057/nusbiosci/n120206
 43. Muhamad II, Hassan ND, Mamat SNH, Nawi NM, Rashid WA, Tan NA. Chapter 14 - Extraction Technologies and Solvents of Phytocompounds From Plant Materials: Physicochemical Characterization and Identification of Ingredients and Bioactive Compounds From Plant Extract Using Various Instrumentations. In: Grumezescu AM, Holban AMBTIE by PM in F, eds. *Handbook of Food Bioengineering.* Academic Press; 2017:523-560. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00014-4
 44. Kumar S, Juyal A, Bisht S, Jaiswal V. Betel leaf (Piper betle): Ethnomedicine to emerging therapeutic frontiers. *J Pharmacogn Phytochem.* 2024;13(2):249-258. doi:10.22271/phyto.2024.v13.i2c.14887
 45. Baliga S, Fazal F, Priya M, Ratnu VS, Rai M. Betel leaf (.0Piper betel linn): The wrongly maligned medicinal and recreational plant possesses potent gastrointestinal and hepatoprotective effects. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease.* Published online December 31, 2013:673-684. doi:10.1016/B978-0-12-397154-8.00035-X
 46. Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of aloe vera and its major active constituents. *Molecules.* 2020;25(6):1-37. doi:10.3390/molecules25061324

47. Upadhyay R. Nutraceutical, therapeutic, and pharmaceutical potential of Aloe vera: A review. *International Journal of Green Pharmacy*. 2018;12.
48. Kumar S, Kalita S, Das A, et al. Aloe vera: A contemporary overview on scope and prospects in food preservation and packaging. *Prog Org Coat*. 2022;166:106799. doi:<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106799>
49. Nyati KK, Masuda K, Mahabub-Uz Zaman M, et al. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(5):2687-2703. doi:10.1093/nar/gkx064
50. Żwieręłło W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4). doi:10.3390/ijms24043749
51. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*. 2013;4. doi:10.1038/ncomms3834
52. Nayaka NMDMW, Sasadara MMV, Sanjaya DA, et al. Piper betle (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications. *Molecules*. 2021;26(8):1-21. doi:10.3390/molecules26082321
53. Surjushe A, Vasani R, Saple D. Aloe vera: A short review. *Indian J Dermatol*. 2008;53(4):163. doi:10.4103/0019-5154.44785
54. Darmawan A, Yusuf S, Tahir T, Syahriyani S. STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan Betel Leaf Extract Efficacy on Wound Healing: A Systematic review STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan. *STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan*. 2021;10(1):526-536. doi:10.30994/sjik.v10i1.666
55. Suharto IPS, Ramayanti ED, Yunalia EM, Ulfa N. Betel Leaf Extract's Effect (Piper Batle Linn) on The Healing Process of Incision Wounds in Rats (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Pendidikan Keperawatan Indonesia*. 2021;7(2):123-128. doi:10.17509/jpki.v7i2.40359
56. Nayaka NMDMW, Sasadara MMV, Sanjaya DA, et al. Piper betle (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications. *Molecules*. 2021;26(8):1-21. doi:10.3390/molecules26082321
57. Prakoso YA, Kurniasih. The effects of aloe vera cream on the expression of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in skin wound healing. *J Trop Med*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/6218303
58. World Health Organization. Burns. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
59. Yamada Y, Endo S, Inada K, et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptor I, II levels in patients with severe burns. *Burns*. 2000;26(3):239-244. doi:10.1016/S0305-4179(99)00137-0
60. Sahib AS, Al-Jawad FH, Alkaisy AA. Effect of antioxidants on the incidence of wound infection in burn patients. *Ann Burns Fire Disasters*. 2010;23(4):199-205.

61. Dergilev K, Zubkova E, Guseva A, et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Proangiogenic Profiling of Cardiosphere-Derived Cell Secretome and Increases Its Ability to Stimulate Angiogenic Properties of Endothelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23). doi:10.3390/ijms242316575
62. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5). doi:10.3390/ijms22052719
63. Chakravorty S, Malvi A, Chaturvedi A, Sonkusare K, Dave N. Glutathione-The Master Antioxidant. *Open Access Journal International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences.* 2020;7(2). doi:10.5281/zenodo.3700161
64. Seo J, Lee U, Seo S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of methanol extract of Piper betle Linn. (Piper betle L.) leaves and stems by inhibiting NF- κ B/MAPK/Nrf2 signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022;155:113734. doi:10.1016/j.biopha.2022.113734
65. Wu Y, Zheng X, Mobet Y, et al. Research on the role and mechanism of Aloe vera (L.) Burm.f. in the treatment of burn: Based on network pharmacology analysis and experimental verification. *Journal of Holistic Integrative Pharmacy.* 2024;5(4):262-276. doi:10.1016/j.jhip.2024.11.001
66. Aara A, Chappidi V, Ramadas M. Antioxidant activity of eugenol in Piper betel leaf extract. *J Family Med Prim Care.* 2020;9(1):327. doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_809_19
67. Chen Y, Ye X, Escames G, et al. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases. *Cell Mol Biol Lett.BioMed Central Ltd.* 2023;28(1). doi:10.1186/s11658-023-00462-9
68. Carvalho MTB, Araújo-Filho HG, Barreto AS, Quintans-Júnior LJ, Quintans JSS, Barreto RSS. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine.* 2021;90:153636. doi:10.1016/J.PHYMED.2021.153636
69. Zulkefli N, Che Zahari CNM, Sayuti NH, et al. Flavonoids as Potential Wound-Healing Molecules: Emphasis on Pathways Perspective. *Int J Mol Sci.Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* 2023;24(5). doi:10.3390/ijms24054607
70. Waritani T, Chang J, McKinney B, Terato K. An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. *MethodsX.* 2017;4:153-165. doi:10.1016/j.mex.2017.03.002
71. Georgiou-Siafis SK, Tsiftoglou AS. The Key Role of GSH in Keeping the Redox Balance in Mammalian Cells: Mechanisms and Significance of GSH in Detoxification via Formation of Conjugates. *Antioxidants.* 2023;12(11). doi:10.3390/antiox12111953
72. Chandimali N, Bak SG, Park EH, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov.* 2025;11(1):19. doi:10.1038/s41420-024-02278-8

73. Damasceno ROS, Pinheiro JLS, Rodrigues LHM, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Eugenol: An Update. *Pharmaceuticals*. 2024;17(11):1505. doi:10.3390/ph17111505
74. Ma L, Liu J, Lin Q, Gu Y, Yu W. Eugenol protects cells against oxidative stress via Nrf2. *Exp Ther Med*. 2021;21(2):107. doi:10.3892/etm.2020.9539
75. Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Hydrogel Dressings for the Treatment of Burn Wounds: An Up-To-Date Overview. *Materials (Basel)*. 2020;13(12). doi:10.3390/ma13122853
76. Hidayatti M, Tarigan SB, Chiuman L. Effectiveness of red betel leaf extract cream for healing burn wounds. *Jurnal Prima Medika Sains*. 2023;5(2):100-107. doi:10.34012/jpms.v5i2.4398
77. Fajriati HS, Azizah N. Powerful Antibacterial for Wound Healing using Betel Leaf Extract. *Academia Open*. 2024;9(2). doi:10.21070/acopen.9.2024.8096
78. Oryan A, Mohammadalipour A, Moshiri A, Tabandeh MR. Topical Application of Aloe vera Accelerated Wound Healing, Modeling, and Remodeling. *Ann Plast Surg*. 2016;77(1):37-46. doi:10.1097/SAP.0000000000000239
79. Sotelo-Orozco J, Chen SY, Hertz-Picciotto I, Slupsky CM. A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. *Front Mol Biosci*. 2021;8. doi:10.3389/fmolb.2021.682134
80. Ilves L, Ottas A, Kaldvee B, et al. Metabolomic Differences between the Skin and Blood Sera of Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21). doi:10.3390/ijms232113001
81. Diana A. Averill-Bates. The antioxidant glutathione. In: Vol 121. Academic Press; 2023:109-141. doi:10.1016/bs.vh.2022.09.002
82. Netz Y, Lidor R, Ziv G. Small samples and increased variability – discussing the need for restricted types of randomization in exercise interventions in old age. *European Review of Aging and Physical Activity*. 2019;16(1):17. doi:10.1186/s11556-019-0224-3