KAJIAN KOMPLEKS MOLEKUL *XANTHONE* DARI EKSTRAK KULIT MANGGIS *(Garcinia mangostana Linn.)* UNTUK MEMPERCEPAT PENYEMBUHAN LUKA PADA LUKA BAKAR (STUDI IN *VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR MODEL LUKA BAKAR)

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor

Oleh

MARISCA EVALINA GONDOKESUMO

NIM. 137070100111013

PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
MINAT BIOMEDIK

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TIM PENGUJI DISERTASI

JUDUL DISERTASI:

KAJIAN KOMPLEKS MOLEKUL *XANTHONE* DARI EKSTRAK KULIT MANGGIS *(Garcinia mangostana Linn.)* UNTUK MEMPERCEPAT PENYEMBUHAN LUKA PADA LUKA BAKAR (STUDI IN *VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR MODEL LUKA BAKAR)

Nama Mahasiswa	:	Marisca Evalina Gondokesumo
NIM	:	137070100111013
Program Studi	:	Doktor Ilmu Kedokteran
Minat	:	Biomedik

KOMISI PROMOTOR:

Promotor	:	Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M.Kes, SpPK
Ko-Promotor 1	:	Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp.B., Sp.BP-RE(K)
Ko-Promotor 2	:	Prof. Drs. Sutiman B. Sumitro, SU., D.Sc.
Ko-Promotor 3	:	Dr. Ir. Wahyu Widowati, M.Si.

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1	:	Prof. Dr. dr. Mulyohadi Ali, Sp.FK
Dosen Penguji 2	:	Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.Kes., Ph.D.
Dosen Penguji Luar	:	Dr. Dian Ratih Laksmitawati, M.Biomed., Apt.

Tgl. Seminar Hasil Penelitian	:	3 September 2018
Tgl. Ujian Tertutup	:	6 Desember 2018
Tgl. Ujian Terbuka	:	8 Januari 2019

KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Marisca Evalina Gondokesumo, Bambang Pardjianto, Sutiman Bambang Sumitro, Wahyu Widowati, Kusworini Handono. Xanthone Analysis and Antioxidant Activity Analysis (Applying ESR) of Six Different Maturity Levels of Mangosteen Rind Extract (*Garcinia mangostana Linn.*). Pharmacognosy Journal Vol 11 (2):369-373. http://www.phcogj.com/v11/i2

Marisca Evalina Gondokesumo, Bambang Pardjianto, Sutiman Bambang Sumitro, Wahyu Widowati, Arbi Dimyati. Microstructural Characterization of the Garcinia mangostana Fruit at Different Maturity Level. Journal of Natural Remedies Vol 18 (2), April 2018. http://www.informaticsjournals.com/index.php/jnr

Marisca Evalina Gondokesumo, Molecular Docking Study of Xanthones From the Pericarp of Garcinia mangostana Linn. Novel COX-2 Inhibitors Targeting Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2. Conference Book of Abstract Proceeding, Hong Kong, June 2017. Akademika Nusa Internasional. http://www.anissh.com

Marisca Evalina Gondokesumo, Garcinia mangostana Fruit has Potency for Healing Burns. 6th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC), November 2015. University of Brawijaya, Malang, Indonesia.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, akhirnya dengan izin dan berkat dari Tuhan Yang Maha Kuasa, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi dengan judul KAJIAN KOMPLEKS MOLEKUL *XANTHONE* DARI EKSTRAK KULIT MANGGIS *(Garcinia mangostana Linn.)* UNTUK MEMPERCEPAT PENYEMBUHAN LUKA PADA LUKA BAKAR (STUDI IN *VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR MODEL LUKA BAKAR). Semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Di dalam tulisan ini, tujuan utamanya adalah untuk mengetahui potensi kompleks molekul ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) dalam membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada luka bakar. Dengan selesainya penulisan disertasi ini, perkenankan penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Brawijaya Malang Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS. serta mantan Rektor Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito atas ijin dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes. dan mantan Dekan Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA atas kesempatan, dukungan dan fasilitas yang diberikan dalam penyeleseian pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
3. Ketua Program Studi Pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK dan mantan KPS Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., Sp.FK., Ph.D atas kesempatan, dukungan dan fasilitas yang diberikan dalam penyeleseian pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.

4. Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK selaku Promotor dan dosen MKPD yang telah banyak memberikan dukungan, motivasi, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis.
5. Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp.B., Sp.BP-RE(K) selaku ko-Promotor 1, memberikan dukungan, motivasi, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis.
6. Prof. Drs. Sutiman B. Sumitro, SU., D.Sc. selaku ko-Promotor 2, memberikan dukungan, motivasi, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis.
7. Dr. Ir. Wahyu Widowati, M.Si. selaku ko-Promotor 3, memberikan dukungan, motivasi, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis.
8. Prof. Dr. dr. Mulyohadi Ali, Sp.FK selaku penguji disertasi, atas koreksi, inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
9. Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.Kes., Ph.D. selaku penguji disertasi, atas koreksi, inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
10. Dr. Dian Ratih Laksmitawati, M.Biomed., Apt. selaku penguji tamu, atas kesediaannya meluangkan waktu untuk menguji ke Malang, perhatian, pengertian, saran, dan motivasi untuk terus mengembangkan diri yang diberikan kepada penulis.
11. Seluruh dosen pengajar di program pasca sarjana Fakultas Kedokteran Univesitas Brawijaya.
12. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes., selaku dosen MKPD pada Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan masukan dan bimbingan serta penambahan wawasan pengetahuan.
13. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes., selaku dosen MKPD pada Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan masukan dan bimbingan serta penambahan wawasan pengetahuan.
14. Kepala Laboratorium Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Penelitian Universitas Surabaya, Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran Bandung, Laboratorium

Penelitian Institut Pertanian Bogor, Centre for Science and Technology of Advanced Material (PSTBM-BATAN) Serpong-Tangerang, Biomoleculer and Biomedical Research Center Aretha Medika Utama Bandung, atas ijin penggunaan fasilitas dan kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian.

15. Terima kasih yang tulus untuk para laboran dan teknisi yang telah membantu dalam pelaksaaan penelitian ini.
16. Seluruh teman seangkatan yang telah bersama-sama, berbagi suka dan lara serta selalu memberikan semangat selama menempuh pendidikan Program Doktor, semoga persaudaraan ini abadi.
17. Suami tercinta dr. Bintoro Hartanto, Sp.B., FICS., FINACS. dan anak-anakku tersayang Bianca Vania Hartanto dan Bima Hartanto atas curahan cinta dan kasih sayang, pengertian, pengorbanan, kesabaran dan segala-galanya yang tak terhingga.
18. Orang tua saya, Suliantoro Gondokesumo dan Linda Puspita serta adik saya dr. Michele Gondokesumo, M.H. atas curahan cinta dan kasih sayang, kesabaran dan segala-galanya yang tak terhingga.
19. Seluruh staf administrasi di lingkungan Pasca Sarjana Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu melancarkan proses administrasi selama menjalani pendidikan Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
20. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bentuan, dan masukan dalam penyusunan disertasi.

Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan untuk semua pihak baik yang tersebut diatas maupun yang tidak bisa disebutkan satu-persatu. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semuanya dengan yang lebih baik, dengan pahala yang berlipat dan limpahan nikmat dan karuniaNYA.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dari segi pembiayaan dan teknis penelitian, sehingga masih dirasakan banyak kekurangan dalam disertasi ini. Hasil

penelitian disertasi ini juga membutuhkan tahapan penelitian lebih lanjut yang panjang untuk dapat diaplikasikan di masyarakat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran, masukan dan kritikan yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Desember 2018

Penulis

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

Luka bakar adalah suatu bentuk kerusakan atau kehilangan jaringan yang disebabkan kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik dan radiasi. Salah satu cara penyembuhan luka bakar adalah dengan menggunakan bahan herbal alami. Berdasarkan berbagai penelitian, kulit buah manggis *(Garcinia mangostana* Linn.) diketahui memiliki senyawa *xanthone* yang memiliki fungsi antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri sehingga diharapkan berpotensi untuk membantu mempercepat penyembuhan luka bakar.

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap. Penelitian tahap 1 bertujuan untuk melakukan analisis QSAR dari senyawa yang terkandung dalam kulit manggis dihubungkan dengan mediator seluler yang berperan dalam penyembuhan luka bakar. Penelitian tahap 2 bertujuan untuk melakukan kuantifikasi kandungan senyawa *xanthone* terpilih menggunakan LC-MS dan karakterisasi senyawa xanthone terpilih dari enam tingkat kematangan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn) menggunakan *Particle Size Analysis* (PSA), *X-ray Fluorescence* (XRF), *X-ray Diffraction* (XRD), *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Electron Spin Resonance* (ESR), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) dan prediksi kemampuan senyawa xanthone sebagai penghelat logam menggunakan Open Bable dan Chemscketh. Tahap ini bertujuan untuk menentukan 1 tingkat kematangan terpilih yang akan dibuat gel.

Penelitian tahap 3 meliputi uji *in vivo* pada tikus model luka bakar. Tahap ini bertujuan untuk mengetahui efek gel ekstrak kulit manggis (gel EKM) dalam membantu mempercepat proses penyembuhan luka bakar pada model tikus luka bakar dibandingkan dengan sediaan MEBO. Parameter yang diukur berupa perbaikan jaringan, re-epitelisasi, infiltrasi neutrofil, infiltrasi limfosit, neovaskularisasi dan ekspresi protein IL-6, TGF-β dan EGF menggunakan analisis Immunohistokimia.

Berdasarkan hasil analisis QSAR pada penelitian tahap 1 diketahui bahwa senyawa *xanthone* yang memiliki aktivitas pa yang tertinggi adalah Esmeatxanthone A (Pa=0.7), Garcinone E (Pa=0.694), γ-mangostin (Pa=0.693) dan Gartanin (Pa=0.692). Keempat jenis *xanthone* yang terpilih diprediksi memiliki target potensial yang berhubungan dengan tingkat ekspresi dari IL-6,TGF-β dan EGF. Hasil analisis enam tingkat kematangan EKM dengan LC-MS menunjukkan bahwa EKM dengan tingkat kematangan 6 memiliki kandungan senyawa Esmeatxanthone A, Garcinone E, γ-mangostin dan Gartanin tertinggi.

Analisis struktur partikel dan kandungan logam (*trace element*) dari EKM menggunakan PSA, XRF, XRD dan SEM menunjukkan bahwa EKM memiliki struktur amorf hingga kristal, dengan ukuran partikel mikro hingga nano. EKM dengan kematangan 6 memiliki struktur *nanocrystal*. EKM juga mengandung logam (*trace element*) yang penting dalam penyembuhan luka bakar seperti Fe, Ca, Zn, Cu dan Mn. Analisis *Electron Spin Resonance* (ESR) menunjukkan EKM tingkat kematangan 4, 5, dan 6 memiliki kemampuan memerangkap radikal bebas (DPPH) yang paling baik. Dengan memperhatikan semua data yang ada dengan demikian dipilih EKM dengan tingkat kematangan 6 dipilih untuk diformulasikan sebagai sediaan gel. Pengujian FTIR pada EKM kematangan tingkat 6 menunjukkan bahwa terdapat kompleks molekul logam transisi-senyawa organik. Adanya kompleks molekul logam transisi-senyawa organik menunjukkan bahwa *xanthone* memiliki kemampuan penghelatan logam. Hasil prediksi kompleks molekul senyawa-organik logam transisi menunjukkan adanya kompleks molekul $Fe(\gamma\text{-mangosteen})_3^{-4}$. Hasil ini mengindikasikan bahwa γ-mangosteen memiliki kemampuan dalam menghelat ion logam.

Penelitian tahap 3 berupa analisis *in vivo* menggunakan model tikus luka bakar menunjukkan adanya perbaikan jaringan (analisis histologi) yang lebih baik pada perlakuan EKM dosis 1 dan 2 dibandingkan EKM Dosis 0 dan menunjukkan aktivitas perbaikan yang sertara dengan MEBO. Hasil ini didukung dengan data analisis infiltrasi neutrofil, infiltrasi

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

limfosit dan neovaskularisasi. Analisis ekspresi protein menggunakan metode IHK menunjukkan bahwa pemberian gel EKM 0,2 g dan 0,4 g mampu meningkatkan ekspresi IL-6 pada hari ke-1 dan 7, TGF-β pada hari ke-1 dan 14, serta EGF pada hari ke-7 dan 14.

Kata Kunci: gel Ekstrak Kulit Manggis, luka bakar, penyembuhan luka bakar, xanthone, kompleks molekul.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

SUMMARY

Burns are a form of tissue damage caused by contact with heat sources such as fire, hot water, chemicals, electricity and radiation. One method of healing burns is to use natural herbal ingredients. Based on various studies, mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) rind is known to have xanthone compounds that have antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial functions that are expected to have the potential to enhanceburn healing.

The study consisted of 3 main research stages. Phase 1 of the research comprised QSAR study of the compounds contained in the mangosteen peel which is associated with cellular mediators of burns; Phase 2 of the research characterized of selected xanthone compounds from six maturity stages of mangosteen peel extract.

Phase 2 of the research included the complex structure characterization and antioxidant activity analysis of six different maturity levels of mangosteen peel extract using Particle Size Analysis (PSA), X-ray Fluorescence (XRF), X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Electron Spin Resonance (ESR) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. The complex molecules structure of organic compound-metal transition also predicted used Chemsketch and Open Bable software. This stage aims to select the most appropriatematurity level to be further composed into gel.

Phase 3 of the research included in vivo tests on burn model mouse. This stage aims to determine the effect of mangosteen peel extract gel in helping to speed up the healing process of burns in burn mouse models compared Mebo. Parameters measured were tissue repair, epithelialization, neutrophil infiltration, lymphocyte infiltration, neovascularization and expression of IL-6, TGF-β and EGF proteins using Immunohistochemical analysis.

Based on the results of QSAR Analysis (Phase 1 of the research) xanthones that exhibited the highest Pa activity are Esmeatxanthone A (Pa = 0.7), Garcinone E (Pa = 0.694), γ-mangostin (Pa = 0.693) and Gartanin (Pa = 0.692). The four selected xanthones are predicted to have potential targets related to the expression level of IL-6, TGF-β and EGF. The results of the analysis of the six maturity levels of mangosteen peel extract with LC-MS showed that mangosteen peel extract with level 6 maturity contained the highest Esmeatxanthone A, Garcinone E, γ-mangostin and Gartanin compounds.

Phase 2 of the research was alsoconducted to identify the particle structure, complex structure and antioxidant activity of mangosteen peel at various levels of maturity. Analysis of particle structure and trace element from MRE (Mangosteen Rind Extract) using PSA, XRF, XRD and SEM showed that MRE has an amorphous to crystals structure, with micro to nanoparticle in sizes. MRE with maturity 6 has a nanocrystal structure. MRE also contains transition metals (trace elements) which are important in healing burns such as Fe, Ca, Zn, Cu and Mn. The analysis of Electron Spin Resonance (ESR) showed MRE levels 4, 5 and 6 had the best ability to trap free radicals (DPPH). By observing all the available data, the MRE maturity level of 6 was selected to be formulated as a gel preparation. FTIR testing on MRE maturity level 6 shows complex molecules transition metal-organic compounds in MRE. The detection complexes molecules of metal transition-organic compounds that shows that organic compound in MRE has *chelating activity* to metal transition. The predictions of complexes molecules of transition metal-organic compounds show the presence of molecular complexes Fe (γ-mangosteen)$_3^{-4}$. This result indicate that γ-mangosteen has ability to chelate Fe ions.

Phase 3 of the research in the form of in vivo analysis used mouse models of burns showed better tissue repair (histological analysis) in the treatment of MRE dose1 and 2 than MRE dose 0 and showed equal repairactivity with MEBO. Infiltration analysis of neutrophils, lymphocyte infiltration and neovascularization showed an increase in neutrophil infiltration on day 1 and an increase in the number of neovascularization on day 7 in the MRE group

compared with MRE Dose 0. Analysis of IL-6, EGF and TGF-β protein expression showed that MRE was able to increase IL-6 expression on day 1 and 7, TGF-β on day 1 and 14, and EGF on day 7 and 14.

Keywords: mangosteen rind extract (MRE) gel, burns, healing burn, xanthone, complex molecules.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PENGESAHAN ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS iii
TIM PENGUJI DISERTASI iv
KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH v
KATA PENGANTAR vi
RINGKASAN x
SUMMARY xi
DAFTAR ISI xii
DAFTAR GAMBAR xx
DAFTAR TABEL xxii
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 5
1.2.1 Sub Masalah 6
1.2.1.1 Sub Masalah Penelitian Tahap 1 6
1.2.1.2 Sub Masalah Penelitian Tahap 2 6
1.2.1.3 Sub Masalah Penelitian Tahap 3 6
1.3 Tujuan Penelitian 7
1.3.1 Tujuan Umum 7
1.3.2 Tujuan Khusus 7
1.3.2.1 Tujuan Khusus Penelitian Tahap 1 7
1.3.2.2 Tujuan Khusus Penelitian Tahap 2 7
1.3.2.3 Tujuan Khusus Penelitian Tahap 3 8

1.4 Manfaat Penelitian 8
1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan 8
1.4.2 Klinis 8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 9
2.1 Kajian Kompleks Sains dalam proses Penyembuhan Luka 9
2.1.1 Kompleksitas Energi dalam Proses Penyembuhan Luka 9
2.1.2 Bio-inorganic Chemistri dalam Penyembuhan Luka Bakar 11
2.2 Luka Bakar 15
2.2.1 Definisi Penyembuhan Luka Bakar 15
2.2.2 Etiologi Luka Bakar 15
2.2.3 Klasifikasi Luka Bakar 15
2.2.4 Komplikasi Luka 19
2.3 Penyembuhan Luka Bakar 20
2.3.1 Definisi Penyembuhan Luka Bakar 20
2.3.2 Proses Penyembuhan Luka 21
2.3.2.1 Fase Koagulasi 21
2.3.2.2 Fase Inflamasi 22
2.3.2.3 Fase Poliferasi 27
2.3.2.4 Fase Maturasi dan Remodeling 30
2.3.3 Terapi Non-Operatif pada Luka Bakar 34
2.3.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka 36
2.3.5 Kriteria Luka Sembuh 39
2.4 Peran Protein IL-6, TGF-β, EGF dalam Penyembuhan Luka Bakar 40
2.5 Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) 41
2.5.1 Klasifikasi Manggis 42
2.5.2 Budidaya Manggis 42
2.5.3 Morfologi Buah Manggis 43

2.5.4 Kulit Manggis 44
2.6 Radikal Bebas dalam Penyembuhan Luka dan Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Manggis 46
2.6.1 Radikal Bebas dalam Penyembuhan Luka Bakar 46
2.6.2 Kompleks Molekul dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis 50
2.7 Aktivitas Penyembuhan Luka Bakar MEBO 52
2.8 Pengujian Senyawa Kandidat Obat Melalui Teknik Bioinformatika 53
2.8.1 Bioinformatika dan Seleksi Senyawa Obat 53
2.8.2 Analisis QSAR 55
2.9 Analisis Stuktur Mikro dan *Trace Element* Bahan Baku Obat 56
2.9.1 Pengujian Ukuran dan Distribusi Partikel Menggunakan PSA 56
2.9.1.1 Definisi PSA 56
2.9.1.2 Prinsip Kerja PSA 57
2.9.1.3 Hasil Analisis PSA 57
2.9.2 Pengujian Ukuran Mikro Menggunakan SEM 57
2.9.2.1 Definisi SEM 57
2.9.2.2 Prisip Kerja SEM 58
2.9.2.3 Hasil Analisis SEM 58
2.9.3 Pengujian Mineral Kualitatif Menggunakan XRD 58
2.9.3.1 Definisi XRD 58
2.9.3.2 Prinsip Kerja XRD 59
2.9.3.3 Keunggulan dan Keterbatasan XRD 59
2.9.4 Pengujian Mineral Kuantitatif Menggunakan XRF 59
2.9.4.1 Definisi XRF 59
2.9.4.2 Prinsip Kerja XRF 60
2.9.4.3 Keunggulan XRF 60

2.9.5 Pengujian Kadar Senyawa Aktif Menggunaka LC-MS 60
2.9.5.1 Definisi LC-MS 60
2.9.5.2 Prinsip Kerja LC-MS 61
2.9.5.3 Hasil Analisis LC-MS 61
2.9.5.4 Keunggulan LC-MS 61
2.10 Analisis Antioksidan dan Kompleks Struktur dari EKM 61
2.10.1 Analisis ESR 61
2.10.2 Analisis FTIR 63
2.11 Analisis Anatomi dan Ekspresi Protein dalam Studi Luka Bakar 64
2.11.1 Histologi 64
2.11.2 Imunohistokimia 64
BAB 3 KERANGKA KONSEP 66
3.1 Kerangka Konsep 66
3.2 Hipotesis dan Subhipotesis 69
3.2.1 Hipotesis 69
3.2.1.1 Sub Hipotesis Penelitian Tahap 1 69
3.2.1.2 Sub Hipotesis Penelitian Tahap 2 69
3.2.1.3 Sub Hipotesis Penelitian Tahap 3 69
BAB 4 METODE PENELITIAN 71
4.1 Desain Penelitian 71
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian 72
4.3 Sampel/Subyek Penelitian 72
4.3.1 Analisis Bioinformatika Senyawa EKM 72
4.3.2 Karakterisasi EKM dengan Tingkat Kematangan Berbeda 72
4.3.3 Analisis Efek Pemberian EKM Terhadap Penyembuhan Luka Bakar 72

4.4 Variabel Penelitian 73
4.4.1 Variabel Penelitian Tahap 1 73
4.4.1.1 Analisis Bioinformatika Senyawa dalam EKM 73
4.4.2 Variabel Penelitian Tahap 2 73
4.4.2.1. Kuantifikasi Senyawa Xanthone EKM pada Berbagai Tingkat Kematangan 73
4.4.2.2 Karakteristik Kompleks Molekul EKM 73
4.4.3 Variabel Penelitian Tahap 3 74
4.4.3.1 Analisis EKM secara *in vivo* 74
4.5 Definisi Operasional Variabel 74
4.6 Alat dan Bahan 76
4.6.1 Alat dan Bahan Penelitian Tahap I 76
4.6.2 Alat dan Bahan Penelitian Tahap II 76
4.6.3 Alat dan Bahan Penelitian Tahap III 77
4.7 Prosedur Penelitian 79
4.7.1 Prosedur Penelitian Tahap I 79
4.7.1.1 Analisis Bioinformatika 79
4.7.2 Prosedur Penelitian Tahap II 81
4.7.2.1 Ekstraksi dan Kuantifikasi Xanthone pada EKM 81
4.7.2.2 Karakteristik Kompleks Molekul EKM 82
4.7.3 Prosedur Penelitian Tahap III 85
4.7.3.1 Uji *in vivo* aktivitas EKM dalam Penyembuhan Luka Bakar 85
4.8 Analisis Data 89
4.9 Alur Penelitian 90
4.9.1 Alur Penelitian Tahap 1 90
4.9.1.1 Alur Penelitian Analisis Bioinformatika 90

4.9.2 Alur Penelitian Tahap 2 91
4.9.2.1 Alur Penelitian Karakterisasi Kompleks Molekul EKM .. 91
4.9.3 Alur Penelitian Tahap 3 92
4.9.3.1 Alur Penelitian Aplikasi Topikal EKM pada Model Tikus Luka Bakar 92
BAB 5 HASIL PENELITIAN..... 93
5.1 Penelitian Tahap 1 93
5.1.1 Analisis Bioinformatik Senyawa EKM..... 93
5.2 Hasil Penelitian Tahap 2 96
5.2.1 Analisis Kuantitatif Senyawa *Xanthone* dalam EKM 96
5.2.2 Karakterisasi EKM menggunakan PSA, SEM, XRD dan XRF.. 97
5.2.2.1 Hasil *Particle Size Analysis* (PSA) 98
5.2.2.2 Hasil *Scanning Electron Microscopy* (SEM) 99
5.2.2.3 Hasil *X-Ray Diffraction* (XRD) 100
5.2.2.4 Hasil *X-Ray Fluorescence* (XRF) 101
5.2.2.5 Hasil Analisis *Electron Spin Resonance* (ESR) 103
5.2.2.6 Hasil Analisis *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) 104
5.2.2.7 Prediksi Kompleks Molekul Senyawa Organik-Logam Transisi 104
5.3 Penelitian Tahap 3 107
5.3.1 Kondisi Fisik Tikus Pasca Luka Bakar 107
5.3.2 Morfologi Luka Bakar 108
5.3.3 Tampilan Anatomi Penyembuhan Luka Bakar 111
5.3.4 Infiltrasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi 114
5.3.4.1 Infiltrasi Neutrofil 114
5.3.4.2 Infiltrasi Limfosit 116

5.3.4.3 Neovaskularisasi 118
5.3.5 Analisis Ekspresi Protein yang Berperan dalam Penyembuhan Luka Bakar 120
5.3.5.1 Ekspresi Protein IL-6 120
5.3.5.2 Ekspresi Protein TGF-β 124
5.3.5.3 Ekspresi Protein EGF 129
BAB 6 PEMBAHASAN 134
6.1 Penelitian Tahap 1 134
6.1.1 Analisis Bioinformatika Senyawa EKM 134
6.2 Penelitian Tahap 2 137
6.2.1 Analisis Kuantitatif Senyawa Xanthone dalam EKM 137
6.2.2 Struktur Partikel dan Mikroelement pada EKM 138
6.2.2.1 Hasil Analisis *Particle size analysis* (PSA) 138
6.2.2.2 Hasil Analisis *Scanning Electron Microscopy* (SEM) .. 140
6.2.2.3 Hasil Analisis *X-Ray Difraction* (XRD) 141
6.2.2.4 Hasil Analisis *X-Ray Fluorescence* (XRF) 142
6.2.3 Aktivitas Antioksidan dan Kompleks Struktur pada EKM 145
6.2.3.1 Aktivitas Antioksidan EKM 145
6.2.3.2 Analisis Kompleks Struktur EKM menggunakan FTIR 148
6.2.3.3 Analisis Kompleks Molekul Senyawa Organik-Logam Transisi 149
6.3 Penelitian Tahap 3 152
6.3.1 Tampilan Morfologi Penyembuhan Luka Bakar 152
6.3.2 Tampilan Anatomi Penyembuhan Luka Bakar 152
6.3.2.1 Infiltrasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi 154

6.3.2.1.1 Infiltrasi Neutrofil 154
6.3.2.1.2 Infiltrasi Limfosit 156
6.3.2.1.3 Neovaskularisasi 157
6.4 Analisis Ekspresi Protein yang Berperan dalam Penyembuhan Luka 158
6.4.1 Ekspresi Protein IL-6 158
6.4.2 Ekspresi Protein TGF-β 160
6.4.3 Ekspresi Protein EGF 162
6.5 Mekanisme Molekuler EKM dalam Penyembuhan Luka Bakar 164
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN 167
7.1 Kesimpulan 167
7.2 Saran 168
DAFTAR PUSTAKA 170
LAMPIRAN 194

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Luka Bakar Derajat I 17
Gambar 2.2 Luka Derajat II 18
Gambar 2.3 Luka Bakar Derajat III 19
Gambar 2.4 Bagian Kulit yang terkena Luka Bakar derajat I, IIA, IIB dan III 19
Gambar 2.5 Diagram Komplikasi Luka Bakar yang Paling Sering Menyebabkan Mortalitas 20
Gambar 2.6 Fase Penyembuhan Luka (Berdasarkan Waktu dan Sel yang Terlibat) 21
Gambar 2.7 Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka 23
Gambar 2.8 Interaksi Selular dan Faktor Humoral pada Penyembuhan Luka 25
Gambar 2.9 Fase Proliferasi pada Penyembuhan Luka 27
Gambar 2.10 Peristiwa Intraseluler dan Ekstraseluler dalam Pembentukan Fibrin (A) Proses Pembentukan Kolagen (B) Gambaran *electon micrograph* dari Kolagen 28
Gambar 2.11 Mediator Kimia yang Dominan pada Tiap Fase Penyembuhan 32
Gambar 2.12 Ringkasan Proses Penyembuhan Luka 33
Gambar 2.13 Bagian-Bagian Buah Manggis 43
Gambar 2.14 Hubungan antara Penyembuhan Luka dengan ROS 48
Gambar 2.15 Pengaturan Keseimbangan Redoks yang Diatur oleh Enzim Antioksidan 49
Gambar 2.16 Mekanisme Pertahanan Tubuh untuk Menghindari Stress Oksidatif 50
Gambar 2.17 Produk Kemasan MEBO 52
Gambar 4.1 Perubahan Gross Patologis dari Aplikasi Model Luka Bakar 86
Gambar 4.2 Alat Pembuat Luka Bakar 86
Gambar 4.3 Alur Penelitian Tahap 1 90
Gambar 4.4 Alur Penelitian Tahap 2 91

Gambar 4.5 Alur Penelitian Tahap 3 92
Gambar 5.1 Kombinasi Aktivitas Antioksidan, Antiinflamasi dan Antibakteri dari Senyawa yang Terkandung dalam Kulit manggis 93
Gambar 5.2 Empat Senyawa Terpilih dengan Kombinasi Aktivitas Antioksidan, Antiinflamasi dan Antibakteria Terbaik 94
Gambar 5.3 Analisis Interaksi (*pathway*) Senyawa dalam EKM Terhadap Ekspresi Protein yang Berperan dalam Proses Penyembuhan Luka Bakar.... 94
Gambar 5.4 Analisis Jalur yang Paling Dipengaruhi EKM 95
Gambar 5.5 *Particle Size Distribution* dari EKM Tingkat Kematangan 6 99
Gambar 5.6 Hasil Analisis SEM dan EDX *spectrum* dari EKM Tingkat Kematangan 6 99
Gambar 5.7 Hasil Analisis XRD dari EKM Tingkat Kematangan 6 101
Gambar 5.8 Hasil Pengujian DPPH dari EKM Tingkat Kematangan 6 Menggunakan ESR 103
Gambar 5.9 Hasil Analisis FTIR dari EKM Tingkat Kematangan 6 104
Gambar 5.10 Kompleks Fe-γ Mangostin, Kompleks molekul dalam EKM 105
Gambar 5.11 Berbagai Macam Kompleks Molekul dalam gel MEBO 106
Gambar 5.12 Data Berat Badan Tikus Pasca Luka Bakar 107
Gambar 5.13 Data Panjang Badan Tikus Pasca Luka Bakar 108
Gambar 5.14 Data Penurunan Luas Luka Bakar 109
Gambar 5.15 Representasi Proses Penyembuhan Jaringan Luka Bakar pada EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1 111
Gambar 5.16 Kuantifikasi Infiltrasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi Menggunakan Software ImageJ 114
Gambar 5.17 Rerata Neutrofil pada Jaringan Luka Bakar dengan Berbagai Macam Perlakuan 115
Gambar 5.18 Rerata Limfosit pada Jaringan Luka Bakar dengan

Berbagai Macam Perlakuan 117
Gambar 5.19 Rerata Neovaskularisasi pada Jaringan Luka Bakar dengan
Berbagai Macam Perlakuan 119
Gambar 5.20 Ekspresi Protein IL-6 pada Hari ke-1, 7 dan 14 Menggunakan
Metode IHK 124
Gambar 5.21 Ekspresi Protein TGF-β pada Hari ke-1, 7 dan 14 Menggunakan
Metode IHK 128
Gambar 5.22 Ekspresi Protein EGF pada Hari ke-1, 7 dan 14 Menggunakan
Metode IHK 132
Gambar 6.1 Mekanisme Antioksidan, Penghelatan Logam dan Karakteristik EKM
dalam Mempercepat Penyembuhan Luka Bakar 151
Gambar 6.2 Mekanisme Molekuler Penyembuhan Luka Bakar yang Diinduksi EKM 165

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Aktivitas Makrofag Selama Penyembuhan Luka 26

Tabel 2.2 Produksi Buah Manggis di Indonesia 42

Tabel 2.3 Berat Semua Bagian dari Buah Manggis 44

Tabel 2.4 Tahapan Kematangan Buah Manggis 45

Tabel 2.5 Karakter Fisik Kulit Manggis pada Berbagai Umur Buah 46

Tabel 4.1 Formula Basis Na-CMC dan gel EKM: Formula 1 (EKM dosis 0.2 g), Formula 2 (EKM dosis 0.4 g) 88

Tabel 5.1 Skor Ekspresi Protein Berdasarkan Prediksi Interaksi (Skala 0-1) 95

Tabel 5.2 Rata-rata Konsentrasi Xanthone pada Ekstrak Kulit Mangggis Berdasarkan Analisis LCMS-MS 97

Tabel 5.3 Kandungan dari EKM Tingkat Kematangan 6 Berdasarkan EDX *spectrum* 99

Tabel 5.4 Hasil XRF dari EKM Tingkat Kematangan 6 101

Tabel 5.5 Morfologi Luka Tikus Pasca Pemberian gel EKM 109

Tabel 5.6 Kondisi Morfologi Luka Bakar 110

Tabel 5.7 Anatomi Jaringan Tikus Model Luka Bakar 112

Tabel 5.8 Analisis Statistik Infiltrasi Neutrofil 115

Tabel 5.9 Analisis Statistik Infiltrasi Limfosit Jaringan 117

Tabel 5.10 Analisis Statistik Neovaskularisasi Jaringan 119

Tabel 5.11 Representasi IHK Protein IL-6 dari Jaringan yang Terkena Luka Bakar 121

Tabel 5.12 Kuantifikasi Ekspresi Protein IL-6 pada Imunohistokimia 122

Tabel 5.13 Representasi IHK Protein TGF-β dari Jaringan yang Terkena Luka Bakar 125

Tabel 5.14 Kuantifikasi Ekspresi Protein TGF-β pada Imunohistokimia 126

Tabel 5.15 Representasi IHK Protein EGF dari Jaringan yang Terkena Luka Bakar 130

Tabel 5.16 Kuantifikasi Ekspresi Protein EGF pada Imunohistokimia 131

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sistem kehidupan merupakan sistem yang sangat kompleks. Oleh karena itu, sistem kehidupan tidak dapat dilihat lagi hanya dengan cara analisis reduksionistik yang menghasilkan simpulan berperspektif parsial, kontekstual dan antroposentrik. Sistem kehidupan harus dipandang sebagai sebuah kesatuan sistem yang kompleks (Sumitro, 2013). Salah satu kompleksitas sistem kehidupan adalah energi kehidupan. Aliran energi dalam kehidupan mengalir melalui perpindahan elektron dari suatu senyawa ke senyawa lain. Salah satu kajian dalam sistem aliran energi kehidupan adalah senyawa radikal (Masarawa & Meyerstein, 2009)

Senyawa radikal memiliki peran yang sangat penting dalam berbagai aspek kehidupan. Pengendalian keseimbangan senyawa radikal atau senyawa oksidan (*moderate oxidant/good redox balance*) sangat penting dalam tubuh untuk melaksanakan kehidupan normal (Bertini, 2009; Masarawa & Meyerstein, 2009). Senyawa radikal merupakan bagian energi kehidupan dalam sistem kekebalan, namun bila dalam jumlah berlebih dapat menimbulkan kerusakan.

Dalam kasus luka bakar sering terjadi produksi radikal yang berlebihan akibat dari luka yang terbuka dan terpapar oksigen dari udara. Radikal tersebut bisa diproduksi dari mikroba, sel-sel yang rusak maupun sel-sel kekebalan tubuh. Proses fisiologis penyembuhan luka pada kasus luka bakar berkaitan dengan keseimbangan radikal (*moderate radicals)* (Suntar *et al*., 2012; Dunnill *et al*., 2017). Senyawa radikal yang banyak ditemukan pada proses penyembuhan luka yaitu senyawa radikal dari atom oksigen atau biasa disebut oksidan. Salah satu manfaat oksidan dalam proses penyembuhan luka adalah untuk mekanisme pertahanan

terhadap bakteri dan induksi persinyalan berbagai protein penting yang berperan dalam penyembuhan luka (Sen *et al*., 2002; Suntar *et al*., 2012).

Keseimbangan radikal bebas dalam jaringan luka bakar dilakukan oleh antioksidan (endogen) berupa enzim dan antioksidan (eksogen) non-enzim. Antioksidan berupa enzim biasa disebut dengan *High Molecular Weight Antioxidant* (HMWA) dan antioksidan non-enzim biasa disebut *Low Molecular Weight Antioxidant* (LMWA) (Engwa, 2018). HMWA seperti *Catalase* (CAT), *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutation Peroksidase* (GPx), dan *Glutation Reductase* (GRx) berperan mengubah radikal bebas menjadi senyawa non-radikal melalui reaksi enzimatis dan LMWA dapat mengubah radikal bebas menjadi molekul non-radikal melalui penghelatan ion logam dan donor elektron kepada senyawa radikal. Penghelatan ion logam melalui LMWA diprediksi berperan dan memiliki potensi untuk terapeutik ketika antioksidan endogen tidak dapat menjaga keseimbangan radikal bebas pada kasus luka bakar (Engwa, 2018).

Salah satu sumber antioksidan adalah ekstrak tumbuhan atau herbal. Herbal banyak mengandung LMWA. Herbal juga memiliki berbagai aktivitas biologis yang berperan dalam penyembuhan luka bakar seperti aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri (Süntar *et al*., 2012). Hasil penelitian menunjukkan beberapa herbal mempunyai aktivitas penyembuhan luka bakar (Aliasl & Khoshzaban 2013; Avicenna, 2011; Nasiri *et al*., 2014; Pirbalouti *et al*., 2012; Rezaeizadeh *et al*., 2009). Pemanfaatan herbal ini dapat menjadi metode alternatif untuk pengobatan luka bakar yang menekan biaya pengobatan (Ji *et al*., 2016). Salah satu herbal yang memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri yang baik adalah kulit buah manggis (Suksamrarn *et al*., 2003; Widowati *et al*., 2014; 2016).

Kulit buah manggis telah digunakan dalam pengobatan di Asia Tenggara selama berabad-abad dalam mengobati penyakit infeksi kulit dan luka serta disentri amoeba (Pedraza-Chacerri *et al*., 2008; Tewtrakul *et al*., 2009). Di Indonesia, pemanfaatan kulit manggis sampai saat ini hanya sebatas sebagai suplemen kesehatan yang kini sudah banyak beredar di pasaran. Pemanfaatan kulit buah manggis sebagai obat luka luar masih belum ada di pasaran, hanya sebatas penelitian laboratorium. Berdasarkan landasan tersebut, pada penelitian ini kulit manggis *(Garcinia mangostana* Linn.) akan diformulasikan ke dalam bentuk gel ekstrak kulit manggis yang akan dimanfaatkan sebagai *wound dressing* dibandingkan dengan gel *Moist Exposed Burn Ointment* (MEBO) yang merupakan sediaan yang biasa digunakan pada penanganan kasus luka bakar.

Penelitian mengenai penggunaan LMWA sebagai pengendali radikal bebas untuk mempercepat penyembuhan luka pada model tikus luka bakar akan diteliti dengan cara: melihat kandungan xanthone serta karakterisasinya sebagai senyawa kompleks, dilanjutkan dengan membuktikan kompleks senyawa xanthone sebagai *scavenger* radikal bebas, membuat gel ekstrak kulit manggis dengan partikel ukuran nanometer untuk diaplikasikan sebagai obat luar yang membuat suasana keseimbangan radikal sehingga dapat membantu mempercepat penyembuhan luka yang akan diamati dari level makroskopik hingga ke level seluler.

Pada penelitian ini, kajian aktivitas kulit manggis sebagai bahan terapi luka bakar dilakukan menggunakan pendekatan pengendalian level energi pada luka. Pada tahap awal penelitian dilakukan secara *in silico* untuk melihat aktivitas kompleks molekul ekstrak kulit manggis sebagai obat untuk penyembuhan luka bakar melalui analisis *Quantitative structure–activity relationship* (QSAR). Analisis QSAR digunakan untuk menyeleksi senyawa yang berperan dalam proses

penyembuhan luka (Vilar & Contanzi, 2012). Proses seleksi senyawa tersebut akan memberikan informasi berupa senyawa-senyawa apa saja yang berpotensi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri dan memiliki peran untuk penyembuhan luka. Analisis QSAR dilakukan pula untuk melihat kompleksitas interaksi protein-protein yang berperan dalam penyembuhan luka bakar. Data bioinformatika ini akan menjadi data awal yang dapat dijadikan acuan dasar mengenai aktivitas dan mekanisme molekuler dari ekstrak kulit manggis (EKM) dalam menyembuhkan luka.

Setelah diketahui senyawa penting yang berperan dalam penyembuhan luka bakar melalui analisis QSAR, selanjutnya dilakukan analisis kadar senyawa tersebut menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS). Hasil analisis LCMS digunakan untuk menentukan tingkat kematangan manggis terbaik sebagai bahan terapi luka bakar. Analisis LCMS merupakan teknik analisis yang akurat untuk mengkuantifikasi senyawa dalam suatu ekstrak tanaman (Vogeser & Seger, 2008)

Selanjutnya untuk melihat adanya kompleks senyawa, struktur partikel dan aktivitas antioksidan dari kompleks molekul EKM dilakuan analisis *Particle Size Analysize* (PSA), *X-ray fluorescence* (XRF), *X-ray diffraction* (XRD), *scanning electron microscope* (SEM), *electron spin resonance* (ESR) dan *fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR). Analisis struktur partikel sangat penting dilakukan untuk mengkarakterisasi ukuran dan karakter molekul senyawa atau obat. Ukuran nano dari partikel senyawa obat terbukti mampu meningkatkan bioavailabilitas senyawa obat (Rachmawati *et al*., 2013; Onoue *et al*., 2010). Upaya membuktikan aktivitas EKM untuk membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada luka bakar, dilakukan pengujian *in vivo* melalui model tikus luka bakar. Model luka bakar pada tikus banyak digunakan oleh peneliti untuk mengevaluasi aktivitas herbal untuk terapi luka bakar (Wang *et al*., 2017, Mori *et al*., 2017; Hussan *et al*., 2018). Evaluasi

penyembuhan luka bakar dapat dilihat melalui tampilan anatomi dan morfologi. Prediksi *protein network* hasil analisis QSAR digunakan untuk melihat proses penyembuhan luka pada tikus model luka bakar. Analisis immunohistokimia (IHK) dari protein hasil analisis QSAR digunakan untuk mengevaluasi peran protein-protein dalam proses penyembuhan luka bakar (Wang *et al*., 2017, Mori *et al*., 2017; Hussan *et al*., 2018).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian mengenai aktivitas kompleks molekul EKM dalam menyembuhkan luka bakar menggunakan pendekatan *in silico* dan *in vivo* sangat penting dilakukan sebagai salah satu alternatif pencarian obat baru untuk terapi luka bakar, serta mengetahui mekanisme molekuler penyembuhan luka bakar yang diberi perlakukan dengan gel EKM. Penelitian ini juga menggali tentang kompleks struktur EKM yang dapat memberikan pengetahuan yang menyeluruh mengenai mekanisme EKM sebagai antioksidan dan pengaruhnya terhadap mekanisme seluler EKM dalam mempercepat penyembuhan luka bakar.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan berdasarkan pada latar belakang adalah sebagai berikut: “Bagaimana potensi kompleks molekul EKM dalam membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada tikus model luka bakar ?”

1.2.1 Sub Masalah

Berdasarkan permasalahan tersebut dapat dirumuskan sub masalah sebagai berikut :

1.2.1.1 Sub Masalah Penelitian Tahap 1

Bagaimana potensi xanthone dalam EKM sebagai antioksidan dan antiinflamasi pada proses penyembuhan luka bakar menggunakan analisis bioinformatika (QSAR)?

1.2.1.2 Sub Masalah Penelitian Tahap 2

1. Bagaimana kandungan dan konsentrasi bahan kompleks molekul senyawa xanthone yang memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflamasi serta berperan dalam penyembuhan luka bakar?
2. Apakah EKM memiliki bentuk, ukuran dan karakteristik yang dapat memenuhi syarat untuk dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas dan memiliki bioavailabilitas tinggi ketika dibentuk sebagai gel?
3. Apakah xanthone yang ada dalam EKM dapat membentuk kompleks senyawa dengan logam transisi?
4. Apakah EKM yang mengandung kompleks senyawa xanthone dengan logam transisi dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas?

1.2.1.3 Sub Masalah Penelitian Tahap 3

1. Bagaimana potensi dan aktivitas gel EKM pada tikus model luka bakar berdasarkan analisis histopatologi, meliputi: 1) kualitas jaringan, 2) re-epitelisasi, 3) infiltrasi neutrofil, 4) infiltrasi limfosit dan 5) neovaskularisasi?
2. Bagaimana potensi dan aktivitas gel EKM pada tikus model luka bakar berdasarkan analisis ekspresi protein hasil analisis QSAR menggunakan metode IHK?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi kompleks molekul EKM dalam membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada tikus model luka bakar.

1.3.2 Tujuan Khusus

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan khusus penelitian ini adalah:

1.3.2.1 Tujuan Khusus Penelitian Tahap 1

Untuk mengetahui potensi xanthone dalam EKM sebagai antioksidan dan antiinflamasi pada proses penyembuhan luka bakar ketika dilakukan analisis bioinformatika (QSAR).

1.3.2.2 Tujuan Khusus Penelitian Tahap 2

1. Untuk menganalisis kandungan dan konsentrasi bahan kompleks molekul senyawa xanthone yang memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflamasi serta berperan dalam penyembuhan luka bakar.
2. Untuk menganalisis bentuk, ukuran dan karakteristik EKM yang dapat memenuhi syarat untuk dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas ketika dibentuk sebagai gel.
3. Untuk mengetahui jenis xanthone yang terdapat dalam EKM yang dapat membentuk kompleks senyawa dengan logam transisi.
4. Untuk mengetahui kompleks senyawa xanthone dengan logam transisi pada EKM dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas.

1.3.2.3. Tujuan Khusus Penelitian Tahap 3

1. Untuk melihat potensi dan aktivitas gel EKM pada tikus model luka bakar berdasarkan analisis histopatologi, meliputi: 1) kualitas jaringan, 2) re-epitelisasi, 3) infiltrasi neutrofil, 4) infiltrasi limfosit dan 5) neovaskularisasi.
2. Untuk melihat potensi dan aktivitas gel EKM pada tikus model luka bakar berdasarkan analisis ekspresi protein hasil analisis QSAR menggunakan metode IHK.

1.4 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dan manfaat bagi :

1.4.1 Pengembangan ilmu pengetahuan

Manfaat pengembangan ilmu pengetahuan dari penelitian ini adalah memberikan pemahaman bahwa gel EKM dapat digunakan untuk membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada luka bakar.

1.4.2 Klinis

Manfaat klinis dari penelitian ini adalah tersedianya gel EKM yang dapat digunakan secara klinis untuk membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada luka bakar.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kajian Kompleksitas Sains dalam Proses Penyembuhan Luka

2.1.1. Kompleksitas Energi dalam Proses Penyembuhan Luka

Sistem biologi merupakan struktur yang kompleks yang harus dipandang sebagai suatu kompleksitas yang menyeluruh. Namun, banyak peneliti dibidang biologi termasuk di dunia kedokteran, masih menggunakan pandangan *reductionism,* dimana hal-hal kompleks dipecah manjadi bagian-bagian kecil dan menguji bagain-bagian kecil tersebut untuk mengetahui proses yang terjadi di dalam sistem yang kompleks (Sumitro dan Sukmaningsih, 2018). Padahal pengetahuan menyeluruh dari suatu sistem lebih baik dibandingkan dengan penjumlahan dari masing-masing pengetahuan parsial, atau dalam istilahnya "*the whole is greater and smarter than the sum of the parts*" (Sumitro, 2016).

Perkembangan pandangan kompleksitas sains mulai digali dalam ilmu biologi setelah adanya kajian nano biologi. Pendekatan nano biologi, dimana sistem kehidupan dilihat pada skala nano memberikan pengetahuan yang lebih menyeluruh mengenai mekanisme makromolekul penyusun kehidupan (Sumitro, 2016). Pengembangan persperktif kompleksitas sains dan nano biologi memberikan ide untuk menghubungkan antara fisika modern dengan ilmu biologi yang bertujuan untuk mencari pemahaman yang lebih komperhensif tentang hidup (Luisi, 2006). Nano sains membawa pada ranah berfikir yang mendaya-manfaatkan diskusi fisika modern untuk fenomena magnetik, sistem transfer partikel sub atomik hingga konstelasi posisi atom terkait struktur senyawa kompleks. Harapannya, perkembangan nano sains ini dapat berguna dalam memberikan nilai tambah bagi cara berfikir reduksionistik-analitik yang selama ini merupakan cara mengembangkan pengetahuan dalam bidang yang terkait kehidupan termasuk lingkungan (Sumitro, 2018).

Salah satu proses kompleks dalam bidang ilmu kedokteran adalah proses penyembuhan luka. Aktivitas penyembuhan luka bakar melibatkan berbagai pengaturan jumlah sel, ekspresi protein hingga pengaturan aliran energi. Aktivitas penyembuhan luka bakar melibatkan pengaturan jumlah sel dalam jaringan seperti, neutrofil, limfosit, makrofag, fibroblas, keratinosit dan sel-sel lainnya. Berbagai macam protein seperti sitokin, *growth factor,* reseptor *growth factor*, enzim perusak matrik kolagen, enzim yang berperan sebagai antioksidan, dan berbagai protein lainnya berperan bersama-sama dalam proses penyembuhan luka (Engwa, 2018; Towndsend, 2016).

Pengaturan energi juga merupakan bagian kompleksitas dalam penyembuhan luka bakar. Pengaturan energi dalam jaringan dilakukan oleh radikal bebas dan anti radikal bebas. Senyawa radikal memiliki peran yang sangat penting dalam berbagai aspek kehidupan seperti pembakaran, biokimia, fisiologi manusia dan masih banyak lagi peran lainnya. Namun, senyawa radikal memiliki peran ganda dalam sistem kehidupan. Di satu sisi, senyawa radikal berperan dalam proses biologis vital, di sisi lain senyawa radikal bertanggung jawab terhadap berbagai kerusakan biologis di tingkat molekul. Oleh karena itu, keseimbangan senyawa radikal bebas atau senyawa oksidan (*moderate oxidant*) menjadi sangat penting dalam tubuh (Bertini, 2009; Masarawa dan Meyerstein, 2009).

Untuk melakukan pendalaman mengenai kompleksitas dalam proses penyembuhan luka bakar dapat dilakuan menggunakan analisis *in silico* yang dapat memprediksi *network biology* dari protein-protein yang berperan dalam proses tertentu (Ishikawa et al., 2012). Analisis kompleks senyawa dan aktivitas antioksidan juga dapat dilakukan untuk mengetahui kompleksitas pengaturan keseimbangan energi dalam proses penyembuhan luka bakar (Sumitro dan sukmaningsih, 2018). Dengan memandang proses penyembuhan luka bakar

pada skala nano molekul hingga pengaturan energinya diharapkan dapat menghasilkan pengetahuan yang holistik mengenai proses penyembuhan luka bakar.

2.1.2 *Bio-inorganic Chemistry* dalam Penyembuhan Luka Bakar

Pertanyaan mengenai bagaimana suatu molekul secara individu mengorganisasi, berinteraksi dan berkomunikasi untuk membentuk suatu sistem kehidupan telah mendorong berkembangnya cabang ilmu baru yang disebut dengan *chemical biology* (biologi kimia). Pengertian dari ilmu *chemical biology* adalah penggunaan pendekatan kimia dan molekul-molekul kecil dalam memanipulasi atau mempengaruhi sistem biologi. Molekul-molekul kecil tersebut dapat berinteraksi dengan molekul biologis seperti DNA, protein dan senyawa biologis lain dan mempengaruhi aktivitas-aktivitas biologis yang berinteraksi dengannya (Schreiber, 2005).

Molekul-molekul kecil umumnya hanya dikenal sebagai senyawa organik. Namun senyawa-senyawa inorganik juga memiliki sejarah panjang baik di bidang biologi maupun kedokteran, di antaranya penggunaan emas dan tembaga sebagai agen penyembuhan luka bakar. Kajian mengenai peran senyawa-senyawa organik dalam bidang biologi merupakan bidang kajian yang menarik. Kajian mengenai peran senyawa-senyawa inorganik dalam bidang biologi telah lama berkembang dan termasuk kedalam kajian *bio-inorganic chemistry* (Bertini et al., 2007)

Senyawa-senyawa inorganik meliputi sebagian besar tabel periodik dan memiliki sifat-sifat yang beragam. Karakteristik yang beragam tersebut memungkinkan ion-ion logam mampu berinteraksi dengan berbagai molekul biologi. Beberapa karakteristik umum dari ion-ion logam sebagaimana dijelaskan oleh Haas dan Franz (2009) adalah:

1. **Muatan**. ion logam memiliki muatan positif pada suatu larutan, tetapi muatan ion logam dapat dimanipulasi tergantung kepada koordinasi ion logan lingkungannya. Kompleks ion logam dapat bersifat kationik, anionik maupun netral.
2. **Interaksi dengan ligan**. Ion logam berikatan melalui interaksi yang sering kali kuat dan selektif. Kompleks logam dan ligan memiliki karakteristik yang unik yang berbeda apabila ion logam atau ligan berdiri sendiri.
3. **Struktur dan ikatan**. Komplek logam-ligan mencangkup koordinasi geometri yang luas dengan struktur yang unik jika dibandingkan dengan senyawa organik. Panjang ikatan, sudut ikatan dan jumlah ikatan koordinasi bergantung pada logam dan keadaan oksidasinya.
4. **Kulit D yang hanya diisi sebagian.** Untuk logam-logam transisi nomor variable elektron terdapat pada orbital kulit d (atau f untuk lantanides) yang berakibat pada ciri-ciri elektronik dan magnetik kompleks logam.
5. **Aktivitas Redoks**. Akibat dari variabel eletron di kulit d adalah kemampuan logam transisi untuk mengalami suatu reaksi oksidasi dan reduksi (Haas dan Franz, 2009).

Kajian biologi mengambil manfaat dari ciri-ciri kimia dari logam untuk membentuk fungsi biologis khusus. Sebagai contoh, logam alkali anah Na+, K^+ dan Ca^{2+} memiliki sifat yang stabil dalam larutan. Hal ini membuat ion-ion tersebut cocok digunakan untuk memperbaiki kesimbangan muatan dan konduktivitas elektrik. Logam-logam transisi juga dapat menjadi sinyal bagi terjadinya transkripsi DNA. Logam-logam transisi juga merupakan *co-factor* bagi reaksi-reaksi enzimatis dalam tubuh (da Silva dan William, 2001).

Namun, adanya logam dalam tubuh juga memiliki resiko buruk dikarenakan logam dapat berpartisipasi pada siklus redoks dengan oksigen yang membentuk *recative oxygen species* (ROS) melalui reaksi fenton. Kapasitas katalitik dari

logam pada reaksi Fenton membutuhkan siklus antara Fe^{2+} dengan Fe^{3+} yang berarti potensial reduksi dari pusat logam merupakan kunci yang menentukan produksi ROS.

Walaupun ROS yang dihasilkan melalui reaksi Fenton bersifat merusak jaringan, namun konsentrasi ROS dalam jumlah tertentu bermanfaat dalam proses fisiologis. Pada proses penyembuhan luka bakar, ROS memiliki fungsi yang penting. Pada fase inflamasi, neutrofil dan makrofag tiba pada daerah luka dan mensekresikan sejumlah besar ROS bersama dengan *pro-inflammatory* sitokin dan enzim proteolitik seperti matrixmetaloproteinase. NADPH oxidae (NOX2) diekspresikan pada level tinggi di membran plasma dari sel *inflammatory* yang berakibat munculnya banyak anion radikal superoksida. Terbentuknya ROS ini secara langsung menyerang pathogen yang menginvasi jaringan. Oleh karena itu, level ekspresi dari enzim-enzim antioksidan seperti GPx, PRDx, SOD meningkat pada saat penyembuhan luka (Kurahashi dan Fujii, 2015). ROS juga memiliki fungsi penting dalam menginduksi angiogenesis. ROS dengan konsentrasi kecil juga diketahui memiliki peran dalam sistem persinyalan penting yang berperan dalam fungsi fisiologis. Jumlah H_2O_2 yang tepat juga meregulasi ekspresi dari VEGF, protein khusus yang memiliki fungsi sebagai angiogenesis *growth factor.* ROS juga memiliki peran dalam proses re-epitelisasi. H_2O_2 berperan sebagai inductor reseptor *epidermal groeth factor* (EGF) dan *keratinocyte growth factor* (KGF). Oleh karena itu, pengaturan jumlah ion logam dalam jaringan yang memicu timbulnya senyawa ROS melalui reaksi Fenton perlu diseimbangkan (Kurasasi dan Fujii, 2015)

Selain berfungsi dalam kesimbangan ROS dan reaksi Fenton, logam-logam transisi selain Fe juga memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka bakar (Zende et al., 2012). Beberapa literatur menyebutkan adanya elemen Fe, Ca, Zn, Cu, dan Mn dalam cairan luka yang menunjukkan bahwa elemen-

elemen ini pada konsentrasi yang tepat dapat membantu dalam proses penyembuhan luka. Konsentrasi Fe menurun dalam cairan luka setelah sehari atau dua hari pasca luka, karena sebagian besar Fe telah digunakan dalam proses penyembuhan luka. Ca juga dibutuhkan dalam berbagai proses fisiologis seperti pembekuan darah, rangsangan neuromuskular, kelengketan selular, integritas struktural pemeliharaan dan fungsi sel membran. Zn memiliki peran yang sangat penting dalam penyembuhan luka, Zn mampu meningkatkan aktivitas dan agregasi trombosit. Kekurangan Zn akan meningkatkan produksi sitokin dan memicu stres oksidatif, menghalangi kemotaksis PMN dan berkompromi perangkap ekstraseluler neutrofil. Kurangnya Zn juga mengganggu adhesi monosit. Zn berperan dalam meningkatkan populasi limfosit T, dan granulasi pembentukan jaringan. Zn terbukti meningkatkan keratinosit migrasi dan juga efektif untuk *in vivo* angiogenesis (Lin, 2017). Mn terkait erat dengan sintesis protein dan didistribusikan secara luas di jaringan mamalia (Liyanage, 2006).

Oleh karena logam-logam transisi merupakan elemen yang harus ada dalam proses penyembuhan luka bakar, maka berpotensi terjadinya reaksi Fenton yang berakibat pada peningkatan produksi radikal bebas pada jaringan luka. Oleh karena itu, logam-logam yang terdapat pada jaringan luka harus dihelat. Secara alami tubuh memiliki sistem penghelatan sendiri. *Dessferioxamin* (DFO) merupakan *chelating agent* penting yang menghambat terbentuknya reaksi fenton dan banyak diproduksi pada saat penyembuhan luka bakar (Haas dan Franz, 2009).

Oleh karena penghelatan logam merupakan proses penting dalam pengaturan radikal bebas dalam proses penyembuhan luka bakar, penggunaan *chelating agent* sebagai bahan percepatan penyembuhan luka bakar menjadi penting. Berbagai bahan alam dari tumbuhan diketahui memiliki aktivitas

penghelatan logam. Sebagai contoh, kelat dari ion Fe^{2+} oleh polifenol menghasilkan reaksi transfer elektron ketika terpapar oksigen meghasilkan Fe^{3+}-*polyphenol* kompleks dan terbentuk kompleks yang sangat stabil (Sukmaningsih et al., 2018).

2.2 Luka Bakar

2.2.1 Definisi Luka Bakar

Luka bakar adalah suatu bentuk kerusakan atau kehilangan jaringan yang disebabkan kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik dan radiasi (Grace dan Borley, 2006; Moenadjat, 2009). Luka bakar merupakan suatu jenis trauma dengan morbiditas dan mortalitas tinggi yang memerlukan penatalaksanaan khusus sejak awal (fase syok) sampai fase lanjut.

Luka bakar merupakan luka yang unik di antara bentuk-bentuk luka lainnya karena luka tersebut meliputi sejumlah besar jaringan mati yang tetap berada pada tempatnya untuk jangka waktu yang lama. Dengan cepat luka bakar akan didiami oleh bakteri patogen dan mengalami eksudasi dengan perembesan sejumlah besar air, protein, serta elektrolit (Smeltzer dan Bare, 2010).

2.2.2 Etiologi Luka Bakar

Penyebab terjadinya luka bakar antara lain: kecelakaan rumah tangga karena terpajan air/kuah panas dan tabung elpiji yang meledak pada saat memasak sebesar 60%, kecelakaan kerja karena tersengat arus listrik dan terpajan bahan kimia sebesar 20%, dan 20% sisanya karena sebab lain, misalnya: ledakan bom dan gunung meletus (Noer MS, 2006; Betz & Sowden, 2009).

2.2.3 Klasifikasi luka bakar

Klasifikasi luka bakar dapat dibagi menjadi dua, yaitu:

1. Berdasarkan Penyebabnya

Luka bakar dapat dikelompokkan menjadi luka bakar termal, elektrik dan kimia (Smeltzer dan Bare, 2010).

a. Luka Bakar Termal

Luka bakar yang disebabkan oleh cedera termal terjadi pada 70% kasus luka bakar. Penyebab cedera termal adalah api, siraman air panas, minyak panas maupun radiasi sinar matahari yang sangat menyengat. Bentuk luka yang diakibatkan oleh siraman air panas berupa luka superfisial, sedangkan yang diakibatkan oleh api berupa luka dengan kerusakan cukup berat dan dalam. Kerusakan jaringan akibat api lebih berat dibandingkan dengan air panas. Cedera luka bakar juga dapat diakibatkan suhu yang sangat rendah (*frost bite)* (Moenadjat, 2009).

b. Luka Bakar Kimia

Luka bakar karena bahan kimia terjadi kurang dari 10% dari keseluruhan kasus luka bakar. Tingkat keparahannya tergantung pada jenis, jumlah, lama kontak, luas jaringan yang mengalami kerusakan, dan kepekatan zat kimia tersebut. Bahkan kimia, terutama asam menyebabkan kerusakan jaringan yang hebat (Moenadjat, 2009).

c. Luka Bakar Elektrik

Luka bakar yang disebabkan oleh sengatan listrik terjadi pada 3-4% kasus luka bakar. Besar tegangan merupakan penentu utama dari tingkat kerusakan jaringan yang diakibatkannya. Arus listrik yang mengenai tubuh dapat terjadi kontak langsung dengansumber listrik atau karena kilatan arus listrik (Dziewulsi & Hettiaratchy, 2004; Moenadjat, 2009).

2. Berdasarkan Kedalamannya

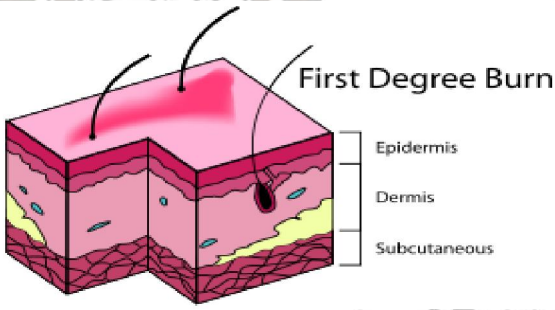
Luka bakar mempunyai kedalaman yang tidak sama. Dalamnya luka tergantung pada suhu panas, penyebab dan lamanya kontak dengan kulit

(Moenadjat, 2009). Luka bakar berdasarkan kedalaman kerusakan jaringannya dapat dibedakan atas beberapa jenis yaitu:

a. Luka Bakar Derajat I:

Luka bakar derajat I kerap diberi simbol 1°. Kerusakan jaringannya terbatas pada bagian permukaan (superfisial) yaitu epidermis, sementara dermis tetap utuh. Perlekatan epidermis dengan dermis (*Dermal – Epidermal Junction)* tetap terpelihara baik. Tampak kulit kering dan hiperemik dengan memberikan efloresensi berupa eritema.

Pasien luka bakar merasakan nyeri karena ujung-ujung saraf sensorik teriritasi. Penyembuhan luka bakar derajat I terjadi secara spontan dalam waktu 5 -7 hari. Derajat kerusakan yang ditimbulkan tidak termasuk dalam masalah klinis yang berarti dalam kajian terapeutik sehingga luka bakar derajat I tidak dicantumkan pada perhitungan luka bakar. Contoh luka bakar derajat I adalah luka bakar akibat sengatan matahari (Sabiston, 1995; Moenadjat, 2009).



Gambar 2.1 Luka Bakar Derajat I (Moenadjat, 2009)

b. Luka Bakar Derajat II (*Partial Thickness Burn)*

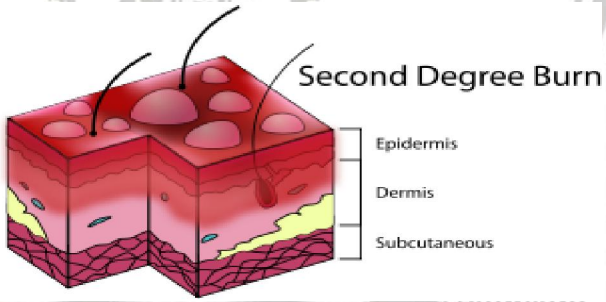
Luka bakar derajat II kerap diberi simbol 2°. Kerusakan meliputi seluruh ketebalan epidermis dan sebagian superfisial dermis. Respon yang timbul berupa reaksi inflamasi akut disertasi proses eksudasi. Timbul rasa nyeri karena ujung-ujung saraf sensorik teriritasi.Luka bakar derajat II dibedakan menjadi dua yaitu derajat II A dan II B (Moenadjat, 2009) yang dijelaskan lebih rinci di bawah ini:

1) Derajat IIA atau Dangkal (*Superficial Partial Thickness Burn)*

Pada luka bakar derajat IIA, kerusakan jaringa mengenai epidermis dan sebagian (sepertiga bagian superfisial) dermis. *Dermal-epidermal junction* mengalami kerusakan sehingga terjadi epidermolisis yang diikuti terbentuknya lepuh (bula, blister). Apendises kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, dan kelenjar sebasea masih utuh. Penyembuhan luka bakar derajat IIA memerlukan waktu antara 10-14 hari. Hal ini karena membrana basalis dan apendises kulit tetap utuh (Moenadjat, 2009).

2) Derajat IIB atau Dalam (*Deep Partial Thickness Burn)*

Pada luka bakar derajat IIB, kerusakan jaringan mengenai hampir seluruh (dua per tiga bagian superfisial) dermis. Apendises kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, dan kelenjar sebasea sebagian utuh. Kerap dijumpai eskar tipis dipermukaan luka (Moenadjat, 2009). Penyembuhan luka bakar derajat IIB memerlukan waktu lebih dari 2 minggu (Moenadjat,2009).

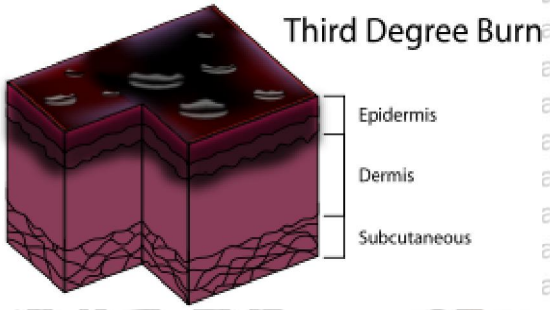


Gambar 2.2 Luka Bakar Derajat 2 (Moenadjat, 2009)

c. Luka Bakar Derajat III (Full Thickness Burn)

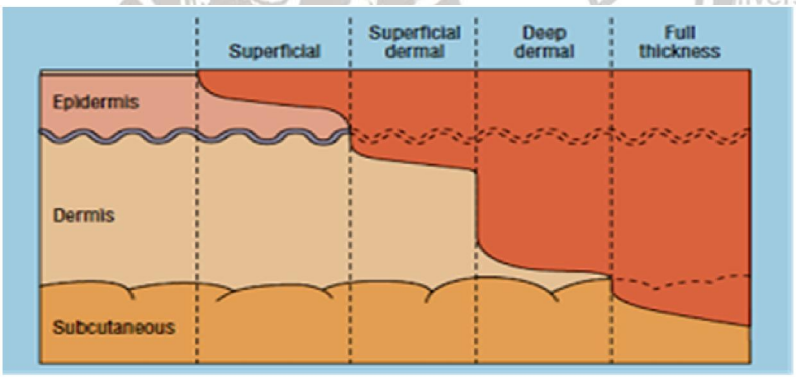
Pada luka bakar derajat III, kerusakan jaringan meliputi seluruh ketebalan dermis dan lapisan yang lebih dalam, contohnya: jaringan adipposa subkutan, fasia, otot, tulang. Tidak dijumpai bula dan apendises kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat dan kelenjar sebasea mengalami kerusakan. Kulit yang terbakar berwarna abu-abu dan pucat. Tidak dijumpai rasa nyeri, bahkan hilang

sensasi nyeri karena ujung-ujung serabut saraf sensorik mengalami kerusakan/kematian, kecuali dengan tekanan dalam. Penyembuhan luka memerlukan waktu yang sangat lama, berbulan – bulan bahkan bertahun-tahun karenatidak ada proses epitelisasi spontan baik dari dasar luka, tepi luka, maupun apendises kulit (Moenadjat, 2009).



Gambar 2.3 Luka Bakar Derajat III (Moenadjat, 2009)

Berikut ini adalah gambar yang dapat membantu menggambarkan klasifikasi luka bakar berdasarkan kedalamannya secara lebih rinci:



Gambar 2.4 Bagian kulit yang terkena luka bakar derajat I, IIA, IIB dan III (Moenadjat, 2009)

2.1.4 Komplikasi luka bakar

Komplikasi bisa terjadi pada pasien luka, antara lain:

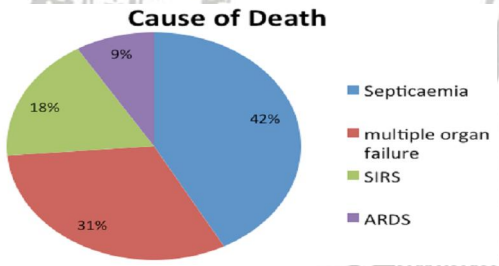
a. Infeksi

Infeksi adalah penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada pasien luka bakar terutama dengan luka bakar yang luas dan dalam (Corwin, 2003). Invasi bakteri pada luka dapat terjadi pada saat trauma, selama pembedahan atau

setelah pembedahan. Gejala infeksi sering muncul dalam 2-7 hari setelah pembedahan. Gejalanya berupa adanya purulent, peningkatan drainase, nyeri, kemerahan dan bengkak di sekeliling luka, peningkatan suhu dan peningkatan jumlah sel darah putih (Kozier, 2009). *Staphylococcus Aureus* resisten metisilin adalah penyebab tersering infeksi nosocomial pada pasien luka bakar di rumah sakit.

b. Perdarahan

Perdarahan dapat menunjukkan suatu pelepasan jahitan dan dapat menyebabkan infeksi atau erosi dari pembuluh darah oleh benda asing seperti drain. Oleh karena itu luka sebaiknya dikontrol dengan ketat selama 48 jam pertama setelah pembedahan dan setiap 8 jam setelahnya (Kozier, 2009). Komplikasi luka bakar lainnya bahkan dapat menyebabkan kematian, antara lain: *Septicaemia* (42%), *Multiple Organ Failure* / MODS (31%), *Systemic Inflammatory Response Syndrome* / SIRS (18%), *Acute Respiratory Distress Syndrome* (9%) (Martina, 2013).



Gambar 2.5 Diagram Komplikasi Luka Bakar yang Paling Sering Menyebabkan Mortalitas (Martina, 2013)

2.3 Penyembuhan Luka Bakar

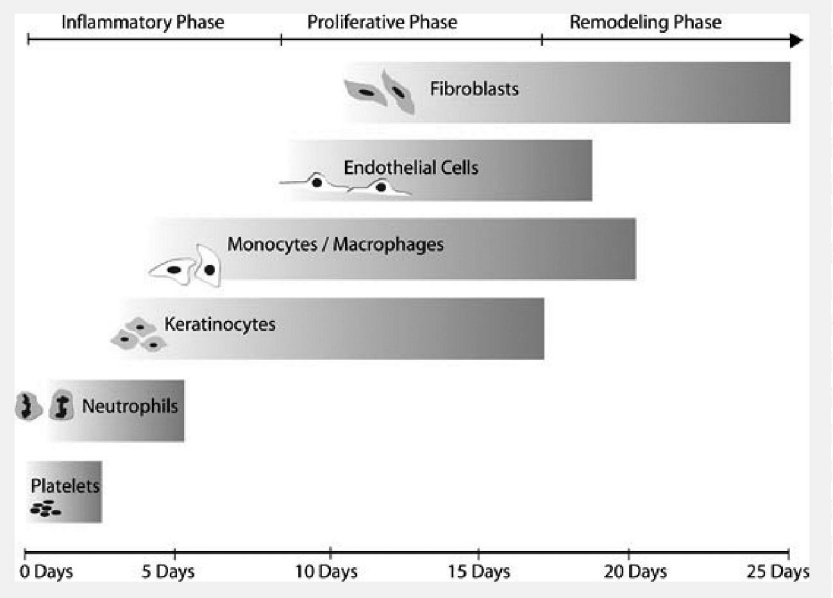
2.3.1 Definisi Penyembuhan Luka Bakar

Penyembuhan luka adalah suatu proses yang kompleks dan dinamis dengan perubahan lingkungan luka dan status kesehatan individu. Luka yang

sembuh akan kembali normal secara struktur anatomi, fungsi dan penampilan (Tarigan & Pemila, 2007).

2.3.2 Proses Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka terkait dengan regenerasi sel sampai fungsi organ tubuh kembali pulih. Fisiologi dari penyembuhan luka yang normal adalah melalui fase hemostasis/koagulasi, inflamasi, granulasi/proliferasi, dan maturasi/remodeling (Tarigan & Pemila, 2007).



Gambar 2.6 Fase Penyembuhan Luka (Berdasarkan waktu dan sel yang terlibat) (Grabb dan Smith's, 2007)

2.3.2.1 Fase koagulasi

Fase koagulasi/hemostasis berlangsung pada menit-menit awal pasca trauma/cedera luka bakar. Pada saat terjadi luka, terjadi robekan dari pembuluh darah sehingga untuk memperlambat aliran darah akan terjadi vasokontriksi (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

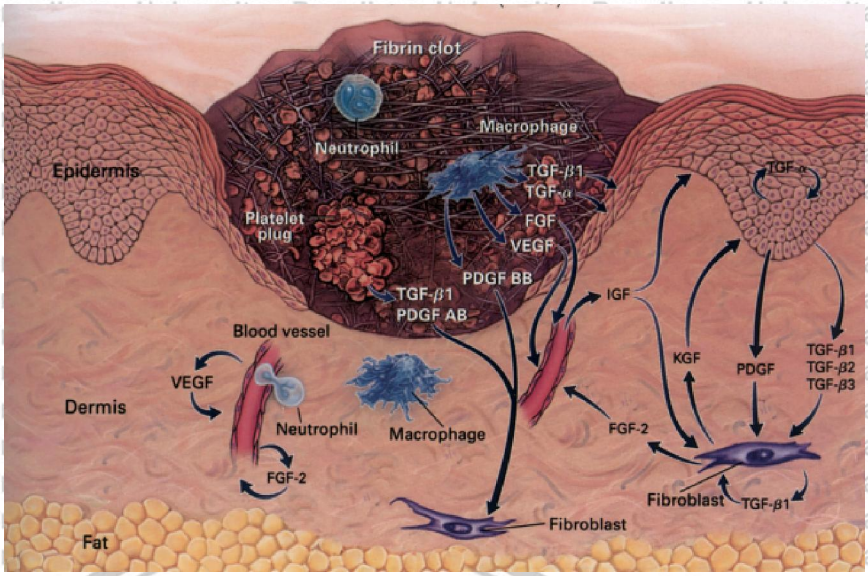
Robekan pembuluh darah itu juga menyebabkan terjadinya kontak antara kolagen subendotelial dengan platelet. Platelet berperan dalam mengontrol perdarahan (Majek *et al.*, 2010). Hal ini akan memicu terjadinya agregasi platelet, degranulasi, dan aktivasi dari rangkaian jalur koagulasi. Degranulasi dari platelet

akan melepaskan berbagai bahan yang berpengaruh secara aktif pada luka, seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor-β* (TGF-β), *platelet-activating factor* (PAF), *fibronectin*, dan serotonin (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Rangkaian koagulasi platelet dimulai dari jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Seiring dengan aktifnya platelet, membran fosfolipid mengikat factor V, sehingga dapat terjadi interaksi dengan faktor X. Aktifitas *prothrombinase* yang membrannya terikat akan meningkatkan produksi thrombin secara cepat. Thrombin itu sendiri akan mengaktivasi platelet dan mengkatalisasi perubahan fibrinogen menjadi fibrin, yang selanjutnya akan menangkap sel darah merah untuk membentuk bekuan darah yang menempel pada endotel kapiler yang rusak, dan menyebabkan terjadinya hemostasis. Selain untuk mencapai hemostasis, fibrin clot juga berperan sebagai jalan untuk terjadinya migrasi ke luka bagi sel-sel radang, seperti *polymorphonuclear leukocytes* (PMN) atau netrofil dan monosit (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

2.3.2.2 Fase inflamasi

Proses inflamasi adalah suatu perlawanan terhadap infeksi dan sebagai jembatan antara jaringan yang mengalami *injury* dan untuk pertumbuhan sel-sel baru (Suriadi, 2004). Mekanisme ini bertujuan untuk mempersiapkan jaringan agar dapat berproliferasi secara optimal dengan cara membersihkan area luka dari benda asing, sel-sel mati dan bakteri untuk dimulainya proses penyembuhan. Fase inflamasi bersifat lokal dan dimulai dalam beberapa menit setelah luka dan berlangsung selama 2 – 4 hari. Pada fase inflamasi ini, luka menunjukkan adanya tanda-tanda peradangan yaitu: kemerahan, panas, nyeri dan pembengkakan (Schwartz & Seymour, 2000).



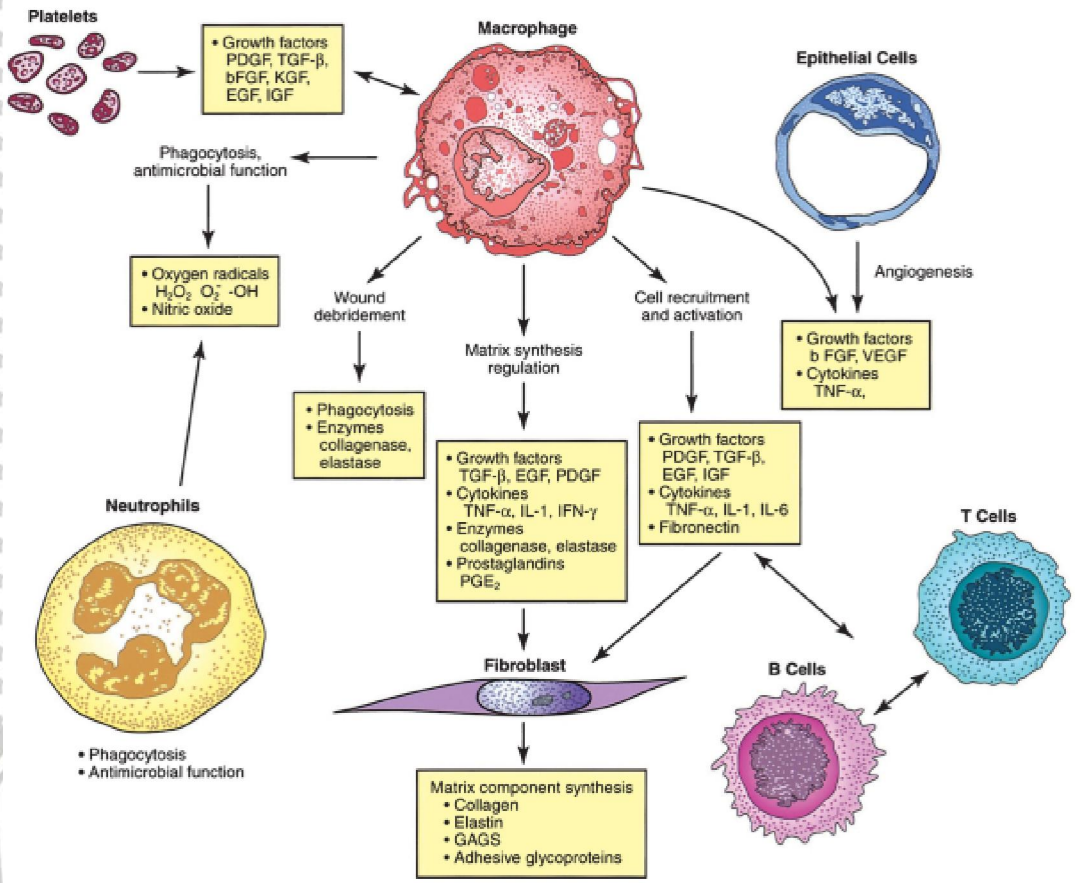
Gambar 2.7 Fase Inflamasi Pada Proses Penyembuhan Luka (Townsend, 2004)

Infiltrasi sel-sel radang ke dalam luka dimulai dengan masuknya *Polymorphonuclear leukocytes* (PMN) yang mencapai puncaknya pada 24 sampai 48 jam pertama. Bahan-bahan vasoaktif seperti serotonin yang dilepaskan saat proses degranulasi platelet, bersama dengan histamin dan serotonin yang dilepaskan oleh *mast cell* yang melekat pada permukaan sel-sel endotel, akan menyebabkan terjadinya vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah, adanya pelepasan prostaglandin pada daerah luka, dan adanya bahan-bahan kemotaksis seperti faktor-faktor komplemen, *interleukin-1* (IL-1), *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), *transforming growth factor-β* (TGF-β), faktor platelet, atau adanya produk-produk bakteri, kesemuanya akan merangsang migrasi dari netrofil ke dalam luka. Peran utama netrofil adalah fagositosis bakteri dan jaringan mati. PMN juga merupakan sumber utama dari sitokin pada awal inflamasi, khususnya TNF-α, yang mungkin berpengaruh pada proses angiogenesis dan sintesa kolagen. PMN juga melepaskan protease, seperti kolagenase, yang berperan pada proses degradasi matriks jaringan pada fase awal dari penyembuhan luka. Selain fungsi untuk menghalangi infeksi, sel ini

tidak terlihat memiliki peran pada deposisi kolagen dan pencapaian kekuatan mekanik luka. Sebaliknya faktor netrofil berimplikasi pada keterlambatan penutupan epitel pada luka (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Populasi sel kedua yang menginvasi luka terdiri dari makrofag, yang diketahui memiliki peran yang penting pada proses penyembuhan luka. Berasal dari monosit dalam pembuluh darah, makrofag mencapai jumlah yang bermakna dalam luka pada 48 sampai 96 jam setelah cedera, dan tetap ada sampai penyembuhan luka selesai. Makrofag, seperti halnya netrofil, berpartisipasi pada debridemen luka melalui fagositosis dan berkontribusi dalam menghambat pertumbuhan mikroba melalui sintesa oksigen radikal dan nitrogen monoksida (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Fungsi makrofag yang penting adalah merekrut dan mengaktivasi berbagai sel lain baik melalui mediator, seperti sitokin dan faktor pertumbuhan, maupun secara langsung melalui interaksi antar sel dan *intercellular adhesion molecules* (ICAM). Dengan melepaskan berbagai mediator, seperti TGF-β, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *epithelial growth factor* (EGF), dan laktat, makrofag mengatur proliferasi sel, sintesa matriks, dan angiogenesis (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).



Gambar 2.8 Interaksi Selular dan Faktor Humoral Pada Penyembuhan Luka (Townsend, 2011)

Gambar 2.8 menunjukkan interaksi seluler dan faktor humoral pada penyembuhan luka. Penyembuhan luka diawali dengan agregasi platelet menuju daerah yang terkena luka. Agregasi platelet menyebabkan terekspresinya sitokin dan faktor pertumbuhan. Sitokin dan faktor pertumbuhan tersebut diantaranya, TGF-β, EGF, PDGF, KGF, IGF. Sitokin-sitokin tersebut mempengaruhi aktivitas sel maktofag. Sel makrofag merupakan sel yang sangat penting dalam penyembuhan luka. Sel ini mempunyai fungsi sebagai perlindungan terhadap bakteri bersama sel neutrofil. Sel makrofag juga menghasilkan faktor pertumbuhan yang menginduksi infiltrasi sel fibroblast untuk mensekresikan matrik ekstraseluller seperti kolagen, elastin, GAGS dan glycoprotein. Sitokin-sitokin ini biasanya disebut *Macrophages Derived Cytokines.* Diantara faktor

petumbuhan tersebut adalah EGF, TGF-β, IGF, TNF-α, IL-1, IL-6 dan IFN-γ. Sel makrofag juga berperan dalam aktivasi dan infiltrasi sel-sel limfosit (Townsend, 2011). Dengan demikian, dapat dilihat bahwa makrofag memegang peranan yang sangat penting selama penyembuhan luka. Oleh karena itu aktivitas makrofag akan diringkas dan dapat dilihat pada Tabel 2.1 di bawah ini:

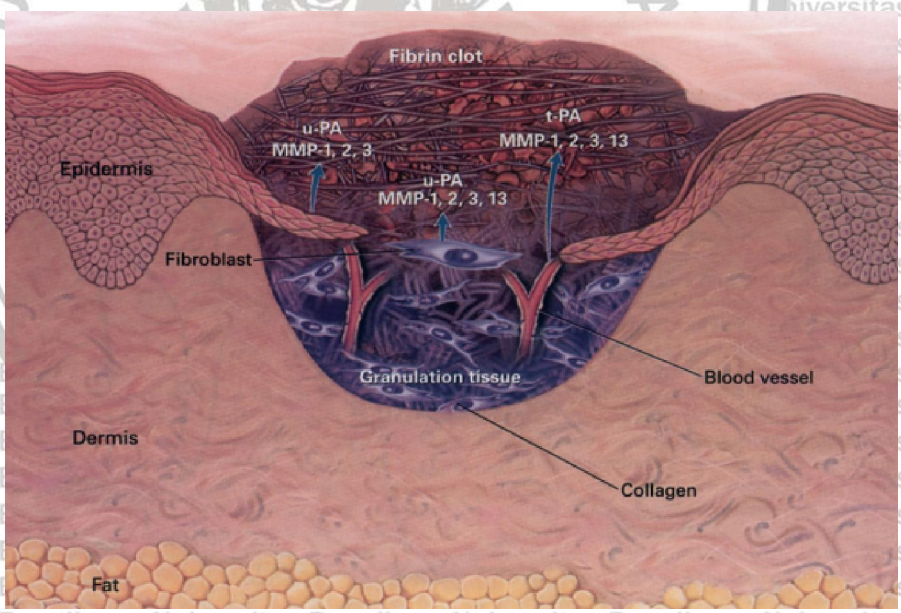
Tabel 2.1 Aktivitas Makrofag Selama Penyembuhan Luka (Schwartz, 2000)

Aktivitas	Mediator
Fagositosis	*Reactive Oxygen Species (ROS)*
	Nitric Oxide (NO)
Debridement	*Collagenase*, elastase
Merekrut dan mengaktifasi sel	*Growth factors: PDGF, TGF-β, EGF, IGF*
	Cytokines: TNF-α, IL-1, IL-6
	Fibronectin
Sistesis matrix	*Growth factors: PDGF, TGF-β, EGF*
	Cytokines: TNF-α, IL-1, IFN-γ
	Enzim: *arginase, collagenase*
	Prostaglandins
	Nitric oxide
Angiogenesis	*Growth factors: FGF, VEGF*
	Cytokines: TNF-α
	Nitric oxide

Limfosit T juga menjadi salah satu sel radang yang menginvasi luka. Dengan jumlah yang lebih sedikit dari makrofag, jumlah limfosit T mencapai puncaknya 1 minggu setelah cedera. Limfosit T diduga berperan aktif pada modulasi lingkungan luka. Penurunan jumlah Limfosit T pada luka akan berakibat menurunnya kekuatan luka dan jumlah kolagen, sementara penurunan $CD8^+$ secara selektif akan mempercepat penyembuhan luka (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

2.3.2.3 Fase proliferasi

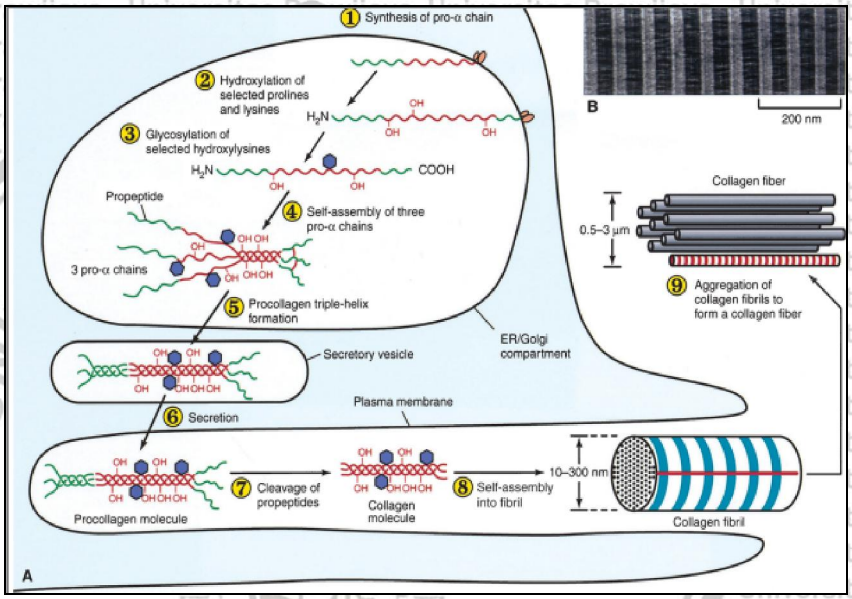
Fase proliferasi dimulai pada hari ke-4 sampai hari ke-21 setelah cedera (Morison, 2004; Barbul *et al.*, 2007). Pada fase ini kontinuitas jaringan disusun kembali. Fibroblas dan sel endotelial merupakan populasi sel terakhir yang menginfiltrasi luka, dan faktor kemotaktik terkuat untuk fibroblas adalah PDGF. Setelah memasuki ke dalam luka, fibroblas berproliferasi dan kemudian menjadi aktif dan menjalankan fungsi utama untuk membentuk matriks jaringan. Aktivasi ini dimediasi oleh sitokin dan *growth factor* yang dilepaskan oleh makrofag. Fibroblas yang terdapat pada luka mensintesa kolagen lebih banyak daripada fibroblas di tempat lain. Laktat yang terdapat pada luka merupakan regulator yang poten pada sintesis kolagen melalui mekanisme yang melibatkan *adenosine diphosphate* (ADP)-ribosilasi (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).



Gambar 2.9 Fase Proliferasi Pada Penyembuhan Luka (Townsend, 2004)

Walaupun terdapat 18 tipe kolagen, yang memiliki peranan penting pada penyembuhan luka adalah kolagen tipe I dan III. Kolagen tipe I merupakan komponen utama matriks ekstraseluler di kulit, dan kolagen tipe III yang secara

normal juga ada di kulit, menjadi lebih banyak dan penting selama proses penyembuhan luka. Sintesis kolagen, seperti halnya modifikasi *post translational*, sangat tergantung pada faktor sistemik seperti suplai oksigen yang adekuat; adanya nutrisi yang cukup (asam amino dan karbohidrat) and kofaktor (vitamins dan trace mineral) dan lingkungan lokal luka (suplai pembuluh darah dan ada tidaknya infeksi) (Barbul *et al*., 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007). Proses pembentukan kolagen dapat dilihat pada Gambar 2.10 di bawah ini:



Gambar 2.10 Peristiwa intraseluler dan ekstraseluler dalam pembentukan fibril kolagen. (A) Proses pembentukan kolagen (B) Gambaran *electon micrograph* dari kolagen (Barbul *et al.*, 2007)

Gambar 2.10 menunjukkan proses dintesis kolagen dalam sel fibroblas. Sintesis fibroblas dimulai dengan sintesis *pro α-chain* dalam kompleks golgi atau retikulum endoplasma. Pada kompleks golgi *pro α-chain* dirubah menjadi prokolagen. Prokolagen ini kemuadian disekresikan melalui vesikel sekresi. Pada saat sekresi, prokolagen mengalami pembelahan propeptidak dan membentuk molekul kolagen. Molekul kolagen kemudain berubah menjadi fibril. Fibril-fibril ini akan beragregasi menjadi serat kolagen (Barbul *et al.*, 2007)

Fibroblas juga mensintesis *glycosaminoglycan* yang merupakan substansi dasar terbesar dari jaringan granulasi. *Glycosaminoglycan* yang terbanyak terdapat dalam luka adalah dermatan dan *chondroitin sulfate* yang konsentrasinya meningkat tajam dalam 3 minggu pertama penyembuhan luka. *Glycosaminoglycan* sering kali berikatan dengan protein untuk membentuk *proteoglycan*. Hubungan antara kolagen dengan *proteoglycan* masih diteliti, diperkirakan bahwa penyusunan subunit kolagen menjadi fibril dan fiber tergantung pada pola yang dibuat oleh *sulfated proteoglycan*. Sewaktu awal kolagen dibentuk, *proteoglycan* berfungsi menjadi struktur yang menyangga kolagen. Akan tetapi seiring dengan maturasi jaringan parut dan remodeling kolagen, jumlah *proteoglycan* secara bertahap semakin berkurang (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Sel endotelial juga berproliferasi secara pesat pada fase ini. Sel-sel ini berperan pada pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), suatu proses yang amat penting pada penyembuhan luka. Sel-sel endotelial bermigrasi dari venul yang dekat dengan luka. Migrasi, replikasi, dan pembentukan kapiler baru ini dipengaruhi oleh sitokin dan *growth factors* seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), *transforming growth factor-β* (TGF-β), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Walaupun banyak sel memproduksi VEGF, makrofag merupakan sumber utama pada penyembuhan luka, dan reseptor VEGF terletak secara spesifik di sel endotelial (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Ketika integritas dan kekuatan jaringan disusun kembali, barier eksternal juga harus dipulihkan. Proses ini ditandai dengan proliferasi dan migrasi dari sel epitel di tepi luka. Proses ini dimulai pada hari 1 setelah cedera dan terlihat sebagai penebalan epidermis di sekeliling luka. Sel basal pada tepi luka terlepas dari dermis, membesar dan mulai bermigrasi menyeberang permukaan dari matriks jaringan. Sel basal disekitar luka mengalami mitosis, dan terlihat

bermigrasi dengan cara bergerak melompati satu sama lain sampai luka tertutup (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Ketika luka telah tertutup, sel epitel yang bermigrasi berubah menjadi bentuk *columnar*, dan meningkatkan aktivitas mitosisnya. Lapisan-lapisan epitel terbentuk kembali dan lapisan permukaan mengalami keratinisasi. Proses ini dinamakan epitelialisasi. Stimulus untuk re-epitelisasi masih belum diketahui secara lengkap, akan tetapi tampaknya proses ini dimediasi oleh kombinasi dari hilangnya kontak inhibisi, eksposure terhadap konstituen dari matriks ekstraseluler, biasanya *fibronectin* dan sitokin yang diproduksi oleh sel mononuklear, terutama *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF-β), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *insulin like growth factor* (IGF-1) yang telah diketahui meningkatkan epitelialisasi (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

2.3.2.4 Fase Maturasi atau Remodeling

Fase maturasi/remodelling merupakan fase terakhir dari tahap penyembuhan luka di mana jaringan granulasi berubah menjadi jaringan ikat yang matang. Fase maturasi/remodelling merupakan fase yang paling lama dalam proses penyembuhan luka. Pada manusia diperkirakan berakhir pada hari ke-21 sampai 1 tahun bahkan lebih tergantung pada kedalaman dan luas luka (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Ketika luka telah dipenuhi jaringan granulasi dan ter-re-epitelialisasi oleh migrasi keratinosit, proses remodeling luka terjadi. Proses inipun juga saling tumpang tindih, dan fase remodeling ini dimulai dengan regresi dari pembuluh darah dan jaringan granulasi dari luka (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

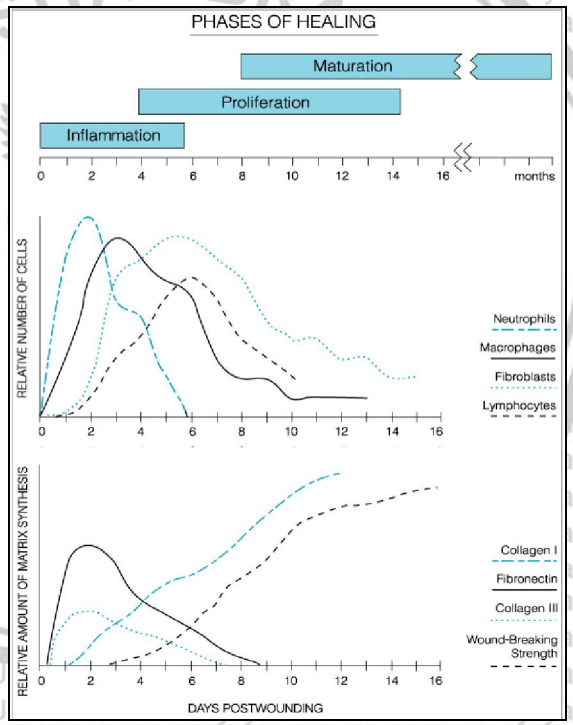
Proses remodeling ditandai dengan kontraksi luka dan remodeling kolagen. Proses kontraksi luka dihasilkan oleh miofibroblas pada luka, yang merupakan

fibroblas yang memiliki mikrofilamen actin intraseluler yang mampu menghasilkan energi dan kontraksi matriks. Masih belum jelas, apakah miofibroblas adalah sel yang berbeda dengan sel fibroblas atau apakah semua sel fibroblas mampu berubah menjadi miofibroblas pada kondisi lingkungan yang tepat. Miofibroblas kontak dengan luka melalui interaksi integrin spesifik dengan matriks kolagen (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Remodeling kolagen juga merupakan ciri dari fase ini. Kolagen tipe III yang awalnya disusun oleh fibroblas selama fase proliferasi akan digantikan dengan kolagen tipe I dalam beberapa bulan. Degradasi lambat dari kolagen tipe III ini dimediasi melalui matriks metaloproteinase yang disekresi oleh makrofag, fibroblas, dan sel endotelial. Kekuatan dari luka semakin meningkat selama proses ini menunjukkan bahwa terjadi perubahan subtipe dari kolagen dan peningkatan dari ikatan antar kolagen. Pada minggu ke-3, pada permulaan dari fase remodeling, luka memiliki sekitar 20% dari kekuatan kulit yang tidak terluka, dan pada akhir penyembuhan luka hanya mampu memiliki sekitar 70% kekuatan dari kulit yang tidak terluka (Triyono, 2005; Li *et al.*, 2007; Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

Gambar 2.11 menunjukkan sel-sel dan matrik ekstraseluller yang berperan dalam penyembuhan luka. Sel-sel yang memiliki peran penting dalam penyembuhan luka diantaranya, netrofil, makrofag, fibroblast dan limfosit. Sel netrofil merupakan sel yang naik secara drastic setelah proses luka. Sel neutrofil berperan dalam proses antibakteri pada fase awal proses penyembuhan luka. Jumlah sel neutrofil mencapai puncaknya pada jam ke-24 hingga jam ke-48. Jumlah sel makrofag mencapai puncaknya pada hari ke-3 dan terus menuruh jumlahnya hingga akhir proses penyembuhan luka. Sel makrofag ini sangat penting dalam proses remodeling dan proliferasi karena mensekresikan faktor pertumbuhan yang berfungsi menginduksi sel fibroblas untuk mensintesis matriks

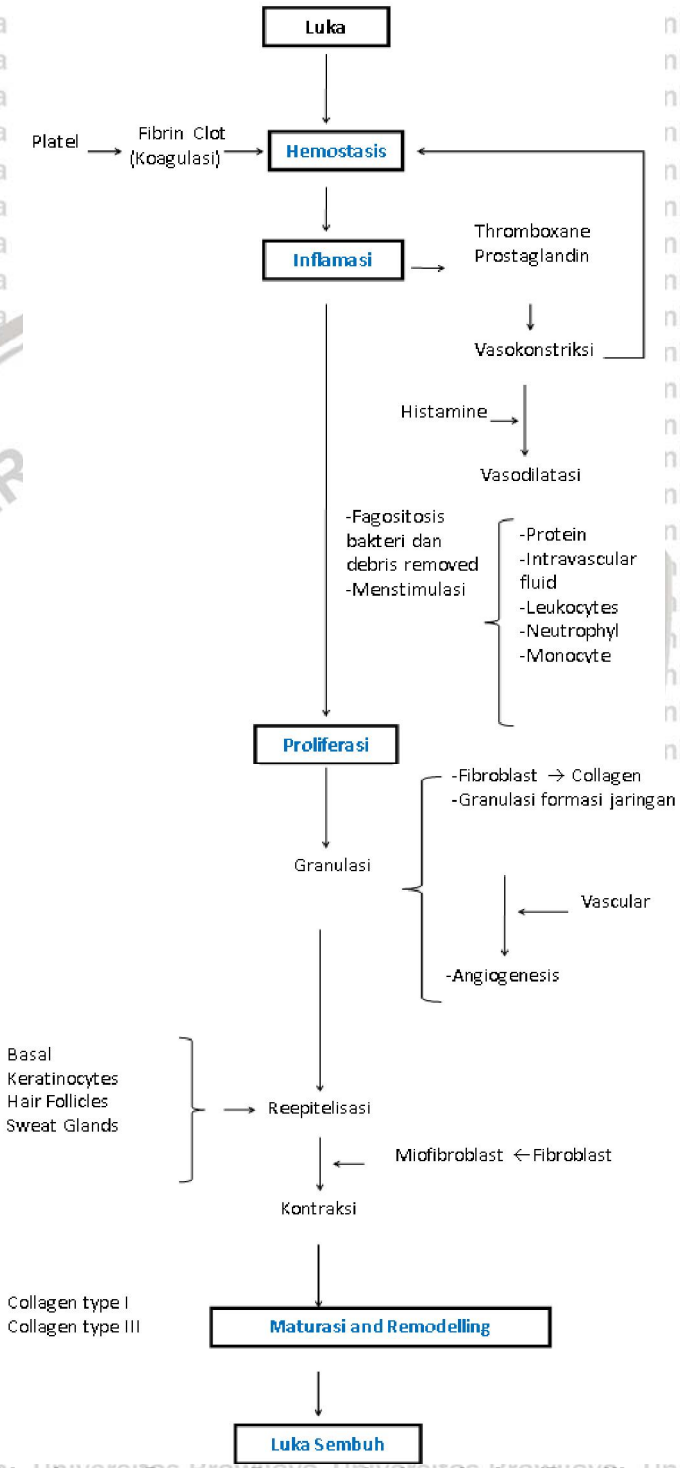
ekstraseluler. Sel fibroblas dan limfosit mencapai puncaknya pada hari ke-7. Sel fibroblast berfungsi dalam sintesis matriks ekstraseluler seperti kolagen, elastin, GAGS dan protein adhesin. Matiks esktraseluller dalam sel yang pertama kali disintesis adalah fibrinogen dan kolagen tipe III. Sekresi kolagen tipe III dan fibrinogen mencapai puncaknya pada hari ke-3. Pada hari ke-7 ekspresi kolagen tipe III menurun dan digantikan dengan sekresi kolagen tipe I. Kolagen tipe III merupakan kolagen sementara dalam jaringan selama fase proliferasi dan akan digantikan dengan kolagen tipe I dalam beberapa bulan. Degradasi lambat dari kolagen tipe III ini dimediasi melalui matriks metaloproteinase yang disekresi oleh makrofag, fibroblas, dan sel endotelial.



Gambar 2.11 Mediator Kimia yang Dominan Pada Tiap Fase Penyembuhan (Barbul, 2005)

Gambar 2.12 di bawah ini merupakan ringkasan proses penyembuhan luka yang disajikan dalam bentuk bagan. Gambar proses penyembuhan luka yang disajikan merupakan gambaran mengenai proses penyembuhan luka dari mulai fase homeostatis hingga fase remodeling berserta sel-sel dan matrik ekstraseluler yang

berperan dalam peyambuhan luka bakar. Seperti telah disebutkan sebelumnya bahwa proses penyembuhan luka bakar meliputi empat fase penting yaitu koagulasi (homeostatis), inflamasi, proliferasi dan remodeling.



Gambar 2.12 Ringkasan Proses Penyembuhan Luka (Pardjianto B, 2010)

2.3.3 Terapi Non-operatif pada Luka Bakar

Perawatan luka bakar terdiri dari beberapa bagian saling berhubungan. Setiap bagiannya memiliki tujuan yang berbeda sesuai dengan masalah aktual sedang dihadapi dalam proses penyembuhan luka bakar tersebut. Terapi non-operatif luka bakar secara umum dijelaskan sebagai berikut:

1. Pertolongan pertama

Segera setelah terbakar, luka harus segera didinginkan dengan air bersuhu 20^{o}C. hal ini dilakukan mengingat sifat kulit adalah sebagai penyimpan panas terbaik. Maka pasien yang mengalami luka bakar, tubuh masih tetap menyimpan energi panas sampai beberapa menit setelah terjadinya trauma panas. Pendinginan luka dilakukan guna mencegah pasien berada pada zona luka bakar yang lebih dalam, mengurangi perluasan kerusakan fisik sel, dehidrasi dan membersihkan luka sekaligus mengurangi nyeri.

2. Perawat Definitif

Perawatan luka meliputi pembersihan luka dan debridemen, pengolesan preparat antibiotik topikal serta pembalutan (Smeltzer dan Bare, 2010), dengan menggunakan:

a. *Normal Saline* (NS) 0,9%

Perawatan luka bakar di rumah sakit sering menggunakan cairan *Normal Saline* (NS) 0,9% dan memasang balutan yang dibasahi larutan salin (Potter dan Perry, 2005). Fungsinya adalah menjaga kelembapan luka sehingga mempercepat proses epitelisasi. *Normal Saline* (NS) 0,9% dapat membersihkan kulit yang mengalami luka bakar dari partikel (misalnya: debu atau pasir, dan lain-lain) yang dapat mengganggu penyembuhan luka (Suriadi, 2004).

b. *Hydrocolloid atau Hydrofibre*

Hydrocolloid atau hydrofibre mengandung sodium *carboxy-methylcellulose*, gelatin, pectin, elastomers dan perekat. *Hydrocolloid atau*

hydrofibre dapat meningkatkan kelembapan pada area luka dan mengangkat jaringan nekrotik secara *autolytic* (Jones, 2006; Wasiak, 2013). Keuntungannya yaitu dapat menyerap eksudat dengan baik dan dapat diganti beberapa hari sekali (Jones, 2006; Wasiak, 2013). Sementara kelemahannya hanya dapat digunakan pada luka bakar yang dangkal dan membutuhkan dressing tambahan/dressing lain untuk membalut luka (Jones, 2006; Wasiak, 2013). Contoh sediaan di Indonesia: Duoderm.

c. *Hydrogel*

Hydrogel merupakan gel *hidrophilic* yang terbuat dari *includemodified carboxymethylcellulose*, hemiselulosa, agar, glycerol dan pectin Kandungan air pada *hydrogel* ini cukup tinggi yaitu sekitar 70-96%, sehingga memberi rasa sejuk/dingin pada luka serta menciptakan dan mempertahankan lingkungan yang lembap/moist (Jones, 2006; Wasiak, 2013; Mentari & Muhartono, 2013).

Keuntungannya yaitu memiliki kelembapan yang sangat tinggi sehingga luka terasa sejuk/dingin, maka eksudat yang dihasilkan oleh luka hanya sedikit, dapat diganti beberapa hari sekali, dapat digunakan pada luka yang nekrosis (Jones, 2006; Taringan & Pemila, 2007).

Kelemahannya yaitu dapat menyebabkan maserasi dan membutuhkan dressing tambahan/dressing lain untuk membalut luka serta harganya yang mahal sehingga hanya beberapa rumah sakit yang menggunakan dan belum terjangkau luas pada masyarakat (Jones, 2006; Mentari & Muhartono, 2013; Wasiak, 2013).

d. *Alginate*

Alginate dihasilkan dari kalsium alami dan garam-garam natrium dari asam alginat ditemukan pada keluarga rumput laut coklat *(Phaeophyceae)*. *Alginate* dapat dikelompokkan menjadi 2 bagian, yaitu: 100 % kalsium alginat

atau yang mengandung kombinasi kalsium dengan natrium alginat dengan rasio 80:20 (Jones, 2006).

Alginate mengandung asam manuronat atau asam guluronat dalam jumlah tertentu sehingga mempengaruhi jumlah eksudat yang dapat diserap (Jones,2006). Keuntungannya yaitu dapat digunakan pada semua jenis luka dengan jumlah eksudat yang banyak serta merupakan absorben yang baik (Jones, 2006). Kelemahannya yaitu dapat menyebabkan maserasi dan membutuhkan dressing tambahan/dressing lain untuk membalut luka dan harus diganti setiap hari (Jones, 2006). Contoh sediaan di Indonesia: kaltostat.

e. Anti-mikroba:

Silver Sulfadiazine (SSD) adalah obat topikal luka bakar yang berfungsi mencegah dan membunuh bakteri atau infeksi jamur (Smeltzer & Bare, 2002). Komponen pokok dari krim SSD adalah sulfa yang mempunyai spektrum antibakteri luas terhadap kuman gram (+) dan gram (-). Aktivitas sulfa dapat dihambat oleh adanya darah, nanah dan hasil perusakan jaringan yang lain. Komponen lain dari krim SSD adalah silver yang mempunyai efek sebagai bakteriostatik. Apabila silver ini dikombinasikan dengan sulfadiazine akan memiliki efek potensial untuk menembus jaringan nekrotik.

Keuntungannya yaitu mudah menembus dan melepaskan eskar, dapat menembus jaringan nekrotik, tidak menghambat pertumbuhan jaringan granulasi dan epitelisasi, tidak menimbulkan nyeri, tidak meninggalkan bekas berwarna (Moenadjat, 2009). Kelemahannya yaitu memilik efek samping seperti: leukopenia, kernicterus, crystalluria, danmethemoglebinemia (Nettina & Sandra, 2010). Contoh sediaan di Indonesia: burnazin, dermazin.

2.3.4 Faktor yang Memengaruhi Penyembuhan Luka

Berikut ini akan dijelaskan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi penyembuhan luka, antara lain:

1. Faktor lokal:

a. Desikasi

Kondisi luka yang kering akan membuat sel dehidrasi dan mati, sehingga mudah terbentuk keropeng atau kerak di atas luka. Dengan demikian akan menghambat penyembuhan luka. Oleh karena itu, dibutuhkan kondisi lingkungan yang lembab untuk mempercepat migrasi sel epidermis dan mendorong epitelisasi (Hess, 2011).

b. Infeksi

Infeksi lokal mempengaruhi penyembuhan luka dengan memperpanjang fase inflamasi yang disebabkan oleh bakteri. Bakteri memperpanjang fase inflamasi dan mengganggu proses epitelisasi, kontraksi serta deposisi kolagen. Infeksi luka yang serius dapat menyebabkan sepsis bahkan kematian. Tanda-tanda klinis infeksi adalah eritema, panas, pembengkakan lokal dan adanya nyeri (Broughton dan Janis, 2006).

c. Nekrosis

Jaringan yang mati dapat menghambat penyembuhan luka. Plak dan eskar adalah dua tipe jaringan nekrosis yang terlihat pada luka. Plak meruapakan jaringan nekrosis yang berwarna kekuningan dan lembap. Eskar merupakan jaringan yang kering, tebal dan dapat berwarna kehitaman. Jaringan yang nekrosis harus segera disingkirkan agar penyembuhan luka dapat berjalan dengan baik (Hess, 2011).

d. Tekanan pada daerah luka

Ketika penekanan pada daerah luka yang berlebihan atau terus menerus, aliran darah dalam kapiler dapat terganggu sehingga dapat menghambat aliran darah di sekitar luka dan menghambat penyembuahn luka (Hess, 2011).

e. Trauma berulang dan edema

Luka akan lambat sembuh atau bahkan tidak sembuh pada keaadaan di mana luka tersebut sering mengalami trauma kembali. Contohnya: kassa yang kering dan menempel pada luka saat diganti akan dapat menyebabkan perlukaan kembali. Edema jaringan di sekitar luka yang berlebihan akan mengganggu suplai darah di sekitar luka sehingga menghambat penyembuhan luka (Hess, 2011).

2. Faktor sistemik:

a. Umur

Prognosis luka bakar umumnya sangat buruk pada usia sangat muda dan usia lanjut. Pada usia yang sangat muda terutama bayi, beberapa hal mendasar menjadi perhatian, antara lain sistem regulasi tubuh yang belum berkembang sempurna, komposisi cairan intravascular dibandingkan dengan komposisi cairan ekstravaskular, interstisium dan intrasel yang berbeda dengan kelompok manusia dewasa, sangat rentan terhadap suatu bentuk trauma. Sistem imunologik yang belum berkembang merupakan salah satu faktor yang patut diperhitungkan, karena luka bakar merupakan suatu trauma yang bersifat imunosupresif. Pada kelompok usia lanjut, proses degeneratif pada sistem, organ, dan sel merupakan salah satu faktor yang mengurangi akseptabilitas (toleransi), daya kompensasi dan daya tahan tubuh terhadap trauma (Moenadjat, 2009).

b. Status gizi atau nutrisi

Faktor yang merupakan modal seseorang dalam konteks daya tahan terhadap suatu bentuk trauma. Pada orang normal, luka bakar menimbulkan suatu bentuk stres metabolisme yang berat (katabolisme). Energi yang diperlukan untuk beraktivitas sehari-hari, menjalankan fungsi organ dan sistem

berlipat ganda karena katabolisme protein (proteolisis) pada trauma berat dan keperluan proses penyembuhan (Moenadjat, 2009).

Pada saat yang bersamaan, terjadi kehilangan energi bersama proses eksudasi luka dan penguapan *(evaporative heat loss)*. Berlangsung kekacauan sistem regulasi, kondisi ini merupakan beban yang berat sehingga cadangan energi tubuh *(lean body mass)* tidak mencukupi kebutuhan. Bila ini terjadi pada seseorang yang terkena status kekurangan gizi dapat dibayangkan betapa berbahayanya efek yang akan ditimbulkan (Moenadjat, 2009).

c. Adanya penyakit kronis

Riwayat penyakit pasien juga patut diperhatikan, contohnya: diabetes. Hambatan terhadap sekresi insulin akan mengakibatkan peningkatan gula darah sehingga mengganggu nutrisi untuk masuk ke dalam sel (Hess, 2011).

d. Sistem kekebalan tubuh yang lemah, obat-obatan dan terapi radiasi

Sistem kekebalan tubuh yang lemah dapat menghambat penyembuhan luka. Obat-obatan seperti: steroid, kemoterapi dan imunosupresan juga dapat menghambat penyembuhan luka dengan cara menekan pembelahan fibroblas dan sintesis kolagen (Suriadi, 2004). Sedangkan terapi radiasi dapat menyebabkan perlukaan atau perubahan kulit, segera setelah terapi atau setelah seluruh terapi selesai (Hess, 2011).

e. Insufisiensi pembuluh darah

Gangguan pembuluh darah karena peyakit metabolik seperti diabetes dapat mengganggu aliran darah sehingga menghambat penyembuhan luka (Hess, 2011).

2.3.5 Kriteria Luka Sembuh

Luka sembuh adalah kondisi luka dengan kriteria hilangnya pus, munculnya jaringan granulasi, terangkatnya jaringan nekrosis, terjadinya

epitelisasi dan ukuran luka mengecil dan menyatu (Handian, 2006). Idealnya luka yang sembuh kembali normal secara struktur anatomi, fungsi dan penampilan. (Tarigan & Pemila, 2007).

2.4. Peran protein EGF, TGF-β, IL-6 dalam Penyembuhan Luka Bakar

Protein Interleukin-6 (IL-6), merupakan sitokin yang penting dalam berbagai proses fisiologis dan patologis, termasuk penyembuhan luka. IL-6 adalah sitokin dengan sifat pro dan anti-inflamasi dan merupakan penanda stres, dengan kemampuan untuk menginduksi ekspresi protein fase akut (Crozier, 1994). Penurunan konsentrasi IL-6 pada plasma pada saat operasi karena pengunaan *alfentanil* diperkirakan mempengaruhi penyembuhan luka pada periode pasca operasi. IL-6 diketahui terlibat dalam semua tahap penyembuhan luka. Sitokin ini menginduksi proliferasi sel-T (Houssiau, et al., 1988) dan berkontribusi pada respon fibroblastik yang diperlukan untuk deposisi kolagen pada jaringan granulasi yang belum matang (Kohase et al, 1986). Migrasi epitel juga dipengaruhi oleh IL-6 yang melibatkan *fibronektin-dependent mecanism*, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Konsentrasi IL-6 dalam cairan luka telah dilaporkan lebih tinggi secara signifikan daripada konsentrasi plasma pada jaringan normal. Hal ini menunjukkan bahwa mediator ini dapat memainkan peranan penting dalam perbaikan jaringan (Ashcoft dan Masterson, 1994). Penelitain mengenai *knockout* dari IL-6 dan reseptor IL-6 menghambat proses infiltrasi *macrophages*, pembersihan fibrin dan kontraksi luka (McFarland-Mancinni, 2010).

Protein TGF-β (*Transforming Growth Factor*-β) atau yang disebut juga dengan *Tumor Growth Factor* merupakan faktor pertumbuhan penting dalam proses penyembuhan luka bakar. Pada tahap koagulasi TGF-β memiliki peran yang penting bersama protein TGF-α, PDGF meninduksi pembentukkan agregasi

platelet yang kemudian mengaktivasi kaskade sinyal pembentukan *fibrin colt* (Kent dan Sheridan, 2003). TGF-β juga merupakan *macrophages-derived* sitokin, Bersama protein TGF-α, PDGF, EGF, IL-1, TNF-α, Protein TGF-β memiliki peranan penting dalam inisasi dari perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). Pada fase proliferasi, protein TGF-β juga berperan dalam proses induksi fibroblas. Fibroblast merupakan sel yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka. TGF-β bersama PDGF merupakan *autocrine* dari *fibroblast*, protein ini dihasilkan oleh *fibroblast* dan menginduksi proliferasi *fibroblast*. Aktivitas dari fibroblast dalam membentuk jaringan granulasi, *collagen, fibronectin,* laminin and hyaluronan juga dipengaruhi oleh aktivitas dari protein TGF- β (Moulin, 1995). Hal ini menunjukkan bahwa protein TGF merupakan protein yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka. Pada jaringan luka bakar protein ini akan terus diekspresikan pada tahap koagulasi, inflamasi, proliferasi hingga remodeling jaringan (Kent dan Sheridan, 2003)

Protein EGF *(Epidermal Growth Factor*) juga merupakan protein penting dalam proses penyembuhan luka. Pada saat terjadi luka, protein ini terekspresi pada waktu fase koagulasi, berperan bersama protein lain dalam pembentukan fibronectin. EGF juga merupakan protein *macrophages-derived* sitokin yang berfungsi dalam dalam inisasi dari perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). EGF juga merupakan protein penting dalam tahap proliferasi, protein ini berpengaruh dalam proses deposisi matriks kolagen pada jaringan luka bakar (Moulin, 1995).

2.5 Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.)

Manggis (*Garcinia mangostana Linn.)* merupakan tanaman buah berupa pohon yang berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara

antara lain di Indonesia, Malaysia, Filipina dan Thailand. Tanaman ini kemudian menyebar ke daerah tropis lainnya ke seluruh dunia seperti India, Srilanka, Madagaskar, Amerika Tengah, Hawaii, Brazil dan Australia Utara(Nugroho, 2010; Shabella, 2011; Nurchasanah, 2013).

2.5.1 Klasifikasi Manggis

Secara taksonomi, manggis diklasifikasikan sebagai berikut (Verheij, 1997):

Kerajaan	Plantae
Divisi	Spermatophyta
Subdivisi	Angiospermae
Kelas	Dicotyledonaceae
Bangsa	Guttiferales
Famili	Guttiferae
Suku	*Garcinia*
Jenis	*Garcinia mangostana* Linn.

2.5.2 Budidaya Manggis

Pusat budidaya penanaman pohon manggis di Indonesia antara lain di Kalimantan Timur, Kalimantan Tengah, Jawa Barat (Jasinga, Ciamis, Wanayasa), Sumatera Barat, Sumatera Utara, Riau, Jawa Timur dan Sulawesi Utara (Prihatman, 2000; ICUC, 2003). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik sepanjang tahun 2000 – 2010, produksi buah manggis di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2.2 di bawah ini.

Tabel 2.2 Produksi Buah Manggis di Indonesia (Miryanti *et al.*, 2011)

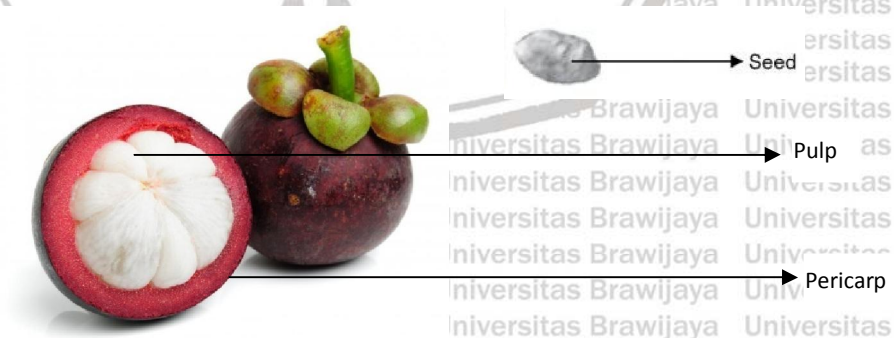
Tahun	Produksi Buah Manggis (ton)
2000	26.400
2001	25.812
2002	62.055
2003	79.073
2004	62.117

Tahun	Produksi Buah Manggis (ton)
2005	64.711
2006	72.634
2007	112.722
2008	65.133
2009	105.558
2010	87.154

Rata-rata produktivitas manggis di pulau Jawa dan Sumatra berkisar antara 5,6-8,45 ton/ha (Anonymous, 2004). Menurut data dari Badan Pusat Statistik (BPS), sentra produksi buah manggis terbesar di Indonesia berada di Provinsi Jawa Barat. Produksi buah manggis dari wilayah Priangan Provinsi Jawa Barat mencapai 38% dari produksi nasional (Nurchasanah, 2013).

2.5.3 Morfologi Buah Manggis

Buah manggis memiliki kulit buah berwarna ungu atau kemerahan dengan daging buah berwarna putih, bertekstur halus, dapat dimakan dengan rasa manis dan agak asam serta aroma yang menyenangkan (Jung *et al.*, 2006; Pedraza-Chacerri *et al.*, 2008; Tewtrakul *et al.*, 2009). Manggis mendapat julukan "*Queen of Tropical Fruits*" atau "ratu buah tropis" akibat rasanya yang paling enak diantara berbagai buah tropis (Yu *et al.*, 2009).



Gambar 2.13 Bagian-bagian buah manggis

Bagian-bagian buah manggis, antara lain: daun kelopak buah, kulit buah (*Pericarp*), daging buah (*Pulp*) dan biji (*Seed*) yang secara rinci dijelaskan melalui Tabel 2.3 berikut ini:

Tabel 2.3 Berat Semua Bagian dari Buah Manggis (Kastaman, 2007)

No	Uraian	Rata-rata	Minimum	Maksimum
1	Berat Buah Utuh	107,37 g	79,00 g	149,00 g
2	Berat Kulit Buah (*Pericarp*)	65,20 g	49,00 g	88,00 g
3	Persentase Berat Kulit Buah (*Pericarp*)	60,82 %	50,48 %	68,52 %
4	Berat daging buah	38,27 g	27,00 g	60,00 g
5	Persentase Berat Daging Buah	35,51 %	26,85 %	45,71 %
6	Berat Daun Kelopak Buah	3,90 g	3,00 g	5,00 g
7	Persentase Berat Daun Kelopak Buah	3,67 %	2,36 %	5,00 %
8	Jumlah Mata Buah	6	5	7
9	Jumlah Biji	2	1	4

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Chaovanalikit *et al*. (2012), menyatakan bahwa buah manggis tersusun dari 17% kulit buah bagian luar, 48% kulit buah bagian dalam, 31% daging buah dan 4% kelopak buah.

2.5.4 Kulit Manggis

Kulit manggis mengandung air 62,05%, abu 1,01%, lemak 0,63%, protein 0,71%, total gula 1,17% dan karbohidrat 35,61% (Yunitasari, 2011). Kulit manggis merupakan bagian tanaman manggis yang mempunyai kandungan senyawa antioksidan *xanthone* tertinggi yaitu 27 kali daripada yang ada pada daging buah manggis (Miryanti, 2011). X*anthone* yang terdapat dalam kulit buah manggis sekitar 107,76-123,97 mg per 100 g kulit buah (Iswari, 2005; Yatman, 2012).

Antosianin banyak ditemukan pada kulit buah manggis bagian luar, yaitu Cyanidin-3-glucoside (Cyn-3-glu) sebesar 179,49 mg/100g kulit buah manggis. Sedangkan banyak senyawa fenolik yang ditemukan pada kulit manggis bagian dalam seperti Gallic acid equivalent (GAE) sebesar 3,404 mg/100g kulit buah manggis (Chaovanalikit *et al.*, 2012).

Tingkat kematangan sangat berpengaruh terhadap kandungan zat-zat yang terkandung pada kulit buah manggis. Berikut ini adalah tabel yang menjelaskan tentang tahapan kematangan buah manggis.

Tabel 2.4 Tahapan Kematangan Buah Manggis (Yalapol *et al.*, 2008; Hadriyono, 2011)

Tahapan	Ciri
Tahap 0	Warna kulit buah kuning kehijauan, kulit buah masih banyak mengandung getah dan buah belum siap dipetik.
Tahap 1	Warna kulit buah hijau kekuningan, buah belum tua dan getah masih banyak. Isi buah masih sulit dipisahkan dari daging. Buah belum siap dipanen.
Tahap 2	Warna kulit buah kuning kemerahan dengan bercak merah hampir merata. Buah hampir tua dan getah mulai berkurang. Isi buah masih sulit dipisahkan dari daging.
Tahap 3	Warna kulit buah merah kecoklatan. Kulit buah masih bergetah. Isi buah sudah dapat dipisahkan dari daging kulit. Buah disarankan dapat dipetik untuk tujuan ekspor.
Tahap 4	Warna kulit buah merah keunguan. Kulit buah masih sedikit bergetah. Isi buah sudah dapat dipisahkan dari daging kulit dan buah dapat dikonsumsi. Buah dapat dipetik untuk tujuan ekspor.
Tahap 5	Warna kulit buah ungu kemerahan. Buah mulai masak dan siap dikonsumsi. Getah telah hilang dan isi buah mudah dilepaskan. Buah lebih sesuai untuk pasar domestik.
Tahap 6	Warna kulit buah unggu kehitaman. Buah sudah masak. Buah sesuai untuk pasar domestik dan siap saji.

Selanjutnya, dijelaskan tentang karakter fisik kulit buah manggis pada berbagai umur buah yang secara rinci dapat dilihat pada Tabel 2.5 berikut ini:

Tabel 2.5 Karakter Fisik Kulit Manggis pada Berbagai Umur Buah (Anonim, 2010)

Umur Buah (BSA)	Bobot Buah Utuh (g)	Tebal Kulit (cm)	Bobot Kulit Buah (g)	Bobot Kulit/ Buah Utuh (%)
1	16.50	0.82	11.82	71.20
2	46.28	1.01	36.79	79.10
3	75.51	0.93	51.48	67.91
4	74.99	0.69	47.81	63.77

Pada Tabel 2.5, dapat dilihat bahwa tebal kulit buah manggis berbeda nyata antar stadia umur buah, dengan tebal kulit terbesar pada umur 2 bulan setelah anthesis, yaitu 1,01 cm dan tebal kulit terkecil pada umur 4 bulan setelah anthesis yaitu 0,69 cm (Anonim, 2010). Bobot kulit manggis mengalami peningkatan seiring dengan umur buah. Kadangkala bobot kulit pada umur 4 bulan mengalami sedikit penurunan dibandingkan bobot kulit pada stadia umur buah 3 bulan, tetapi tidak signifikan perbedaannya (Anonim, 2010). Bobot tertinggi saat umur 3 bulan setelah anthesis yaitu 51,48 g/buah.

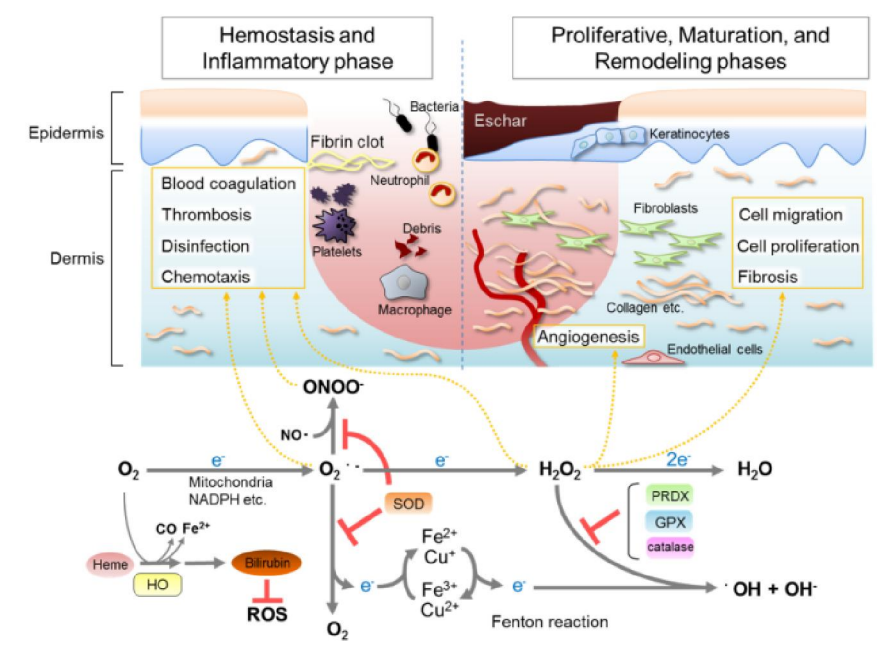
2.6. Radikal Bebas dalam Penyembuhan Luka, Kompleks Molekul Xanthone, dan Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Manggis

2.6.1 Radikal Bebas dalam Penyembuhan Luka Bakar

Radikal bebas merupakan atom atau molekul memiliki atom dengan kulit luar elektron yang tidak memiliki pasangan. Di dalam tubuh makhluk hidup, radikal bebas terbentuk dalam proses fisiologis seluler yang terjadi dalam tubuh. Radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif berfungsi dalam sistem energi sel namun dalam jumlah yang tidak terkendali dan dapat merusak berbagai macam molekul biologis seperti asam nukleat, protein, dan lemak. Diantara contoh radikal bebas yang banyak terdapat dalam sel adalah H_2O_2, hidroksi radikal, dan oksigen superoksida (Karp, 2011).

Beberapa reaksi enzimatis seperti rantai enzim dalam proses respirasi, sistem sitokrom P450 dan sintesis prostaglandin merupakan reaksi yang menghasilkan radikal bebas. Proses endogen seperti fagositosis, inflamasi, reaksi dalam mitokondria juga menghasilkan radikal bebas. Proses fisiologis di dalam tubuh seperti stress, emosi, dan penuaan juga berperan dalam pembentukan radikal bebas dalam tubuh (Engwa, 2018).

Proses penyembuhan luka bakar merupakan salah satu proses yang memicu terbentuknya radikal bebas. Dalam proses penyembuhan luka bakar, ROS memiliki fungsi yang penting. Pada fase inflamasi, neutrofil dan makrofag tiba pada fase daerah luka dan mensekresikan sejumlah besar ROS bersama dengan *pro-inflamatory* sitokin dan enzim proteolitik seperti matrixmetaloproteinase. NADPH oxidae (NOX2) diekspresikan pada level tinggi di membran plasma dari sel *inflammatory* yang berakibat munculnya banyak anion radikal superoksida. Terbentuknya ROS ini secara langsung menyerang pathogen yang menginvasi jaringan. Oleh karena itu, level ekspresi dari enzim-enzim antioksidan seperti GPX, PRDX, SOD meningkat pada saat penyembuhan luka (Kurahashi dan Fuiji, 2015). ROS juga memiliki fungsi penting dalam menginduksi angiogenesis. ROS dengan konsentrasi kecil juga diketahui memiliki peran dalam sistem persinyalan penting yang berperan dalam fungsi fisiologis. Jumlah H_2O_2 yang tepat juga meregulasi ekspresi dari VEGF, protein khusus yang memiliki fungsi sebagai angiogenesis *growth factor*. ROS juga memiliki peran dalam proses re-epitelisasi. H_2O_2 berperan sebagai inductor reseptor *epidermal growth factor* (EGF) dan *keratinocyte growth factor* (KGF). Peran dari ROS dalam penyembuhan luka, disajika dalam Gambar 2.14.

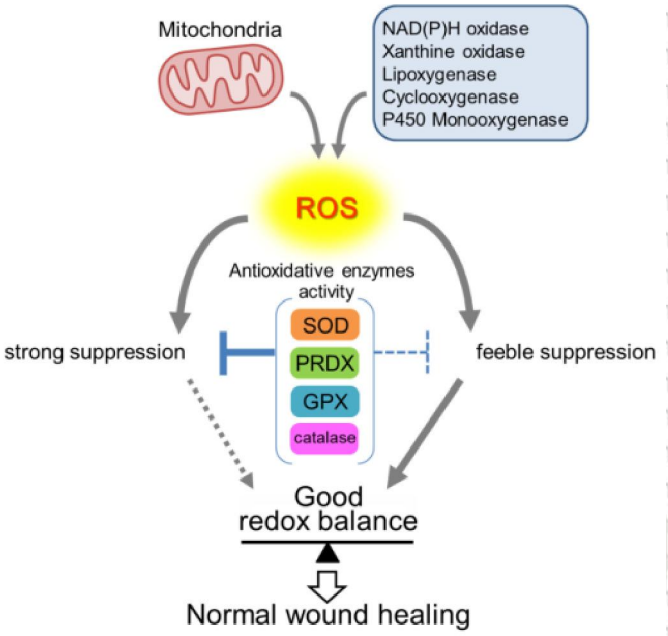


Gambar 2.14 Hubungan antara penyembuhan luka dengan *reactive oksigen species* (ROS) (Kurahashi dan Fuiji, 2015)

Gambar 2.14 menunjukkan bahwa radikal bebas berperan pada berbagai mekanisme dalam penyembuhan luka sehingga dapat dihubungkan dengan penyembuhan luka pada kasus luka bakar. Radikal bebas berperan dalam seluruh fase penyembuhan luka bakar, mulai dari homeostatis, inflamasi, proliferasi hingga remodeling. Pada fase inflamasi radikal bebas berperan dalam proses koagulasi darah, thrombosis, disinfeksi dan *chemotaxis*. Pada fase lanjutan penyembuhan luka bakar, radikal bebas berperan dalam proses migrasi sel, proliferasi sel dan fibrosis. Munculnya radikal bebas pada luka bakar dipicu oleh adanya reaksi di mitokondria dan reaksi Fenton yang diakibatkan adanya senyawa logam dalam jaringan luka (Kurahashi dan Fuijii, 2015).

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa ROS dan radikal bebas yang lain memiliki peran positif dan peran negatif dalam proses penyembuhan luka bakar. Oleh karena itu, proses pengaturan energi melalui pengaturan radikal bebas dalam penyembuhan luka bakar harus dikendalikan. Secara alami tubuh

memiliki mekanisme dalam pengaturan keseimbangan redoks yang berakibat pada penyembuhan luka bakar secara normal (Engwa, 2018). Mekanisme pengaturan kesimbangan redoks dalam jaringan luka bakar disajikan dalam Gambar 2.15.

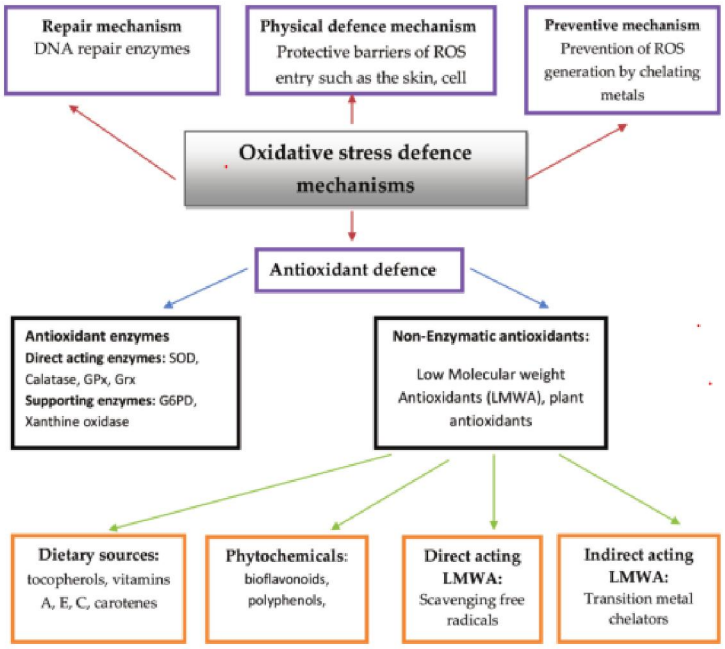


Gambar 2.15 Pengaturan kesimbangan redoks yang diatur oleh enzim-enzim antioksidan (Kurahashi dan Fujii, 2015)

Gambar 2.15 menunjukkan bahwa ROS diproduksi oleh beberapa proses oksidasi dan respirasi pada mitokondria. Proses terbentuknya ROS harus diatur karena ROS yang berlebihan bersifat sitotoksik. Pengaturan ROS dapat dilakukan melalui enzim antiokstidatif seperti SOD, PRDX, GPX dan katalase. Jumlah ROS yang optimal bergantung pada setiap proses pada luka bakar. Ekspresi enzim antioksidatif dapat ditingkatkan dan dapat ditekan sesuai kebutuhan untuk mengatur konsentrasi ROS yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka (Kurahashi dan Fujii, 2015).

Pengaruran kesimbangan redoks dalam jaringan luka bakar juga dapat difasilitasi oleh molekul LMWA. Molekul LMWA merupakan molekul dengan sifat

antioksidan yang tinggi. Pengaturan kesimbangan redoks dalam jaringan berfungsi untuk menghindarkan jaringan dari stress oksidatif (Engwa, 2018). Mekanisme pertahanan makhluk hidup menghadapi stress oksidatif disajikan dalam Gambar 2.16.



Gambar 2.16 Mekanisme pertahanan tubuh untuk menghindari stres oksidatif (Engwa, 2018)

Gambar 2.16 menunjukkan adanya pertahanan tubuh melawan berbagai macam antioksidan. Penghambatan stres oksidatif dapat dilakukan melalui penghelatan logam, pertahanan tubuh terhadap ROS melalui kulit. Penghambatan stres oksidatif juga dapat dilakukan melalui antioksidan dalam bentuk LMWA maupun antioksidan dalam bentuk enzim (Engwa, 2018).

2.6.1 Kompleks Molekul dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis

Antioksidan merupakan molekul yang dapat mengubah radikal bebas menjadi molekul atau atom yang tidak berbahaya dengan mendekomposisi, memerangkap atau mengubahnya menjadi molekul radikal bebas menjadi molekul yang tidak reaktif. Dalam tubuh, terdapat dua jenis antioksidan, yaitu antioksidan berupa enzim dan antioksidan non enzim. Antioksidan berupa enzim

adalah enzim-enzim di dalam sel yang memiliki aktivitas untuk mengubah radikal bebas menjadi molekul yang tidak reaktif. Diantara antioksidan berupa enzim adalah *superoxide dismutase* (SOD), *catalase, glutathione reductase* (GRx) dan *glutathione peroxidase* (GPx) (Engwa, 2018; Ma et al., 2017)

Antioksidan non enzim biasanya berupa senyawa *low-molecular-weight antioxidant* (LMWA) yang dapat mencegah kerusakan oksidatif dengan cara bereaksi dengan ROS secara langsung atau secara tidak langsung dengan menghelat logam. Logam transisi dapat dihelat oleh molekul LMWA yang mencegahnya dari dalam pembentukan reaksi Haber-Weiss yang dimediasi logam. Mekanisme lain dari LMWA dalam memerangkap radikal bebas adalah melalui donasi elektron ke radikal bebas yang menghindarkan kerusakan molekul biologis oleh radikal bebas (Engwa, 2018).

Pada tumbuhan, terdapat pula antioksidan, baik antioksidan dalam bentuk non enzim maupun antioksidan dalam bentuk enzim. Antioksidan dalam bentuk enzim dalam tumbuhan diantaranya adalah katalase, SOD, GPx, dan GRx. Sedangkan antioksidan dalam bentuk non enzim terdiri dari LMWA (Low *Molecular Weight Antioxidant*) seperti asam askorbat, proline, flavonoid, karotenoid, asam fenolik dan HMWA (*High Molecular Weight Antioxidant) seperti* tannin (Ma et al., 2017; Engwa, 2018).

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) telah banyak dilakukan oleh para peneliti (Sumarny et al., 2014; Tjahjani et al. 2014; Suttirak dan Manurakchinakorn, 2012). Tjahjani et al. (2014) meneliti tentang aktivitas antioksidan dari kulit buah manggis dan menemukan bahwa ekstrak dari kulit buah manggis memiliki aktivitas antioksidan yang baik melalui uji pemerangkapan DPPH, uji aktivitas SOD, dan uji total antioksidan Suttirak dan Manurakchinakorn (2012) juga mengatakan bahwa

ekstrak kulit manggis mengandung asam fenolik dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat bagus.

2.7 Aktivitas Penyembuhan Luka Bakar MEBO

Moist exposed burn ointment (MEBO) merupakan salep untuk pengobatan luka bakar dari pengobatan tradisonal china yang formulasinya dipatenkan oleh USA pada tahun 1995. Tidak seperti obat yang lain, salep MEBO dibutuhkan untuk membuat lingkungan yang lembab yang berguna untuk pengobatan yang optimal dan memicu proses re-epetelisasi (Atiyeh, 2002a; 2002b). MEBO menyediakan kelembabab fisiologis yang berfungsi untuk mengoptimalkan proses penyembuhan luka bakar dan sangat mudah diaplikasikan pada luka MEBO dijual di pasaran dengan berbagai macam merek yang berbeda. Gambar 2.17 menunjukkan kemasan salah satu produk MEBO.

Gambar 2.17 Produk kemasan MEBO

MEBO merupakan herbal murni yang berasal dari alam. MEBO terdiri dari β-sitosterol dari *Phellodendron amurense, Scuttelaria baicalensis, Coptis chinensis, Pheretima aspergillum*, lilin lebah dan minyak wijen. Efek farmakologis dari MEBO kemungkinan besar disebabkan oleh adanya kandungan-kandungan senyawa organik diantaranya, 1) β-sitosterol yang diisolasi dari *Pheretima aspergillum,* 2) Flavanoid terutama baicalin yang diisolasi dari *Scuttelaria baicalensis,* 3) Alkaloids utamanya berberine yang diisolasi dari *Coptis chinensis,* 4) lilin dari lebah dan minyak wijen (Hirsch et al., 2008).

Bahan aktif yang terkandung dalam MEBO juga merupakan bahan aktif yang berfungsi sebagai antioksidan (Li et al., 2012). Zhonghong et al. (1999) menyatakan bahwa ekstrak akar dari tanaman *Scutellaria baicalensis* memiiki aktivitas pemerangkapana DPPH. Ekstrak tanaman tersebut juga dapat berperan sebagai penghelat logam dengan membentuk kompleks molekul Fe^{2+}-ascorbic acid. Rhamnetin dari *Coptidis rhizoma* menunjukkan aktivitas antioksdian yang baik (Jiang et al. 2008). Senyawa-senyawa lain dalam ekstrak herbal yang terdapat dalam gel MEBO juga memiliki aktivitas antioksidan diantaranya phellodendrine, wogonin, dan baicalein (Li et al., 2012). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka bakar.

Penelitian Tang et al. (2014) menyatakan bahwa MEBO dapat memicu terbentuknya jaringan granulasi pada jaringan luka bakar, mempercepat waktu penyembuhan luka, meningkatkan neovaskularisasi dan meningkatkan jumlah fibroblas. MEBO berperan positif dalam mempercepat penyembuhan luka bakar melalui peningkatan ekspresi VEGF dan bFGF. Protein VEGF dan bFGF merupakan protein yang berperan dalam memicu proliferasi fibroblas dan VEGF merupakan protein yang berperan dalam proliferasi sel endotel dan memicu terjadinya angiogenesis dan peningkatan permeabilitas jaringan vaskular, serta meningkatkan deposisi kolagen.

2.8 Pengujian Senyawa Kandidat Obat Melalui Teknik Bioinformatika

2.8.1 Bioinformatika dan Seleksi Senyawa Obat

Bioinformatika merupakan bidang penelitian interdisipliner yang menggabungan kajian ilmu komputer dengan biologi. Bioinformatika mencakup teknologi yang menggunakan komputer untuk penyimpanan, pengambilan, manipulasi, dan distribusi mengenai informasi yang berhubungan dengan

makromolekul biologis seperti DNA, RNA dan protein. Tujuan utama bioinformatika adalah untuk lebih memahami sel dan bagaimana sel berfungsi pada tingkat molekuler. Dengan menganalisis urutan molekul dan data mengenai struktur molekul, penelitian bioinformatika dapat menghasilkan wawasan baru dan memberikan perspektif "global" dari sel (Xiong, 2006).

Selama dua dekade terakhir, beberapa metode bioinformatika telah dikembangkan dan diaplikasikan dalam pengembangan dan pengujian hipotesis farmakodinamik, farmakokinetik dan toksikologi. Metode-metode yang telah dikembangkan diantaranya *quantitative structure-activity relationships* (QSARs), pendekatan permodelan, analisis jaringan *docking*, dan metode-metode lain yang seluruhnya menggunakan komputer (Pelkonen et al., 2011; Ritam dan Sandeep, 2017). Peningkatan penemuan mengenai senyawa-senyawa baru dan kebutuhan akan penemuan akan senyawa baru menyebabkan bioinformatika berkembang dengan pesat untuk memudahkan manusia dalam menguji senyawa-senyawa potensial obat (Pelkonen et al., 2011). Penggunaan metode bioinformatika akan mengurangi biaya pengujian senyawa berpotensi obat dibandingkan menggunakan metode *in vivo* dan *in silico*.

Pada dasarnya perkembangan bioinformatika untuk menguji aktivitas obat didasarkan pada dua pendekatan, yaitu pendekatan berbasis struktur dan pendekatan berbasis ligan. Pendekatan berbasis ligan didasarkan kepada perhitungan sifat struktur senyawa, sedangkan pendekatan berbasis struktur didasarkan pada interaksi protein target dengan senyawa (Vilar dan Costanzi, 2012).

Pendekatan berbasis ligan bergantung kepada sifat-sifat molekul ligan yang telah diketahui tanpa memperhitungkan secara eksplisit interaksi ligan dengan protein targetnya. Metode berbasis ligan hanya dapat diterapkan ketika sifat-sifat ligan telah diketahui. Sebaliknya, pendekatan berbasis struktur

didasarkan pada perhitungan langsung interaksi antara ligan-protein dan dapat diterapkan hanya ketika struktur protein target telah dipelajari dengan baik melalui experimen maupun melalui permodelan komputasi.

2.8.2 Analisis QSAR

QSAR (*Quantitative structure-activity relationship*) merupakan suatu pendekatan untuk melihat korelasi antara struktur kima dengan aktivitas biologis atau reaksi kimia secara kuantitatif (Ishikawa, 2012). Metode QSAR mencakup sejumlah analisis bioinformatika dengan pendekatan *ligand-based analysis* yang dirancang untuk melihat korelasi antara aktivitas biologis dengan sifat-sifat molekuler senyawa yang dihitung mengunakan analisis struktur dua dimensi (2D) atau struktur ligan tiga dimensi (3D). Analisis QSAR hanya dapat dilakukan apabila suatu set ligan dengan aktivitas biologis tertentu telah diketahui, yang biasa disebut dengan istilah *training set*. Model statistik mengkorelasikan aktivitas biologis dengan sifat-sifat molekuler yang dibangun atas dasar *training set* yang kemudian diterapkan pada prediksi aktivitas senyawa baru. Di bidang GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors)*, data aktivitas biologis telah dipublikasikan untuk ligan dari banyak reseptor dan digunakan untuk menghasilkan banyak *training set*. QSAR telah banyak diaplikasikan untuk memprediksi aktifitas ligan-ligan GPCR (*G-Protein Coupled Receptors*). Akan tetapi untuk reseptor yang kurang dipelajari atau ketidakadaan ligan-ligan yang tidak diketahui menjadi penghambat utama dari aplikasi analisis bioinformatika dengan pendekatan *ligand-based analysis* (Costazi, et al., 2009)

Analisis QSAR membutuhkan perhitungan mengenai molekuler *descriptor* berupa topologi atau karakteristik fisiokimia dari molekul. Apabila sebuah *descriptor* telah diketahui untuk seluruh dataset, korelasi antara *descriptor* dengan aktivitas eksperimantal dipelajari menggunakan analisis statistik,

diantaranya regresi linear, *multiple linear regression* (MLR), atau regresi *partial least square* (PLS) (Vilar dan Constanzi, 2012)

Model QSAR sangat bergantung dengan *training set* yang ada di alam. Metode QSAR memiliki daya prediktif tinggi apabila diaplikasikan untuk struktur yang memiliki hubungan dengan molekul yang terdapat dalam training set, akan tetapi memiliki daya prediktif rendah apabila diterapkan pada molekul dengan struktur yang beraneka ragam. Jadi, untuk memastikan kekuatan prediktif yang kuat, analisis QSAR harus dibatasi untuk analisis senyawa dengan karakteristik molekuler yang terwakili dengan baik dalam *training set* (Vilar dan Costanzi, 2012).

2.9 Analisis Struktur Mikro dan *Trace Element* Bahan Baku Obat

Karakteristik fisika dan kimia dari 6 tingkat kematangan ekstrak kulit manggis dilakukan dengan metode berikut:

2.9.1 Pengujian Ukuran dan Distribusi Partikel Menggunakan PSA

2.9.1.1 Definisi PSA

PSA (*particle size analyzer*) adalah alat yang dapat digunakan untuk menganalisis ukuran partikel dan distribusinya dari sampel yang representatif. Distribusi ukuran partikel dapat diketahui melalui gambar yang dihasilkan. Ukuran tersebut dinyatakan dalam jari-jari untuk partikel yang berbentuk bola. Penentuan ukuran dan distribusi partikel menggunakan PSA dapat dilakukuan dengan (1) difraksi sinar laser untuk partikel dari ukuran submikron sampai dengan milimeter, (2) *counter principle* untuk mengukur dan menghitung partikel yang berukuran mikron sampai dengan milimeter, dan (3) penghamburan sinar untuk mengukur partikel yang berukuran mikron sampai dengan nanometer (Etzler, 2004).

2.9.1.2 Prinsip Kerja PSA

Pengukuran menggunakan PSA didasarkan pada prinsip metoda *dynamic light scattering* (DLC), yaitu interaksi cahaya dengan partikel melalui 4 cara, yaitu: difraksi, refleksi, absorpsi dan refaksi. Sumber cahaya laser dilewatkan ke dalam sampel dan detektor mengukur cahaya yang dihamburkan karena gerak Brown partikel koloid. PSA berdasarkan difraksi laser dimana partikel dengan ukuran berbeda akan menghamburkan cahaya pada sudut berbeda. Partikel besar akan menghambur dengan sudut kecil sedangkan partikel kecil akan menghambur dengan sudut besar. Hasil pengukuran PSA menggunakan metode difraksi laser didapatkan distribusi volume ukuran partikel (Prasmita, 2012; Galuh dan Rahmi, 2014).

2.9.1.3 Hasil Analisis PSA

Karakteristik dari sebaran partikel didasarkan pada sebaran partikel dalam intensitas dengan metode kumulan. Garis horizontal menunjukkan partikel yang terukur pada alat PSA dan garis vertikal menunjukkan rentang ukuran dari sampel yang diuji. Suatu partikel bahan dapat digolongkan sebagai partikel nano jika memiliki ukuran antara 1-100 nm. Makin halus suatu partikel makin besar pula luas permukaan yang dapat meningkatkan reaktivitas material. Material dalam skala mikrometer umumnya menunjukkan sifat-sifat yang sama dengan *bulk*-nya maka material ukuran nanometer dapat menunjukkan sifat fisik yang berbeda dari *bulk*-nya (Prasmita, 2012).

2.9.2 Pengujian Ukuran Mikro Menggunakan SEM

2.9.2.1 Definisi SEM

SEM merupakan sejenis mikroskop yang menggunakan elektron sebagai pengganti cahaya untuk melihat benda dengan resolusi tinggi. Analisis SEM bermanfaat untuk mengetahui struktur mikro (termasuk porositas dan bentuk retakan) benda padat (Gunawan, 1979). Alat SEM terdiri atas bagian-bagian,

yaitu sumber elektron (*electron gun*) berupa filamen kawat wolfram, alat untuk mencacah (*scanner*) titik-titik sepanjang spesimen berupa sistem lensa elektromagnetik dan foil pencacah elektromagnetik, seperangkat lensa elektromagnetik untuk memfokuskan elektron dari sumber menjadi titik kecil di atas spesimen, sistem detektor, serta sistem layar (Rohaeti, 2009).

2.9.2.2 Prinsip Kerja SEM

Prinsip kerja SEM yaitu peristiwa interaksi antara sinar elektron dengan spesimen padatan. Gelombang elektron yang dipancarkan *electron gun* terkondensasi di lensa kondensor dan terfokus sebagai titik yang jelas oleh lensa objektif. *Scanning coil* yang diberi enegi menyediakan medan magnetik bagi sinar elektron. Berkas sinar elektron yang mengenai cuplikan menghasilkan elektron sekunder dan kemudian dikumpulkan oleh detektor sekunder atau detektor *backscatter*. Gambar yang dihasilkan terdiri dari ribuan titik berbagai intensitas di permukaan *cathode ray tube* (CRT) sebagai topografi gambar. Pada sistem ini berkas elektron dikonsentrasikan pada spesimen, bayangan diperbesar dengan lensa objektif dan diproyeksikan pada layar (Kroschwitz, 1990).

2.9.2.3 Hasil Analisis SEM

Gambar yang dihasilkan oleh SEM memiliki resolusi tinggi tiga dimensi yang dapat digunakan untuk menentukan struktur mikro permukaan dari sebuah sampel. Morfologi dari suatu sampel dapat dilihat dari tiga sisi, yaitu: permukaan atas, permukaan samping, dan permukaan ruang dalam (Gunawan, 1979).

2.9.3 Pengujian Mineral Kualitatif Menggunakan XRD

2.9.3.1 Definisi XRD

XRD merupakan suatu alat yang digunakan untuk menganalisis sistem kristal pada material yang diuji. XRD dapat memberikan informasi mengenai jenis

struktur, parameter kisi, susunan atom yang berbeda pada kristal (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

2.9.3.2 Prinsip Kerja XRD

Prinsip kerja dari XRD ini menggunakan difraksi sinar X yang dihamburkan oleh sudut kristal material yang diuji. Komponen utama pada XRD ini terdiri dari tabung katoda, sampel holder dan detektor. XRD akan memberikan data difraksi dan juga kuantitasi intensitas difraksi pada sudut dari suatu bahan. Setiap pola yang muncul pada pola XRD mewakili satu bidang kristal yang memiliki orientasi tertentu. Berkas sinar-X yang dihamburkan ada yang saling menghilangkan dan saling menguatkan (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

2.9.3.3 Keunggulan dan Keterbatasan XRD

Keunggulan metode XRD yaitu memberikan cara yang cepat, teliti, tidak menimbulkan kerusakan pada cuplikan, digunakan untuk mengidentifikasikan fasa-fasa kristal yang terdapat dalam suatu material, untuk membedakan berbagai oksida yang terdapat dalam material (misalkan FeO, Fe_2O_3, Fe_3O_4) (Pusat penelitian metalurgi dan material, 2018).

Selain dari kelebihan XRD diatas, pastinya XRD juga mempunyai keterbatasan, yaitu tidak dapat digunakan untuk analisa kuantitatif, sehingga XRD tidak dapat kita gunakan untuk menghitung jumlah dan kadar dari mineral-mineral tersebut. Biasanya, XRD digunakan untuk menghitung analisa jumlah yang tidak harus akurat. (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

2.9.4 Pengujian Mineral Kuantitatif Menggunakan XRF

2.9.4.1 Definisi XRF

XRF merupakan suatu alat yang digunakan untuk menganalisa komposisi kimia dan juga konsentrasi unsur-unsur yang terkandung dalam material dengan menggunakan metode spektometri. XRF hampir sama dengan XRD, tetapi

bedanya XRF dapat mengukur secara kualitatif dan juga kuantitatif (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

2.9.4.2 Prinsip Kerja XRF

Analisa menggunakan XRF dilakukan berdasarkan dengan identifikasi dan pencacahan karakteristik sinar-X yang terjadi akibat adanya efek fotolistrik. Elektron dikulit yang lebih dalam (kulit K) akan terpental keluar dari atom karena adanya sinar-X yang datang, maka dari itu terjadi kekosongan atau *vacancy* elektron (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

Selanjutnya karena terjadi kekosongan pada kulit K, elektron pada kulit L dan M takan turun disertai dengan emisi sinar X yang khas sehingga hal tersebut mengakibatkan kekosongan pada kulit L dan M. Ketika terjadi kekosongan pada kulit L, maka elektron pada kulit M dan N akan turun dengan disertai sinar-X. Spektometri XRF memanfaatkan sinar X yang dipancarkan oleh bahan yang selanjutnya ditangkap oleh detektor untuk dianalisis kandungan unsur dalam material tersebut (Smallman et al, 1999, Callister et al, 2007).

2.9.4.3 Keunggulan XRF

Analisis menggunakan alat spektrometer XRF untuk bahan organik memiliki keuntungan yaitu dapat menentukan hampir semua mineral yang ada dalam satu kali pengukuran. Selain itu, sampel yang diperlukan relatif sedikit (sekitar 1 gram), dapat menganalisis tanpa adanya standar, memiliki akurasi dan ketelitian yang tinggi (Manggara, 2018).

2.9.5 Pengujian Kadar Senyawa Aktif Menggunakan LC-MS

2.9.5.1 Definisi LC-MS

LC-MS atau kromatografi cair-spektrometri massa adalah salah satu teknik kimia analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik kromatografi cair atau *liquid chromatography* dengan kemampuan analisis massa spektrometri massa (MS) (Vogeser dan Seger, 2008).

2.9.5.2 Prinsip kerja LC-MS

LC-MS bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi molekul (m/z). Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (ion source) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS umumnya menggunakan beberapa jenis sumber ion dan analisis massa yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa (Agilent Technologies, 2001).

2.9.5.3 Hasil Analisis LC-MS

Teknik gabungan ini dapat digunakan untuk menganalisis senyawa biokimia, organik, dan anorganik yang umum ditemukan pada sampel kompleks yang berasal dari lingkungan dan biologi. Oleh karena itu, LC-MS dapat diterapkan di berbagai sektor termasuk bioteknologi, pemantauan lingkungan, pengolahan makanan, dan industri farmasi, agrokimia, dan kosmetik (Kimia LIPI, 2018).

2.9.5.4 Keunggulan LC-MS

Keunggulan dari teknologi LC-MS yaitu: hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrofotometer massa sebagai detektor, aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis karena penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da), mampu mengukur analit yang sangat polar, persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi, dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Vogeser dan Seger, 2008).

2.10. Analisis Antioksidan dan Kompleks Struktur dari EKM

2.10.1 Analisis ESR

ESR merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan secara langsung untuk mengukur kadar radial bebas. ESR digunakan secara luas pada pengujian

radikal bebas baik pada bidang kimia maupun sistem biokimia. Pengukuran radikal bebas menggunakan ESR didasarkan pada fakta dimana elektron yang tidak berpasangan dari radikal bebas memiliki momen magnetik yang berasosiasi dengannya dan dapat dijajarkan baik dengan sebuah medan magnet ekstrenal secara pararel maupun antiparalel. Tingkat energi dari momen magnetik elektron yang tidak berpasangan lebin tinggi untuk persekutuan antiparalel dibandingkan dengan persekutuan paralel, hal ini menunjukkan bahwa perbedaan energi dipengaruhi oleh variasi medan magnet eksternal (Jackson, 1999).

Konsep ESR sendiri juga dapat dijelaskan melalui perilaku dari elektron bebas. Dimana elektron bebas yang diamati pada ESR mengalami penyerapan resonan energi elektromagnetik pada transisi spin elektron. Elektron yang tidak berpasangan pada radikal bebas mempunyai spin ±½. Dalam medan magnet terdapat dua tingkat magnetik yaitu +½ dan –½ dengan energi yang berbeda (Jeaperson dan Brady, 2012). Berdasarkan teori kuantum, elektron memiliki spin yang dapat dipahami sebagai momentum sudut yang mengemukakan momen magnetik. Muatan pada elektron juga berputar dan merupakan arus listrik yang beredar. Arus listrik yang mengalir menginduksi momen magnetik (μ) ketika elektron dipengaruhi atau dikenai oleh medan magnetik stabil H.

ESR merupakan suatu spektroskopi molekul atau ion yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Informasi yang diperoleh dari spektrum ESR meliputi:

1. Faktor-g
2. Pemisahan dari spektrum akibat interaksi spin magnetik dalam radikal
3. Bentuk pita (Jackson, 1999).

Nilai faktor-g bergantung pada struktur elektron bahan dan orientasi molekul dalam medan magnet, karena medan magnet yang diberikan dapat menggeser elektron disepanjang molekul oleh karena itu nilai faktor-g yang

diperoleh tersebut dapat memberikan informasi structural dari suatu senyawa. Nilai faktor-g sendiri dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi suatu bahan yang bersifat radikal bebas (Jackson, 1999).

Analisis ESR sangat baik digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan dari larutan kimia. Namun, penggunaan ESR untuk bahan biologis terutama jaringan sangat terbatas. Jaringan yang aktif bermetabolisme seperti otot dan hati menunjukaan sebuah sinyal radikal bebas menggunakan radikal bebas ketika dipelajari dalam bentuk beku. Sinyal yang terbentuk sangat komplek tetapi berhubungan dengan kuinon mitokondria (Jackson dan Johnson, 1989). Hal ini menujukkan bahwa analisis ESR untuk analisis molekul biologis masih sulit untuk diterapkan (Jackson dan Johnson, 1989)

2.10.2 Analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Analisis FTIR digunakan untuk melihat adanya gugus fungsional dari suatu senyawa atau ekstrak. Organisme hidup terdiri atas senyawa organik karbon yang secara kovalen berikatan karbon, hidrogen, oksigen dan nitrogen. Kemampuan atom karbon untuk membentuk ikatan tunggal dan ganda dengan sesamanya, yang memungkinkan pembentukan struktur dengan mengikat berbagai gugus fungsional (Coates, 2000). Analisis FTIR juga dapat digunakan untuk melihat adanya kompleks molekul logam transisi-senyawa organik (Miller dan Wilkins, 1952).

Spektrofotometer FTIR merupakan salah satu alat yang dapat digunakan untuk identifikasi senyawa, khususnya senyawa organik, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis dilakukan dengan melihat bentuk spektrumnya yaitu dengan melihat puncak-puncak spesifik yang menunjukan jenis gugus fungsional yang dimiliki oleh senyawa tersebut. Analisis FTIR memiliki beberpa kelemahan dan kebihan. Kelebihan FTIR adalah universal, murah, sensitif, menghasilkan data yang lengkap, relatif cepat dan mudah. Kelemahan FTIR adalah tidak dapat

mendeteksi beberpa molekul, sulit untuk mengidentifikasi campuran, dan adanya kandungan air dalam senyawa dapat mempengaruhi hasil analisis (Smith, 2011).

2.11 Analisis Anatomi dan Ekspresi Protein dalam Studi Luka Bakar

2.11.1 Histologi

Histologi atau disebut juga dengan mikroanatomi merupakan studi tentang anatomi dari sel atau jaringan dari tumbuhan atau hewan. Studi histologi umumnya dipelajari menggunakan mikroskop cahaya atau mikroskop elektron dari spesimen yang telah dipotong, diwarnai dan diamati dalam mikroskop. Pada penelitian ini, analisis histologi digunakan dalam pengamatan anatomi penyembuhan luka bakar. Analisis histologi akan memberikan data mengenai gambaran penyembuhan luka secara anatomi dari jaringan luka yang terkena luka bakar (Bock, 2015).

2.11.2 Immunohistokimia

IHK merupakan proses pencitraan antigen (protein) tertentu pada sel di dalam sayatan jaringan yang memanfaatkan prinsip *antibody monoclonal* yang mengikat antibodi tertentu Istilah Immunohistokimia berasal dari immune yang merujuk pada antibody dan histo yang merujuk pada jaringan (Ramos-Vara, et al., 2014). IHK merupakan aplikasi dari prinsip antibodi monoclonal yang penting yang bermanfaat untuk menentukkan distribusi antigen tertentu dalam jaringan, baik jaringan sehat maupun jaringan yang sakit (Duraiyan, et al. 2012).

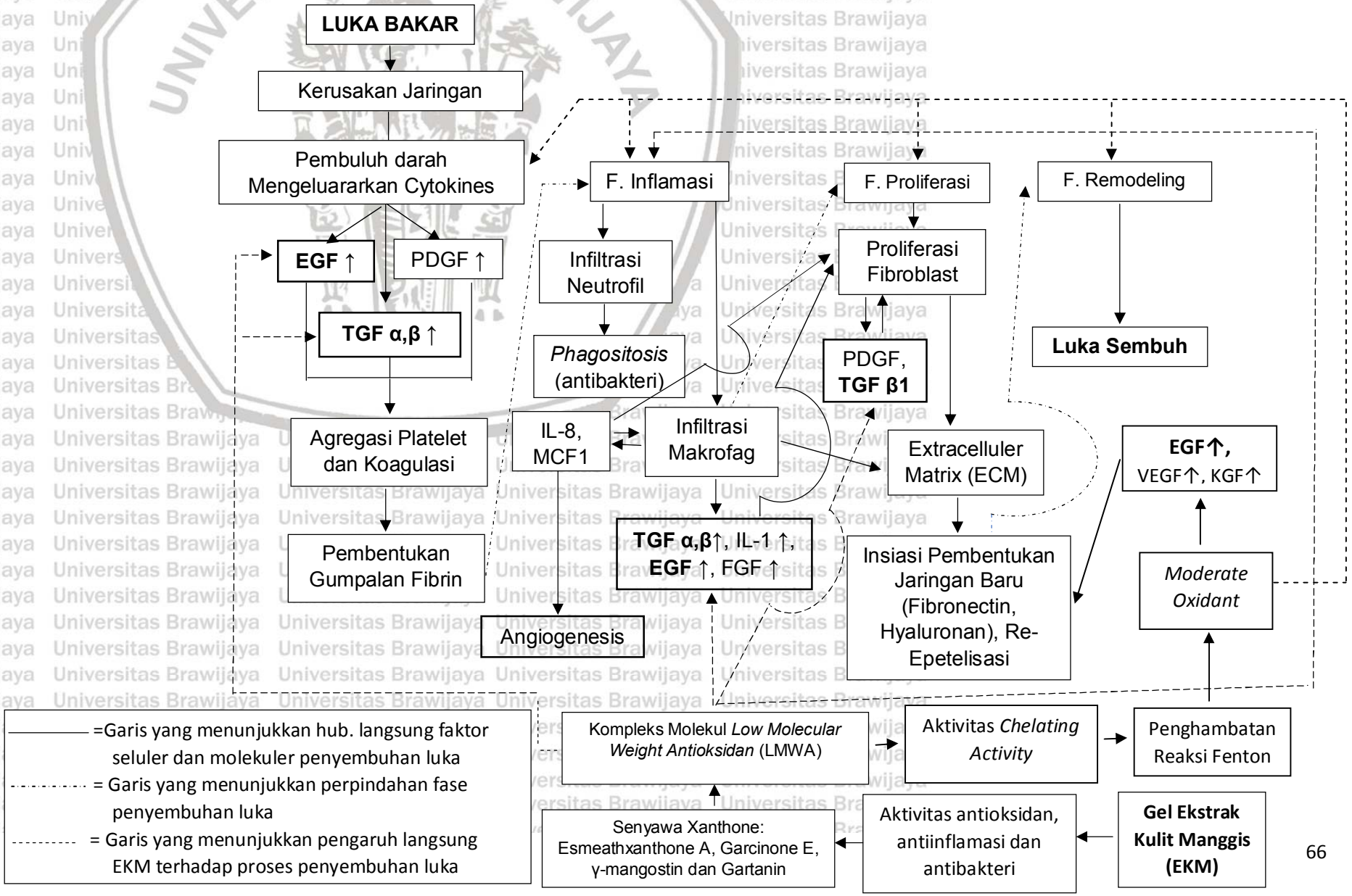
Prinsip dasar dari IHC telah ada sejak tahun 1930an, tetapi penelitan pertama dari IHC baru dipublikasikan pada tahun 1941. Penelitian menggunakan *Fluroscein isothiocyanate* (FOTC)-yang berlabel antibodi pada sebuah pewarna flurosesnsi untuk melihat lokalisasi antigen pneumococcal pada jaringan yang terinfeksi. Dengan meningkatnya ekspansi dan perkembangan dari teknik IHK, enzim berlabel dikembangkan seperti *peroxidase* dan *alkaline phosphatase*.

Coloidal gold berlabel juga telah ditemukan dan digunakan dalam mengindentifikasi reaksi immunohistokima baik pada mikroskop cahaya maupun mikroskop electron. Label-label lain diantaranya elemen radioaktif dan reaksi immunologi dapat dilakukan menggunakan autoradiografi. Tujuan dari pengembangan IHK adalah auntuk membuat teknik pewarnaan IHK yang menyebabkan kerusakan minimal pada jaringan atau sel menggunakan antibodi yang sedikit (Duraiyan, et al., 2012)

Pada penelitian ini, IHK digunakan untuk melihat ekspresi protein-protein yang berfungsi dalam penyembuhan luka bakar pada jaringan luka bakar. Selain ekspresi protein IHK juga dapat digunakan untuk menentukan penyebaran protein dalam jaringan luka.

BAB 3
KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian:

Kulit buah manggis (*G. mangostana* Linn.) telah lama diketahui memiliki kemampuan sebagai tanaman obat. Pada berbagai penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit manggis memiliki kemampuan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antimikroba. Aktivitas biologis ini dikarenakan kandungan senyawa xanthone dalam EKM seperti Esmeathxanthone A, Garcinone E, γ-Mangostin dan Gartanin. Senyawa-senyawa ini diprediksi mampu menciptakan suasana keseimbangan oksidan *(moderate oxidant/ good redox balance*) dalam jaringan yang terkena luka bakar.

Proses penyembuhan luka memerlukan reaksi oksidasi pada saat proses fagositosis untuk membunuh dan membersihkan kuman dan debris jaringan pada fase inflamasi. Oksidan juga diproduksi secara alami melalui proses respirasi di mitokondria. Akan tetapi, reaksi oksidasi yang berlebihan atau berkepanjangan akan berpotensi merusak dan mengganggu proses penyembuhan luka itu sendiri, oleh karena itu *xanthone* pada ekstrak kulit manggis yang memiliki potensi sebagai anti-oksidan dapat berperan sebagai *scavenging agent*, sehingga reaksi oksidasi dapat berlangsung dengan baik, tidak menimbulkan stres oksidatif dan tidak berakibat buruk pada proses penyembuhan luka. Oksidan yang sering muncul dalam luka bakar adalah ROS.

Walaupun ROS bersifat merusak pada konsentrasi yang berlebihan. ROS juga memiliki fungsi yang penting dalam proses penyembuhan luka apabila berada dalam konsentrasi moderat. Pada fase inflamasi, neutrofil dan makrofag tiba pada daerah luka dan mensekresikan sejumlah besar ROS. Terbentuknya ROS ini secara langsung menyerang pathogen yang menginvasi jaringan. ROS juga memiliki fungsi penting dalam menginduksi angiogenesis. ROS dengan konsentrasi kecil juga

diketahui memiliki peran dalam sistem persinyalan penting yang berperan dalam fungsi fisiologis. Radikal bebas berperan dalam seluruh fase penyembuhan luka bakar, mulai dari homeostatis, inflamasi, proliferasi hingga *remodeling*. Pada fase inflamasi radikal bebas berperan dalam proses koagulasi darah, *thrombosis*, disinfeksi dan *chemotaxis*. Pada fase lanjutan penyembuhan luka bakar, radikal bebas berperan dalam proses migrasi sel, proliferasi sel dan fibrosis. Jumlah H_2O_2 yang tepat juga meregulasi ekspresi dari VEGF, protein khusus yang memiliki fungsi sebagai angiogenesis *growth factor.* ROS juga memiliki peran dalam proses re-epitelisasi. H_2O_2 berperan sebagai *inductor* reseptor EGF dan KGF.

EKM memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Aktivitas antioksidan ini diduga dipengaruhi oleh kompleks struktur logam transisi-senyawa organik. *Xanthone* marupakan LMWA yang berperan dalam proses antioksidan melalui pengkelatan logam transisi dan donor elektron senyawa radikal menjadi non radikal. Setelah seluruh bakteri dan debris telah dibersihkan oleh neutrofil dan makrofag, maka proses penyembuhan luka masuk pada fase proliferasi, dimana terjadi pertumbuhan jaringan granulasi yang terbentuk dari proses fibroplasia dan deposisi matriks ekstraseluler.

Dengan menggunakan teknik pengujian QSAR, didapatkan bahwa beberapa senyawa *xanthone* yang terkandung dalam EKM berinteraksi positif dengan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan yaitu IL-6, TGF-β dan EGF. IL-6 memiliki sifat *chemoattractant* bagi neutrofil, sehingga proses fagositosis dapat berlangsung, IL-6 diperlukan pada proses re-epitelialisasi. TGF-β berperan mendorong migrasi, proliferasi dari fibroblas dalam proses fibroplasia dan membentuk kolagen. TGF-β juga terlibat pada deposisi matriks ektraseluler. Akan tetapi jumlah TGF-β yang berlebih pada fase akhir fase proliferasi akan justru menghambat proses re-

epitelialisasi. EGF merupakan *growth factor* yang berperan penting pada proses re-epitelialisasi.

3.2 Hipotesis dan Subhipotesis

3.2.1. Hipotesis:

Kompleks molekul dalam EKM berfungsi dalam mempercepat proses penyembuhan luka bakar.

3.2.1.1 Sub hipotesis Penelitian Tahap 1

Senyawa aktif xanthone berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi dapat berinteraksi dengan protein-protein yang berperan dalam penyembuhan luka bakar melalui analisis *in silico*.

3.2.1.2 Sub hipotesis Penelitian Tahap 2

1. Kandungan kompleks molekul senyawa xanthone memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflamasi serta berperan dalam penyembuhan luka bakar.
2. EKM memiliki bentuk, ukuran dan karakteristik yang dapat memenuhi syarat untuk dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas dan memiliki bioavailabilitas tinggi ketika dibentuk sebagai gel.
3. Xanthone yang ada dalam EKM dapat membentuk kompleks senyawa dengan logam transisi.
4. EKM yang mengandung kompleks senyawa xanthone dengan logam transisi dapat bersifat sebagai *scavenger* radikal bebas.

3.2.1.3. Sub hipotesis Penelitian Tahap 3

1. Gel EKM mempercepat penyembuhan luka bakar pada tikus model luka bakar.

2. Terdapat peningkatan ekspresi gen TGF-β, EGF dan IL-6 pada tikus yang diberi gel EKM Dosis 1 (0,2 g), EKM Dosis 2 (0,4 g) melalui analisis IHK.

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksplorasi laboratorium dengan tujuan untuk melihat karakteristik serta potensi gel ekstrak kulit buah manggis (EKM) untuk penyembuhan luka bakar (*healing burns*) melalui uji *in silico* dengan *analysis QSAR* dan *in vivo* pada tikus model luka bakar. Penelitian ini akan dibagi menjadi tiga tahap:

1. Tahap pertama terdiri dari analisis bioinformatika menggunakan pendekatan QSAR untuk mengetahui potensi dari senyawa yang terkandung dalam EKM sebagai antioksidan dan antiinflamasi serta melihat interaksinya terhadap protein-protein yang berperan dalam proses penyembuhan luka bakar.
2. Tahap kedua berupa prediksi aktivitas antioksidan dan mekanisme senyawa xanthone sebagai antioksidan. Penelitian tahap dua dilakukan dengan karakterisasi kompleks molekul menggunakan LCMS, karakterisasi EKM menggunakan XRF, XRD, SEM dan PSA, pengujian aktivitas antioksidan EKM kematangan 6 menggunakan metode ESR, dan prediksi penghelatan logam transisi mengunakan analisis FTIR dan pengujian kemampuan kompleks senyawa xanthone-logam transisi sebagai *scavenger* radikal bebas menggunakan *Open Babel* dan *Chemsketch*.
3. Tahap ketiga berupa penelitian observasional analitik dengan pendekatan *in vivo* pada tikus model luka bakar terdiri 4 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, MEBO, Gel EKM Dosis 1 (0,2 g), dan Gel EKM Dosis 2 (0,4 g) terhadap penilaian histopatologi (re-epetelisasi, infiltrasi neutrofil, infiltrasi limfosit dan neovaskularisasi) dan IHK.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan bulan September 2017 sampai Maret 2018. Tempat pelaksanaan penelitian meliputi:

1. Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.
2. Laboratorium Sentral, Universitas Padjajaran, Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat.
3. Centre for Science and Technology of Advanced Material, PSTBM-BATAN, Serpong, Tangerang, Banten.
4. Biomoleculer and Biomedical Research Center, Aretha Medika Utama, Bandung, Jawa Barat.
5. Laboratorium Penelitian Universitas Surabaya (UBAYA), Surabaya, Jawa Timur.

4.3 Sampel/Subjek Penelitian

4.3.1 Analisis bioinformatik senyawa EKM

Sampel docking : SMILE senyawa dari Data Bank

4.3.2 Karakterisasi EKM dengan tingkat kematangan berbeda

Sampel LC-MS : 6 sampel EKM berdasarkan tingkat kematangan

Sampel : 6 sampel EKM berdasarkan tingkat kematangan

4.3.3 Analisis efek pemberian gel EKM terhadap penyembuhan luka bakar

Kriteria inklusi sampel : Kulit manggis tingkat kematangan ke-6, tikus Wistar jantan sehat usia 2 bulan berat 300–400 gram. Berat badan tikus pada awal penelitian memiliki berat yang homogen.

Kriteria eksklusi sampel: Kulit manggis selain tingkat kematangan 6, tikus Wistar betina, tikus Wistar tidak sehat, tikus Wistar

umur < 2 bulan, tikus Wistar berat <300 dan atau >400 gram.

Besarnya sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus dari Gomez dan Gomez (1995):

$(\mu-1)\ (t-1) \geq 20$

$(\mu-1)\ (5-1) \geq 20$

$5\ \mu - 4 \geq 20$

$5\ \mu \geq 24$

$\mu \geq 4.8$ ~ dibulatkan ke atas menjadi 5 ekor tikus ditambah 3 untuk cadangan = 8 ekor tikus /kelompok

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Penelitian Tahap I

4.4.1.1 Analisis bioinformatik senyawa dalam EKM

a. Variabel bebas : senyawa dalam EKM dalam SMILE Bank Data

b. Variabel tergantung : Kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dari senyawa yang terkandung dalam EKM (Pa, *probability "to be active"*), konsentrasi senyawa *xanthone* pada 6 tingkat kematangan kulit manggis, protein-protein yang berperan dalam proses penyembuhan luka bakar.

4.4.2 Penelitian Tahap 2

4.4.2.1 Kuantifiasi senyawa xanthone EKM pada berbagai tingkat kematangan

a. Variabel bebas : EKM dengan 6 tingkat kematangan

b. Variabel tergantung : ukuran partikel, struktur mikro, komposisi mineral, kadar metabolit, kemampuan memerangkap radikal bebas dan kompleks molekul EKM

4.4.2.2 Karakteristik kompleks molekul EKM

a. Variabel bebas : EKM dengan tingkat kematangan 6

b. Variabel tergantung : ukuran partikel, struktur mikro, komposisi mineral, kemampuan memerangkap radikal bebas, kompleks molekul EKM.

4.4.3 Variabel Penelitian Tahap 3

4.4.3.1. Analisis EKM secara *in vivo*

a. Variabel bebas : perlakuan yang diberikan meliputi kelompok kontrol negatif, MEBO, gel EKM dosis 1 (0,2 g), gel EKM dosis 2 (0,4 g)

b. Variabel tergantung : hasil perbaikan luka bakar setelah mendapat perlakuan yang diberikan meliputi uji histopatologi (infiltrasi neutrofil, infiltrasi limfosit, neovaskularisasi), IHK (ekspresi protein IL-6, TGF-β, EGF).

4.5 Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak kulit manggis (EKM) : ekstrak ethanol 96% kulit buah manggis.
2. Tingkat kematangan kulit buah manggis: tingkat kematangan buah manggis yang diukur menggunakan kriteria warna dan terkstur kulit buah manggis
3. Gel EKM: Gel Na-CMC yang diberi tambahan EKM.
4. Analisis QSAR: analisis *quantitative structured activity relationship* yang dilakukan menggunakan program PASS SERVER, HIT PICK, STRING dan CytoScene untuk melihat hubungan antara senyawa dalam EKM dengan protein-protein yang berperan sebgai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri.
5. Nilai Pa: nilai '*probability analysis'* nilai yang menunjukkan tingkat kesesuaian antara hasil analisis bioinformatika dengan experimen langsung dengan nilai *threshold* 0.7.

6. Strukur mikro: data mengenai struktur hasil karakterisasi EKM berupa ukuran partikel, bentuk partikel dan agregasi partikel yang diukur menggunakan PSA, XRD dan SEM.
7. *Mikroelement:* senyawa logam yang terdapat dalam EKM yang diukur menggunakan XRF.
8. Aktivitas antioksidan: aktivitas pemerangkapan DPPH oleh EKM berdasarkan penurunan nilai g yang diukur menggunakan ESR.
9. Kompleks struktur: struktur gabungan antara logam transisi dan senyawa organik yang terdapat dalam EKM.
10. Luka bakar derajat dua: luka bakar yang ditandai dengan perubahan *gross* patologis dengan kerusakan meliputi seluruh ketebalan epidermis dan sebagian superfisial dermis.
11. Re-epitelisasi: proses pembentukan lapisan epitel baru pada jaringan luka yang sel epitelnya telah hilang.
12. Infiltrasi neutrofil: jumlah sel neutrofil pada sayatan jaringan yang terkena luka setelah diwarnai dengan HE.
13. Infiltrasi limfosit: jumlah sel limfosit pada sayatan jaringan yang terkena luka setelah diwarnai dengan HE.
14. Neovaskularisasi: pembentukan pembuluh darah baru pada jaringan yang terkena luka setelah diwarnai dengan HE.
15. Immunohistokimia (IHK): analsis ekspresi protein menggunakan antibodi primer dan sekunder pada segmen jaringan yang terkena luka bakar.
16. IL-6: Protein sitokin (pro dan anti-inflamasi) yang terdeteksi pada analisis IHK dari jaringan yang terkena luka bakar.
17. TGF-β: protein faktor pertumbuhan (*Transforming Growth Factor*) yang yang terdeteksi pada analisis IHK dari jaringan yang terkena luka bakar.

18. EGF: protein faktor pertumbuhan (*Epidermal Growth Factor*) yang yang terdeteksi pada analisis IHK dari jaringan yang terkena luka bakar.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Penelitian Tahap I

Analisis bioinformatika

Alat : perangkat komputer, software PUBCHEM, software PASS *online library,* software HIT-PICK, software STRING, software Cytoscape

Bahan : struktur 3D senyawa turunan *xanthone* dari kulit manggis (NCBI, PubChem)

4.6.2 Alat dan Bahan Penelitian Tahap 2

a. Pengeringan dan pembuatan serbuk kulit buah manggis

Alat : oven, blender

Bahan : Kulit buah manggis berdasarkan umur pemanenan dengan tingkat kematangan 1-6 yang diambil dari Perkebunan Sagala Herang, Kabupaten Subang, Jawa Barat

b. Ekstraksi etanol simplisia kulit manggis dan evaporasi pelarutnya

Alat : alat maserasi, neraca analitik, batang pengaduk, *beaker glass*, evaporator

Bahan : simplisia kering kulit manggis kematangan 1-6

c. Freeze drying EKM

Alat : *freeze dryer*

Bahan : EKM kematangan 1-6

d. Identifikasi kualitatif ekstrak kulit manggis (Senyawa Xanthone)

Alat : LC-MS (Thermo Scientific, TSQ Quantum Acces Max type Triple Quadropole, kolom hypersile Gold 1,9 umx2.1mmx50mm)

Bahan : EKM kematangan 1-6 (cairan dan padatan), asam formiat 1% dalam

aquades dan asam formiat 1 % dalam acetoniltrile

e. Analisis ukuran partikel EKM dengan PSA

Alat : NanoPlus HD – Zeta Potential & Nano Particle Size Analyzer

Bahan : EKM

f. Analisis struktur kristal kulit manggis dengan SEM

Alat : SEM, kulkas 4°C, ultramikrotom

Bahan : EKM, glutaraldehid 2%, buffer cacodylate 0,1M pH 7.4, EDTA 5%, sukrosa 0,2 M pH 7.4, osmium tetroxide 1%, Luveak 812 resin, uranium asetat, timbal sitrat

g. Analisis komposisi EKM dengan XRD

Alat : PAN analytical X'Pert PRO MPD, *Software* High Score Plus, Crystal Maker dan DDVIEW dilengkapi PDF2

Bahan : EKM

h. Analisis komposisi EKM dengan XRF

Alat : XRF ARL OPTX – 2050, Operating Enviromenment : Room temperature : 18 to 28 oC; Humidity : 40 to 70% (no condensation) free from corrosive gases, particle, perceptible vibration

Bahan : EKM

i. Analisis EKM menggunakan ESR

Alat : ESR

Bahan : EKM, ethanol, galvinoxyl, aquades

j. Analisis EKM menggunakan FTIR

Alat : FTIR, Spektrofotometer

Bahan : EKM kematangan 6, *Potassium Bromide*

4.6.3. Alat dan Bahan Penelitian Tahap 3

a. Pembuatan luka bakar pada tikus

Alat : Alat pembuat luka bakar (panas 60^{o}C) untuk mendapatkan luka bakar derajat dua), kulkas, beaker glass, timbangan analitik., tabung eppendorf, penanggas air, stopwatch, sentrifugal, tips pipet 1-10 µl, tip s pipet 10-100 µl, tips pipet 100-1000 µl, micropipet 1-10 µl, micropipet 10-100 µl, micropipet 100-1000 µl, *syringe*, dan penggaris

Bahan : Tikus Wistar jantan sehat umur 2 bulan berat 300-400 gram, formalin, aquades, alkohol, ethanol 70%, gel kulit manggis,kandang tikus, sekam, pakan tikus, Tiletamine/Zolazepam HCl (Zoletic, Virbac, France) dan 0,1 mL Xylazine HCl (Rimpun, Bayer, Korea)

b. Aplikasi gel EKM

Alat : Alat pembuat luka bakar (panas 60 ^{o}C) untuk mendapatkan luka bakar derajat dua), beaker glass, timbangan analitik, sentrifugal, *syringe*, dan penggaris

Bahan : Tikus Wistar jantan model luka bakar, formalin, aquades, alkohol, ethanol 70%, gel kulit manggis, kandang tikus, sekam, pakan tikus, Tiletamine/Zolazepam HCl (Zoletic, Virbac, France) dan 0,1 mL Xylazine HCl (Rimpun, Bayer, Korea)

c. Pembuatan preparat histopatologi jaringan kulit tikus

Alat : *Beaker glass*, batang pengaduk, spatula, oven, *waterbath*, alumunium foil, plat besi berukuran 4 x 2 cm, kaca objek dan penutup, mikrotom, inkubator, kapas, dan gunting

Bahan : Alkohol 70%,Alkohol 80%, Alkohol 90%, Alkohol Absolut, kloroform, parafin liqiudum, larutan formaldehid 10%, *hematoxylin-Eosin*, dan xylol

d. Pengamatan preparat histopatologi

Alat : Mikroskop cahaya

Bahan : Preparat histopatologi

e. Uji imunohistokimia

Alat : *object glass*, cover slip, slide holder, staining racks

Bahan : sampel kulit tikus luka bakar (dalam blok paraffin), antibodi primer anti-EGF, IL-6, dan TGF-β, antibody sekunder (terkonjugasi dengan *Horse radish peroxide*), etanol, *Peroxide blocking solution, Prediluted blocking serum, Phospate buffer saline (PBS), Diaminobenzinidine (DAB),* dan Hematoxylin-Eosin

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Penelitian Tahap I

4.7.1.1 Analisis Bioinformatik

a. Koleksi senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis

Koleksi senyawa aktif didapatkan dari proses *data mining* dan juga database herbal Knapsack (Afendi *et al*., 2012), sehingga didapatkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis. Database Knapsack merupakan database masif yang menyimpan informasi kandungan metabolit sekunder lebih dari 20.000 spesies tumbuhan. Setiap senyawa kemudian ditelusuri SMILE-nya (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) di database PUBCHEM (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) (Kim *et al*. 2016). SMILE, merupakan format yang mengkode informasi struktur dan yang digunakan dalam pengolahan informasi kimia. Struktur molekuler suatu senyawa dapat dianalisis menjadi grafik molekuler (Toropov *et al.,* 2005). SMILE merupakan data text dari senyawa yang mewakili strukturnya. SMILE disimpan dalam format *.txt dan diproses untuk analisis lebih lanjut.

b. Prediksi aktivitas biologis

Prediksi aktivitas biologi dari senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis dilakukan menggunakan PASS SERVER (http://www.pharmaexpert.ru/passonline/) (Filimonov *et al*., 2014). Prediksi dilakukan berdasarkan pendekatan *structure activity relationship* (SAR). Apabila senyawa memiliki struktur dan gugus aktif yang sama maka diprediksikan memiliki aktivitas yang sama. *Scoring* PASS SERVER menggunakan konstanta (Pa), yaitu *probability activity*, dengan *threshold* 0.7. Apabila Pa>0.7 maka hasil prediksi secara komputasi tidak akan jauh berbeda apabila diuji secara laboratorium (Goel *et al.,* 2014). Adapun aktivitas biologi yang dianalisis yaitu: antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Prediksi dilakukan untuk mengelompokkan potensi dari senyawa aktif. Diharapkan jika suatu senyawa yang memiliki kombinasi dengan aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri dapat mempercepat proses penyembuhan suatu luka.

c. Prediksi protein target

Senyawa aktif yang paling berpotensi kemudian dianalisis protein targetnya menggunakan HIT-PICK (http://mips.helmholtz-muenchen.de/hitpick/) (Liu *et al*., 2013) dan *Swiss Target Prediction* (http://www.swisstargetprediction.ch/) (Gfeller *et al*., 2014). Pendekatan yang digunakan yaitu *Targeted-focused library,* yang digunakan untuk mencari potensi protein yang menjadi target dari suatu kumpulan senyawa baru. Prinsip yang digunakan yaitu mencari kesamaan gugus fungsi dan struktur dari senyawa baru dengan senyawa yang sudah diketahui protein targetnya (Malo *et al.,* 2006). Protein target tersebut kemudian dianalisis mekanisme *pathway* kerjanya. Sehingga dapat dipelajari proses biologi apa yang akan terganggu apabila obat berikatan dengan protein target tersebut.

d. Analisis *Pathway* interaksi senyawa aktif dengan protein target

Protein yang menjadi target dapat dianalisis interaksinya dengan protein lain yang terlibat dalam suatu *pathway* tertentu. Layanan yang digunakan yaitu STRING (http://string-db.org). String database bisa digunakan untuk mempelajari interaksi protein-protein yang fungsional di manusia (Szklarczyk *et al*., 2017). String juga menfasilitasi analisis biological proses yang melibatkan protein tertentu (Szklarczyk D *et al.,* 2015). *Tool* ini banyak digunakan untuk mengusulkan *pathway* baru yang diinduksi oleh obat. Pathway yang didapatkan kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan program CytoScape (http://www.cytoscape.org) untuk mengetahui jalur yang paling berperan dan mengevaluasi tipe interaksi pada protein network (Shannon, 2003).

4.7.2. Prosedur Penelitian Tahap 2

4.7.2.1 Ekstraksi dan Kuantifikasi Xanthone pada EKM

a. Pengeringan dan pembuatan serbuk kulit buah manggis

Kulit buah manggis diambil dari Perkebunan Sagala Herang, Kabupaten Subang, Jawa Barat berdasarkan umur pemanenan dengan kematangan 1-6, kulit manggis dikeringkan menggunakan oven suhu 40-50^{o}C sampai kering. Kulit buah manggis yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara diblender, diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 serta diukur kadar airnya dengan alat *moisturebalance* (Puspitasari dan Proyogo, 2015).

b. Ekstraksi etanol simplisia kulit buah manggis

Sebanyak sampel 700 gram serbuk simplisia tanaman kulit buah manggis dimaserasi masing-masing menggunakan ethanol 96% dengan perbandingan 1:5, selama 5 hari. Setiap hari diaduk setiap 3 jam sekali. Kemudian dievaporasi dan akan diperoleh EKM (Ciurzyńska & Lenart, 2011).

c. *Freeze drying* EKM

Hasil evaporasi dilakukan pengeringan menggunakan *freeze drying* menggunakan *frezze dryer* sampai diperoreh berat konstan dan dihitung rendemennya. Metode *frezze drying* dilakukan dengan cara merubah kadar air dalam produk menjadi es yang kemudian es tersebut akan diubah fasenya secara sublimasi pada temperatur dan tekanan dibawah *triple point* dalam diagram fasa air (Januari dan Martin, 2014).

d. Identifikasi kualitatif ekstrak kulit buah manggis (Senyawa *Xanthone*) menggunakan LC-MS

EKM dianalisis secara kualitatif menggunakan senyawa-senyawa standar *xanthone* yaitu *garcinone E, gartanin, 1-isomangostin, alpha-mangostin, gamma-mangostin, 8-deoxygartanin dan smeathxanthone A* menggunakan LC-MS Thermo Scientific TSQ Quantum Acces Max type Triple Quadropole, dengan kolom hypersile Gold 1,9 umx2.1mmx50mm dan eluen asam formiat 1% dalam aquades dan asam formiat 1% dalam acetoniltrile (Pratima dan Gadikar, 2018).

4.7.2.2 Karakteristik Kompleks Molekul Senyawa EKM

a. Karakterisasi EKM menggunakan PSA

EKM dianalisis menggunakan alat NanoPlus HD – Zeta Potential & Nano Particle Size Analyzer untuk menentukan distribusi ukuran partikel dari sampel. Partikel-partikel berada dalam gerakan Brownian tersebar akan memiliki intensitas yang berbeda ketika disinari laser. Fluktuasi sebaran cahaya diamati menggunakan detektor, dari mana ukuran partikel dan distribusinya dapat dihitung. Satu gram sampel bubuk suspensikan dalam air dan dianalisis pada 25° C (Seth *et al*., 2017).

b. Karakterisasi EKM menggunakan SEM-EDX

Sample EKM dipreparasi sebelum dilakukan SEM (Pathan, Bond, & Gaskin, 2010). Keenam tingkat kematangan kulit buah manggis segera

diimersikan pada glutaraldehid 2% dalam buffer cacodylate 0,1 moler (pH 7,4) pada 4^0C selama 4 jam. Kemudian didekalsifikasi dengan EDTA 5% dengan sukrosa 0,2 molar (pH 7,4) pada 4^0C selama 48 jam. Kemudian dilakukan post-fiksasi dalam osmium tetroxide 1% dalam buffer cacodylate 0,1 moler (pH 7,4), didehidrasi dan dibenamkan dalam Luveak 812 resin. Irisan yang ultratipis ketebalan 70-80 nanometer dikerjakan dengan ultramikrotom, dicat dengan uranium asetat dan timbal sitrat, dan diamati dengan SEM di LIPI, Serpong Tangerang. Selain SEM dilakukan pula *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDX). EDX dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan mineral pada suatu sample menggunakan sinar-X (Leapman, 2003). Data yang dihasilkan oleh analisis EDX terdiri dari spektrum dengan puncak (*peak*) yang sesuai dengan unsur-unsur yang berbeda yang terdapat pada sampel .

c. Karakterisasi EKM menggunakan XRD

Analisis EKM dilakukan dengan PAN analytical X'Pert PRO MPD, *Software* High Score Plus, Crystal Maker dan DDVIEW dilengkapi PDF2. XRD digunakan untuk analisis komposisi fasa atau senyawa pada material dan juga karakterisasi kristal (Athmaselvi *et al*., 2014). Prinsip dasar XRD adalah mendifraksi cahaya yang melalui celah kristal. Difraksi cahaya oleh kisi-kisi atau kristal ini dapat terjadi apabila difraksi tersebut berasal dari radius yang memiliki panjang gelombang yang setara dengan jarak antar atom, yaitu sekitar 1 Angstrom. Radiasi yang digunakan berupa radiasi sinar-X, elektron, dan neutron. Sinar-X merupakan foton dengan energi tinggi yang memiliki panjang gelombang berkisar antara 0.5 sampai 2.5 Angstrom. Ketika berkas sinar-X berinteraksi dengan suatu material, maka sebagian berkas akan diabsorbsi, ditransmisikan, dan sebagian lagi dihamburkan terdifraksi. Hamburan terdifraksi inilah yang dideteksi oleh XRD. Berkas sinar X yang dihamburkan tersebut ada yang saling menghilangkan karena fasanya berbeda dan ada juga yang saling menguatkan

karena fasanya sama. Berkas sinar X yang saling menguatkan itulah yang disebut sebagai berkas difraksi.

d. Karakterisasi EKM menggunakan XRF

Analisis EKM dengan menggunakan alat XRF dengan spesifikasi XRF ARL OPTX–2050. XRF merupakan alat yang digunakan untuk menganalisis komposisi kimia beserta konsentrasi unsur-unsur yang terkandung dalam suatu sample dengan menggunakan metode spektrometri (West *et al*., 2010). XRF umumnya digunakan untuk menganalisa unsur dalam mineral atau batuan. Tetapi selain itu, XRF juga dapat dimanfaatkan dalam analisis makanan dan produk agrikultur lainnya (Mathanker *et al*., 2013). Analisis unsur di lakukan secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan untuk menganalisis jenis unsur yang terkandung dalam bahan dan analisis kuantitatif dilakukan untuk menentukan konsentrasi unsur dalam bahan.

e. Analisis Aktivitas Antioksidan EKM menggunakan ESR

Karakterisasi menggunakan ESR digunakan untuk mengetahui potensi senyawa dalam kulit buah manggis untuk memerangkap radikal bebas (Spasojević, 2011). Pengukuran menggunakan ESR dilakuan pada suhu ruang 24°C pada sprektometer varian E-109 yang dilengkapi dengan Bruker ER 0411 XG *microwave bridge*. Parameter*spectroscopic* yang digunakan: frekuensi 9.27 GHz, *field sweep* 8mT, *microwave power* 4.9 mW dan modulasi amplitudo 0.11 mT. Radikal bebas Galvinoxyl digunakan sebagai objek aktivitas pemerangkapan dalam ESR. Stabilitas larutan etanol disiapkan hanya pada saat akan digunakan, larutan etanol lalu diukur selama 30 menit dan kehilangan sinyal yang signifikan tidak terdeteksi. Kehilangan sinyal sampai 7% didapatkan setelah 24 jam. Larutan radikal baru disiapkan setiap hari. Gel kulit buah manggis ditambahkan pada larutan galvinoxyl dalam etanol (c= 0.15 mmol/dm^3) untuk mendapatkan berbagai konsentrasi gel (0.1, 0.2, 0.5, dan 1.0 vol.%). Konsentrasi akhir yang

sama dari radikal galvinoxyl diperoleh dengan menambahkan jumlah aquades yang cukup. Gel dicampurkan dengan larutan radikal dalam erlenmeyer dan dimasukkan ke dalam kapiler yang kemudian ditempatkan dalam tabung ESR standar. Sprektrum ESR dicatat sebagai fungsi waktu mulai dari kontak antara gel dengan *free radical*. Waktu interval yang dicatat adalah 0.5 menit dan 1.0 menit bergantung pada aktivitas sampel. Intensitas sinyal radikal galvinoxyl dihitung dengan integrasi ganda sprektrum ESR dengan menggunakan *software* EW (EPRWare). Intensitas sinyal dari larutan 0.12 mmol/dm^3 galvinoxyl murni diukur sebelum memulai pengukuran sampel, diambil sebagai intensitas sinyal referensi (I_0) untuk waktu reaksi t= 0 menit. Intensitas sinyal (I_n) dinormalisasi setelah waktu reakti t, dinyatakan sebagai persentase, dihitung sebagai:

$$I_n = (I / I_0) \times 100$$

yang mana I adalah intensitas sinyal radikal galvinoxyl dalam larutan gel diukur pada waktu t. Setiap sampel dianalisis dalam tiga kali ulangan. Hasilnya disajikan sebagai nilai rata-rata (Kuzmanova *et al*., 2012).

f. Karakterisasi EKM menggunakan FTIR

Sampel EKM dicampur dengan 1 mg/100 mg KBr (*potassium bromide*). Senyawa organik dan anorganik yang memiliki ikatan kovalen akan mengabsropsi beberapa frekuennsi dari radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang 0.5-1000μm.

g. Analisis kompleks senyawa organik logam transisi

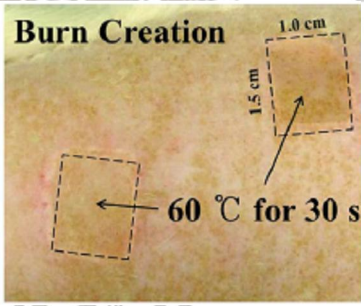
Analisis kompleks senyawa organik logam transisi dilakukan menggunakan Open Babel dan Chemsketch (Sukmaningsih *et al*., 2018). Analisis kompleks senyawa logam transisi-senyawa organik dilakukan terhadap 4 senyawa xanthone dan senyawa-senyawa aktif yang terdapat pada gel MEBO.

4.7.3 Prosedur Penelitian Tahap 3

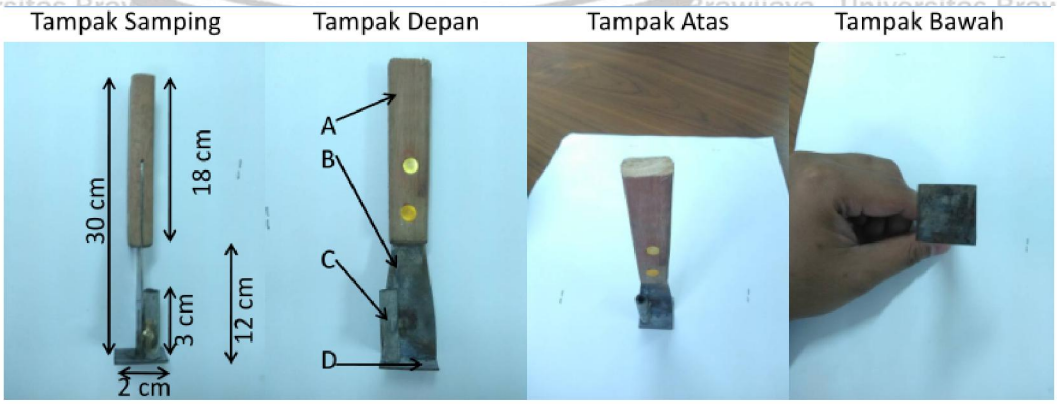
4.7.3.1 Uji *in vivo* aktivitas EKM dalam penyembuhan luka bakar

a. Pembuatan model tikus luka bakar

Untuk menganalisis potensi gel kulit buah manggis terhadap *healing* luka bakar pada model tikus luka bakar, dibuat luka bakar pada punggung tikus yang telah diberikan anestesi dosis tunggal intraperitoneal 0,15 mL Tiletamine/Zolazepam HCl (Zoletic, Virbac, France) dan 0,1 mL Xylazine HCl (Rimpun, Bayer, Korea). Setelah dilakukan anestesi, bulu di punggung dicukur. Punggung tikus dipaparkan selama 30 detik dengan alat yang dipanaskan 60 ^{o}C. Tindakan ini akan menghasilkan luka bakar derajat dua dengan ukuran 1,0 x 1,5 cm yang dikonfirmasi dengan perubahan gross patologis seperti gambar di bawah (Ju *et al*., 2016). Foto alat pembuat luka bakar dapat dilihat pada Gambar 4.2 di bawah ini.



Gambar 4.1 Perubahan gross patologis dari aplikasi model luka bakar (Ju *et al*., 2016)



Gambar 4.2 Alat pembuat luka bakar
(Keterangan: A=pegangan dari bahan kayu; B=plat besi penyangga dari bahan besi; C=selang besi kecil tempat konduksi pengatur suhu dari bahan besi; D=plat besi inducer luka bakar bentuk persegi bahan dari besi)

b. Pembuatan Gel EKM

Gel EKM yang telah dibuat merupakan gel Na-CMC. Basis Na-CMC dibuat dengan konsentrasi 2%. Na-CMC dikembangkan terlebih dahulu pada 15 mL aquades suhu 70°C (campuran 1). Selanjutnya metil paraben dilarutkan dalam sedikit aquades kemudian ditambahkan campuran gliserin dan propilenglikol (campuran 2). Campur kedua campuran, ad aquades hingga 20 mL dan diaduk hingga homogen.

Sedangkan gel ekstrak dibuat dengan variasi dosis 0,2 gdan 0,4 g. Formula gel disajikan pada tabel I. Na-CMC dikembangkan pada 15 mL aquades suhu 70°C (campuran 1). Selanjutnya dibuat campuran 2, dan kedua campuran dijadikan satu. Diaduk homogen dan di ad dengan aquades hingga 20 mL.

c. Formulasi gel EKM dosis 1 dan 2

Formulasi gel EKM disajikan pada tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Formula basis Na-CMC dan gel EKM: Formula 1 (EKM dosis 0.2 g), Formula 2 (EKM dosis 0.4 g)

Komponen	Formula 1	Formula 2
Ekstrak *freeze dried* kulit buah manggis	0.2	0.4
Na-CMC	0.4 g	0.4 g
Gliserin	2 g	2 g
Propilenglikol	1 g	1 g
Metil paraben	0.03 g	0.03 g
Aquades ad	20 g	20 g

d. Pengamatan preparat histopatologi

Pengamatan secara histopatologi dilakukan pada preparat jaringan kulit tikus model luka bakar, kontrol positif dan kontrol negatif. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya secara deskriptif. Pengamatan ini meliputi parameter-parameter yang berperan dalam penyembuhan luka bakar seperti keberadaan sel radang dan makrofag, serta neokapilerisasi (Mawarsari, 2015).

e. Perhitungan neovaskularisasi, infiltrasi neutrofil dan infiltrasi limfosit

Kuantfikasi neovaskularisasi, infiltrasi neutrofil dan infiltrasi limfosit dilakukan menggunakan software ImageJ. Software imageJ dapat membedakan dan menghitung jumlah sel neutrofil, limfosir dan neovaskuarisasii pada preparat jaringan yang telah diberi pewarnaan HE.

f. Uji Imunohistokimia

Uji imunohistokimia diawali dengan deparafiniasi dan rehidrasi slide preprat. Deparafinasi preparat (blok parafin) dilakukan dengan menggunakan xylene sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Rehidrasi slide preparat dilakukan dengan menggunakan etanol 100%, 95% dan 70% masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, preparat dibilas dengan air selama satu menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dalam *peroxidase blocking solution* selama 10 menit dilanjutkan dengan diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* selama 10 menit. Kemudian preparat diinkubasi dalam antibodi primer anti-EGF dalam suhu ruangan selama 1 jam. Preparat kemudian dicuci dengan *Phospate Buffer Saline (PBS)* sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*conjugated to horse radish peroxidase*) dalam suhu ruangan selama 1 jam. dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat diinkubasi dengan 0.3% H_2O_2 didalam PBS selama 15 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dengan

kromogen DAB (Diaminobenzinidine) dalam suhu ruangan selama 10 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 5 menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dengan Hematoxylin selama 3 menit, kemudian dicuci kembali dengan air mengalir selama 5 menit. Preparat dibersihkan dan ditetesi dengan mounting media. Preparat ditutup dengan coverslip dan dimati ekspresi IL-6, EGF, dan TGF-β (warna coklat) pada sel menggunakan mikroskop cahaya.

g. Kuantifikasi Protein IL-6, EGF dan TGF-β

Kuantifikasi ekspresi protein IL-6, EGF dan TGF-β dilakukan menggunakan *software* ImageJ. Untuk kuantifikasi hasil IHK dilakukan pengamatan protein yang berwarna coklat pada sayatan jaringan yang telah di *staining* menggunakan *antibody* primer dan sekunder.

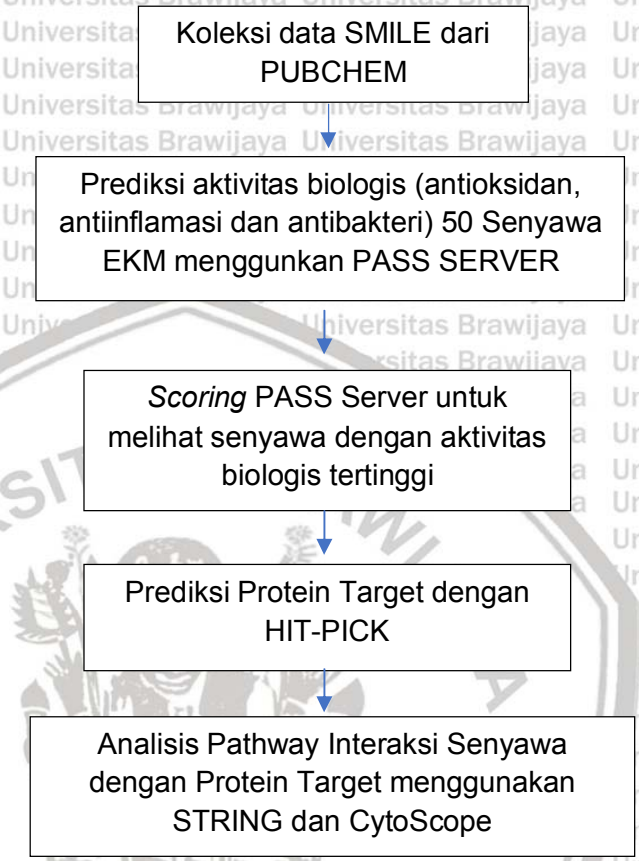
4.8 Analisis Data

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka diperlukan analisis dengan pendekatan uji statistika. Uji statistika yang digunakan dalam penelitian ini yaitu statistika deskriptif dan *One Way Anova* dlanjutkan dengan Uji *Post Hoc Tuckey* HSD.

4.9 Alur Penelitian

4.9.1 Alur Penelitian Tahap 1

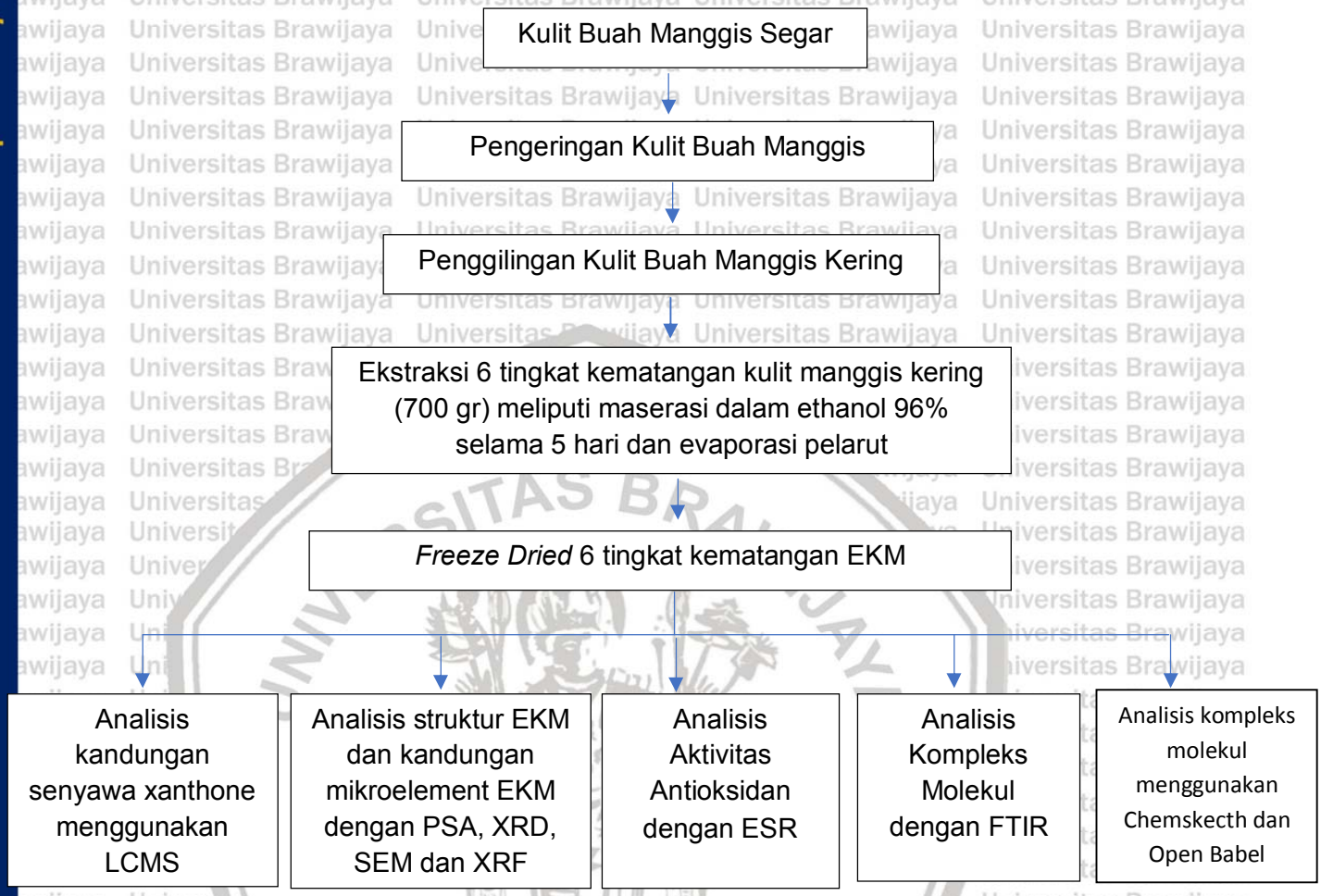
4.9.1.1 Alur Penelitian Analisis Bioinformatika dan Kuantifikasi Senyawa



Gambar 4.3 Alur penelitian Tahap 1 *in silico*

4.9.2. Alur Penelitian Tahap 2

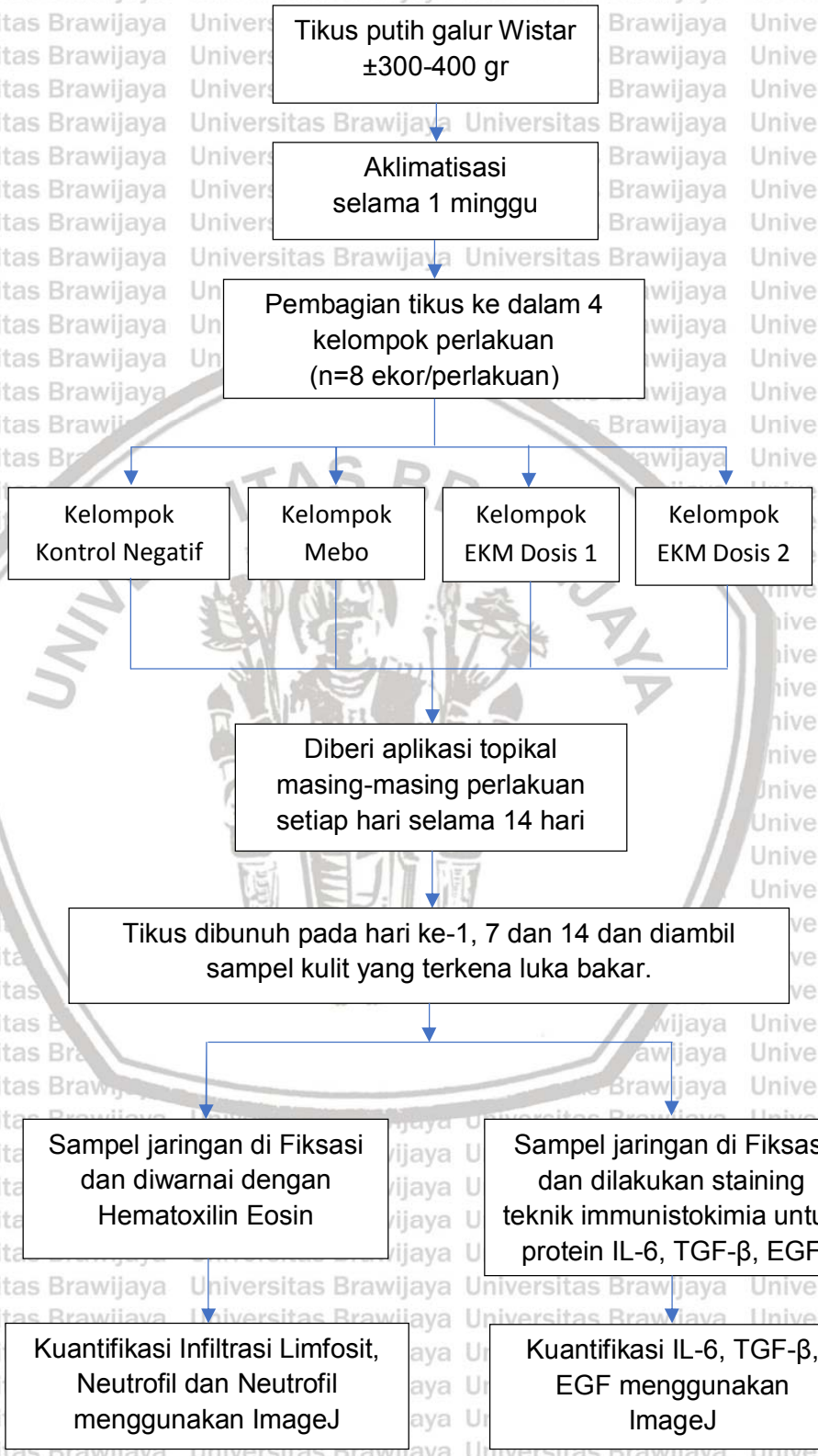
4.9.2.1 Alur Penelitian Karakterisasi Kompleks Molekul EKM



Gambar 4.4 Alur penelitian Tahap 2 Karakterisasi gel EKM tingkat kematangan 6

4.9.3 Alur Penelitian Tahap 3

4.9.3.1 Pengaruh Aplikasi Topikal EKM pada Tikus Model Luka Bakar



Gambar 4.5 Alur Penelitian Tahap 3 Pengaruh Gel EKM pada Tikus Model Luka

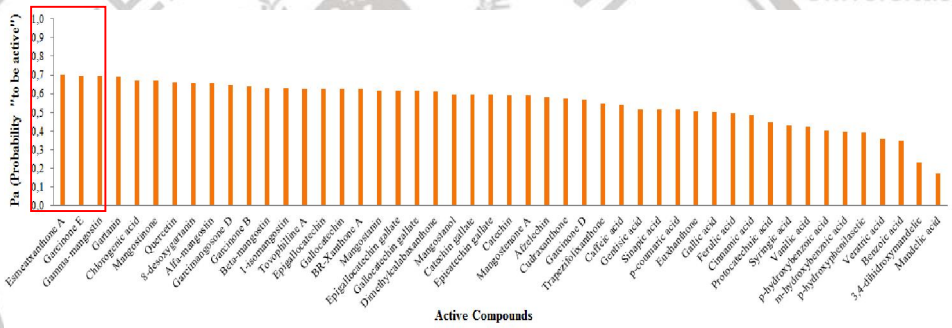
BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian Tahap I

5.1.1 Analisis Bioinformatika Senyawa EKM

Analisis bioinformatika dilakukan untuk memprediksi potensi dari senyawa yang terkandung dalam EKM sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dan interaksinya terhadap protein-protein yang diprediksi berperan dalam proses penyembuhan luka bakar. Pengujian senyawa EKM sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri dikarenakan aktivitas-aktivitas tersebut diperlukan dalam proses penyembuhan luka.

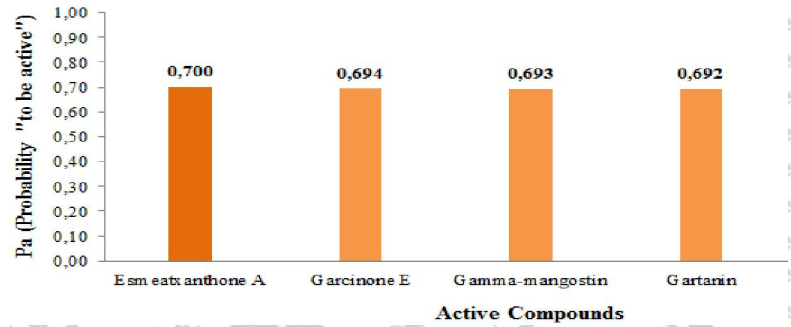


Gambar 5.1 Kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri dari senyawa yang terkandung dalam kulit manggis

Proses awal dari analisis bioinformatika adalah proses pengkoleksian senyawa. Hasil proses pengkoleksian senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis dari proses *data mining* dan juga *database* herbal *Knapsack*, didapatkan sekitar 120 senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit manggis. Kemudian ditelusuri SMILE-nya di *database* PUBCHEM. Hasil penelusuran SMILE di *database* PUBCHEM didapatkan hanya 50 senyawa yang dapat dianalisis lebih lanjut. Hasil penelitian ini menyeleksi potensi dari senyawa aktif yang memiliki ketiga potensi tersebut menggunakan PASS SERVER. Hasil analisis QSAR

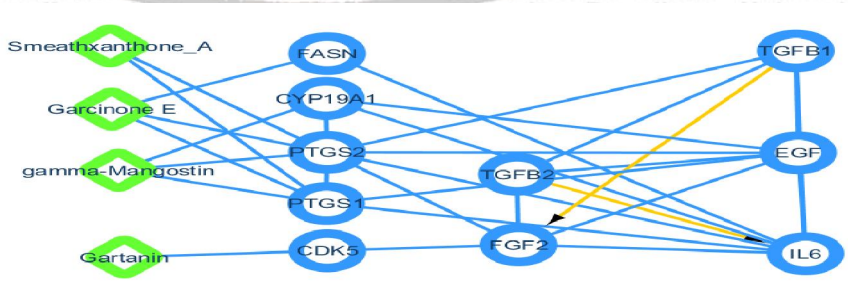
menggunakan PASS SERVER dapat dilihat pada Gambar 5.1. Gambar 5.1 menunjukkan 4 senyawa dengan nilai Pa "*Potential to Active*" yang paling tinggi.

Sebanyak 4 senyawa terpilih dengan nilai Pa tertingi dalam penelitian ini yaitu: Esmeathxanthone A (Pa 0.7), Garcinone E (Pa 0.694), γ-mangostin (Pa 0.693) dan Gartanin (0.692) dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Empat senyawa EKM terpilih dengan kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteria terbaik

Mekanisme kerja dari senyawa dapat diketahui berdasarkan prediksi protein target. Interaksi yang terbentuk oleh senyawa EKM dan protein target divisualisasikan pada Gambar 5.3. Hasil menunjukkan bahwa 4 senyawa tersebut kemungkinan memiliki target protein yang berhubungan dengan tingkat ekspresi dari IL-6, EGF, TGFB1 (Gambar 5.3) (Tabel 5.1). Protein-protein ini merupakan protein yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Peran protein ini dalam penyembuhan luka telah dibahas pada bab 2 dan dibahas kembali dalam bab 6.

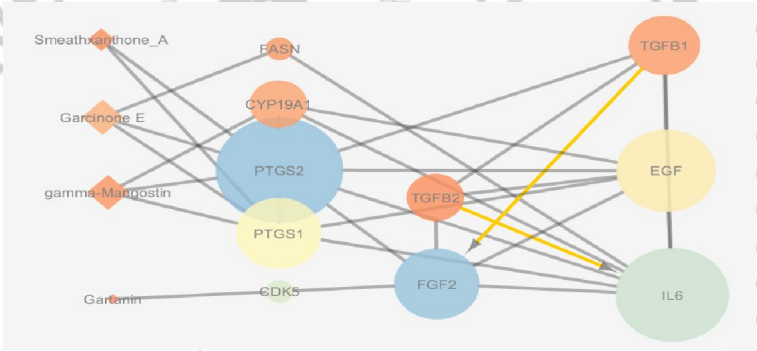


Gambar 5.3 Analisis interaksi (*pathway*) senyawa dalam EKM terhadap ekspresi protein yang berperan dalam proses penyembuhan luka

Tabel 5.1 Skor ekspresi protein berdasarkan prediksi interaksi (Skala 0-1)

Protein	Expression Score
TGFB1->FGF2	0.450
TGFB2->IL6	0.517

Peranan utama yang mengontrol *pathway* tersebut dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui jalur yang potensial (Gambar 5.4). Kemungkinan besar, pengingkatan ekspresi TGFB1 berkaitan erat dengan FGF2 dan ekspresi TGFB2 berkaitan dengan ekspresi IL6. Oleh karena itu, diperkirakan senyawa yang terdapat dalam EKM mempengaruhi proses penyembuhan luka bakar melalui *pathway* tersebut.



name	AverageShortestPathLength
EGF	1.53846154
TGFB1	1.69230769
IL6	1.46153846

Gambar 5.4 Analisis jalur yang paling dipengaruhi senyawa dalam EKM

Gambar 5.4 menunjukkan bahwa terdapat tiga protein utama yang dipengaruhi oleh EKM yaitu protein TGF-β1, IL-6, dan EGF. Masing-masing protein memiliki nilai *average shortes path leghth* (ASPL) yang berbeda. Nilai ASPL terendah adalah IL-6, dan yang tertinggi adalah TGF- β1. Nilai ASPL yang rendah menunjukkan adanya kedekatan koneksi antara protein tersebut dengan protein-protein lain dalam jaringan yang menunjukkan pula adanya hubungan yang lebih tinggi dalam jaringan.

Hasil analisis QSAR ini dapat dijadikan acuan dalam studi lanjutan baik secara *ex vivo* maupun *in vivo*. Dalam penelitian ini dilakukan analisis lanjutan secara *in vivo* menggunakan model tikus luka bakar pada penelitian tahap 3. Ekspresi dari protein IL-6, EGF dan TGFB1 dilihat untuk mengevaluasi peran protein-protein tersebut dalam proses penyembuhan luka bakar. Hasil penelitian mengenai ekspresi ketiga protein tersebut disajikan dalam hasil penelitian tahap 3.

5.2. Hasil Penelitian Tahap 2

5.2.1 Analisis Kuantitatif Senyawa *Xanthone* dalam EKM

Analisis kuantitatif senyawa *xanthone* dilakukan untuk melihat kadar senyawa *xanthone* dalam EKM dengan tingkat kematangan berbeda. Senyawa-senyawa yang dideteksi merupakan senyawa yang telah diprediksi memiliki aktivitas penting dalam proses penyembuhan luka dan berkaitan erat dengan protein-protein yang juga berperan dalam proses penyembuhan luka

Analisis kuantitatif juga dilakukan untuk mengkarakterisasi kandungan senyawa kulit manggis dengan tingkat kematangan yang berbeda. Hasil ini dapat dijadikan acuan mengenai kulit manggis manakah yang mengandung senyawa potensial untuk penyembuhan luka paling tinggi.

Tabel 5.2 menunjukkan kadar empat senyawa xanthone yaitu γ-mangostin, gartanin, smeathxanthone, dan garcinone-E yang terdapat di dalam ekstrak kulit manggis dengan tingkat kematangan berbeda hasil analisis LC-MS.

Tabel 5.2 Rata-rata konsentrasi xanthone pada ekstrak kulit manggis berdasarkan analisis LCMS-MS

Senyawa Penanda	Hasil	Kulit Manggis (Level Kematangan)					
		1	2	3	4	5	6
γ-mangostin	Area	709049.45 ±0.00	799222.80 ±541.06	281756.15 ±11173.63	1494470.58 ±4661.78	3525400.69 ±157000.69	3021837.04 ±56397.09
	Pengukuran (µg/mL)	0.02±0.00	0.06±0.00	1.07±0.06	0.41±0.00	1.43±0.08	1.17±0.03
	Penghitungan (µg/mg)	0.94±0.00	3.20±0.01	18.18±0.95	18.97±0.11	48.42±2.67	66.13±1.59
Garcinone-E	Area	764523.91 ±35324.79	1014092.16 ±4393.64	670434.34 ±19433.06	1805527.61 ±16646.07	2050104.53 ±58425.28	2242394.65 ±29565.58
	Pengukuran (µg/mL)	1.28±0.06	1.70±0.01	1.13±0.04	2.99±0.33	3.40±0.09	3.72±0.05
	Penghitungan (µg/mg)	78.53±3.5	89.43±0.38	78.17±2.2	139.16±1.2	115.50±3.2	209.51±2.7
Gartanin	Area	118717.96 ±667.82	174794.47 ±736.43	178937.89 ±446.48	545065.65 ±23990.32	499347.34 ±12746.25	528602.22 ±14.857.53
	Pengukuran (µg/mL)	0.37±0.00	0.44±0.00	0.45±0.00	0.93±0.04	0.87±0.01	0.91±0.02
	Penghitungan (µg/mg)	22.44±0.06	23.26±0.05	30.91±0.04	43.10±1.47	29.49±0.57	51.10±1.10
Smeath-xanthone-A	Area	12231.99 ±41.30	15134.08 ±2294.29	74224.50 ±7913.23	25680.63 ±607.07	65656.10 ±1094.87	53407.44 ±1618.30
	Pengukuran (µg/mL)	0.02±0.00	0.03±0.00	0.15±0.01	0.05±0.00	0.13±0.00	0.11±0.01
	Penghitungan (µg/mg)	1.49±0.01	1.58±0.24	2.48±0.23	2.36±0.06	4.42±0.07	5.97±0.18

*Data kandungan *xanthone* berdasarkan pengukuran (µg/mL) dan penghitungan (µg/mg). Penelitian dilakukan secara *duplicate*. Konsentrasi *xanthone* pada EKM dengan standard γ-mangostin, Garcinone-E, Gartanin, Smeathxanthone-A. Data disajikan dalam rerata±standard deviasi.

Hasil analisis kuantitatif kadar senyawa *xanthone* dalam EKM dapat dilihat pada Tabel 5.2, hal ini menunjukkan bahwa 6 tingkat kematangan EKM mengandung γ-mangostin, garcinone-E, gartanin, dan smeathxanthone-A, di mana konsentrasi *xanthone* tertinggi terdapat di dalam EKM dengan tingkat kematangan 6. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa EKM kematangan 6 memiliki potensi yang lebih besar dalam proses penyembuhan luka karena memiliki kandungan senyawa *xanthone* tertinggi.

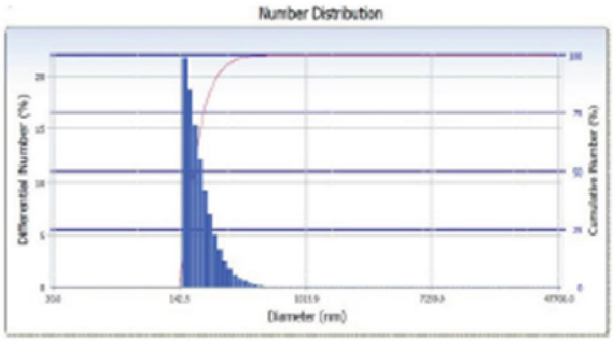
5.2.2. Karakterisasi EKM menggunakan PSA, SEM, XRD, dan XRF

Karakterisasi EKM menggunakan PSA, SEM, XRD dan XRF dilakukan untuk mengkarakterisasi ukuran dan kandungan unsur dalam EKM dengan tingkat kematangan berbeda. Pengetahuan akan struktur, ukuran, dan kandungan logam transisi dalam EKM dapat memprediksi adanya kompleks molekul yang terdapat

dalam EKM. Analisis PSA dilakukan untuk menganalisis partikel suatu sampel yang bertujuan untuk menentukan ukuran partikel dan distribusinya. Analisis SEM dilakukan untuk mengamati struktur mikro dari EKM dan komposisi atom-atomnya melalui spektrum EDX. XRD dilakukan untuk menganalisis sistem kristal pada material yang diuji. XRD dapat memberikan informasi mengenai jenis struktur, parameter kisi, susunan atom yang berbeda pada kristal. Sedangkan XRF digunakan untuk menganalisa komposisi kimia dan juga konsentrasi unsur-unsur yang terkandung dalam material dengan menggunakan metode spektrometri. Data mengenai analisis struktur mikro dan kandungan unsur-unsur EKM dilakukan pada EKM dengan tingkat kematangan 1-6. Hasil pengujian PSA, XRD, SEM dan XRF dapat dilihat pada Lampiran. Pada bab ini hanya ditampilkan karakteristik manggis dengan tinggkat kematangan 6. Hal ini karena EKM dengan tingkat kematangan 6 memiliki kandungan senyawa *xanthone* yang paling tinggi, memiliki karakteristik partikel yang unik dan memiliki aktivitas antioksidan yang paling baik diantara tingkat kematangan yang lain.

5.2.2.1 Hasil PSA

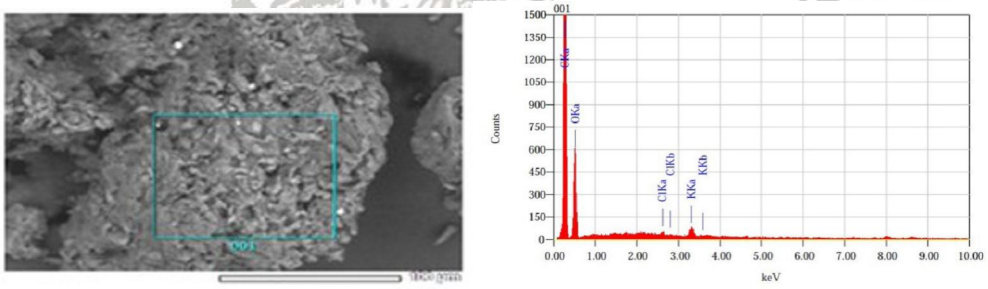
Gambar 5.5 dan Tabel 5.3 menunjukkan struktur mikro kulit manggis manggis pada tingkat kematangan 1-6 yang umumnya menunjukkan struktur seperti granular dan plate yang menyusun koagulasi besar. Terlihat bahwa ukuran partikel kulit manggis pada berbagai tingkat kematangan sangat bervariasi. Ukuran partikel kulit manggis terbesar pada tingkat kematangan 3 dan terkecil pada tingkat kematangan 5. Ukuran partikel bervariasi karena tergantung pada metode pemrosesan dan bisa juga berasal dari koagulasi partikel kulit manggis. Hasil penelitian ukuran partikel dari EKM tingkat kematangan 1-6 disajikan dalam Lampiran.



Gambar 5.5 Particle Size Distribution dari EKM tingkat kematangan 1-6

Hasil analisis PSA menunjukkan bahwa EKM dengan tingkat kematangan 6 memiliki ukuran partikel 199.2 ± 58.9 nm yang menunjukkan bahwa EKM dengan tingkat kematangan 6 berukuran nano. Buzea *et al*. (2007) mengatakan bahwa partikel dengan ukuran 100-1000 nm merupakan struktur nano.

5.2.2.2 Hasil SEM



Gambar 5.6 Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 6

Tabel 5.3 Kandungan dari EKM tingkat kematangan 6 berdasarkan EDX spectrum

No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	62,41 %
2.	Oksigen (O)	36,67 %
3.	Khlor (Cl)	0,23 %
4.	Kalium (K)	0,68 %

Gambar 5.6 dan Tabel 5.3 menunjukkan Spektrum EDX yang sesuai mengungkapkan elemen komposisi sampel. EKM dengan tingkat kematangan 6,

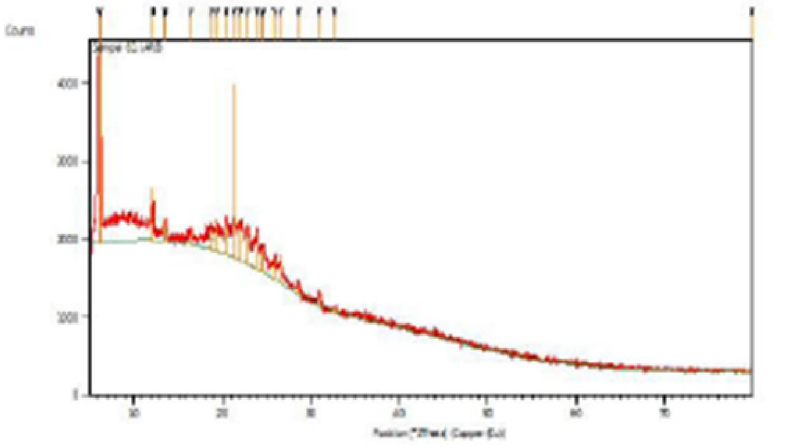
memilki kandungan C, O, Cl dan K. Kulit manggis tingkat kematangan 6 mengandung elemen C, O, Cl, dan K sebesar 62,41%, 36,67%; 0,23% dan 0,68%.

Berdasarkan hasil SEM, EKM tingkat kematangan 6 cenderung beragregasi. Mayoritas partikel-partikel yang terlihat di bawah pengamatan mikroskop cenderung menggumpal. Kecenderungan nanopartikel untuk beragregasi disebabkan oleh efek Gerak Brown dan gaya *Van der Waals*. Agregasi nanopartikel dapat mengubah sifat fisik maupun kimia nanopartikel. Agregasi nanopartikel mengurangi rasio luas permukaan nanopartikel. Untuk mencegah nanopartikel saling melekat dan mengendap, nanopartikel harus distabilkan (Jassby, 2011).

5.2.2.3 Hasil XRD

Analisis XRD telah dilakukan untuk menentukan struktur fisik bahan. Data yang akan diperoleh berupa grafik hubungan sudut difraksi sinar X pada bahan dengan intensitas sinar yang dipantulkan oleh bahan. Analisis XRD telah dilakukan terhadap seluruh tingkat kematangan dari EKM. Hasil analisis XRD disajikan dalam Lampiran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EKM dengan tingkat kematangan 1, 2, dan 3 memiliki struktur *amorf* dan EKM dengan tingkat kematangan 4, 5, dan 6 memiliki struktur *crystal*.

Pola XRD kulit manggis ditunjukkan pada Gambar 5.7, hasilnya menujukkan bahwa pada kulit manggis tingkat kematangan 6 memiliki bentuk kristal. Struktur kristal karbon menunjukkan kemungkinan konsentrasi *xanthone* yang tinggi. Perpaduan hasil analisis XRD dan PSA menunjukkan bahwa EKM tingkat kematangan 6 memiliki struktur *nanocrystal*.



Gambar 5.7 Hasil XRD dari EKM tingkat kematangan 6

5.2.2.4 Hasil XRF

XRF adalah teknik pengukuran X-Ray yang mirip dengan EDX, tetapi memiliki tingkat pengukuran yang lebih kecil untuk unsur-unsur yang memiliki nomor atom di atas 11. Oleh karena itu dalam penelitian ini penting untuk melakukan pengukuran XRF, sebagai konfirmasi terhadap pengukuran EDX dan XRD. Hasil analisis XRF terhdap 6 tingkat kematangan yang berbeda telah dilakukan dan hasilnya disajikan pada Lampiran.

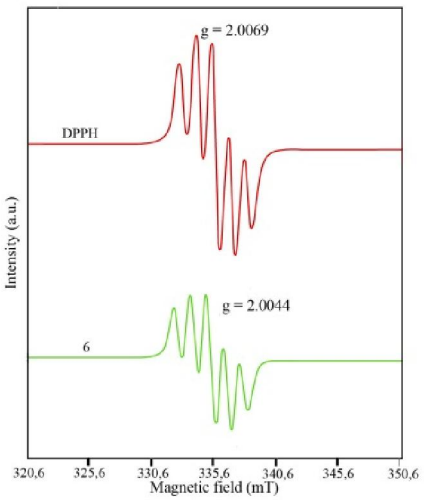
Tabel 5.4 Hasil XRF dari EKM tingkat kematangan 6

Senyawa	Konsentrasi Mikroelemen (%)
Kalium (K)	52.03
Klorida (Cl)	13.45
Kalsium (Ca)	4.67
Fosfor (P)	1.75
Sulfur (S)	2.20
Natrium (Na)	1.22
Cadmium (Cd)	1.11
Perak (Ag)	-

Senyawa	Konsentrasi Mikroelemen (%)
Besi (Fe)	0.92
Zink (Zn)	0.98
Molybdenum (Mo)	0.58
Rubidium (Rb)	0.52
Magnesium (Mg)	0.43
Silicon (Si)	0.40
Zirconium (Zr)	0.25
Argon (Ar)	0.20
Mangan (Mn)	0.30
Titanium (Ti)	0.53

XRF adalah metode X-ray yang mirip dengan EDX, namun dapat mengukur elemen yang lebih kecil di atas 11 nomor atom (West *et al*., 2010). XRF dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil yang diperoleh dari EDX dan Analisis XRD. Hasil XRF ditunjukkan pada Tabel 5.4. Sebagian besar elemen sesuai dengan hasil sebelumnya dianalisis dengan EDX dan ada juga beberapa lagi elemen lain yang ditemukan. Elemen K, Cl, Ca, P, S, Na, Cd, Fe, Zn, Rb, Mg, Si, Zr, Ar dan Mn terdeteksi pada EKM dengan tingkat kematangan 6.

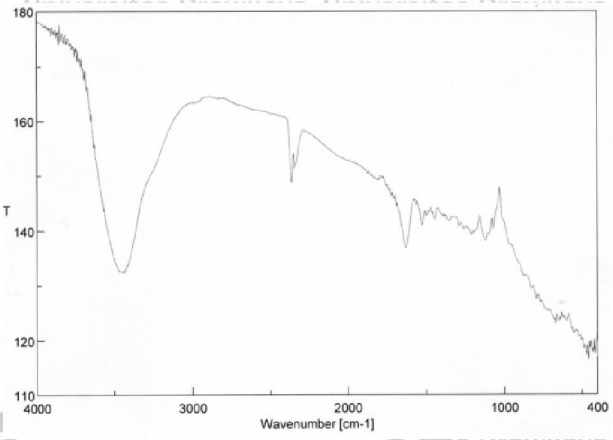
5.2.2.5. Hasil Analisis ESR



Gambar 5.8 Hasil pengujian DPPH dari EKM kematangan 6 menggunakan ESR

Pengujian aktivitas antioksidan EKM dengan tingkat kemaangan 1-6 telah dilakukan. Hasil pengujian aktivitas antioksidan EKM tingkat kematangan 1-6 disajikan dalam Lampiran. Pengujian antioksidan dilakukan menggunakan analisis ESR. DPPH digunakan sebagai senyawa standar radikal bebas yang dibandingkan dengan DPPH ditambah EKM kematangan 6. Berdasarkan hasil ESR menunjukkan EKM dengan tingkat kematangan 6, memiliki penurunan g-value (2,0069 menjadi 2,0044) jika dibandingkan dengan radikal bebas DPPH.

5.2.2.6. Hasil Analisis FTIR pada Tingkat Kematangan 6

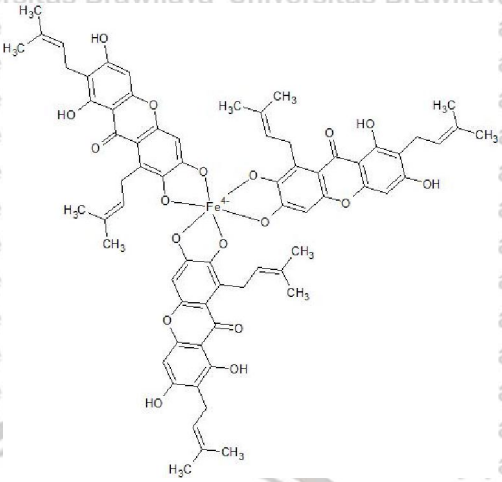


Gambar 5.9 Analisis FTIR dari EKM kematangan 6

Gambar 5.9 menunjukkan hasil spektrum FTIR. Hasil analisis FTIR menunjukkan ikatan antara logam transisi dengan senyawa organik pada ekstrak kulit manggis pada tingkat kematangan 6. Ikatan logam transisi-senyawa organik terdeteksi pada penurunan absrobansi vibrasi pada gelombang dengan nomor 900-400 cm^{-1}. Tingkat absorbansi menunjukkan bahwa terdapat variasi interaksi antara logam transisi dengan senyawa organik pada EKM. Di antara kompleks logam-senyawa organik yang terdeteksi adalah kompleks Fe-O pada 625-490 cm^{1}. Kompleks ion Fe-O juga terdeteksi pada panjang gelombang 571.81 cm^{-1}.

5.2.2.7. Prediksi kompleks molekul senyawa organik-logam transisi

Prediksi struktur ikatan antara ion Fe dengan γ-magostin telah dilakukan menggunakan program Chemskect dan Open Babel. Hasil prediksi ikatan struktur disajikan dalam Gambar 5.10. Hasil prediksi senyawa menunjukkan adanya kompleks gabungan antara Fe^{2+} dengan γ-magostin. Kedua molekul tersebut membentuk $Fe(\gamma\text{-mangosteen})_3^{-4}$ Gambar 5.10 menunjukkan Fe^{2+} berperan sebagai atom sentral dan γ-magostin berperan sebagai ligand.

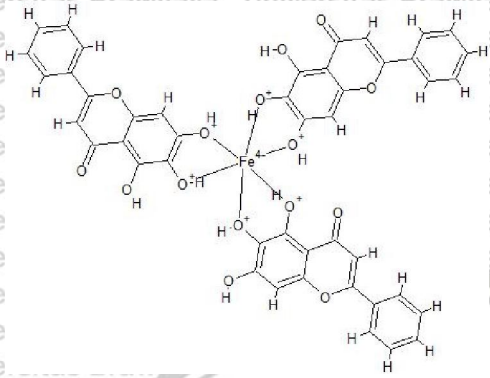


Gambar 5.10 Kompleks Fe-γ Mangostin, kompleks molekul dalam EKM

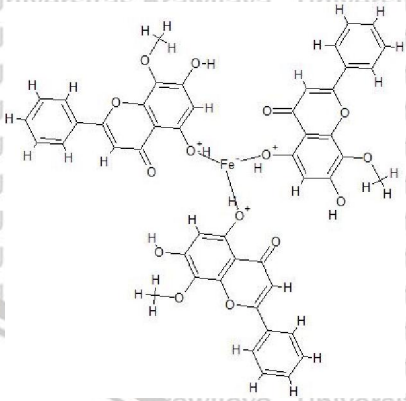
Prediksi ini mendukung hasil analisis XRF dimana ektrak kulit manggis mengandung berbagai macam logam transisi. Hasil FTIR menunjukan bahwa logam-logam tersebut berbentuk kompleks senyawa dengan senyawa organik. Kompleks senyawa organik dengan logam transisi diketahui memiliki peran penting sebagai senyawa antioksidan. Senyawa yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan ion logam transisi dapat berfungsi sebagai *chelator* (pengkelat) logam. Proses pengkelatan logam dapat mencegah terbentuknya radikal bebas melalui penghambatan reaksi Fenton.

Prediksi kemampuan kompleks senyawa dalam gel MEBO dalam mengkelat ion logam juga telah dilakukan. Gel MEBO diprediksi memiliki senyawa-senyawa yang berperan dalam pengkelatan ion logam karena mampu membentuk kompleks molekul logam transisi-senyawa organik. Hasil analisis yang didapatkan dari kompleks molekul logam transisi-senyawa organik yang terkandung dalam gel MEBO dengan menggunakan program *chemskecth* dan *Open Babel*, antara lain: ditemukan adanya kompleks Fe(phellodendrine)$_3^{-1}$, Fe(rhamnetin)$_3^{-4}$, Fe(wogonin)$_3^{-}$

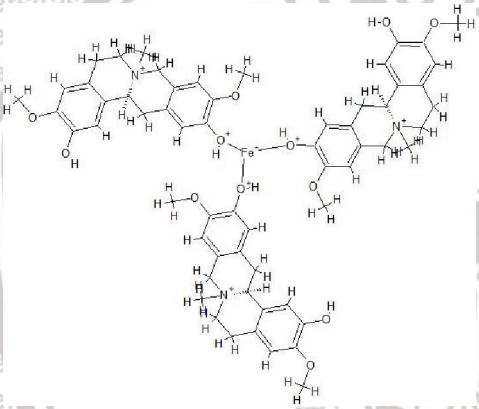
Fe(baicalein)$_3^{-4}$. Gambar prediksi struktur senyawa tersebut dilihat pada Gambar 5.11.



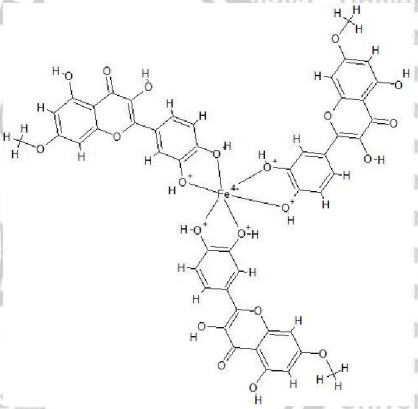
Kompleks Fe(baicalein)$_3^{-4}$



Kompleks Fe(wogonin)$_3^{-}$



Kompleks Fe(phellodendrine)$_3^{-1}$



Kompleks Fe(rhamnetin)$_3^{-4}$

Gambar 5.11 Berbagai macam kompleks molekul dalam gel MEBO

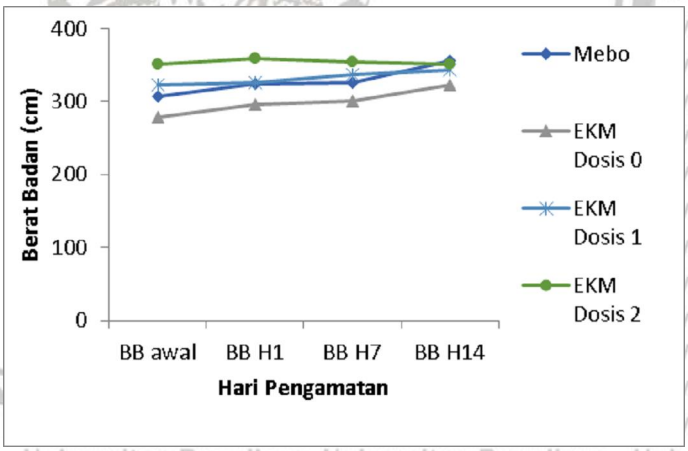
Gambar 5.11 menunjukkan berbagai macam kompeks molekul senyawa organik-logam transisi yang terdapat dalam gel MEBO. Gambar 5.11 menunjukkan bahwa gel MEBO memiliki senyawa yang diprediksi berperan dalam pengkelatan ion logam. Prediksi ini dapat memperkuat teori yang menyatakan bahwa penggunaan obat herbal yang memiliki aktivitas antioksidan memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka.

5.3 Hasil Penelitian Tahap 3

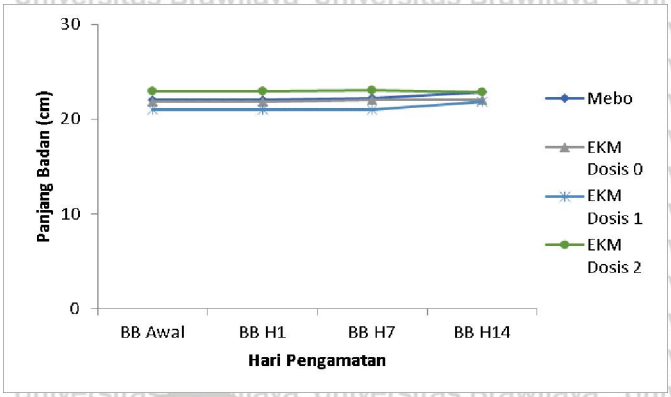
5.3.1 Kondisi Fisik Tikus Pasca Luka Bakar

Tikus model luka bakar dilbuat dengan membuat luka bakar pada punggung tikus yang telah diberikan anestesi dosis tunggal intraperitoneal. Setelah dilakukan anestesi, bulu di punggung dicukur. Punggung tikus dipaparkan selama 30 detik dengan alat yang dipanaskan 60 ºC. Tindakan ini akan menghasilkan luka bakar derajat dua yang dikonfirmasi dengan perubahan gross patologis seperti gambar di bawah (Ju *et al.*, 2016). Tikus yang telah mengalami luka bakar, diberi pakan dan minum sesuai data yang terdapat dalam Lampiran.

Kondisi fisik berupa panjang tubuh dan berat badan tikus diukur setiap hari. Kondisi fisik ini diukur untuk melihat kondisi kesehatan tikus pasca luka bakar. Data mengenai kondisi fisik tikus (berat badan dan panjang badan) disajikan dalam gambar 5.12. dan gambar 5.13.



Gambar 5.12 Data Berat Badan Tikus Pasca Luka Bakar



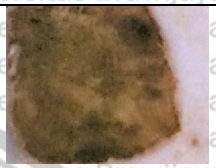
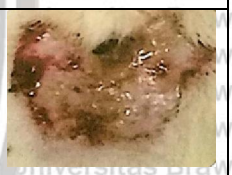
Gambar 5.13 Data Panjang Badan Tikus Pasca Luka Bakar

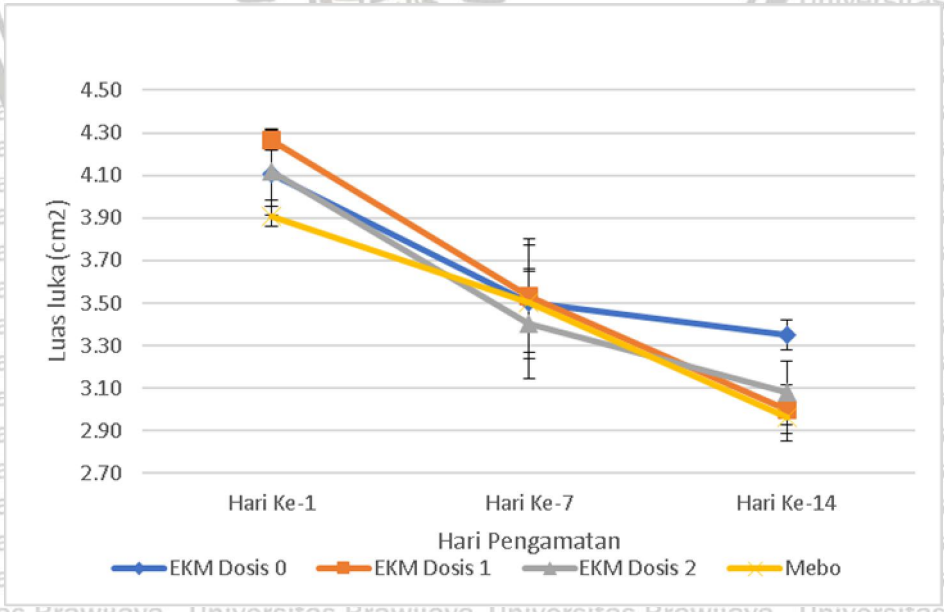
Gambar 5.12 dan 5.13 menunjukkan rerata berat badan tikus pasca berat induksi luka bakar mengalami kenaikan. Hal ini menunjukkan bahwa tikus model luka bakar tidak memiliki masalah dengan nutrisi. Panjang badan tikus stagnan dari awal perlakuan hingga hari ke-14.

5.3.2 Morfologi Luka Bakar

Morfologi luka bakar telah diamati untuk melihat kondisi luka bakar setelah diberi perlakuan menggunakan EKM Dosis 0, EKM Dosis 1, EKM Dosis 2 dan MEBO. Hasil pengamatan morfologi luka disajikan dalam Tabel 5.5. Tabel 5.5 menunjukkan adanya pengurangan luas luka bakar pada EKM Dosis 1, Dosis 2 dan MEBO.

Tabel 5.5 Morfologi luka tikus pasca pemberian gel EKM

Perlakuan	Hari ke-0	Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
EKM Dosis 0				
EKM Dosis 1				
EKM Dosis 2				
MEBO				



Gambar 5.14 Data Penurunan luas luka bakar

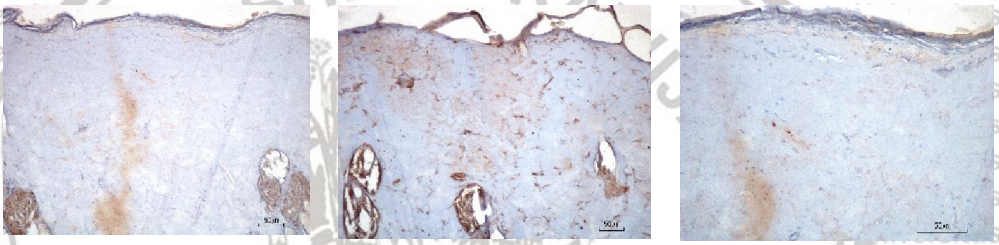
Gambar 5.14 menunjukkan terjadi penurunan luas luka bakar pada seluruh perlakuan. Kelompok perlakuan EKM Dosis 1 (0,2 g), EKM Dosis 2 (0,4 g) dan MEBO, mengalami pengurangan luas luka yang lebih cepat dibandingkan dengan EKM Dosis 0 (kontrol negatif). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel EKM mampu meningkatkan proses penyembuhan luka bakar sebanding dengan MEBO. Pengamatan mengenai adanya bula, rambut dan keropeng pada luka bakar pasca luka bakar disajikan dalam Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Kondisi Morfologi Luka Bakar

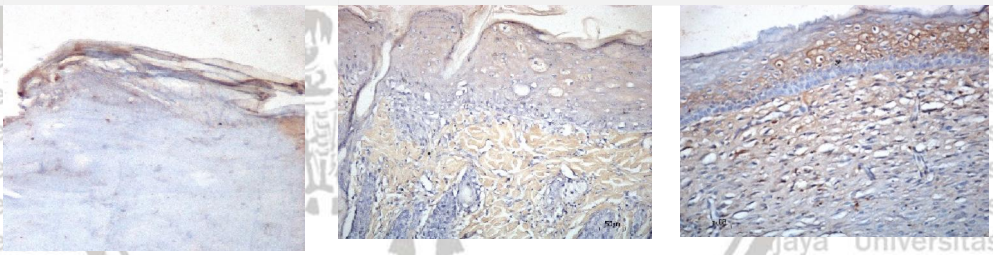
Perlakuan	Pengamatan	Hari Pengamatan			
		0	1	7	14
EKM Dosis 0	Adanya Bula	-	-	-	-
	Adanya Keropeng	-	-	- (ada erosi)	+
	Munculnya Rambut	-	-	-	-
EKM Dosis 1 (0,2 g)	Adanya Bula	-	-	-	-
	Adanya Keropeng	-	-	+	+ ++
	Munculnya Rambut	-	-	-	-
EKM Dosis 2 (0,4 g)	Adanya Bula	-	-	-	-
	Adanya Keropeng	-	-	+	+ (Keropeng Lepas), Erosi
	Munculnya Rambut	-	-	-	-
MEBO	Adanya Bula	-	-	-	-
	Adanya Keropeng	-	-	+	+++, (Keropeng Lepas), Erosi
	Munculnya Rambut	-	-	-	-

5.3.3 Tampilan Anatomi Penyembuhan Luka Bakar

Pengamatan histopatologi telah dilakukan terhadap jaringan yang terkena luka bakar dan telah diberi berbagai macam perlakuan yaitu, EKM Dosis 0, EKM Dosis 1, dan EKM Dosis 2, dan MEBO. Sediaan histopatologi diwarnai dengan pewarna Hematoxylin-Eosin. Pengamatan dilakukan pada hari Ke-1, hari ke-7 dan hari ke-14. Parameter yang diamati yaitu tampilan anatomi perbaikan jaringan, infiltrasi neutrofil, infiltrasi limfosit dan neovaskularisai. Gambar 5.12 menunjukkan representasi proses penyembuhan luka bakar secara anatomi pada model tikus luka bakar.



a. EKM Dosis 0 H-1 **b. EKM Dosis 0 H-7** **c. EKM Dosis 0 H-14**



d. EKM Dosis 1 H-1 **e. EKM Dosis 1 H-7** **f. EKM Dosis 1 H-14**

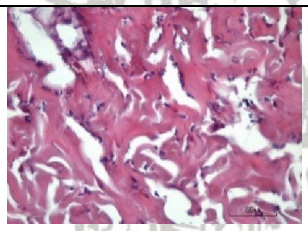
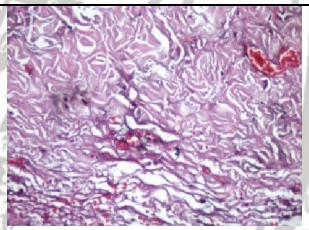
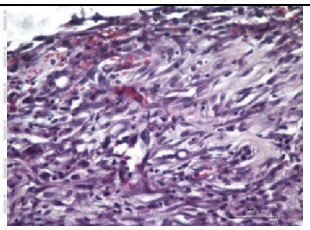
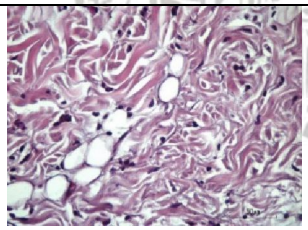
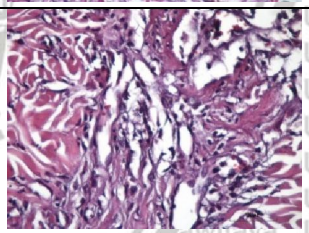
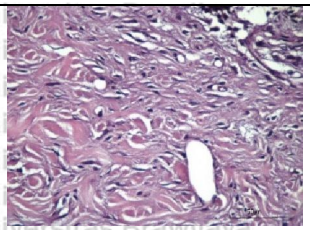
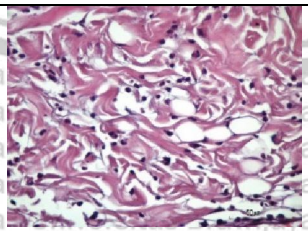
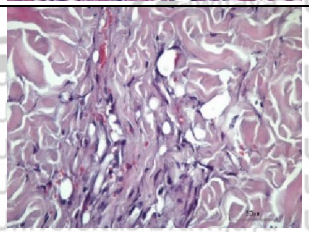
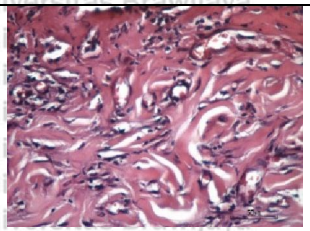
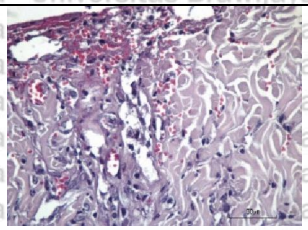
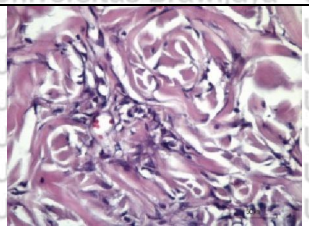
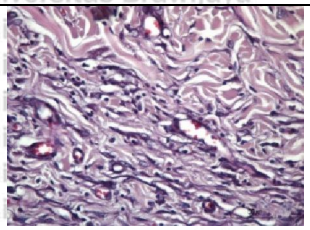
Gambar 5.15 Representasi proses penyembuhan luka bakar jaringan luka bakar pada EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1

Gambar 5.15 menunjukkan proses penyembuhan jaringan luka bakar hari ke-1 hingga hari ke-14. Hasil ini merupakan representasi perbandingan proses penyembuhan luka bakar pada EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1. Proses penyembuhan luka dapat ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah kolagen dan proses re-epitelisasi. Proses re-epitelisasi pada EKM Dosis 1 lebih cepat

dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Hasil re-epiteliasi pada EKM Dosis 1 menunjukkan epitel yang lebih tebal dibandingkan dengan EKM Dosis 0.

Tampilan anatomi perbaikan jaringan disajikan dalam Tabel 5.7. Tabel 5.7 menunjukkan perkembangan perbaikan jaringan kolagen dari pengamatan hari ke-1, ke-7 dan ke-14. Sel-sel neutrofil, sel-sel limfosit terwarnai dengan jelas dan neovaskularisasi pembuluh darah juga teramati dengan jelas. Jumlah infiltrasi neutrofil, limfosit dan neovaskularisasi kemudian diamati dan dikuantifikasi. Hasil kuantifikasi jumlah neutrofil, limfosit dan neovaskularisasi disajikan dalam sub-bab selanjutnya.

Tabel 5.7 Anatomi jaringan tikus model luka bakar

No	Perlakukan	Waktu Pengamatan		
		Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
1.	EKM Dosis 0			
2.	EKM Dosis 1			
3.	EKM Dosis 2			
4.	MEBO			

Hasil pengamatan anatomi jaringan yang terkena luka bakar dan diberi berbagai perlakukan menunjukkan peningkatan kepadatan kolagen pada seluruh perlakuan. Pada EKM Dosis 0 hari ke-1, terlihat kerusakan struktur yang berat dari jaringan kulit epidermis, dermis dan jaringan ikat tidak dapat dibedakan. Pada hari ke-7 terlihat penyembuhan jaringan ikat, tetapi batas antara epidermis dan dermis belum jelas, sedangkan pada hari ke-14 terlihat jaringan ikat membaik dan batas antara epidermis dan dermis mulai terlihat.

Pada kelompok perlakuan MEBO hari ke-1, kerusakan struktur dari jaringan kulit tingkat sedang, epidermis dan dermis tidak dapat dibedakan. Pada hari ke-7, penyembuhan jaringan ikat dengan batas pertumbuhan yang jelas antara epidermis dan dermis dan pada hari ke-14 integritas jaringan ikat utuh dan baik, batas antara epidermis dan dermis mulai terlihat dengan jelas.

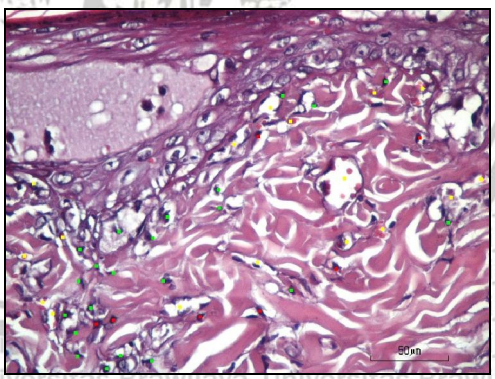
Pada perlakuan EKM Dosis 1 hari ke-1, terdapat kerusakan minimal pada struktur dari jaringan kulit, terutama pada bagian epidermis. Dermis masih utuh dan terjadi sedikit kerusakan pada lapisan epidermis. Jaringan ikat masih utuh. Pada hari ke-7 terlihat penyembuhan yang bermakna pada jaringan ikat dan dermis dengan batas pertumbuhan yang jelas antara epidermis dan dermis; lapisan epidermis mulai bertumbuh namun belum terlihat penebalan lapisan dan pada hari ke-14 terlihat pertumbuhan sempurna jaringan kulit baru, integritas jaringan ikat utuh dan baik, batas antara epidermis dan dermis mulai terlihat jelas. Lapisan epidermis tumbuh dengan baik.

Pada kelompok perlakuan EKM Dosis 2 hari ke-1, kerusakan minimal sekali pada struktur dari jaringan kulit, terutama pada bagian epidermis, dermis masih terlihat utuh dan ada sedikit kerusakan pada lapisan epidermis. Jaringan ikat masih terlihat utuh. Pada hari ke-7 terjadi penyembuhan yang bermakna pada

jaringan ikat dan dermis dengan pertumbuhan batas yang jelas antara epidermis dan dermis, lapisan epidermis mulai bertumbuh namun dan sudah terlihat adanya penebalan lapisan. Pada hari ke-14 terjadi pertumbuhan sempurna jaringan kulit baru, integritas jaringan ikat solid dan baik, batas antara epidermis dan dermis mulai terlihat jelas dan ada beberapa lapisan epidermis yang tumbuh. Gambar selengkapnya dari sayatan anatomi tikus model luka bakar disajikan dalam Lampiran.

5.3.4 Infiltrasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi

Perhitungan infiltrasi neutrofil, neovaskularisasi dan infiltrasi limfosit dilakukan menggunakan Software ImageJ. ImageJ dapat digunakan untuk mengkuantifikasi sel dalam jaringan. Contoh hasil analisis imageJ dalam proses perhitungan jaringan disajiakn dalam Gambar 5.16. Titik hijau merepresentasikan sel neutrofil, titik kuning merepresentasikan sel limfosit dan titik merah merepresentasikan neovaskularisasi.

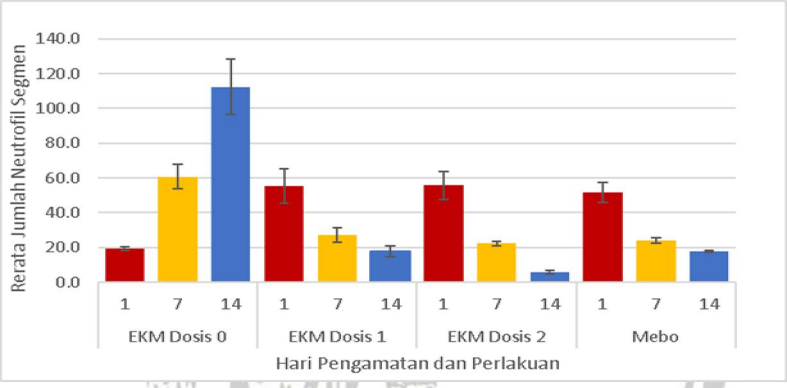


Gambar 5.16 Kuantifikasi infiltrasi neutrofil, limfosit, neovaskularisasi menggunakan software ImageJ

5.3.4.1 Infiltrasi Neutrofil

Pengamatan terhadap jumlah neutrofil pada preparat histopatologi jaringan yang terkena luka bakar dan diberi berbagai perlakuan telah dilakukan. Hasil pengamatan tersebut disajikan dalam Gambar 5.17. Pengamatan infiltrasi neutrofil

menunjukkan hasil yang berbeda pada masing-masing perlakuan. Pada jaringan yang diberi perlakuan EKM Dosis 0, menunjukan adanya peningkatan jumlah neutrofil pada hari ke-1, 7 dan 14. Hasil ini mengindikasikan terjadinya infeksi bakteri pada jaringan luka bakar yang tidak diberi perlakuan. Jumlah neutrofil yang terus meningkat juga mengindikasikan terjadinya inflamasi yang berkepanjangan (*prolonged inflammation*). Pada jaringan yang diberi perlakuan, MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, terdapat penurunan jumlah neutrofil pada pengamatan hari ke-7 dan hari ke-14.



Gambar 5.17 Rerata neutrofil pada jaringan luka bakar dengan berbagai macam perlakuan

Tabel 5.8 Analisis Statistik Hasil Infiltrasi Neutrofil

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$19.3\pm1.2^{a,A}$	$60.7\pm7.0^{a,B}$	$112.3\pm16.0^{a,C}$
EKM Dosis 1	$55.3\pm10.0^{b,A}$	$27.3\pm4.2^{b,B}$	$17.7\pm3.2^{b,B}$
EKM Dosis 2	$55.7\pm8.1^{b,A}$	$22.3\pm1.2^{b,B}$	$6.0\pm1.0^{b,C}$
MEBO	$51.7\pm5.8^{b,A}$	$24.0\pm1.7^{b,B}$	$17.7\pm0.6^{b,B}$

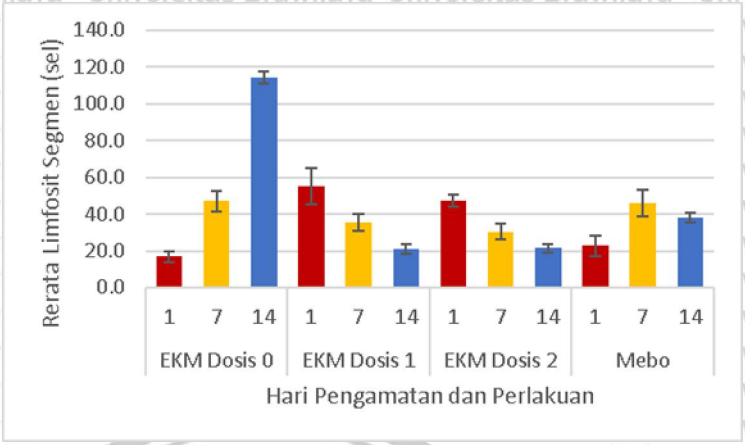
*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

Analisis statistik juga telah dilakukan untuk melihat apakah jumlah neutrofil berbeda secara nyata pada berbagai macam perlakuan. Hasil analisis statistik *oneway Anova* dan *Post Hoc Tuckey Test* ($\alpha<0,05$) menunjukkan adanya

perbedaan jumlah neutrofil pada hari ke-1 setelah luka bakar dan telah diberi berbagai perlakuan. Hasil analisis statistik disajikan pada Tabel 5.8. Terdapat perbedaan yang signifikan antara jaringan yang diberi perlakuan EKM Dosis 1, EKM Dosis 2 dan MEBO dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Hal ini menujukkan bahwa EKM memiliki kemampuan untuk meningkatkan infiltrasi neutrofil pada jaringan yang terkena luka bakar pada hari ke-1. Analisis statistik menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 memiliki kemampuan yang sama dengan MEBO dalam meningkatkan infiltrasi neutrofil pada hari ke-1. Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa jumlah neutrofil pada model tikus yang diberi perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 tertinggi pada hari pertama (fase inflamasi) dan terus menurun pada ke 7 dan 14. Hal ini menunjukkan bahwa neutrofil dibutuhkan pada saat fase inflamasi pada proses penyembuhan luka bakar.

5.3.4.2 Infiltrasi Limfosit

Pengamatan jumlah limfosit pada preparat histopatologi jaringan yang terkena luka bakar dan diberi berbagai perlakuan telah dilakukan. Hasil pengamatan tersebut disajikan dalam Gambar 5.18. Limfosit merupakan sel yang berperan penting dalam penyembuhan luka normal. Limfosit akan meningkat pada hari ke-5 setelah luka dan akan mencapai jumlah tertinggi pada hari ke-7. Limfosit berperan sebagai penghasil molekul sitokin yang akan memicu sel-sel mesenkimal lokal untuk menghasilkan *fibroblast. Fibroblast* ini yang berperan dalam menghasilkan protein struktural yang akan membentuk jaringan.



Gambar 5.18 Rerata limfosit pada jaringan luka bakar dengan berbagai macam perlakuan

Pengamatan infiltrasi limfosit menunjukkan hasil yang berbeda pada masing-masing perlakuan. Pada luka dengan perlakuan EKM Dosis 0 menunjukkan adanya peningkatan jumlah limfosit pada hari 7 dan 14 dibandingkan dengan hari pertama. Pada jaringan yang diberi perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, terdapat penurunan jumlah infiltrasi limfosit pada pengamatan hari ke-7 dan hari ke-14 dibandingkan dengan hari pertama.

Tabel 5.9 Analisis Statistik Infiltrasi Limfosit Jaringan

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$17.0\pm3.0^{a,A}$	$47.0\pm5.6^{a,B}$	$114.3\pm3.0^{a,C}$
EKM Dosis 1	$55.3\pm10.0^{b,A}$	$35.3\pm4.5^{a,b,B}$	$21.0\pm2.6^{b,B}$
EKM Dosis 2	$47.3\pm3.2^{b,A}$	$30.3\pm4.2^{b,B}$	$21.3\pm2.5^{b,C}$
MEBO	$22.7\pm5.5^{a,A}$	$46.0\pm7.0^{a,B}$	$38.0\pm2.6^{c,B}$

*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

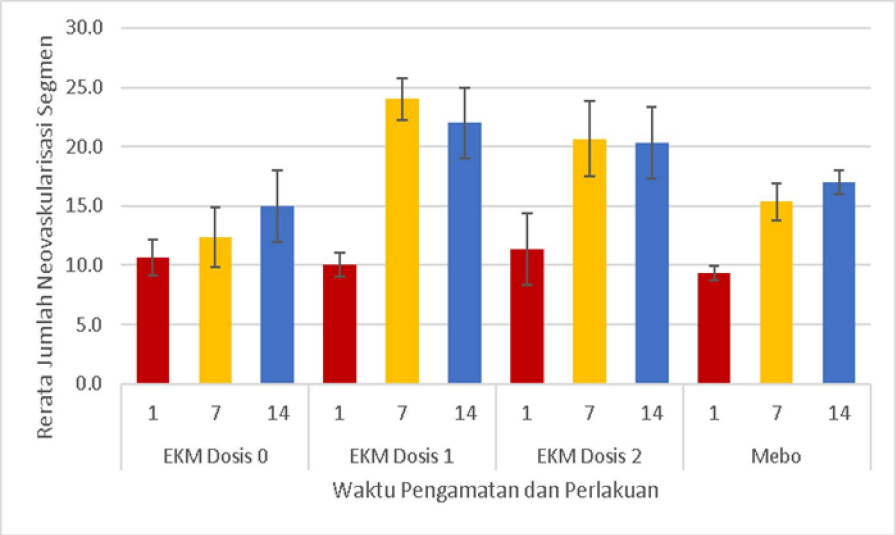
Hasil analisis statistik infiltrasi limfosit disajikan dalam Tabel 5.9. Analisis statistik *oneway Anova* dan *Post Hoc Tuckey Test* ($\alpha<0.05$) menunjukkan adanya peningkatan jumlah infiltrasi limfosit pada perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 dibandingan dengan EKM Dosis 0 dan MEBO. Artinya pada hari ke-1 pemberian

EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, dapat meningkatkan infiltrasi limfosit. Namun pada pengamatan hari ke-7 dan 14, terdapat perbedaan nyata dari jumlah infiltrasi limfosit antara EKM Dosis 0 dan perlakuan. Jumlah limfosit pada jaringan luka pada hari ke-7 dan 14 lebih rendah dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Perbedaan jumlah limfosit pada EKM Dosis 0 kemungkinan besar disebabkan karena *adanya prolonged inflammation* atau inflamasi yang berkepanjangan akibat adanya infeksi bakteri atau luka yang belum sembuh.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa infiltrasi neutrofil pada perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, jumlah neutrofil tertinggi terjadi pada hari pertama dan turun secara signifikan pada hari ke-7 dan ke-14. Pada MEBO, jumlah neutrofil tertinggi terjadi pada hari ke-7 dan turun pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa ketika tidak terjadi *prolonged inflammation,* jumlah neutrofil tertinggi terjadi pada hari ke-1 setelah luka atau terjadi pada fase inflamasi.

5.3.4.3 Neovaskularisasi

Pengamatan jumlah neovaskularisasi pada preparat histopatologi jaringan yang terkena luka bakar dan diberi berbagai perlakuan juga telah dilakukan. Hasil pengamatan tersebut disajikan dalam Gambar 5.19. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian EKM meningkatkan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-7 dan hari ke-14.



Gambar 5.19 Rerata Neovaskularisasi pada Jaringan Luka Bakar dengan berbagai Macam Perlakuan

Pengamatan jumlah neovaskularisasi menunjukkan hasil yang berbeda pada masing-masing perlakuan. Pada luka yang diberi perlakuaan EKM Dosis 0 menunjukkan adanya peningkatan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-7 dan ke-14. Pada jaringan yang diberi perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, terdapat peningkatan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-7, namun turun kembali pada hari ke-14. Pada jaringan yang diberi perlakuan MEBO terdapat peningkatan jumlah neovaskularisasi dari hari ke-1, 7 dan 14.

Tabel 5.10 Analisis Statistik Neovaskularisasi Jaringan

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$10.7\pm1.5^{a,A}$	$12.3\pm2.5^{a,A}$	$15.0\pm3.0^{a,A}$
EKM Dosis 1	$10.0\pm1.0^{a,A}$	$24.0\pm1.7^{b,B}$	$22.0\pm3.0^{b,B}$
EKM Dosis 2	$11.3\pm3.1^{a,A}$	$20.7\pm3.2^{b,c,B}$	$20.3\pm3.1^{a,B}$
MEBO	$9.3\pm0.6^{a,A}$	$15.3\pm1.5^{a,c,B}$	$17.0\pm1.0^{a,B}$

*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

Hasil analisis statistik disajikan dalam Tabel 5.10. Analisis statistik *oneway Anova* dan *Post Hoc Tuckey Test* ($\alpha<0.05$) menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-1. Artinya pada hari ke-1 pemberiaan obat (MEBO) dan EKM tidak dapat meningkatkan neovaskularisasi. Namun pada pengamatan hari ke-7, terdapat perbedaan nyata dari jumlah neovaskularisasi antara EKM Dosis 0, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, namun tidak ada perbedaan nyata antara EKM dosis 0 dan MEBO. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian EKM baik Dosis 1 maupun Dosis 2 dapat meningkatkan jumlah neovaskularisasi dibandingkan dengan kontrol dan MEBO. Pada hari ke-14 jumlah neuvaskularisasi lebih tinggi secara signifikan pda perlakuan EKM Dosis 1 dan rerata yang lebih tinggi pada EKM Dosis 2 dibandingkan dengan EKM Dosis 0 dan MEBO.

Hasil statistik juga menunjukkan bahwa pada tikus yang diberi perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 menunjukkan adanya peningkatan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-7 dan 14 dibandingkan dengan hari ke-1. Hal ini menunjukkan bahwa neovaskularisasi terbentuk pada fase proliferasi hingga remodeling.

5.3.5 Analisis Ekspresi Protein yang Berperan dalam Penyembuhan Luka

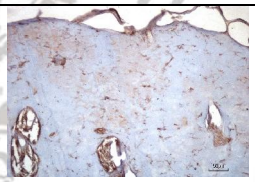
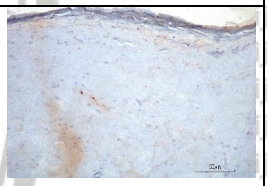
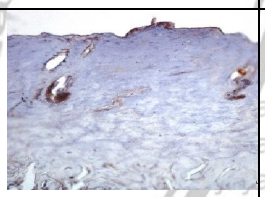
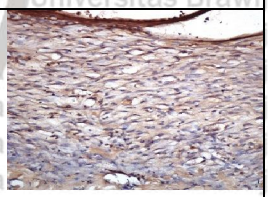
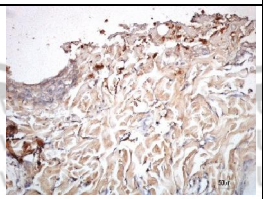
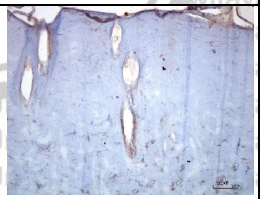
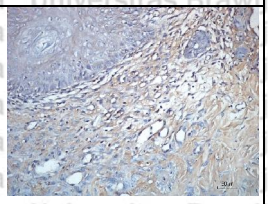
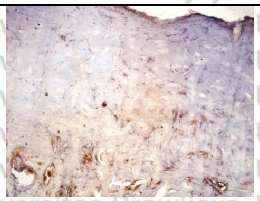
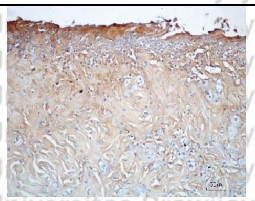
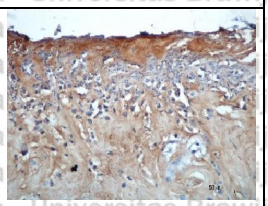
5.3.5.1 Ekspresi Protein IL-6

Uji imunohistokimia telah dilakukan untuk melihat ekspresi protein IL-6. Analisis ekspresi protein IL-6 pada jaringan luka bakar didasarkan pada analisis QSAR gel EKM yang telah dilakukan dan menunjukkan bahwa protein IL-6 merupakan protein yang dipengaruhi oleh senyawa-senyawa dalam gel EKM serta memiliki pengaruh dalam proses penyembuhan luka. Hasil analisis uji imunohistokimia protein IL-6

berupa kuantifikasi ekspresi protein dan persebaran protein IL-6. Tabel 5.11 menunjukkan foto hasil analisis imunohistokimia protein IL-6.

Foto hasil uji imunohistokimia (Tabel 5.11) menunjukan perbaikan jaringan yang lebih baik pada perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Foto IHK juga menunjukkan adanya proses re-epitelisasi pada jaringan yang diberi perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2. Hal ini menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 memiliki kemampuan yang sama dengan MEBO dalam menyembuhkan luka bakar *grade* IIA.

Tabel 5.11 Representasi IHK protein IL-6 dari jaringan yang terkena luka bakar

No	Perlakuan	Waktu Pengamatan		
		Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
1.	EKM Dosis 0			
2	EKM Dosis 1			
3	EKM Dosis 2			
4	MEBO			

Tabel 5.11 juga menunjukkan bahwa protein IL-6 terekpresi pada jaringan endodermis. Jaringan endodermis merupakan tempat dimana protein-protein sitokin berperan dalam penyembuhan luka. Kuantifikasi ekspresi protein IL-6 dari foto IHK dilakukan untuk melihat persebaran dan jumlah protein yang diekspresikan pada jaringan yang terkena luka bakar. Hasil kuantifikasi protein IL-6 disajikan pada Tabel 5.12 dan Gambar 5.20.

Tabel 5.12 Kuantifikasi Ekspresi Protein IL-6 pada Imunohistokimia

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$1.0\pm0^{a,A}$	$3.67.3\pm0.57^{a,b,B}$	$2.67\pm0.57^{a,b,A}$
EKM Dosis 1	$3.67\pm0.33^{b,A}$	$10.67.0\pm2.3^{c,B}$	$5.33\pm1.15^{c,A}$
EKM Dosis 2	$4.0\pm0^{b,A}$	$6.67\pm1.15^{b,B}$	$4.67\pm1.15^{b,c,A}$
MEBO	$2.0\pm0^{a,A}$	$2.0\pm0^{a,A}$	$1.33\pm0.57^{a,A}$

*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

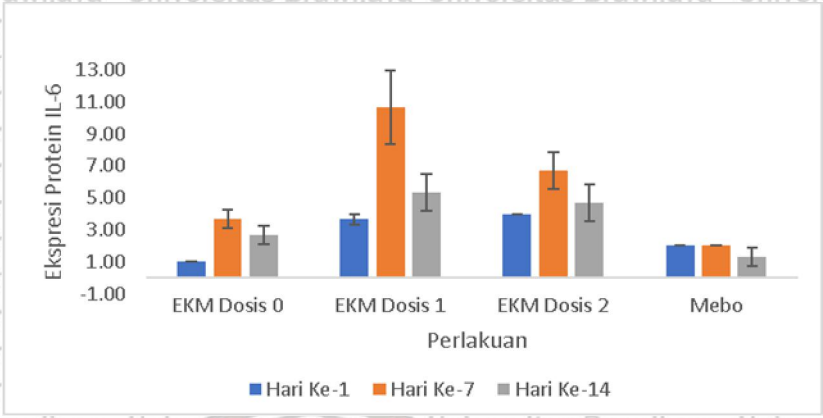
Berdasarkan Tabel 5.12, Pada hari ke-1, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein IL 6 tertinggi terletak pada perlakuan EKM Dosis 2, yaitu sebesar 4.00±0.00 dan rata-rata ekspresi protein IL 6 yang terendah berada pada perlakuan EKM Dosis 0, yaitu sebesar 1.00±0.00. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein IL 6 antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *Annova* dan *Post Hoc Tuckey Test*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 berbeda secara signifikan dengan EKM Dosis 0 dan MEBO. Hal ini menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan Dosis 2 mampu meningkatkan ekspresi IL-6 pada hari pertama setelah luka.

Pada hari ke-7 dapat dilihat bahwa rata-rata ekspresi protein IL 6 tertinggi pada perlakuan EKM dosis 1, yaitu sebesar 10,67±2,30, dan rata-rata ekspresi protein IL 6 terendah pada perlakuan MEBO yaitu sebesar 2,00±0,00. Untuk

membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein IL 6 antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *Anova* dan *Post Hoc Tuckey Test*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada hari ke-7 terdapat perbedaan secara signifikan antara EKM Dosis 1 dengan seluruh perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa, pemberian EKM Dosis 1 mampu meningkatkan ekspresi protein IL-6 hari ke-7.

Pada hari ke-14 dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein IL-6 tertinggi pada perlakuan EKM Dosis 1 sebesar 5.33±1.15, dan rata-rata ekspresi protein IL-6 terendah pada perlakuan MEBO yaitu sebesar 1.33±0.57. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein IL-6 antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *Anova* dan *Post Hoc Tuckey Test*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 mampu meningkatkan ekspresi protein IL-6 pada hari ke-14.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa pada perlakuan EKM Dosis 0, 1, dan 2 IL-6 diekspresikan tertinggi pada hari ke-7. Walaupun IL-6 merupakan protein inflamasi, hasil penelitian menunjukkan bahwa IL-6 dibutuhkan pada saat fase proliferasi. Akan tetapi, kajian lebih lanjut akan hal ini sangat diperlukan. Hingga saat ini, peran protein IL-6 dalam proses penyembuhan luka belum diketahui secara pasti.



Gambar 5.20 Ekspresi protein IL-6 pada hari ke-1, 7 dan 14 menggunakan metode IHK

Gambar 5.20 menunjukkan tersebut menunjukkan bahwa ekspresi protein IL-6 pada semua perlakuan menujukkan pola yang sama. Ekspresi protein IL-6 tertinggi pada hari hari ke-7 dan ekspresi protein IL-6 terendah terjadi pada hari ke-1. Analisis uji statistik, seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, menunjukkan bahwa perlakuan EKM Dosis 1 dan Dosis 2 meningkatkan ekspresi protein IL-6 dibandingkan dengan kontrol pada hari ke-1. Pada hari ke-7, perlakuan EKM Dosis 2 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-6 yang signifikan dibandingkan dengan kontrol, MEBO dan EKM dosis 1. Hasil ini menunjukkan bahwa EKM baik Dosis 1 maupun Dosis 2 mampu meningkatkan ekspresi protein IL-6 pada hari petama dan ke-7 dibandingkan dengan MEBO dan EKM Dosis 0.

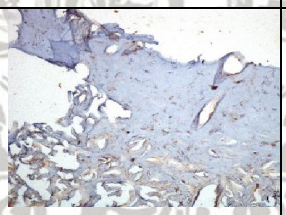
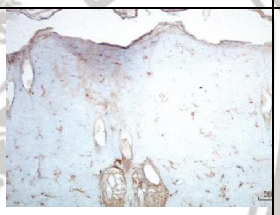
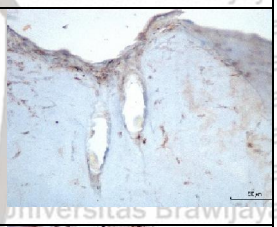
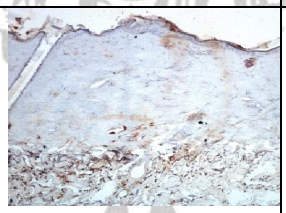
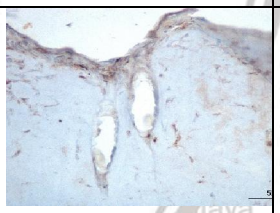
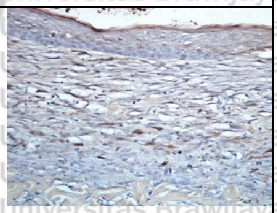
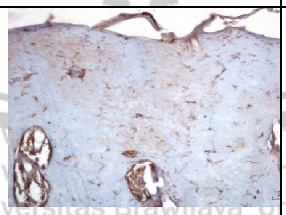
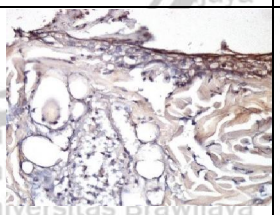
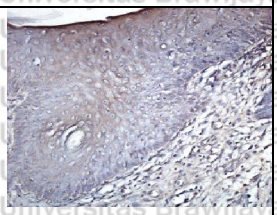
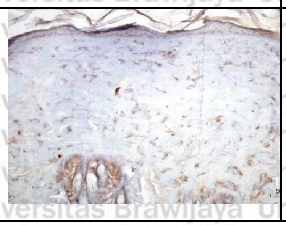
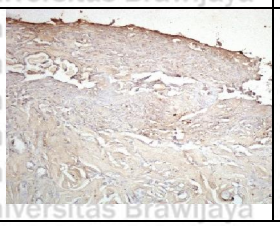
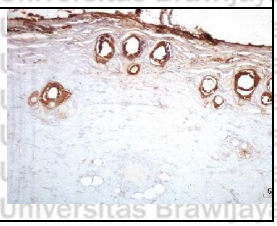
5.3.5.2 Ekspresi Protein TGF-β

Uji imunohistokimia telah dilakukan untuk melihat ekspresi protein TGF-β (*Tumor Growth Factor*). Analisis ekspresi protein TGF-β didasarkan pada analisis QSAR gel EKM yang telah dilakukan dan menunjukkan bahwa protein TGF-β merupakan protein yang dipengaruhi oleh senyawa-senyawa dalam gel EKM serta memiliki pengaruh dalam proses penyembuhan luka. Hasil analisis uji imunohistokimia protein TGF-β berupa kuantifikasi ekspresi protein dan

persebaran protein TGF-β. Tabel 5.13 menunjukkan foto hasil analisis imunohistokimia protein TGF-β.

Foto hasil uji imunohistikimia menunjukan perbaikan jaringan yang lebih baik pada perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Foto IHK juga menunjukkan adanya proses re-epitelisasi pada jaringan yang diberi perlakuan MEBO, EKM dosis 1 dan EKM dosis 2. Hal ini menunjukkan bahwa EKM dosis 1 dan dosis 2 memiliki kemampuan yang sama dengan MEBO dalam menyembuhkan luka bakar *grade* IIA.

Tabel 5.13 Representasi IHK protein TGF-β dari jaringan yang terkena luka bakar

No	Perlakuan	Waktu Pengamatan		
		Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
1.	EKM Dosis 0			
2	EKM Dosis 1			
3	EKM Dosis 2			
4	MEBO			

Kuantifikasi ekspresi protein TGF-β dari foto IHC dilakukan untuk melihat persebaran dan jumlah protein yang diekspresikan pada jaringan yang terkena luka bakar. Hasil kuantifikasi TGF-β disajikan pada Tabel 5.14 dan Gambar 5.21.

Tabel 5.14 Kuantifikasi Ekspresi Protein TGF-β pada Imunohistokimia

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$5.00\pm1.00^{a,A}$	$3.67\pm0.58^{a,A}$	$3.33\pm0.58^{c,A}$
EKM Dosis 1	$4.33\pm0.58^{a,A}$	$6.0\pm1.00^{b,A}$	$5.33\pm1.53^{c,A}$
EKM Dosis 2	$4.33\pm0.58^{a,A}$	$6.0\pm1.00^{b,A,B}$	$5.33\pm1.15^{c,B}$
MEBO	$4.67\pm1.15^{a,A}$	$6.67\pm1.15^{b,A}$	$5.67\pm1.15^{c,A}$

*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

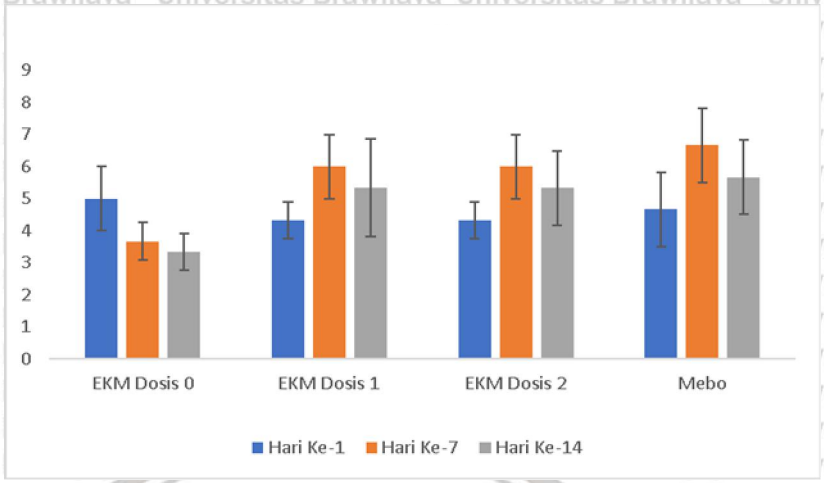
Berdasarkan Tabel 5.14, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein TGF-β tertinggi pada EKM Dosis 0 sebesar 5.00±1.00, dan rata-rata ekspresi protein TGF-β terendah pada perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 yaitu sebesar 4.33±0.58. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein TGF-β antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova*. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dari ekspresi protein TGF-β. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 tidak berpengaruh terhadap ekspresi protein TGF-β pada hari ke-1.

Pada hari ke-7, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein TGF-β tertinggi pada kelompok MEBO sebesar 6,67±1,15, dan rata-rata ekspresi protein TGF-β terendah pada perlakuan EKM Dosis 0 yaitu sebesar 3.67±0.58. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein TGF-β antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova*. Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang pada

signifikan rata-rata ekspresi protein TGF-β antar perlakuan antara EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1, EKM Dosis 2, serta MEBO. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan EKM dan MEBO mampu meningkatkan ekspresi protein TGF-β pada hari ke-7 pasca luka.

Pada hari ke-14, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein TGF-β tertinggi pada perlakuan MEBO, yaitu sebesar 5,67±1,15, dan rata-rata ekspresi protein TGF-β terendah pada perlakuan yaitu sebesar 3,33±0.58. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein TGF-β antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova*. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi protein TGF-β antar perlakuan. Dapat terlihat dari Tabel 5.14 menunjukkan angka rata-rata ekspresi protein TGF-β pada hari 14 yang relatif sama antar perlakuan (perbedaan tidak bermakna). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakukan EKM dan MEBO tidak berpengaruh secara statistik terhadap ekspresi protein TGF-β. Namun secara rerata, ekspresi protein TGF-β pada kelompok perlakuan (EKM Dosis 1, EKM Dosis 2 dan MEBO) dibandingkan dengan EKM Dosis 0.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa protein TGF-β diekspresikan stabil pada hari ke-1, 2, dan 3. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara hari ke-1, 7 dan 14. Hal ini menunjukkan bahwa TGF-β memiliki peran yang penting pada tahap koagulasi, inflamasi, proliferasi, hingga remodeling pada proses penyembuhan luka bakar.



Gambar 5.21 Ekspresi Protein TGF-β pada hari ke-1, 7 dan 14 menggunakan metode IHK

Gambar 5.21 menunjukkan pola ekspresi protein TGF-β hasil analisis IHK. TGF-β adalah salah satu *growth factor* yang penting dalam proses penyembuhan luka. TGF-β berikatan dengan reseptor (TβRI dan II) dan mengaktifkan SMAD pathway. TGF-β berperan penting dalam proses penyembuhan luka seperti peradangan, angiogenesis, proliferasi fibroblast, sintesis kolagen dan remodeling ekstraseluler matriks yang baru. Namun TGF-β tidak ditemukan pada luka kronis dan luka yang gagal sembuh. Hal ini membuktikan bahwa TGF-β sangat diperlukan untuk mempercepat penyembuhan luka. Pada penelitian yang menggunakan kulit manggis sebagai obat penyembuhan luka bakar, ditemukan bahwa ekspresi TGF-β meningkat 1 hari setelah terjadinya luka. Peningkatan ekspresi TGF-β ini berlangsung hingga 7 hari setelah luka terjadi. Pemberian EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 meningkatkan TGF-β dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan ekspresi TGF-β pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 ini bertahan hingga 14 hari setelah pemberian sediaan. Pada 14 hari setelah pemberian EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 pada luka bakar, didapatkan peningkatan ekspresi TGFβ dibandingkan dengan kontrol. Kulit yang mendapatkan terapi EKM Dosis 1

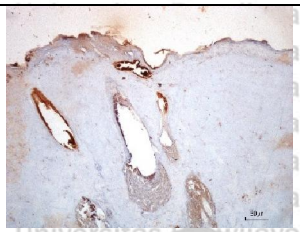
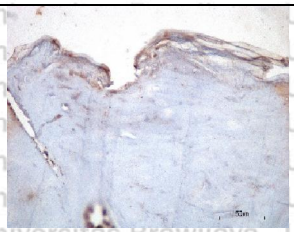
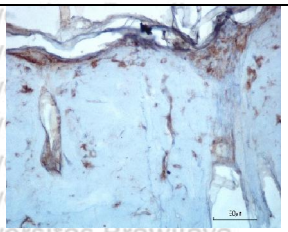
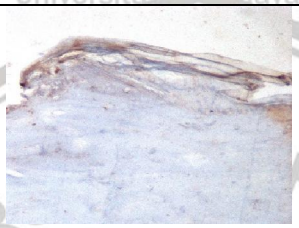
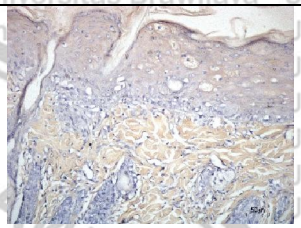
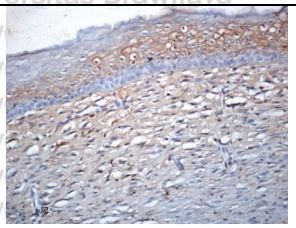
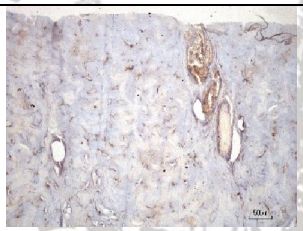
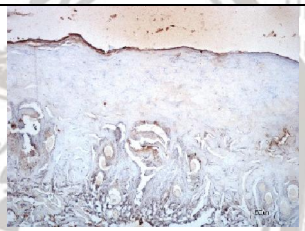
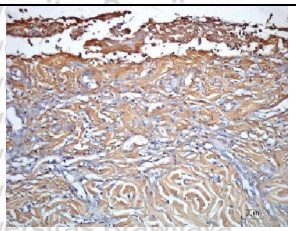
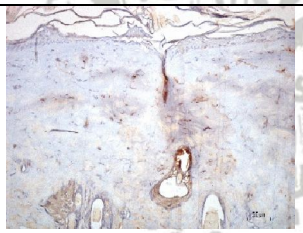
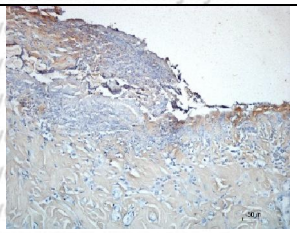
dan Dosis 2 menunjukkan percepatan proliferasi epitel baru dibandingkan dengan kontrol.

5.3.5.3 Ekspresi Protein EGF

Uji imunohistokimia telah dilakukan untuk melihat ekspresi protein EGF (*Epidermal Growth Factor*). Analisis ekspresi protein EGF didasarkan pada analisis QSAR gel EKM yang telah dilakukan dan menunjukkan bahwa protein EGF merupakan protein yang dipengaruhi oleh senyawa-senyawa dalam gel EKM serta memiliki pengaruh dalam proses penyembuhan luka. Hasil analisis uji imunohistokimia protein EGF berupa kuantifikasi ekspresi protein dan persebaran protein EGF. Tabel 5.16 menunjukkan foto hasil analisis histokimia protein EGF.

Foto hasil uji imunohistikimia menunjukkan perbaikan jaringan pada perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Foto IHK juga menunjukkan adanya proses re-epitelisasi pada jaringan yang diberi perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2. Hal ini menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 dan Dosis 2 memiliki kemampuan yang sama dengan MEBO dalam menyembuhkan luka bakar tingkat IIA.

Tabel 5.15 Representasi IHK protein EGF dari jaringan yang terkena luka bakar

No.	Perlakuan	Waktu Pengamatan		
		Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
1.	EKM Dosis 0			
2.	EKM Dosis 1			
3.	EKM Dosis 2			
4.	MEBO			

Kuantifikasi ekspresi protein EGF dari foto IHK dilakukan untuk melihat persebaran dan jumlah protein yang diekspresikan pada jaringan yang terkena luka bakar. Hasil kuantifikasi EGF disajikan pada Tabel 5.16 dan Gambar 5.22.

Tabel 5.16 Kuantifikasi Ekspresi Protein EGF pada Imunohistokimia

Perlakuan	Hari Pengamatan		
	1	7	14
EKM Dosis 0	$1.67\pm0.58^{a,A}$	$3.0\pm0.00^{c,B}$	$3.33\pm0.58^{e,B}$
EKM Dosis 1	$3.33\pm1.15^{a,A}$	$8.0\pm1.15^{d,B}$	$4.67\pm1.53^{e,A,B}$
EKM Dosis 2	$5.33\pm1.15^{b,A}$	$7.0\pm1.00^{d,A}$	$7.00\pm1.00^{f,A}$
MEBO	$5.33\pm1.53^{b,A}$	$5.0\pm0.58^{c,A}$	$3.67\pm0.58^{e,A}$

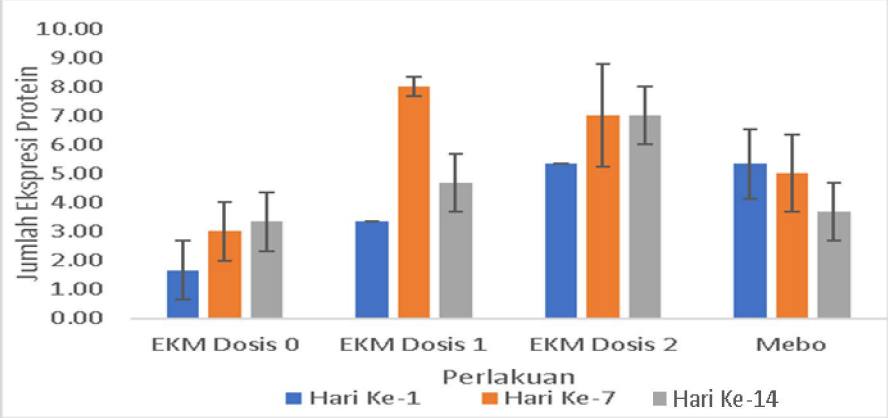
*Data ditampilkan dalam rerata±standar deviasi. Notasi huruf kecil yang bebeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$. Notasi huruf besar yang bebeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan berdasarkan uji statistik dengan $\alpha<0.05$

Berdasarkan Tabel 5.16, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein EGF yang tertinggi berada pada perlakuan MEBO, yaitu sebesar 5.33±1.53, dan rata-rata ekspresi protein EGF terendah berada pada perlakuan EKM Dosis 0 yaitu sebesar 1,67±0,58. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein EGF antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova.* Hasil pengujian menunjukkan bahwa EKM Dosis 2 mampu meningkatkan ekspresi EGF setara dengan MEBO.

Pada hari ke-7, dapat terlihat bahwa rata-rata ekspresi protein EGF yang tertinggi ditemukan pada perlakuan EKM Dosis 1 yaitu sebesar 8±1.15, dan rata-rata ekspresi protein EGF terendah ditemukan pada perlakuan EKM Dosis 0, yaitu sebesar 3.00±0.00. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein EGF antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova*. Berdasarkan analisis statistik menunjukkan hasil terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi protein EGF antar perlakuan. Untuk melihat letak perbedaan yang bermakna tersebut, dilakukan uji *post hoc Tuckey* dengan hasil notasi pada Tabel 5.16, jika notasi sama maka menunjukkan tidak berbeda signifikan, tetapi notasi berbeda menunjukkan rata-rata berbeda signifikan.

Pada hari ke-14, rata-rata ekspresi protein EGF tertinggi ditemukan pada perlakuan EKM Dosis 2, yaitu sebesar 7,00±1,00, dan rata-rata ekspresi protein EGF terendah berada pada EKM Dosis 0, yaitu sebesar 3.33±0.58. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi protein EGF antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik *oneway anova*. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan rerata ekspresi protein EGF yang signifikan. Analisis *post hoc tuckey* menunjukkan EKM dosis 2 berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol dan MEBO. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EKM meningkatkan ekspresi protein EGF pada hari ke-14.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa pada perlakuan EKM Dosis 0, 2 dan MEBO, ekspresi protein EGF diekspresikan secara stabil. Hasil statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada ekspresi protein EGF pada hari ke1, 7 dan 14. Hal ini menunjukkan bahwa EGF dibutuhkan pada semua fase penyembuhan luka mulai dari koagulasi, inflamasi, proliferasi hingga remodeling. Pada EKM Dosis 1 terilhat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara ekspresi protein pada hari ke-1 dan 7, dimana ekspresi protein meningkat secara signifikan dari hari ke-1 hingga hari ke-7.



Gambar 5.22 Ekspresi protein EGF pada hari ke-1, 7 dan 14 menggunakan metode IHK

Gambar 5.22, menunjukkan bahwa pemberian perlakuan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 mampu meningkatkan ekspresi EGF pada hari ke-7 dan 14 dibandingkan dengan kontrol. Pola ekspresi protein EGF pada kontrol, menunjukkan bahwa ekpresi protein EGF meningkat pada hari ke-7 dan hari ke-14. Pada perlakuan EKM Dosis 1, dan EKM Dosis 2 menunjukkan bahwa ekspresi tertinggi terjadi pada hari ke-7 dan menurun pada hari ke-14.

Hasil analisis menunjukkan bahwa EKM baik Dosis 1 maupun Dosis 2 memiliki kemampuan mempercepat penyembuhan luka yang sebanding dengan MEBO. Pada beberapa parameter seperti infiltrasi limfosit, neovaskularisasi, dan ekspresi IL-6 EKM Dosis 1 memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan EKM Dosis 2 dan MEBO. Pada parameter lain, EKM Dosis 1 memiliki kemampuan yang sama dengan MEBO dan EKM Dosis 2. Hal ini menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 merupakan dosis terbaik karena memiliki aktivitas yang lebih baik pada parameter infiltrasi limfosit dan neovasularisasi. Selain itu, EKM Dosis 1 mengandung ekstrak yang lebih kecil (0.2 g) dibandingkan dengan EKM Dosis 2 (0.4 g). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan EKM dengan Dosis 0.2 g yang dibuat menjadi 23 gram gel (0,86%) mampu mempercepat penyembuhan luka bakar yang sebanding dengan MEBO, bahkan pada beberapa parameter seperti ekspresi IL-6 dan neovaskularisasi lebih baik daripada MEBO.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Penelitian Tahap I

6.1.1 Analisis Bioinformatika Senyawa EKM

Senyawa aktif pada suatu bahan yang memiliki kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri merupakan kandidat yang baik untuk dikembangkan sebagai agen penyembuhan luka. Luka bakar merupakan luka yang terpapar langsung dengan udara sehingga rentan terhadap infeksi mikroba. Adanya agen antibakteri dapat mencegah timbulnya infeksi bakteri pada luka bakar. Senyawa antioksidan sangat diperlukan untuk menyeimbangkan energi radikal yang terdapat pada jaringan yang luka bakar agar tidak menimbulkan stres oksidatif dan kerusakan jaringan (Engwa, 2018; Kurasashi & Fujii; 2014). Sedangkan inflamasi merupakan fase penting dalam proses penyembuhan luka bakar, namun inflamasi yang berkepanjangan dapat memperlambat penyembuhan luka bakar (Bjarnsholt *et al*., 2008).

Pada Gambar 5.1, dapat dilihat bahwa senyawa *esmeatxanthone A* diprediksi memiliki kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflammasi dan antibakteri yang terbaik dengan Pa 0.7, disusul *garcinone E, γ-mangosten dan gartanin*. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Sattayasai, *et al*. (2013) yang menyatakan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam EKM menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, antialergi, antiinflamasi, antivirus dan antibakteri. Pemilihan empat senyawa (Gambar 5.2) berdasarkan pada hasil prediksi yang menunjukkan adanya kombinasi aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri pada senyawa yang diisolasi dari kulit buah manggis. Pemilihan senyawa ini didukung oleh Djamann *et al*., (2016) yang menyatakan bahwa terdapat lebih 50 jenis *xanthones* yang diisolasi dari kulit

buah manggis antara lain: α-, β-, dan γ-mangostin, gartinin, 1- dan 3-isomangostin, *8-hydroxycudraxanthone G*, *Garcinone A*, *Garcinone B, Garcinone C, Garcinone* D, *8-Deoxygartanin, Tovophyllin A, Tovophyllin, Cudraxanthon, Demethylcalabaxanthone* dan *Esmeatxanthone A*. Senyawa *xanthone* merupakan senyawa yang memiliki kemampuan antioksidan yang paling tinggi (Widowati *et al*., 2014; Wulan, 2015), antibakteri dan antiinflamasi (Djamann *et al*., 2016, Widowati *et al*, 2016). Chaverrı at al. (2009) menyatakan bahwa kemampuan antioksidan EKM ini terlihat dari kemampuannya untuk meningkatkan kadar glutation (GSH), dan menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada jaringan otak dan darah serta mampu menurunkan jumlah *reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk pada proses stres oksidatif.

Berdasarkan hasil analisis STRING, dapat dilihat bahwa ekspresi IL-6 akan dipengaruhi oleh ekstrak melalui protein TGF-β. Ekspresi IL-6 lebih tinggi daripada FGF2. Peranan utama yang dipengaruhi oleh IL-6 di dalam tubuh yaitu regulasi dari proliferasi sel epitel melalui pengaturan 4 jenis protein (FGF2, TGF-β1, IL6, TGF-β2) dan homestasis leukosit 2 (TGFB1, IL6). Protein PTGS2 memiliki peranan penting pada jalur tersebut (Gambar 5.3 dan Gambar 5.4). Jalur yang paling cepat teraktivasi adalah peningkatan kadar dari IL6, kemudian diikuti oleh EGF dan TGFB1.

Gambar 5.4 menunjukkan bahwa IL-6 merupakan protein yang memiliki kedekatan hubungan yang paling tinggi dengan protein-protein lain dalam jaringan. Hal ini dapat dilihat dari nilai *average shortes path length (ASPL)*. IL-6 memiliki nilai ASPL yang paling kecil diantara ketiga protein yang dipengaruhi oleh keempat senyawa *xanthone*. ASPL merupakan karakteristik topologi jaringan tanpa skala (*scale free network*) yang umumnya digunakan sebagai metrik untuk menganalisis

gen yang berasosiasi dengan penyakit. Nilai ASPL yang rendah menunjukkan adanya kedekatan koneksi antara protein tersebut dengan protein-protein lain yang menunjukkan juga adanya hubungan yang lebih tinggi dengan protein yang berhubungan dengannya (Embar *et al*., 2016).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa TGF-β1, EGF, IL6 memiliki peranan krusial dalam proses penyembuhan luka. Interleukin-6 adalah sitokin yang terlibat dalam respon inflamasi dan infeksi (Scheller *et al*., 2011). Peningkatan kadar IL-6 sangat berkorelasi dengan proses penyembuhan luka. Terutama kedua fungsi utama terkait proliferasi sel epitel dan juga peranan leukosit dalam mengelimasi antigen yang terdapat di daerah luka.

Protein TGF-β juga merupkan protein yang telah lama diketahui memiliki peran penting dalam penyembuhan luka bakar. Pada tahap koagulasi TGF-β bersama protein TGF-α dan PDGF menginduksi agregasi platelet yang kemudian mengaktivasi kaskade sinyal pembentukan *fibrin colt* (Kent dan Sheridan, 2003). TGF-β juga merupakan *macrophages-derived* sitokin, bersama protein TGF-α, PDGF, EGF, IL-1, TNF-α, protein TGF-β memiliki peranan dalam inisasi perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). Pada fase proliferasi, protein TGF-β juga berperan dalam proses induksi fibroblas. Fibroblas merupakan sel yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka. TGF-β bersama PDGF merupakan *autocrine* dari fibroblas, protein ini dihasilkan oleh fibroblas dan menginduksi proliferasi fibroblas. Aktivitas dari fibroblas dalam membentuk jaringan granulasi, kolagen, fibronektin, laminin and hialuronan juga dipengaruhi oleh aktivitas dari protein TGF-β (Moulin, 1995). Hal ini menunjukkan bahwa protein TGF-β merupakan protein yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka. Pada jaringan luka bakar protein ini akan terus

diekspresikan dari tahap koagulasi, inflamasi, proliferasi hingga remodeling jaringan (Kent dan Sheridan, 2003)

Protein EGF merupakan protein penting dalam proses penyembuhan luka. Pada saat terjadi luka, protein ini terekspresi pada fase koagulasi, berperan bersama protein lain dalam pembentukan fibronektin. EGF juga merupakan protein *macrophages-derived* sitokin yang berfungsi dalam inisasi dari perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). EGF juga merupakan protein penting dalam tahap proliferasi, protein ini berpengaruh dalam proses deposisi matriks kolagen pada jaringan luka bakar (Moulin, 1995).

Analisis QSAR menunjukkan bahwa prediksi protein yang dipengaruhi oleh senyawa xanthone dalam EKM merupakan protein-protein yang telah diketahui berperan dalam penyembuhan luka bakar. Hasil analisis QSAR ini dapat menjadi acuan untuk melihat ekspresi protein yang dipengaruhi oleh gel EKM pada model tikus luka bakar.

6.2 Penelitian Tahap 2

6.2.1 Analisis Kuantitatif Senyawa Xanthone dalam EKM

Analisis kuantitatif senyawa xanthone dalam EKM dapat dilihat pada Tabel 5.2. Tabel 5.2 menunjukkan bahwa EKM dengan 6 tingkat kematangan mengandung γ-mangostin, garcinone-E, gartanin dan smeathxanthone-A, dimana konsentrasi xanthone tertinggi terdapat di dalam EKM kematangan ke-6. Selaras dengan penelitian Hadriyono (2011) bahwa senyawa xanthone dan derivatnya yang diisolasi dari kulit buah manggis mengandung 3-*isomangostein, alpha-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, garcinone A, garcinone B, C, dan D, maclurin, mangostenol, dan catechin*. Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa

xanthone tertinggi yang terkandung dalam EKM kematangan tingkat 6 mengandung γ-mangostin, garcinone-E, gartanin, smeathxanthone-A masing-masing sebanyak 66,13; 209,51; 51,10; dan 5.97 µg/mg. Perbedaan tingkat kematangan manggis menghasilkan konsentrasi xanthone yang berbeda.

6.2.2 Struktur Partikel dan Mikroelement pada EKM

Data mengenai analisis struktur partikel dan kandungan unsur-unsur EKM pada 6 tingkat kematangan manggis digunakan untuk mengkarakterisasi struktur fisik dan kimiawi dari 6 tingkat kematangan EKM. Hasil karakterisasi 6 tingkat kematangan kulit manggis disajikan dalam Lampiran. Karakter fisik dibutuhkan untuk melihat bioavailabilitas EKM untuk aplikasi topikal. Ukuran dan karakter partikel sangat berpengaruh terhadap bioavailabitas suatu senyawa baik untuk aplikasi topikal atau pengobatan secara oral (Rachmawati, 2012). Hasil analisis mengenai kandungan elemen mikro juga dapat dijadikan prediksi tentang kompleks molekul di dalam EKM. Analisis struktur partikel dan mikroelemen pada EKM dilakukan menggunakan analisis PSA, SEM, XRD dan XRF.

6.2.2.*1* PSA dari EKM

Hasil analisis ukuran partikel menggunakan metode PSA yang disajikan pada Gambar 5.5. menunjukkan bahwa ukuran partikel EKM pada tingkat kematangan 6 memiliki ukuran diantara 100-1000 nm, yaitu 199,2 nm. Secara umum, partikel yang memiliki ukuran di bawah 1 mikron atau kurang dari 1000 nm, disepakati sebagai nanopartikel (Tiyaboonchai, 2003; Buzea *et al*., 2007).

Ukuran partikel EKM ini secara visual dapat menghasilkan dispersi yang relatif transparan, serta perpanjangan waktu pengendapan dikarenakan berkurangnya resultan gaya ke bawah akibat gravitasi. Hal tersebut sebagai akibat dari berkurangnya massa tiap partikel dan peningkatan luas permukaan total yang

signifikan menghasilkan interaksi tolak menolak antar partikel yang besar dan muncul fenomena gerak brown sebagai salah satu karakter spesifik partikel pada ukuran koloid (Gupta & Kompella, 2006).

EKM dengan tingkat kematangan 6 termasuk ke dalam nanopartikel. Nanopartikel memiliki keunggulan dari ukuran partikel lainnya karena dapat menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea *et al*., 2007). Keunggulan lainnya yaitu adanya peningkatan luas permukaan kontak pada kadar yang sama (Kawashima, 2000), sehingga dapat meningkatkan absopsi EKM ke dalam kulit yang terkena luka bakar. Pada banyak kasus, peningkatan kadar bahan aktif dalam darah sangat diperlukan untuk menimbulkan efek farmakologis, seperti penyembuhan luka bakar (Hu dan Li, 2011; Wu *et al*., 2005). Oleh karena itu, kesesuaian ukuran partikel dari bahan aktif dengan jaringan target dan penyakit diperlukan untuk menghasilkan sistem yang dapat memberikan hasil penyembuhan luka yang optimal.

Pengembangan bahan nanopartikel dalam bidang obat telah banyak dilakukan oleh para peneliti. Rachmawati (2012; 2013) mengembangkan senyawa *Curcumin* dari kunyit (*Curcuma domestica*) berbasis nanopartikel dan menyatakan bahwa struktur nano dari *Curcumin* dapat meningkatkan tingkat kelarutan, kestabilan dan bioavaibilitas dari *Curcumin*. Peningkatan bioavaibilitas ini meliputi kemampuan penyerapan pada usus hewan uji, di mana konsentrasi *Curcumin* dalam darah meningkat secara signifikan setelah diberi *Curcumin* nano dibandingkan dengan *Curcumin* biasa (Onoue *et al*., 2009). Senyawa dalam bentuk nanopartikel juga memiliki kemampuan permeabilitas yang lebih tinggi apabila digunakan dalam produk obat topikal. Rachmawati (2013) mengungkapkan bahwa gel dari senyawa dengan struktur nano meningkatkan penyerapan bahan obat pada jaringan kulit.

Hasil analisis PSA yang telah dilakukan seperti yang terdapat dalam Lampiran menunjukkan bahwa EKM dengan tingkat kematangan 1, 2, 3, dan 6 merupakan struktur dengan ukuran nano seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Struktur nano tersebut dimungkinkan memiliki tingkat bioavailibilitas yang lebih tinggi dibandingkan EKM tingkat 4 dan 5 yang memiliki ukuran lebih besar.

6.2.2.2 Analisis SEM dari EKM

Struktur mikro dari berbagai tingkat kematangan EKM dianalisis dengan menggunakan SEM dan disajikan berupa gambar struktur morfologi dan spektrum EDX seperti yang terlihat pada Lampiran. Gambar 5.6 dan Tabel 5.3 menunjukkan hasil analisis SEM pada EKM dengan tingkat kematangan 6. Morfologi permukaan dari EKM dalam berbagai tingkat kematangan dapat dilihat dari tiga sisi, yaitu: permukaan atas, permukaan samping, dan permukaan ruang dalam (Gunawan, 1979). EKM tingkat kematangan 6 menunjukkan struktur bentuk butiran dan bentuk gabungan.

Berdasarkan hasil SEM, EKM tingkat kematangan 6 cenderung beragregasi. Mayoritas partikel-partikel yang terlihat di bawah pengamatan mikroskop cenderung menggumpal. Kecenderungan nanopartikel untuk beragregasi disebabkan oleh efek Gerak Brown dan gaya *Van der Waals*. Agregasi nanopartikel dapat mengubah sifat fisik maupun kimia nanopartikel. Agregasi nanopartikel mengurangi rasio luas permukaan nanopartikel. Agregasi nanopartikel terjadi dalam dua tahap, yaitu partikel saling mendekat dan saling bertubrukan (*transport step*) dan pelekatan partikel yang saling bertubrukan (*attachment step*). Untuk mencegah nanopartikel saling melekat dan mengendap, nanopartikel harus distabilkan (Jassby, 2011).

Berdasarkan spektrum EDX pada Tabel 5.3, EKM tingkat kematangan 6 memiliki kandungan atom karbon, oksigen, klor, dan kalium (C, O, Cl, dan K),

dengan persentase atom C masing-masing lebih besar dari 60%. Semakin banyak kandungan atom C pada setiap tingkat kematangan EKM, dimungkinkan memiliki konsentrasi bahan aktif xanthone yang tinggi juga.

6.2.2.3 Analisis XRD dari EKM

Analisis XRD digunakan untuk menentukan struktur fisik bahan. Data yang diperoleh dari analisis XRD berupa grafik hubungan sudut difraksi sinar X pada bahan dengan intensitas sinar yang dipantulkan oleh bahan. Nilai derajat kristalinitas dapat diketahui dari grafik kristalinitas yang memotong bagian lembah dari grafik (Sidqi, 2011).

Hasil karakterisasi dengan XRD pada EKM tingkat kematangan 6 menunjukkan sifat kristalit. Sifat ini ditandai dengan puncak yang terlihat pada sudut paling rendah, yaitu 8,29º; 8,82º; dan 5,97º. EKM tingkat kematangan 6 menunjukkan kristal karbon yang menunjukkan kemungkinan konsentrasi bahan aktif xanthone yang tinggi.

Gondokesumo *et al*. (2018) menunjukkan bahwa EKM pada tingkat kematangan 1, 2 dan 3 menunjukkan sifat amorf. Sifat amorf ini menunjukkan bahwa partikel penyusun suatu molekul tersusun secara tidak beraturan dan kurang kompak. Ketidakteraturan susunan partikel ini menyebabkan ruang di antara partikel mudah untuk disisipi partikel lain. Semakin amorf sifat suatu molekul maka semakin mudah untuk disisipi molekul lain (Mason & Lorimer 2002). Sifat amorf ini ditandai dengan puncak pada sudut difraksi 20º, yaitu berturut-turut 22,93º; 22,26º; dan 24,41º (Kencana, 2009).

Analisis PSA menunjukkan bahwa ukuran dari partikel EKM pada tingkat kematangan 6 adalah nanopartikel dan hasil analisis XRD menunjukkan bahwa struktur kulit manggis pada tingkat kematangan 6 adalah kristal menunjukkan bahwa

EKM yang dikarakterisasi memiliki struktur *nanocrystal. Nanocrystal* merupakan struktur yang memiliki bioavailabilitas lebih tinggi dibandingkan dengan struktur partikel biasa. Struktur *nanocrystal* dari suatu senyawa banyak dikembangkan oleh para peneliti karena memiliki bioavalabilitas, kestabilan struktur, permeabilitas dan kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan partikel berukuran lebih besar (Onoue *et al*., 2009; Rachmawati *et al*., 2012).

Bentuk partikel *nanocrystal* diketahui memiliki tingkat permeabilitas pada kulit yang lebih tinggi dibandingkan bentuk mikro (Rachmawati *et al*., 2013). Dengan bentuk *nanocrystal* pada EKM dengan tingkat kematangan 6 diharapkan mampu meningkatkan penyerapan EKM pada kulit yang terkena luka bakar. Dengan tingkat penyerapan EKM yang baik diharapkan dapat mempercepat penyembuhan luka bakar.

Nanocrystal juga diketahui mampu meningkatkan tingkat kelarutan (*solubility*) senyawa obat yang bersifat hidrophobik (Rachmawati *et al*., 2013). Tingkat kelarutan merupakan hal penting dalam senyawa obat karena kelarutan berpengaruh terhadap bioavalabilitas dari suatu senyawa. Analisis SwissADME menunjukkan bahwa senyawa xanthone dalam EKM (γ-mangostin, garcinone-E, gartanin, dan smeathxanthone-A) memiliki tingkat kelarutan yang rendah. Bentuk *nanocrystal* pada EKM dengan tingkat kematangan 6 diduga meningkatkan tingkat kelarutan dari EKM (SwissADME, 2018).

6.2.2.4 Analisis XRF dari EKM

XRF adalah teknik pengukuran X-Ray yang mirip dengan EDX, tetapi memiliki tingkat pengukuran yang lebih kecil untuk unsur-unsur yang memiliki nomor atom di atas 11. Oleh karena itu dalam penelitian ini penting untuk melakukan pengukuran XRF sebagai konfirmasi terhadap pengukuran EDX dan XRD. Hasil

analisis XRF terhdap 6 tingkat kematangan yang berbeda telah dilakukan dan hasilnya disajikan pada Lampiran.

Hasil analisis XRF menunjukkan persentase (%) kandungan unsur-unsur yang terdapat dalam EKM berbagai tingkat kematangan. Persentase hasil tersebut merupakan perhitungan relatif terhadap keseluruhan luas peak yang muncul pada pola serapan, artinya luas puncak tertentu untuk unsur tertentu dibandingkan dengan keseluruhan luas puncak yang muncul. Jadi data yang dihasilkan merupakan jumlah mol dari masing-masing unsur dalam EKM berbagai tingkat kematangan. Selanjutnya data tersebut dikonversi menjadi persen massa dengan cara mengkalikan dengan massa atom relatif masing-masing unsur yang muncul. Hasil persentase massa masing-masing unsur dikalikan dengan berat EKM berbagai tingkat kematangan yang telah melalui proses destruksi (penghilangan senyawa organik) atau sampel mineral EKM berbagai tingkat kematangan sehingga diketahui berat dari masing-masing unsur (Manggara, 2018).

Berdasarkan data XRF pada Tabel 5.4, diketahui bahwa EKM dengan tingkat kematangan 6 ditemukan mineral makro dan mikro. Mineral makro yang teridentifikasi yaitu kalium (K), klor (Cl), kalsium (Ca), fosfor (P), belerang (S), natrium (Na), dan magnesium (Mg). Mineral mikro yang teridentifikasi yaitu, cadmium (Cd), perak (Ag), besi (Fe), seng (Zn), molybdenum (Mo), rubidium (Rb), silika (Si), zirkonium (Zr), argon (Ar), mangan (Mn), titanium (Ti), barium (Ba), dan emas (Au). Diketahui bahwa mineral mikro seng (Zn) dan besi (Fe) merupakan komponen penting dalam setiap obat, sehingga diharapkan dapat menunjang proses penyembuhan luka bakar.

Zende *et al*. (2012) mengatakan bahwa *trace elemet* dan struktur mikro senyawa memiliki pengaruh terhadap proses penyembuhan luka bakar. Kemudian

pada beberapa literatur menyebutkan bahwa adanya elemen Fe, Ca, Zn, Cu, dan Mn dalam cairan luka, menunjukkan bahwa elemen-elemen ini pada konsentrasi yang tepat dapat membantu dalam proses penyembuhan luka (Liyanage *et al*., 2015). Konsentrasi Fe menurun dalam cairan luka setelah sehari atau dua hari, karena sebagian besar Fe telah digunakan dalam proses penyembuhan luka. Ca juga dibutuhkan dalam berbagai proses fisiologis seperti pembekuan darah, rangsangan neuromuskular, kelengketan selular, integritas struktural pemeliharaan dan fungsi sel membran. Zn memiliki peran yang sangat penting dalam penyembuhan luka, Zn mampu meningkatkan aktivitas trombosit dan agregasi. Kekurangan Zn akan meningkatkan produksi radang sitokin dan stres oksidatif, menghalangi kemotaksis PMN dan berkompromi perangkap ekstraseluler neutrofil. Kurangnya Zn juga mengganggu adhesi monosit. Zn berperan dalam meningkatkan populasi limfosit T, dan granulasi pembentukan jaringan. Zn terbukti meningkatkan migrasi keratinosit dan juga efektif untuk *in vivo* angiogenesis (Lin, 2017). Mn terkait erat dengan sintesis protein dan didistribusikan secara luas di jaringan mamalia (Liyanage, 2006).

Walaupun logam transisi memiliki manfaat yang baik, beberapa logam transisi merupakan kunci dalam aktivitas katalitik senyawa radikal. Terdapat 2 alasan mengapa logam transisi memiliki peran penting dalam aktivitas katalitik senyawa radikal. Pertama, radikal biasanya terbentuk karena reaksi redoks yang mencakup kompleks logam transisi. Kedua, kebanyakan senyawa radikal sekunder yang terbentuk pada sistem biologis atau sistem katalitik bereaksi lebih cepat dengan kompleks logam transisi daripada dengan senyawa organik (Bertini, 2009, Masarawa dan Meyerstein, 2009).

Logam transisi juga dapat berpartisipasi pada siklus redoks dengan oksigen yang membentuk *recative oxygen species* (ROS) melalui reaksi fenton. Logam transisi yang paling berperan dalam proses ini adalah Fe dan Cu. Kapasitas katalitik dari logam pada reaksi Fenton berupa siklus antara Fe^{2+} dengan Fe^{3+} yang menunjukkan pula potensial reduksi dari pusat logam merupakan kunci yang menentukan produksi ROS (Kurasasi & Fujii, 2015).

Oleh karena logam-logam transisi merupakan elemen yang harus ada dalam proses penyembuhan luka bakar, maka potensi terjadinya reaksi Fenton yang berakibat pada peningkatan produksi radikal bebas pada jaringan luka. Oleh karena itu, logam-logam yang terdapat pada jaringan luka harus dikelat. Secara alami tubuh memiliki sistem pengkelatan sendiri. *Dessferioxamin* (DFO) merupakan *chelating agent* penting yang menghambat terbentuknya reaksi fenton dan banyak diproduksi pada saat penyembuhan luka bakar (Haas & Franz, 2009).

6.2.3 Aktivitas Antioksidan dan Kompleks Struktur pada EKM

6.2.3.1 Aktivitas Antioksidan EKM

Penelitian tentang aktivitas antioksidan pada 6 tingkat kematangan kulit manggis telah dilakukan. Hasil analisis aktivitas antioksidan ditampilkan dalam lampiran. Gambar 5.8. menunjukkan bahwa EKM tingkat kematangan 6 memiliki efek antioksidan yang baik. Hal ini dapat dilihat dari besarnya penurunan nilai g. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa EKM diketahui memiliki efek antioksidan yang baik (Suttirak & Manurakchinakorn, 2014).

Analisis antoksidan EKM dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode ESR. ESR dikenal dengan kemampuannya yang kuat untuk menentukan senyawa antioksidan (Bartoszek & Polak, 2016). Aktivitas antioksidan ditentukan

menggunakan spektrometer ESR dengan mengukur penyerapan radiasi elektromagnetik. DPPH digunakan sebagai radikal bebas standar dan kemudian dibandingkan dengan DPPH yang ditambah dengan EKM tingkat kematangan 1-6. Penyerapan radiasi elektromagnetik dari setiap tingkat kematangan EKM 6 ditunjukkan pada Gambar 5.8.

Penurunan nilai g menunjukkan penurunan intensitas radikal bebas. Perbedaan nilai g menunjukkan tingkat radikal bebas yang berbeda (Polovka, 2006). Penurunan nilai g terjadi pada EKM dengan tingkat kematangan 6. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan EKM dengan tingkat kematangan 6 mampu menurunkan intensitas radikal bebas DPPH.

Aktivitas pemerangkapan DPPH digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan suatu senyawa. Senyawa antioksidan berperan menyumbangkan atom hidrogen untuk menangkap radikal bebas (Suttirak & Manurakchinakorn, 2014, Widowati *et al*., 2016; Widowati *et al*., 2017). Aktivitas pemerangkapan DPPH dipengaruhi oleh struktur, posisi dan derajat hidroksilasi pada struktur cincin serta aktivitas donor elektron dan hidrogen dari senyawa-senaywa yang terdapat dalam EKM (Polovka, 2006).

Kulit manggis diketahui memiliki berbagai kandungan senyawa aktif, salah satunya fenolik. Senyawa-senyawa golongan fenolik memiliki kemampuan pereduksi yang tinggi sehingga berperan baik sebagai antioksidan. Pada buah mangis ditemukan 10 jenis senyawa fenolik dan kandungan senyawa fenolik utama pada kulit manggis adalah *xanthone* (Widowati *et al*., 2016) dan *protocatechuic acid* (Zadernowski, Czaplicki, & Naczk, 2009).

Senyawa-senyawa antioksidan dalam EKM merupakan kelompok LMWA. LMWA dapat mencegah kerusakan oksidatif dengan cara bereaksi dengan ROS

secara langsung atau secara tidak langsung dengan mengkelat logam. Logam transisi dapat dikelat oleh molekul LMWA yang mencegahnya dari dalam pembentukan reaksi Fenton dan Haber-Weiss yang dimediasi logam. Mekanisme lain dari LMWA dalam memerangkap radikal bebas adalah melalui donasi elektron ke radikal bebas yang menghindarkan kerusakan molekul biologis oleh radikal bebas (Engwa, 2018).

Gondokesumo *et al*. (2018) menyebutkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas antioksidan pada tingkat kematangan kulit manggis yang berbeda. Perbedaan aktivitas antioksidan di antara sampel diduga dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa yang berbeda pada tingkat kematangan EKM yang berbeda. Konsentrasi senyawa fenolik di antara tingkat kematangan manggis yang berbeda telah diukur oleh Pothihirat *et al*. (2009). Senyawa lain yang berperan dalam aktivitas antioksidan dari EKM adalah flavonoid. Kulit buah dewasa memiliki kandungan flavonoid total yang lebih tinggi (4,08 g QE/100 g) dibandingkan kulit buah muda (2,91 g QE/100 g). Semakin tinggi aktivitas antioksidan kulit buah dewasa dapat dihasilkan dari total flavonoid atau fenolik yang lebih tinggi (Suttirak & Manurakchinakorn, 2014).

Antioksidan diketahui memiliki peran yang sangat penting dalam penyembuhan luka. Ketika terjadi luka, sel darah putih (neutrofil, makrofag) bermigrasi ke titik luka dan terjadi peningkatan ROS dalam jumlah besar pada jaringan luka. Walaupun ROS memiliki peran penting dalam penyembuhan luka, namun ketidakteraturan ROS dapat menyebabkan stres oksidatif yang memiliki efek merugikan pada penyembuhan luka (Dunnill *et al*., 2017). Antioksidan dapat menjadi donor hidrogen untuk mengurangi ROS bersama enzim superoksida dismutase. Menurunnya ROS ini dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Sehingga penggunaan pengobatan luka yang mengadung antioksidan diduga dapat mempercepat

penyembuhan luka (Zhishen, *et al*. 1997).

6.2.3.2 Analisis Kompleks Struktur EKM menggunakan FTIR

Gambar 5.9 menunjukkan hasil spektrum FTIR. Hasil analisis FTIR menunjukkan ikatan antara logam transisi dengan senyawa organik yang terdapat dalam EKM pada tingkat kematangan 6. Ikatan logam transisi-senyawa organik terdeteksi pada penurunan absrobansi vibrasi pada gelombang dengan nomor 900-400 cm^{-1}. Tingkat absorbansi menunjukkan bahwa terdapat variasi interaksi antara logam transisi dengan senyawa organik pada EKM. Di antara kompleks logam-senyawa organik yang terdeteksi adalah kompleks Fe-O pada 625-490 cm^{-1} (Sukmaningsih *et al*., 2018, Miller & Wilkins, 1952). Kompleks ion Fe-O juga terdeteksi pada panjang gelombang 571.81 (Venkateswarlu *et al*., 2014).

Terdeteksinya kompleks molekul senyawa organik-logam transisi menunjukkan adanya aktivitas pengkelatan logam. Sebagai contoh, kelat dari ion Fe^{2+} oleh polifenol menghasilkan reaksi transfer elektron ketika terpapar oksigen meghasilkan Fe^{3+}-polyphenol kompleks dan terbenuk kompleks yang sangat stabil. Secara fisika, transisi logam Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} dalam pengkelatan oleh senyawa herbal merupakan bagian dari mekanisme antioksidan. Perubahan sifat magnet dari sebuah paramagnetik menadi senyawa kompleks diamagnetik terjadi ketika kehilangan atau medapat elektron dari radikal bebas (Sukmaningsih *et al*., 2018).

Aktivitas pengkelatan logam EKM dapat mencegah teradinya reaksi Fenton dan Herber-Weiss, yang berakibat pada pencegahan terbentuknya ROS (Kurasashi dan Fujii, 2015). Pengkelatan logam transisi oleh senyawa organik yang membentuk kompleks senyawa organik-logam transisi akan meningkatkan bioavailabilitas logam transisi sehingga logam transisi akan mudah dikeluarkan dari jaringan atau dalam istilah lain logam mudah didetoksifikasi (Sumitro & Sukmaningsih, 2018).

Salah satu obat yang telah dijual dipasaran yang berasal dari herbal atau ekstrak tanaman adalah MEBO. Gel MEBO mengandung ekstrak dari 4 tanaman yaitu *Phellodendron amurense, Scuttelaria baicalensis, Coptis chinensis,* dan *Pheretima aspergillum*, ditambah dengan winyak wijen dan lilin lebah. Bahan aktif yang terdapat dalam gel MEBO diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang baik seperti β-sitosterol, baicalin dan rhamnetin (Zhongong *et al*., 1999; Jiang *et al*., 2008; Li *et al*., 2012). Hal ini membuktikan bahwa penggunaan senyawa antioksidan dalam penyembuhan luka bakar akan mempercepat proses penyembuhan luka bakar. Sehingga aplikasi topikal EKM yang memiliki aktivitas antioksidan diharapkan mampu menyembuhkan luka bakar sebanding dengan gel MEBO.

6.2.3.3 Analisis kompleks molekul senyawa organik-logam transisi

Prediksi kompleks molekul pada EKM telah dilakukan menggunakan metode bioinformatika menggunakan program *Chemskecth* dan *Open Babel*. Prediksi kompleks molekul yang diperkirakan terdapat pada EKM adalah kompleks *Fe-γ mangostin.* Kompleks ini terdiri dari 3 molekul gamma magosteen yang berikatan dengan Fe^{2-} yang mengikat 4 atom O. Analisis ini didukung oleh hasil yang telah didapatkan melalui FTIR dimana terdeteksi gelombang Fe-O pada spektrometri EKM. Ion Fe berperan sebagai atom sentral dan senyawa *γ*-mangostin berperan sebagai ligan. Kedua molekul tersebut membentuk $Fe(\gamma\text{-mangosteen})_3^{-4}$. Gambar 5.10 menunjukkan struktur molekul dari gabungan kedua atom tersebut.

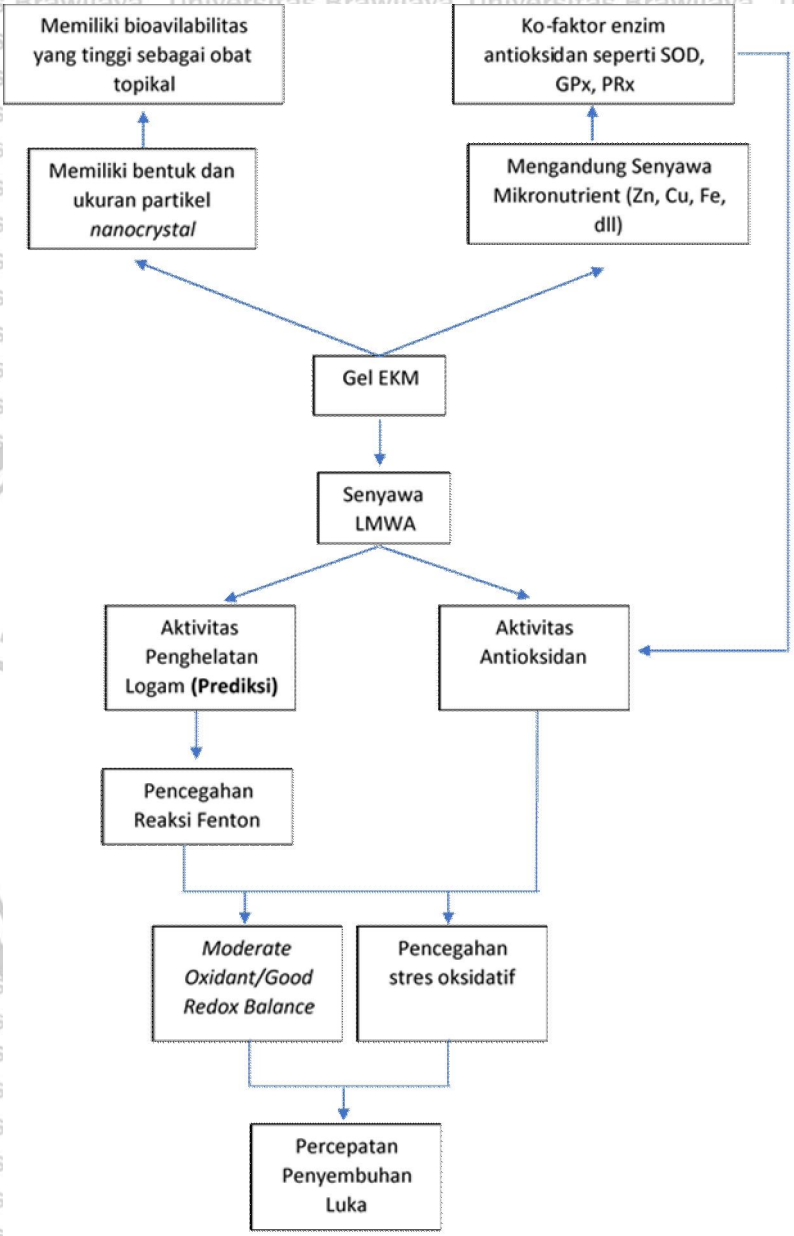
Hasil analisis kompleks molekul tersebut dapat pula memprediksi aktivitas antioksidan senyawa kulit manggis sebagai antioksidan. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Pembentukan kompleks molekul senyawa organik merupakan mekanisme tidak langsung LMWA sebagai molekul antioksidan. Pembentukan kompleks molekul merupakan peristiwa pengkelatan logam.

Pengkelatan logam Fe oleh senyawa xanthone dapat mencegah terjadinya reaksi Fenton yang berakibat pada menurunnya ROS. Menurunya ROS dapat mencegah terjadinya kerusakan jaringan dan mencegah terjadinya stress oksidatif (Kurasashi & Fujii, 2015).

Pengujian aktivitas pengkelatan logam melalui analisis terbentuknya kompleks molekul logam transisi dengan senyawa organik juga dilakukan pada gel MEBO. Hal ini dilakukan karena gel MEBO merupakan obat yang banyak digunakan dalam pengobatan luka bakar dan mampu mempercepat penyembuhan luka bakar (Tang *et al*., 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa setidaknya terdapat 4 senyawa dalam gel MEBO yang diprediksi dapat berperan penting dalam penyembuhan luka bakar yaitu phellodendrine, wogonin, rhamnetin dan baicalein. Keempat senyawa ini dapat membentuk kompleks senyawa logam transisi-senyawa organik. Kompleks senyawa yang dapat terbentuk adalah kompleks $Fe(phellodendrine)_3^{-1}$, $Fe(rhamnetin)_3^{-4}$, $Fe(wogonin)_3^{-}$, $Fe(baicalein)_3^{-4}$. Gambar prediksi struktur senyawa dilihat pada Gambar 5.11.

Hasil prediksi ini memperkuat hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *chelating agent* atau pengkelat logam memiliki peran yang baik dalam proses penyembuhan luka bakar (Kurasashi & Fuii, 2015). Gel MEBO yang telah umum digunakan sebagai agen terapi luka bakar diprediksi memiliki senyawa-senyawa yang dapat mengkelat logam. Pengkelatan logam oleh senyawa organik akan mencegah terbentuknya reaksi Fenton dan Herber-Weiss yang akan menurunkan kandar ROS dan mencegah terjadinya stress oksidatif yang dapat merusak jaringan. Adanya molekul pegkelat logam akan menciptakan adanya *good redox balance* atau *moderate oxidant* dalam jaringan luka yang berakibat pada percepatan

penyembuhan luka (Engwa, 2018; Kurasashi & Fujii, 2015). Rangkuman mengenai karakteristik kompleks molekul EKM dapat dilihat pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1 Mekanisme antioksidan, pengkelatan logam dan karakteristik EKM dalam mempercepat penyembuhan luka bakar

6.3. Penelitian Tahap 3

6.3.1 Tampilan morfologi penyembuhan luka bakar

Pengamatan mengenai morfologi luka bakar pada hari ke-1, 7 dan 14 pasca luka bakar telah dilakukan. Hasil pengamatan morfologi luka bakar disajikan dalam Tabel 5.5. Hasil pengukuran luas luka menunjukkan terdapat penurunan luas luka pada semua perlakuan. Penurunan luas luka tertinggi secara berturut-turut adalah EKM Dosis 1, EKM Dosis 2, MEBO dan yang terkecil EKM Dosis 0 (Gambar 5.14). Ukuran luka yang mengecil merupakan salah satu kriteria luka sembuh (Handian, 2006). Walaupun belum menutup, namun penurunan luas luka bakar menunjukkan adanya perbaikan luka bakar. Hasil pengukuran luka menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menurunkan luas luka dibandingkan dengan perlakuan lain. Kondisi morfologi luka bakar seperti yang disajikan pada Tabel 5.6 menunjukkan bahwa pada seluruh perlakuan terdapat keropeng, rambut mulai tampak menutupi bagian-bagian yang terkena luka bakar. Hal ini mengindikasikan adanya proses penyembuhan luka.

6.3.2 Tampilan anatomi penyembuhan luka bakar

Tampilan anatomi penyembuhan luka bakar menunjukkan perbaikan luka bakar pada seluruh perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol. Gambar 5.15 merepresentasikan proses penyembuhan luka bakar pada kelompok EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1. Pada EKM Dosis 1, proses re-epitelisasi terlihat lebih baik dibandingkan kontrol pada hari ke-7 dan 14. Proses epitelisasi merupakan salah satu kriteria luka sembuh (Handian, 2006). Hasil ini menunjukkan bahwa pada hari ke-14 luka bakar telah sembuh secara sempurna.

Proses epitelisasi yang tampak merupakan hasil dari berbagai mekanisme molekuler penyembuhan luka. Stimulus untuk re-epitelisasi masih belum diketahui

secara lengkap, akan tetapi tampaknya proses ini dimediasi oleh kombinasi dari hilangnya kontak inhibisi, paparan terhadap konstituen dari matriks ekstraseluler, biasanya *fibronectin* dan sitokin yang diproduksi oleh sel mononuklear, terutama EGF, TGF-β), bFGF, PDGF dan IGF-1 yang telah diketahui meningkatkan epithelialisasi (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007). Teori ini sejalan dengan hasil ekspresi gen TGF-β dan EGF yang lebih tinggi pada perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Tingkat ekspresi dari protein-protein ini akan dijelaskan pada bab-bab selanjutnya.

Tabel 5.7 menunjukkan adanya perbaikan ketebalan kolagen pada hari ke-1 hingga hari ke-14. Peningkatan jumlah kolagen menunjukkan adanya proses penyembuhan luka. Kolagen disintesis pada tahap proliferasi. Kolagen diproduksi oleh sel-sel fibroblas. Kolagen yang pertama dibentuk merupakan kolagen I dan III. Kolagen tipe I merupakan komponen utama matriks ekstraseluler di kulit, dan kolagen tipe III yang secara normal juga ada di kulit, menjadi lebih banyak dan penting selama proses penyembuhan luka. Sintesis kolagen, seperti halnya modifikasi *post translational*, sangat tergantung pada faktor sistemik seperti suplai oksigen yang adekuat; adanya nutrisi yang cukup (asam amino dan karbohidrat) dan kofaktor (vitamin dan *trace* mineral) dan lingkungan lokal luka (suplai pembuluh darah dan ada tidaknya infeksi) (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007). Kent & Sheridan (2003) menyatakan bahwa sintesis kolagen dipengaruhi oleh *macrophages-derived* sitokin seperti TGF-β, TGF-α, EGF, IL-1. Hasil pada Tabel 5.6 menunjukkan bahwa perlakuan EKM dan MEBO yang dilakukan mampu menstimulasi proses sintesis kolagen untuk perbaikan luka bakar.

6.3.2.1 Infiltrasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi

Hasil analisis histopatologi yang disajikan dalam Tabel 5.6, kemudian dikuantifikasi untuk melihat jumlah neutrofil, limfosit dan neovaskularisasi. Jumlah sel, neutrofil, limfosit dan neovaskularisasi merupakan aspek penting dalam proses penyembuhan luka. Sel neutrofil dan limfosit merupakan sel PMN. PMN merupakan sumber utama dari sitokin pada awal inflamasi, khususnya TNF-α, yang mungkin berpengaruh pada proses angiogenesis dan sintesa kolagen. PMN juga melepaskan protease, seperti kolagenase, yang berperan pada proses degradasi matriks jaringan pada fase awal dari penyembuhan luka. Selain fungsi untuk menghalangi infeksi, sel ini tidak terlihat memiliki peran pada deposisi kolagen dan pencapaian kekuatan mekanik luka. Sebaliknya faktor neutrofil berimplikasi pada keterlambatan penutupan epitel pada luka (Barbul *et al.*, 2007; Gurtner, 2007; Sabiston, 2007).

6.3.2.1.1 Infiltrasi Neutrofil

Neutrofil merupakan sel yang meningkat jumlahnya akibat kerusakan jaringan pada luka bakar. Peran utama neutrofil adalah fagositosis bakteri dan jaringan mati. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah, adanya pelepasan prostaglandin pada daerah luka, dan adanya bahan-bahan kemotaksis seperti faktor-faktor komplemen, IL-1, TNF-α, TGF-β, faktor platelet, atau adanya produk-produk bakteri, kesemuanya akan merangsang migrasi dari netrofil ke dalam luka (Barbul *et al.*, 2007).

Gambar 5.17 menunjukkan bahwa pada perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 jumlah neutrofil tertinggi pada hari ke-1 setelah perlakuan dan mengalami penurunan pada hari ke-7 dan 14. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya. Kim *et al.* (2018) menujukkan bahwa neutrofil meningkat pasca terjadinya luka pada jam ke-0 hingga jam ke-24, namun menurun pada hari-hari berikutnya. Penurunan jumlah neutrofil bisa terjadi karena apoptosis, fagositosis

maupun nekrosis dari neutrofil. Penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa neutrofil dapat berpindah dari jaringan yang terkena luka atau yang disebut *reverse migration*. Gambar 5.17 juga menunjukkan bahwa jumlah neutrofil pada jaringan yang diberi perlakuan EKM Dosis 0, tidak menunjukkan adanya penurunan. Kemungkinan besar hal ini dikarenakan adanya inflamasi yang berkepanjangan pada jaringan kontrol akibat infeksi bakteri. Bjarnsholt *et al*. (2008) menyatakan bahwa apabila terjadi infeksi bakteri pada luka, jumlah sel PMN terutama neutrofil akan meningkat tajam.

Analisis statistik (Tabel 5.8) yang telah dilakukan menunjukkan bahwa jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 berbeda signifikan dengan kontrol pada hari ke-1 setelah luka. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EKM pada jaringan luka bakar mampu meningkatkan infiltrasi neutrofil pada jaringan yang terkena luka. Infiltrasi neutrofil yang baik pada tahap inflamasi (hari ke-1-2) sangat baik karena neutrofil berfungsi dalam membunuh bakteri yang terdapat pada luka (Oliveira *et al*., 2016).

Hasil pengamatan infiltrasi neutrofil menunjukkan adanya aktivitas anti inflamasi dari EKM pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini terlihat dari penurunan jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan dan MEBO. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa sel neutrofil merupakan sel-sel inflamasi. Penurunan sel neutrofil merupakan bagian dari aktivitas anti-inflamasi juga diterangkan oleh Lin *et al*. (2017). Hasil penelitian ini juga membuktikan prediksi hasil analisis QSAR di mana xanthone yang terdapat dalam EKM merupakan agen inflamatori. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Widowati *et al*. (2016) yang menyatakan bahwa EKM memiliki kemampuan sebagai agen anti-inflamasi melalui pengujian secara *ex vivo* menggunkan model anti-inflamasi sel RAW.

6.3.2.1.2 Infiltrasi Limfosit

Limfosit merupakan salah satu sel PMN, merupakan sumber utama dari sitokin pada awal inflamasi, khususnya TNF-α, yang mungkin berpengaruh pada proses angiogenesis dan sintesa kolagen. PMN juga melepaskan protease, seperti kolagenase, yang berperan pada proses degradasi matriks jaringan pada fase awal dari penyembuhan luka (Barbul *et al*., 2007).

Gambar 5.18 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata dari inflitrasi limfosit pada hari ke-1. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EKM dan MEBO menstimulasi peningkatan inflitrasi limfosit pada jaringan yang terkena luka bakar. Pada hari ke-7 dan 14, terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata limfosit EKM Dosis 0 dengan seluruh EKM Dosis 1 dan 2. Infiltrasi limfosit pada hari ke-7 dan 14 lebih tinggi pada EKM Dosis 0 dibanding dengan perlakuan yang lain. Hal ini memperkuat indikasi bahwa terjadi *prolonged inflammation* pada jaringan yang terkena luka bakar pada EKM Dosis 0 akibat infeksi bakteri. Bjarnsholt *et al*. (2008) menyatakan bahwa apabila terjadi infeksi bakteri pada luka, jumlah sel PMN terutama neutrofil akan meningkat tajam.

Hasil penelitian Agaiby & Daison (1999) menunjukkan bahwa jumlah limfosit tertinggi terjadi pada hari ke-10 pasca luka. Jumlah limfosit mengalami kenaikan dari hari pertama hingga hari ke-10 dan kemudian turun secara perlahan. Hasil penelitian ini berbeda dengan data pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2. Pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 jumlah neutrofil tertinggi pada hari pertama dan turun pada hari ke-7 dan 14.

6.3.2.1.3 Neovaskularisasi

Neovaskularisasi jaringan terjadi pada proses penyembuhan luka pada tahap proliferasi dan remodeling. Neovaskularisasi seharusnya terjadi pada hari ke 3-14. Neovaskularisasi jaringan luka bersamaan dengan proses fibroplasia. Neovaskularisasi merupakan proses penting dalam proses penyembuhan luka bakar. Sesaat setelah terjadinya luka, neovaskularisasi diperlukan dalam transportasi oksigen, nutrient dan sel-sel inflamasi. Neovaskularisasi juga diperlukan dalam mengangkut debris sel-sel mati atau yang dibutuhkan dalam menutup luka (Kent & Sheridan, 2003).

Gambar 5.19 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak EKM meningkatkan rerata neovaskularisasi pada hari ke-7 dan ke-14 pasca luka bakar. Tabel 5.10 terdapat perbedaan nyata dari jumlah neovaskularisasi antara EKM Dosis 0 dan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2, namun tidak ada perbedaan nyata antara EKM dosis 0 dan MEBO. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian EKM baik Dosis 1 maupun Dosis 2 dapat meningkatkan jumlah neovaskularisasi dibandingkan dengan kontrol dan MEBO. Pada hari ke-14 jumlah neuvaskularisasi lebih tinggi secara signifikan pda perlakuan EKM Dosis 1 dan rerata yang lebih tinggi pada EKM Dosis 2 dibandingkan dengan EKM Dosis 0 dan MEBO.

Peningkatan jumlah neovaskularisasi ini akan meningkatkan transportasi nutrient, sel dan oksigen yang dibutuhkan dalam proses penyembuhan luka bakar (Kent & Sheridan, 2003). Proses pembentukan pembuluh darah baru (neovaskularisasi) atau yang disebut juga angiogenesis melibatkan proses molekuler yang rumit. Beberapa protein terlibat dalam insiasi proses angiogenesis ini, diantaranya FGF-1, FGF-2 dan VEGF (Shweiki *et al.*, 1992).

6.3.3 Analisis Ekspresi Protein yang Berperan dalam Penyembuhan Luka

Analisis ekspresi protein IL-6, TGF-β, EGF telah dilakukan menggunakan teknik analisis imunohistokimia (IHK). Analisis IHK dilakukan dengan melakukan pencitraan protein pada sayatan jaringan menggunakan antibodi spesifik (Duraiyan, *et al*. 2012). Teknik IHK memiliki keunggulan dapat melihat persebaran protein pada jaringan, namun analisis IHK tidak terlalu sensitif dalam mengukur kuantitas protein (Ramos-Vara, 2005).

6.3.3.1 Ekspresi Protein IL-6

Tabel 5.11 menunjukkan bahwa protein IL-6 terekspresi pada daerah endodermis pada semua perlakuan dan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa protein ini merupakan protein yang penting dalam proses penyembuhan luka. Tabel 5.12 dan Gambar 5.20 menunjukkan kuantifikasi protein IL-6 dengan metode IHK. Gambar dan Tabel tersebut menunjukkan pada hari 1, terjadi peningkatan ekspresi IL-6 secara signifikan pada kemopok EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 dibandingkan dengan MEBO dan EKM Dosis 0. Pada hari ke -7, ekspresinya semakin meningkat.

Ekspresi protein IL-6 pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 hari ke-7 berbeda signifikan dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Namun, secara rerata ekspresi protein IL-6 pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 lebih tinggi dibandingkan kontrol. Ekspresi IL-6 pada kelompok perlakuan menurun pada hari ke-14. Ekspresi protein IL-6 pada hari ke-14 lebih tinggi secara signifikan jika dibandingkan dengan EKM Dosis 0.

Penelitian mengenai peran IL-6 dalam penyembuhan luka bakar masih sangat sedikit. Hasil penelitian Wang *et al* (2017) melalui analisis imunohistokimia menunjukkan IL 6 tidak terdeteksi pada daerah luka hari 1 baik pada kontrol dan kelompok perlakuan, tetapi meningkat pada hari 3, dan kemudian menurun

perlahan-lahan sampai tidak dideteksi pada hari 8 dan 11. Pola ekspresi ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan dimana ekspresi protein menurun pada hari ke-14. Namun pada penelitian ini, ditemukan ekspresi protein IL-6 pada hari ke-1 setelah luka.

IL-6 memiliki fungsi yang sangat penting pada fase lanjutan dari penyembuhan luka. IL-6 diproduksi segera setelah terjadinya luka oleh epidermal keratinosit, makrogaf, sel langerhans dan fibroblast di dermis. Hasil penelitian McFarland-Mancinni (2010) menunjukkan bahwa *knockout* dari IL-6 dan reseptor IL-6 menghambat proses infiltrasi makrofag, pembersihan fibrin, dan kontraksi luka. Peningkatan ekspresi IL 6 bertahan hingga hari ke-7 setelah luka bakar terjadi. Ekspresi IL 6 pada jaringan yang mendapatkan terapi EKM dengan Dosis 1 dan EKM Dosis 2 lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Pada 14 hari setelah terjadinya luka bakar, kulit yang mendapatkan terapi dengan gel EKM dengan Dosis 1 dan EKM Dosis 2 menunjukkan pembentukan lapisan epitel baru. Lapisan epitel ini terbentuk lebih cepat bila dibandingkan dengan kontrol.

Tidak adanya peningkatan yang signifikan dari IL-6 dan kecilnya ekspresi IL-6 dibandingkan kontrol negatif pada jaringan luka kemungkinan besar baik pula untuk penyembuhan luka. Fungsi IL-6 sendiri dalam penyembuhan luka belum diketahui secara jelas. Hasil penelitian Wang *et al*. (2012) menunjukkan bahwa ekspresi IL-6 pada kelompok perlakukan dengan *Povidone-iodine* (PVI) lebih kecil dibandingkan kontrol. IL-6 adalah sitokin dengan sifat pro dan anti-inflamasi dan merupakan penanda stres, dengan kemampuan untuk menginduksi ekspresi protein fase akut (Crozier, 1994). Hal ini menunjukkan bahwa pengobatan EKM Dosis 2 dapat meningkatkan penyembuhan luka kulit dengan mengurangi respons inflamasi akut yang melibatkan kongesti dan edema.

Walaupun belum diketahui peran IL-6 secara pasti dalam proses penyembuhan luka bakar, protein ini memiliki peran vital dalam proses penyembuhan luka bakar. Penurunan konsentrasi IL-6 pada plasma pada saat operasi karena pengunaan *alfentanil* diperkirakan mempengaruhi penyembuhan luka pada periode pasca operasi. IL-6 telah terlibat dalam semua tahap penyembuhan luka. Sitokin ini menginduksi proliferasi sel-T (Houssiau, *et al*., 1988) dan berkontribusi pada respon fibroblastik yang diperlukan untuk deposisi kolagen pada jaringan granulasi yang belum matang (Kohase *et al*, 1986). Migrasi epitel juga dipengaruhi oleh IL-6 yang melibatkan *fibronektin-dependent mecanism*, baik secara *in vivo* maupun *in vitro.* Konsentrasi IL-6 dalam cairan luka telah dilaporkan lebih tinggi secara signifikan daripada konsentrasi plasma pada jaringan normal. Hal ini menunjukkan bahwa mediator ini dapat memainkan peranan penting dalam perbaikan jaringan (Ashcoft dan Masterson, 1994).

6.3.3.2 Ekspresi Protein TGF-β

TGF-β adalah salah satu *growth factor* yang penting dalam proses penyembuhan luka. TGF-β berikatan dengan reseptor (TβRI dan II) dan mengaktifkan SMAD pathway. TGF-β berperan penting dalam proses penyembuhan luka seperti peradangan, angiogenesis, proliferasi fibroblas, sintesis kolagen dan permodelan kembali matriks ekstraseluler yang baru. TGF-β tidak ditemukan pada luka kronis dan luka yang gagal sembuh. Hal ini mengindikasikan bahwa TGF-β sangat diperlukan untuk mempercepat penyembuhan luka.

Hasil analisis IHK yang ditunjukkan pada Tabel 5.13 menunjukkan bahwa protein TGF-β tereskpresi pada jaringan endodermis kulit. Tabel 5.14 dan Gambar 5.21 menunjukkan kuantifikasi protein TGF-β. Gambar dan Tabel tersebut menunjukkan bahwa penggunaan kulit manggis sebagai obat penyembuhan luka

bakar mampu meningktkan ekspresi TGF-β1 hari ke-7 setelah terjadinya luka. Pemberian EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 meningkatkan TGF-β dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Peningkatan ekspresi TGF-β pada EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 ini bertahan hingga 14 hari setelah pemberian sediaan. Kulit yang mendapatkan EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 menunjukkan percepatan proliferasi epitel baru dibandingkan dengan kontrol.

Pada analisis IHK, ekspresi TGF-β paling tinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol negatif pada hari-1, tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan dibandingkan perlakuan. Pada hari-7, ekspresi TGF-β mulai meningkat pada kelompok perlakuan EKM Dosis 1, 2 dan MEBO secara signifikan dibandingkan EKM Dosis 0. Pada hari ke-14, ekspresi TGF-β menurun pada semua kelompok perlakuan dan kontrol negatif. Penelitian yang dilakukan Luckett-Chastain & Galluci, 2009 menunjukkan ekspresi mRNA TGF-β1 dan TGF-βR2 mRNA jauh lebih tinggi pada tikus yang terkena luka pada hari ke-7 hari, akan tetapi ekpresi proteinnya setara (Luckett-Chastain & Galluci, 2009). Hasil penelitian Luckett-Chastain & Galluci (2009) sesuai dengan penelitian ini.

Peningkatan ekspresi TGF-β merupakan mekanisme yang dapat mempercepat penyembuhan luka. Beberapa pengujian senyawa kandidat obat dari bahan sintetik maupun ekstrak tumbuhan memiliki kemampuan dalam mempercepat penyembuhan luka melalui mekanisme peningkatan ekspresi TGF-β. Wang *et al*. (2017) mengatakan bahwa pemberian PVI pada permukaan luka bakar meningkatkan proses penyembuhan luka bakar melalui peningkatan ekspresi TGF-β. Penelitian Moori *et al*. (2016) menunjukkan bahwa minyak lavender dapat meningkatkan proses penyembuhan luka bakar melalui mekanisme peningkatan ekspresi TGF-β. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Momordica charantia*

juga menunjukkan percepatan penyembuhan luka bakar melalui mekanisme peningkatan ekspresi TGF-β (Hussan *et al*., 2014).

Percepatan penyembuhan luka bakar pada MEBO, EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 kemungkinan besar juga melaui mekanisme peningkatan ekspresi protein TGF-β. Seperti yang telah dterangkan sebelumnya, TGF-β juga merupkan protein yang memiliki peran penting dalam penyembuhan luka bakar. Protein ini berperan penting pada tahap koagulasi, proliferasi dan remodeling. Pada tahap koagulasi TGF-β memiliki peran yang penting bersama protein TGF-α, PDGF meninduksi pembentukkan agregasi platelet yang kemudian mengaktivasi kaskade sinyal pembentukan *fibrin colt* (Kent & Sheridan, 2003). TGF-β juga merupakan *macrophages-derived* sitokin, bersama protein TGF-α, PDGF, EGF, IL-1, TNF-α, protein TGF-β memiliki peranan penting dalam inisasi dari perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). Pada fase proliferasi, protein TGF-β juga berperan dalam proses induksi fibroblast. TGF-β bersama PDGF merupakan autocrine dari fibroblast, protein ini dihasilkan oleh fibroblast dan menginduksi proliferasi fibroblast. Aktivitas dari fibroblast dalam membentuk jaringan granulasi, kolagen, fibronectin, laminin and hyaluronan juga dipengaruhi oleh aktivitas dari protein TGF- β (Moulin, 1995).

6.3.3.3 Ekspresi Protein EGF

EGF adalah merupakan salah satu molekul yang berperan dalam re-epitelialisasi. EGF menstimulasi migrasi fibroblas dan kontraksi dari luka. EGF juga berperan dalam proses deferensiasi dari keratinosit menjadi epitel dan pembentukan barrier epitel. EGF berikatan dengan EGFR, salah satu jenis dari reseptor tirosin kinase yang banyak terekspresi di sel kulit. Aktivasi EGFR menimbulkan berbagai respon biologis seperti migrasi, proliferasi sel, diferensiasi sel dan apoptosis

(Bodnar, 2013). EGF ini terekspresi pada waktu fase koagulasi, berperan bersama protein lain dalam pembentukan fibronectin. EGF juga merupakan protein *macrophages-derived* sitokin yang berfungsi dalam dalam inisasi dari perbanyakan jaringan baru dan transisi dari perbaikan jaringan pada daerah yang luka (Ruoslahti, 1988). EGF juga merupakan protein penting dalam tahap proliferasi, protein ini berpengaruh dalam proses deposisis matriks kolagen pada jaringan luka bakar (Moulin, 1995).

Pada Tabel 5.15 menunjukkan bahwa protein EGF terekspresi pada jaringan luka bakar di daerah endodermis. Tabel 5.16 dan Gambar 5.22 menunjukkan kuantifikasi ekspresi protein EGF pada analisis IHK. Dari ekspresi EGF pada sediaan IHK kulit tikus yang mengalami luka bakar, terlihat adanya peningkatan ekspresi EGF pada hari ke-1, 7 dan 14 setelah luka bakar terbentuk. Pemberian sediaan topikal EKM Dosis 1 dan EKM Dosis 2 juga menunjukkan adanya peningkatan ekspresi EGF pada sediaan kulit tikus dibandingkan dengan EKM Dosis 0. Peningkatan ekspresi EGF ini sebanding dengan peningkatan ekspresi EGF pada perlakuan MEBO. Ekspresi EGF mengalami penurunan pada hari ke-14 setelah terjadinya luka bakar.

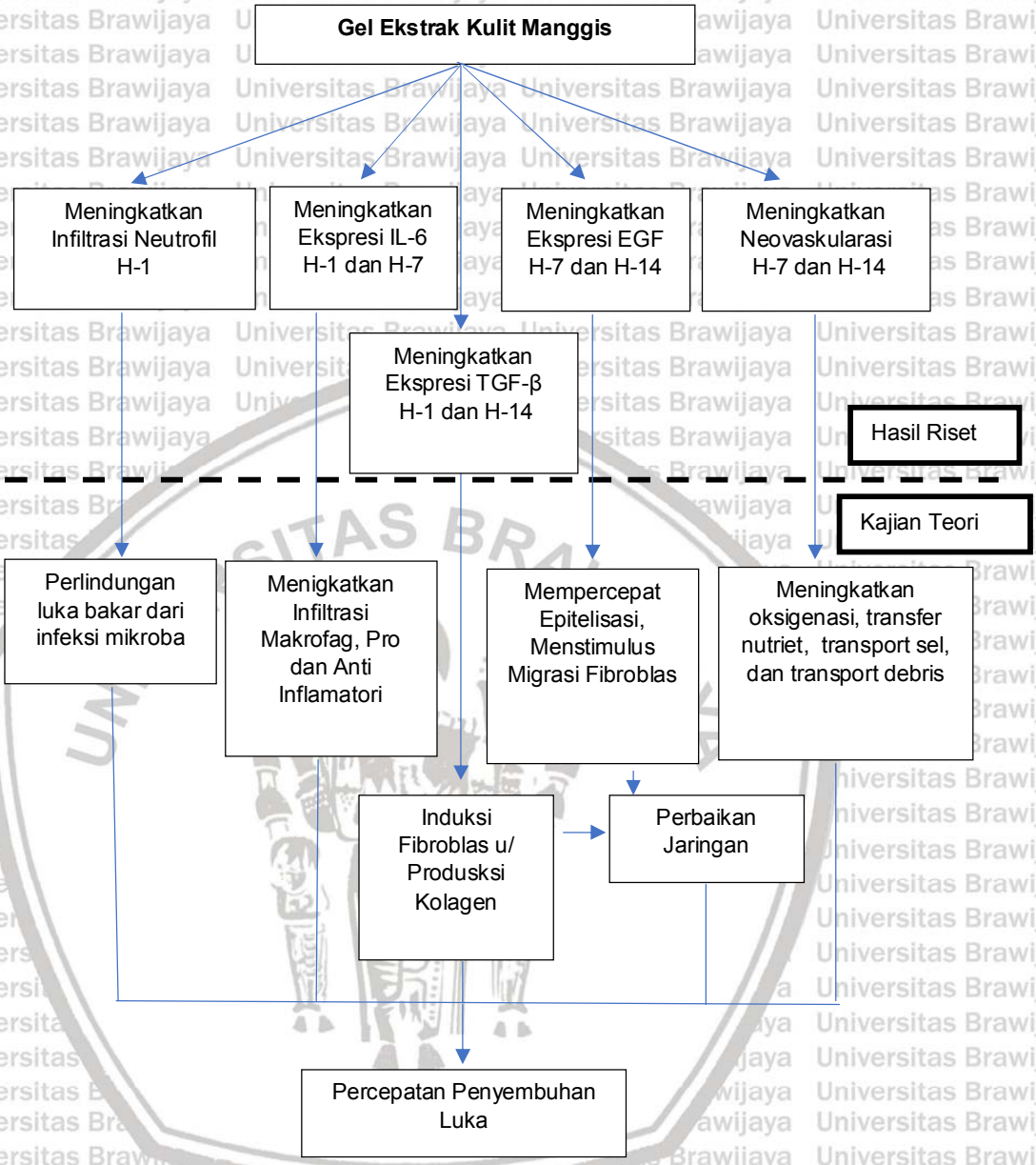
Wenczak dkk. (1992) telah menunjukkan lokalisasi reseptor EGF (EGF-R) pada daerah luka bakar. Pada periode awal pasca luka (hari 2-4), EGF-R belum terdiferensiasi dan selama periode akhir ppasca luka (hari 5-16), EGF-R berkurang, akan tetapi EGF-R imunoreaktif ditemukan pada epitel yang hipertropi dan kulit tambahan. Tingginya EGF-R imunoreaktif berhubungan dengan distribusi *proliferating cell nuclear antigen* yang menunjukkan perannya dalam penyembuhan luka (Wenczak *et al*, 1992).

Terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi EGF antara EKM Dosis 2 dan kelompok lain pada hari 1. Ekspresi EGF terlihat meningkat pada seluruh kelompok pada hari 7, dengan nilai tertinggi pada kelompok EKM Dosis 1. Kelompok perlakuan ekstrak menunjukkan peningkatan ekspresi EGF yang signifikan ada hari ke-7 ini dibandingkan kontrol negatif. Pada hari 14, ekspresi EGF menurun pada kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan EKM Dosis 2 dengan seluruh kelompok perlakuan pada hari 14. Peningkatan ekspresi EGF pada hari ke-1, 7 dan 14 merupakan hal yang dapat mempercepat penyembuhan luka bakar.

Peningkatan ekspresi EGF pada luka bakar yang diberi perlakuan EKM dan MEBO ini kemungkinan besar mampu mempercepat penyembuhan luka bakar. Beberapa kandidat obat yang dikembangkan seperti *Pocrine Accelular Dermal Matrix* (*ADM*) *d*an *PVI* mampu meningkatkan ekspresi dari EGF berdasarkan hasil IHK (Chen *et al*., 2013). Pemberian perlakuan EGF topikal pada luka bakar juga terbukti mampu mempercepat penyembuhan luka bakar melaui mekanisme peningkatan sel fibroblas dan kolagen (Kwon *et al*., 2013).

6.4. Mekanisme Molekuler EKM dalam Penyembuhan Luka Bakar

Proses penyembuhan luka bakar merupakan suatu proses yang rumit dan melibatkan banyak faktor. Proses penyembuhan luka bakar diawali dari proses koagulasi, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Proses penyembuhan luka bakar juga melibatkan berbagai macam sel-sel penting, diantaranya adalah fibroblas, makrofag, limfosit, netrofil, dan lain-lain. Beberapa protein penting juga berkaitan dalam proses penyembuhan luka bakar seperti EGF, FGF, VEGF, TGF-β, IL-6.



Gambar 6.2 Mekanisme Molekuler Penyembuhan Luka Bakar yang diinduksi EKM

Penelitian ini dilakukan untuk melihat mekanisme molekuler EKM pada model tikus luka bakar secara *in silico* (bioinformatik) melalui analisis QSAR dan *in vivo* melalui model tikus luka bakar dengan meneliti infiltrasi neutrofil, limfosit dan neovaskularisasi serta ekspresi protein IL-6, TGF-β, dan EGF. Hasil analisis QSAR

menunjukkan bahwa pemberian EKM mampu mempengaruhi aktivitas-aktivitas protein yang berperan dalam penyembuhan luka bakar seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, yaitu IL-6, TGF-β1, TGF-β1, EGF dan FGF. Analisis *in vivo* terhadap hasil ini menunjukkan bahwa ekspresi IL-6, TGF-β, dan EGF pada perlakuan dengan EKM memiliki tingkat ekspresi yang berbeda dengan kontrol negatif. Perbedaan ini ada yang hanya berbeda secara rerata maupun secara statistik. Pemberian EKM juga mempegaruhi proses infiltrasi sel-sel neutrofil dan proses neovaskularisasi pada jaringan luka bakar. Mekanisme molekuler dan seluler ini digambarkan dalam Gambar 6.1. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa analisis bioinformatika merupakan metode yang berdaya dalam eksplorasi senyawa alam berpotensi obat. Namun analisis bioinformatika harus didukung dengan analisis *in vitro* atau *in vivo*.

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa senyawa kompleks molekul pada EKM memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Bahan antioksidan dalam EKM mampu menseimbangkan kompleksitas energi dengan merubah radikal bebas menjadi molekul yang tidak reaktif dalam jaringan yang terkena luka bakar. Keseimbangan oksidan (*moderate oksidan*) akibat perlakuan EKM terbukti mampu mempercepat penyembuhan luka bakar. Namun, penelitian-penelitian lain perlu dilakukan untuk memperkuat hasil penelitian tentang efek antioksidan EKM dalam jaringan dan proses kimiawi pengkelatan logam secara *in vivo* dan hubunganya dengan pengaturan energi dalam penyembuhan luka bakar.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Analisis bioinformatik menunjukkan EKM mengandung (*Esmeathxanthone A* (Pa 0.7), *Garcinone E* (Pa 0.694), *γ-mangostin* (Pa 0.693) dan *Gartanin* (0.692) yang memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Analisis QSAR menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut mempengaruhi protein-protein EGF, IL-6, TGF-β yang berperan dalam proses penyembuhan luka bakar.
2. Analisis kandungan senyawa *xanthone*, aktivitas antioksidan dan analisis kompleks senyawa logam transisi-senyawa organik menunjukkan hasil sebagai berikut:
   a. EKM kematangan 6 mengandung senyawa *xanthon*e (*Esmeathxanthone A, Garcinone E, γ-mangostin dan Gartanin*) tertinggi dibandingkan dengan tingkat kematangan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa bahan untuk pembentukan kompleks molekul paling banyak tedapat pada EKM dengan tingkat kematangan 6.
   b. Analisis ukuran, karakteristik partikel, dan kandungan *trace element* dari EKM menggunakan PSA, XRD, XRF dan SEM menunjukkan bahwa EKM memiliki struktur kristal/amorf, dengan ukuran partikel mikro hingga nano. EKM tingkat kematangan 6 memiliki struktur *nanocrystal* dan mengandung *trace element* Fe, Ca, Zn, Cu, Mn yang berperan dalam proses penyembuhan luka bakar.
   c. EKM kematangan 4, 5 dan 6 memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibandingkan EKM kematangan 1, 2, dan 3 dilihat dari hasil analisis ESR.

Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya kompleks logam transisi-senyawa organik pada EKM yang menunjukkan bahwa senyawa xanthone mampu menjadi *chelator* logam.

d. *Xanthone* dalam EKM diprediksi memiliki kemampuan untuk mengkelat logam. Hasil prediksi menggunakan *Chemskett* dan *Open Buble* menunjukkan adanya prediksi kompleks senyawa Fe(ɣ-mangosteen)$_3^{-4}$, senyawa ɣ-mangosteen diprediksi dapat berperan sebagai senyawa antioksidan dengan mengkelat ion Fe.

3. Analisis *in vivo* menggunakan model tikus luka bakar menunjukkan adanya perbaikan jaringan lebih baik, infiltrasi neutrofil, neovaskularisasi dan infiltrasi limfosit lebih baik pada perlakuan gel EKM Dosis 1 (0,2 g) dan EKM Dosis 2 (0,4 g) setara dengan MEBO. Bahkan dalam beberapa parameter seperti infiltrasi limfosit, neovaskularisasi, dan ekspresi IL-6 menunjukkan bahwa EKM Dosis 1 (0,2 g) memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan MEBO. Analisis infiltrasi neutrofil, neovaskularisasi dan infiltrasi limfosit menunjukkan adanya peningkatan infiltrasi neutrofil pada hari ke-1 dan peningkatan jumlah neovaskularisasi pada hari ke-7 pada kelompok pemberian gel EKM dibandingkan dengan kontrol negatif.
4. Pemberian gel EKM Dosis 1 (0,2 g) dan EKM Dosis 2 (0,4 g) mampu meningkatkan ekspresi IL-6 pada hari ke-1 dan 7, TGF-β pada hari ke-1 dan 14, serta EGF pada hari ke-7 dan 14.

7.2 Saran

Penelitian tentang eksplorasi bahan alam sebagai bahan baku obat merupakan hal yang penting. Analisis lanjutan dapat dilakukan untuk menguji gel

EKM terhadap kadar kolagen, fibroblas dan angiogenesis pada tikus model luka bakar. Analisis protein dari model tikus luka bakar dapat dilakukan lebih lanjut untuk protein-protein yang telah diuji tapi dengan rentang waktu yang lebih singkat (per jam atau per hari).

Analisis protein dari model tikus luka bakar dapat pula dilakukan lebih lanjut untuk protein-protein lain yang memiliki peran dalam penyembuhan luka seperti TNF-α, VEGF, FGF. Penelitian mengenai formulasi EKM dengan formula yang lebih beragam juga dapat dilakukan untuk malihat formula EKM terbaik yang dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Penelitian lebih lanjut uji klinis aplikasi gel EKM pada manusia yang mengalami luka bakar.

Penelitian lebih lanjut tentang kemampuan senyawa EKM sebagai antioksidan pada jaringan model tikus luka bakar perlu dilakukan lebih lanjut. Aktivitas pengkelatan logam dari EKM pada model tikus luka bakar dan kaitannya dengan konsentrasi logam transisi juga perlu dikaji lebih lanjut untuk memberikan pengetahuan yang lebih menyeluruh tentang peranan LMWA dalam proses penyembuhan luka bakar.

DAFTAR PUSTAKA

Afendi, FM, Taketo O, Mami Y, Aki AM, YukikoN, Kensuke N, Shun I, et al. (2012). "KNApSAcK Family Databases: Integrated Metabolite–Plant Species Databases for Multifaceted Plant Research." Plant and Cell Physiology 53 (2): e1–e1.

Agaiby, A. D., & Dyson, M. 1999. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *The Journal of Anatomy*, *195*(4), 531-542.

Agilent. 2001. Basic of LC/MS. [Online]. Tersedia: http://www.chem.pitt.eduwipfAgilent%20LC-MS%20primer.pdf. Diakses: 20 Oktober 2018

Ahuja, RB dan Pallab C. 2014. Postburn pruritus: A practical review. *CME Article* 22(1): 13 – 21.

Alharbi, Z, Andrzej P, Rolf D, Sven R, Gerrit G, Jens K, Norbert P, . 2012. Treatment of burns in the first 24 hours: simple and practical guide by answering 10 questions in a step-by-step form. *World J Emer Surg* 7(1): 13

Aliasl, J dan Fariba K. 2013. Traditional herbal remedies for burn wound healing in canon of avicenna. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 8(4): 192 – 196.

Atiyeh, B. S., Dham, R., Kadry, M., Abdallah, A. F., Al-Oteify, M., Fathi, O., & Samir, A. (2002). Benefit–cost analysis of moist exposed burn ointment. *Burns*, *28*(7), 659-663.

Atiyeh, B. S., Ioannovich, J., Magliacani, G., Masellis, M., Costagliola, M., Dham, R., & Al-Farhan, M. (2002). Efficacy of moist exposed burn ointment in the management of cutaneous wounds and ulcers: a multicenter pilot study. *Annals of plastic surgery*, *48*(2), 226-227.

Arikumalasari, J, Dewantara IGNA, dan Wijayanti NPAD. 2009. Optimasi HPMC sebagai gelling agent dalam formula gel ekstrak kulit buah manggis *(Garcinia mangostana* L.) *Jurnal Farmasi Udayana* 2(3): 145 – 151.

Aruoma, OI, Barry H, Brigid MH, John B. 1989. The antioxidant action of N-Acetylcycteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical,

superoxide, and hypochlorus acid. *Free Radical Biology & Medicine* 6: 593 – 597.

Ashkani-Eshfahani, S, Yasaman E, Elmira E, Fereshteh B, Mohammad RN. 2012. Glucosamine enhances tissue regeneration in the process of wound healing in rats as animal model: a stereological study. *J Cytol Histol* 3(4)

Athmaselvi, K. A., Kumar, C., Balasubramanian, M., & Roy, I. (2014). Thermal, Structural, and Physical Properties of Freeze Dried Tropical Fruit Powder. Journal of Food Processing, 2014, 1–10. https://doi.org/10.1155/2014/524705

Balqis, U, Rasmaidar dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologis Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (Spondias dulcis F.) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (Rattus norvegicus). *Jurnal Medika Veterinaria* 8 (1): 31-16.

Barbul, A, Efron DE, Are C, Park JE, Ahuja V. 2007. *Wound Healing: in Schwartz's Principles of Surgery*. Editor: F. Charles Brunicardi, Dana K, Andersen, Timothy RB, David LD, John GH, Rapahael EP. 8th ed. McGraw-Hill. New York.

Baskaran, H., Yarmush, M. L., & Berthiaume, F. (2000). Dynamics of tissue neutrophil sequestration after cutaneous burns in rats. *Journal of Surgical Research*, *93*(1), 88-96.

Berman, S, dan Kozier ERB. 2009. *Buku Ajar Keperawatan Klinis Kozier & Erb Edisi 5.* EGC. Jakarta.

Bertini, I. (Ed.). (2009). *Inorganic and Bio-Inorganic Chemistry-Volume II* (Vol. 6). EOLSS Publications.

Bertin-Maghit, M, Goudable J, Dalmas E, Steghens JP, Bouchard C, Gueugniaud PY, Petit P, Delafosse B. 2000. Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Care Med* 26(6): 800 – 803.

Betz, Cecily L, dan Linda AS. 2009. *Buku Saku Keperawatan Pediatri Ed 3.* EGC. Jakarta.

Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Madsen, K. G., Phipps, R., Krogfelt, K., ... & Givskov, M. (2008). Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair and regeneration*, *16*(1), 2-10.

Bodnar RJ. 2013. Epidermal Growth Factor and epidermal growth factor receptor: The Yin and Yang in the treatment of cutaneous wounds and cancer. *Advances in wound care*. 2 (1): 24-29.

Broughton, G, Janis JE. 2006. Wound healing: An overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 19(2): 403 – 434.

Burnette WN. 1981. "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry* 112 (2): 195–203.

Buzea, C., Blandino, IIP dan Robbie, K. (2007). Nanomaterial and nanoparticles: source and toxicity. Biointerphase. 2: MR170-MR172.

Callister, William D. (2007). "Material Science and Engineering An Introduction". New York: John Wiley and Sons, Inc.

Callister, William D. 2007. "Material Science and Engineering An Introduction". New York: John Wiley and Sons, Inc.

Chaovanalikit, A, Minguang A, Kitbunluewit T, Choldumrongkool N, Sondee J, dan Chupratum S. 2012. Anthocyanin and total phenolics content of mangosteen and effect of processing on the quality of mangosteen products. *International Food Research Journal* 19(3): 1047 – 1053.

Chen, S, Junbin S, Min Z, Yinghua C, Xueer W, Lei Z, Zhihui T, Yuan Y, Qinglin L, Wen Z, Malcolm X, Lu Z, dan Lin Z. 2015. Mesenchymal stem cell-laden anti-inflammatory hydrogel enhances diabetic wound healing. *Scientific Reports* 5: 18104.

Chen, X., Shi, Y., Shu, B., Xie, X., Yang, R., Zhang, L., ... & Zhang, F. (2013). The effect of porcine ADM to improve the burn wound healing. *International journal of clinical and experimental pathology*, *6*(11), 2280.

Choi JS, Leong KW, Yoo HS. 2008. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). Biomaterials 29: 587-596.

Chonmawang, MT, Surrasmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes. Fitroterapia* 78(6): 401 – 408.

Ciurzyńska, A. & Lenart, A. 2011. Freeze-Drying – Application in Food Processing and Biotechnology – A Review. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2011, Vol. 61, No. 3, pp. 165-171

Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of analytical chemistry*, *12*, 10815-10837.

Corwin, EJ. 2003. Buku Saku Patofisiologi Ed 3. EGC. Jakarta.

Costanzi, S., Tikhonova, I. G., Harden, T. K., & Jacobson, K. A. (2009). Ligand and structure-based methodologies for the prediction of the activity of G protein-coupled receptor ligands. *Journal of computer-aided molecular design*, *23*(11), 747.

Crowe MJ, Doetschman T, and Greenhalgh DG. 2000. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. J Invest Dermatol 115:3

Crozier, T. (1994). Interleukin-6 and wound healing. *British Journal of Anaesthesia*, *73*(3), 426.

de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, *16*(6), 378.

Depkes RI. 2008. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia tentang Kebijakan Dasar Pusat Kesehatan Masyarakat. Jakarta.

Dissemond, JG, Goos M, Wagner SN. 2002. The role of oxidative stress in the pathogenesis and therapy of chronic wounds. *Hautarzt* 53(11): 718 – 723.

Djamaan, A., Putri, SD and Agustin, r. 2016. Formulation of toothgel from mangosteen (Garcinia mangostana L.) pericarp extract purified and its

antibacterial activity against bacteria of plaque formation. Der Pharmacia Lettre, 2016, 8 (2):334-339.

Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., … Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. International Wound Journal, 14(1), 89–96.

Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, *4*(Suppl 2), S307.

Dziewulsi, P, Hettiaratchy S. 2004. Pathophysiology and types of burns. *British Medical Journal* 328: 1427 – 1429.

Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. In *Phytochemicals-Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*. IntechOpen.

Escámez, M.J., García, M., Larcher, F., Meana, A., Muñoz, E., Jorcano, J.L. and Del Río, M., 2004. An in vivo model of wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(6), pp.1182-1191.

Etzler FM. (2004). Particle Size Analysis: A Comparison of Methods. *American Pharmaceutical Review.*

Etzler FM. 2004. Particle Size Analysis: A Comparison of Methods. American Pharmaceutical Review.

Filimonov, D. A., A. A. Lagunin, T. A. Gloriozova, A. V. Rudik, D. S. Druzhilovskii, P. V. Pogodin, and V. V. Poroikov. 2014. “Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource.” Chemistry of Heterocyclic Compounds 50 (3): 444–57. https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1.

Finnson K. W., Arany P. R., & Philip A. 2013. Transforming growth factor beta signaling in cutaneous wound healing: lessons learned from animal studies. *Advances in wound care*, *2*(5), 225-237.

Fitriana, AY, Retno W, dan Sudarso S. 2012. Daya repelan dan uji iritasi formula lotion ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn.) dengan variasi basis lanolin terhadap nyamuk *Aedes aegypti. Jurnal Pharmacy* 9(2): 39 – 57.

Fourjoh, SN. 2006. Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology. Risk factors, treatment and prevention. *Burns* 32: 529 – 537.

Fuller, FW. 2009. The side effects of Silver Sulfadiazine. *J. Burn Care Rehabil* 30: 464 – 470.

Galuh, S. dan Rahmi, D. (2014). Pembuatan Nanopartikel dengan Metode High Speed Homogenization. Jurnal Litbang Industri, Vol. 3 No. 2, Desember, 67-131.

Gartner, L.P and Hiatt J.L. 2016. Colour Textbook of Histology 3rd Ed. Saunders Elsevier.Philadelphia.

Genuino, GAS, Kathrina VBA, Andre PTE, Marie CML, Brian SB. 2014. Topical petrolatum gel alone versus topical silver sulfadiazine with standard gauze dressings for the treatment of superficial partial thickness burns in adults: A randomized controlled trial. *Burns* 40(7): 1267 – 1273.

Gfeller, D., A. Grosdidier, M. Wirth, A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete. 2014. "SwissTargetPrediction: A Web Server for Target Prediction of Bioactive Small Molecules." Nucleic Acids Research 42 (W1): W32–38. https://doi.org/10.1093/nar/gku293.

Gondokesumo et al. 2018. Microstructural Characterization of the *Garcinia mangostana* Fruit at Different Maturity Level. Journal of Natural Remedies Vol 18(2).

Gorda, IW, I Gede S, Anak AGOD. 2011. The influence of honey in the incision wound recovery in mice (*Mus musculus*). *Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia.*

Grace, PA dan Neil RB. 2006. *At A Glance: Ilmu Bedah ed 3.* Erlangga. Jakarta.

Gunawan, B. dan Citra D. A. (1979). Karakterisasi Spektrofotometri I R dan Scanning Electron Microscopy (S E M) Sensor Gas dari Bahan Polimer Poly Ethelyn Glycol (P E G). Journal Sains. Vol. 3, No. 2, hal. 1-17.

Guo, S, dan Di Pietro LA. 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89(3): 219 – 229.

Gupta, R.B and Kompella, U.B. (2006). Nanoparticle technology of drug delivery. Taylor & Francis Grup. New York, pp 4-6, 13-16.

Gurtner, GC. 2007. *Wound Healing: Normal and Abnormal.* Grabb and Smith's Plastic Surgery 6th Ed. Philadelphia.

Gutierrez-Orozco, F. and Failla, M.L., 2013. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthones: a critical review of the current evidence. *Nutrients, 5*(8), pp.3163-3183.

Haas, K. L., & Franz, K. J. (2009). Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical reviews*, *109*(10), 4921-4960.

Hadriyono, Krp. 2011. Karakter Kulit Manggis, Kadar Polifenol Dan Potensi Antioksidan Kulit Manggis (Garcinia Mangostana L.) Pada Berbagai Umur Buah Dan Setelah Buah Dipanen. Skripsi. Bogor:Ipb.

Handian, FI. 2006. Efektivitas Perawatan Menggunakan Madu Nektar Flora Dibandingankan Dengan Silver Sulfadiazine Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Derajat II Terinfeksi Pada Marmut. [Skripsi]. Universitas Brawijaya. Malang.

Hemmati, AA, Maryam F, Gholamreza H, Zahra BM, Mohammad B, Nader SM. 2015. The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. *Global Journal of Health Science* 7(3): 52 – 58.

Hess, TC. 2011. Checklist for factors affecting wound healing. *Advances in Skin & Wound Care* 24(4)

Horton, JW. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma. The role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189: 75 – 88.

Hosseinimehr, SJ, Khorasani G, Azadbakht M, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A. 2010. Effect of aloe cream versus silver sulfadiazine for healing burn wounds in rats. *Acta Dermatovenerol Croat* 18(1): 2 – 7.

Hu, M. dan Li, X. (2011). Oral Bioavaibility: Basic Principles, Advance Concept, and Application. John Wiley & Sons, Inc. Hokoben. New Jersey. 32-33.

Hussan, F., Teoh, S. L., Muhamad, N., Mazlan, M., & Latiff, A. A. (2014). Momordica charantia ointment accelerates diabetic wound healing and enhances transforming growth factor-β expression. *Journal of wound care*, *23*(8), 400-407.

ICUC. 2003. Fruit to the future mangosteen. *Factsheet* 8 International Centre for Underutillized Crops.

Ishikawa, T., Hirano, H., Saito, H., Sano, K., Ikegami, Y., Yamaotsu, N., & Hirono, S. (2012). Quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis to predict drug-drug interactions of ABC transporter ABCG2. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *12*(6), 505-514.

Iswari, K, Harnel, E. Afdi, Azman, Artati F, Aswardi. 2005. *Kajian Teknologi Pengolahan Manggis Mendukung Agribisnis Manggis di Sumbar*. Laporan Hasil Penelitian BPTP. Sumatera Barat.

Jack W Penn, Adriaan O Grobbelaar, and Kerstin J Rolfe. 2012. Review Article The role of the TGF-β family in wound healing, burns scarring: a review. Int J Burn Trauma; 2(1):18-28

Jackson MJ & Johnson K (1989) Application of electron spin resonance techniques to the detection of free radicals in muscle tissue. In *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, vol. 3, pp. 209–214 [*J Miquel, AT Quintanilha and H Weber, editors*]. Boca Raton, FL: CRC Press.

Jackson, M. J. (1999). An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proceedings of the Nutrition Society*, *58*(4), 1001-1006.

Januari, A. & Martin, A. 2014. Pengeringan Bengkuang dengan Sistem Pengeringan Beku Vakum (Vacuum Freeze Drying System). Jom FTEKNIK Volume 1 No.2 Oktober 2014.

Jespersen N.D., Brady J.E (2012) Chemistry: the molecular nature of matter.; – 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc

Ji, T, Guo W, Yang RL, Tang S, Sun X. 2016. Clinical outcome and quality of life after surgery for peri-acetabular metastases. *J Bone Joint Sung* [Br] 93: 1104 – 1110.

Jones, V, Joseph EG, Keith GH. 2006. ABC of Wound healing: Wound dressing. *British Medical Journal* 332: 777 – 780.

Ju, HW, Ok JL, Jung ML, Bo MM, Hyun JP, Ye RP, Min CL, Soo HK, Janet RC, Chang SK, Chan HP. 2016. Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-model. *International Journal of Biological Macromolecules* 85(2016): 29 – 39.

Jung, HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. 2006. Antioxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (mangosteen). *J Agric Food Chem* 54: 2077 – 2082.

Karp, G. (2009). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons.

Kastaman, R. 2007. Analisis Prospektif Pengembangan Produk Olahan Manggis (*Garcinia mangostana*) Dalam Upaya Peningkatan Pendapatan Petani (Studi Kasus di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya).

Kaushik, D, Shiwani K, Pawan K, Shivkant S, AC Rana. 2013. Burn wound: Pathophysiology and its management by herbal plants. *Chron Young Sci* 4: 86 – 93.

Kawashima, Y, Yamamoto, H, Takeuchi, H, and Kuno Y. (2000). Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. Pharmaceutical Development and Tech. 5(1): 77-85

Kencana AL. (2009). Perlakuan sonikasi terhadap kitosan: viskositas dan bobot molekul [SKRIPSI]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Kent, D., & Sheridan, C. (2003). Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. *Mol Vis*, *9*, 747-755.

Kim, M. H., Liu, W., Borjesson, D. L., Curry, F. R. E., Miller, L. S., Cheung, A. L., ... & Simon, S. I. (2008). Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, *128*(7), 1812-1820.

Kim, SH, Yu W, Mostov K, Matthay MA, Hunt CA. 2009. A computational approach to understand in vitro alveolar morphogenesis. *Plos ONE* 4(3): e4819.

Kim, Sunghwan, Paul A. Thiessen, Evan E. Bolton, Jie Chen, Gang Fu, Asta Gindulyte, Lianyi Han, et al. 2016. "PubChem Substance and Compound Databases." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D1202–13.

Klein, G. L. (2016). Why so little effort to study anti-oxidant therapy in burns?. *Burns & trauma*, 4(1), 29.

Kozier, B., & Erb, G. (2009). Buku ajar praktik keperawatan klinis. *Jakarta: EGC*.

Kurahashi, T., & Fujii, J. (2015). Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *Journal of Developmental Biology*, 3(2), 57-70.

Kuzmanova, SV, Branka B, Srecko V. 2012. Electron spin resonance measurement of radical scavenging activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice. *Pharmacogn Mag.* 8(30): 171 – 174.

Kwon, Y. B., Kim, H. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Baek, R. M., Kim, J. Y., ... & Lee, J. H. (2006). Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *Journal of veterinary science*, *7*(2), 105-109.

Lalonde, C, U Nayak, J Hennigan, R Demling. 1997. Antioxidant prevent the cellular deficit produced in response to burn injury. *J Burn Care Rehabil* 17(5): 379 – 383.

Leapman, R. D. (2003). Detecting single atoms of calcium and iron in biological structures by electron energy-loss spectrum-imaging. Journal of Microscopy, 210(1), 5–15.

Li, D, Guo W, Qu H, Yang R, Tang X, Yan T. 2013. Experience with wound complications aftersurgery for sacral tumors. *Eur Spine J* 22: 2069 – 2076.

Li, H. L., Chen, L. P., Hu, Y. H., Qin, Y., Liang, G., Xiong, Y. X., & Chen, Q. X. (2012). Crocodile oil enhances cutaneous burn wound healing and reduces scar formation in rats. *Academic emergency medicine*, *19*(3), 265-273.

Li, H. B., Li, D., Zhang, Y., Gan, R. Y., Song, F. L., & Chen, F. (2010). *Antioxidant properties of Chinese medicinal plants* (pp. 331-362). Sciences Publishers: Enfield, CT, USA.

Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PH, Steinberg SM, Ma J. 2017. Zinc in Wound Healing Modulation. Nutrients 24; 10(1):16.

Liu, X., I. Vogt, T. Haque, and M. Campillos. 2013. "HitPick: A Web Server for Hit Identification and Target Prediction of Chemical Screenings." Bioinformatics 29 (15): 1910–12. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt303.

Liyanage JA, Rodrigo I, Wijeratne M. 2006. Influence of nutritional factors upon the variation of essential metal concentrations on wound healing. Chemical Speciation & Bioavailability 18(2):57-60.

Liyanage, J. A., Rodrigo, I., & Wijeratne, M. (2008). Wound tissue concentration of essential elements and healing of leg ulcers in Sri Lankan patients: is there a link?. *Chemical Speciation & Bioavailability*, *20*(3), 131-136

Luisi, P. L. (2016). *The emergence of life: from chemical origins to synthetic biology*. Cambridge University Press.

Luckett-Chastain, L. R., & Gallucci, R. M. 2009. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor-β expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *British Journal of Dermatology*, *161*(2), 237-248.

Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2006). A comparison of wound healing following treatment with Lavandula x allardii honey or essential oil. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to*

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, *20*(9), 755-757.

Ma, X., Deng, D., & Chen, W. (2017). Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In *Enzyme Inhibitors and Activators*. InTech.

Macomber, R. S. (1988). *NMR spectroscopy: Basic principles and applications* (p. 178). New York: Harcourt Brace Jovanovich.

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, *4*(9), 429.

Majek, P, Zuzana R, Jana S, Jiri S, Alzbeta S, Jan ED. 2010. Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. *Proteome Sci* 8(1): 56.

Majewska, I dan Gendaszeska-Damach E. 2011. Proangigenic activity of plant extracts in accelerating wound healing – a new face of old phytomedicines. *Acta Biochim Pol* 58(4): 449 – 460.

Manggara, A. B., & Shofi, M. (2018). Analisis Kandungan Mineral Daun Kelor (Moringa oleifera Lamk.) Menggunakan Spektrometer XRF (X-Ray Fluorescence). *Akta Kimia Indonesia*, *3*(1), 104-111.Sukirno, S. Murniasih, 'Analisis Unsur Fe, Ca, Ti, Ba, Ce, Zr dan La Dalam Sedimen Laut Di Semenanjung Muria Dengan Metode XRF', Ganendra, XII.1, Januari, 2009, 25– 31.

Martina, RN, Wardhana A. 2013. Mortality analysis of adult burn patients. *Jurnal Plastik Rekonstruksi* 2(2): 96 – 100.

Masarwa, A., & Meyerstein, D. (2009). Radical Reactions with Metal Complexes in Aqueous Solutions. *Inorganic and Bio-Inorganic Chemistry-Volume I*, *6*, 168.

Mason TJ, Lorimer JP. (2002). *Applied Sonochemistry : The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. Verlag: Whiley-VCH.

Mathanker, S., Weckler, P., & Bowser, T. (2013). X-ray applications in food and agriculture: a review. Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers) (Vol. 56).

Mawarsari, Titis. 2015. "Uji aktivitas penyembuhan luka bakar ekstrak etanol umbi talas jepang (*Colocasia esculenta* (L.) Schott var. *antiquorom*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Program Studi Farmasi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

McFarland-Mancini, M. M., Funk H. M., Paluch A. M., Zhou, M.Giridhar P. V., Mercer C. A. & Drew A. F. 2010. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *The journal of immunology*.

Medibena. 2010. QuantiChrom Nitric Oxide Assay Kit (D2NO-100)

Mentari, V, dan Muhartono. 2013. Perbandingan tingkat kesembuhan luka bakar derajat II antara pemberian madu topikal nektar kopi dengan hidrogel pada tikus putih *(Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley. *Medical J* 2(2): 156 – 158.

Mescher, A.L. (2015). Junqueira's Histology Text and Atlas 13th ed. McGraw Hill Lange

Miller, F. A., & Wilkins, C. H. (1952). Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions. *Analytical chemistry*, *24*(8), 1253-1294.

Miryanti, A, Sapei L, Budiono K, Indra S. 2011. *Ekstraksi Antioksidan Dari Kulit Buah manggis* (*Garcinia mangostana* L.). Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Katolik Parahyangan Bandung.

Moenadjat, Yefta. 2009. *Luka Bakar: Masalah dan Tatalaksana.* Balai Penerbit FKUI. Jakarta.

Mori, H. M., Kawanami, H., Kawahata, H., & Aoki, M. (2016). Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF-β in a rat model. *BMC complementary and alternative medicine*, *16*(1), 144.

Morison, MJ. 2004. *Manajemen Luka.* EGC. Jakarta.

Moulin, V. (1995). Growth factors in skin wound healing. *European journal of cell biology*, *68*(1), 1-7.

Nancy, D, Smith FC, Donaldson JH, Mitchell M. 2008. Debridement for surgical wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008(3)

Nasiri, E, Seyed JH, Mohammad A, Seyed AM. 2014. A review of natural products for burn healing based on the Iranian traditional medicine. *J Mazand Univ Med Sci* 23(110): 256 – 273.

Nettina, SM. 2010. *Lippincott Manual of Nursing Practice 10th ed.* Lippincott Williams & Walkins. Philadelphia.

Noer, MS, ID Saputro, DS Perdanakusuma. 2006. *Penanganan Luka Bakar Akut.* Universitas Airlangga Press. Surabaya.

Nugroho, AE. 2010. *Manggis (Garcinia mangostana* L.) *: Dari Kulit Buah Yang Terbuang Hingga Menjadi Kandidat Suatu Obat.* Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Nurchasanah. 2013. *Khasiat Sakti Manggis Tumpas Berbagai Penyakit.* Dunia Sehat. Jakarta.

Ocal, K, Dincer A, Ismail C, Ali U, Candan O, Faik Y, Musa D, Handan C, Suha A. 2004. The effect of *N*-acetylcysteine on oxidative stress in instestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns* 30(8): 778 – 784.

Onoue, Satomi, et al. "Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability." *Journal of pharmaceutical sciences* 99.4 (2010): 1871-1881.

Pardjianto B. 2010. Ringkasan Proses Penyembuhan Luka.

Pathan, A. K., Bond, J., & Gaskin, R. E. (2010). Sample preparation for SEM of plant surfaces. Materials Today, 12, 32–43. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70143-7

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM (2008) Medicinal properties of mangosteen (Garcinia mangostana). Food Chem Toxicol 46: 3227-3239. doi:10.1016/j.fct.2008.07.024. PubMed: 18725264. [PubMed]

Pelkonen, O., Turpeinen, M., & Raunio, H. (2011). In vivo-in vitro-in silico pharmacokinetic modelling in drug development. *Clinical pharmacokinetics*, *50*(8), 483-491.

Pirbalouti, AG, Azizi S, Koohpayeh A. 2012. Healing potential of Iranian traditional medicinal plants on burns wounds in alloxan-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(2): 397 – 403.

Poeloengan, M dan Praptiwi P. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah manggis *(Garcinia mangostana* Linn.). *Media Litbang Kesehatan* 20(2): 65 – 69.

Potter dan Perry. 2005. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan: Konsep, Proses, dan Praktik Edisi 4. Vol. 1.* EGC. Jakarta.

Pradipta, VS, TW Nikodemus dan Y Susilawati. 2007. Isolasi dan identifikasi senyawa golongan xanthone dari kulit buah manggis *(Garcinia mangostana* L.). *PDII-LIPI* : 64 – 77

Prasmita, K. (2012). *Studi Pendahuluan Penentuan Distribusi Ukuran Nano Partikel Logam Menggunakan Mikroelektroda.* Depok: FMIPA UI.

Pratima, N. & Gadikar, R. 2018. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. Arc Org Inorg Chem Sci. 1(1)- 2018. AOICS.MS.ID.000103

Prihatman, K. 2000. *Manggis (Garcinia mangostana* L.) *Sistem Informasi Manajemen Pembangunan di Pedesaan*. BAPPENAS. Jakarta.

Pusat Penelitian Kimia. 2018. SEM (Scanning Electron Microscopy) [Online]. Tersedia: http://kimia.lipi.go.id/pages/view/12/fasilitas

Pusat penelitian Metalurgi dan Material. 2018. X-Ray Difraction. [Online]. Tersedia: http://www.metalurgi.lipi.go.id/fasilitas/xrd-x-ray-diffraction/

Puspitasari, AD. & Proyogo, LS. 2015. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (Muntingia calabura). Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta. ISSN 2528-5912.

Rachmawati, H., Al Shaal, L., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2013). Development of curcumin nanocrystal: physical aspects. *Journal of pharmaceutical sciences*, *102*(1), 204-214.

Rachmawati, H., Budiputra, D. K., & Mauludin, R. (2015). Curcumin nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation. *Drug development and industrial pharmacy*, *41*(4), 560-566.

Rachmawati, H., Edityaningrum, C. A., & Mauludin, R. (2013). Molecular inclusion complex of curcumin–β-cyclodextrin nanoparticle to enhance curcumin skin permeability from hydrophilic matrix gel. *Aaps Pharmscitech*, *14*(4), 1303-1312.

Ramos-Vara, JA. 2005. *"Technical Aspects of Immunohistochemistry".* Vet Pathol 42 (4): 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405. PMID 16006601.

Repertinger, S. K., Campagnaro, E., Fuhrman, J., El-Abaseri, T., Yuspa, S. H., & Hansen, L. A. (2004). EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(5), 982-989.

Rezaeizadeh, H, Alizadeh H, Naseri M, MR Shams A. 2009. The tarditional Iranian medicine point of view on health and disease. *Iranian J Publ Health* 38(1): 169 – 172.

Ritam, R., & Sandeep, L. (2017). Metabolic Screening in Drug Development. Journal of Analytical and Pharmacetical Research. 6(4), 00185

Rock, CL, Newan V, Flatt SW, Faerber S, Wright FA, Pierce JP. 1997. Nutrient intakes from foods and dietary supplements in women at risk for breast cancer recurrence. The Women's healty eating and living study group. *Nutr Cancer* 29(2): 133 – 139.

Rodrigo G. Rosique, Marina J. Rosique, and Jayme A. Farina Junior. 2015. Curbing Inflammation in skin wound healing: A review. International Journal of Inflamation; 1: 1-9

Rohaeti, E. (2009). Karakterisasi biodegradasi polimer. In *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA* (pp. 248-

257).Kroschwitz, J. 1990, Polymer Characterization and Analysis, John Wiley and Sons, Inc., Canada.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Rowan, MP, Leopoldo CC, Eric AE, David MB, Lloyd FR, Shanmugasundaram N, Rodney KC, Robert JC, Kevin KC. 2015. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical care* 19: 243.

Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Annual review of biochemistry*, *57*(1), 375-413.

Sabiston. 1995. *Buku Ajar Bedah*. EGC. Jakarta.

Sattayasai, J., Chaonapan, P., Arkaravichie, T., Soiampornkul, R., Junnu, S., Charoensilp, P. 2013. Protective Effects of Mangosteen Extract on H2O2-Induced Cytotoxicity in SK-N-SH Cells and Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. December 2013 Volume 8 Issue 12 e85053.

Schafer, M, dan Werner S. 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res* 58(2): 165 – 171.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, and Rose-John, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Molecular Cell Research Volume 1813, Issue 5, May 2011, Pages 878-888Schwartz, SI, Shires GT, Spencer FT. 2000. *Principles of Surgery Edisi 6*. EGC. Jakarta.

Schreiber, S. L. (2005). Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nature chemical biology*, *1*(2), 64.

Sen, C. K., Khanna, S., Gordillo, G., Bagchi, D., Bagchi, M., & Roy, S. (2002). Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradiSgm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *957*(1), 239-249.

Seth, D., Mishra, H. N., & Deka, S. C. (2017). Functional and reconstitution properties of spray-dried sweetened yogurt powder as influenced by processing conditions. International Journal of Food Properties, 20(7), 1603–1611. https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1214965

Shabella, R. 2011. *Terapi Kulit Manggis, Dahsyatnya Khasiat Kulit Manggis untuk Menumpas Penyakit.* Galmas Publisher. Klaten.

Sheehan, D.C and Hrapchak, B.B.1987. Theory and Practice of Histotechnology 2nd ed; Battelle Memorial Institute, Columbus

Shen C, Sun L, Zhu N, Qi F. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. 2017. International Journal of Molecular Medicine. 2017. 39 (4):949-959. doi: 10.3892/ijmm.2911

Sherman, A. R., & Barkley, M. (2011). Nutrition and wound healing. Journal of Wound Care, 20(8), 357–367. https://doi.org/10.12968/jowc.2011.20.8.357

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, *359*(6398), 843.

Sidqi, T. (2011). Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Temulawak dengan Metode Ultrasonikasi. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

Silalahi, J, dan Chemayanti S. 2015. Burn wound healing activity of hydrolyzed virgin coconut oil. *PharmTech* 8(1): 67 – 73.

Smallman, R.E. dan Bishop, R.J., (1999). Metalurgi Fisik Modern dan Rekayasa Material. Jakarta: Erlangga Ed. 6.

Smallman, R.E. dan Bishop, R.J., 1999. Metalurgi Fisik Modern dan Rekayasa Material. Jakarta: Erlangga Ed. 6.

Smeltzer, SC dan Bare BG. 2002. *Brunner and Suddarth's textbook of medical-surgical nursing 12th ed.* Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia.

Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.

Soneja, A, Drews M, Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 57: 108 – 119.

Spasojević, I. (2011). Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 48(3), 114–142. https://doi.org/10.3109/10408363.2011.591772

Stoll SW, Rittié L, Johnson JL, Elder JT. 2012. Heparin-binding EGF-like growth factor promotes epithelial-mesenchymal transition in human keratinocytes. J Invest Dermatol 132: 2148-2157.

Sukmaningsih, A. A. S. A., Permana, S., Santjojo, D. J. D. H., Wardoyo, A. Y. P., & Sumitro, S. B. (2018). Investigating Natural Transition Metal Coordination Anthocyanin Complex In Java Plum (Syzygium Cumini) Fruit As Free Radical Scavenging. *Rasayan Journal of Chemistry, 11(3),1193 – 1203*

Suksamrarn, S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of *Garcinia mangostana. Chemical Pharmacology Bulletin* 51: 857 – 859.

Suksamrarn, S, Suwannapoch N, Ratananukul P, Aroonlerk N, Suksamrarn A. 2002. Xanthones from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana. Journal of Natural Products* 65: 761 – 763.

Sumarny, R., Sofiah, S., Nurhidayati, L., & Fatimah, F. (2014). Antioxidant Activity Of Mangosteen (*Garcinia mangostana L.*) Fruit Rind Extract In Oral Solution Dosage Form Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) Secara Bentuk Dosis Larutan Oral. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, *7*(1), 6-12.

Sumitro, S. B., & Alit, S. (2018, March). Herbal medicine, radical scavenger and metal detoxification: bioinorganic, complexity and nano science perspectives. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 130, No. 1, p. 012003). IOP Publishing.

Sumitro, S. B. (2016). Perspektif Nano Science Dalam Ilmu Hayati (The whole is greater and smarter than the sum of the parts). In *Prosiding Seminar Biologi UIN Malang 2016*.

Süntar, I., Akkol, E. K., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2012). Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants?. *Free radicals and antioxidants*, *2*(2), 1-7.

Suriadi. 2004. *Perawatan Luka*. Sagung Seto. Jakarta.

Suttirak, W., & Manurakchinakorn, S. (2014). In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract. *Journal of food science and technology*, *51*(12), 3546-3558.

SwissADME. (2018). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. [Online]. Tersedia: http://www.swissadme.ch/

Szklarczyk, Damian, John H Morris, Helen Cook, Michael Kuhn, Stefan Wyder, Milan Simonovic, Alberto Santos, et al. 2017. "The STRING Database in 2017: Quality-Controlled Protein–protein Association Networks, Made Broadly Accessible." Nucleic Acids Research 45 (D1): D362–68.

Taghavi, M, Mohammad RR, Nosratollah B, Mohammad RZ, Ali K, Morteza A. 2010. Epidemiology of outpatient burns in Tehran: an analysis of 4813 cases. *Burns* 36(1): 109 – 113.

Tang, Q. L., Han, S. S., Feng, J., Di, J. Q., Qin, W. X., Fu, J., & Jiang, Q. Y. (2014). Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF. *Molecular medicine reports*, *9*(4), 1277-1282.

Tarigan, R dan Pemila U. 2007. *Perawatan Luka Moist Wound Healing*. Fakultas Ilmu Keperawatan Universitas Indonesia. Depok.

Tatiya-aphiradee, N., Chatuphonprasert, W. and Jarukamjorn, K., 2016. In vivo antibacterial activity of Garcinia mangostana pericarp extract against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a mouse superficial skin infection model. *Pharmaceutical biology*, *54*(11), pp.2606-2615.

Tewtrakul, S, Chatchai W, Wilawan M. 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 379 – 382.

Thakur, R, Nitika J, Raghvendra P, Sardul SS. 2011. Practices in wound healing studies of plants. *Review Article Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1 – 15

Thompson S W, Springfield I L. 1966. Selected Histochemical and Histopathological Methods, Neuromuscular Clinical Laboratory

Tiyaboonchai W. (2003). Chitosan nanoparticle: A promising system for drug delivery. *Naresuan Univ. J.*, 11(3): 51-66

Tjahjani, S., Widowati, W., Khiong, K., Suhendra, A., & Tjokropranoto, R. (2014). Antioxidant properties of Garcinia mangostana L (mangosteen) rind. *Procedia Chemistry*, *13*, 198-203.

Toropov, AA., Toropova, AP., Muhkhamedzhanova, DV., Gutman, I. 2005. Simplified Molecular input line entry system (SMILES) as ana alternative for constructing quantitative structure-property relationships (QSPR). Indian Journal of Chemistry. Vol. 44A, August 2005. Pp 154-1552

Towsend, CM. 2004. *Wound Healing Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice 17th ed.* Saunders. Philadelphia.

Triyono, B. 2005. *Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar Yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupikain, Suatu Studi Histokimia*. [Doctoral Dissertation] : Universitas Diponegoro.

Venkateswarlu, S., Kumar, B. N., Prasad, C. H., Venkateswarlu, P., & Jyothi, N. V. V. (2014). Bio-inspired green synthesis of Fe3O4 spherical magnetic nanoparticles using Syzygium cumini seed extract. *Physica B: Condensed Matter*, *449*, 67-71.

Verheij, EWM. 1997. *Garcinia mangostana* L. In EWM Verheij dan RE Coronel (Eds). Edible Fruits and Nuts. *Plant Resource of South East Asia*. Bogor.

Vilar, S., & Costanzi, S. (2012). Predicting the biological activities through QSAR analysis and docking-based scoring. In *Membrane Protein Structure and Dynamics* (pp. 271-284). Humana Press, Totowa, NJ.

Vishnu, PV, Malika J, Surapaneni KM, Karthik B, Saraswathi P, Chandra SGVS. 2010. Toxicity study of *Garcinia manostana* Linn. pericarp extract in rats. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1(3): 633 – 637

Vogeser, M., & Seger, C. (2008). A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory—Goals for further developments. *Clinical biochemistry*, *41*(9), 649-662.

Wang, L., Qin, W., Zhou, Y., Chen, B., Zhao, X., Zhao, H. Ning, J. 2017. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Scientific reports*, *7*(1), 991.

Wasiak, J, Cleland H, Campbell F. 2013. Dressing for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 4.

Wenczak, B.A., Lynch, J.B. and Nanney, L.B., 1992. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *The Journal of clinical investigation*, *90*(6), pp.2392-2401.

West, M., Ellis, A. T., Potts, P. J., Streli, C., Vanhoof, C., Wegrzynek, D., & Wobrauschek, P. (2010). Atomic spectrometry update–X-ray fluorescence spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25(10), 1503.

WHO. 2014. *Burns.* Fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheet/fs365/en/ diakses 6 Februari 2017

Widowati, W., Darsono, L., Suherman, J., Fauziah, N., Maesaroh, M., & Erawijantari, P. P. (2016). Anti-inflammatory effect of mangosteen (Garcinia mangostana L.) peel extract and its compounds in LPS-induced RAW264. 7 cells. *Natural Product Sciences*, *22*(3), 147-153.

Widowati, W., Darsono, L., Suherman, J., Yelliantty, Y., & Maesaroh, M. (2014). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis, antioxidant, antiaggregation of mangosteen peel extract (Garcinia mangostana L.). *Int J Biosci Biochem Bioinfo*, *4*(6), 458-66.

Widowati W, Fauziah N, Herdiman H, Afni M, Afifah E, Kusuma HSW, Nufus H, Arumwardana S, Rihibiha DD. Antioxidant and anti aging assays of Oryza

sativa extracts, vanillin and coumaric acid. *J Nat Remed* 2016; 16(3): 88-99.

Widowati W, Rani AP, Hamzah RA, Arumwardana S, Afifah E, Kusuma HSW, Rihibiha DD, Nufus H, Amalia A. Antioxidant and antiaging assays of *Hibiscus sabdariffa* extract and its compounds. *Nat Prod Sci* 2018; 23(3): 192-200

Widowati W, Janeva WB, Nadya S, Amalia A, Arumwardana S, Kusuma HSW, Arinta Y. Antioxidant and Antiaging Activities of Jasminum Sambac Extract, and its Compounds, 2018. J Reports Pharmaceutic Sci 2018; 7(3):270-285

Wijaya, A. 2011. Pengaruh ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap penurunan jumlah *foam cell* pada aorta tikus (*Rattus novergicus)* model aterogenik. *Jurnal ilmiah Malang Program Studi Pendidikan Dokter FKUB.*

Wright, Josephine A., Toby Richards, and Surjit KS Srai. "The role of iron in the skin and cutaneous wound healing." *Frontiers in pharmacology* 5 (2014): 156.

Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J., and Fu S. (2005). Chitosan nanoparticle as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. International Journal of Pharmaceutics. 295: 235-245.

Wulan, A.J. 2015. Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) sebagai Alternatif Pelindung Memori. Prosiding Seminar Presentasi Artikel Ilmiah Dies Natalis FK Unila ke 13 | Bandar Lampung, Oktober 2015 | 58-63

Xiao J W, Han G, Philip Owens, Siddiquil Y, Li A G. 2006. Role of TGFb-Mediated Inflammation in Cutaneous Wound Healing. Journal of Investigative Dermatology Symposium; 11, 112-117.

Xiong, J. (2006). *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press.

Xu K and Yu FS. 2011. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 52: 3301-3308.

Xue, Z. Q., Zeng, G., Qi, Y. W., & Gao, Z. W. 2017. Implications of the epidermal growth factor on burn skin wound repair. An in vitro and in vivo study. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 10(2), 2648-2653.

Yagi, S., Rahman, A. E. A., ELhassan, G. O., & Mohammed, A. M. (2013). Elemental analysis of ten sudanese medicinal plants using X-ray fluorescence. *Journal of Applied and Industrial Sciences*, *1*(1), 49-53.

Yamakuni, T, Aoki K, Nakatani K, Kondo N, Oku H, Ishiguro K, Ohizumi Y. 2006. Garcinone B reduces prostaglandin E2 release and NF-kappaB-mediated transcription in C6 rat glioma cells. *Neurosci Lett* 394(3): 206 – 210

Yatman, E. 2012. Kulit Buah Manggis Mengandung Xanton yang Berkhasiat Tinggi. *Widya* 29(34): 2 – 9

Yu, L, Mouming Z, Bao Y, Weidong B. 2009. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from *Garcinia mangostana* fruit pericarp. *Food Chemistry* 166: 969 – 973.

Yunitasari, L. 2011. *Gempur 41 Penyakit dengan Buah Manggis*. Pustaka Baru Press. Yogyakarta.

Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczk, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana). Food Chemistry, 112(3), 685–689.

Zende, P., Pujari, K. And Jadkar, S., Antioxidants And Trace Elements In Burns. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(1)

Zi-Qi L, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T. 2003. Naofumi Mukaida Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healin process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. Journal of Leukocyte Biology,73:713-720.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1
Hasil Ananlisis Senyawa Xanthone dalam EKM

Tabel Analisis senyawa garcinon pada sampel no. 1-6

No	Nama Sampel	Berat Sampel (g)	Area	KONS. TKR (µg/ml)	F. P (ml)	Berat (µg) Garcinon E	KONS. THT (mg/g)
1	Sampel No.1 Cairan – 1	0.0086	5,268,966.45	8.69	5.04	43.81	5.09
	Sampel No.1 Cairan – 2	0.0086	5,664,939.39	9.34	5.04	47.09	5.48
2	Sampel No.1 Padatan - 1	0.0113	1,793,757.06	2.97	525.24	1,562.29	138.26
	Sampel No.1 Padatan - 2	0.0113	1,817,298.16	3.01	525.24	1,582.63	140.06
3	Sampel No.2 Cairan – 1	0.0093	975,675.47	1.63	5.04	8.21	0.88
	Sampel No.2 Cairan – 2	0.0093	930,906.00	1.56	5.04	7.84	0.84
4	Sampel No.2 Padatan - 1	0.0086	739,545.51	1.24	527.03	53.67	76.01
	Sampel No.2 Padatan - 2	0.0086	789,502.31	1.32	527.03	96.99	81.04
5	Sampel No.3 Cairan – 1	0.0094	1,836,838.41	3.05	4.42	13.45	1.43
	Sampel No.3 Cairan – 2	0.0094	1,871,026.86	3.10	4.42	13.69	1.46
6	Sampel No.3 Padatan - 1	0.0157	2,091,417.58	3.46	533.95	1,849.66	117.81
	Sampel No.3 Padatan - 2	0.0157	2,008,791.47	3.33	533.95	1,777.09	113.19
7	Sampel No.4 Cairan – 1	0.0085	1,037,154.10	1.73	5.04	8.72	1.03
	Sampel No.4 Cairan – 2	0.0085	1,050,265.46	1.75	5.04	8.83	1.04
8	Sampel No.4 Padatan - 1	0.0091	2,263,300.67	3.75	513.55	1,924.19	211.45
	Sampel No.4 Padatan - 2	0.0091	2,221,488.63	3.68	513.55	1,888.86	207.57
9	Sampel No.5 Cairan – 1	0.0082	5,802,115.83	9.57	5.02	48.06	5.86
	Sampel No.5 Cairan – 2	0.0082	5,749,860.62	9.48	5.02	47.63	5.81
10	Sampel No.5 Padatan - 1	0.0101	1,010,985.38	1.69	533.84	900.49	89.16
	Sampel No.5 Padatan - 2	0.0101	1,017,198.93	1.70	533.84	905.94	89.70
11	Sampel No.6 Cairan – 1	0.0087	730,131.61	1.22	5.02	6.15	0.71
	Sampel No.6 Cairan – 2	0.0087	725,254.92	1.22	5.02	6.11	0.70
12	Sampel No.6 (1) Padatan – 1	0.0078	684,175.59	1.15	541.29	622.05	79.75
	Sampel No.6 (1) Padatan – 2	0.0078	656,693.09	1.10	541.15	597.43	76.59
13	Sampel No.6 (3) Padatan – 1	0.0030	2553720	4.22	50.99	215.40	71.80
	Sampel No.6 (3) Padatan – 2	0.0030	2473634	4.09	50.99	208.69	69.56

Tabel Analisis senyawa gamma-mangostin pada sampel no.1-6

No	Nama Sampel	Berat Sampel (g)	Area)	KONS. TKR (µg/ml)	F. P (ml)	Berat (µg) Gamma_M	KONS. THT (mg/g)
1	Sampel No.1 Cairan – 1	0.0086	8,908,617.28	4.12	5.04	20.74	2.41
	Sampel No.1 Cairan – 2	0.0086	9,860,429.25	4.59	5.04	23.14	2.69
2	Sampel No.1 Padatan – 1	0.0113	1,491,174.20	0.41	525.24	213.49	18.89
	Sampel No.1 Padatan – 2	0.0113	1,497,766.95	0.41	525.24	215.22	19.05
3	Sampel No.2 Cairan - 1	0.0093	1,481,767.84	0.40	5.04	2.02	0.22
	Sampel No.2 Cairan - 2	0.0093	1,458,421.00	0.39	5.04	1.97	0.21
4	Sampel No.2 Padatan - 1	0.0086	709,049.45	0.02	527.03	8.12	0.94
	Sampel No.2 Padatan - 2	0.0086	709,049.45	0.02	527.03	8.12	0.94
5	Sampel No.3 Cairan - 1	0.0094	6,253,400.41	2.79	4.42	12.31	1.31
	Sampel No.3 Cairan - 2	0.0094	6,310,614.12	2.82	4.42	12.43	1.32
6	Sampel No.3 Padatan - 1	0.0157	3,414,384.44	1.37	533.95	730.49	46.53
	Sampel No.3 Padatan - 2	0.0157	3,636,416.94	1.48	533.95	789.76	50.30
7	Sampel No.4 Cairan - 1	0.0085	3,787,715.34	1.55	5.04	7.84	0.92
	Sampel No.4 Cairan - 2	0.0085	3,823,834.81	1.57	5.04	7.93	0.93
8	Sampel No.4 Padatan - 1	0.0091	3,061,715.80	1.19	513.55	612.02	67.25
	Sampel No.4 Padatan - 2	0.0091	2,981,958.27	1.15	513.55	591.54	65.00
9	Sampel No.5 Cairan - 1	0.0082	8,437,990.68	3.88	5.02	19.49	2.38
	Sampel No.5 Cairan - 2	0.0082	8,480,486.64	3.90	5.02	19.59	2.39
10	Sampel No.5 Padatan - 1	0.0101	799,605.39	0.06	533.84	32.39	3.21
	Sampel No.5 Padatan - 2	0.0101	798,840.21	0.06	533.84	32.19	3.19
11	Sampel No.6 Cairan - 1	0.0087	3,099,970.74	1.21	5.02	6.08	0.70
	Sampel No.6 Cairan - 2	0.0087	3,017,252.28	1.17	5.02	5.87	0.68
12	Sampel No.6 (1) Padatan - 1	0.0078	935,416.53	0.13	541.29	69.60	8.92
	Sampel No.6 (1) Padatan - 2	0.0078	990,774.31	0.16	541.15	84.56	10.84
13	Sampel No.6 (3) Padatan - 1	0.0030	2896571	1.11	50.99	56.55	18.85
	Sampel No.6 (3) Padatan - 2	0.0030	2738552	1.03	50.99	52.53	17.51

Tabel Analisis senyawa gartanin pada sampel no.1-6

No	Nama Sampel	Berat Sampel (g)	Area)	KONS. TKR (µg/ml)	F. P (ml)	Berat (µg) Gartanin	KONS. THT (mg/g)
1	Sampel No.1 Cairan - 1	0.0086	952045.613	1.46	5.04	7.37	0.86
	Sampel No.1 Cairan - 2	0.0086	1027787.569	1.56	5.04	7.88	0.92
2	Sampel No.1 Padatan - 1	0.0113	528101.930	0.90	525.24	475.28	42.06
	Sampel No.1 Padatan - 2	0.0113	562029.370	0.95	525.24	498.73	44.14
3	Sampel No.2 Cairan - 1	0.0093	153409.196	0.41	5.04	2.08	0.22
	Sampel No.2 Cairan - 2	0.0093	143588.145	0.40	5.04	2.01	0.22
4	Sampel No.2 Padatan - 1	0.0086	119190.180	0.37	527.03	193.33	22.48
	Sampel No.2 Padatan - 2	0.0086	118245.734	0.37	527.03	192.68	22.40
5	Sampel No.3 Cairan - 1	0.0094	326081.052	0.64	4.42	2.82	0.30
	Sampel No.3 Cairan - 2	0.0094	319468.975	0.63	4.42	2.78	0.30
6	Sampel No.3 Padatan - 1	0.0157	508360.305	0.88	533.95	469.30	29.89
	Sampel No.3 Padatan - 2	0.0157	490334.381	0.86	533.95	456.64	29.09
7	Sampel No.4 Cairan - 1	0.0085	151144.123	0.41	5.04	2.06	0.24
	Sampel No.4 Cairan - 2	0.0085	151482.818	0.41	5.04	2.06	0.24
8	Sampel No.4 Padatan - 1	0.0091	539108.088	0.92	513.55	472.15	51.88
	Sampel No.4 Padatan - 2	0.0091	518096.361	0.89	513.55	457.95	50.32
9	Sampel No.5 Cairan - 1	0.0082	518313.144	0.89	5.02	4.48	0.55
	Sampel No.5 Cairan - 2	0.0082	508332.883	0.88	5.02	4.41	0.54
10	Sampel No.5 Padatan - 1	0.0101	174273.731	0.44	533.84	234.52	23.22
	Sampel No.5 Padatan - 2	0.0101	175315.207	0.44	533.84	235.25	23.29
11	Sampel No.6 Cairan - 1	0.0087	132537.850	0.38	5.02	1.93	0.22
	Sampel No.6 Cairan - 2	0.0087	131379.775	0.38	5.02	1.92	0.22
12	Sampel No.6 (1) Padatan - 1	0.0078	178622.183	0.45	541.29	240.89	30.88
	Sampel No.6 (1) Padatan - 2	0.0078	179253.601	0.45	541.15	241.28	30.93
13	Sampel No.6 (3) Padatan - 1	0.0030	30849	0.07	50.99	3.80	1.27
	Sampel No.6 (3) Padatan - 2	0.0030	32228	0.08	50.99	3.91	1.30

Tabel Analisis senyawa gartanin pada sampel no.1-6

No	Nama Sampel	Berat Sampel (g)	Area)	KONS. TKR (µg/ml)	F. P (ml)	Berat (µg) 1456	KONS. THT (mg/g)
1	Sampel No.1 Cairan - 1	0.0086	288,753.53	0.57	5.04	2.88	0.34
	Sampel No.1 Cairan - 2	0.0086	304,262.15	0.60	5.04	3.04	0.35
2	Sampel No.1 Padatan - 1	0.0113	26,109.89	0.05	525.24	27.16	2.40
	Sampel No.1 Padatan - 2	0.0113	25,251.37	0.05	525.24	26.26	2.32
3	Sampel No.2 Cairan - 1	0.0093	56,903.07	0.11	5.04	0.57	0.06
	Sampel No.2 Cairan - 2	0.0093	57,147.99	0.11	5.04	0.57	0.06
4	Sampel No.2 Padatan - 1	0.0086	12,261.19	0.02	527.03	12.80	1.49
	Sampel No.2 Padatan - 2	0.0086	12,202.78	0.02	527.03	12.74	1.48
5	Sampel No.3 Cairan - 1	0.0094	175,394.80	0.35	4.42	1.53	0.16
	Sampel No.3 Cairan - 2	0.0094	172,436.10	0.34	4.42	1.51	0.16
6	Sampel No.3 Padatan - 1	0.0157	64,881.91	0.13	533.95	68.60	4.37
	Sampel No.3 Padatan - 2	0.0157	66,430.29	0.13	533.95	70.24	4.47
7	Sampel No.4 Cairan - 1	0.0085	114,434.88	0.23	5.04	1.14	0.13
	Sampel No.4 Cairan - 2	0.0085	114,676.36	0.23	5.04	1.14	0.13
8	Sampel No.4 Padatan - 1	0.0091	52,263.13	0.10	513.55	53.15	5.84
	Sampel No.4 Padatan - 2	0.0091	54,551.75	0.11	513.55	55.48	6.10
9	Sampel No.5 Cairan - 1	0.0082	293,564.81	0.58	5.02	2.92	0.36
	Sampel No.5 Cairan - 2	0.0082	285,805.71	0.57	5.02	2.84	0.35
10	Sampel No.5 Padatan - 1	0.0101	16,756.38	0.03	533.84	17.71	1.75
	Sampel No.5 Padatan - 2	0.0101	13,511.77	0.03	533.84	14.28	1.41
11	Sampel No.6 Cairan - 1	0.0087	119,759.30	0.24	5.02	1.19	0.14
	Sampel No.6 Cairan - 2	0.0087	120,058.00	0.24	5.02	1.19	0.14
12	Sampel No.6 (1) Padatan - 1	0.0078	23,249.01	0.05	541.29	24.92	3.19
	Sampel No.6 (1) Padatan - 2	0.0078	22,982.81	0.05	541.15	24.63	3.16
13	Sampel No.6 (3) Padatan - 1	0.0030	79820	0.16	50.99	7.91	2.64
	Sampel No.6 (3) Padatan - 2	0.0030	68629	0.14	50.99	6.97	2.32

Tabel Respon ratio senyawa gamma mangostin terhadap alpha mangostin, beta-mangostin dan 8-deoxygartanin

No	Nama Sampel	Respon Ratio alpha-mangostin	Respon Ratio beta-mangostin	Respon Ratio 8-deoxygartanin
1	Sampel No.1 Cairan - 1	16,212,182.33	286,727.83	849,891.72
	Sampel No.1 Cairan - 2	17,501,687.29	311,630.69	963,118.73
2	Sampel No.1 Padatan - 1	6,486,305.16	237,166.28	264,725.19
	Sampel No.1 Padatan - 2	6,619,318.53	235,511.92	262,671.37
3	Sampel No.2 Cairan - 1	2,011,602.28	48,238.35	82,676.21
	Sampel No.2 Cairan - 2	2,040,988.70	48,670.51	79,787.22
4	Sampel No.2 Padatan - 1	3,275,865.28	102,445.40	56,369.64
	Sampel No.2 Padatan - 2	3,480,144.43	112,277.03	56,679.07
5	Sampel No.3 Cairan - 1	5,825,243.75	36,463.33	545,140.14
	Sampel No.3 Cairan - 2	5,889,242.32	36,054.20	552,687.93
6	Sampel No.3 Padatan - 1	10,999,561.75	273,769.12	562,854.21
	Sampel No.3 Padatan - 2	10,765,282.62	262,596.00	565,318.35
7	Sampel No.4 Cairan - 1	3,987,408.87	18,461.58	151,715.45
	Sampel No.4 Cairan - 2	3,986,733.36	18,582.91	154,748.32
8	Sampel No.4 Padatan - 1	11,190,113.46	243,333.58	287,828.09
	Sampel No.4 Padatan - 2	11,068,128.45	221,311.05	260,521.14
9	Sampel No.5 Cairan - 1	10,686,159.92	113,387.55	541,284.86
	Sampel No.5 Cairan - 2	10,872,983.71	112,631.76	518,797.27
10	Sampel No.5 Padatan - 1	4,845,454.00	144,975.53	86,629.65
	Sampel No.5 Padatan - 2	4,840,259.81	141,073.18	84,766.61
11	Sampel No.6 Cairan - 1	3,219,192.36	21,989.37	167,323.00
	Sampel No.6 Cairan - 2	3,204,596.03	22,400.74	165,212.98
12	Sampel No.6 (1) Padatan - 1	4,755,698.13	101,158.57	126,197.27
	Sampel No.6 (1) Padatan - 2	4,674,789.89	100,511.89	126,842.05
13	Sampel No.6 (3) Padatan - 1	11,781,295.78	403,557.17	522,501.31
	Sampel No.6 (3) Padatan - 2	11,860,926.92	415,011.05	497,703.59

Tabel Analisis Kuantitatif senyawa xanthon dalam ekstrak simplisia kulit manggis

No	Nama Sampel	Kadar (mg/ g)						
		g-mangostin	garcinon-E	gartanin	smeathxanthone A	alfa-mangostin	beta-mangostin	8-deoxygartanin
1	Sampel No.1 Cairan	2.41	5.09	0.86	0.34	4.39	0.08	0.77
		2.69	5.48	0.92	0.35	4.78	0.09	0.86
2	Sampel No.1 Padatan	18.89	138.26	42.06	2.40	82.18	3.00	21.08
		19.05	140.06	44.14	2.32	84.17	2.99	20.63
3	Sampel No.2 Cairan	0.92	1.03	0.24	0.13	0.97	0.00	0.24
		0.93	1.04	0.24	0.13	0.97	0.00	0.25
4	Sampel No.2 Padatan	67.25	211.45	51.88	5.84	245.81	5.35	27.70
		65.00	207.57	50.32	6.10	241.28	4.82	25.31
5	Sampel No.3 Cairan	2.38	5.86	0.55	0.36	3.01	0.03	0.57
		2.39	5.81	0.54	0.35	3.06	0.03	0.55
6	Sampel No.3 Padatan	3.21	89.16	23.22	1.75	19.44	0.58	11.54
		3.19	89.70	23.29	1.41	19.31	0.56	11.26
7	Sampel No.4 Cairan	0.22	0.88	0.22	0.06	0.30	0.01	0.12
		0.21	0.84	0.22	0.06	0.30	0.01	0.12
8	Sampel No.4 Padatan	0.94	76.01	22.48	1.49	4.36	0.14	10.63
		0.94	81.04	22.40	1.48	4.63	0.15	10.74
9	Sampel No.5 Cairan	0.70	0.71	0.22	0.14	0.73	0.005	0.28
		0.68	0.70	0.22	0.14	0.72	0.005	0.28
10	Sampel No.5 Padatan	8.92	79.75	0.22	0.14	45.37	0.96	0.16
		10.84	76.59	0.22	0.14	51.15	1.10	0.16
11	Sampel No.6 (1) Cairan	1.31	1.43	0.30	0.16	1.22	0.01	0.50
		1.32	1.46	0.30	0.16	1.23	0.01	0.51
12	Sampel No.6 (1) Padatan	46.53	117.81	29.89	4.37	149.89	3.73	33.10
		50.30	113.19	29.09	4.47	148.92	3.63	33.53
13	Sampel No.6(3) Padatan	18.85	71.80	1.27	2.64	76.67	2.63	21.45
		17.51	69.56	1.30	2.32	75.83	2.65	20.15

Lampiran 2

Data Ekstraksi Kulit Manggis

Tabel Hasil evaporasi ekstrak etanol kulit buah manggis

Simplisia No	Berat Simplisia Kulit Manggis	Jumlah Simplisia yang Ditimbang	Bobot Ekstrak etanol Kulit Manggis	Bobot Ekstrak Dalam Vial
1	1750 g	700 g	187,92 g	4,61 g
2	1350 g	700 g	89, 28 g	3,85 g
3	2050 g	700 g	119,95 g	3,95 g
4	700 g	700 g	183,12 g	4,26 g
5	900 g	700 g	106,59 g	4,51 g
6	1000 g	700 g	179,35 g	4,63 g
		200 g	68,38 g	

Tabel Simplisia ekstrak kulit manggis 700 g

Simplisia No	Berat Simplisia	Berat Ekstrak	Rendemen
1	700 g	17,4319 g	2,49 %
2	700 g	22,3406 g	3,19 %
3	700 g	45,7124 g	6,53 %
4	700 g	41,3437 g	5,98 %
5	700 g	38,0726 g	5,43 %
6 (1)	700 g	12,1101 g	1,73 %
6 (2)	200 g	38,3198 g	19,1 %

Tabel Ekstrak cairan hasil maserasi kulit manggis kode 6 (3) sebanyak 965 g

Replikasi	Berat Simplisia	Berat Ekstrak	Rendemen
1	965 g	255,19 g	26,44 %
2	965 g	274,63 g	28,45 %
3	965 g	181,85 g	18,84 %

Tabel Ekstrak pati (padatan) dari hasil maserasi ekstrak kulit manggis kode 6 (3) dengan bobot simplisia 965 g

Replikasi	Berat Pati
1	54,24 g
2	60,29 g
3	72,89 g

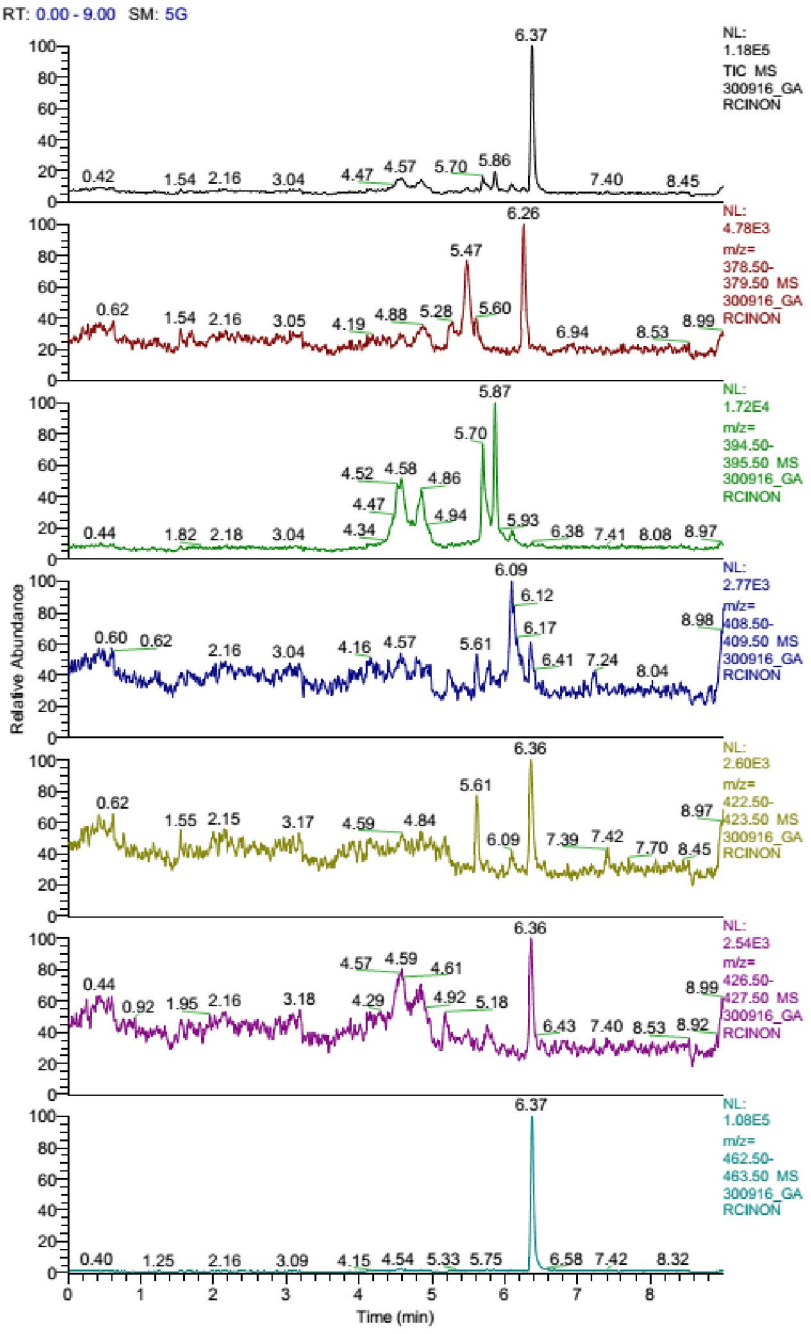
Tabel Rendemen ekstrak cairan dan padatan Pati Kulit Manggis kode 6 (3) dengan bobot simplisia 965 g

Replikasi	Berat Simplisia	Berat Ekstrak	Rendemen
1	965 g	309.43 g	32.06 %
2	965 g	334.92 g	34.70 %
3	965 g	254.74 g	26.39 %

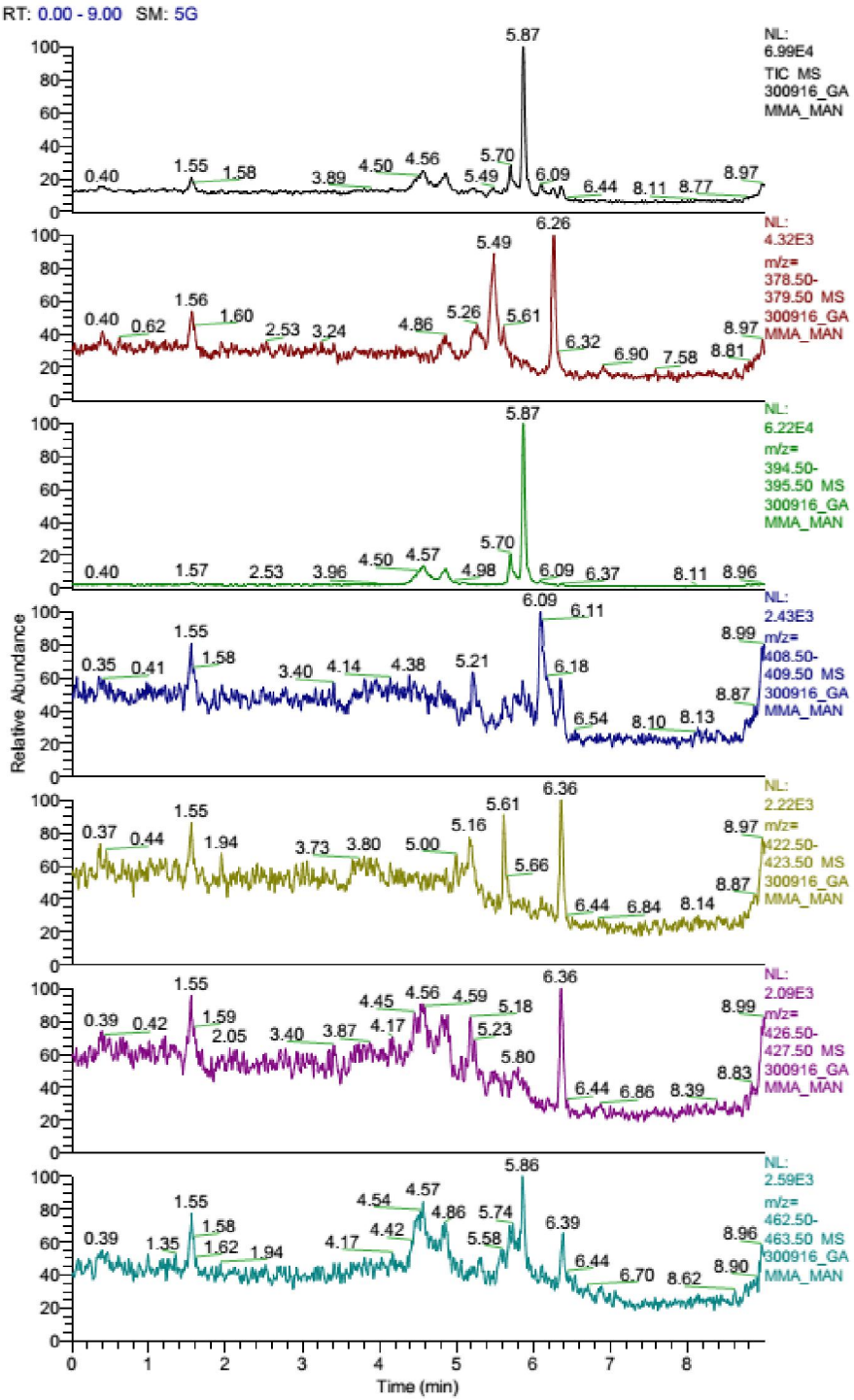
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

Lampiran 3

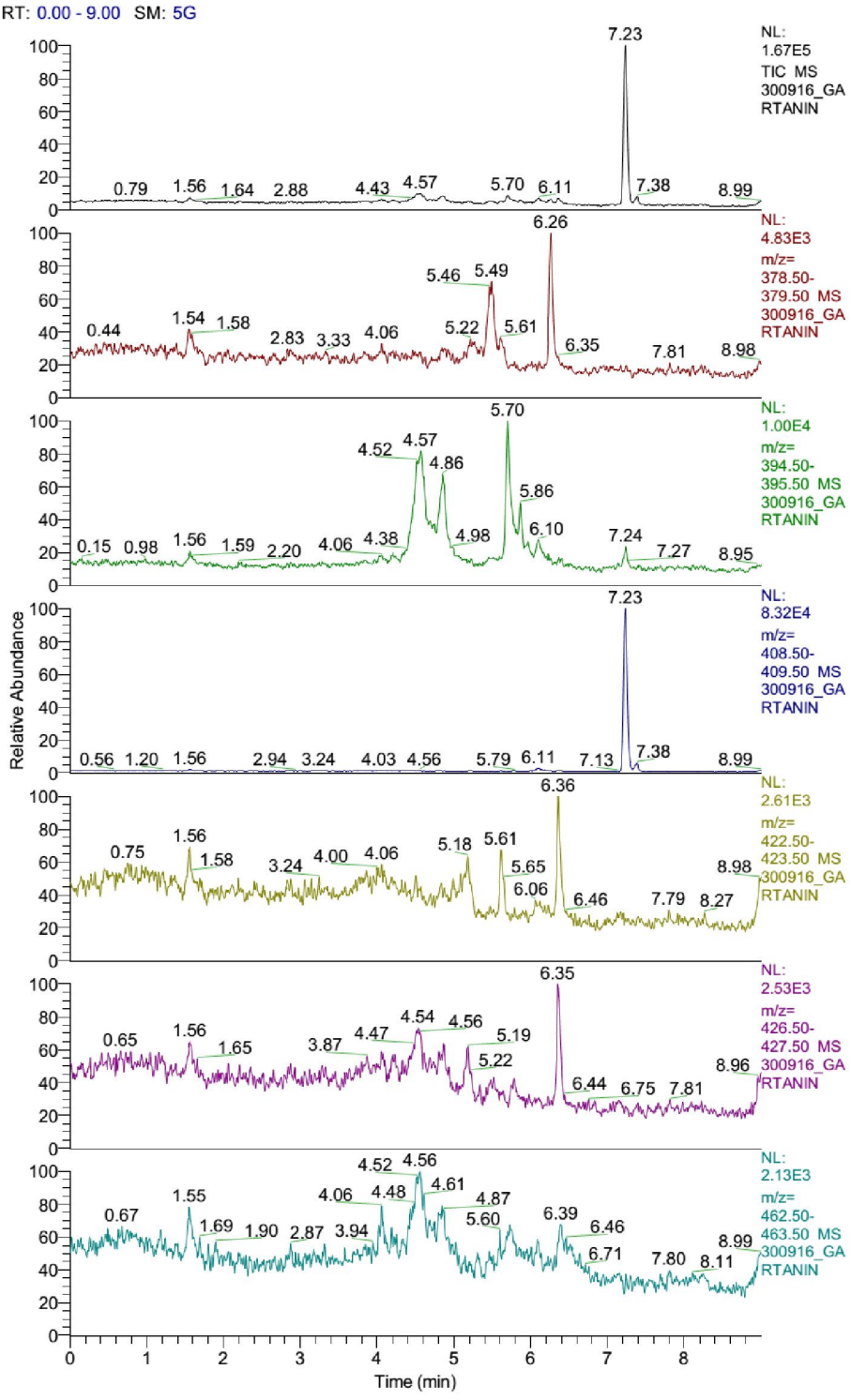
Analisis LC-MS Kulit Manggis



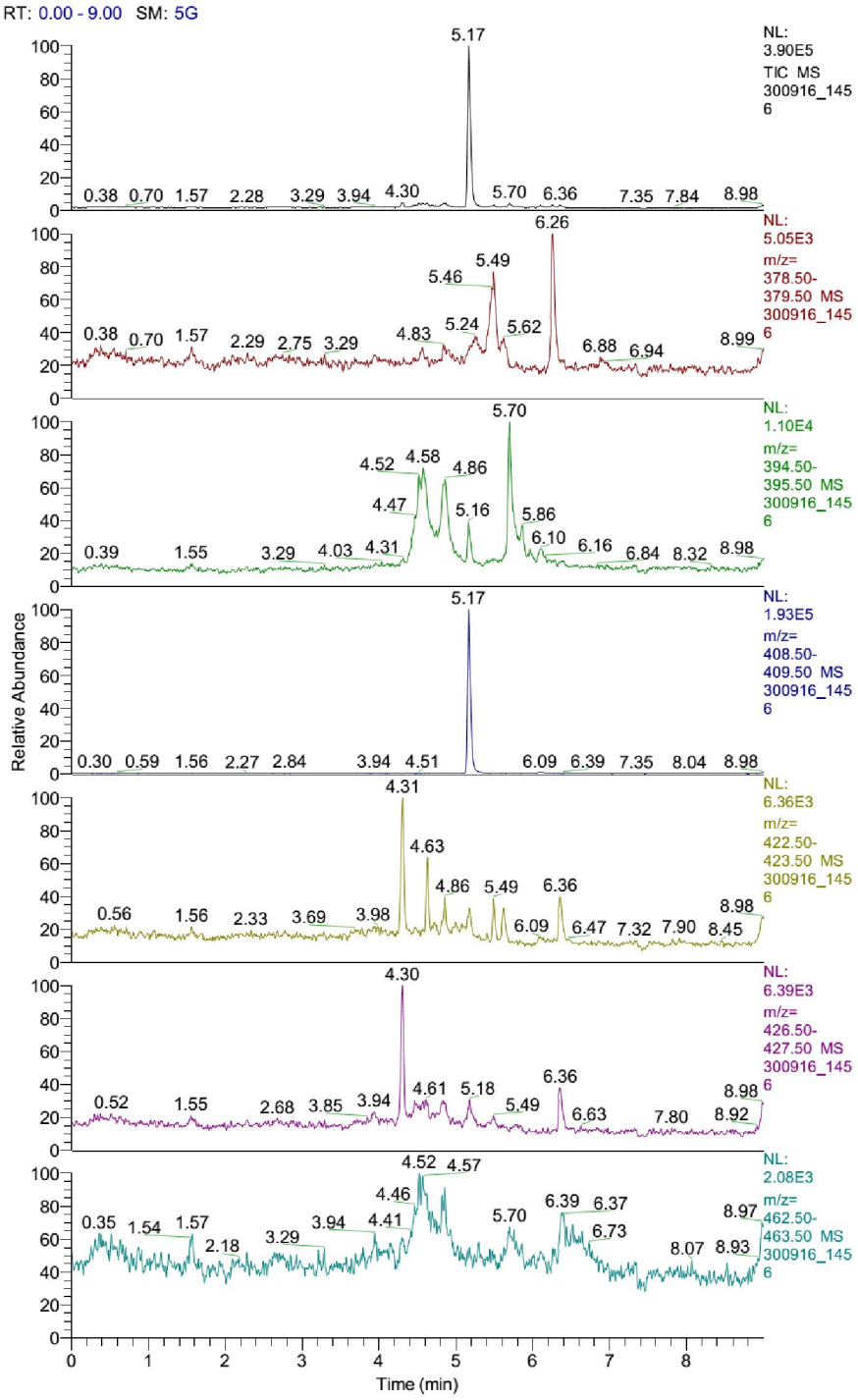
Gambar 1. Analisis kualitatif senyawa standar Garcinon-E



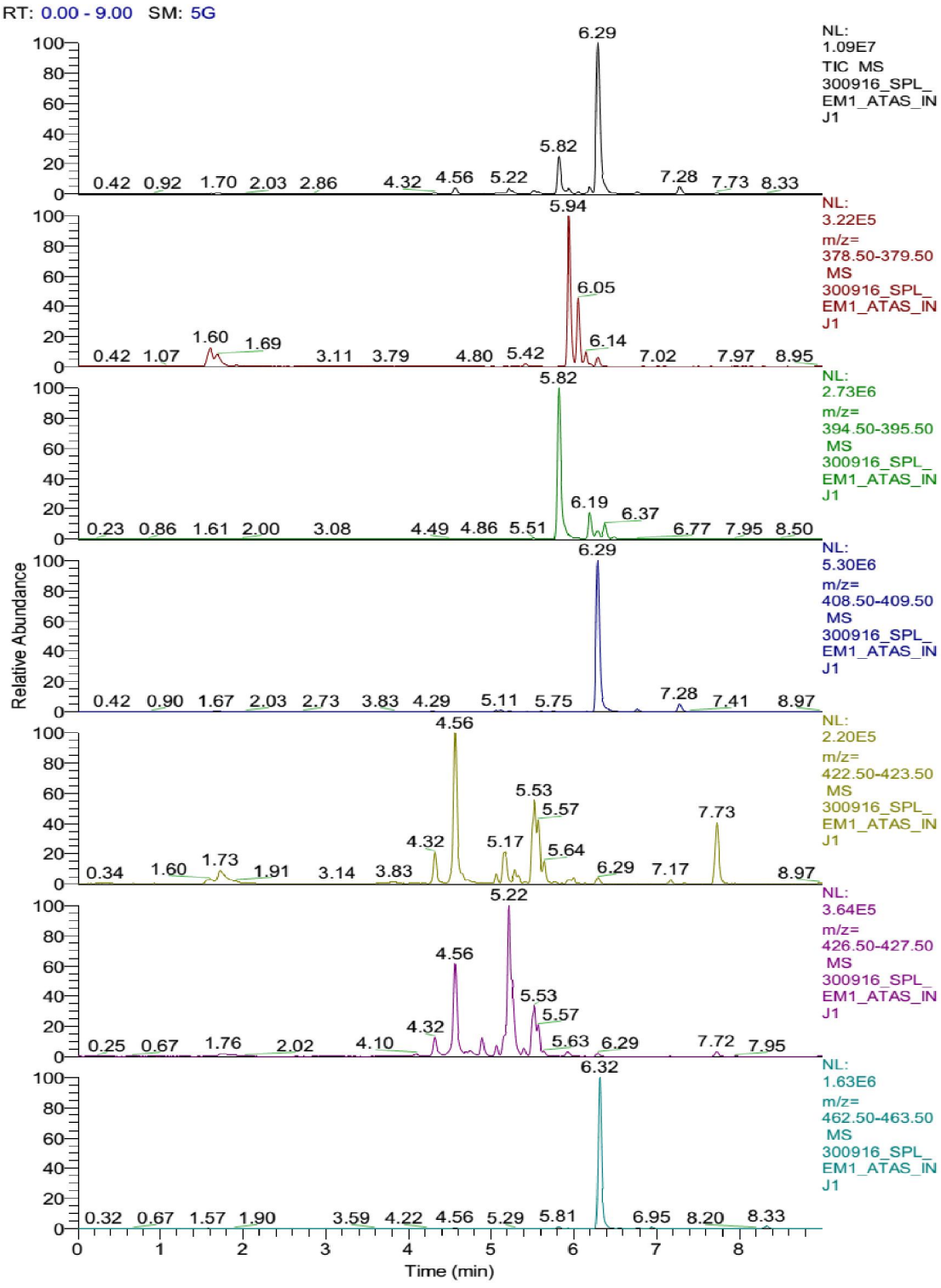
Gambar 2. Analisis kualitatif senyawa standar Gamma-mangostin



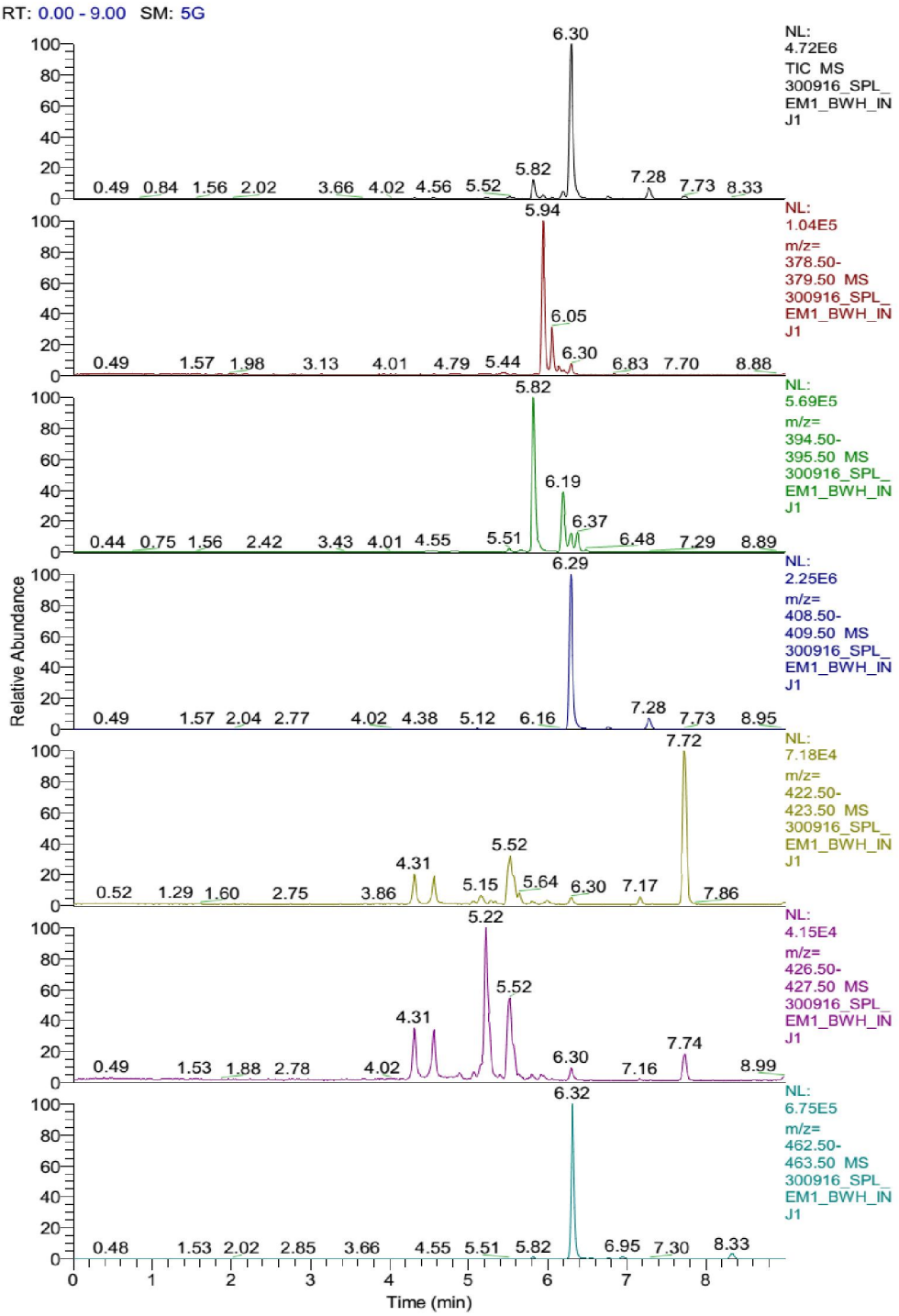
Gambar 3. Analisis kualitatif senyawa standar gartanin



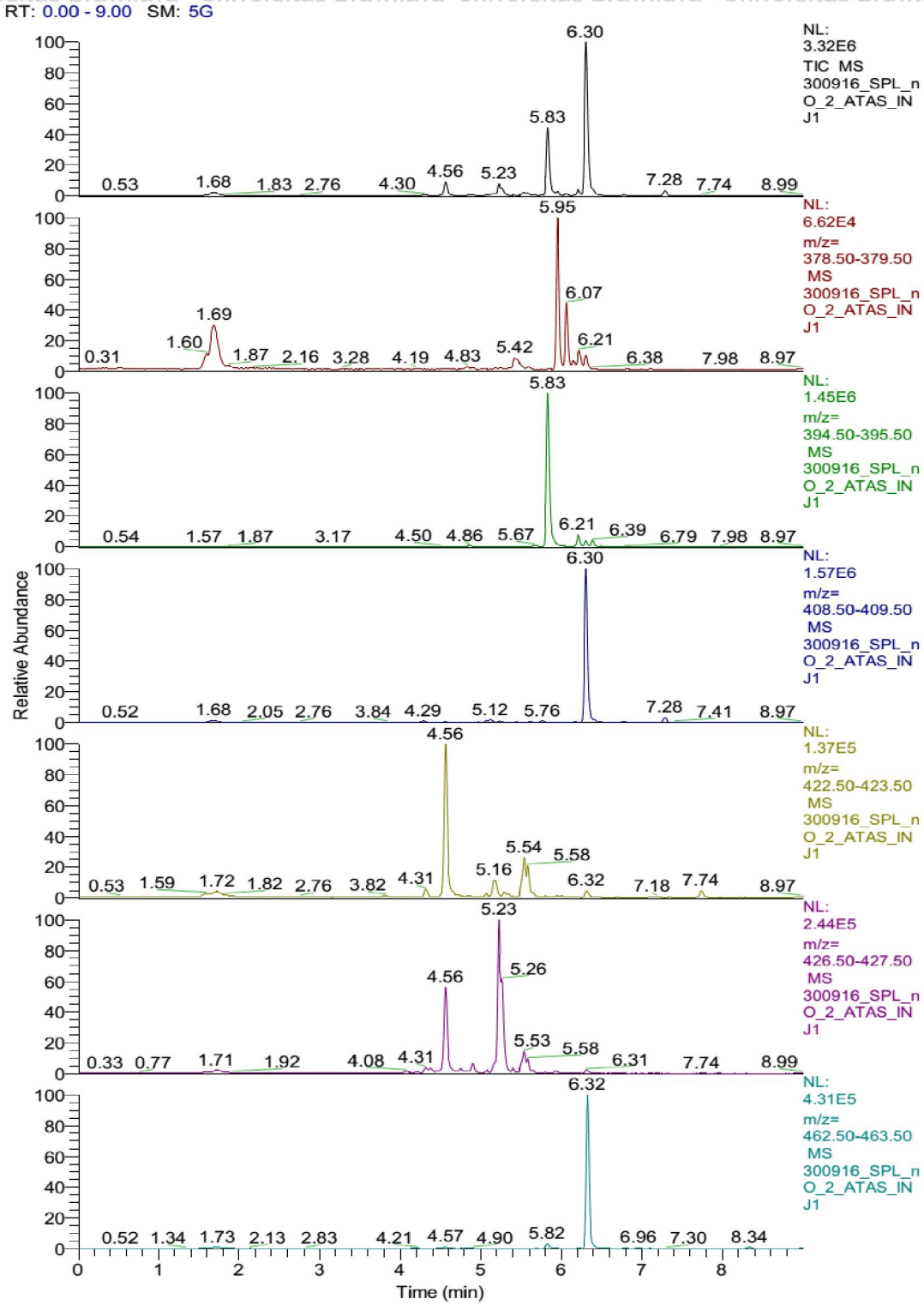
Gambar 4. Analisis kualitatif senyawa standar smeaxthxanthone



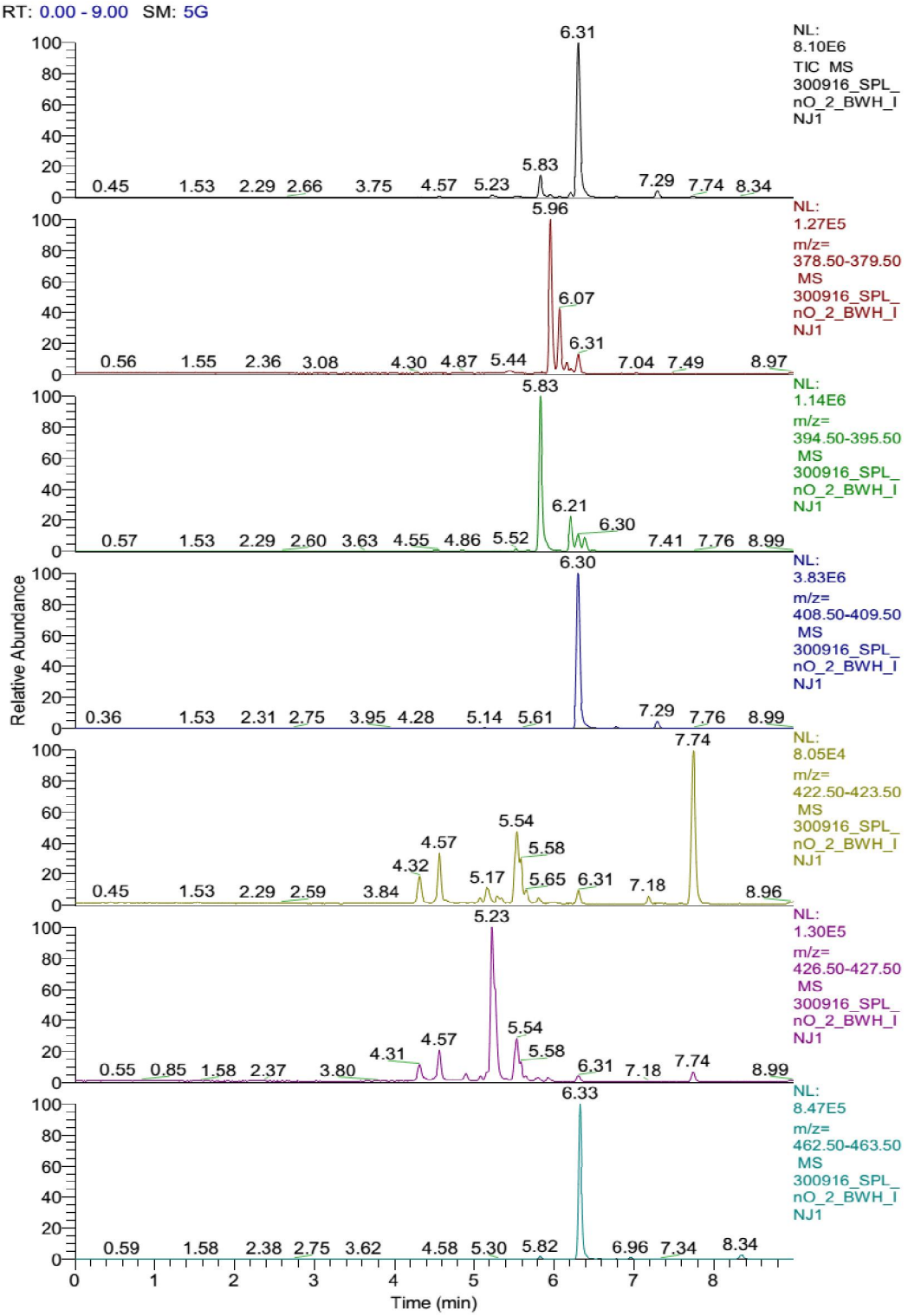
Gambar 5. Analsis kualitatif sampel no.1 cairan



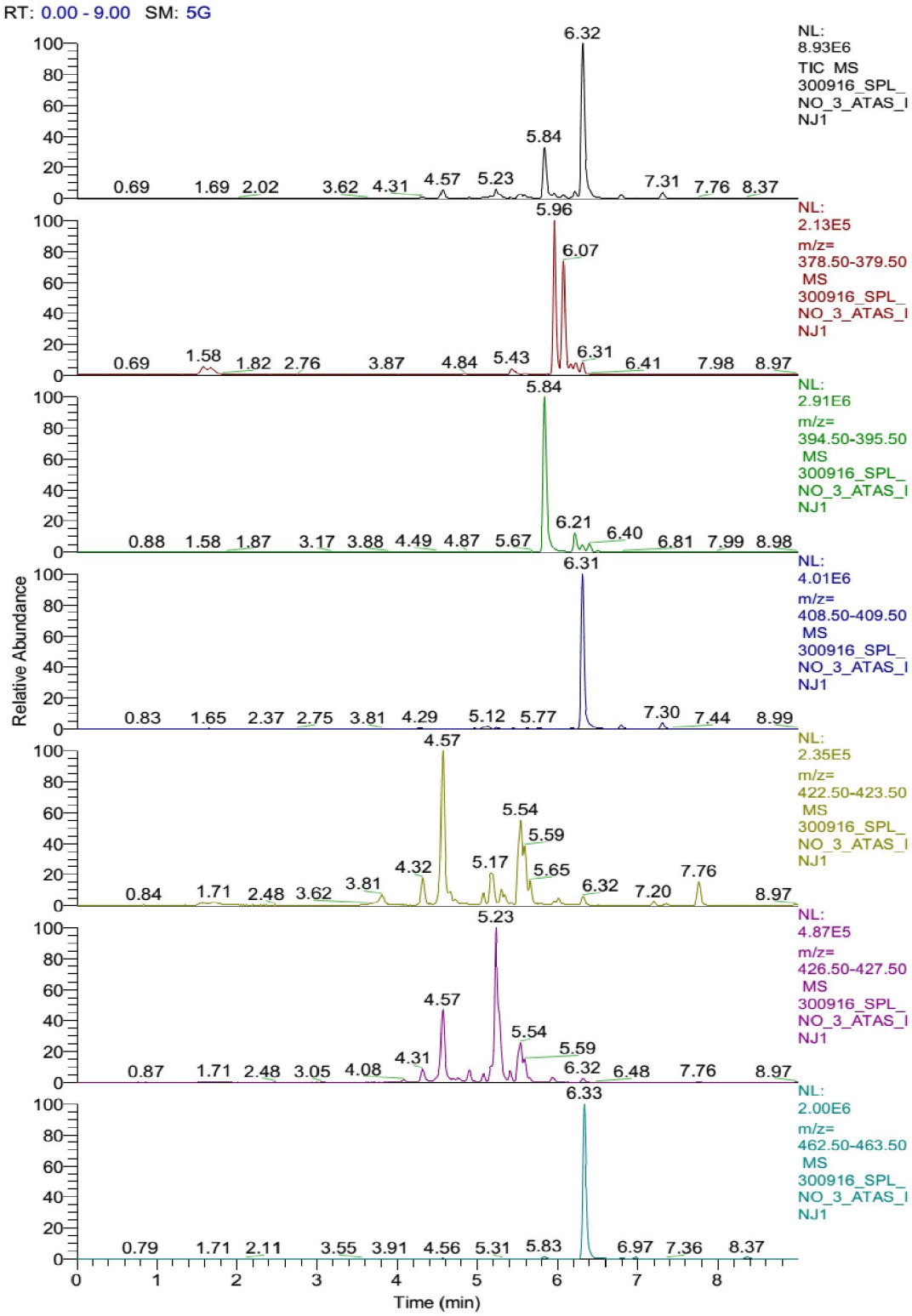
Gambar 6. Analisis kualitatif sampel no1 padatan



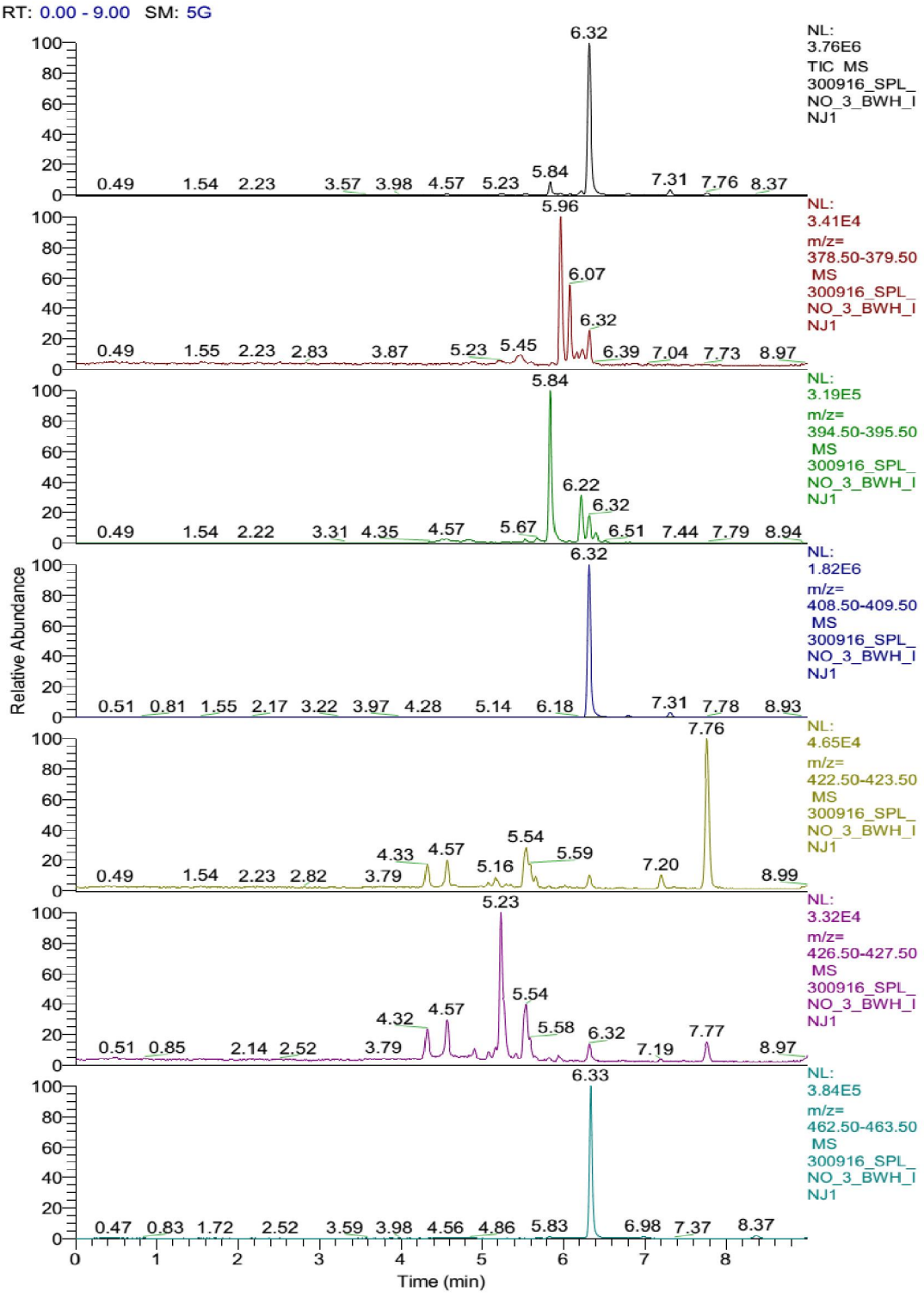
Gambar 7. Analisis kualitatif sampel no. 2 cairan



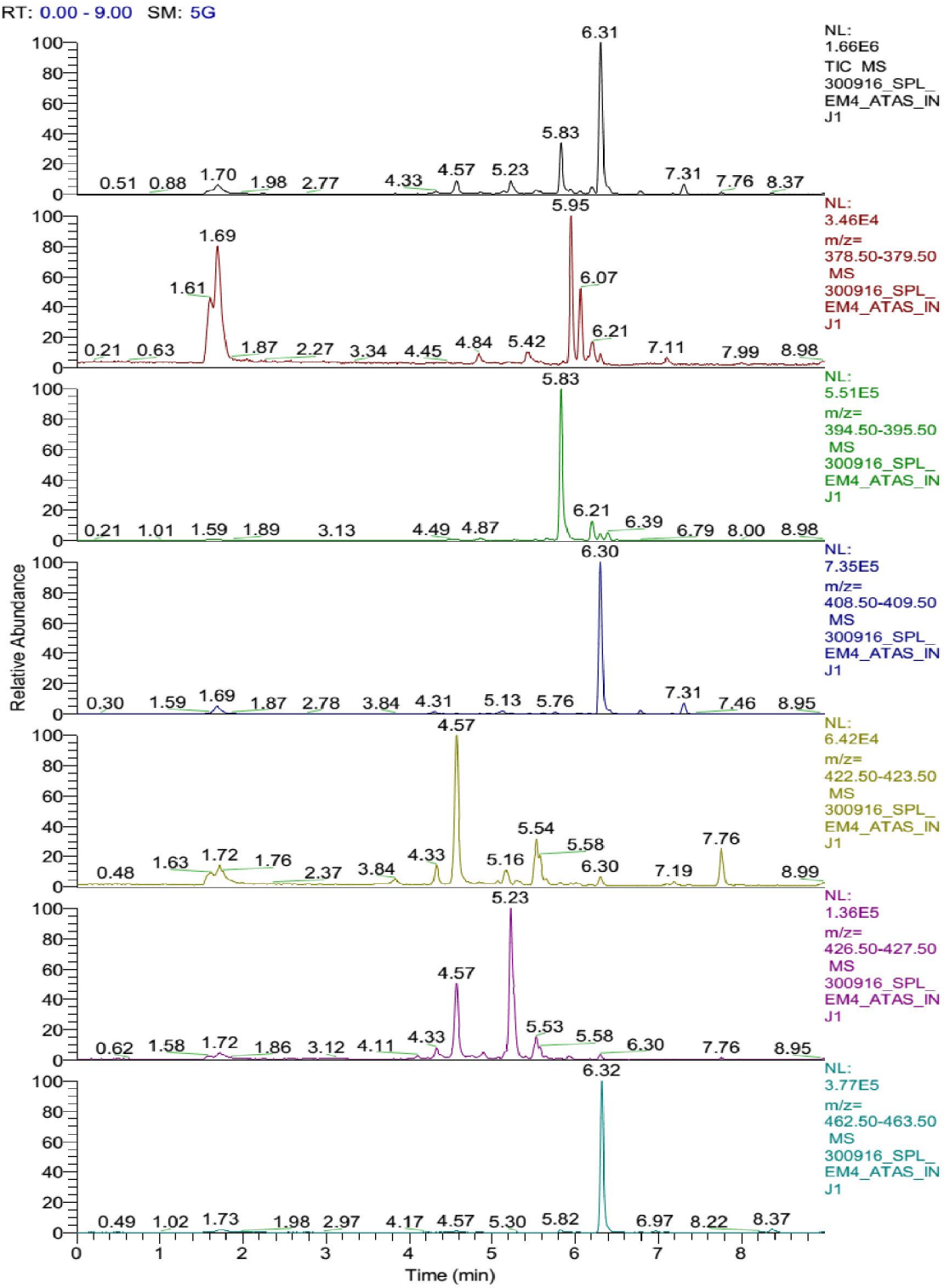
Gambar 8. Analisis kualitatif sampel no.2 padatan



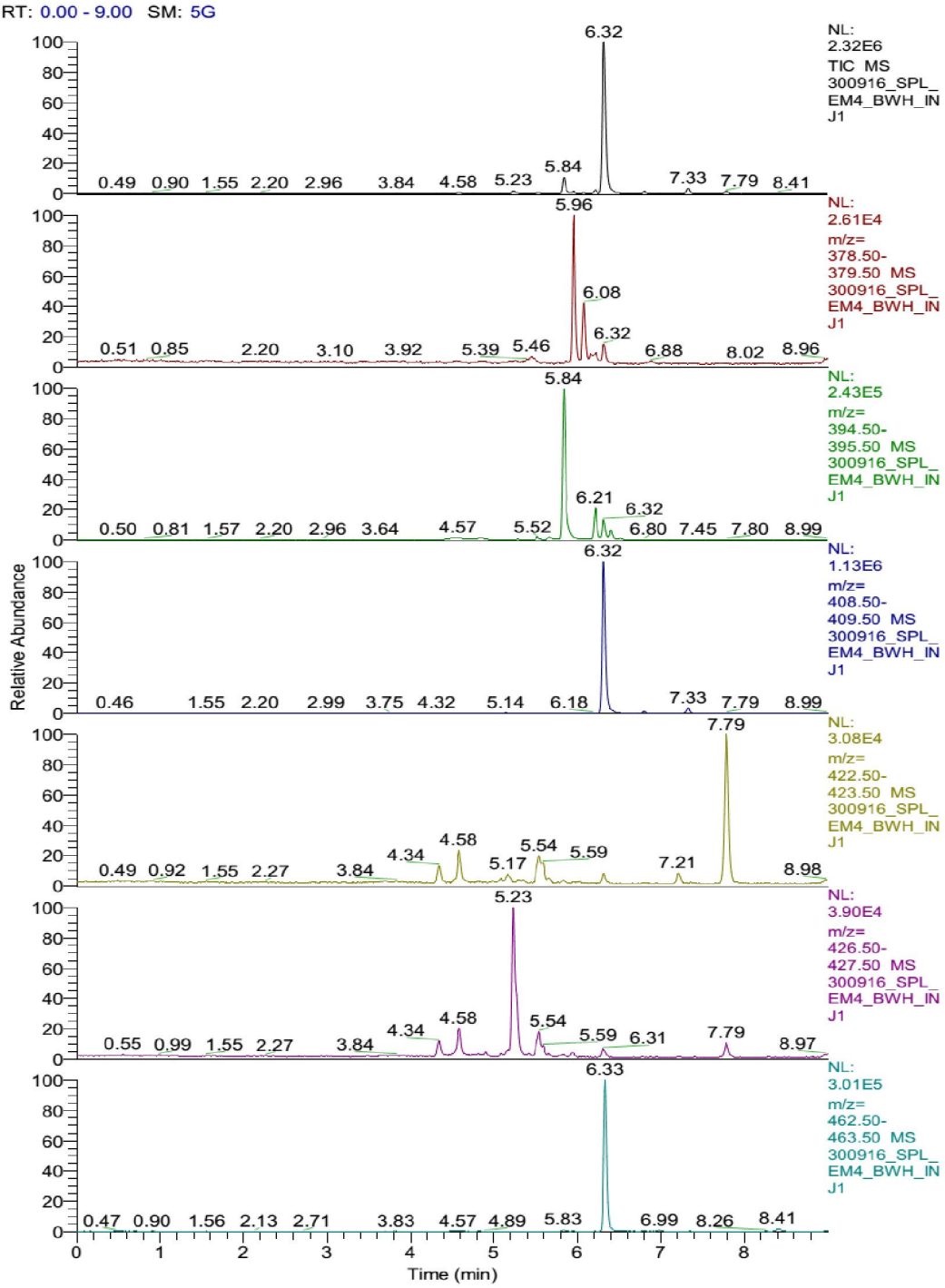
Gambar 9. Analisis kualitatif sampel no. 3 cairan



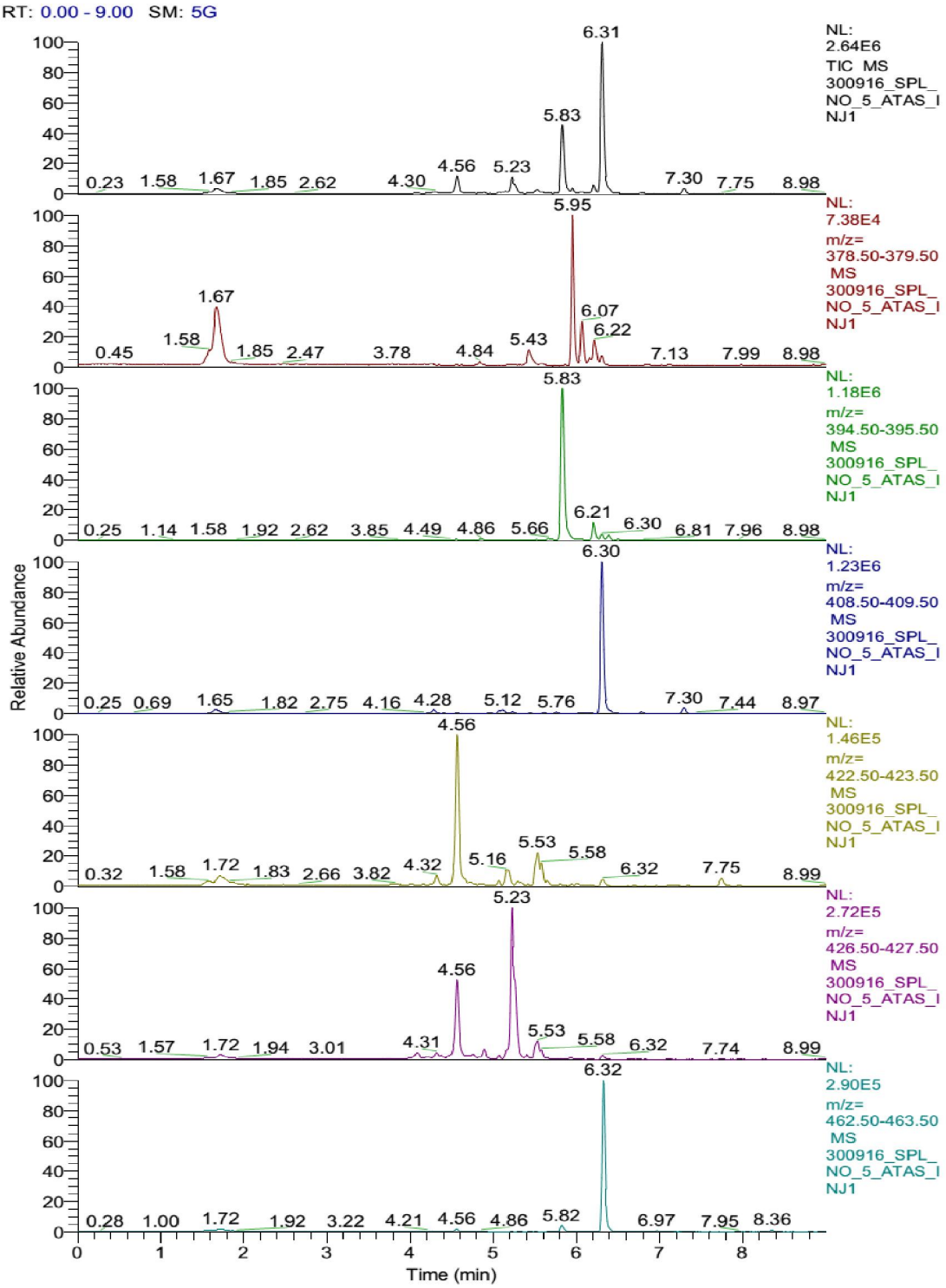
Gambar 10. Analisis kualitatif sampel no 3 padatan



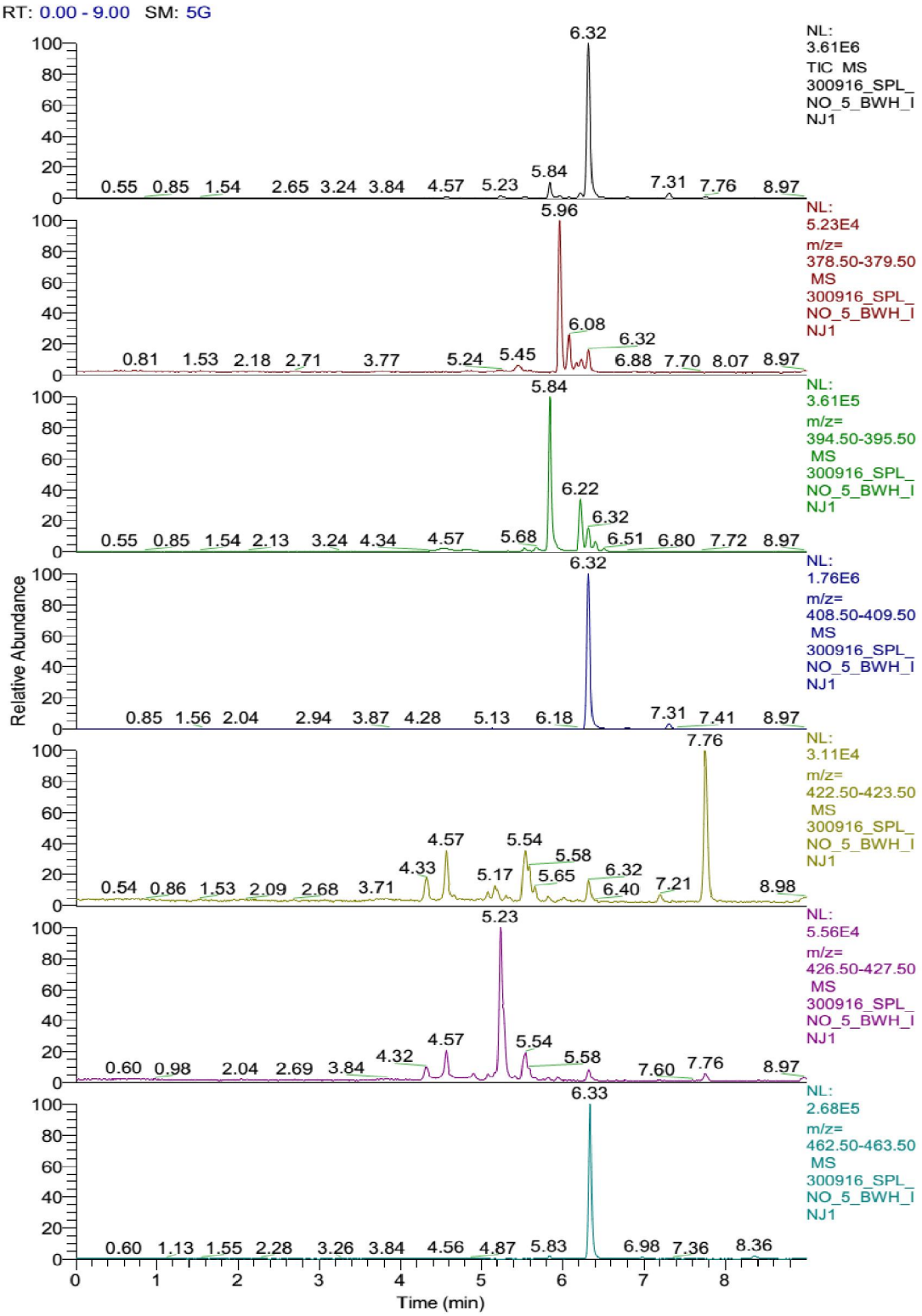
Gambar 11. Analisis kualitatif sampel no.4 cairan



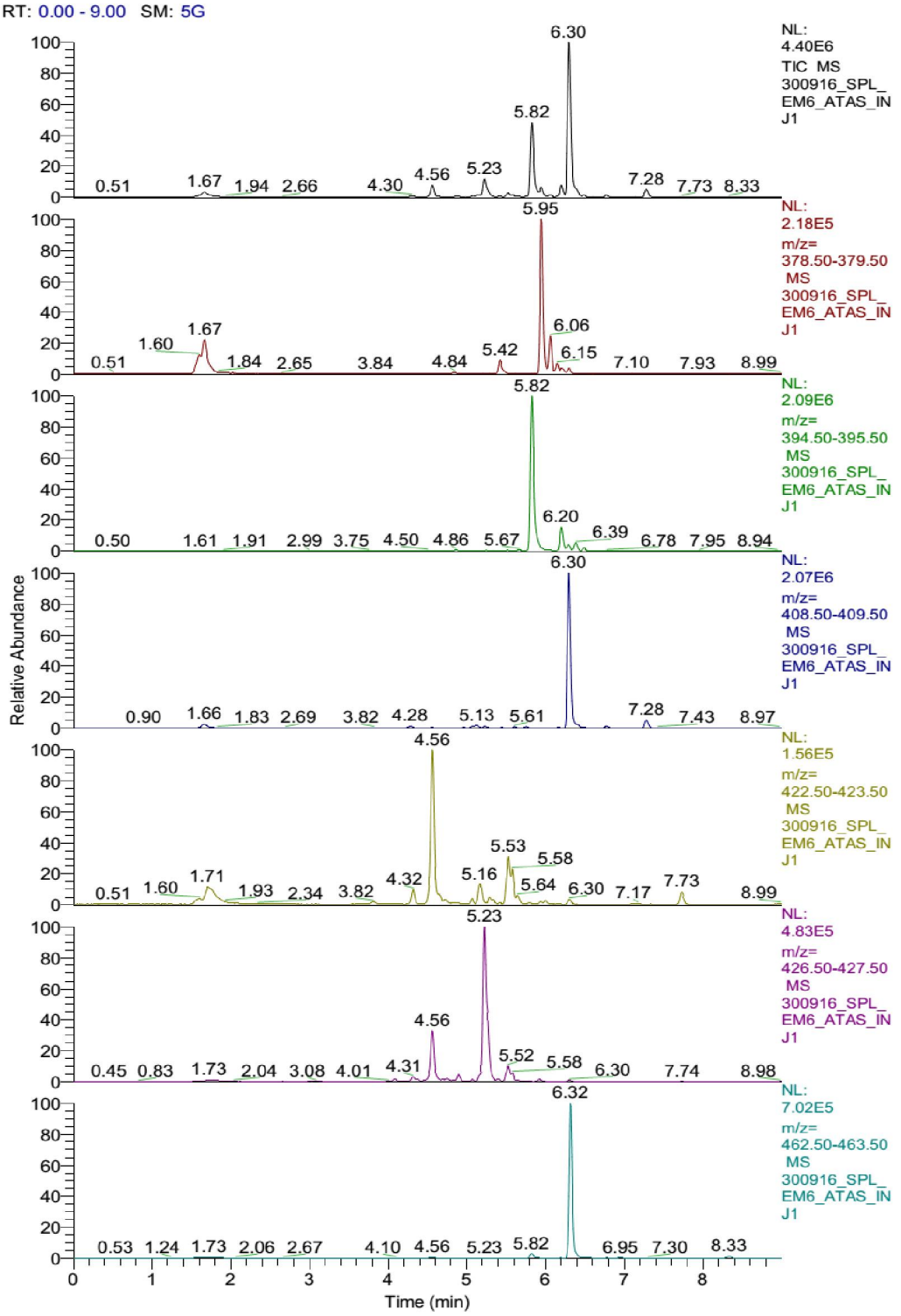
Gambar 12. Analisis kualitatif sampel no.4 padatan



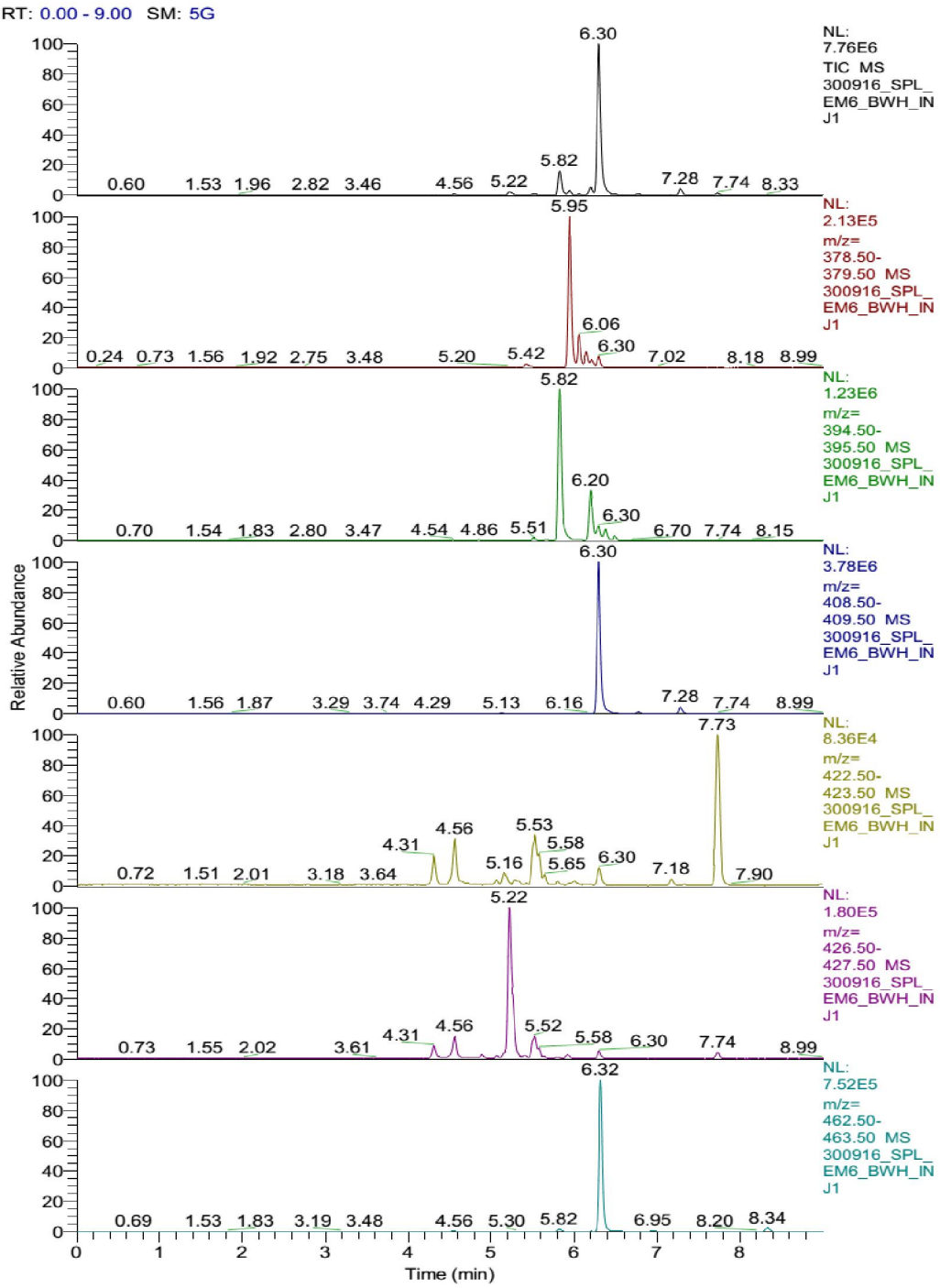
Gambar 13. Analisis kualitatif sampel no. 5 cairan



Gambar 14. Analisis kualitatif sampel no 5 padatan



Gambar 15. Analisis kualitatif sampel no.6 cairan

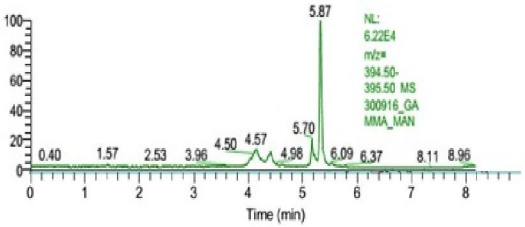


Gambar 16. Analisis kualitatif sampel no 6 padatan

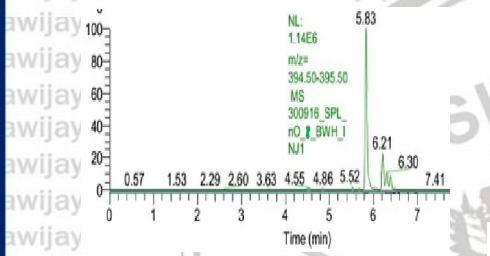
Lampiran 4

Kuantifikasi Kandungan EKM

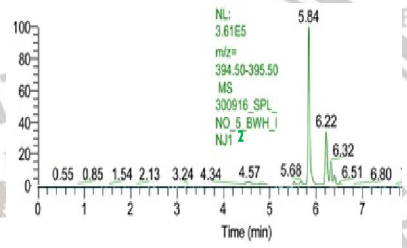
Gamma-mangostin



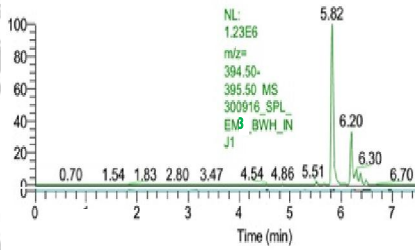
Standard : γ-mangostin



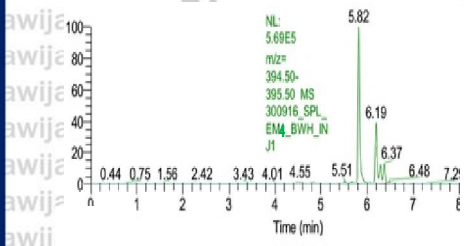
Ekstrak kulit manggis tingkat 1



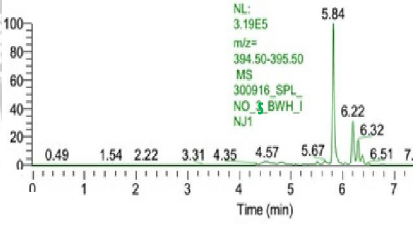
Ekstrak kulit manggis tingkat 2



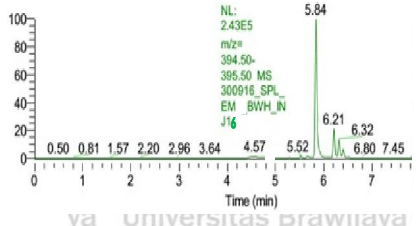
Ekstrak kulit manggis tingkat 3



Ekstrak kulit manggis tingkat 4

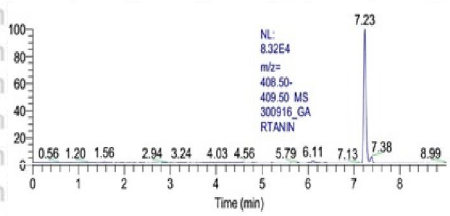


Ekstrak kulit manggis tingkat 5

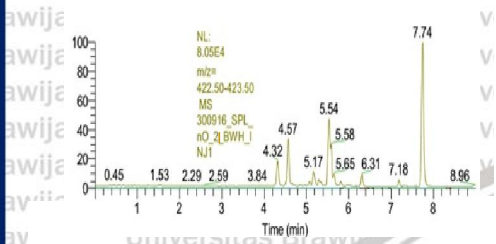


Ekstrak kulit manggis tingkat 6

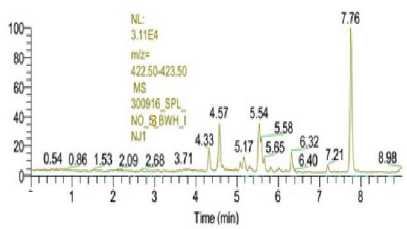
Gartanin



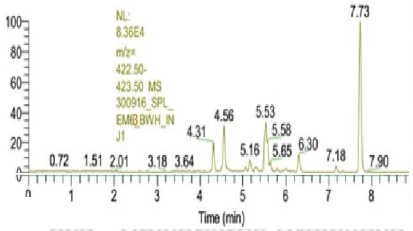
Standard: Gartanin



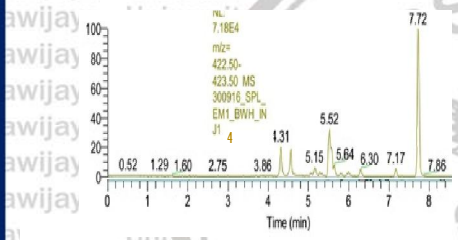
Ekstrak kulit manggis tingkat 1



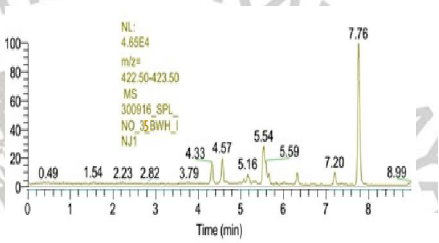
Ekstrak kulit manggis tingkat 2



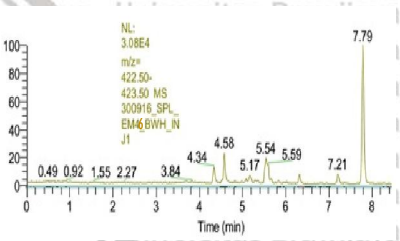
Ekstrak kulit manggis tingkat 3



Ekstrak kulit manggis tingkat 4

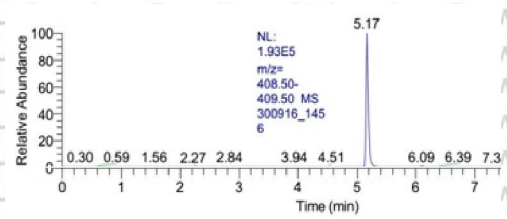


Ekstrak kulit manggis tingkat 5

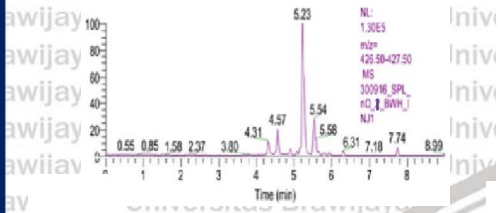


Ekstrak kulit manggis tingkat 6

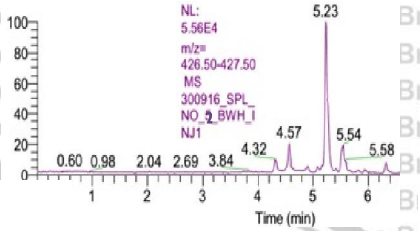
Smeathxanthone A



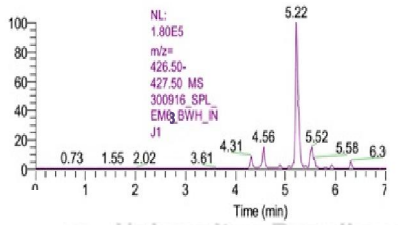
Standard : Smeathxanthone



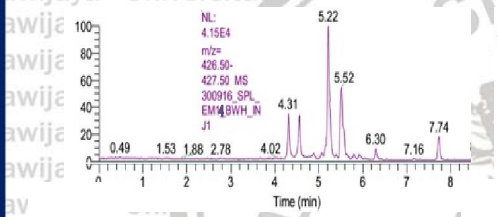
Ekstrak kulit manggis tingkat 1



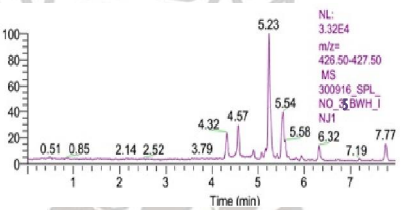
Ekstrak kulit manggis tingkat 2



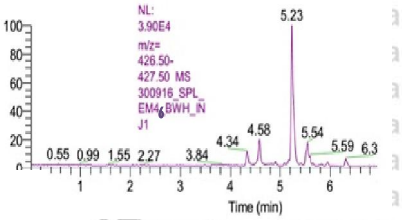
Ekstrak kulit manggis tingkat 3



Ekstrak kulit manggis tingkat 4

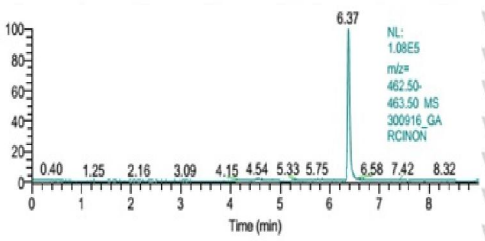


Ekstrak kulit manggis tingkat 5

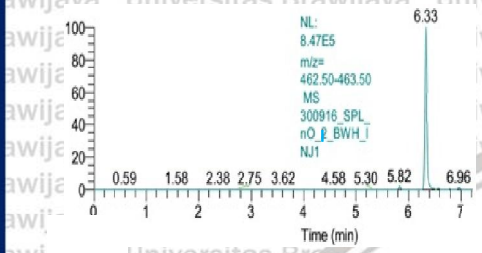


Ekstrak kulit manggis tingkat 6

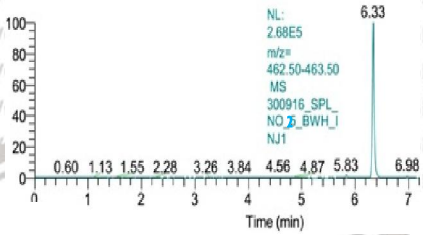
Garcinone-E



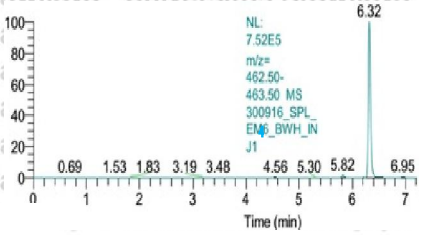
Standard : Garcinone-E



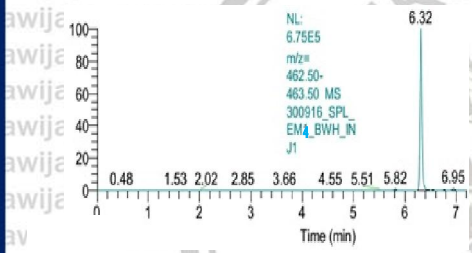
Ekstrak kulit manggis tingkat 1



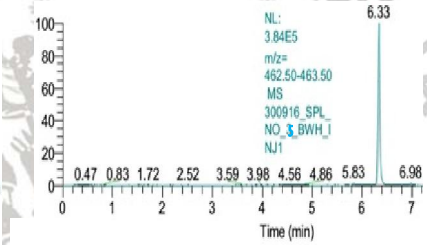
Ekstrak kulit manggis tingkat 2



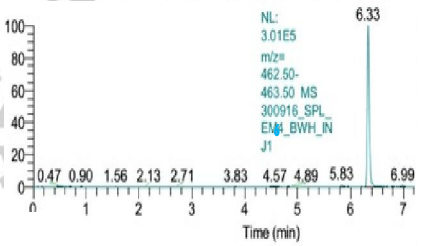
Ekstrak kulit manggis tingkat 3



Ekstrak kulit manggis tingkat 4



Ekstrak kulit manggis tingkat 5

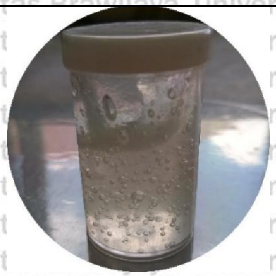


Ekstrak kulit manggis tingkat 6

Gambar Kromatografi LCMS-MS ekstrak kulit manggis tingkat kematangan 1-6

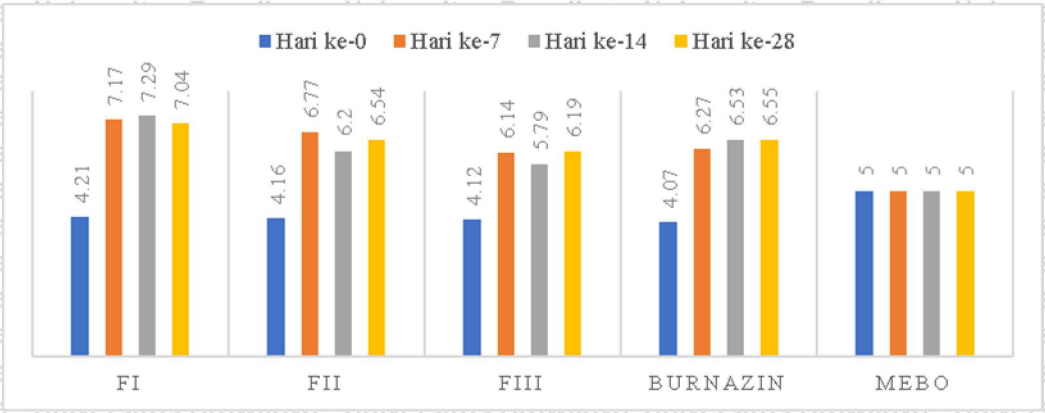
Lampiran 5
Karakterisasi Gel EKM

1. Hasil pengujian organoleptis FI, FII, FIII, Burnazin, dan MEBO

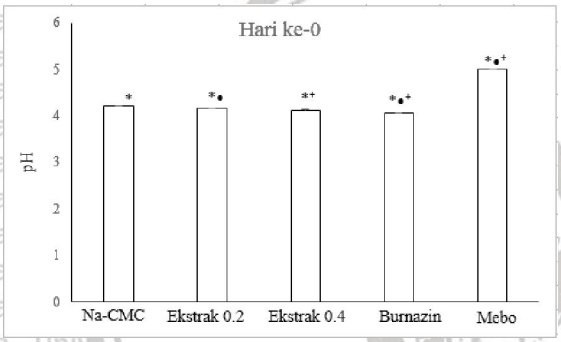
Nama sediaan	Dokumentasi	Hasil pengamatan
FI		Bentuk semisolid, tidak berbau, berwarna bening
FII		Bentuk semisolid, tidak berbau, berwarna coklat
FIII		Bentuk semisolid, tidak berbau, berwarna coklat
Burnazin		Bentuk semisolid, tidak berbau, berwarna putih pekat
MEBO		Bentuk semisolid, berbau sesame oil, berwarna kuning kecoklatan

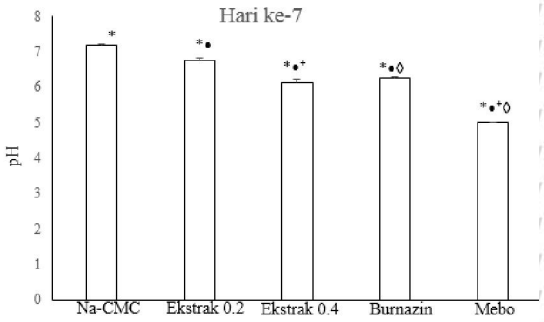
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

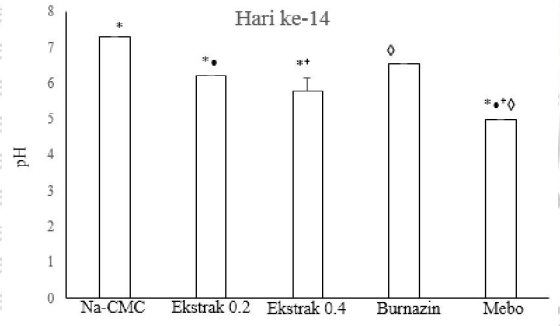
2. Data Pengujian pH

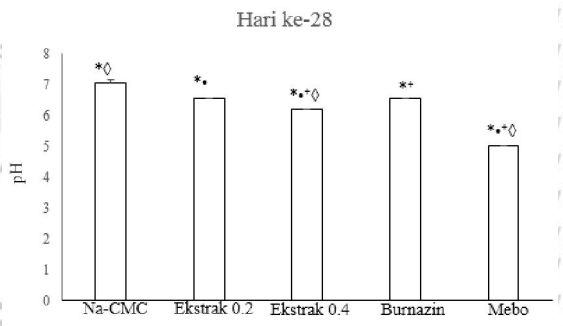


3. Data Ketahanan pH



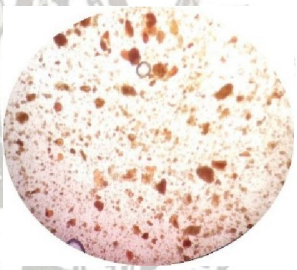
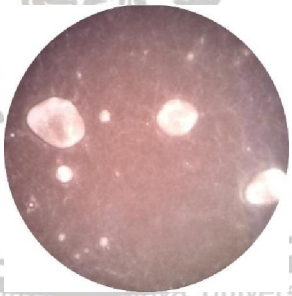
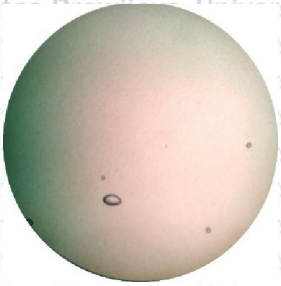




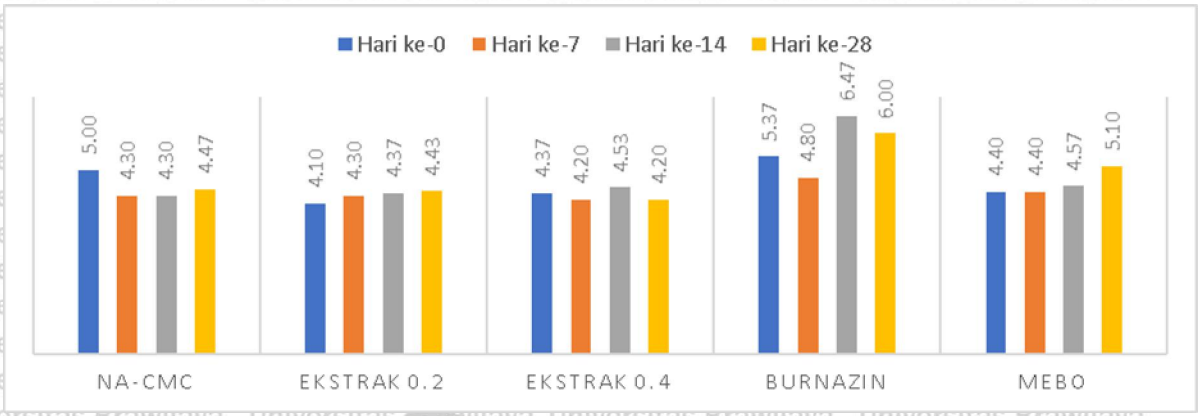


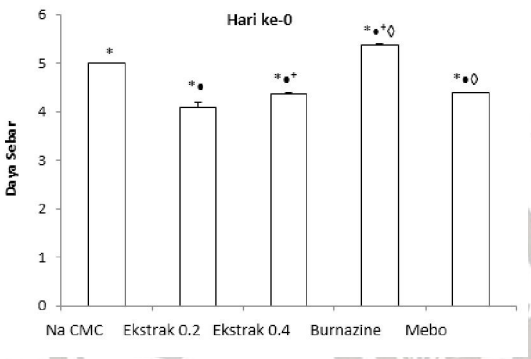
Keterangan:
*$p<0,05$ *terhadap Na-CMC*
•$p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC
$^{+}p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC
◊$p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC

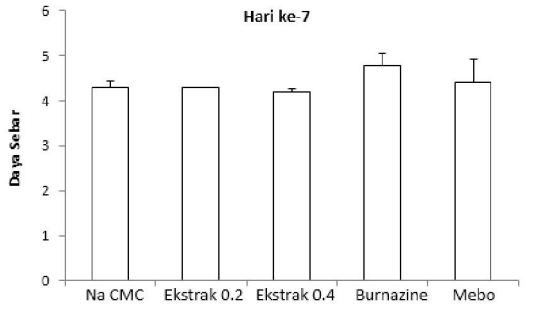
4. Hasil pengujian homogenitas FI, FII, FIII, Burnazin, dan MEBO

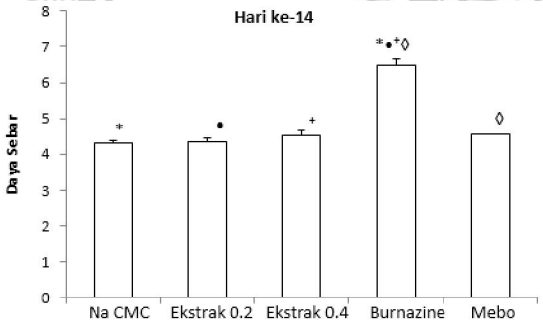
Nama sediaan	Dokumentasi	Hasil pengamatan
FI		Pengujian dilakukan dengan perbesaran 40X Sampel basis Na-CMC kurang homogen karena masih terdapat buliran.
FII		Sampel gel ekstrak dosis 0.2 gr kurang homogen karena masih terdapat buliran kasar.
FIII		Sampel gel ekstrak dosis 0.4 gr kurang homogen karena masih terdapat buliran kasar.
Burnazin		Sampel Krim Burnazin kurang homogen karena masih terdapat buliran.
MEBO		Sampel Salep Mebo kurang homogen karena masih terdapat buliran.

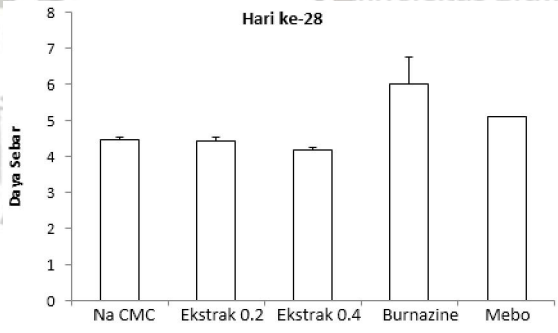
5. Data Pengujian Daya Sebar











Keterangan:

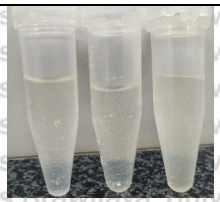
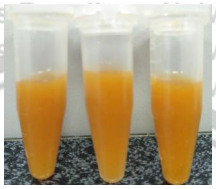
*$p<0,05$ *terhadap Na-CMC*

•$p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC

⁺$p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC

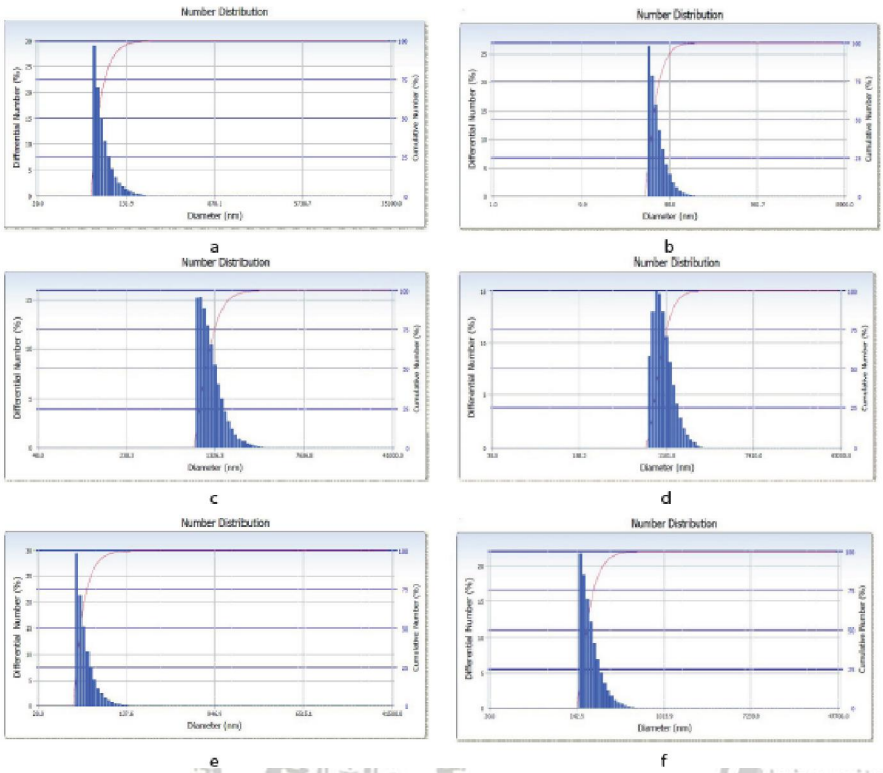
◊$p<0,05$ dibandingkan terhadap Na-CMC

6. Hasil pengujian konsistensi FI, FII, FIII, Burnazin, dan MEBO

Nama sediaan	Dokumentasi	Hasil pengamatan
FI		Setelah disentrifugasi selama 5 jam, sampel basis Na-CMC tidak membentuk 2 fasa
FII		Setelah disentrifugasi selama 5 jam, sampel gel ekstrak dosis 0.2 gr tidak membentuk 2 fasa
FIII		Setelah disentrifugasi selama 5 jam, sampel gel ekstrak dosis 0.4 gr tidak membentuk 2 fasa
Burnazin		Setelah disentrifugasi selama 5 jam, sampel krim Burnazin membentuk 2 fasa yang saling terpisah
MEBO		Setelah disentrifugasi selama 5 jam, sampel Salep Mebo terdapat 2 fasa yang saling terpisah pada bagian atas sampel

Lampiran 6

Hasil Analisis PSA, XRD, FTIR, SEM dan ESR



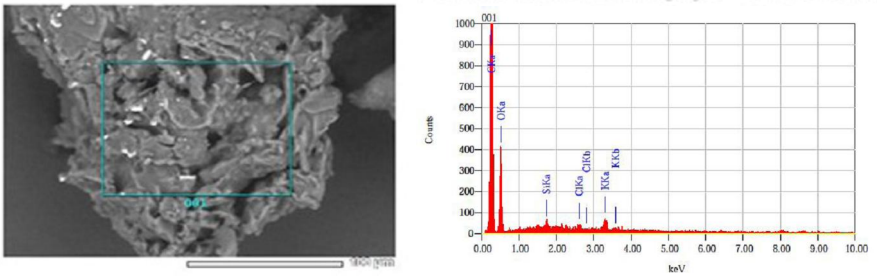
Gambar Particle Size Distribution dari Kulit Manggis tingkat kematangan 1-6

Tabel Data hasil Particle Size Analysis (PSA) dari Kulit Manggis tingkat kematangan 1-6

Mangosteen level	Size (nm)
1	81.8 ± 21.1
2	72.6 ± 20.4
3	1244.1 ± 341.0
4	1112.2 ± 256.5
5	57.0 ± 14.5
6	199.2 ± 58.9

Data are presented in Mean ± Standard Deviation

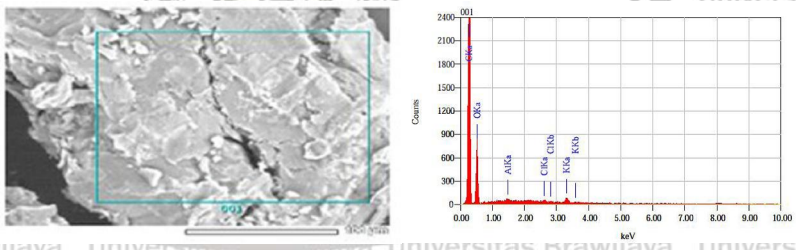
Hasil Scanning Electron Microscopy (SEM)



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 1

Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 1 berdasarkan EDX spectrum

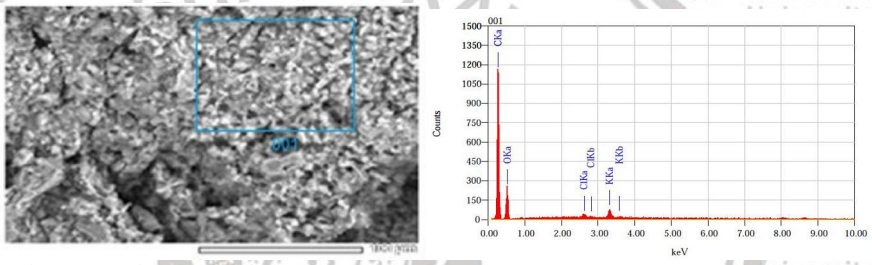
No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	64,20 %
2.	Oksigen (O)	34,52 %
3.	Silikonn (Si)	0,33 %
4.	Khlor (Cl)	0,22 %
5.	Kalium (K)	0,72 %



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 2

Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 2 berdasarkan EDX spectrum

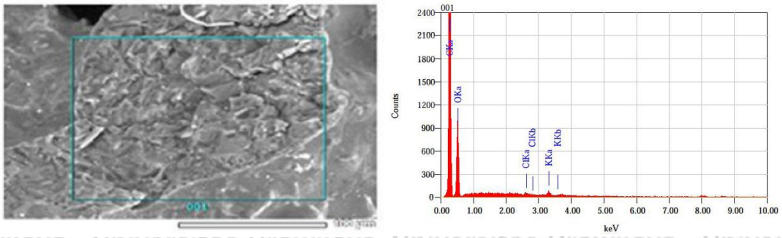
No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	65,33 %
2.	Oksigen (O)	33,96 %
3.	Silikon (Si)	0,10 %
4.	Aluminium (Al)	0,10%
5.	Khlor (Cl)	0,17 %
6.	Kalium (K)	0,45 %



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 3

Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 3 berdasarkan EDX spectrum

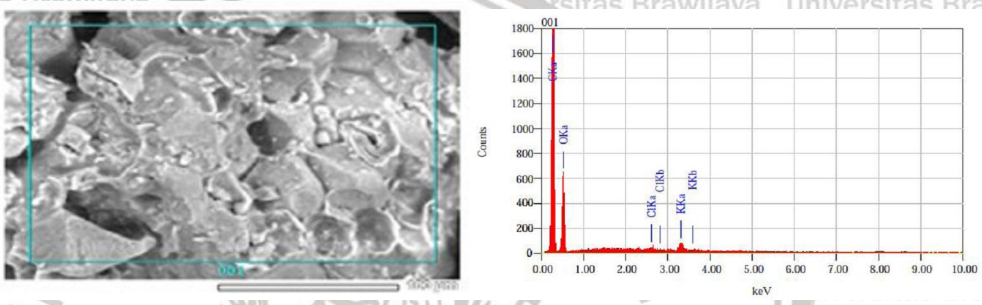
No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	61,38 %
2.	Oksigen (O)	36,49 %
3.	Khlor (Cl)	0,48 %
4.	Kalium (K)	1,65 %



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 4

Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 4 berdasarkan EDX spectrum

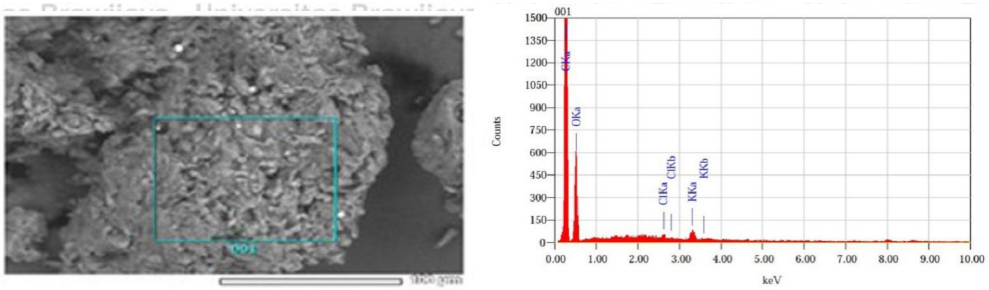
No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	65,42 %
2.	Oksigen (O)	34,20 %
3.	Khlor (Cl)	0,10 %
4.	Kalium (K)	0,28 %



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 5

Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 5 berdasarkan EDX spectrum

No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	61,18 %
2.	Oksigen (O)	37,94 %
3.	Khlor (Cl)	0,19 %
4.	Kalium (K)	0,69 %



Gambar SEM dan EDX spectrum dari EKM tingkat kematangan 6

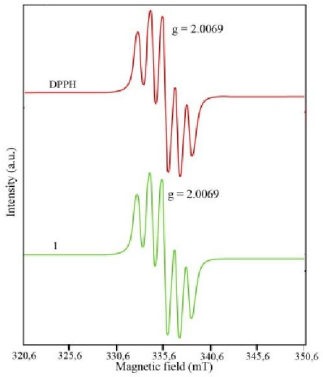
Tabel Kandungan dari EKM tingkat kematangan 6 berdasarkan EDX spectrum

No.	Unsur	Kandungan (%massa)
1.	Carbon (C)	62,41 %
2.	Oksigen (O)	36,67 %
3.	Khlor (Cl)	0,23 %
4.	Kalium (K)	0,68 %

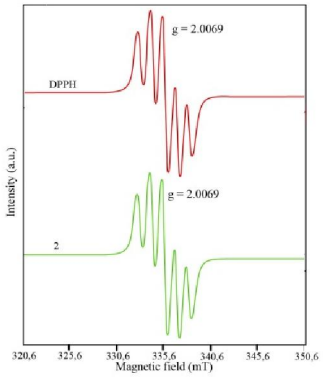
Hasil XRF Kulit Manggis tingkat kematangan 1-6

Elements	Concentrations mangosteen pericarp level (%)					
	1	2	3	4	5	6
Potassium (K)	50.96	50.59	50.38	50.21	51.22	52.03
Chloride (Cl)	12.20	11.18	12.83	9.61	11.90	13.45
Calcium (Ca)	4.92	8.10	1.48	8.56	5.90	4.67
Phosphor (P)	1.78	1.68	1.67	1.50	1.39	1.75
Sulfur (S)	1.01	1.25	2.06	1.25	1.01	2.20
Sodium (Na)	1.37	1.27	1.08	1.67	1.77	1.22
Cadmium (Cd)	1.50	0.77	1.89	0.91	1.18	1.11
Silver (Ag)	1.33	2.01	3.20	1.31	1.52	–
Iron (Fe)	0.924	0.836	0.821	1.05	1.986	0.920
Zinc (Zn)	0.879	0.386	0.257	0.482	0.712	0.988
Molybdenum (Mo)	0.712	–	0.854	0.678	–	0.575
Rubidium (Rb)	0.75	0.873	0.88	0.985	1.18	0.523
Magnesium (Mg)	0.410	0.425	0.290	0.315	0.392	0.431
Silicon (Si)	0.295	0.294	0.249	0.280	0.569	0.401
Zirconium (Zr)	0.239	0.209	0.125	0.219	0.167	0.249
Argon (Ar)	0.291	0.254	0.339	0.246	0.203	0.203
Manganese (Mn)	0.218	0.218	0.156	0.453	0.195	0.293
Titanium (Ti)	0.115	0.115	–	–	0.089	0.504
Barium (Ba)	–	–	0.80	–	0.84	–
Gold (Au)	–	–	0.74	–	–	–

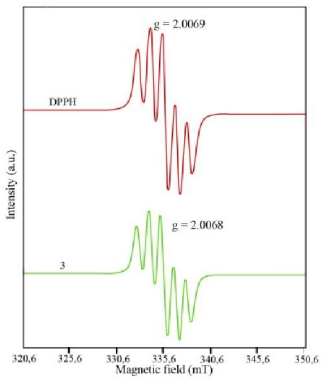
Hasil Analisis ESR pada 6 Tingkat Kematangan Kulit Manggis



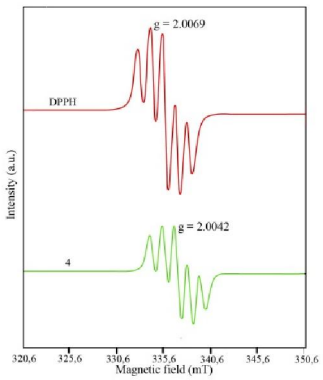
a. DPPH – MRE level 1



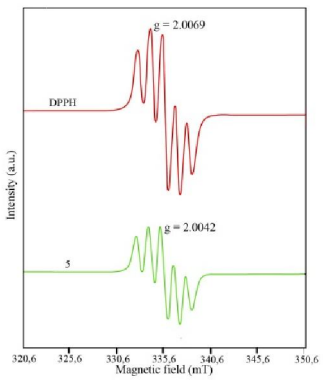
b. DPPH – MRE level 2



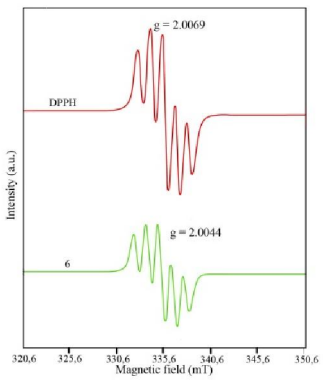
c. DPPH – MRE level 3



d. DPPH – MRE level 4



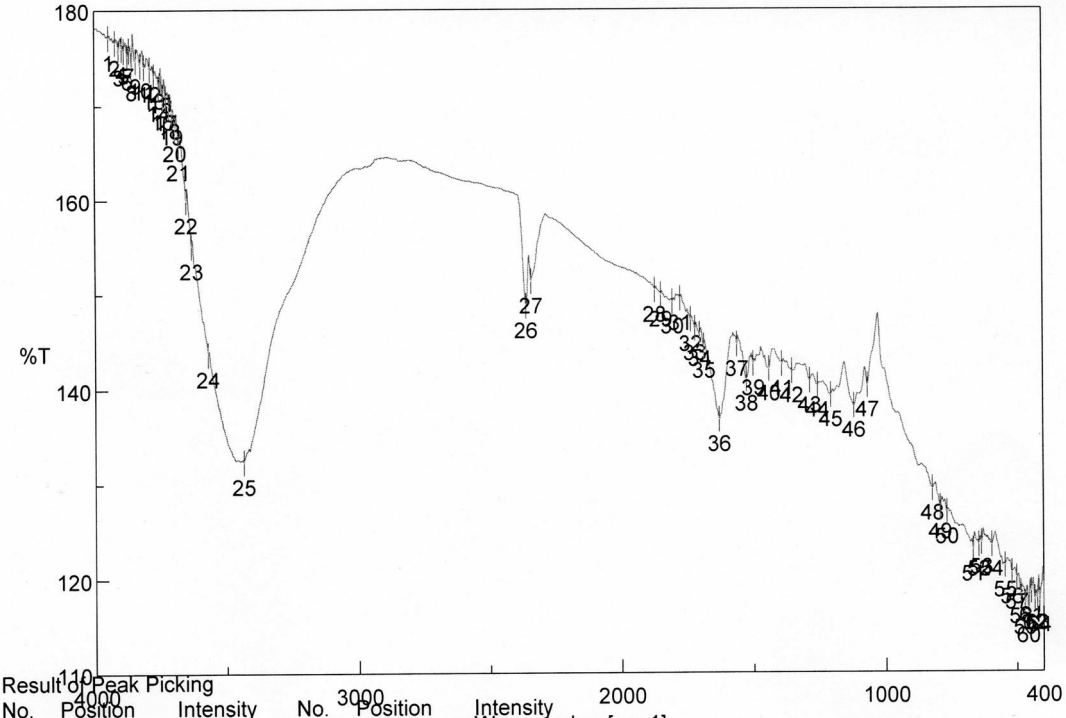
e. DPPH – MRE level 5



f. DPPH – MRE level 6

Gambar Hasil pengujian DPPH menggunakan ESR dengan tingkat kematangan berbeda

Hasil Analisis FTIR EKM Tingkat Kematangan 6

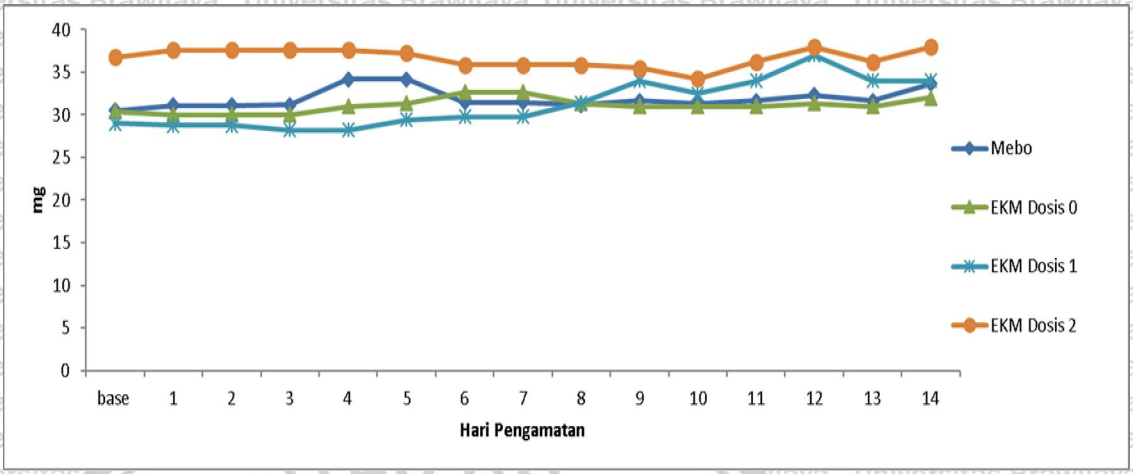


Result of Peak Picking

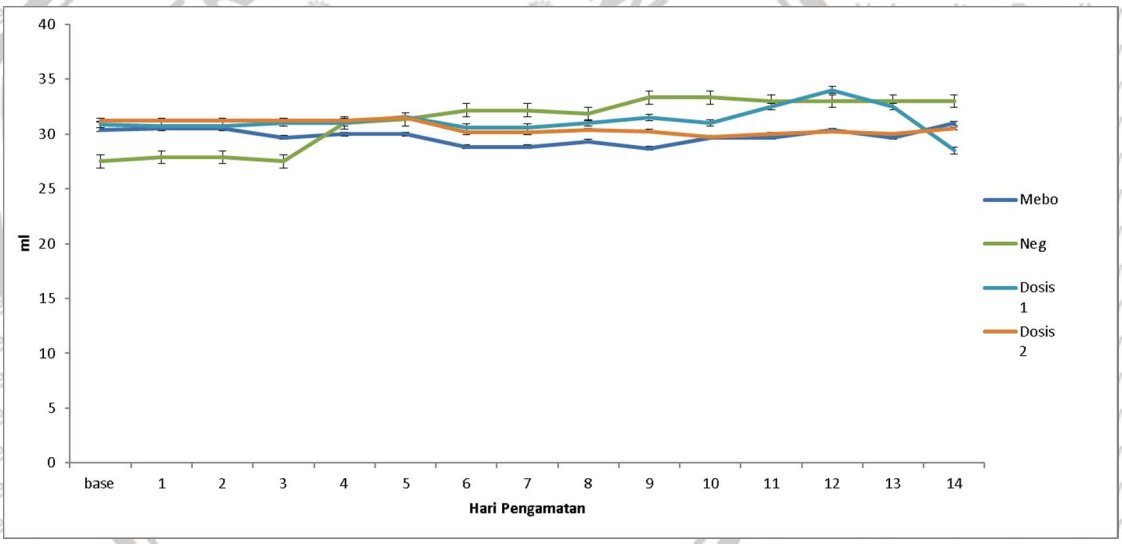
No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	3943.71	177.139	2	3918.64	176.617
3	3905.15	175.612	4	3892.61	176.002
5	3885.86	175.788	6	3872.36	175.127
7	3864.65	175.836	8	3855.01	174.008
9	3840.54	174.705	10	3822.22	174.247
11	3808.72	174.054	12	3786.54	173.841
13	3771.12	173.113	14	3752.8	171.789
15	3745.08	172.712	16	3736.4	170.934
17	3725.8	170.873	18	3713.26	169.979
19	3702.66	169.336	20	3691.09	167.575
21	3677.59	165.547	22	3650.59	159.925
23	3630.34	155.074	24	3568.63	143.641
25	3434.6	132.312	26	2360.44	148.724
27	2342.12	151.347	28	1870.61	150.354
29	1846.51	149.866	30	1803.12	149.129
31	1774.19	149.456	32	1734.66	147.232
33	1719.23	146.281	34	1700.91	145.683
35	1685.48	144.431	36	1627.63	136.708
37	1560.13	144.588	38	1525.42	140.953
39	1499.38	142.597	40	1439.6	142.034
41	1389.46	142.529	42	1353.78	141.755
43	1286.29	140.782	44	1256.4	140.265
45	1207.22	139.236	46	1119.48	138.111
47	1068.37	140.284	48	823.455	129.374
49	793.564	127.41	50	768.494	126.873
51	669.178	122.902	52	647.965	123.461
53	636.394	123.639	54	596.861	123.445
55	545.756	121.217	56	520.686	120.508
57	502.366	119.909	58	486.938	118.395
59	470.546	117.253	60	457.047	116.367
61	447.404	118.544	62	433.905	117.746
63	424.263	117.718	64	415.585	117.523

[Comment]	
Sample Name	sampel 2
Comment	Sampel
User	Nn
Division	Lb. Penelitian
Company	JASCO
[Measurement Information]	
Model Name	FT/IR-4200typeA
Serial Number	B015261018
Light Source	Standard
Detector	TGS
Accumulation	Auto (49)
Resolution	4 cm-1
Zero Filling	On
Apodization	Cosine
Gain	Auto (4)
Aperture	Auto (7.1 mm)
Scanning Speed	Auto (2 mm/sec)
Filter	Auto (30000 Hz)

Lampiran 7
Data Makanan dan Minuman Tikus Penelitian

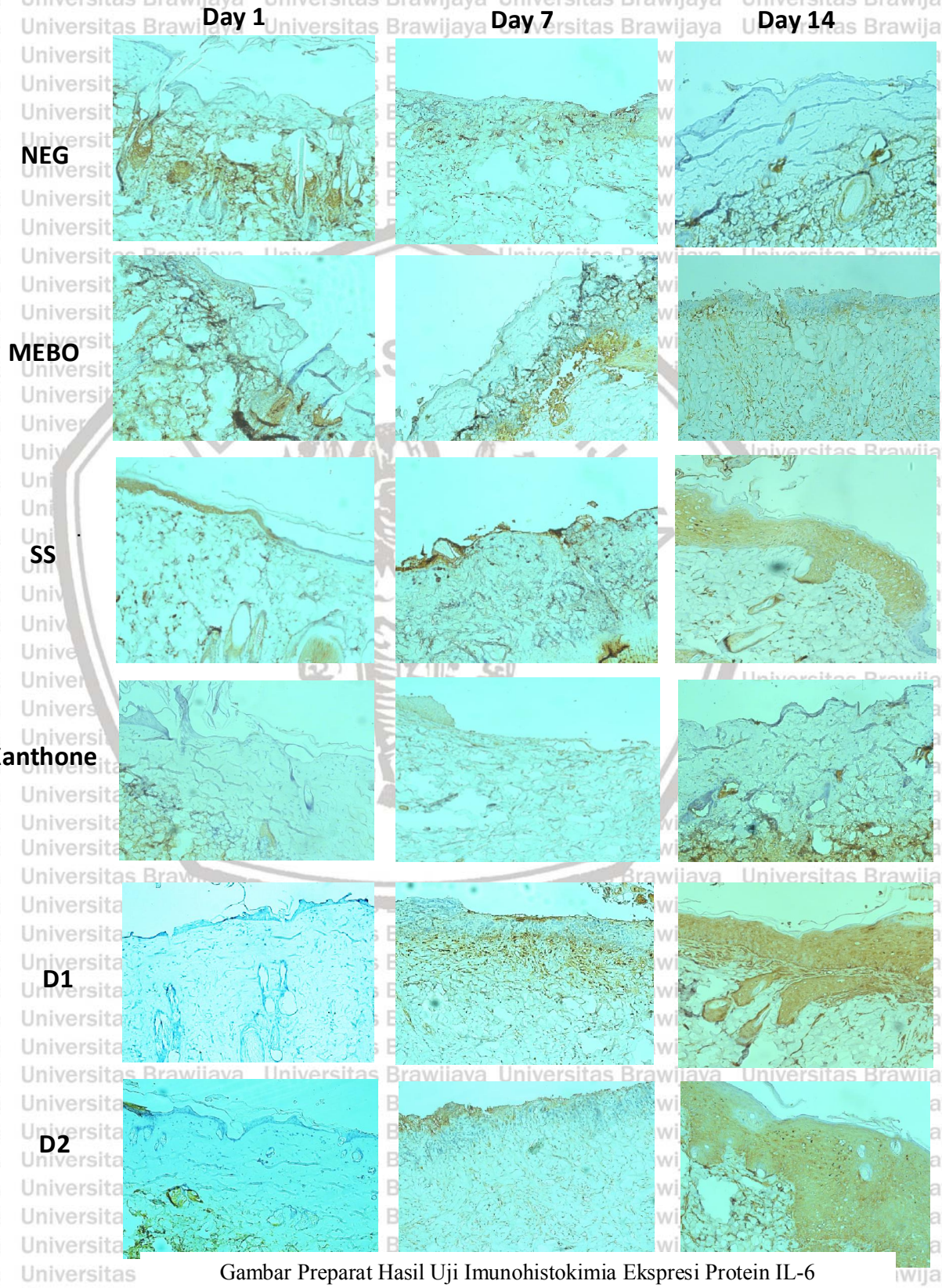


Grafik pakan yang dimakan oleh tikus model luka bakar



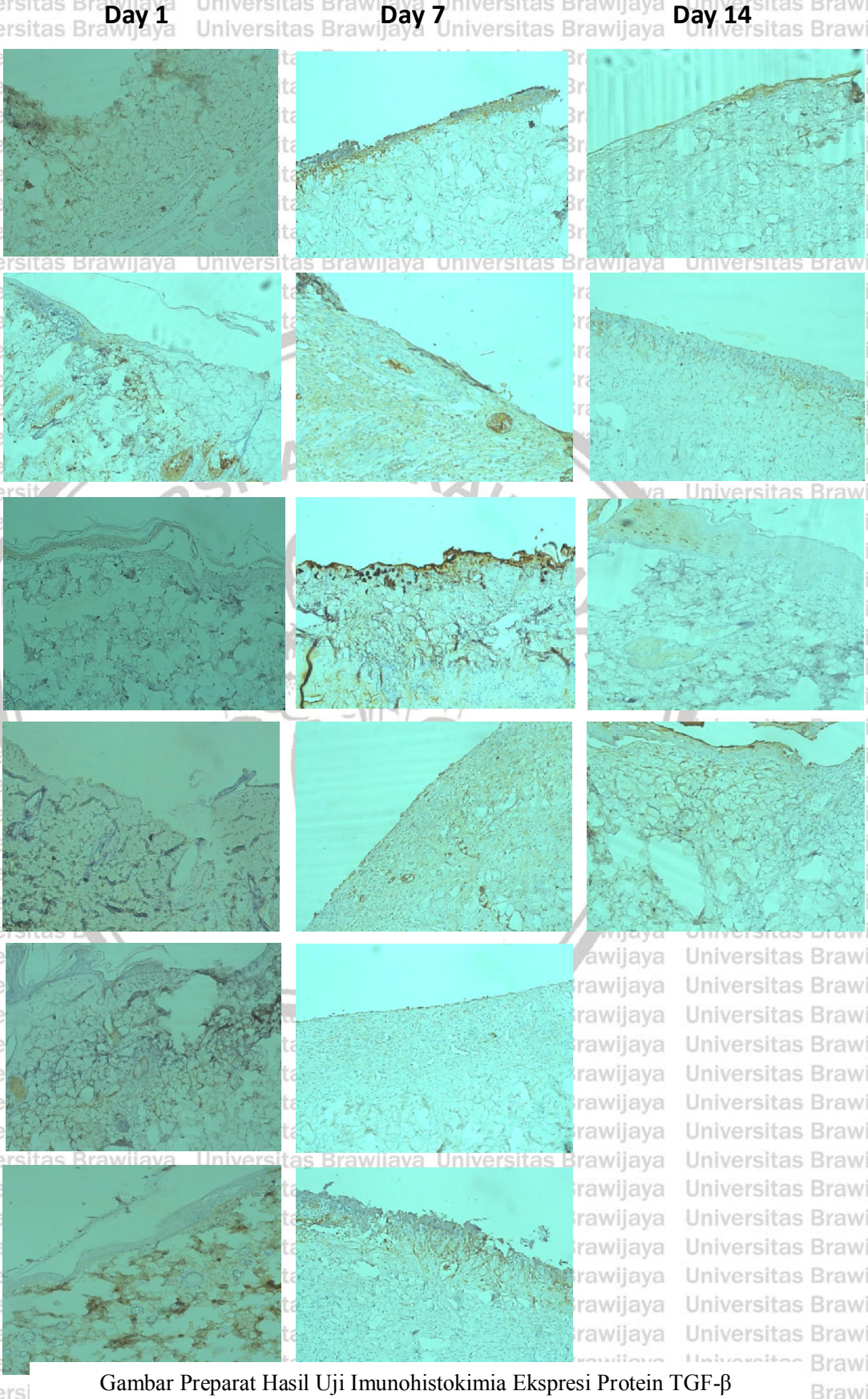
Grafik minuman yang diminum oleh oleh tikus model luka bakar

Lampiran 8
Kuantifikasi Hasil IHK

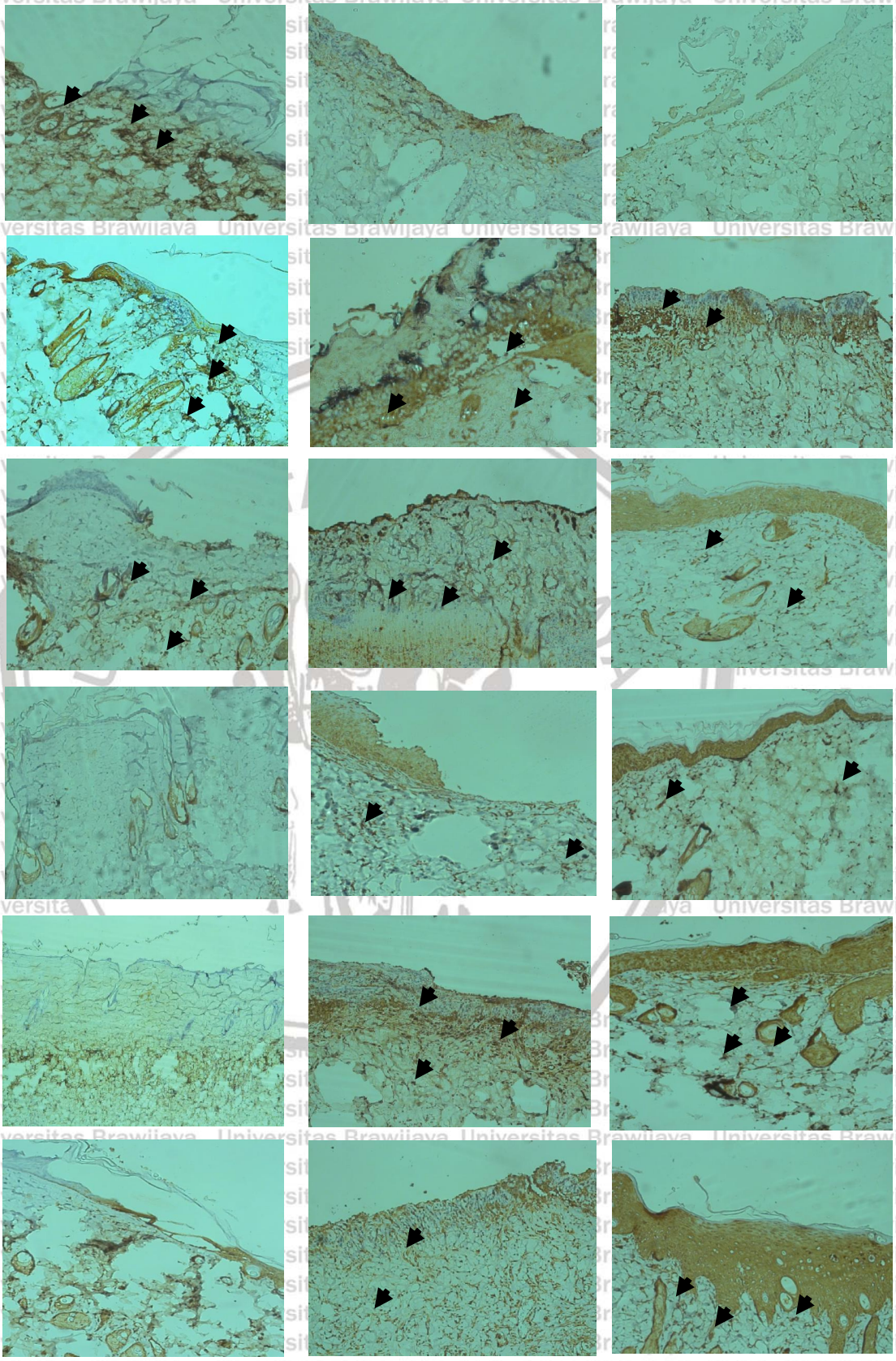


Gambar Preparat Hasil Uji Imunohistokimia Ekspresi Protein IL-6

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



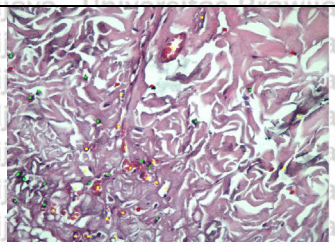
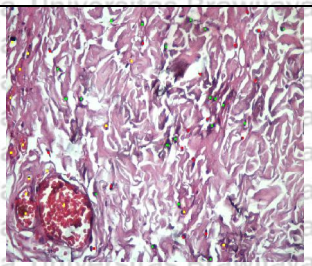
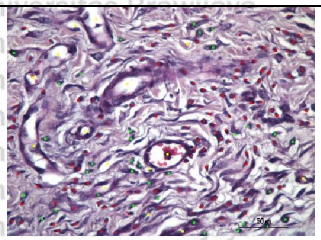
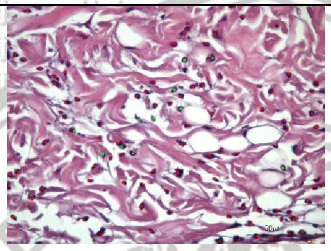
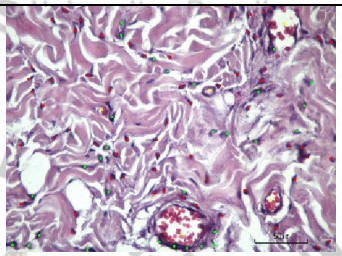
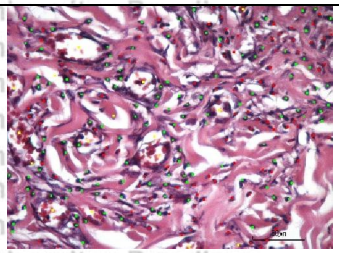
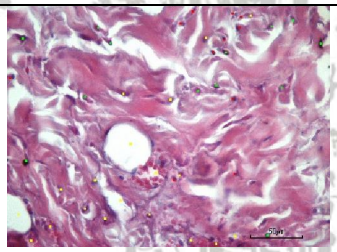
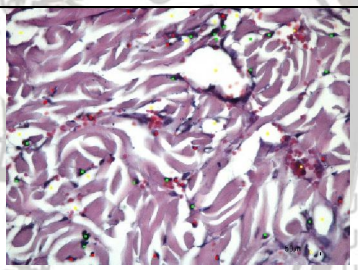
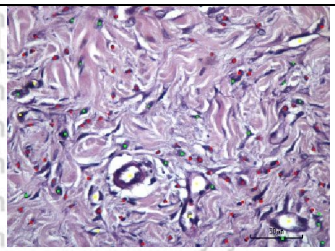
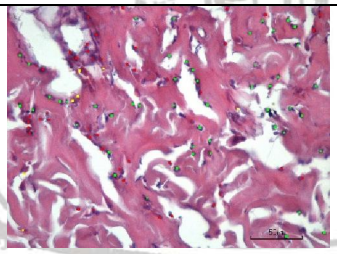
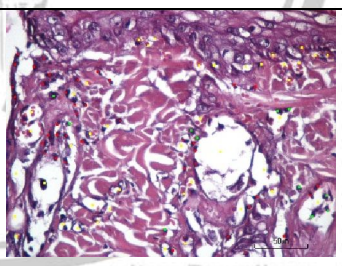
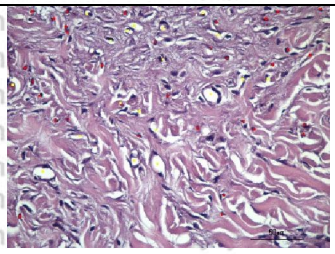
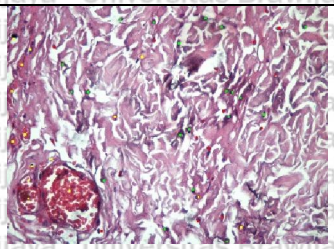
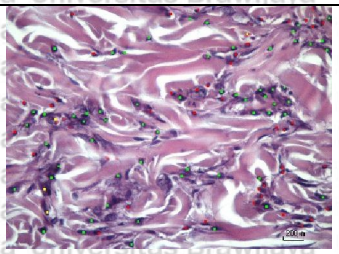
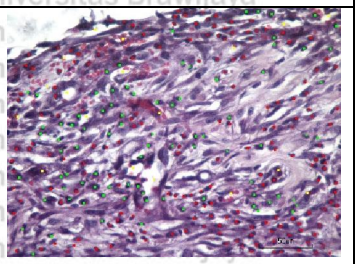
Gambar Preparat Hasil Uji Imunohistokimia Ekspresi Protein TGF-β



Gambar Preparat Hasil Uji Imunohistokimia Ekspresi Protein EGF

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

Kuantifikasi Neutrofil, Limfosit dan Neovaskularisasi

Perlakuan	Hari Ke-1	Hari Ke-7	Hari Ke-14
Kontrol Negatif			
SSD			
Mebo			
EKM Dosis 1			
EKM Dosis 2			

INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
SCHOOL OF LIFE SCIENCES AND TECHNOLOGY
Jl. Ganesa 10 Bandung 40132 Indonesia, Phone (+62) 22 2511575, 2500258, Fax (+62) 22 2534107
e-mail : sith@itb.ac.id http://www.sith.itb.ac.id

Nomor : 2984/I1.CO2.2/PL/2015
Hal : Determinasi tumbuhan

7 Oktober 2015.

Kepada yth.
Pembantu Dekan
Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya
Jalan Veteran Malang
Jawa Timur

Memperhatikan permintaan Saudara dalam surat No. 5887/UN10.7/AK/2014 tanggal 28 Mei 2014 mengenai determinasi tumbuhan, dengan ini kami sampaikan bahwa setelah dilakukan determinasi oleh staf kami, sampel tumbuhan buah manggis yang dibawa oleh Sdr. Marisca Evalina Gondokesumo, S Farm., M.Farm-Klin.,Apt. (NIM : 137070100111013), adalah :

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida (Dicots)
Anak kelas	:	Dilleniidae
Bangsa	:	Theales
Nama suku / familia	:	Clusiaceae (Guttiferae)
Nama jenis / species	:	*Garcinia mangostana* L.
Sinonim	:	*Mangostana garcinia* Gaertner
Nama Umum	:	Mangosteen (Inggris), Manggis (Indonesia),manggu (Sunda)
Buku Acuan	:	1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr. R..C.1963. Flora of Java Volume I , N.V.P.Noordhoff , Groningen, the Netherlands. pp 387.
		2. Ogata, Y. *et al.* (Committe Members) 1995. Medicinal Herb Index in Indonesia (Second Edition). PT. Eisai Indonesia. Jakarta. pp : 71 - 72.
		3. Verheij, E.W.M. 1992. *Garcinia mangostana* L. In : Verheij, E.W.M. & Coronel, R.E. (Eds.) Plant Resources of South-East Asia No 2 Edible fruits and nuts. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. pp: 177-181.
		4. Cronquist,A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia Press, New York. pp.Xiii - XViii

Demikian yang kami sampaikan. Atas perhatian dan kerjasama yang diberikan, kami ucapkan terima kasih.

a.n. Wakil Dekan Bidang Sumber Daya,

Dr. Iriawati
NIP. 196205071988032001

Tembusan:
Dekan SITH ITB, sebagai laporan.