

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP SUBFRAKSI ETIL ASE TAT DAUN
MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.) KONSENTRASI 10% TERHADAP
EKSPRESI TNF- α PADA TIKUS PUTIH JANTAN**

PROPOSAL



Oleh:

SUVINA RAHMADANI
NIM: 1904147

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
2023**

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka adalah suatu keadaan yang ditandai dengan rusaknya jaringan tubuh. Kerusakan jaringan tubuh dapat melibatkan jaringan ikat, jaringan otot, syaraf kulit dan robeknya pembuluh darah yang akan mengakibatkan pendarahan (Abdurrahmat, 2014). Salah satu jenis luka adalah luka eksisi, dimana luka eksisi adalah luka yang disebabkan oleh terpotongnya jaringan karena goresan benda yang tajam, biasanya seperti pisau dan lain sebagainya (Priyandari & Umatjina, 2015). Berdasarkan data departemen kedaruratan Amerika Serikat tahun 2005 sebanyak 11,8 juta luka ditangani dan lebih 7,3 juta luka robek ditangani pertahun. Luka sayatan atau tusukan menyebabkan kurang lebih 2 juta pasien yang dirawat tiap tahun. Prevalensi di Indonesia untuk cedera luka terbuka sebesar 25,4%, dengan prevalensi tertinggi terdapat di provinsi Sulawesi Tengah sebesar 33,3%. Berdasarkan kelompok umur, prevalensi luka terbuka yang paling banyak dijumpai adalah pada kelompok umur 25 sampai 34 tahun (32,0%) (Husaini, 2010).

Saat tubuh mengalami luka, maka terjadi proses peradangan yang merupakan tahap awal dalam perbaikan jaringan yang rusak. Selama proses peradangan diperlukan peran dari sel radang dalam jaringan atau dalam sirkulasi darah, mediator kimiawi yang dihasilkan dari sel radang, endothel atau mediator kimia yang terlarut dalam plasma (contohnya komplemen, faktor pembekuan darah, dsb.) (Arimbi dkk., 2013). Sel radang terdiri dari sel radang mononuklear (monosit dan limfosit) dan sel radang polimorfonuklear (basofil, eosinofil dan neutrofil). Sel ini pada kondisi normal berada pada pembuluh darah, tetapi pada saat terjadi luka sel sel tersebut akan beremigrasi ke dalam jaringan dermis, terutama neutrofil (Wijaya dkk., 2015). Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan salah satu jenis sitokin pro inflamasi yang dihasilkan oleh neutrofil dan makrofag. Pada saat luka terjadi kadar TNF- α akan mengalami peningkatan. Peningkatan kadar TNF- α dapat menginduksi keluarnya molekul

adhesi endotel yaitu inntercellular 3 adhesion molecule 1 (ICAM-1) yang akan menambah melekatnya neutrofil pada sel endotel sebelum masuk ke dalam ruang ekstrasvaskuler atau ruang intrasel. Produk peradangan lainnya akan menyebabkan kemotaksis netrofil menuju jaringan yang cedera (Haq FF, 2016).

Tujuan utama pengobatan luka adalah mengembalikan fungsi dan bentuk jaringan kulit kembali normal dengan komplikasi lokal sekecil mungkin. Pada saat terjadinya luka, jaringan tersebut akan mengalami proses penyembuhan yang merupakan fenomena yang kompleks dengan melibatkan beberapa proses tersebut (Primadina, *et al.*, 2019). Terdapat banyak substansi yang bisa mempercepat penyembuhan luka diantaranya ada beberapa ekstrak tanaman walaupun sebenarnya penggunaan tersebut merupakan kebiasaan yang dilakukan oleh masyarakat tradisional. (Mathivanan, *et al.*, 2006). Oleh karena itu tanaman yang lebih banyak dipilih sebagai obat alternatif dan alami untuk pengobatan berbagai penyakit, Akan tetapi masih belum banyak penelitian yang mengkaji khasiat secara ilmiah (Madhavi, 2012).

Untuk mengatasi masalah terhadap penyembuhan luka eksisi dibutuhkan suatu sediaan yang mempunyai daya penetrasi yang baik dan waktu kontak yang cukup lama. Salah satu sediaan yang dipilih adalah salep. Fomulasi pada sediaan salep akan mempengaruhi jumlah dan kecepatan zat aktif yang akan diabsorpsi. Zat aktif dalam sedian salep masuk ke dalam basis atau pembawa yang akan membawa obat untuk kontak dengan permukaan kulit. Bahan pembawa yang digunakan untuk sedian topikal akan memiliki efek yang menguntungkan jika dipilih secara tepat (Lachman & Lieberman, 1994).

Salah satu tanaman herbal yang berperan dalam proses penyembuhan luka ialah meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Tumbuhan ini dapat ditemukan hampir di seluruh wilayah indonesia. Studi fitokimia meniran yang ditandai dan adanya berbagai senyawa seperti lignan, filantin, hypofilantin, flavonoid, glycosinoid, dan tannin (Hakim & Obydul, 2016). Herba meniran juga

memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiinflamasi, antihistamin, antijamur, dan antimikroba (Kaur, 2017).

Berdasarkan aktivitas yang dimiliki meniran (*Phyllanthus niruri* L.), maka perlu dikembangkan menjadi suatu sediaan farmasi untuk meningkatkan penggunaannya. Upaya ini dilakukan untuk mempermudah penggunaan senyawa aktif yang ada pada meniran (*Phyllanthus niruri* L.) sebagai penyembuhan luka maka dibuat formulasi suatu sediaan topikal berupa salep. Bentuk sediaan salep tepat untuk pengobatan pada kulit karena kontak antara obat dengan kulit lebih lama serta mempunyai konsistensi yang sesuai sehingga mudah untuk digunakan (Sari, 2013).

Pada penelitian sebelumnya uji salep fraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan konsentrasi 10 % dapat memberikan pengaruh terhadap penyembuhan luka pada tikus putih jantan terlihat pada penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan persentase kadar hidroksiprolin, dimana perlakuan dengan konsentrasi 10 % memiliki efek penyembuhan luka lebih baik (Weli, 2021). Sementara menurut penelitian yang dilakukan oleh Siahaan et al., 2017 bahwa pemberian gel ekstrak daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) meningkatkan epitelisasi jaringan luka pada tikus putih wistar jantan. Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melanjutkan penelitian tentang pengaruh pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) konsentrasi 10% terhadap ekspresi TNF- α tikus putih jantan. Parameter yang diamati berupa persentase luas penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ada pengaruh pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan konsentrasi 10% terhadap persentase penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan.

2. Apakah ada pengaruh lama pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L) dengan konsentrasi 10% pada hari ke 5, 10, 15 terhadap persentase penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L) dengan konsentrasi 10% terhadap persentase penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan.
2. Untuk mengetahui pengaruh lama pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran (*Phyllanthus niruri* L) dengan konsentrasi 10% pada hari ke 5, 10, 15 terhadap persentase penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi gambaran ekspresi TNF- α mengenai pengaruh penyembuhan luka eksisi terhadap pemberian salep subfraksi etil asetat daun meniran.
2. Dapat menambah pengalaman dan ilmu pengetahuan bagi peneliti sendiri.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjaun Tanaman Meniran (*Phyllanthus niruri* L)

2.1.1 Klasifikasi

Menurut aspan (2010) tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dapat di klasifikasikan sebagai berikut:



Sumber : (Feriska, 2020)

Gambar 1. Daun Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida (<i>Dicotyledoneae</i>)
Sub kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiales
Genus	: <i>Phyllanthus</i> (L) Murr.
Spesies	: <i>Phyllanthus niruri</i> L.

2.1.2 Sinonim

Nama lain dari meniran (*Phyllanthus niruri* L.) adalah *Phyllanthus amarus* Schum, *Phyllanthus swartzii* Kostel dan *Phyllanthus nanos* Hook. f (Aspan, 2010).

2.1.3 Nama Daerah

Sidukuang anak (Minang); *Memeniran, meniran* (Jawa); *Gosau ma dungi* (Maluku)
(Dalimartha, 2008).

2.1.4 Morfologi Meniran

Merupakan semak semusim yang tegak, tinggi 30-100 cm hingga 1 m. batang hijau, bulat, licin, tak berambut, diameter ± 3 mm. Daun tunggal tapi tersusun seperti daun mejemuk, berseling, anak daun 15-24, bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, panjang $\pm 1,5$ mm, lebar ± 7 mm, tepi rata, hijau. Bunga tunggal, dekat tangkai daun, menggantung, putih, daun kelopak bentuk bintang, benang sari dan putih tidak tampak jelas, mahkota kecil, putih. Buah kotak, bulat, pipih, diameter ± 2 mm, hijau keunguan. Biji kecil, keras, bentuk ginjal, coklat. Akar tunggang, putih kotor (Arbain dkk, 2014).

2.2 Tinjauan Farmakologi

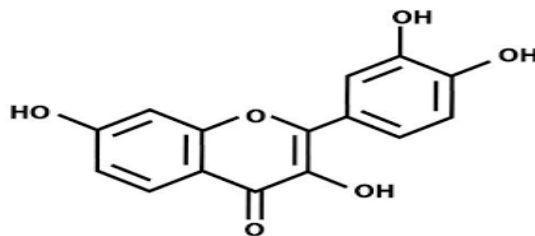
Efek farmakologi meniran (*phyllanthus niruri* L.) diantaranya peluruh air seni (diuretic), pembersih hati, antiradang, pereda demam, peluruh dahak, peluruh haid, penerang penghilatan, penambah nafsu makan, astringent, obat dysuria, gonorrhoe, sifilis, nyeri ginjal, tetanus, pembersih darah dan diare, sedangkan akar meniran untuk nyeri perut dan sakit gigi (Arief, 2011). Selain itu meniran juga memiliki untuk sebagai imunomodulator, antispasmodic, antilitik (untuk batu ureter dan empedu), penghilang rasa nyeri, antihipertensi, antiviral, antibakteri, antimutagenik dan juga efek hipoglikemia (lestari, 2015).

Tabel 1. Kandungan daun meniran yang memiliki efek dalam proses dalam penyembuhan luka diantaranya (Kaur, 2017):

Kandungan Kimia	Efek Terapi
Cyanidin	Antioksidan, antiinflamasi, photoprotective, antineurodegenerative skin
Flavonoid, alkaloid, lignin, delphinidin	Antioksidan, anti inflamasi, antihistamin
Malvidin	Anti inflamasi dan antikarsinogenik
Kaempferol	Antioksidan, anti inflamasi, antibakteri, anti kanker
Flavonol	Antioksidan, antikarsinogenik, antiviral, dan antiplatelet.
Antosianidin	Antioksidan, antiinflamasi, dan antimikroba.
Quercetin	Anti virus, antibakteri, antikanker, antiinflamasi
Saponin, triterpenoid	Antimikroba

2.3 Tinjauan Kimia

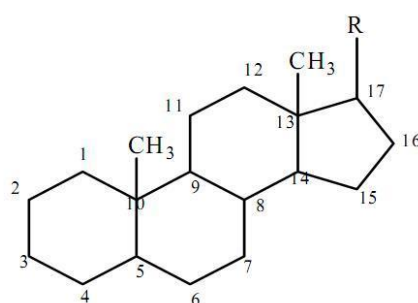
1. Flavonoid



Gambar 2. Struktur kimia flavonoid (Arifin dkk, 2018)

Flavonoid merupakan suatu senyawa polar dengan adanya gugus hidroksil bebas, sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti methanol, etanol, butanol dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid lebih mudah larut dalam air. Sedangkan aglikon yang kurang polar seperti flavon yang termotoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut non polar seperti eter dan kloroform (arifin dkk, 2018).

2. Steroid



Gambar 3. Struktur Kimia Steroid (Arifin dkk., 2018)

Steroid adalah senyawa triterpenoid yang dasarnya sistem cincin siklopentanoperhidropenatren. Senyawa ini tersebar luas di alam dan mempunyai fungsi biologis yang sangat penting misalnya untuk antiinflamasi (Arifin dkk, 2018).

Beberapa jenis senyawa steroid yang digunakan dalam dunia obat-obatan antara lain estrogen merupakan jenis steroid hormon seks yang digunakan untuk konsentrasi sebagai penghambat ovulasi, progestin merupakan steroid sintetik digunakan untuk mencegah keguguran dan uji kehamilan, glikokortikoid sebagai antiinflamasi, alergi, demam, leukemia, dan hipertensi serta kardenolida merupakan steroid glikosida jantung digunakan sebagai obat diuretik dan penguat jantung (Arifin dkk, 2018).

2.4 Tinjauan Farmasetik

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) digunakan masyarakat sebagai bahan baku obat tradisional dan dikembangkan dalam bentuk sediaan farmasi seperti obat paten dalam bentuk tablet *effervenset* dengan nama sediaan promono, dalam bentuk kapsul dan juga sirup dengan

nama sediaan stimuno yang khasiatnya membantu merangsang tubuh memproduksi lebih banyak antibody dan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh agar daya tahan tubuh bekerja optimal dan membantu sistem imun tubuh agar bekerja lebih aktif sehingga kekebalan tubuh meningkat (Sari, 2013).

2.5 Tinjauan Umum Kulit

2.5.1 Pengertian Kulit

Kulit adalah suatu organ yang membungkus seluruh permukaan luar tubuh, merupakan organ terberat dan terbesar dari tubuh. Berat seluruh kulit sekitar 16 % dari bobot tubuh. Ketebalan kulit tergantung dari letak, umur, jenis hewan, dan jenis kelamin. Secara embriologi, kulit berasal dari dua lapis yang berbeda. Lapisan luar adalah epidermis yang merupakan lapisan epitel dan berasal dari ektodermis, sedangkan lapisan dalam berasal dari mesodermis adalah dermis atau korium dan merupakan suatu lapisan jaringan ikat (Wahyuni, 2016).

2.5.2 Fungsi Kulit

Kulit berfungsi sebagai:

1. Proteksi: lapisan epidermis tebal, bersama dengan selubung anti-airnya, serta kandungan pigmen, melindungi terhadap sinar ultraviolet (UV), stress mekanis, termal dan kimia. Serta mencegah dehidrasi dan invasi oleh mikroorganisme.
2. Sensasi: melalui reseptor untuk raba, tekan, nyeri dan suhu.
3. Termoregulasi: perubahan sirkulasi perifer darah untuk mengatur suhu tubuh, begitu pula untuk kelenjer, rambut dan jaringan adiposa.
4. Fungsi metabolik: area kulit melakukan fotosintesis vitamin D, dan lipid, termasuk trigliserida (lipid netral) (Peckham, 2014).

2.5.3 Bagian-Bagian Kulit

1. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan teratas pada kulit manusia dan memiliki tebal yang berbeda-beda: 400-600 μm untuk kulit tebal dan 75-150 μm untuk kulit tipis. Epidermis yang paling tipis yaitu di kelopak mata dan yang paling tebal yaitu pada bagian yang sering digunakan seperti telapak tangan dan kaki.

2. Dermis

Dermis yaitu lapisan kulit dibawah epidermis, memiliki ketebalan yang bervariasi tergantung pada daerah tubuh dan mencapai maksimum 4mm di daerah punggung. Lapisan ini menjadi ujung saraf perasa, masing-masing saraf perasa memiliki fungsi tertentu seperti saraf dengan fungsi mendeteksi rasa sakit, sentuhan, tekanan, panas dan dingin. Lapisan ini mengandung akar rambut, pembuluh darah, kelenjer dan saraf. Lapisan dermis juga mengandung saraf yang elastis sehingga dapat membuat kulit yang dikerutkan akan kembali ke bentuk semula.

3. Hipodermis

Pada bagian bawah dermis, terdapat suatu jaringan ikat longgar yang disebut jaringan hipodermis atau subkutan dan mengandung sel lemak yang bervariasi. Lapisan subkutan adalah lapisan yang paling dalam pada struktur kulit. Pada lapisan kulit ini terdapat saraf, pembuluh darah dan limfe. Fungsi ini adalah melindungi tubuh dari benturan fisik dan mengatur panas tubuh.

2.6 Tinjauan Umum Luka

2.6.1 Definisi Luka

Luka didefinisikan sebagai gangguan dari seluler, anatomi dan fungsi yang berkelanjutan dari jaringan hidup yang disebabkan oleh trauma fisik, kimia, suhu, mikroba, atau imunologi yang mengenai jaringan (Thakur *et al.*, 2011).

Luka adalah suatu keadaan kerusakan jaringan dan dapat mengenai struktur yang lebih dalam dari kulit seperti, saraf, otot, atau membran. Luka atau kerusakan kulit dan jaringan dibawahnya dapat disebabkan oleh :

1. Trauma mekanis yang disebabkan oleh terpotong, tergesek, terpukul, terkepit, dan tebentur.
2. Trauma elektris yang disebabkan oleh cidera akibat listrik dan petir.
3. Trauma termis yang disebabkan oleh panas atau dingin.
4. Trauma kimia yang disebabkan oleh zat asam atau basa dan zat iritatif lainnya (Karataka *et al.*, 1995).

2.6.2 Jenis-jenis luka

A. Jenis luka berdasarkan penyebabnya (Al-Muqsith, 2015)

Menurut (Al-Muqsith, 2015) jenis luka berdasarkan penyebabnya, yaitu:

a. Luka lecet (*Vulnus excoriati*)

Luka ini akibat gesekan dengan benda keras misalnya terjatuh dari motor sehingga terjadi gesekan antara anggota tubuh dengan aspal. Dimensi luka yaitu hanya memiliki panjang dan lebar, namun biasanya mengenai ujung-ujung syaraf nyeri dikulit sehingga derajat nyeri biasanya lebih tinggi dibanding luka robek.

b. Luka sayat (*Vulsum scissum*)

Jenis luka ini disebabkan oleh sayatan benda tajam misalnya logam atau kayu. Luka yang dihasilkan tipis dan kecil, yang juga bisa disebabkan karena disengaja dalam proses pengobatan.

c. Luka robek atau perit (*Vulsum laceratum*)

Luka jenis ini biasa karena benda keras yang merusak permukaan kulit misalnya terjatuh, terkena ranting pohon, atau batu sehingga menimbulkan robekan pada kulit. Dimensi luka panjang, lebar, dan dalam.

d. Luka tusuk (*Vulsum punctum*)

Luka terjadi akibat tusukkan benda tajam, berupa luka kecil dan dalam. Pada luka ini perlu diwaspadai adanya bakteri *Clostridium tetani* benda tajam/logam yang menyebabkan luka.

e. Luka gigitan (*Vulsum morsum*)

Luka jenis ini diakibatkan gigitan gigi, baik oleh manusia ataupun binatang seperti serangga, ular, dan binatang buas. Perlu diwaspadai luka akibat gigitan dari ular berbisa yang berbahaya.

f. Luka bakar (*Vulsum combustion*)

Luka atau kerusakan jaringan yang timbul karena suhu tinggi. Penanganan jenis luka ini disarankan pada empat stadium luka dan persentase permukaan tubuh yang terbakar.

B. Berdasarkan Mekanisme Terjadinya Luka (Nasution, 2015)

a. Luka Insisi (*Incised Wound*), terjadi karena teriris oleh instrumen yang tajam. Misalnya yang terjadi akibat pembedahan.

b. Luka Memar (*Contusion Wound*), terjadi akibat benturan oleh suatu tekanan dan dikarakteristikan oleh cedera pada jaringan lunak, pendarahan dan bengkak.

c. Luka Lecet (*Abraded Wound*), terjadi akibat bergesekan dengan benda lain yang biasanya dengan benda yang tidak tajam.

d. Luka Tusuk (*Punctured Wound*), terjadi akibat adanya benda. Seperti peluru atau pisau yang masuk kedalam kulit dengan diameter yang kecil.

e. Luka Gores (*Lacerated Wound*), terjadi karena tergores benda yang tajam, seperti tergores kaca atau kawat.

f. Luka Tembus (*Penetrating Wound*), yaitu luka yang menembus organ tubuh biasanya pada bagian awal luka masuk diameternya kecil tetapi pada bagian ujung lukanya akan melebar.

g. Luka Bakar (*Combustio Wound*).

h. Luka Gigitan Hewan, disebabkan karena adanya gigitan dari hewan liar atau hewan peliharaan. Hewan liar yang biasanya menggigit adalah hewan yang ganas dan memakan daging, yaitu dalam usaha untuk membela diri.

i. Luka Eksisi (*Excised Wound*), luka yang diakibatkan terpotongnya jaringan oleh benda tajam.

2.6.3 Fase penyembuhan luka

Fase penyembuhan luka dibagi menjadi tiga fase, yaitu : (Kartika, 2015)

1. Fase inflamasi

- a. Hari ke 0 sampai 5.
- b. Respons segera setelah terjadi injuri berupa pembekuan darah untuk mencegah kehilangan darah.
- c. Karakteristik: tumor, rubor, dolor, color, functio laesa.
- d. Fase awal terjadi hemostasis.
- e. Fase akhir terjadi fagositosis.
- f. Lama fase ini bisa singkat jika tidak terjadi infeksi.

2. Fase Proliferasi atau Epitelisasi

- a. Hari ke 3 sampai 21.
- b. Disebut juga fase granulasi karena adanya pembentukan jaringan granulasi: luka tampak merah segar, mengkilat.

- c. Jaringan granulasi terdiri dari kombinasi: fibroblas, sel inflamasi, pembuluh darah baru, fibronectin, dan asam hialuronat.
- d. Epitelisasi terjadi pada 24 jam pertama ditandai dengan penebalan lapisan epidermis pada tepisan luka.
- e. Epitelisasi terjadi pada 48 jam pertama pada luka insisi.

3. Fase Maturasi atau Remodeling

- a. Berlangsung dari beberapa minggu sampai 2 tahun.
- b. Terbentuk kolagen baru yang mengubah bentuk luka serta peningkatan kekuatan jaringan (*tensile strength*).
- c. Terbentuk jaringan parut (*scar tissue*) 50-80% sama kuatnya dengan granulasi : luka tampak merah segar, mengkilat.
- d. Jaringan granulasi terdiri dari kombinasi : fibroblas, sel inflamasi, pembuluh darah, fibronectin, dan asam hialuronat.
- e. Epitelisasi terjadi pada 24 jam pertama ditandai dengan penebalan lapisan epidermis pada tepian luka.
- f. Epitelisasi terjadi pada 48 jam pertama pada luka insisi.

2.6.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka tidak hanya sebatas pada proses regenerasi yang bersifat lokal saja pada luka, namun dipengaruhi pula oleh faktor intrinsik dan faktor ekstrinsik.

1. Faktor intrinsik adalah faktor dari penderita yang dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan meliputi usia, status nutrisi, hidrasi, oksigenasi dan perfusi jaringan, status imunologi, dan penyakit penyerta (hipertensi, DM, atherosclerosis).
2. Faktor ekstrinsik adalah faktor yang didapat dari luar penderita yang dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan luka, meliputi pengobatan, radiasi, stress psikologi, infeksi, iskemia dan trauma jaringan.

2.7 Tinjauan Umum Salep

2.7.1 Defenisi Salep

Salep merupakan sediaan semisolid yang lunak, mudah dioleskan, dan digunakan sebagai obat luar pada kulit dan membran mukosa (Allen, 2002). Pelepasan sebagai obat dari basis maupun dari bahan obatnya, kelarutan, viskositas, ukuran partikel, homogenitas, dan formulasi. Formulasi sediaan salep yang bersifat oklusif mengandung basis yang berlemak dengan pengemulsi air dalam minyak atau minyak dalam air (Aulton, 2007).

2.7.2 Penggolongan Salep

- a. Zat yang dapat dilarutkan dalam dasar air

Umumnya kelarutan obat dalam minyak lemak lebih besar dari pada dalam vaselin lebih mudah dilarutkan dengan cara digerus dalam mortir dengan minyak lemak.

- b. Zat yang mudah larut dalam air

Bila massa salep mengandung air dan obatnya dapat larut dalam air yang tersedia maka obatnya dilarutkan dulu dalam air dan dicampur dengan bagian dasar salep yang dapat menyerap air.

- c. Zat-zat yang kurang larut atau tidak larut dalam dasar salep

Zat-zat diserbukkan dulu dengan derajat halus serbuk pengayak no 100 setelah itu serbuk dicampur baik. Baik dengan nama berat massa salep atau salah satu bahan dasar salep (Anif, 2004).

2.7.3 Kualitas Dasar Salep

1. Stabil, selama masih dipakar mengobati maka salep harus bebas inkompatibilasi, stabil pada suhu kamar dan kelembapan yang ada didalam kamar.
2. Lunak, yaitu semua zat dalam keadaan halus dan seluruh produk menjadi lunak dan homogen.

3. Mudah dipakai, umumnya salep tipe emulsi adalah yang paling mudah dipakai dan dihilangkan dari kulit.
4. Dasar salep yang cocok yaitu dasar yang salep yang halus kompatibel secara fisika dan kimia dengan obat yang dikandungnya.
5. Terdistribusi merata, obat harus terdistribusi merata melalui dasar salep padat atau cair pada pengobatan (Anief, 2003).

2.7.4 Pembagian Dasar Salep

1. Dasar salep hidrokarbon

dasar salep yang bersifat lemak (bebas air), preparat yang berair mungkin dapat dicampur hanya dalam jumlah sedikit saja bila lebih minyak sukar tercampur.

2. Dasar salep adsorpsi

Pencampuran larutan berair, hasil dari pembentukan emulsi air dan minyak.

3. Dasar salep yang dapat dibersihkan dengan air

Dasar salep yang dapat dibersihkan dengan air merupakan emulsi minyak dalam air yang dapat dicuci dari kulit dengan air.

4. Dasar salep larut dalam air

5. Tidak seperti dasar salep yang tidak larut dalam air, yang mengandung (Ansel, 1989).

2.8 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penghilangan senyawa-senyawa kimia yang larut dengan cara memisahkannya dari bahan-bahan yang tidak larut dengan menggunakan pelarut cair. Banyak metode yang digunakan dalam proses ekstraksi, baik dingin maupun panas. Metode dingin melibatkan maserasi dan perkolasi, sedangkan metode panas melibatkan refluks, peleburan, infus, perebusan, sokletasi (Yulianti D, Susilo B, 2014). Sampel diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol disimpan selama 24 jam pada suhu kamar (W. Wahyuni *et al.*, 2021).

2.9 Metode Fraksi

Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa berdasarkan derajat kepolarannya. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda-beda tergantung dari jenis tanamannya. Dalam prakteknya, fraksinasi dilakukan dengan dua metode yaitu menggunakan corong pisah dan kromatografi kolom (Winna, 2014).

2.10 Metode Subfraksi

Hasil ekstraksi dan fraksinasi biasanya masih berupa campuran beberapa senyawa yang harus dipisahkan menjadi beberapa bagian sederhana dan tunggal. Biasanya pemutusan koneksi dapat dilakukan dengan Teknik kromatografi. Kromatografi adalah Teknik analisis yang banyak digunakan untuk pemisahan komponen internal. Semua metode kromatografi didasarkan pada komponen antara keduanya. Fase yang tidak bercampur adalah fase diam dan fase gerak, mekanisme komponen dapat dibagi menjadi dua fase dihasilkan dari penyerapan, partisi, reaksi pertukaran ion dan difusi komponen ke dalam pori-pori fase padat, yang mengarah ke pemisahan (Harbone, 1987).

2.11 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari nama “*immune*” yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibodi dan “*histo*” menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi *biomarker* ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Ramos-Vara, 2005). Untuk memvisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering digunakan ialah dengan konjugasi

antibodi dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga bisa digunakan fluorophore seperti fluorescen atau rhodamin. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003).

Imunohistokimia merupakan gabungan antara histologi atau sitologi dan imunologi. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi diikat oleh suatu penanda (marker) berupa fluoresin, enzim, bahan partikel, atau isotop yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat 2002; Setijanto 2002).

2.11 TNF- α

Menurut Kumar et al (2007), sitokin adalah produk polipeptida dari banyak jenis sel yang melakukan fungsi sel lainnya. Tumor Necrosis Factor Alpha adalah sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. Tumor Necrosis Factor (TNF) disebut TNF- α untuk membedakannya dengan TNF- β atau limfotoksin. Tumor Necrosis Factor Alpha dapat dihasilkan oleh makrofag, sel T yang diaktifkan oleh antigen, sel NK dan mast cell. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresi TNF- α . Interferon Gamma (IFN- γ) yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF- α (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Tumor Necrosis Factor Alpha memiliki berbagai fungsi dalam proses inflamasi kesembuhan luka, yaitu meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam pengaturan aktivitas makrofag dan respon imun

dalam jaringan dengan merangsang growth factor lain dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dan hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta sel 20eutrophil dan makrofag (Supit dkk., 2015). Bersama IL-1, TNF- α menginduksi respon inflamasi akut sistemik, terutama pada kondisi infeksi atau cedera. Respon tersebut antara lain adalah munculnya demam, sintesis hepatic berbagai protein, pembuangan secara metabolik (kaheksia), pelepasan neutrofil ke dalam sirkulasi dan pelepasan hormon adenokortikotropik (menginduksi sintesis dan pelepasan kortikosteroid). Tumor Necrosis Factor Alpha juga menyebabkan terjadinya efek hipotensif pada syok septik, termasuk berkurangnya kontraktilitas miokard dan relaksasi otot polos pembuluh darah (Kumar et al., 2007). Tumor Necrosis Factor Alpha dibutuhkan pada proses kesembuhan luka karena berperan penting sebagai mediator pro-inflamasi. Semakin tinggi kadar TNF- α pada luka, menandakan proses inflamasi yang sedang berlangsung. Semakin rendah kadar TNF- α pada luka, menandakan keadaan luka yang mulai mencapai kesembuhan. Tumor Necrosis Factor Alpha berfungsi pada saat migrasi sel leukosit, apoptosis sel, sintesis MMP dan mempengaruhi apoptosis fibroblast (Chen and Goddel, 2003).

BAB III. METODA PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan dari bulan Mei sampai Agustus 2023 di Laboratorium penelitian Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kandang tikus, kapas, pencukur bulu, gunting, pipet tetes, penggaris, silet(tiger), timbang digital, timbangan hewan, sarung tangan, masker, oven, batang pengaduk, pisau, pinset, gelas ukur, *beaker glass*, penjepit, spatel dan stik pH universal, rotary microtome, Heat induced epitope, microwave, deck glass.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah makanan dan minuman tikus, etanol 100%, 96%, 70%, aquades, vaselin flavum, salep tekasol, salep subfraksi etil asetat daun meniran 10%, isofluren, formalin, poly-L-lysine, deparafinisasi, xylene, distilled water, cutrate buffer pH 6, PBS pH 7,4, H₂O₂, natrium goat serum (NGS), goat anti-rabbit IgG antibody (H+L), biotinylated BA-1000-1,5, avidin biotin, Hcl buffer, hematoksin, entellan.

3.3 Hewan Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus putih jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200 gram memiliki galur wistar sebagai hewan percobaan.

3.4 Prosedur Pembuatan Salep (Penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya)

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun meniran kering (*Phyllanthus niruri* L.) yang diambil di daerah Tampunik, Kenagarian kambang timur, Kecamatan Lengayang, Kabupaten Pesisir Selatan.

3.4.2 Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas Padang.

3.4.3 Pembuatan Subfraksi Etil Asetat Daun Meniran

Sampel kering sebanyak 2,7 kg dihaluskan hingga menjadi serbuk, serbuk simplisia dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3 hari. Kemudian saring hasil maserasi, didapatkan maserat dan ampas, lakukan remaserasi sampai didapat maserat berwarna coklat kebeningan. Maserat yang dihasilkan diuapkan dengan *Rotary Evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental kemudian difraksi menggunakan etil asetat (1:2), fraksi yang dihasilkan diuapkan untuk mendapatkan fraksi etil asetat yang kental.

Selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom untuk mendapatkan subfraksi kental etil asetat daun meniran. Silika gel digunakan sebagai fase diam, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah heksana dan etil asetat dengan perbandingan (2:1). Hasil kromatografi kolom yang diperoleh dikelompokkan berdasarkan pola bercak noda dan pemantauan nilai R_f , pemantauan dilakukan menggunakan pelat KLT yang dielusi dengan sebagai fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1).

3.4.4 Evaluasi Subfraksi Etil Asetat

1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan dilakukan dengan cara visual yaitu dengan mengamati bentuk, warna, dan bau (Depkes, 1995).

2. Penentuan Randemen Subfraksi

Randemen subfraksi dihitung dengan cara persamaan:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat serbuk subfraksi}}{\text{Bobot fraksi kental}} \times 100 \%$$

3. Pemeriksaan Susut Pengeringan

Keringan krus porselen dan tutupnya di dalam oven pada suhu 105⁰ C selama 30 menit, dan biarkan dingin lalu ditimbang beratnya. Masukkan Subfraksi ke dalam krus tersebut hingga beratnya 1-2 gram diluar berat krus dengan penutup yang telah diketahui sebelumnya. Krus digoyang secara perlahan agar ekstrak merata dan masukkan kembali kedalam oven, buka tutupnya dan biarkan tutup tetap berada di dalam oven. Krus yang berisi subfraksi dipanaskan dalam oven dengan suhu 105⁰ C sampai berat konstan. Setelah itu krus dikeluarkan dan didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang. Lakukan pengulangan seperti cara diatas hingga diperoleh berat yang konstan (Depkes,1995).

Hitung susut pengeringan dengan rumus :

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{(B-A)-(C-A)}{(B-A)} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = Berat Krus Kosong

B = Berat Krus + Subfraksinasi Etil Asetat Sebelum Pengeringan

C = Berat Krus + Subfraksinasi Etil Asetat Setelah Pengeringan

4. Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Kimia

Subfraksi etil asetat dari daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml aquadest dan 5 ml kloroform asetat, dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan (Harborne, 1987).

a. Uji Flavonoid (Metode “Sianidin Test”)

Ambil lapisan air 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan serbuk Mg dan HCl (p), terbentuknya warna merah menandakan adanya Flavanoid.

b. Uji Saponin

Ambil lapisan air, kemudian kocok kuat-kuat dalam tabung reaksi, maka terbentuknya busa yang permanen ($\pm$ 15 menit) menunjukkan adanya saponin.

c. Uji Terpenoid dan Steroid (Metode “Simes”)

Ambil sedikit lapisan kloroform dengan menggunakan pipet tetes yang didalamnya telah terdapat kapas dan norit. Teteskan filtrat pada plat tetes. Biarkan mengering. Residu ditambahkan 1 tetes asam anhidrat dan 2 tetes H_2SO_4 (p), terbentuknya warna biru ungu menandakan adanya steroid, bila terbentuk warna merah menunjukkan adanya terpenoid.

d. Uji Alkaloid (Metode “Culvenore-Fristgerald”)

Ambil sedikit lapisan kloroform dan tambahkan 10 ml kloroform amoniak 0,05 N, aduk secara perlahan lalu tambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 2N kemudian dikocok perlahan, dan diamkan hingga terpisah. Lapisan asam ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih

e. Uji Fenolik

Ambil lapisan 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan pereaksi $FeCl_3$ terbentuknya warna biru menandakan adanya kandungan fenolik.

3.4.5 Pembuatan salep subfraksi

Sediaan salep yang akan dibuat dalam penelitian ini memiliki konsentrasi subfraksi etil asetat meniran 10% dan sediaan yang akan dibuat sebanyak 30 g. Masukkan subfraksi daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang telah ditimbang sebanyak 3 gram kedalam lumpang, kemudian timbang dasar salep sebanyak 27 g masukkan kedalam lumpang dan kemudian digerus hingga homogen. Keluarkan dari lumpang, masukkan kedalam wadah yang disiapkan.

3.4.6 Evaluasi Salep Subfraksi Daun Meniran

1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan dilakukan dengan cara visual yaitu dengan mengamati bentuk, warna, dan bau (Depkes RI, 1995).

2. Pemeriksaan Homogenitas

Pemeriksaan dilakukan dengan cara 0,1 gram massa sediaan dioleskan pada kaca objek, lalu ratakan dengan kaca objek lain dengan kemiringan 45⁰, ditarik secara cepat dengan tekanan yang sama. Susunannya diamati dibawah mikroskop tidak terlihat butir-butir kasar (Depkes RI, 1995).

3. Pemeriksaan pH Salep

Pengukuran nilai pH menggunakan alat bantu stik pH universal yang dicelupkan kedalam 0,5 gr salep. Nilai pH salep yang baik adalah 4,5 - 6,5 atau sesuai dengan nilai pH kulit manusia. (Depkes RI, 1995).

3.5. Penyiapan Hewan Percobaan

Pengujian pengaruh pemberian subfraksi etil asetat pada meniran terhadap penyembuhan luka dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan tikus putih jantan dengan bobot ± 200

gram. Sebanyak 27 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok besar, maka masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Dari 3 kelompok besar tersebut dikelompokkan lagi berdasarkan hasil pemeriksaan efek penyembuhan luka. Pemeriksaan tersebut dilakukan pada hari ke 5, 10, 15 setelah tikus diberikan luka eksisi. Sebelum digunakan tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 7 hari. Hewan dinyatakan sehat dimana selama aklimatisasi tidak menunjukkan penyimpangan berat badan lebih dari 10% dan secara visual tidak terdapat gejala penyakit.

3.5.1 Pembuatan Luka

Sehari sebelum pembuatan luka, hewan percobaan dicukur bulunya pada bagian punggung yang akan dibuat sayatan kemudian dibersihkan dengan menggunakan kapas yang diberi alkohol 70%, kemudian dilakukan anastesi pada tikus dengan menggunakan isofluran. Selanjutnya dibuat luka yang berbentuk lingkaran dengan diameter ± 2 cm dengan kedalaman ± 1 mm dengan cara mengangkat kulit tikus pada bagian punggung dengan pinset lalu dilukai dengan gunting bedah (Cahaya dkk, 2017).

Pada penelitian ini, tikus dibagi menjadi 3 kelompok dimana masing-masing tikus diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Pembagian kelompok tersebut yaitu:

1. Kelompok I (kontrol) ialah kelompok tikus yang akan diberi luka tanpa diberikan pengobatan dan hanya dioleskan basis salep pada luka dan periksa persentase luas penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan di hari ke 5, 10, dan 15.
2. Kelompok II (pembanding) ialah kelompok tikus yang akan dioleskan sediaan salep yang beredar yaitu Tekasol[®] pada luka dan diperiksa persentase luas penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan di hari ke 5, 10, dan 15.

3. Kelompok III (perlakuan) ialah kelompok tikus yang dioleskan salep subfraksi dengan konsentrasi 10% pada luka dan diperiksa persentase luas penyembuhan luka, waktu epitelisasi, dan ekspresi TNF- α pada tikus putih jantan di hari ke 5, 10, dan 15.

3.5.2 Pengujian Aktivitas Penyembuhan Luka

1. Sediaan salep dioleskan pada bagian punggung tikus sebanyak 2 kali pengolesan/hari.
2. Sediaan salep diberikan pada kelompok tikus yang telah dikelompokkan.
3. Selanjutnya dilakukan pengamatan parameter penyembuhan luka (cahaya dkk, 2017).

3.5.3 Parameter Penyembuhan Luka

Persentase luas penyembuhan luka dengan menghitung luas luka pada hari pertama setelah dilukai kemudian pada hari ke 5, 10 dan 15 pada masing-masing kelompok.

Dicari persentase penyembuhan lukanya dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Luas Penyembuhan Luka} = \frac{\text{Luas luka awal} - \text{Luas luka akhir}}{\text{Luas luka awal}} \times 100\%$$

3.5.4 Waktu Epitelisasi

Waktu yang diperlukan untuk terbentuknya epitel baru yang sempurna menutupi daerah luka. Dalam hal ini dicatat hari pengelupasan jaringan keropeng dari luka tanpa meninggalkan sisa luka di area eksisi (Amanda, 2017).

3.5.5 Pengamatan Imunohistokimia

a. Prosedur pewarnaan imunohistokimia

Paraffin blok dipotong dengan rotary microtome dengan ketebalan 4 μ m, dan di letakkan diatas kaca yang dilapisi Poli-L-lysine. Setelah itu Deparafinisasi dengan Xylene, kemudian rehidrasi dengan alkohol bertingkat dimulai dengan ethanol 100%, 96%, 70%, distilled water masing-masing 5menit. Epitope retrieval dengan Heat induced epitope retrieval menggunakan microwave selama 10 menit didalam Citrate buffer pH 6. Washing dalam PBS pH 7,4 3x5 menit. Endogen peroksidase blocking dengan 3% H2O2 dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit, dilanjutkan dengan 0,3% H2O2 dalam PBS pH 7,4 selama 30 menit. Washing dalam PBS pH

7,4 3x5 menit. Non spesific protein block dengan 2% Normal Goat serum (NGS) dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit pada suhu ruang. Aplikasi antibody primer dan inkubasi didalam humid chamber overnight 4 °C. TNF α ; dilusi 1;100 (TNF alpha Polyclonal Antibody), Washing dalam PBS pH 7,4 3x5 menit. Inkubasi dengan secondary antibody pada suhu ruang selama 30 menit menggunakan Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated BA-1000-1.5, dilusi 1;100 . Washing dalam PBS pH 7,4 3x5 menit. Inkubasi dengan kompleks avidin biotin pada suhu ruang selama 30 menit, pada suhu ruang selama 30 menit. Aplikasi chromogen DAB dalam Tris HCl buffer pH 7,6. Pencucian dengan distilled water selama 3x5 menit. Counterstaining dengan hematoksin. Pencucian dengan distilled water selama 10 menit. Counterstaining dengan hematoksin. Pencucian dengan distilled water selama 10 menit. Bluing dalam larutan jenuh lithium carbonate. Pencucian dengan distilled water selama 10 menit. Dehidrasi dalam alkohol bertingkat; dimulai dengan ethanol 70%, 96%, 100%, masing-masing 5 menit. Clearing dalam Xilene 2 x 5 menit. Mounting deck glass dengan entellan

b. Prosedur penilaian ekspresi TNF alpha pada pewarnaan immunohistokimia

Ekspresi TNF alpha tampak sebagai warna coklat pada pewarnaan immunohistokimia. Pola pewarnaan TNF alpha berupa pewarnaan matriks, dan sitoplasmic, dengan warna coklat terdeteksi pada matriks ekstraseluler dan sitoplasma sel. Pengukuran area dilakukan dengan pengambilan fotomikrograf pada perbesaran 400x (objective 40x), pada 5 lapang berbeda, pada area jaringan granulasi paska luka. Pengukuran ekspresi dilakukan dengan mengukur proporsi area (fraksi stained area) terwarnai coklat, dengan mengisolasi area terwarnai coklat, konversi binary dan pengukuran proporsi area program ImajeG (ImageJ 1.49v software, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Luas area terwarnai positif dilaporkan dalam persen area

3.5.4 Analisa Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisis varian (ANOVA). ANOVA ini digunakan karena data yang diperoleh bersifat objektif, kategorik, dan numerik. Pada penelitian ini data dari parameter penyembuhan luka yaitu hasil persentase luas penyembuhan luka dan imunohistokimia digunakan dengan analisa statistik dengan pengujian two-way ANOVA, parameter selanjutnya waktu epitelisasi digunakan dengan analisa statistik menggunakan one-way ANOVA. Jika hasil yang diperoleh signifikan ($p < 0,05$). Analisa data dilanjutkan dengan uji Duncan yang bertujuan untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan hasil antara masing-masing kelompok perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahmat AS. 2014. Luka, Peradangan dan Pemulihan. *Jurnal Entropi*. 9(1): 729-738.
- Al-Muqsih, A. 2015. Luka (*Vulnus*), Fakultas Kedokteran, Universitas Malikussaleh, Tersedia di [repository.uminal.ac.id/4013/Luka\(Vulnus\).pdf](https://repository.uminal.ac.id/4013/Luka(Vulnus).pdf). (diakses tanggal 04 Agustus 2019).
- Amanda, N. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Piladang (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd) Secara Topikal Penyembuhan Luka Eksisi Pada Tikus Putih Jantan. *Skripsi*. Padang: STIFI.
- Annisa. 2021. Efek Penyembuhan Luka Eksisi Salep Subfraksi Etil Asetat Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Konsentrasi 5% Terhadap Tikus Putih Jantan. *Skripsi*. Padang: Universitas Perintis Indonesia.
- Arbain, D., Bakhtiar, A., Putra, D.P., Nurainas. 2014. Review Tumbuhan Obat Sumatera. Padang: Universitas Andalas.
- Aria, M., Arel, A., & Monika, 2015, Uji Efek Antiinflamasi Fraksi Daun Piladang (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd) Terhadap Mencit Putih Betina, *Jurnal Scientia*, 5 (2) : 84-91.
- Arief H. 2011. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Arifin B, Ibrahim S. 2018. Struktur Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. 6(1): 21-29.
- Arimbi, A. Azmijah, R. Darsono, H. Plumeriastuti, T. V. Widiyanto dan D. Legowo. 2013. Buku Ajar Patologi Umum Veteriner Edisi 2. Airlangga University Press. Surabaya.
- Aspan, R. 2010. Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Baratawidjaya, K. G. dan Rengganis I. 2010. Imunologi Dasar Edisi 9. Fakultas Kedokteran UI. Jakarta.
- Cahaya., Herson, H., Pramono., Dwi, A. (2017). Uji Farmakologis Ekstrak Kental Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Untuk Membantu Penyembuhan Luka Sayat Pada Tikus Putih Jantan. *Jurnal Farmamedika*., 2(1), 25–31.
- Chea, G. and D. V. Goeddel. 2002. TNF-R1 Signaling: a Beautiful Pathway. *Science*. 296 (5573) : 1634-1635.
- Dalimartha, S. 2008. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia (edisi 2). Jakarta: Trubus Agriwidya, Anggota IKAPI PT. Pustaka Pembangunan Swadaya Nusantara.
- Depkes RI. 1995. Farmakope Indonesia IV. Jakarta: Depkes RI.
- Djauhari E, Hernani. 2014. Gulma Berkhasiat Obat. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Haq F.F., 2016, Pengaruh Luka Insisi Terhadap Perbandingan Kadar TNF- α pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar, *Skripsi*, Unissula Press.

- Harbone, JB. 1987. *Metoda Fisikokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Bandung: ITB.
- Husaini ed. 2010. Luka dan Perawatan, KTL. *Jurnal of Ners Community*, 6(2), 198-206.
- Kartika. R. W. Perawatan Luka Kronis dengan *Modern Dressing*. Jakarta:RS Gading Pluit. DK-230/ vol. 42 no. 7, th. 2015.
- Kaur N, Kaur B, Sirhindi G. 2017. *Phytochemistry and Pharmacology of Phyllanthus niruri L. Review Phytotherapy Research*. DOI: 10.1002.
- Kurahasi, T dan Fujii, J. 2015. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *Journal of Developmental Biology*. 3:57-70.
- Kumar, V., R. S. Cotran, dan S. L. Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi Edisi 7*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Lachman, L., & Lieberman, A. A. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. Jakarta: UI.
- Lehninger, Albertl. 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lestari IAS. 2015. *Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Tanaman Meniran (Phyllanthus niruri L.)*. Medan: Universitas Sari Mutiara Indonesia
- Madhavi P. 2012. *Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrullus lanatus Seed Oil by In-vivo and In-vitro Models*, *irjpas.Com*. 2(4): 104-108.
- Mathivanan N, Surendiran G, Srinivasan K, Malarvizhi K. *Morinda pubescens JE Smith (Morinda tinctoria Roxb.)*. 2006. *Fruit extract accelerates wound healing in rats. J Med Food*. 4(1): 591-3.
- Maulina, N. (2005). *Penilaian TNF-ALFA pada hati mencit jantan setelah pemberian ekstrak etanol manggis (Garcinia mangostana L.) dengan metode imunohistokimia*. 1–7.
- Nasution N 2015. Uji aktivitas ekstrak etanol umbi talas jepang (*Colocasia esculenta L.*) *Schoot var. antiquorum*) terhadap Penyembuhan Luka Terbuka pada Tikus Putih (*Rottus novvergicus*) Jantan Galur *Sprague Dawley*. UIN: Syarif Hidayatullah.
- Nasution A. I. (2016). *Buku Ajar Biomolekuler Untuk Kedokteran Dasar*. Syiah Kuala Universitas Press. Banda Aceh.
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ozaki, Y., Sekita, S., Soedigdo, S., Harada, M., 1989, *Antiinflammatory effect of Graptophyllum pictum (L.) Griff.*, *Chem Pharm. Bul.l (Tokyo)*, 37 (10), 2799-802.
- Peckham, M. 2014. *At a Glance Histologi. Institute for Molecular and Cellular Biology Faculty of Biological Science, Leeds, Uk* : Penerbit Erlangga.
- Primadina, N., Basori, A., & Perdanakusuma, D. S. (2019). *Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler*. *Qanun Medika - Medical Journal Faculty of Medicine Muhammadiyah Surabaya*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.30651/jqm.v3i1.2198>.

- Priyandari, Y., & Umatjina, S. A. T. M. U. (2015). Getah Pohon Jarak (*Jatropha Curcas*) Topical Mempercepat Lama Penyembuhan Luka Eksisi Mencit. *Journals of Ners Community*, 6(2), 198–206. <http://journal.unigres.ac.id/index.php/JNC/article/view/52>.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspect Of Immunohistochemistry. *Ves. Pathol.* Vol 42: 405-426.
- Rantam, F. A. 2003. Metode imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. 3-88.
- Rismana, E., Rosidah, I., Prasetyawan, Y., Bunga, O., & Erna, Y. 2013. Efektivitas Khasiat Pengobatan Luka Bakar Sediaan Gel Mengandung Fraksi Ekstrak Pegagan Berdasarkan Analisis Hisroksiprolin dan Histopatologi Pada Kulit Kelinci. *Jurnal Buletin Kesehatan*. 41(1): 45–60.
- Samuelsson, Gunnar, 1999, *Drug Of Natural Origin A Teexbook Of Pharmacognosy*, Swedish Pharmaceutical Press, Sweden.
- Sari, WN. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit Putih Jantan. *Skripsi*. Padang: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Shila, G and Natasa, SB. 2008. *Wound Healing Properties of Carica Pepaya Laetex: In Vivo Evaluation in Mice Burn Model*. *Journal of Ethnopharmacology* 121. 338-341.
- Siahaan, M. S. Y., Pangkahila, W., & Aman, I. G. M. (2017). Gel ekstrak daun meniran (*Phyllanthus niruri*) meningkatkan epitelisasi penyembuhan luka pada kulit tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Biomedik (Jbm)*, 9(1), 14–18.
- Supit, I. A., D. H. C. Pagemanan dan S. R. Marunduh. 2015. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF-a) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *Jurnal eBiomedik*. 3 (2) : 640-643
- Thakur, R., Jhain, N., Phatak, R., and Shandu, S. S. 2011. *Practices in Wound Healing Studies Plants*. India: *Jurnal Hindawi Publishing Corporation*.
- Wahyuni, S. 2016. Pengaruh Pemberian Salep Fitoplankton *Chlorella Vulgaris* Terhadap Penyembuhan Luka Sayat (*Incisi*) Pada Mencit (*Mus Musculus Albinus*). *Skripsi*. Makasar: Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
- Weli, H. 2021. Pengaruh Pemberian Salep Subfraksi Etil Asetat Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Kosentrasi 10% Terhadap Penyembuhan Luka Eksisi Pada Tikus Putih Jantan . *Skripsi*. Padang: Universitas Perintis Indonesia.
- Wijaya, Y. A., S. J. R. Kalangi dan M. M. Kaseke. 2015. Gambaran Reaksi Radang Luka Postmortem pada Hewan Coba. *Jurnal e-Biomedik*. 3 (1) : 539- 543

