

PENGARUH *SPRAY* EKSTRAK DAUN SIRIH TERHADAP HISTOPATOLOGI PENYEMBUHAN LUKA

THE EFFECT OF BETEL LEAF EXTRACT SPRAY ON HISTOPATHOLOGY OF WOUND HEALING

Isabella Meliawati Sikumbang, Laela Hayu Nurani , Sapto Yuliani, Citra Ariani Edityaningrum

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta 55166, Indonesia

 laela.farmasi@pharm.uad.ac.id

 <https://doi.org/10.31603/pharmacy.v8i2.6902>

Article info:

Submitted : 15-03-2022

Revised : 21-04-2022

Accepted : 07-06-2022



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Publisher:

Universitas Muhammadiyah Magelang

ABSTRAK

Luka disebut sebagai '*Silent Epidemic*' karena memiliki dampak yang substansial apabila tidak ditangani dengan tepat. Daun sirih diketahui mengandung senyawa yang berpotensi sebagai penyembuh luka. Tujuan penelitian ini untuk menguji aktivitas *spray* ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dalam menyembuhkan luka akut pada mencit Balb/C jantan. Formula *spray* dibuat dengan variasi konsentrasi ekstrak daun sirih sebesar 3% (S1), 5% (S2) dan 7% (S3). Uji aktivitas penyembuhan luka akut yaitu 15 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok S1, S2, S3, P (kontrol positif), dan C (kontrol negatif). Intervensi dan observasi dilakukan selama 14 hari. Hasil observasi dianalisis dengan menghitung rasio luas luka dan ketebalan epitel. Analisis data kemudian dilakukan dengan *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc Tukey Cramer*. Hasil menunjukkan bahwa *spray* ekstrak daun sirih semua konsentrasi mempunyai aktivitas penyembuh luka dan konsentrasi 7% berbeda tidak signifikan terhadap kontrol positif ($p > 0,05$). Kesimpulan pada penelitian ini yaitu *spray* ekstrak daun sirih 3%, 5%, dan 7% berpotensi sebagai penyembuh luka akut, aktivitas penyembuhan yang terbaik ditunjukkan pada konsentrasi 7%.

Kata kunci: *Spray*; *Piper betle* l; Luka akut

ABSTRACT

Wounds are referred to as '*Silent Epidemic*' because they have a substantial impact if not treated properly. Betel leaf is known to contain compounds that may be used as wound healers. The purpose of this study was to test the spray activity of betel leaf extract (*Piper betle* L) in healing acute wounds in male Balb/C mice. Spray formula made with various concentrations of betel leaf extract by 3% (S1), 5% (S2) and 7% (S3). The acute wound healing activity test was 15 mice divided into 5 groups S1, S2, S3, P (positive control), and C (negative control). Interventions and observations were carried out for 14 days. The results of observational analysis by calculating the ratio of wound area then *One Way ANOVA* test and *Post Hoc Tukey Cramer* test. The results showed that spray of betel leaf extract with a concentration of 7% was not significantly different from P ($p > 0.05$). The conclusion in this study is that sprays of betel leaf extract 3%, 5%, and 7% may be used as an acute wound healer, the best healing activity is shown at a concentration of 7%.

Keywords: *Spray*; *Piper betle* l; Acute wound

1. PENDAHULUAN

Kulit adalah organ terbesar dalam tubuh manusia yang berperan penting dalam berbagai proses seperti hidrasi, perlindungan dari bahan kimia dan patogen, inisialisasi sintesis vitamin D, ekskresi, dan regulasi termal, sehingga terjadinya kerusakan pada kulit seperti luka yaitu rusaknya integritas epitel kulit yang disertai dengan gangguan struktur dan fungsi jaringan normal kulit merupakan permasalahan kesehatan yang biasa dialami oleh masyarakat dan berpotensi membahayakan jiwa (Tottoli *et al.*, 2020). Luka akut dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti

pembedahan pada operasi, terkena benda tajam, kecelakaan, dan sebagainya. Apa pun penyebabnya, luka mempunyai dampak yang substansial namun sering kali dianggap remeh dan tidak terlalu diperhatikan, oleh karena itu fenomena luka disebut sebagai 'Silent Epidemic' (Gonzalez et al., 2016; Lindholm & Searle, 2016).

Prevalensi kejadian luka secara global meningkat setiap tahunnya, diperkirakan dalam populasi 1 juta orang, terdapat sekitar 3500 orang hidup dengan luka, 525 di antaranya mengalami luka selama lebih dari 1 tahun, hal ini juga mengakibatkan meningkatnya biaya pengobatan yang diperkirakan menghabiskan hampir 3% dari total biaya sistem kesehatan (Lindholm & Searle, 2016). Angka kejadian luka di Indonesia pun cukup tinggi bersama dengan peningkatan jumlah kecelakaan lalu lintas dalam beberapa tahun terakhir (Mahyudin et al., 2020).

Proses penyembuhan luka akut biasanya tidak berlangsung lama dan terjadi perbaikan jaringan yang dapat diprediksi di mana trombosit, keratinosit, sel imun, sel mikrovaskular, dan fibroblas memainkan peran penting dalam pemulihan integritas jaringan (Demidova-Rice et al., 2013). Namun penyembuhan luka juga dapat berlangsung lama apabila gagal menuju proses penyembuhan karena adanya infeksi atau komplikasi yang disebabkan oleh penanganan luka yang kurang tepat. Di sisi lain penggunaan obat luka sintetik misalnya antibiotik yang kurang tepat juga dapat menimbulkan resistensi, sehingga luka menjadi semakin lama sembuh. Manajemen luka dan pemberian terapi yang tepat dapat mengoptimalkan penyembuhan luka (Nicks et al., 2010). Dalam penyembuhan luka dapat menggunakan obat herbal karena memiliki efek samping yang minimal. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai penyembuh luka adalah daun sirih hijau (*Piper betle* L).

Daun sirih memiliki kandungan senyawa kimia seperti tannin, flavonoid (kuersetin), eugenol, hidroksikavikol and kavibetol yang juga berpotensi sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, antidiabetes dan antikanker (Narayan Singh et al., 2021; Umar, 2018; Dwivedi & Tripathi, 2014; Pradhan et al., 2013). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Zar'ah et al. (2021) secara *in vivo* menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih berpengaruh terhadap penyembuhan luka pada mencit. Rahayu et al. (2019) melaporkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih pada mencit yang mengalami luka akut dapat mempercepat fase inflamasi, meningkatkan neoepitelisasi dan pembentukan kolagen baru sehingga mempercepat penyembuhan luka akut (Rahayu et al., 2019). Pemberian ekstrak daun sirih juga dapat meningkatkan penyembuhan luka yang tertunda pada diabetes mellitus dengan mengurangi penanda stres oksidatif dan ekspresi 11b HSD-1 (Ghazali et al., 2016). Uji secara *in vitro* pada penelitian sebelumnya, memperoleh hasil bahwa ekstrak *Piper betle* L memiliki kemampuan dalam menurunkan tingkat ekspresi IL-33 (50,8%), VCAM (32,1%), CD248 (46,13%) yang memicu proses inflamasi, sehingga mengurangi stres seluler dan mempercepat proses penyembuhan luka (Ché Thị, Nguyễn, & Lê Hoàng, 2021). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Zuhdan et al. (2014) yang menguji ekstrak daun sirih yang dibuat menjadi sediaan salep menunjukkan bahwa salep ekstrak daun sirih mampu mempercepat penyembuhan luka, namun kelemahan dari sediaan salep adalah kurang higienis karena langsung kontak dengan kulit sehingga dapat menyebabkan kontaminasi (Zuhdan et al., 2014). Penelitian mengenai penggunaan ekstrak daun sirih sebagai penyembuh luka pernah dilakukan sebelumnya, namun penggunaan daun sirih yang dibuat menjadi sediaan *spray* sebagai penyembuh luka belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, ekstrak daun sirih pada penelitian ini akan dibuat menjadi sediaan *spray* karena dapat memberikan kemudahan dalam penggunaannya, lebih praktis, dan higienis (Mandal et al., 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek *spray* ekstrak daun sirih terhadap penyembuhan luka akut pada mencit.

2. METODE

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: simplisia daun sirih hijau (*Piper betle* Linn) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat

Tradisional (BP2TOOT), Jawa Tengah, sebanyak 1000 g dengan kadar air sebesar 7%; etanol 70% (teknis) (Brataco), DMSO (Merck), karbopol 940, TEA, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, aquades, hydrocolloid *dressing* (Tegaderm), plester (Gidcare), ketamine (KTM-100), xylazine (Interchemie), NaCl 0,9% (Otsu), *Water for Injection* (WFI) (Otsu-Wi), lembar polypropilen (Yasicha), Oxoferin.

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah bejana maserasi, *vaccum pump*, rotary evaporator (Heidolph), *moisture content balance* (Ohaus), timbangan digital (Henherr), *stopwatch*, alat-alat gelas (Iwaki pyrex), *Punch biopsy* diameter 4 mm (Ribbel), Spuit 1 cc (Terumo), timbangan digital, Pencukur rambut (Kemei), penggaris kertas, kamera digital (Lumix), dan peralatan bedah.

2.2. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau

Ekstrak daun sirih dibuat dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia daun sirih dilarutkan menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:5. Kemudian dilakukan pengadukan selama 3 jam dan dibiarkan selama 24 jam. Filtrat disaring lalu diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50 °C hingga didapatkan ekstrak yang kental (Lawrence & Jeyakumar, 2009).

2.3. Pembuatan *Spray* Ekstrak Daun Sirih Hijau

Spray dibuat dengan acuan dari formula Sikumbang et al. (2020) yang telah dimodifikasi. Formula dapat dilihat pada Tabel 1, pembuatan *spray* menjadi tiga formula dibedakan berdasarkan konsentrasi ekstrak yaitu 3%, 5%, dan 7%.

Tabel 1. Formula *Spray* Ekstrak Daun Sirih

Nama Bahan	Kegunaan	Konsentrasi (g/mL)		
		S1	S2	S3
Ekstrak Sirih	Zat Aktif	3	5	7
Karbopol 940	Polimer	0,2	0,2	0,2
TEA	Pendapar	0,5	0,5	0,5
Propilen glikol	Solubilizer	5	5	5
Metil Paraben	Pengawet	0,2	0,2	0,2
Propil Paraben	Pengawet	0,1	0,1	0,1
DMSO	Co-solvent	7	7	7
Aquadest	Pelarut	ad 100	ad 100	ad 100

Dilakukan pendispersian karbopol 940 menggunakan air, lalu dilakukan penambahan trietanolamin dan propilen glikol kemudian dihomogenkan (sebagai campuran A). Selanjutnya sebagai campuran B, yaitu ekstrak daun sirih dilarutkan dengan larutan DMSO, kemudian dilakukan penambahan metil paraben dan propil paraben, diaduk hingga homogen. Lalu dilakukan penggabungan antara campuran B ke dalam campuran A, dilakukan pengadukan sampai homogen, kemudian ad dengan aquades (Sikumbang et al., 2020).

2.4. Uji Aktivitas Penyembuhan Luka Akut

Perlakuan hewan uji telah memiliki persetujuan etik dengan nomor 012106037 dari komite etik Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia. 15 ekor mencit Balb/C jantan dengan berat badan 25-30 g diaklimatisasi selama 7 hari. Lingkungan penempatan hewan uji berada dalam kendali dengan siklus gelap terang (12 jam terang-12 jam gelap), suhu ruangan 27,0°C ± 28,0°C, dan kelembaban 55% ± 10%. Kebersihan 164igamba dan 164igambar164 mencit dijaga dari kontaminasi lingkungan, gergajen diganti setiap dua hari sekali. Hewan uji diberi pakan dan minum *ad libitum*.

2.5. Pembuatan Luka Akut dan Perlakuan Hewan Uji

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu, S1 (diberi *spray* sirih 3%), S2 (diberi *spray* sirih 5%), S3 (diberi *spray* sirih 7%), C (tanpa perlakuan intervensi sebagai kontrol negatif), P (diberi obat sintetik oxoferin konsentrasi 0,001%). Sebelum perlakuan pembuatan luka, mencit dibius

menggunakan kombinasi Ketamine dosis 50 mg/KgBB dan Xylazine dosis 5 mg/KgBB secara intraperitoneal. Lalu dilakukan pencukuran rambut pada punggung mencit sampai permukaan kulitnya nampak. Pembuatan luka dilakukan pada hari ke-0 dengan alat *punch biopsy* berdiameter 4 mm pada dorsal kanan dan kiri mencit. Kemudian mencit diberi perlakuan *spray* ekstrak daun sirih sebanyak 2 kali semprot sehari. Dilakukan observasi pada proses penyembuhan luka setiap hari mulai hari ke-0 hingga hari ke-14 (Nasruddin et al., 2014; Rahayu et al., 2019).

2.6. Uji Makroskopis

Area luka dibasuh dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% setiap observasi. Gambar luka didokumentasikan dengan kamera digital dan luka digambar pada lembar polipropilen menggunakan spidol permanen setiap hari lalu dilakukan perhitungan luas area luka dengan perangkat lunak analisis gambar *Scion Image Beta 4.02* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Rumus perhitungan rasio luas luka mengikuti [Persamaan 1](#) (Nasruddin et al., 2014) :

$$\text{Rasio luas luka} = \frac{\text{Luas luka hari ke } - n}{\text{Luas luka hari ke } - 0} \quad (2)$$

2.7. Pemrosesan jaringan dan analisis histologis

Pada hari ke 14 setelah pembuatan luka, percobaan hewan di-eutanasia secara massal dengan injeksi ketamin-xylazine, diberikan melalui injeksi IP. Pembedahan jaringan dilakukan pada luka dan kulit di sekitarnya. Jaringan luka yang didapat ditempel pada lembaran polipropilen untuk mencegah hiperkontraksi sampel dan kemudian difiksasi selama kurang lebih 24 jam dalam larutan buffer formalin 10% pada pH 7.4. Pembelahan jaringan dilakukan di pusat luka. Bagian didehidrasi dalam seri alkohol, dibersihkan dalam xilena, dan ditanam dalam parafin untuk menyiapkan bagian seri 5 μm . Bagian luka diwarnai dengan hematoxylin-eosin (HE) untuk mengamati ketebalan epidermis dan pembentukan jaringan baru. Ketebalan epidermis diamati melalui mikroskop yang dihubungkan dengan alat *Optilab* dengan pembesaran lensa obyektif 40x. Gambar diolah dan diukur menggunakan *software Image Raster*. Pengukuran tebal epitel dilakukan secara tegak lurus dimulai dari lapisan basal sampai lapisan korneum yang paling luar dengan satuan mikrometer. Pada daerah perlukaan dipilih lapisan epitel pada dua titik, yaitu pada daerah epitel yang paling tebal dan di daerah yang paling tipis. Rata-rata hasil pengukuran didapat dari kedua titik tersebut (Kartiningtyas et al., 2015).

2.8. Analisis Data

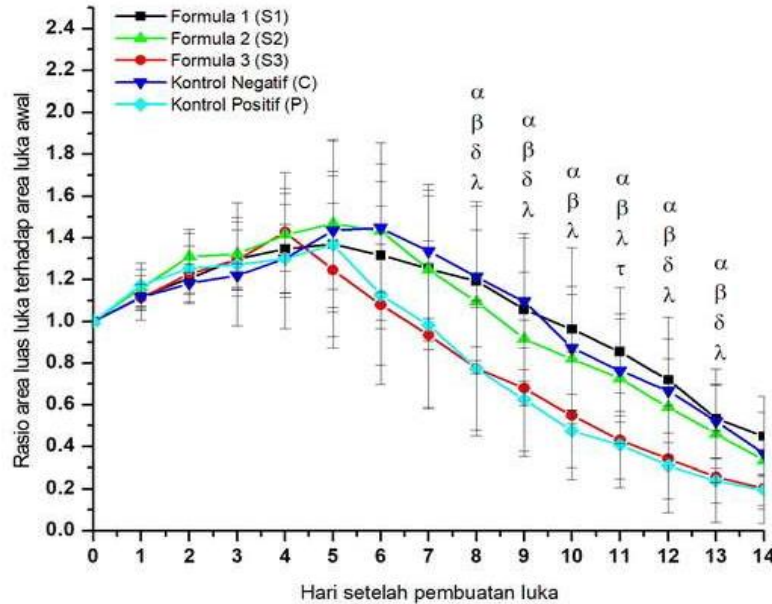
Data dianalisis secara statistik dengan perangkat lunak *IBM SPSS Statistics 20.0*. Uji prasyarat statistik yaitu uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene's test* dianalisis untuk seluruh data penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA* dan uji *Pos Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, signifikansi antar kelompok dinyatakan jika $p < 0.05$ (Nasruddin et al., 2019).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyembuhan luka merupakan proses dinamis dan interaktif yang melibatkan mediator, sel darah, matriks ekstraseluler, dan sel parenkim. Penyembuhan luka memiliki tiga fase yang saling tumpang tindih, yaitu fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling jaringan (Wang et al., 2018). Pada fase inflamasi, terjadi agregasi trombosit diikuti oleh infiltrasi leukosit di dalam lokasi luka, sehingga luka mengalami perbesaran diameter, yang menunjukkan bahwa luka semakin membesar dari hari 0 hingga hari ke 4-6 ([Gambar 1](#)).

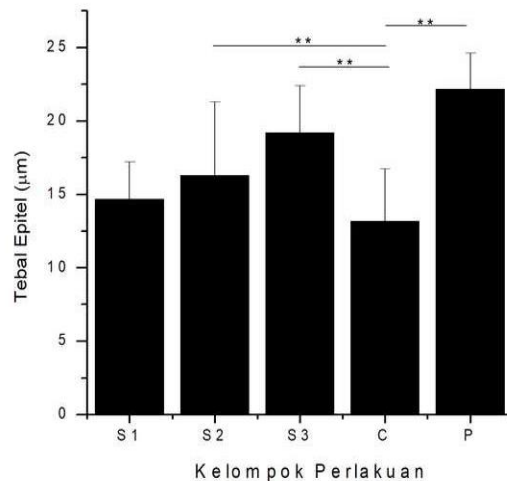
Perbedaan diameter luka antar kelompok dapat dilihat dari hasil analisis statistik yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok ($p > 0,05$) di hari ke-0 hingga hari ke-5. Terdapat perbedaan signifikan antara S3 dan P dengan C ($p < 0,05$), dan pada kelompok S1 dan S2 dengan C menunjukkan hasil yang hampir sama ($p > 0,05$) pada hari ke-13. S2 dan S3 secara signifikan lebih kecil daripada S1 dan C di hari akhir pengamatan ($p < 0,05$). Hal tersebut

menunjukkan bahwa *spray* sirih dapat memengaruhi penyembuhan luka dibandingkan dengan kontrol negatif. Pengamatan luka dilakukan selama 14 hari merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Rahayu et al. (2019), yaitu mengamati fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling yang terjadi dalam rentang waktu 14 hari (Rahayu et al., 2019). Hasil histologi menunjukkan bahwa kelompok yang diberi perlakuan daun sirih dan kontrol positif menunjukkan penebalan epitel yang signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (Gambar 2).



Gambar 1. Rasio Luas Luka Pada Kelompok Perlakuan Selama 14 Hari.

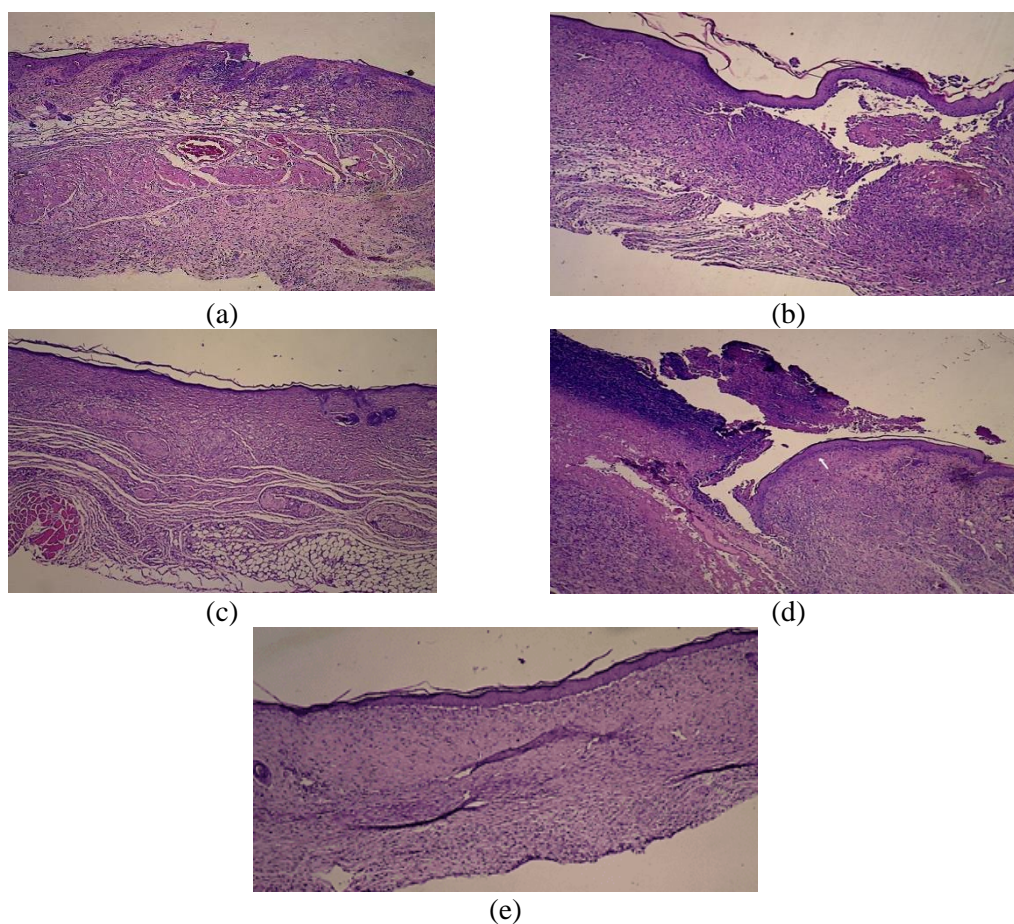
A: Menunjukkan Tingkat Signifikansi S Terhadap SS; β : Tingkat Signifikansi S Terhadap KP; Δ : Tingkat Signifikansi SS Terhadap KN; Δ : Tingkat Signifikansi KN Terhadap KP; T: Tingkat Signifikansi SP Terhadap KP ($P < 0,05$).



Gambar 2. Rata-Rata Ketebalan Epitel Pada Kelompok Perlakuan Selama 14 Hari oleh Pengaruh *Spray* Daun Sirih (S1= Konsentrasi 3%; S2= Konsentrasi 5%; S3= Konsentrasi 7%; C = Kontrol Negatif; P = Kontrol Positif) ($P < 0,05$; $**P < 0,01$)

Hasil pengukuran tebal epitel pada Gambar 2 menunjukkan *spray* ekstrak daun sirih konsentrasi 5%, 7%, dan kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif ($p < 0,05$), dan tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif ($p > 0,05$). Sedangkan kelompok *spray* sirih konsentrasi 1% tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($p > 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa *spray* sirih 5% dan 7% dapat mempengaruhi epitel

luka, meningkatnya regenerasi jaringan luka atau pembentukan epitel baru dapat dipengaruhi oleh senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirih, salah satunya adalah senyawa tannin. Senyawa tannin dapat meningkatkan perkembangan epidermis dan berperan dalam re-epitelisasi dengan melakukan pengendapan lipid protein kompleks dan meningkatkan penutupan luka dengan terbentuknya keropeng. Daun sirih juga memiliki kandungan saponin, flavonoid (kuersetin), dan minyak atsiri yang membuat proses penyembuhan luka terbantu karena memiliki fungsi sebagai antioksidan dan antimikroba yang mempercepat epitelisasi luka, serta mengurangi inflamasi (Palumpun et al., 2017). **Gambar 3** menunjukkan gambaran histopatologi kulit pada hari ke-14 oleh pengaruh *spray* daun sirih.



Gambar 3. Gambaran Histopatologi Kulit Pada Hari Ke-14 oleh Pengaruh *Spray* Daun Sirih: (a) *Spray* Konsentrasi 3%; (b) *Spray* Konsentrasi 5%; (c) *Spray* Konsentrasi 7%; (d) Kontrol Negatif; (e) Kontrol Positif ; →: Epitel

Seperti yang telah dilaporkan oleh Palumpun et al. (2017), bahwa pemberian topikal ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dapat mempertebal epidermis, jumlah fibroblast dan kolagen yang meningkat pada proses penyembuhan luka tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) (Palumpun et al., 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Nilugal et al. (2014), melaporkan bahwa tikus Wistar albino yang dibuat luka dan diberi perlakuan salep ekstrak daun sirih 10% menunjukkan peningkatan laju kontraksi luka dan mempercepat waktu penyembuhan dibandingkan kontrol negatif, yang mungkin disebabkan oleh peningkatan epitelisasi (Nilugal et al., 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Maryunis et al. (2016), mengungkapkan bahwa ekstrak daun sirih dapat menurunkan konsentrasi IL-1 β dalam proses penyembuhan luka. IL-1 β memiliki peran penting dalam memicu timbulnya peradangan, perlakuan dengan ekstrak daun sirih juga menunjukkan peningkatan yang signifikan pada asam askorbat, vitamin E, super oksida dismutase, katalase dan ATPase (Maryunis et al., 2016). Ekstrak daun sirih diketahui dapat mempromosikan peradangan, neoepitelisasi dan pembentukan kolagen baru untuk mempercepat

penyembuhan luka akut (Setyowati et al., 2019). Penelitian ini membuktikan bahwa *spray* ekstrak daun sirih berpengaruh terhadap penyembuhan luka pada mencit, namun perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek terhadap manusia, dosis dan sediaan yang efektif untuk digunakan, sehingga *spray* ekstrak daun sirih dapat bermanfaat sebagai alternatif terapi untuk penyembuhan luka.

4. KESIMPULAN

Spray ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L) mempunyai aktivitas penyembuhan luka akut pada mencit jantan galur Balb/C. Hasil yang terbaik ditunjukkan pada *spray* ekstrak sirih konsentrasi 7% yang memiliki aktivitas sebanding dengan oxoferin. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek terhadap manusia, dosis dan sediaan yang efektif untuk digunakan, sehingga *spray* ekstrak daun sirih dapat bermanfaat sebagai alternatif terapi untuk penyembuhan luka.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada LPPM UAD atas dana penelitian Hibah Penelitian Dasar Nomor: PD-107/SP3/LPPM-UAD/VI/2021.

6. KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

7. DAFTAR PUSTAKA

- Ché Thi, C. H., Nguyễn, H. Đ., & Lê Hoàng, D. M. (2021). Influence of Piper betle L. extract on umbilical cord cells in vitro and potential treating cutaneous wound. *Heliyon*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06248>
- Demidova-Rice, T., Hamblin, M., & Herman, I. (2013). Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv Skin Wound Care*, 25(7), 304–314. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.Acute>
- Dwivedi, V., & Tripathi, S. (2014). Review study on potential activity of Piper betle. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 93(34), 9398.
- Ghazali, N. A., Elmy, A., Yuen, L. C., Sani, N. Z., Das, S., Suhaimi, F., Thent, Z. C. (2016). Piper betel leaves induces wound healing activity via proliferation of fibroblasts and reducing 11 β hydroxysteroid dehydrogenase-1 expression in diabetic rat. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 7(4), 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2016.08.008>
- Gonzalez, A. C. D. O., Andrade, Z. D. A., Costa, T. F., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing -A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- Kartiningtyas, A. T., Prayitno, P., & Lastianny, S. P. (2015). Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit Citrus Sinensis terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus Sprague Dawley. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 1(1), 86. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.9012>
- Lawrence, R., P. T., & Jeyakumar, E. (2009). Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from Aloe Vera. *Brazilian Journal of Microbiology*, 906–915.
- Lindholm, C., & Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, doi: 10.11. <https://doi.org/10.1111/iwj.12623>
- Mahyudin, F., Edward, M., Basuki, M. H., Basrewan, Y., & Rahman, A. (2020). Modern and Classic Wound Dressing Comparison in Wound Healing, Comfort and Cost. *Jurnal Ners*, 15(1), 31. <https://doi.org/10.20473/jn.v15i1.16597>
- Mandal, U. K., Chatterjee, B., Husna, F., & Pauzi, B. (2016). A Review on Transdermal Spray: Formulation Aspect Mathews Journal of Pharmaceutical Science A Review on Transdermal Spray: Formulation Aspect. *Mathews Journal of Pharmaceutical Science*, 1(March).
- Maryunis, M., Bakri, S., Patellongi, I., Aman, M., Tahir, T., & Syam, A. (2016). The Effect of the Extracts of Betel (*Piper betel*) Leaves on the Content of IL-1 β as the Inflammatory Cytokine in Experimental Mice Using an Acute Wound Healing Modeling. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 30(1), 180–190. Retrieved from <http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied>

- Narayan Singh, S., Singh, G., Mukharjee, A., & Kumar, N. (2021). Phytochemistry, Pharmacological Property & Medicinal Uses of Piper Betle L: a Review. *Journal of Natural Remedies*, 21(11) (1).
- Nasruddin, et al, Nakajima, Y., Mukai, K., Setyowati, H., Rahayu, E., & Nur, M. (2014). Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clinical Plasma Medicine*, 2, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2014.01.001>
- Nasruddin, N., Setyowati, H., Rahayu, E., Wahyuningtyas, E. S., Sikumbang, I. M., Nurani, L. H., Setya, G. (2019). Efektivitas Perlakuan Irisan Daun Lidah Buaya yang Teraktivasi Plasma Jet untuk Mempercepat Penyembuhan Luka Akut Fase Proliferasi. *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 2, 18–25.
- Nasruddin, Nakajima, Y., Mukai, K., Setyowati, H., Rahayu, E., Sugama, J., & Nakatani, T. (2014). Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clinical Plasma Medicine*, 2(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2014.01.001>
- Nicks, B. A., Ayello, E. A., Woo, K., Nitzki-George, D., & Sibbald, R. G. (2010). Acute wound management: Revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. *International Journal of Emergency Medicine*, 3(4), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s12245-010-0217-5>
- Nilugal, K. C., Perumal, K., & Ugander, R. E. (2014). Evaluation of Wound Healing Activity of Piper Betle Leaves and Stem Extract In Experimental Wistar Rats. *American Journal of Pharmtech Research*, 4(3), 443–452.
- Palumpun, E. F., Wiraguna, A. A. G. P., & Pangkahila, W. (2017). Pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle*) secara topikal meningkatkan ketebalan epidermis, jumlah fibroblas, dan jumlah kolagen dalam proses penyembuhan luka pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). *Jurnal E-Biomedik*, 5(1). <https://doi.org/10.35790/ebm.5.1.2017.15037>
- Pradhan, D., Suri, K. a, Pradhan, D. K., & Biswasroy, P. (2013). Golden Heart of the Nature: Piper betle L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 147–167.
- Rahayu, H. S. E., Nasruddin, N., Nurani, L. H., Darmawati, S., Rohmani, A., Lutfiyati, H., Nakatani, T. (2019). Ethanolic extract of the natural product of Daun sirih (Piper betle) leaves may impede the effectiveness of the plasma jet contact style for acute wounds. *Clinical Plasma Medicine*, 15(18). <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2019.100090>
- Setyowati, H., Rahayu, E., Nasruddin, N., Hayu, L., & Darmawati, S. (2019). Ethanolic extract of the natural product of Daun sirih (Piper betle) leaves may impede the effectiveness of the plasma jet contact style for acute wounds. *Clinical Plasma Medicine*, 15(18). <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2019.100090>
- Sikumbang, I. M., Astuti, R. A., Wahyuningtyas, E. S., Lutfiyati, H., Wijayatri, R., & Nasruddin, N. (2020). Wound healing activity of aloe vera extract spray on acute wound in male balb/c mice. *Pharmaciana*, 10(3), 315. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v10i3.16640>
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 1–30. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- Umar, R. (2018). Chemical Composition and The Potential Biological Activities of *Piper Betel* – A. *Malaysian Journal of Applied Sciences*, 3(1), 1–8.
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Zar'ah, N. A., Syachruddin, S., & Kusmiyati, K. (2021). The Effect of Green Betel Leaves (Piper betle L.) Extract on Wounding Healing in Mice (*Mus musculus* L.). *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 103. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i1.2282>
- Zuhdan Fanani, M., & Nugroho, T. (2014). Pengaruh Salep Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle*) Terhadap Penyembuhan Luka Iris Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 6(1), 20–27. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol6.iss1.art4>