Volume 10, No.3, Agustus 2026: 270-289

EFEK NIACINAMIDE BERBASIS KITOSAN TERHADAP EPIDERMAL GROWTH FACTOR DAN MALONDIALDEHYDE PADA PENYEMBUHAN LUKA EKSISI TIKUS WISTAR

THE EFFECT OF CHITOSAN-BASED NIACINAMIDE ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND MALONDIALDEHYDE IN WOUND HEALING OF WISTAR RATS EXCISION

Jesslyn Tan[1], Hadyanto Lim[2*], Jekson Martiar Siahaan[3]

[1]Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Methodist Indonesia, Medan
[2,3] Departemen Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Methodist Indonesia, Medan

ABSTRAK

Pendahuluan: Kulit sebagai organ terluar tubuh memiliki fungsi utama sebagai barrier terhadap kerusakan mekanis, infeksi, dan stres oksidatif. Kerusakan kulit memicu proses penyembuhan luka yang melibatkan berbagai faktor pertumbuhan seperti Epidermal Growth Factor (EGF) dan mediator stres oksidatif seperti Malondialdehyde (MDA). Niacinamide (vitamin B3) memiliki potensi antioksidan dan antiinflamasi, namun penetrasi kulitnya rendah sehingga memerlukan sistem penghantar yang tepat. Kitosan sebagai biopolimer memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, dan kemampuan meningkatkan penetrasi zat aktif [1,2]. **Tujuan**: Menganalisis efek formulasi niacinamide berbasis kitosan terhadap aktivitas EGF dan MDA pada penyembuhan luka eksisi tikus putih galur Wistar secara in vivo. **Metode**: Penelitian eksperimental laboratorium menggunakan 40 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi dalam 5 kelompok (normal, kontrol negatif, kontrol positif Bioplacenton, perlakuan niacinamide 0,4% b/v berbasis kitosan, dan perlakuan niacinamide 1% b/v berbasis kitosan), masing-masing diamati pada hari ke-3 dan ke-14. Setiap tikus dibuat luka eksisi full thickness 2×2 cm dan diberikan gel niacinamide berbasis kitosan dua kali sehari. Pemeriksaan meliputi parameter klinis (kecepatan dan persentase penyembuhan luka), pemeriksaan ELISA untuk kadar EGF dan MDA, serta pemeriksaan histopatologi (jumlah fibroblas dan kepadatan kolagen) [3,4]. **Hasil**: Kelompok perlakuan niacinamide 0,4% b/v menunjukkan percepatan penyembuhan klinis yang signifikan ($p<0,001$) dengan performa terbaik dibandingkan kelompok lain. Namun, tidak ditemukan perbedaan signifikan pada kadar EGF ($p=0,848$), kadar MDA ($p=0,904$), jumlah fibroblas ($p=0,481$), maupun kepadatan kolagen ($p=0,386$) antar kelompok [5]. **Kesimpulan**: Formulasi niacinamide berbasis kitosan mempercepat penyembuhan luka secara klinis, namun efek ini tidak disertai perubahan signifikan pada parameter molekuler dan histopatologis yang diukur. Kontribusi spesifik niacinamide tidak dapat dipisahkan dari efek kitosan karena keterbatasan desain (tidak adanya kontrol vehicle), sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk mengidentifikasi mekanisme molekuler yang mendasari efek terapeutik tersebut.
Kata Kunci: Penyembuhan luka, niacinamide berbasis kitosan, MDA, EGF

ABSTRACT

Background*: The skin, as the outermost organ, functions as a barrier against mechanical damage, infection, and oxidative stress. Skin injury triggers wound healing involving various growth factors such as Epidermal Growth Factor (EGF) and oxidative stress mediators like Malondialdehyde (MDA). Niacinamide (vitamin B3) has antioxidant and anti-inflammatory potential, but its skin penetration is low, requiring an appropriate delivery system. Chitosan as a biopolymer is biocompatible, biodegradable, and capable of enhancing active substance penetration [1,2].* ***Objective****: To analyze the effect of chitosan-based niacinamide formulation on EGF and MDA activity in excisional wound healing of Wistar white rats in vivo.* ***Method****: A laboratory experimental study used 40 male Wistar rats divided into 5 groups (normal, negative control, positive control Bioplacenton, 0.4% b/v chitosan-based niacinamide treatment, and 1% b/v chitosan-based niacinamide treatment), each observed on days 3 and 14. Each rat received a 2×2 cm full-thickness excision wound and was given chitosan-based niacinamide gel twice daily. Examinations included clinical parameters (wound healing rate and percentage), ELISA for EGF and MDA levels, and histopathological examination (fibroblast count and collagen density) [3,4].* ***Result****: The 0.4% b/v niacinamide treatment group showed significant clinical wound healing acceleration ($p<0.001$) with the best performance compared to other groups. However, no significant differences were found in EGF levels ($p=0.848$), MDA levels ($p=0.904$), fibroblast count ($p=0.481$), nor collagen density ($p=0.386$) between groups [5].* ***Conclusion****: Chitosan-based niacinamide formulation accelerates clinical wound healing, but this effect was not accompanied by significant changes in the measured molecular and histopathological parameters. The specific contribution of niacinamide cannot be separated from the effects of chitosan due to the absence of a vehicle control group, necessitating further research to identify the molecular mechanisms underlying this therapeutic effect.*
Keywords*: Wound healing, chitosan-based niacinamide, MDA, EGF*

Alamat Korespondensi:
Hadyanto Lim, Departemen Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Methodist Indonesia, Jl. Setia Budi Pasar II No 85, Medan. No. HP: 082168332889. Email: hadyantolim61@gmail.com

PENDAHULUAN

Kulit merupakan organ terluas dalam tubuh manusia yang berfungsi sebagai barrier terhadap kerusakan mekanis, infeksi bakteri, radiasi ultraviolet, dan suhu ekstrem [1]. Kerusakan pada kulit dapat mengganggu fungsinya sebagai barrier sehingga menimbulkan luka. Proses penyembuhan luka merupakan proses dinamis yang melibatkan interaksi berbagai molekul dan kaskade seluler, dimulai dari fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, hingga remodeling matriks [2,3].

Fase inflamasi merupakan tahap inisiasi penyembuhan luka di mana berbagai faktor inflamasi berperan, termasuk Epidermal Growth Factor (EGF) yang berfungsi dalam proses re-epitelisasi dan proliferasi sel. EGF adalah polipeptida rantai tunggal terdiri dari 53 asam amino yang mengaktifkan reseptor EGFR (ErbB1) dan jalur sinyal hilir yang mengendalikan proliferasi, diferensiasi, dan motilitas sel [4]. Selain itu, stres oksidatif akibat ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen juga mempengaruhi penyembuhan luka.

Radikal bebas yang dilepaskan saat fase inflamasi dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran sel, DNA, protein, dan lipid, yang memperlambat penyembuhan luka [5,6]. Malondialdehyde (MDA) merupakan produk akhir peroksidasi lipid yang digunakan sebagai biomarker stres oksidatif [7].

Niacinamide (nikotinamida), bentuk amida dari vitamin B3 yang larut dalam air, memiliki peran penting dalam kaskade antioksidan kulit. Niacinamide mampu mengurangi proses inflamasi, menurunkan produksi sebum, meningkatkan produksi kolagen, dan memiliki efek anti-aging. Sebagai prekursor NAD^+, niacinamide dapat menurunkan ekspresi dan aktivitas NADPH oksidase, mengganggu aktivitas nitric oxide synthase (NOS), serta meningkatkan aktivitas enzimatik katalase [8,9]. Meskipun bukan antioksidan langsung, niacinamide terbukti menurunkan level reactive oxygen species (ROS) dan meningkatkan masa hidup replikasi sel fibroblas manusia [10]. Namun, niacinamide memiliki kemampuan penetrasi ke dalam jaringan kulit yang rendah secara in vitro, sehingga diperlukan bahan pembawa (carrier) yang tepat [11].

Kitosan, biopolimer hasil deasetilasi kitin, memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, toksisitas rendah, serta aktivitas antioksidan, antimikroba, dan kemampuan mengikat faktor pertumbuhan. Kitosan juga memiliki sifat mukoadhesif dan dapat meningkatkan adsorpsi zat aktif obat-obatan. Kitosan dalam bentuk hidrogel diharapkan dapat meningkatkan biofarmasetika dan memberikan efek prolonged serta controlled release [12,13]. Karena kitosan hanya larut dalam kondisi asam (pH<6,3) dan niacinamide dapat dihidrolisis dalam kondisi asam maupun basa, kombinasi keduanya berpotensi memberikan efektivitas penyembuhan luka yang lebih baik [14].

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek formulasi niacinamide berbasis kitosan terhadap aktivitas Epidermal Growth Factor (EGF) dan Malondialdehyde (MDA) pada penyembuhan luka eksisi tikus putih galur Wistar secara in vivo, dengan outcome primer berupa persentase penutupan luka pada hari ke-14. Sebagai outcome sekunder,

penelitian ini juga mengevaluasi kecepatan penyembuhan luka, kadar EGF dan MDA dalam serum, serta parameter histopatologis (jumlah fibroblas dan kepadatan kolagen).

Hipotesis yang diajukan sebelum analisis adalah:

1. Aplikasi niacinamide 0,4% b/v berbasis kitosan meningkatkan persentase penutupan luka (outcome primer) secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif (efek positif).
2. Aplikasi formulasi niacinamide berbasis kitosan menurunkan kadar MDA (outcome sekunder) dibandingkan kontrol negatif (efek negatif/penurunan).
3. Aplikasi formulasi niacinamide berbasis kitosan meningkatkan kadar EGF, jumlah fibroblas, dan kepadatan kolagen (outcome sekunder) dibandingkan kontrol negatif (efek positif/peningkatan).

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2024 – April 2025 di rumah hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam USU, Laboratorium Farmasi USU, Laboratorium Histologi FK USU, dan Laboratorium MIPA USU.

Persetujuan Etik dan Kesejahteraan Hewan

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Methodist Indonesia Medan dengan nomor 96/KEPK-FKUMI/EC/2025 tertanggal 2025. Seluruh prosedur penelitian dilaksanakan setelah persetujuan etik diperoleh.

Penelitian ini mematuhi prinsip 3R (Replacement, Reduction, Refinement) serta prinsip 5F (Freedom from Hunger and Thirst, Freedom from Discomfort, Freedom from Pain, Injury or Disease, Freedom to Express Normal Behaviour, Freedom from Fear and Distress). Penggunaan hewan coba telah mempertimbangkan penggantian dengan metode alternatif (replacement), jumlah hewan minimum yang diperlukan untuk mencapai tujuan ilmiah (reduction), serta prosedur yang meminimalkan rasa sakit dan stres (refinement). Penelitian ini juga telah mematuhi pedoman ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) untuk memastikan

transparansi dan reproduktibilitas dalam pelaporan penelitian hewan [41].

Selama masa adaptasi dan perawatan, hewan ditempatkan dalam kandang dengan sirkulasi udara dan cahaya yang cukup, diberi pakan dan air minum tiga kali sehari, serta kandang dibersihkan setiap hari dari kotoran dan sisa makanan. Seluruh prosedur anestesi menggunakan kombinasi ketamine dan xylazine untuk meminimalkan rasa sakit selama pembuatan luka. Setelah terminasi pada hari ke-3 dan ke-14, tikus dieutanasia dengan metode yang sesuai dan dilakukan pengambilan jaringan untuk pemeriksaan histopatologi. Kriteria humane endpoint diterapkan selama penelitian, di mana hewan yang menunjukkan tanda-tanda sakit berat atau distress akan dikeluarkan dari penelitian dan dieutanasia segera.

Alat

Alat yang digunakan meliputi: sarung tangan, masker, pinset, nierbekken steril, kasa steril, spuit injeksi 1 ml dan 3 ml, blade no. 15, handle blade, gunting bedah, cooling box, ice pack, magnetic stirrer, inkubator, microcentrifuge tube 1,5 ml, mikropipet 1–10 µL, microplate washer, microplate, ELISA kit EGF dan MDA, mikroskop cahaya (Olympus CX23), image processing software (ImageJ, NIH), kamera mikroskop Olympus, dan spektrofotometer microplate reader.

Bahan

Kitosan (derajat deasetilasi 75%), niacinamide (Sigma-Aldrich, Cat. No. N5535-100G, CAS 98-92-0), asam asetat 1%, phosphate-buffered saline (PBS), xylazine, ketamine, formalin 10%, alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, xylol, parafin, kaca objek, reagen EGF ELISA kit (Elabscience, Cat. No. E-EL-M0025), dan reagen MDA ELISA kit (MyBioSource, Cat. No. MBS269473).

Sampel

Sebanyak 40 ekor tikus putih jantan galur Wistar (Rattus norvegicus) berusia 8–12 minggu dengan berat badan 150–250 gram diperoleh dari Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara. Hewan dinyatakan dalam kondisi sehat (specific pathogen-free / SPF) berdasarkan sertifikat kesehatan dari pemasok dan dikonfirmasi melalui observasi fisik (rambut bersih, mata cerah, aktivitas normal, tidak ada tanda-tanda infeksi atau cacat) selama masa karantina.

Hewan diadaptasi selama 10 hari di rumah hewan sebelum perlakuan dimulai. Selama masa aklimatisasi, hewan ditempatkan dalam kandang polikarbonat (ukuran 40 × 30 × 20 cm) dengan 4 ekor per kandang, dilengkapi dengan alas serbuk kayu yang diganti setiap hari. Kandang ditempatkan dalam ruangan dengan siklus cahaya 12:12 jam (terang 06.00–18.00 WIB, gelap 18.00–06.00 WIB), suhu ruangan 22 ± 2°C, dan kelembapan relatif 50–70%. Hewan diberi pakan standar (pelet komersial, kandungan protein 18–22%) dan air minum ad libitum (disediakan dalam botol minum) tiga kali sehari [16]. Lingkungan diperkaya dengan bahan sarang (nesting material) dari kertas atau kapas untuk mendukung perilaku alami hewan.

Unit eksperimental adalah setiap tikus individu. Untuk mengatasi rentang berat badan yang lebar (150–250 gram), dilakukan stratifikasi berat badan sebelum alokasi kelompok. Hewan dikelompokkan berdasarkan berat badan menjadi tiga strata: ringan (150–180 g), sedang (181–210 g), dan berat (211–250 g). Dari setiap strata, hewan dialokasikan secara proporsional ke lima kelompok perlakuan untuk memastikan distribusi berat badan yang seimbang antar kelompok (rata-rata berat badan antar kelompok tidak berbeda signifikan, hasil uji ANOVA satu arah menunjukkan p>0,05).

Kriteria inklusi meliputi: tikus putih jantan galur Wistar, usia 8–12 minggu, berat 150–250 gram, kondisi sehat (aktif, tidak cacat, tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit). Kriteria eksklusi adalah tikus yang menunjukkan tanda-tanda sakit (lesu, tidak mau makan/minum, diare, atau infeksi) selama masa aklimatisasi.

Kriteria drop-out adalah tikus yang mati selama penelitian atau mengalami cedera berat yang memerlukan penghentian penelitian (sesuai humane endpoint) [16].

Hewan dibagi menjadi 5 kelompok (n=8 per kelompok, masing-masing 4 untuk terminasi hari ke-3 dan 4 untuk hari ke-14):

· K1 (Normal): tanpa luka, tanpa intervensi. Berfungsi sebagai kontrol baseline untuk parameter biomolekuler (MDA dan EGF) dan histopatologi (fibroblas dan kolagen). Tidak digunakan dalam analisis parameter klinis (kecepatan dan persentase penutupan luka) karena tidak memiliki luka.

· K2 (Kontrol Negatif): luka eksisi, tanpa intervensi.

· K3 (Kontrol Positif): luka eksisi + Bioplacenton gel.

· K4 (Perlakuan A): luka eksisi + niacinamide 0,4% b/v berbasis kitosan.

· K5 (Perlakuan B): luka eksisi + niacinamide 1% b/v berbasis kitosan.

Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dilakukan secara a priori berdasarkan outcome primer, yaitu persentase penutupan luka pada hari ke-14. Mengacu pada penelitian serupa yang menunjukkan perbedaan efek yang besar pada penyembuhan luka dengan intervensi topikal [21,22], ditetapkan effect size (Cohen's f) sebesar 0,40 (efek besar), tingkat signifikansi (α) 0,05, dan power (1-β) 0,80. Dengan menggunakan perangkat lunak G*Power (v. 3.1.9.7) untuk repeated measures ANOVA (antar-subjek) dengan 4 kelompok yang mengalami luka (K2–K5), 2 waktu pengukuran (H3 dan H14), korelasi antar pengukuran 0,5, dan koreksi Greenhouse-Geisser ε = 1,0, total sampel minimal yang diperlukan adalah 32 ekor (8 ekor per kelompok).

Untuk mengakomodasi 5 kelompok (termasuk kelompok normal K1) dan mengantisipasi kemungkinan drop-out sebesar 20%, total sampel ditetapkan menjadi 40 ekor, dengan alokasi masing-masing kelompok utama sebanyak 8 ekor (4 ekor untuk terminasi hari ke-3 dan 4 ekor untuk hari ke-14) [37].

Metode Randomisasi dan Allocation Concealment

Alokasi hewan ke dalam 5 kelompok perlakuan dilakukan secara acak menggunakan tabel bilangan acak. Allocation concealment dilakukan dengan menggunakan wadah tertutup (opaque sealed envelopes) yang berisi penunjukan kelompok, yang baru dibuka setelah hewan siap untuk diberikan perlakuan [16].

Blinding

Untuk meminimalkan bias, penilaian parameter dilakukan secara buta (blinded) terhadap kelompok perlakuan:

1. Pengukuran luka (klinis): Pengukuran panjang dan lebar luka menggunakan jangka sorong dilakukan oleh peneliti yang tidak mengetahui alokasi kelompok. Foto luka diberi kode acak sebelum dianalisis.

2. Pemeriksaan ELISA (MDA dan EGF): Teknisi laboratorium yang melakukan pemeriksaan ELISA tidak

mengetahui kelompok sampel. Sampel diberi kode numerik sebelum pengujian.

3. Pemeriksaan histopatologi (fibroblas dan kolagen): Patolog yang mengevaluasi preparat histologi buta terhadap kelompok perlakuan. Preparat diberi kode acak dan dinilai secara independen oleh dua pengamat untuk memastikan konsistensi.

4. Analisis data: Analisis statistik dilakukan dengan kode kelompok yang dirahasiakan hingga semua data terkumpul dan dianalisis.

Tahapan/Jalannya Penelitian

Pembuatan gel: Gel niacinamide berbasis kitosan dibuat dalam dua konsentrasi, yaitu 0,4% b/v dan 1% b/v. Perhitungan konsentrasi didasarkan pada % berat per volume (% b/v) : (0,2 g / 50 mL) × 100 = 0,4% b/v; (0,5 g / 50 mL) × 100 = 1,0% b/v.

Prosedur pembuatan: Kitosan (0,5 g) dilarutkan dalam 25 mL asam asetat 1% sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer pada kecepatan 300–500 rpm selama 2 jam pada suhu ruang (25 ± 2°C) hingga terbentuk larutan homogen. Niacinamide (0,2 g atau 0,5 g) dan CMC (0,5 g) dilarutkan dalam 20 mL aquades sambil diaduk hingga homogen. Larutan niacinamide-CMC ditambahkan ke dalam larutan kitosan secara bertahap sambil terus diaduk hingga terbentuk gel yang homogen. Aquades ditambahkan hingga volume akhir mencapai 50 mL, dan pengadukan dilanjutkan selama 30 menit. Gel yang telah jadi dimasukkan ke dalam syringe steril dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan [15,39].

Karakterisasi gel: pH 5,2 ± 0,3; viskositas 2.500–3.200 cP (Brookfield, spindle no. 4, 20 rpm); homogen (warna kuning bening, tidak ada partikel); kadar niacinamide terukur 98,2 ± 1,5% dari teoritis (spektrofotometri UV-Vis 261 nm); stabil pada 4°C, 25°C, dan 40°C selama 14 hari.

Prosedur Luka dan Perawatan Hewan

Anestesi: Tikus dianestesi secara intraperitoneal menggunakan kombinasi ketamine (80–100 mg/kg BB) dan xylazine (5–10 mg/kg BB) yang disesuaikan dengan berat badan masing-masing hewan. Konsentrasi sediaan ketamine adalah 100 mg/mL dan xylazine 20 mg/mL. Kedalaman anestesi dikonfirmasi dengan uji toe pinch (refleks tarik kaki) sebelum prosedur bedah dimulai [40].

Persiapan lapangan bedah: Setelah anestesi tercapai, area punggung tikus dicukur menggunakan alat cukur listrik,

kemudian didesinfeksi dengan alkohol 70% diikuti dengan povidone-iodine 10% untuk memastikan kondisi aseptik.

Pembuatan luka eksisi: Luka eksisi full-thickness berukuran 2 × 2 cm (luas 4 cm^2) dibuat pada bagian dorsal tikus (regio interskapular) menggunakan skalpel steril (blade no. 15) dan gunting bedah. Luka dibuat melalui seluruh lapisan kulit hingga mencapai fascia, tanpa mengangkat panniculus carnosus. Tidak digunakan splint pada model luka ini karena penyembuhan diamati secara spontan melalui kontraksi dan epitelisasi (penyembuhan secondary intention) [16].

Analgesia dan perawatan pasca-bedah: Setelah prosedur bedah, hewan diberikan analgesik buprenorphine (0,01–0,05 mg/kg BB, subkutan) segera setelah prosedur dan dilanjutkan setiap 12–24 jam sesuai kebutuhan. Luka ditutup dengan kasa steril dan diikat dengan perban. Untuk mencegah hewan menjilat luka, digunakan kandang individu dengan pengawasan ketat.

Perawatan harian: Kelompok perlakuan diberikan gel niacinamide berbasis kitosan sebanyak 0,2–0,3 g per aplikasi (cukup untuk menutupi seluruh permukaan luka) dua kali sehari (pagi dan sore). Kontrol positif (K3) diberi Bioplacenton dengan volume yang sama. Kontrol negatif (K2) tidak diberikan intervensi. Luka dibersihkan dengan NaCl 0,9% steril sebelum setiap aplikasi gel.

Kontrol Positif (Bioplacenton Gel)

Sebagai kontrol positif, digunakan Bioplacenton® gel (PT Kalbe Farma Tbk, Indonesia, No. Reg. DKL7211638828A1) yang mengandung ekstrak plasenta ex bovine 10% dan neomycin sulfate 0,5% dalam basis jelly. Bioplacenton dipilih sebagai pembanding karena merupakan sediaan topikal yang tersedia di pasaran dan umum digunakan masyarakat Indonesia untuk perawatan luka [46]. Pada kelompok kontrol positif (K3), Bioplacenton gel diaplikasikan secara topikal sebanyak 0,2–0,3 g per aplikasi dua kali sehari (pagi dan sore), sesuai dengan frekuensi yang digunakan pada kelompok perlakuan.

Monitoring dan Humane Endpoints

Kesehatan hewan dipantau setiap hari oleh peneliti dan di bawah supervisi dokter hewan. Kriteria humane endpoint yang digunakan meliputi: kehilangan berat badan >20% dari berat awal, ketidakmampuan untuk makan atau minum, tanda-tanda infeksi sistemik (demam, lethargi), nyeri berat

yang tidak responsif terhadap analgesik, atau luka yang menunjukkan tanda-tanda infeksi berat (purulen, nekrosis luas). Tidak ada hewan yang mencapai humane endpoint selama penelitian berlangsung.

Eutanasia dan Pengambilan Sampel

Pada hari terminasi (hari ke-3 dan ke-14), tikus dieutanasia dengan metode carbon dioxide (CO_2) asfiksiasi secara bertahap (20–30% volume ruang per menit) selama 5–10 menit, dilanjutkan dengan dislokasi servikal untuk memastikan kematian. Setelah kematian dipastikan, sampel darah diambil dari vena orbitalis, dan jaringan luka diambil untuk pemeriksaan histopatologi.

Parameter klinis: Pengukuran panjang dan lebar luka dilakukan setiap hari pada pukul 08.00–10.00 WIB menggunakan jangka sorong digital (Mitutoyo, presisi 0,01 mm) oleh seorang pengamat yang buta terhadap alokasi kelompok perlakuan. Karena luka dibuat berbentuk bujur sangkar 2 × 2 cm, luas luka (A) dihitung sebagai hasil kali panjang dan lebar (cm^2). Untuk memastikan reliabilitas, setiap luka diukur dua kali pada setiap sesi, dan nilai rata-rata digunakan untuk analisis.

Persentase penutupan luka dihitung dengan rumus: $(A_0-A_t)/A_0$ x 100%, dengan A_0 adalah luas luka awal (hari ke-0, yaitu 4 cm^2 untuk semua kelompok yang mengalami luka) dan A_t adalah luas luka pada hari pengamatan ke-t.

Kecepatan penyembuhan luka didefinisikan sebagai laju reduksi luas luka per hari (mm^2/hari), dihitung dengan rumus: $(A_0-A_t)/t$, dengan t adalah hari pengamatan ke-t.

Definisi objektif waktu sembuh (time to closure) adalah hari ketika luka mencapai penutupan 100% (luas luka = 0 mm^2). Jika luka belum menutup sempurna pada hari ke-14, maka dicatat sebagai >14 hari [16]. Luka juga difoto setiap hari menggunakan kamera digital dengan skala kalibrasi untuk verifikasi dan planimetri jika diperlukan (ImageJ, NIH) [42,43].

Pengambilan dan Pemrosesan Serum: Pada hari terminasi (hari ke-3 dan ke-14), sampel darah diambil dari vena orbitalis tikus menggunakan pipet kapiler hematokrit. Sebanyak 1–2 mL darah ditampung dalam tabung microcentrifuge tanpa antikoagulan dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit hingga menggumpal. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan

3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Serum yang diperoleh dipindahkan ke tabung microcentrifuge steril dan disimpan pada suhu -20°C hingga proses analisis [19].

Pengambilan dan Pemrosesan Jaringan: Setelah pengambilan darah, tikus dieutanasia sesuai prosedur. Jaringan luka diambil dari bagian sentral luka (tidak termasuk tepi luka) menggunakan skalpel, dengan ukuran sekitar 1 × 1 cm. Jaringan segera direndam dalam larutan formalin buffer 10% selama 2–4 jam. Setelah fiksasi, jaringan didehidrasi dengan alkohol bertingkat (70%, 80%, 95%, absolut, masing-masing 30–60 menit), dijernihkan dengan xylol, dan diinfiltrasi dengan parafin cair. Jaringan dicetak dalam blok parafin dan dibiarkan membeku [18,45].

Pemeriksaan Kadar EGF dan MDA dengan ELISA: Kadar EGF dan MDA dalam serum diukur menggunakan metode ELISA kuantitatif sandwich sesuai protokol kit [19]

Prosedur: 100 µL serum atau standar dimasukkan ke dalam well yang telah dilapisi antibodi spesifik, diinkubasi 37°C 90 menit, dicuci 3×, ditambahkan 100 µL antibodi biotin, diinkubasi 37°C 60 menit, dicuci, ditambahkan 100 µL streptavidin-HRP, diinkubasi 37°C 30 menit, dicuci, ditambahkan 90 µL TMB, diinkubasi ruang gelap 15–20 menit, dihentikan dengan 50 µL larutan stop, dan dibaca pada 450 nm [19,44].

Kontrol kualitas: Setiap sampel diukur dalam duplo; nilai rata-rata digunakan. Kurva standar menggunakan regresi four-parameter logistic ($R^2 \geq 0,98$). Koefisien variasi (CV) antar duplo harus <10%; jika tidak, pengukuran diulang [19,44].

Pemeriksaan Histopatologi: Blok parafin dipotong dengan mikrotom (Leica RM2245) pada ketebalan 3–4 µm, diregangkan dalam penangas air 40°C, dan ditempatkan pada kaca objek. Preparat diwarnai dengan metode Hematoksilin-Eosin (HE) [18,45]. Prosedur pewarnaan: deparafinisasi xylol (2×5 menit), rehidrasi alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, masing-masing 2 menit), pewarnaan inti hematoksilin (3–5 menit), pencucian air mengalir, diferensiasi alkohol asam 1%, pembiruan air ammonia, pewarnaan sitoplasma eosin Y 1% (10 menit), dehidrasi alkohol bertingkat, penjernihan xylol, dan penutupan dengan DPX.

Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CX23) pada perbesaran 400× (lensa objektif 40×, okuler 10×). Penilaian dilakukan pada 5 lapang pandang yang dipilih secara acak dari setiap preparat, menghindari area tepi luka dan nekrosis [18,46]. Pengambilan skor didefinisikan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Skor Jumlah Fibroblast dan Kepadatan Kolagen

Skor	Jumlah Fibroblas	Kepadatan Kolagen
1	< 5 sel (jarang)	Kolagen tipis, tersebar longgar
2	5 – 15 sel (sedang)	Kolagen sedang, serat mulai teratur
3	> 15 sel (banyak)	Kolagen padat, serat tebal dan teratur

Blinding: Evaluasi histopatologi dilakukan secara buta terhadap kelompok. Preparat diberi kode numerik acak. Penilaian dilakukan oleh dua pengamat independen; perbedaan diselesaikan dengan konsensus. Uji reliabilitas antar pengamat (ICC) menunjukkan nilai >0,80 [47].

Analisis data: Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Sebelum analisis inferensial, dilakukan uji normalitas (Shapiro-Wilk) dan homogenitas varians (Levene). Jika asumsi dilanggar, digunakan uji non-parametrik atau koreksi pada derajat kebebasan [48].Analisis dilakukan pada dua set data yang terpisah:

1. Set data 1 (Analisis Penyembuhan Luka – Klinis): Hanya K2, K3, K4, K5. Parameter: kecepatan dan persentase penutupan luka. Model: repeated measures ANOVA (waktu × kelompok) dengan identitas hewan sebagai subjek. Asumsi sphericity diuji dengan Mauchly; jika dilanggar, digunakan koreksi Greenhouse-Geisser [49].
2. Set data 2 (Analisis Biomarker dan Histopatologi): Semua kelompok (K1–K5). Parameter: MDA, EGF, fibroblas, kolagen. Model: ANOVA satu arah pada setiap titik waktu (H3 dan H14) karena hewan pada H3 dan H14 adalah kohort independen (bukan pengukuran berulang pada hewan yang sama).

Jika terdapat perbedaan signifikan, dilakukan uji post-hoc Tukey HSD (jika varians homogen) atau Games-Howell (jika tidak homogen). Koreksi Bonferroni diterapkan untuk perbandingan berganda [49,50,51].

Effect Size dan Interval Kepercayaan: Effect size: partial eta squared (η^2) (0,01 = kecil; 0,06 = sedang; 0,14 = besar) [50]. Interval

kepercayaan 95% (95% CI) dilaporkan untuk perbedaan rata-rata. Tingkat signifikansi: $\alpha = 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Dasar Hewan Coba

Seluruh 40 ekor tikus menyelesaikan penelitian tanpa drop-out. Rata-rata berat badan awal antar kelompok tidak berbeda signifikan ($p>0,05$, ANOVA satu arah), dengan rata-rata keseluruhan 196,3 ± 24,7 g (rentang 155–245 g).

Kecepatan Penyembuhan Luka

Analisis kecepatan dan persentase penutupan luka dilakukan pada 4 kelompok yang mengalami luka (K2, K3, K4, dan K5). Kelompok K1 (normal) tidak dilibatkan dalam analisis statistik parameter klinis karena tidak memiliki luka. Model yang menghasilkan nilai Pillai's Trace adalah repeated measures ANOVA dengan dua faktor (waktu dan kelompok) dan hewan sebagai subjek/random effect. Asumsi sphericity diuji dengan Mauchly ($p<0,001$) dan dikoreksi dengan Greenhouse-Geisser.

Kelompok K4 (niacinamide 0,4% b/v) menunjukkan performa terbaik secara signifikan dibandingkan semua kelompok lain ($p<0,001$), sedangkan K2 (kontrol negatif) mengalami penurunan paling cepat (Gambar 1). Hasil ini sejalan dengan penelitian Iraji & Banan [23] dan Esfahani dkk. [21] yang melaporkan peningkatan re-epitelisasi dan penyembuhan luka dengan niacinamide topikal.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa niacinamide 0,4% b/v (K4) memberikan persentase penutupan luka yang secara signifikan lebih baik dibandingkan niacinamide 1% b/v (K5) ($p<0,001$), sementara K5 tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif (K2) maupun positif (K3). Fenomena ini menunjukkan adanya efek dosis yang tidak linear yang terdeteksi dalam sampel ini.

Beberapa mekanisme hipotetik dapat menjelaskan temuan ini. Pertama, penelitian oleh Wessels et al. (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi optimal niacinamide untuk aktivitas fibroblas dan sintesis kolagen secara in vitro adalah 0,31 mg/ml (setara dengan 0,031% b/v), sementara konsentrasi yang lebih tinggi justru dapat menurunkan viabilitas sel [22]. Kedua, niacinamide pada konsentrasi 0,4% b/v telah terbukti secara signifikan meningkatkan hidrasi kulit melalui

peningkatan sintesis seramida [24], sedangkan konsentrasi yang lebih tinggi dapat mempengaruhi produksi sebum [25]. Namun, karena penelitian ini tidak mengukur hidrasi kulit atau produksi sebum secara langsung, penjelasan ini bersifat spekulatif dan memerlukan konfirmasi pada penelitian selanjutnya.

Kadar Malondialdehyde (MDA)

Hasil pada kadar MDA (Tabel 2) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan pada kadar MDA antar kelompok, antar waktu, maupun interaksinya. Nilai p yang tinggi dan partial η^2 yang kecil menunjukkan bahwa efek yang terdeteksi sangat lemah dalam sampel ini. Namun, $p>0,05$ tidak membuktikan tidak adanya efek; dengan n=4 per sel, terdapat risiko Type II error yang tinggi.

Pengukuran MDA dilakukan pada serum darah, bukan pada jaringan luka. MDA serum mencerminkan stres oksidatif sistemik, sedangkan perubahan MDA yang paling dinamis dan relevan terjadi secara lokal di jaringan luka selama fase inflamasi [26,27]. Penelitian oleh Tyastono et al. menunjukkan bahwa kadar MDA dalam jaringan luka meningkat tajam pada hari kelima setelah cedera dan baru menurun setelahnya, suatu pola yang mungkin tidak terdeteksi jika hanya menggunakan serum [28]. Dengan demikian, ketiadaan temuan signifikan pada penelitian ini tidak dapat diinterpretasikan sebagai bukti bahwa niacinamide tidak memiliki efek antioksidan pada luka.

Kadar Epidermal Growth Factor (EGF)

Kadar EGF serum pada H3 dan H14 disajikan pada Tabel 2. Partial eta-squared untuk interaksi (0,316) menunjukkan efek sedang menurut kriteria Cohen [50], namun tidak mencapai signifikansi statistik ($p=0,196$). Dengan n=4 per sel, studi ini memiliki power yang terbatas untuk mendeteksi efek sedang; interval kepercayaan yang lebar pada perbedaan K1-K5 (-10,12 hingga 4,90) menunjukkan ketidakpastian yang tinggi. Partial eta-squared 0,316 tidak boleh ditafsirkan sebagai bukti efek sedang tanpa interval kepercayaan dan konteks power.

Penelitian oleh Song et al. menunjukkan bahwa niacinamide dapat menghambat EGFR/ERK pathway dan meningkatkan ekspresi AQP3 pada keratinosit yang diinduksi retinoic acid [32]. Namun, studi tersebut meneliti AQP3, bukan kadar EGF, sehingga

tidak dapat digunakan sebagai bukti langsung bahwa niacinamide menurunkan kadar EGF. Dengan demikian, interpretasi bahwa niacinamide mempengaruhi EGF melalui jalur ini tidak didukung oleh data penelitian ini dan memerlukan penelitian lebih lanjut.

Jumlah Fibroblas

Skor fibroblas pada H3 dan H14 disajikan pada Tabel 3. Penilaian fibroblas dilakukan pada 5 lapang pandang acak per preparat (perbesaran 400×) oleh dua pengamat independen (ICC >0,80), dan skor yang dilaporkan adalah rata-rata dari 5 lapang pandang. Fibroblas dinilai sebagai skor semikuantitatif (1: <5 sel/LPB; 2: 5–15 sel/LPB; 3: >15 sel/LPB), bukan jumlah sel absolut.

Seluruh kelompok mengalami peningkatan skor fibroblas dari H3 ke H14, menunjukkan proses penyembuhan alami. Namun, tidak terdeteksi perbedaan signifikan antar kelompok. K1 (normal, tanpa luka) menunjukkan skor fibroblas yang relatif stabil (1,95→2,17), yang merupakan baseline normal tanpa cedera. Penelitian in vitro menunjukkan niacinamide dapat meningkatkan aktivitas fibroblas bila dipapar dalam jangka panjang [33,34], namun temuan ini tidak terkonfirmasi dalam penelitian ini.

Kepadatan Kolagen

Skor kolagen pada H3 dan H14 disajikan pada Tabel 3. Terdapat peningkatan kolagen yang signifikan dari H3 ke H14 pada semua kelompok ($p<0,001$), yang menunjukkan proses penyembuhan fisiologis. Namun, tidak terdeteksi perbedaan antar kelompok ($p=0,784$) maupun interaksi ($p=0,386$). Pernyataan ini harus dibaca sebagai "studi ini tidak mendeteksi perbedaan dalam sampel ini", bukan "niacinamide tidak memengaruhi kolagen".

Penilaian kolagen dilakukan secara semikuantitatif dengan skor 1–3 oleh dua pengamat independen (ICC >0,80). Efek waktu yang signifikan dengan partial $\eta^2=0,626$ menunjukkan bahwa waktu menyumbang 62,6% varians pada data, sedangkan efek kelompok sangat kecil (partial $\eta^2=0,103$). Dengan n=4 per sel, studi ini tidak memiliki power yang cukup untuk mendeteksi perbedaan antar kelompok yang mungkin ada.

Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan utama penelitian ini adalah:

1. Tidak adanya kelompok kontrol vehicle (kitosan/CMC/asam asetat tanpa

niacinamide). Kitosan itu sendiri memiliki aktivitas penyembuhan luka melalui berbagai mekanisme [12,13], sehingga efek yang diamati pada K4 dan K5 tidak dapat diatribusikan secara spesifik kepada niacinamide.

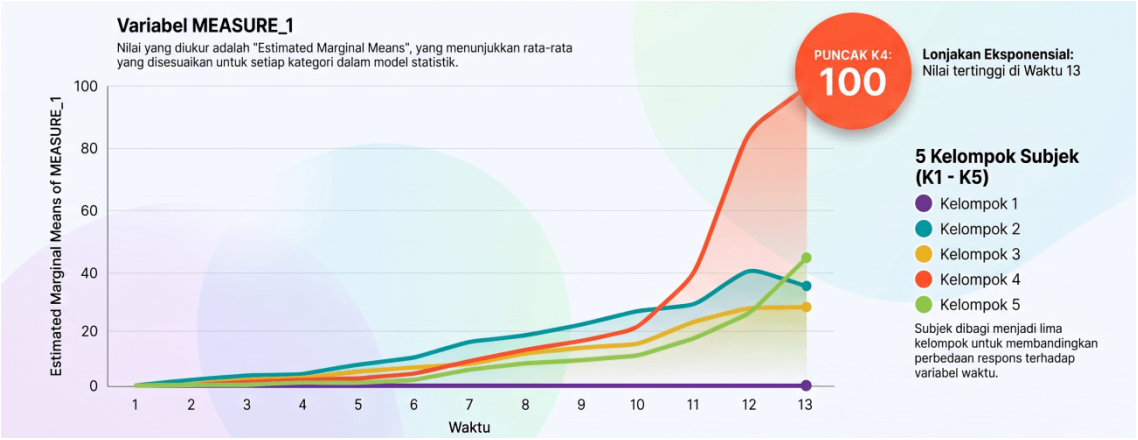
2. Ukuran sampel kecil (n=4 per subkelompok) yang memberikan power statistik rendah dan meningkatkan risiko Type II error [37,38].

3. Pengukuran biomarker di serum, bukan di jaringan luka. MDA serum mencerminkan stres oksidatif sistemik, sedangkan perubahan MDA lokal di jaringan luka lebih dinamis dan relevan [26,27].

4. Potensi bias pengukuran luka: meskipun telah dilakukan blinding, penggunaan jangka sorong pada luka yang tidak beraturan sempurna dapat menimbulkan variasi.

5. Penggunaan model tikus tanpa splint: penyembuhan luka pada tikus didominasi oleh kontraksi (melalui panniculus carnosus), berbeda dengan manusia yang lebih mengandalkan re-epitelisasi. Hal ini membatasi generalisasi hasil ke manusia.

7. Banyaknya pengujian statistik tanpa koreksi yang memadai untuk semua perbandingan, yang meningkatkan risiko Type I error.



Gambar 1. Grafik ini menunjukkan perubahan rata-rata marginal untuk setiap kelompok (K1–K5).

Tabel 2. Parameter Biomolekuler pada Hari ke-3 dan ke-14

Kelompok	n	MDA		EGF	
		H3	H14	H3	H14
K1 (Normal)	4	454,75±182	328,50±197	0,74±0,09	2,89±4,52
K2	4	298,00±36	329,16±145	2,09±2,03	1,21±0,37

(Kontrol -)					
K3 (Kontrol +)	4	456,50±206	428,25±372	0,86±0,72	1,06±0,53
K4 (Nia 0,4% b/v)	4	296,50±89	323,07±153	0,57±0,22	0,93±0,17
K5 (Nia 1% b/v)	4	301,06±84	344,11±111	3,35±2,30	0,95±0,63
Nilai p (Interaksi)		0,902		0,196	
Nilai p (Waktu)		0,904		0,848	

Tabel 3. Parameter Histopatologi pada Hari ke-3 dan ke-14

Kelompok	n	Fibroblas (skor)		Kolagen (skor)	
		H3	H14	H3	H14
K1 (Normal)	4	1,95±0,43	2,17±0,05	2,30±0,81	2,70±0,11
K2 (Kontrol -)	4	2,47±0,48	2,65±0,50	2,40±0,56	2,55±0,60
K3 (Kontrol +)	4	2,00±0,20	2,90±0,00	1,45±0,28	2,80±0,22
K4 (Nia 0,4% b/v)	4	1,90±0,32	2,60±0,413	1,80±0,79	2,50±0,41
K5 (Nia 1% b/v)	4	2,15±0,25	2,73±0,34	2,25±0,50	2,70±0,47
Nilai p (Interaksi)		0,196		0,386	
Nilai p (Waktu)		0,848		<0,001	

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, formulasi gel yang mengandung niacinamide 0,4% b/v berbasis kitosan menunjukkan percepatan yang signifikan pada parameter makroskopis penyembuhan luka (kecepatan dan persentase penutupan luka) pada tikus Wistar dibandingkan kontrol. Namun, karena tidak adanya kelompok kontrol vehicle (kitosan tanpa niacinamide), efek ini tidak dapat diatribusikan secara spesifik kepada niacinamide dan harus dianggap sebagai efek dari formulasi kombinasi (niacinamide + kitosan + vehicle). Studi ini tidak mendeteksi perbedaan signifikan pada kadar MDA, EGF, jumlah fibroblas, maupun kepadatan kolagen antar kelompok, namun dengan ketidakpastian yang tinggi akibat ukuran sampel kecil dan keterbatasan metodologis.

Diperlukan penelitian lanjutan dengan kontrol vehicle, jumlah sampel lebih besar, dan pengukuran biomarker di jaringan luka, untuk mengisolasi

kontribusi spesifik niacinamide dan mengidentifikasi mekanisme molekuler yang mendasari efek terapeutik yang teramati secara makroskopis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. dr. Hadyanto Lim, M.Kes, Sp.FK, FESC, FIBA., FAHA dan Dr. dr. Jekson Martiar Siahaan, Mbiomed, AIFO-K selaku pembimbing; Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed, Dr. dr. Endy Julianto, MKT, AIFO-K, dan dr. Putri C Eyanoer, MS.Epi., PhD, Sp.KKLP selaku penguji; serta seluruh pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol. 2020;10(9):200223.
2. Sinno H, Prakash S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. Plast Surg Int. 2013;2013:146764.
3. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010;89(3):219-229.
4. Stone WL. Physiology, Growth Factor. StatPearls. 2017.
5. Sosa V, Moline T, Somoza R, et al. Oxidative stress and cancer: an overview. Ageing Res Rev. 2013;12(1):376-390.
6. Gupta A, Singh RL, Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. Mol Cell Biochem. 2002;241(1-2):1-7.
7. Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. Bioimpacts. 2015;5(3):123-127.
8. Boo YC. Mechanistic basis and clinical evidence for the applications of nicotinamide (niacinamide) to control skin aging and pigmentation. Antioxidants. 2021;10(8):1315.
9. Marques C, Hadjab F, Porcello A, et al. Mechanistic insights into the multiple functions of niacinamide: therapeutic implications and cosmeceutical applications in functional skincare products. Antioxidants. 2024;13(4):425.
10. Kang HT, Lee HI, Hwang ES. Nicotinamide extends replicative lifespan of human cells. Aging Cell. 2006;5(5):423-436.
11. Desnita R, Luliana S, Kasim Z. Improving the in vitro penetration of niacinamide using span 60-based niosomal system in gel formulation. Pharmaciana. 2018;8(2):296.
12. Ahmed S, Ahmad M. Chitosan based dressings for wound care. Immunochem Immunopathol. 2015;1(2):1000106.
13. Che X, et al. Application of chitosan-based hydrogel in promoting wound healing: a review. Polymers. 2024;16(3):344.
14. Szymańska E, Winnicka K. Stability of chitosan – a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. Mar Drugs. 2015;13(4):1819-1846.
15. Hanna DH, Lotfy VF, Basta AH, Saad GR. Comparative evaluation for controlling release of niacin from protein- and cellulose-chitosan based hydrogels. Int J Biol Macromol. 2020;150:228-237.
16. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. J Invest Dermatol. 2018;138(9):1999-2005.
17. Santos TS, et al. Histological evidence of wound healing improvement in rats treated with oral administration of hydroalcoholic extract of Vitis labrusca. J Med Food. 2021;24(4):335-352.

18. Khristian E, Inderiati D. Sitohistoknologi. 2017.
19. Elabscience. Mouse EGF ELISA Kit (Cat. No. E-EL-M0025) and Mouse MDA ELISA Kit (Cat. No. E-EL-M0588) Instruction Manual. Wuhan: Elabscience Biotechnology Co., Ltd; 2024.
20. Crowther JR. The ELISA Guidebook. 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press; 2009.
21. Ashkani Esfahani S, Khoshneviszadeh M, Namazi MR, et al. Topical nicotinamide improves tissue regeneration in excisional full-thickness skin wounds: a stereological and pathological study. Trauma Mon. 2015;20(4):e18193.
22. Wessels Q, Pretorius E, Smith CM, Nel H. The potential of a niacinamide dominated cosmeceutical formulation on fibroblast activity and wound healing in vitro. Int Wound J. 2014;11(2):152-158.
23. Iraji F, Banan L. The efficacy of nicotinamide gel 4% as an adjuvant therapy in the treatment of cutaneous erosions of pemphigus vulgaris. Dermatol Ther. 2010;23(3):308-311.
24. Soma Y, Kashima M, Imaizumi A, et al. Moisturizing effects of topical nicotinamide on atopic dry skin. Int J Dermatol. 2005;44(3):197-202.
25. Greatens A, et al. Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. Exp Dermatol. 2005;14(7):498-508.
26. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. Anal Biochem. 2017;524:13-30.
27. Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. Bioimpacts. 2015;5(3):123-127.
28. Tyastono RD, et al. Difference of propolis administration as an antioxidant against oxidative stress (MDA) and apoptosis in skin graft model white rats. Bali Med J. 2021;4(1):59-65.
29. Tunc AS, Ercan N. Effect of topical sildenafil on wound healing and oxidative stress in rats. Injury. 2024;55(6):111525.
30. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186:421-431.
31. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, et al. Oxidative stress in aging human skin. Biomolecules. 2015;5(2):545-589.
32. Song X, et al. Nicotinamide attenuates aquaporin 3 overexpression induced by retinoic acid through inhibition of EGFR/ERK in cultured human skin keratinocytes. Int J Mol Med. 2008;22(2):229-236.
33. Knoedler S, et al. Fibroblasts – the cellular choreographers of wound healing. Front Immunol. 2023;14:1233800.
34. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:958381.
35. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. Bioengineering. 2021;8(5):63.
36. Shams S, Shahrousand M, Mohammadi-Rovshandeh J, et al. Encouraging collagen and epithelial layer formation via poly(lactic acid)/hyaluronic acid hybrid wound dressing containing niacinamide. Int J Biol Macromol. 2025;306:141463.
37. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum Associates; 1988.
38. Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. Nat Rev Neurosci. 2013;14(5):365-376.
39. Chan Ma, Sunil Prabhu. Characterization of a novel lyophilized chitosan hydrogel complex for the controlled release of a highly water soluble drug, niacinamide. Int J Drug Deliv. 2011;3(1):55-63.
40. Ghasemi A, et al. Wound Healing Effects of New Cream Formulations with Herbal Ingredients. MDPI. 2025.

41. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2010;8(6):e1000412.
42. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671-675.
43. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1986;1(8476):307-310.
44. MyBioSource. Mouse Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit, Cat. No. MBS269473. San Diego: MyBioSource; 2024.
45. Bancroft JD, Layton C. The Hematoxylin and Eosin. In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th ed. Elsevier; 2018:126-138.
46. PT Kalbe Farma Tbk. Bioplacenton® Gel: Informasi Produk. Bekasi: PT Kalbe Farma Tbk; 2024. [No. Reg. DKL7211638828A1]
47. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. J Chiropr Med. 2016;15(2):155-163.
48. Field A. Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics. 5th ed. London: SAGE Publications; 2018.
49. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika. 1965;52(3-4):591-611.
50. Bender R, Lange S. Adjusting for multiple testing—when and how? J Clin Epidemiol. 2001;54(4):343-349.