

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA TELANG TERHADAP
EKSPRESI GEN TGF- β DAN DENSITAS KOLAGEN
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Dengan
Penurunan Kolagen Akibat Terpapar UVB Intensitas Tinggi)**

TESIS

Untuk Memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Christin Magdalena Hutapea

MBK 2016010195

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA TELANG TERHADAP
EKSPRESI GEN TGF- β DAN DENSITAS KOLAGEN
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Dengan
Penurunan Kolagen Akibat Terpapar UVB Intensitas Tinggi)**

Disusun oleh :

Christin Magdalena Hutapea

MBK. 2016010195

Akan dipertahankan didepan tim penguji tanggal Agustus 2022
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan Sp.KK (K)
NIDN. 8951110021

Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

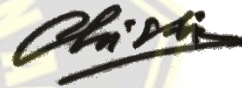


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050

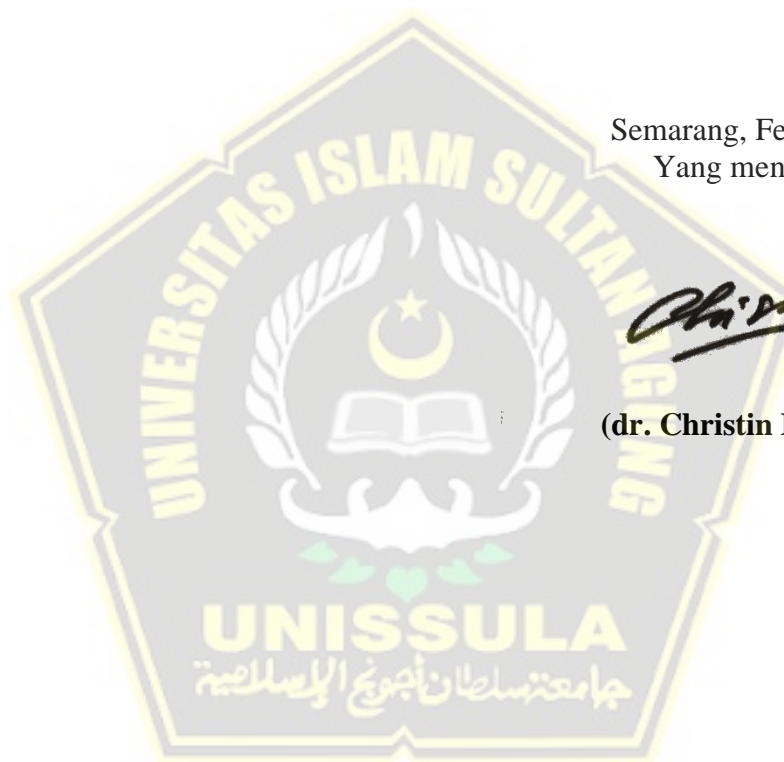
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.

Semarang, Februari 2022
Yang menyatakan,



(dr. Christin Magdalena)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr.Christin Magdalena Hutapea
Tempat / tanggal lahir : P.Siantar/13 Juli 1978
Agama : Kristen Protestan
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Kristen Kalam Kudus P.Siantar :lulus tahun 1985
2. SDK Methodist 1 Medan :lulus tahun 1991
3. SMPN 1 Medan :lulus tahun 1994
4. SMAN 4 Medan :lulus tahun 1997
5. S1 Fakultas Kedokteran USU :lulus tahun 2001
6. Profesi Dokter USU :lulus tahun 2003
7. S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang :(2020-sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : DJ. Hutapea SH. Msi
Ibu : Ny. M br. Siahaan
2. Nama Suami : KBP. Tony Binsar SH,SiK,Msi
3. Nama Anak : Jonathan Felix Sebastian

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis berjudul, **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen TGF- β Dan Densitas Kolagen (Studi Eksperimental in vivo pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan penurunan Kolagen akibat Paparan UVB Intensitas Tinggi)”** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang Ilmu Biomedik Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto SH. MHum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H. Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan juga sebagai dosen pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
4. Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K), selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

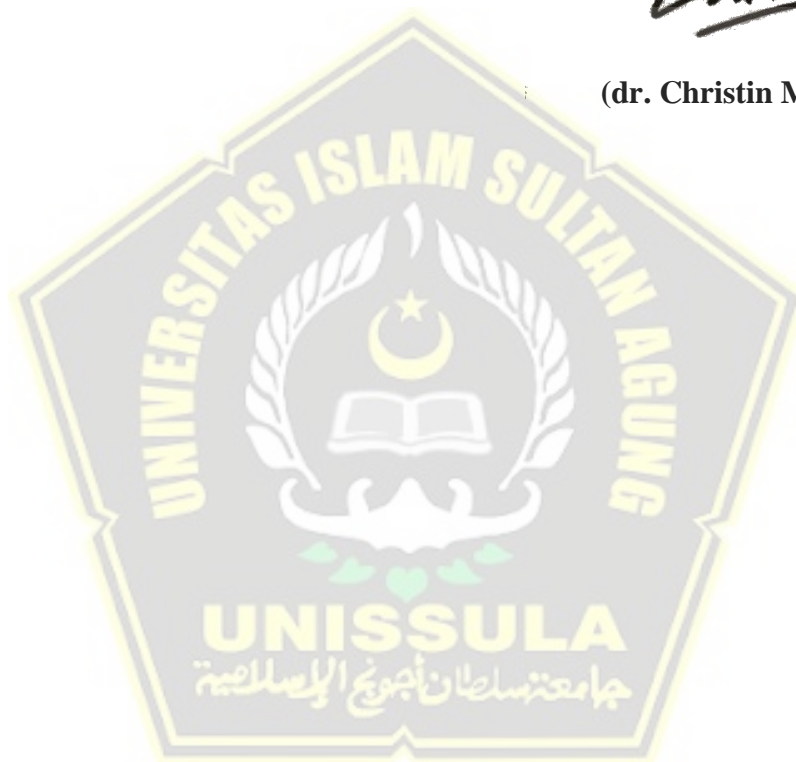
5. Ibu Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Ibu Dr. Drs. Atina Husana M.Kes selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Ibu Dr. dr. Chodijah, M.Kes selaku dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
9. Dukungan kedua orangtua Bapak Dj. Hutapea SH. Msi dan ibu M.Siahaan serta dukungan suami tercinta Kombes Tony Binsar SH. SIK. Msi dan ananda Jonathan yang selalu memberikan semangat dalam menyelesaikan tesis ini.
10. Teman-teman dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, Februari 2022



(dr. Christin Magdalena)



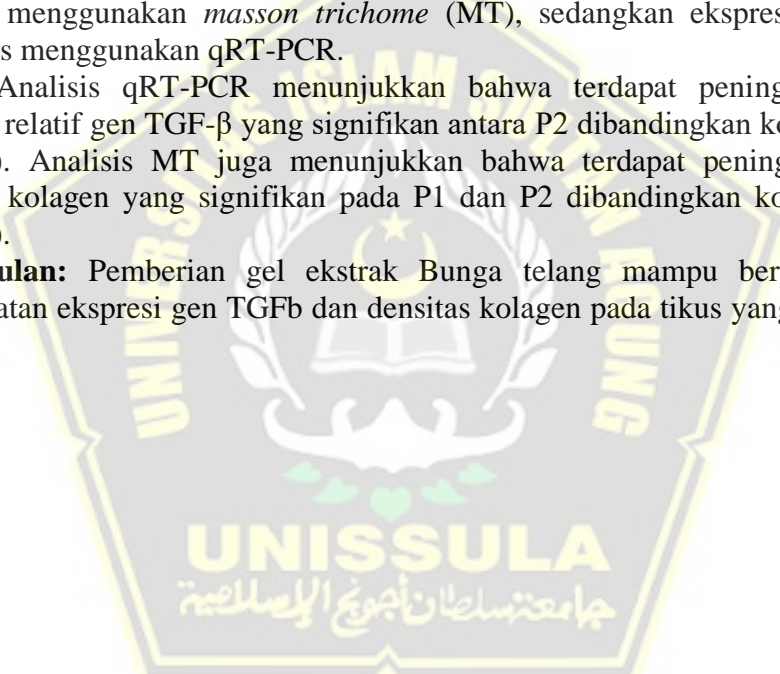
ABSTRAK

Latar Belakang: Sinar UVB yang diemisikan matahari memicu peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang berdampak pada penurunan kolagen jaringan kulit. Peningkatan ROS juga menghambat produksi *growth factor* prokolagen seperti *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) sehingga berujung pada penghambatan sintesis kolagen. Senyawa yang terkandung dalam bunga Telang, seperti antosianin diketahui berperan dalam menghambat produksi ROS paparan sinar UVB sehingga dapat menghambat degradasi kolagen pada jaringan kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak bunga Telang terhadap ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada jaringan kulit tikus yang terpapar UVB intensitas tinggi.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* menggunakan 4 kelompok penelitian, yaitu 1 kelompok tikus sehat, 1 kelompok tikus UVB dan 2 kelompok perlakuan; terdiri dari tikus yang diberi gel ekstrak bunga telang 5% dan 10%. Densitas kolagen pada sampel dianalisis menggunakan *masson trichome* (MT), sedangkan ekspresi gen TGF β dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Analisis qRT-PCR menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata ekspresi relatif gen TGF- β yang signifikan antara P2 dibandingkan kontrol negatif ($p < 0.05$). Analisis MT juga menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata densitas kolagen yang signifikan pada P1 dan P2 dibandingkan kontrol negatif ($p < 0.05$).

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak Bunga telang mampu berperan dalam peningkatan ekspresi gen TGF β dan densitas kolagen pada tikus yang diberi sinar UVB.



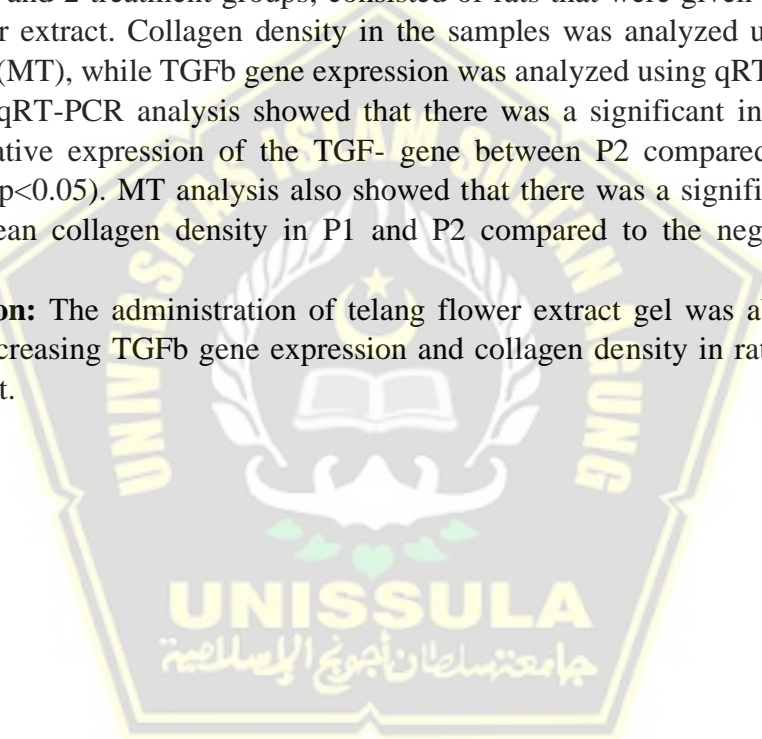
ABSTRACT

Background: UVB rays emitted by the sun trigger an increase in reactive oxygen species (ROS) which results in a decrease in skin tissue collagen. The increase in ROS also inhibits the production of procollagen growth factors such as Transforming Growth Factor (TGF- β) so that it leads to inhibition of collagen synthesis. Compounds contained in the Telang flower, such as anthocyanins are known to play a role in inhibiting the production of ROS by exposure to UVB rays so that they can inhibit the degradation of collagen in skin tissue. This study aimed to determine the effect of giving Telang flower extract gel on TGF- β gene expression and collagen density in rat skin tissue exposed to high intensity UVB.

Methods: This study was an experimental study with a post-test only control group design using 4 research groups, namely 1 group of healthy rats, 1 group of UVB rats and 2 treatment groups; consisted of rats that were given 5% and 10% gel flower extract. Collagen density in the samples was analyzed using Masson trichome (MT), while TGF β gene expression was analyzed using qRT-PCR.

Results: qRT-PCR analysis showed that there was a significant increase in the mean relative expression of the TGF- gene between P2 compared to negative controls ($p < 0.05$). MT analysis also showed that there was a significant increase in the mean collagen density in P1 and P2 compared to the negative control ($p < 0.05$).

Conclusion: The administration of telang flower extract gel was able to play a role in increasing TGF β gene expression and collagen density in rats exposed to UVB light.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Transforming Growth Factor β</i> (TGF- β).....	9
2.1.1. Definisi TGF- β	10
2.1.2. Aktivitas TGF- β	14
2.1.3. Aktivitas TGF β dalam Sintesis Kolagen.....	16
2.2. Kolagen.....	18
2.2.1. Definisi Kolagen	18

2.2.2.	Jenis Kolagen	19
2.2.3.	Manfaat Kolagen.....	20
2.3.	Ekstrak Bunga Telang	21
2.3.1.	Definisi dan Deskripsi Bunga Telang	21
2.3.2.	Manfaat Bunga Telang dalam Menekan Inflamasi	24
2.3.3.	Manfaat Bunga Telang pada Penuaan Dini.....	25
2.3.4.	Manfaat Bunga Telang pada Penurunan Kolagen.....	25
2.4.	Tikus Putih Sebagai Hewan Uji Model Penurunan Kolagen.....	27
2.4.1.	Karakteristik Tikus Putih sebagai Hewan Uji	27
2.5.	Gel.....	28
2.5.1.	Definisi dan Karakteristik Gel	28
2.5.2.	Kelebihan dan Kekurangan Bahan Gel	29
2.6.	Pengaruh gel ekstrak bunga telang terhadap ekspresi TGF- β dan densitas kolagen pada tikus yang dipapar UVB	31
BAB III_KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		33
3.1.	Kerangka Teori	33
3.2.	Kerangka Konsep.....	37
3.3.	Hipotesis	37
BAB IV_METODE PENELITIAN		38
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	38
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	39
4.2.1.	Variabel Peneltian	39
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	39
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	41
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	41
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	41
4.3.3.	Cara Penentuan Sampel Penelitian.....	42
4.3.4.	Besar Sampel.....	42
4.4.	Alat dan Bahan.....	43
4.4.1.	Alat.....	43

4.4.2. Bahan.....	43
4.5. Cara Penelitian.....	44
4.5.1. Perolehan Ethical Clearance	44
4.5.2. Cara Pembuatan Gel Ekstrak Bunga Telang.....	44
4.5.3. Penetapan Dosis	45
4.5.4. Paparan UV-B	45
4.5.5. Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen	46
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan	47
4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.....	47
4.5.8. Pengecatan Kolagen.....	48
4.5.9. Analisis Kuantitatif Ekspresi TGF beta menggunakan RT-PCR.....	49
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	50
4.7. Analisa Data.....	50
4.8. Alur Penelitian	51
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
5.1. Hasil Penelitian.....	52
5.1.1. Hasil Validasi Ekstrak Bunga Telang	52
5.1.2. Densitas Kolagen pasca induksi UVB pada tikus	53
5.1.3. Gel ekstrak Bunga Telang meningkatkan densitas kolagen jaringan kulit tikus yang terpapar UVB	54
5.1.4. Gel ekstrak Bunga Telang meningkatkan ekspresi gen TGF β jaringan kulit tikus yang terpapar UVB	56
5.2. Pembahasan.....	58
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	62
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1. Kesimpulan	63
6.2. Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ekspresi gen TGF- β	10
Gambar 2.2.	Aktifitas TGF- β dalam sintesis kolagen.....	18
Gambar 2.3.	Ilustrasi Skematis Ekspresi dan Lokalisasi Kolagen Individu di Kulit.....	20
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian.....	38
Gambar 4.2.	Alur penelitian.....	51
Gambar 5.1.	(A) Jaringan kulit tikus sehat (B). Penurunan densitas kolagen pada jaringan kulit tikus yang diinduksi UVB.....	53
Gambar 5.2.	Penampang densitas kolagen pada (A) jaringan kulit tikus sehat (B) kontrol negatif tikus yang diinduksi UVB (C) kelompok P1 (5%) dan (D) kelompok P2 (10%). Densitas kolagen ditunjukkan dengan warna biru.....	55
Gambar 5.3.	Grafik Representatif Densitas Kolagen pada Semua Kelompok Perlakuan (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).....	55
Gambar 5.4.	Analisis ekspresi relative gen TGF β menggunakan qRT-PCR (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).....	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1. Komponen PCR Mix TGF Beta.....	50
Tabel 5.1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Bunga Telang.....	53
Tabel 5.2. Data Hasil Penelitian Densitas Kolagen dan Ekspresi Gen TGF- β.....	54
Tabel 5.4. Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Densitas Kolagen.....	55
Tabel 5.5. Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Ekspresi Relatif Gen TGFβ.....	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Ethical Clearance.....	75
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian.....	76
Lampiran 3. Data Hitungan MT.....	80
Lampiran 4. Data PCR.....	81
Lampiran 5. Data Hasil Penelitian.....	83
Lampiran 6. Hasil Determinasi Bunga Telang.....	87
Lampiran 7. Laporan Hasil Uji Fitokimia Bunga Telang.....	88



DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: <i>Activator Protein -1</i>
CTE	: <i>Clitorea ternatea Extract</i>
ERK	: <i>Extraceluler Signal Regulated Kinase</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
kDa	: <i>Kilodalton</i>
M1/M2	: <i>Macrofage 1/Macrofage 2</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MMP	: <i>Matrix Metaloprotease</i>
NF-KB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT PCR	: <i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>
Smad	: <i>Small Mothers against decapentaplegic</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TICs	: <i>Tumor Initiating Cells</i>
TNF alfa	: <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sinar UVB merupakan salah satu sinar UV yang diemisikan oleh matahari yang dapat memicu timbulnya keriput pada kulit akibat berkurangnya kolagen.¹⁻⁴ Paparan Sinar UVB dengan intensitas radiasi yang tinggi diketahui mampu menginduksi terbentuknya spesies oksigen reaktif (ROS) pada kulit. Hal ini mengaktifasi produksi sitokin pro inflamasi untuk kemudian mengaktifasi sel-sel imun seperti neutrofil menginvasi jaringan kulit. Peningkatan ROS mengaktifasi jalur protein kinase yang kemudian memicu peningkatan produksi enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) yang disekresikan oleh neutrofil untuk mendegradasi kolagen. Peningkatan ROS yang berkepanjangan dapat menghambat produksi *growth factor* pro-kolagen seperti *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) sehingga berujung pada penghambatan sintesis kolagen.⁵ Tingginya produksi enzim MMP serta adanya penghambatan sintesis kolagen berdampak pada berkurangnya densitas kolagen yang menyebabkan timbulnya keriput yang berujung pada berkurangnya estetika wajah. Pemberian antioksidan menurut penelitian terdahulu dapat menurunkan kadar ROS sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada inisiasi sintesis kolagen.⁶ Bunga Telang (*Clitorea ternatea*) diketahui memiliki kandungan senyawa antioksidan yang mampu mengurangi kadar ROS⁷⁻⁹, namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh bunga Telang terhadap kadar ekspresi

gen TGF- β dan densitas kolagen pada kulit akibat paparan sinar UVB dengan intensitas tinggi.

Penurunan kolagen di jaringan kulit merupakan salah satu dampak yang disebabkan oleh paparan sinar UVB. Sehubungan dengan mekanisme penurunan kolagen, penetrasi UVB pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS yang secara langsung menginduksi kerusakan DNA dan memicu sekresi interleukin (IL)-6, yang mengakibatkan overekspresi MMP.¹⁰ Enzim MMP adalah kolagenase yang diaktifkan oleh faktor transkripsi protein-1 (AP-1). Di antara semua tipe MMP, degradasi kolagen paling banyak diprakarsai oleh MMP-1 dan dilanjutkan oleh MMP-3. Sintesis kolagen diinisiasi oleh TGF- β 1 melalui aktivasi kompleks smad2 dan smad3 yang berujung pada sintesis prokolagen 1 sebagai prekursor kolagen.¹¹

Terapi yang umum digunakan untuk mengatasi penurunan kolagen akibat paparan sinar UVB, berfokus pada perlindungan terhadap paparan UVB serta memperbaiki kerusakan jaringan dengan menggunakan beberapa bahan kimia seperti retinoid dan 5-fluorouracil.¹² Mekanisme senyawa retinoid dalam mengatasi penurunan kolagen adalah melalui reseptor asam retinoat, yang bertindak sebagai faktor transkripsi dalam regulasi gen.¹³ Selain itu, retinoid telah terbukti meningkatkan produksi kolagen, meningkatkan regulasi proliferasi fibroblas.¹⁴⁻¹⁶ Namun demikian penggunaan senyawa kimia secara berkepanjangan dapat menyebabkan gangguan pada kulit seperti iritasi, kulit kering dan kemerahan pada kulit.

Bunga Telang diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.^{17,18} Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen.¹⁹ Selain itu penghambatan ROS juga mampu menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu proses polarisasi makrofag 1 (M1) menjadi makrofage 2 (M2) yang mampu mensekresikan TGF- β 1.²⁰ Sekresi faktor pertumbuhan ini dapat mengaktivasi kompleks smad 2/3 yang berperan dalam produksi kolagen. Namun hingga saat ini peran ekstrak bunga Telang pada tikus yang dipapar UVB dengan intensitas tinggi, dilihat dari kadar ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen belum pernah diteliti.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan pertanyaan : "Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB intensitas tinggi?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen

TGF- β dan densitas kolagen pada tikus jantan galur Wistar dengan penurunan kolagen akibat terpapar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Untuk membuktikan peningkatan ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar UVB setelah diberi gel ekstrak bunga telang secara topikal 5% dan 10% dibandingkan dengan kontrol.

1.3.2.2. Untuk membuktikan peningkatan kadar kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar UVB setelah diberi gel ekstrak bunga telang secara topikal 5% dan 10% dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian gel ekstrak bunga Telang terhadap kadar ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar UVB dengan intensitas tinggi.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah:

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh ekstrak gel bunga Telang terhadap kadar TGF- β dan

densitas kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar UVB.

2. Hasil penelitian lebih lanjut diharapkan gel ekstrak Bunga Telang dapat diaplikasikan masyarakat pada kulit yang mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB dengan intensitas tinggi.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Saritani et al., 2021 ¹⁹	<i>Clitoria ternatea L. extract cream 5% inhibits the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in Wistar rats (Rattus norvegicus) dermic skin exposed to ultraviolet B</i>	In vivo eksperimental	Terjadi penurunan MMP-1 dan Peningkatan Kolagen
2.	Rahayu S, 2020 ²¹	Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (<i>Clitoria Ternatea L.</i>) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap	Observational	nilai IC50 ekstrak Bunga Telang sebesar 4,19 ppm dan 3,08 ppm
3.	Fitrilia et al., 2020 ⁹	<i>The Potential of Butterfly Flower Methanol Extract as an antioxidant by Silico</i>	In silico	Ekstrak Bunga Telang mampu menghambat terjadinya ROS
4	Zakaria et al., 2018 ²²	<i>In vitro protective effects of an aqueous extract of Clitoria ternatea L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes</i>	In vitro experimental	Ekstrak Bunga Telang menekan kerusakan
5	Varsha Jadhav et al., 2018 ²³	<i>Evaluation of antioxidant potential of Clitoria Ternatea</i>	Observational	Ekstrak bunga telang mampu memperlambat reaksi oksidatif stress
6	Adhikarya et al 2018 ²⁴	<i>Clitoria ternatea flower petals: Effect on TNFR1 neutralization via</i>	In vivo experimental	Ekstrak bunga telang (CTE)

	<i>downregulation of synovial matrix metalloproteases</i>		memiliki potensi aktivitas anti rematik yang menargetkan synovial MMP2 pada sendi rematik dan penargetan TNFR1 mungkin menjadi kombinasi terapeutic masa depan.
7	Chen <i>et al.</i> , 2018 <i>Clitoria ternatea flower petals: Effect on TNFR1 neutralization via downregulation of synovial matrix metalloproteases</i>	In vivo experimental	Bunga Telang memiliki aktivitas antiradical bebas serta mampu memutihkan kulit

Berdasarkan Tabel 1.1 dapat diketahui bahwa belum terdapat kajian yang menginvestigasi pengaruh ekstrak bunga Telang terhadap kadar TGF- β dan densitas kolagen pada tikus model penurunan kolagen akibat paparan UVB dengan dosis 160mj/cm² sebanyak 15 menit perhari selama 5 hari . Penelitian yang dilakukan oleh Saritani *et al* tahun 2021, mengkaji pengaruh krim Bunga Telang terhadap kadar MMP-3 dan kolagen tikus yang dipapar UVB. Lalu tahun 2020 Fitrilia *et al*,meneliti potensi ekstrak Bunga Telang sebagai sebagai antioksidan in silico. Penelitian Rahayu S meneliti ekstrak Bunga Telang sebagai antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 4,19 ppm dan 3,08 ppm. Pada tahun 2018 Zakaria *et al* meneliti

efek ekstrak Bunga Telang terhadap *hidrogen peroxide-induced cytotoxicity* dan UV yang menginduksi kerusakan mtDNA pada keratinocytes manusia. Varsha Jadhav *et al* tahun 2018 juga meneliti potensi *Clitorea ternatea* atau Bunga Telang sebagai antioksidan, pada tahun yang sama Adhikarya R dan team juga meneliti efek ekstrak Bunga Telang terhadap TNFR1 netruutralization via *down egulation of synovial matrix mettallopproteases* dan didapat hasil bahwa ekstrak bunga Telang (CTE) juga memiliki aktivitas anti rematik dan dapat menjadi kombinasi terapi di masa depan. Sementara penelitian Chen *et al.* mengkaji efek ekstrak Bunga Telang dalam bentuk masker sebagai antiradikal bebas dan mencerahkan kulit wajah.

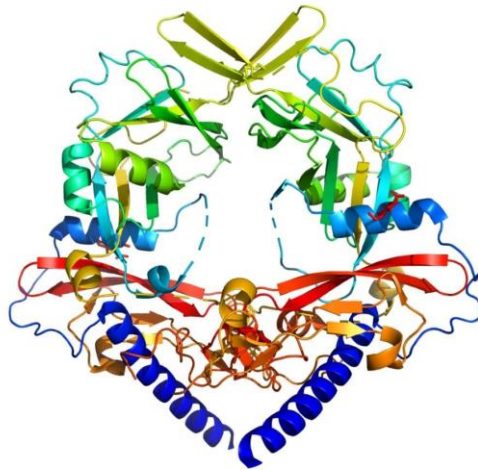
Beberapa penelitian masih terbatas pada analisis potensi antioksidan dan peran Bunga Telang sebagai penghambat ROS dan pada penyakit rematik, oleh karena itu penelitian yang mengkaji pengaruh Bunga Telang dengan konsentrasi 5% dan 10% terhadap ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada tikus yang dipapar UVB masih original dan layak untuk dilanjutkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Transforming Growth Factor β* (TGF- β)

Transforming Growth Factor adalah senyawa protein yang diturunkan dari keping darah selain EGF dan PDGF dan memiliki dua jenis subtype yaitu TGF alpha dan TGF beta.²⁵ TGF- α merupakan hormon mitogenik yang disekresi oleh sel kanker dan fibroblas yang termodifikasi oleh infeksi retroviral dan memiliki panjang 50 AA dengan gugus disulfida yang menghubungkan deret 8-Cys-Cys-21, 16-Cys-Cys-32, 34-Cys-Cys-43; dan memiliki gugus fungsional lain yaitu Phe-15, Arg-42, dan Leu-48.²⁶ Hormon ini bersinergis dengan faktor pertumbuhan yang lain seperti TGF- β dan mengaktifasi perubahan fenotipe pada sel, seperti transisi epitelial-mesenkimal, sehingga berperan dalam onkogenesis selain dalam penyembuhan.^{27,28} Peningkatan rasio kompleks pencerap TGF- α dan EGF terjadi pada kasus kanker. TGF- β menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah walaupun menghambat proliferasi sel endotelial dan merupakan senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag, sehingga pada sel tumor sering dijumpai rasio makrofag yang sangat tinggi. Walaupun bersifat immunosupresif, TGF- β menghambat pertumbuhan kanker ovarium; dan bersama faktor osteoinduksi menstimulasi pembentukan tulang.



Gambar 2.1. Ekspresi gen TGF- β

2.1.1. Definisi TGF- β

Transforming Growth Factor β (TGF- β) adalah sitokin pleiotropik yang memiliki ukuran molekul 25 kDa^{29,30}. Molekul TGF- β mengarahkan aktivitasnya melalui mode aksi intrakrin, autokrin, parakrin dan endokrin. TGF- β berperan penting dalam beberapa proses seluler yang meliputi proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan apoptosis yang diperlukan untuk menjaga homeostasis suatu jaringan. Pada kondisi normal, TGF- β berperan dalam memberikan efek apoptosis, hal ini penting untuk diferensiasi dan regenerasi sel, apabila TGF- β berada pada kadar yang tinggi maka akan menyebabkan terjadinya kematian sel secara masif, pada sel hepar akan menyebabkan fibrosis dan sirosis. Pada proses tumorigenesis tahap awal, TGF- β berperan sebagai faktor supresor, namun apabila terjadi aktivasi sinyal pengaktifan TGF- β yang

berlebihan justru akan berkontribusi terhadap berlanjutnya progresi tumor oleh karena terjadinya resistensi efek supresif.³¹⁻³³ Hipotesis *stem cell* kanker mengatakan bahwa berbagai jenis tumor diinisiasi oleh suatu sub populasi sel yang menampilkan karakteristik seperti *stem cell* yang disebut dengan *stem cell-like cancer cells* atau *tumor initiating cells* (TICs) yang berkontribusi terhadap terjadinya resistensi obat. Sifat self renewal dari TICs ini ditekan oleh terapi farmakologi yang menghambat sinyal TGF- β , hal ini mengindikasikan bahwa jalur sinyal TGF- β berperan penting dalam menjaga sub populasi TICs.³⁴⁻³⁶ Pada kadar yang tinggi, TGF- β sering menghambat proliferasi sel secara reversibel, beberapa *stem cell* dewasa tidak hanya mengekspresikan reseptor TGF- β pada permukaan selnya namun juga dapat bertahan pada posisi diam (*quiescent*) selama beberapa bulan, diam di sini berarti bahwa *stem cell* dapat memasuki siklus sel kembali sebagai respon terhadap kondisi lingkungan tertentu, hal ini berbeda dengan kondisi penuaan sel dan diferensiasi sel pada umumnya. Kemampuan anggota TGF- β superfamily dalam menyeimbangkan antara proses proliferasi sel yang aktif dan siklus sel yang reversibel penting untuk menjaga kemampuan *stem cell* untuk berespon cepat terhadap perubahan fisiologi jaringan.³⁷ Jalur sinyal TGF- β mengendalikan proses biologi pada spektrum luas dari homeostasis sistem imun sampai self renewal.³⁸

Faktor pertumbuhan ini terdiri dari tiga isoform berbeda yang diekspresikan dalam jaringan mamalia: TGF- β 1, 2 dan 3, dikodekan oleh gen yang terletak di kromosom berbeda.²⁹ Isoform 1 dan 2 memiliki fungsi yang hampir sama dalam hal efek biologis, sedangkan isoform 3 cenderung memberikan beberapa aktivitas yang berlawanan dengan kedua isoform tersebut. Faktor pertumbuhan TGF- β 1 adalah polipeptida dalam keluarga transforming growth factor beta sitokin. TGF- β 1 merupakan protein yang disekresi untuk fungsi sel-sel kebanyakan termasuk untuk mengontrol pertumbuhan sel, proliferasi sel, differensiasi sel dan apoptosis.³⁹⁻⁴² TGF - β 1 merupakan isoform yang paling melimpah dan diekspresikan untuk meregulasi biologis, termasuk untuk mengaktifasi sel fibroblas dalam proses pembentukan kolagen.⁴³ TGF- β adalah peptida multifungsi yang mengatur proliferasi, difrensiasi, dan fungsi-fungsi lain dalam berbagai jenis sel.⁴⁴⁻⁴⁶ TGF- β bekerja secara sinergis dengan TGF- α dalam menginduksi transformasi. TGF- β juga bekerja dengan mekanisme negatif untuk faktor pertumbuhan autokrin.⁴⁷⁻⁴⁹ Disregulasi aktivasi dan sinyal TGF- β akan menyebabkan apoptosis. Ada banyak sel yang mensintesis TGF- β dan hampir semua dari sel-sel itu memiliki reseptor spesifik untuk peptida ini.

TGF- β 1 pertama kali diidentifikasi dalam platelet manusia sebagai protein dengan berat molekul 25 kilodalton dan saat itu

diduga berperan dalam proses penyembuhan luka.⁵⁰⁻⁵² Belakangan, TGF- β dikarakterisasi sebagai prekursor protein (mengandung 390 asam amino) yang diproses secara proteolitik untuk menghasilkan peptida matur dari 112 asam amino.

TGF- β 1 memiliki peran penting untuk mengontrol sistem imun dan menunjukkan aktivitas yang berbeda terhadap tipe sel yang juga berbeda. Kebanyakan sel imun (atau leukosit) menghasilkan TGF- β 1.^{53,54} Pada manusia TGF- β 1 dikode oleh gen TGFB.

Faktor pertumbuhan TGF- β 2 pertama kali ditemukan pada glioblastoma manusia dan awalnya didefinisikan sebagai “faktor penekan sel T yang berasal dari glioblastoma” dan juga diekspresikan dalam banyak jenis sel dan jaringan, khususnya neuron dan sel astroglial, paru-paru, otot polos dan kelenjar/jaringan seksual.^{25,55,56} Faktor pertumbuhan ini juga penting dalam pertumbuhan tumor karena dapat meningkatkan proliferasi sel dengan cara autokrin dan mengurangi pengawasan kekebalan terhadap perkembangan tumor.

Faktor pertumbuhan TGF- β 3 diisolasi dari garis sel rhabdomyosarcoma.⁵⁷⁻⁵⁹ Selain itu, setiap isoform menyajikan homologi antarspesies yang tinggi di sepanjang mamalia, lebih besar dari 97%, bahkan mencapai lebih dari 99% di antara manusia dan spesies hewan pengerat eksperimental. Keseimbangan proses seluler

diperlukan untuk menjaga homeostasis suatu jaringan. Sitokin TGF- β merupakan sitokin multifungsional yang berperan penting dalam regulasi beberapa proses seluler termasuk self renewal dan diferensiasi sel. Sifat pleiotropik TGF- β berimplikasi pada munculnya suatu proses patologis apabila terjadi deregulasi pada jalur pengaktifannya sehingga TGF- β juga berperan dalam meregulasi homeostasis. Jalur sinyal TGF- β berperan dominan pada diferensiasi sel dengan mengatur ekspresi gen-gen yang berfungsi dalam proses proliferasi sel dan perbaikan jaringan.^{60,61} Proses perkembangan *stem cell* yang meliputi self renewal dan diferensiasi sel dipengaruhi oleh faktor intrinsik yang terdiri dari epigenetik dan faktor transkripsi utama, sedangkan faktor ekstrinsik yang berpengaruh terdiri dari inhibitor dan jalur sinyal. TGF- β berperan dalam mengaktifkan sinyal proliferasi sel

2.1.2. Aktivitas TGF- β

TGF- β merupakan factor yang disekresikan, dan tergantung pada tipe sel, ekspresi dan ligan dan dosis. TGF- β bersifat pleiotropik dan kadang antagonis dengan efek seluler dalam hal proliferasi, differensiasi, migrasi dan kematian sel.⁶²⁻⁶⁵ Aktivitas biologis pleiotropik TGF- β berperan dalam mengerahkan berbagai macam proses seluler termasuk kontrol proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis, morfogenesis, motilitas dan invasi, homeostasis sel imun,

dan produksi matriks ekstraseluler.⁶⁶⁻⁶⁹ Selain itu, TGF- β menghasilkan dan memodulasi beberapa proses jaringan dan sistemik seperti remodeling matriks ekstraseluler, angiogenesis secara *in vivo*, immunosupresi, dan peradangan kronis.^{70,71} Aksi dari TGF beta tergantung pada beberapa parameter termasuk keberadaan sitokin sitokin lain. Pada beberapa contoh, efek biologis TGF beta dimodulasi oleh sitokin mitogenik yang berfungsi membatalkan efek inhibitori TGF beta. Hal ini meyakinkan bahwa SCF memicu survival *stem cell* hematopoietik dan mencegah efek penghambatan TGF beta pada sel ini TGF- β superfamily selain terdiri dari TGF- β 1-3 juga terdapat BMP (bone morphogenetics protein), GDFs (growth differentiation factors), AMH (anti-Mullerian hormone), Activin, dan Nodal. Tipe ligand BMPs dan Nodal ditemukan pada vertebrata dan invertebrate. Sintesis dan ekspresi reseptor TGF- β 1 terjadi di banyak sel, namun aktivasinya bersifat parakrin dan terbatas pada tempat di mana TGF- β 1 dihasilkan. Ekspresi TGF-1 dipengaruhi oleh plasmin, matriks metalloproteinase, trombospondin-1, pH, dan ROS. Namun, aktivasi TGF- β 1 juga dikendalikan oleh integrin tertentu yang dapat berikatan dengan sekuen Arg-Gly-Asp pada LAPs (latency associated proteins) menghasilkan perubahan konformasional dari bentuk aktif ke bentuk prodomain. Sehingga bagi keseluruhan superfamily, agonis dan antagonis faktor ekstraseluler terlarut pada jaringan

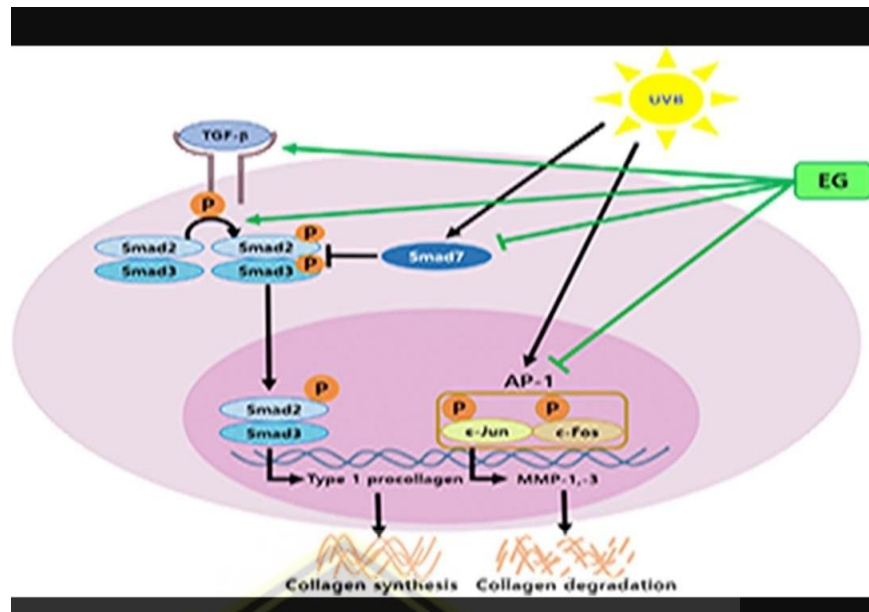
berkontribusi pada kompleksitas pengaturan akses ligan terhadap reseptornya. Sinyal ligan TGF- β diaktifkan oleh ikatan serin-treonin kinase trans membran, yang dikenal sebagai reseptor tipe I dan II, pada vertebrata ada 7 tipe reseptor tipe I (Activin- receptor like kinases tipe /ALKs 1-7), dan 5 reseptor tipe II . Ligan TGF superfamily berikatan secara spesifik dengan kompleks reseptor tipe I dan II, saat aktivasi ligan, sebuah reseptor tipe II memfosforilasi reseptor tipe I partnernya. Efektor kanonikal inti adalah regulatori R-Smad 1, 2, 3, 5, dan 8. Smad 2/3 difosforilasi oleh ALK4/5/7. Sebaliknya, Smad1/5/8 difosforilasi oleh ALK1/2/3/6. Smad inhibitori (Smad6 dan 7) dapat mengganggu percabangan tersebut dengan berikatan secara langsung dengan R-Smad dan memblokir modifikasinya.^{72,73}

2.1.3. Aktivitas TGF β dalam Sintesis Kolagen

Kolagen merupakan ECM paling penting didermis kulit sehingga berkurangnya kolagen akan menyebabkan berkurangnya elastisitas kulit, kulit kendur dan menua.^{74,75} Paparan UVB yang intens dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen bahkan dapat menginduksi penghentian siklus pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel.⁷⁶ Untuk berinteraksi dengan serat kolagen, fibroblast

mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler.⁷⁷ Myofibroblast diregulasi oleh sitokin transforming growth factor beta (TGF- β).⁷⁸ TGF- β 1 yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β receptor (TGF- β R) yang menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA untuk mengaktifasi jalur smad 2/3 yang berdampak pada sintesis type 1 procollagen lalu menjadi kolagen.^{79,80} Smad 2/3 yang teraktivasi akan berikatan dengan smad 4 yang berdampak pada masuknya kompleks protein tersebut ke inti sel. Disisi lain TGF- β melalui jalur ERK $\frac{1}{2}$ mengaktifasi protein co-factor, lalu masuk ke inti sel dan membantu penempelan kompleks smad pada gene site pro-collagen-1.⁸¹⁻⁸⁴

UVB menghambat aktivasi smad 2/3 melalui aktivasi smad7. Disisi lain UVB juga mengaktifasi protein AP-1 yang berdampak pada penempelan kompleks c-jun/c-fos sehingga mengaktifasi ekspresi MMP1 dan 3. MMP1 dan 3 bertanggung jawab terhadap degradasi kolagen.⁴⁷ Hal ini dapat dilihat dalam gambar dibawah ini.



Gambar 2.2. Aktifitas TGF- β dalam sintesis kolagen

2.2. Kolagen

2.2.1. Definisi Kolagen

Kolagen adalah komponen matriks ekstraseluler tertua di dunia hewan. Saat ini, 29 trimer homo dan hetero telah diidentifikasi, semuanya memiliki kesamaan pengulangan asam amino $[\text{Gly-X-Y}]_n$ yang membedakan struktur primernya dari protein lain dan memungkinkan struktur kuaterner khas, heliks rangkap tiga. Berdasarkan struktur agregat, kolagen telah diklasifikasikan sebagai kolagen berserat, non-berserat, berserabut dan terkait fibril dengan heliks tiga terputus. Kolagen terdiri dari beberapa jenis, salah satunya adalah kolagen tipe I yang paling melimpah di jaringan mamalia. Sekitar 70-90% dari kolagen yang ditemukan di tubuh merupakan kolagen tipe I. Kolagen tipe I adalah

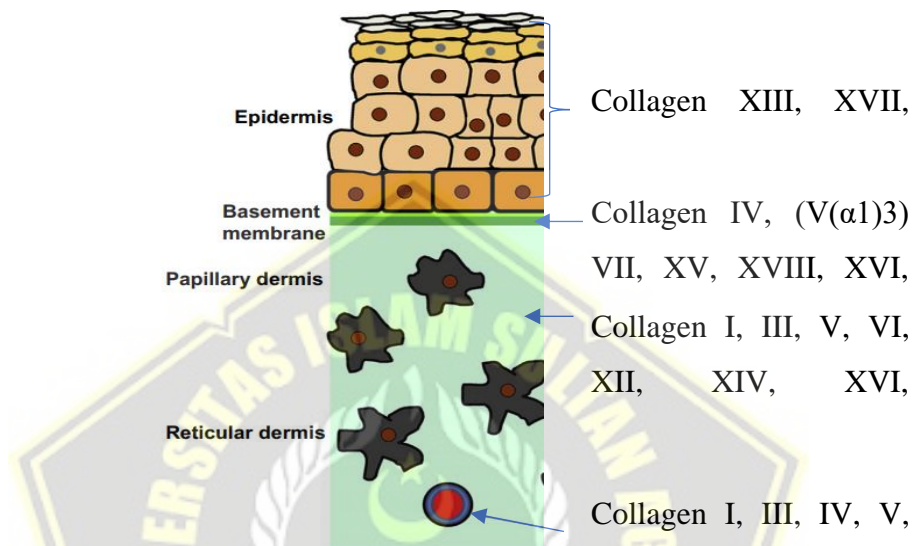
elemen struktural utama dari semua jaringan ikat yang berfungsi untuk menyediakan perancah struktural untuk komponen lain terutama karena jalur pengikatan silang lisil oksidase. Kolagen tipe I juga terkait dengan interaksi sel, migrasi, perlekatan, diferensiasi, dan organisasi²³.

2.2.2. Jenis Kolagen

Kolagen adalah keluarga protein matriks ekstraseluler yang paling melimpah pada vertebrata. Protein dalam superfamili kolagen semuanya memiliki tiga rantai polipeptida dengan urutan berulang - Gly-Xaa-Yaa- yang diperlukan, Xaa dan Yaa tersusun atas prolin dan 4-hidroksiprolin masing-masing. Saat ini, kolagen diklasifikasikan ke dalam 28 jenis sebagai tipe I, II, III, ..., XXVIII. Kolagen tersebut juga disebut 'kolagen tipe N', atau 'kolagen N'.

Berdasarkan 28 jenis yang telah teridentifikasi, kolagen diklasifikasikan sebagai kolagen fibrilar klasik (I, II, III, V, dan XI), kolagen membran basal (IV), kolagen zona membran basal (XV dan XVIII), kolagen tipe VI, kolagen tipe VII, kolagen rantai pendek (VIII dan X), *fibril-associated collagen with interrupted triple helices* (IX, XII, dan XIV), kolagen mirip FACIT (XVI, XIX, XX, XXI, dan XXII), kolagen transmembran (XIII, XVII, XXIII, dan XXV), kolagen fibrilar baru (XXIV dan XXVII), kolagen tipe XXVI, dan kolagen tipe XXVIII.²⁴

Kolagen berkontribusi 70-80% dari berat kering kulit²⁵. Berdasarkan 28 jenis kolagen yang diketahui ada bukti bahwa 18 kolagen diekspresikan di kulit baik selama perkembangan atau pada orang dewasa. Hal ini mencerminkan pentingnya komposisi kolagen pada permukaan kulit²⁶.



Gambar 2.3. Ilustrasi Skematis Ekspresi dan Lokalisasi Kolagen Individu di Kulit

2.2.3. Manfaat Kolagen

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kolagen dapat membantu meningkatkan dan memperbaiki hidrasi kulit. Kolagen juga menambah elastisitas kulit sehingga dapat mengencangkan kulit sekaligus mencegah atau mengurangi kerutan akibat penuaan pada kulit.^{85,86}

2.3. Ekstrak Bunga Telang

2.3.1. Definisi dan Deskripsi Bunga Telang

Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) atau *Blue Pea Flower* merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili Fabaceae. Akhir-akhir ini menarik banyak minat karena memiliki aplikasi potensial baik dalam pengobatan modern dan pertanian, dan sebagai sumber pewarna makanan alami dan antioksidan.^{9,87-89} Bunga Telang tumbuh secara merambat hingga mencapai 6 meter, dengan ranting halus, dan memiliki daun majemuk.⁹⁰ Tumbuhan ini berasal dari Amerika Selatan yang menyebar ke daerah tropik sejak abad 19 termasuk Indonesia. Tanaman ini tidak hanya mampu tumbuh dengan paparan sinar matahari penuh, tetapi juga dapat tumbuh di bawah naungan seperti di perkebunan karet dan kelapa. *Clitoria ternatea* menghasilkan bunga berbentuk kacang zygomorphic pentamerous dengan kelopak berbentuk tabung yang terdiri dari lima sepal yang menyatu sekitar dua pertiga panjangnya. Kelopaknya yang mencolok terdiri dari lima kelopak bebas, dengan satu spanduk besar dan bulat, dua sayap berkerut yang sering kali setengah panjang spanduk dan dua lunas putih yang membantu melindungi organ bunga.⁹¹ Kelopak bunga paling sering berwarna biru tua tetapi juga dapat muncul dalam warna putih dan berbagai warna biru dan putih di antaranya. Benang sari *C. ternatea* terdiri dari 10 filamen di mana sembilan menyatu dan satu terletak bebas.

Terlampir pada setiap filamen adalah kepala sari putih yang mengandung serbuk sari, yang terdiri dari empat lobus. *C. ternatea* menghasilkan ovarium monocarpellary yang mengandung sepuluh bakal biji. Mengatasi ini adalah gaya panjang dan tebal dengan ujung bengkok. *C. ternatea* polongnya sempit dan pipih dengan ujung runcing, dan biasanya berisi sekitar 10 biji. Bijinya mengandung asam palmitat (19%), asam stearat (10%), asam oleat (51-52%), asam linoleat (17%) dan asam linolenat (4%).^{8,23,91,92} Kandungan kalori biji dilaporkan sekitar 500 kal/100 g. *C. ternatea* menghasilkan daun majemuk menyirip yang lonjong dan utuh dengan ujung emarginate.⁹³ Epidermis pada kedua permukaan daun terdiri dari satu lapisan sel yang dilindungi oleh kutikula tebal dan dengan pertumbuhan trikoma.⁹³ Lapisan sel palisade, xilem berlignifikasi dan stomata parasit terletak di bawah epidermis atas.⁹³ *C. ternatea* menghasilkan sistem akar dalam yang ekstensif, yang memungkinkan tanaman bertahan hingga 7-8 bulan kekeringan. Akar juga menghasilkan bintil besar untuk fiksasi nitrogen. Komponen kimia yang paling dikenal diantaranya adalah Antosianin yang memberikan warna biru yang menjadi karakteristiknya, dan siklotida peptide makrosiklik ultra stabil yang hadir disemua jaringan tanaman ini.^{8,94} Kelimpahan Antosianin unik ini bersama dengan metabolit sekunder lainnya di *C.ternatea* menjadikan

tanaman ini sebagai sumber aditif alami yang ideal yang dapat meningkatkan penampilan dan nilai gizi produk konsumen ^{17,18}

Berikut ini klasifikasi dari Bunga Telang ⁹⁵:

Kingdom : Plantae
Sub kingdom : Tracheobionta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Rosidae
Ordo : Fabales
Famili : Fabaceae
Genus : Clitoria
Spesies : Clitoria ternatea

Bunga Telang mengandung asam lemak yang meliputi asam palmitat, stearat, oleat linoleat dan linolenat. Selain itu Bunga Telang juga memiliki kandungan tanin, flobatanin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenol flavonoid, flavanol glikosida, protein, alkaloid, antrakuinon, stigmasit 4-ena-3,6 dion, minyak volatil, steroid dan flavonoid. Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa polifenol yang dihasilkan dari tanaman dan terdiri dari berbagai kelas seperti anthocyanin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi. ^{8,9,23,94,96}

2.3.2. Manfaat Bunga Telang dalam Menekan Inflamasi

Kandungan Antosianin dalam Bunga Telang diketahui dapat menghambat peradangan dan hipersensitivitas dalam aktivitas asma dengan menghambat aktivasi NF- κ B dalam monosit dan mengurangi konsentrasi plasma mediator pro-inflamasi.^{97,98} Turunan flavon pada Bunga Telang memiliki kemampuan dalam menekan produksi TNF α dari makrofag yang teraktivasi melalui penghambatan jalur pensinyalan AP-1 dan aktivasi Nrf-2.⁹⁹ Selain itu Apigenin memiliki kemampuan dalam menekan pelepasan dan ekspresi gen MCP-1 yang merupakan salah satu mediator pro-inflamasi dalam makrofag.¹⁰⁰ Kaempferol dan quercetin juga dilaporkan mampu menekan produksi berbagai mediator pro-inflamasi dari makrofag, endotel, epitel, atau sel hati dengan menghambat faktor sinyal yang terlibat dalam jalur TLR4.¹⁰¹ Beberapa turunan kaempferol antara lain kaempferol 3-(2-Glucosylrutinoside), kaempferol 3-neohesperidoside, kaempferol 3-(2"-rhamnosyl-6"-malonyl) glucoside, kaempferol 3rutinoside, dan kaempferol 3-glucoside dan turunan quercetin seperti quercetin 3-(2G). -rhamnosylrutinoside), quercetin 3-neohesperidoside, quercetin 3-(2-rhamnosyl-6- malonyl) glucoside, quercetin 3-rutinoside, dan quercetin 3-glucoside telah terbukti memiliki efek penghambatan pada enzim COX-2 aktivitas yang berperan penting dalam pelepasan mediator pro-inflamasi seperti PGE2 dan PGD2.

2.3.3. Manfaat Bunga Telang pada Penuaan Dini

Paparan UVB diketahui dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan faktor inflamasi yang dapat berujung pada penuaan dini akibat dari peningkatan enzim matrix metalloproteinase MMP dan penurunan *Transforming Growth Factor β* (TGF- β)³¹. Peningkatan enzim MMP akan mendegradasi kolagen pada kulit sehingga menyebabkan hilangnya kekenyalan kulit serta timbulnya kerutan pada kulit. Faktor pertumbuhan TGF- β merupakan faktor kunci dalam aktivasi sel fibroblas untuk memproduksi kolagen, sehingga penurunan TGF- β berujung pada penurunan densitas kolagen.

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam Bunga Telang diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF alfa yang berperan dalam peningkatan enzim MMP. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa pemberian antosianin mampu meningkatkan densitas kolagen pada kulit yang terpapar UVB.¹⁹

2.3.4. Manfaat Bunga Telang pada Penurunan Kolagen

Berdasarkan penelitian terdahulu Paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF alfa yang berakibat pada peningkatan enzim matrix metalloproteinase (MMP) serta penurunan densitas kolagen.¹⁰² Peningkatan produksi MMP-3

juga dapat berakibat pada aktivasi α -SMA yang merupakan protein kunci dalam apoptosis sel, termasuk sel fibroblast yang merupakan sel utama memproduksi kolagen.¹⁰³ Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit sehingga berujung pada hilangnya kekenyalan kulit hingga timbulnya kerutan pada kulit. Hingga saat ini kajian mengenai peran *C. ternatea* dalam memperbaiki kulit yang mengalami penuaan dini akibat paparan UVB intensitas tinggi masih jarang dilakukan. Namun berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada *C. ternatea* terdapat kemungkinan *C. ternatea* dapat memperbaiki kulit yang mengalami penurunan kolagen. Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam *C. ternatea* diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF alpha.¹⁰⁴ Penurunan faktor inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti. Selain itu turunnya factor inflamasi TNF alpha dapat menurunkan aktivasi α -SMA sehingga proses apoptosis sel kulit, termasuk sel fibroblast, dapat terhenti. Hal ini akan menyebabkan dapat terbentuknya kolagen dan kembalinya kekenyalan serta hilangnya kerutan kulit³¹.

2.4. Tikus Putih Sebagai Hewan Uji Model Penurunan Kolagen.

Klasifikasi Tikus Putih Klasifikasi tikus putih (*Rattus novergicus*) adalah sebagai berikut ¹⁰⁵:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Ratus
Spesies	: Rattus novergicus

2.4.1. Karakteristik Tikus Putih sebagai Hewan Uji

Tikus merupakan hewan mamalia yang telah lama menjadi spesies paling disukai untuk model hewan penelitian biomedis karena kesamaan anatomi, fisiologis, dan genetiknya dengan manusia.¹⁰⁵ Galur tikus yang biasa digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian yaitu galur Sprague-Dawley, Wistar dan Long evans. Karakteristik tikus antara lain tidak memiliki gall blader, tidak dapat memuntahkan isi perutnya, tidak pernah berhenti tumbuh, kecepatan pertumbuhannya akan menurun setelah berumur 100 hari.

Keunggulan hewan pengerat jenis ini antara lain :

1. Ukurannya yang kecil
2. Kemudahan pemeliharaan
3. Siklus hidup yang pendek,
4. Sumber daya genetik yang melimpah.

Penelitian pada tikus yang dipapar UVB juga memberikan wawasan mengenai pengembangan obat untuk mencegah berkurangnya kolagen atau pun untuk meningkatkan kolagen. Pembuatan model tikus dengan penurunan kolagen dilakukan dengan penyinaran UVB yang bersumber dari dua FS-40 UVB sunlamps. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Sharma et al, penyinaran dilakukan dengan energi sebesar 100 mJ/cm² /hari selama 5 hari, sehingga tikus menerima dosis paparan total sebesar 500 mJ/cm².¹⁰⁶

2.5. Gel

2.5.1. Definisi dan Karakteristik Gel

Adalah sediaan semipadat yang dimaksudkan untuk aplikasi pada kulit atau selaput lendir yang dapat dijangkau seperti rongga mulut.¹⁰⁶ Gel terdiri dari dua sistem interpenetrasi dimana partikel koloid, juga dikenal sebagai gelator atau gallant di distribusikan secara merata di seluruh media dispersi atau pelarut dan membentuk matriks tiga dimensi yang dikenal sebagai gel.¹⁰⁶ Gel dibuat dengan bahan pembentuk gel (gelling agent) yang dapat berupa polimer

alami, sintetik atau semi-sintetik. Polimer dalam gel bertindak sebagai backbone matriks gel yang memberi kekuatan struktural pada gel, meningkatkan daya rekat ke permukaan tempat pengaplikasian dan menurunkan permeasi molekul yang lebih besar sehingga memungkinkan retensi.¹⁰⁷

2.5.2. Kelebihan dan Kekurangan Bahan Gel

Beberapa keuntungan utama bentuk sediaan gel dibandingkan bentuk sediaan semipadat lainnya adalah sebagai berikut:

- Gel lebih mudah diformulasikan dibandingkan dengan bentuk sediaan semipadat lainnya.
- Gel memiliki sifat perlekatan yang baik pada tempat aplikasi.
- Gel bersifat *biodegradable* dan *biocompatible*.
- Waktu retensi gel lebih tinggi daripada bentuk sediaan topikal lainnya.
- Gel adalah formulasi tidak berminyak yang elegan karena berbahan dasar air.
- Gel dapat digunakan sebagai formulasi pelepasan terkontrol dengan entwinning polimer lebih dari satu kali.
- Gel memiliki toleransi yang sangat baik untuk kondisi stressing tertentu.
- Gel membentuk protective layer di situs aplikasi.

- Gel memberikan daya sebar dan sensasi dingin yang sangat baik karena penguapan pelarut.
- Gel dapat digunakan untuk memformulasikan obat yang bersifat polar dan non-polar.

Terlepas dari banyaknya keuntungan, sediaan gel juga memiliki beberapa kelemahan atau keterbatasan seperti :

- Efek gel relatif lebih lambat dan berkelanjutan.
- Gelling agent yang digunakan dapat menyebabkan iritasi.
- Kadar air yang tinggi dapat meningkatkan kemungkinan kontaminasi pada gel.
- Sineresis dapat terjadi pada gel selama masa penyimpanan.
- Penguapan pelarut dari formulasi dapat menyebabkan pengeringan gel.
- Ikatan kovalen yang terdapat pada beberapa gel dapat membuatnya menjadi unbreakable sehingga bahan aktif obat akan terperangkap di dalam matriks gel.
- Flokulasi dalam beberapa gel dapat menghasilkan gel yang tidak stabil.
- Rheologi beberapa gel dapat berubah karena pengaruh suhu, kelembaban dan faktor lingkungan lainnya.
- Gelling agent dapat mengendap dan mengakibatkan *in salting out*.²⁵

- Beberapa obat dapat terdegradasi dalam formulasi gel karena adanya polimer.¹⁰⁶

2.6. Pengaruh gel ekstrak bunga telang terhadap ekspresi TGF- β dan densitas kolagen pada tikus yang dipapar UVB

Ekstrak Bunga Telang merupakan bahan alami yang mempunyai kandungan flavonoid, antosianin, flavonol glikosida, kaempferol glikosida dan tannin. Antosianin dalam bunga telang merupakan golongan flavonoid yang berpotensi sebagai agen fotoprotektif karena memiliki kemampuan dalam menyerap sinar UVB, berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi.¹⁹ Berdasarkan penelitian terdahulu paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF alpha yang berakibat pada peningkatan enzim matrix metalloproteinase (MMP) serta penurunan densitas kolagen.¹⁰² Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit sehingga berujung pada hilangnya kekenyalan kulit hingga timbulnya kerutan pada kulit. Berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada bunga Telang terdapat flavonoid yang dapat memperbaiki kulit yang mengalami penurunan kolagen. Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam bunga Telang diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF alpha.¹⁰⁴ Penurunan faktor

inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti.

Kolagen merupakan ECM paling penting didermis kulit sehingga berkurangnya kolagen akan menyebabkan berkurangnya elastisitas kulit, kulit kendur dan menua.^{74,75} Paparan UVB yang intens dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast dan degradasi kolagen bahkan dapat menginduksi penghentian siklus pada fase G0/G1.⁷⁶ Fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler.⁷⁷ Myofibroblast diregulasi oleh sitokin transforming growth factor beta (TGF- β 1).⁷⁸ TGF- β 1 yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β reseptor (TGF- β R) yang menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA untuk mengaktifasi jalur smad 2/3 yang berdampak pada sintesis type 1 procollagen lalu menjadi kolagen.^{79,80} Smad 2/3 yang teraktivasi akan berikatan dengan smad 4 yang berdampak pada masuknya kompleks protein tersebut ke inti sel. Disisi lain TGF- β melalui jalur ERK 1/2 mengaktifasi protein co-factor, lalu masuk ke inti sel dan membantu penempelan kompleks smad pada gene site pro-collagen-1.⁸¹⁻⁸⁴ Bunga Telang berperan dalam peningkatan ekspresi TGF- β sehingga mengaktifasi kompleks MAPK yang berdampak pada aktivasi fibroblast menjadi myofibroblast dan peningkatan densitas kolagen pada kulit yang terpapar UVB.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Penurunan kolagen yang ditandai dengan kerutan pada kulit dan hilangnya elastisitas kulit adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Mekanisme penurunan kolagen pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($1O_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH) yang mengaktifkan mitogen-activated protein kinase (MAPK)⁵⁵. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun³⁵. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dan mengakibatkan degradasi kolagen^{34,37,55}. Selain itu, AP-1 menghambat transforming growth factor- β (TGF- β) yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen tipe I pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen⁵⁶⁻⁵⁸. Selain AP-1, ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF- κ B dan regulasi

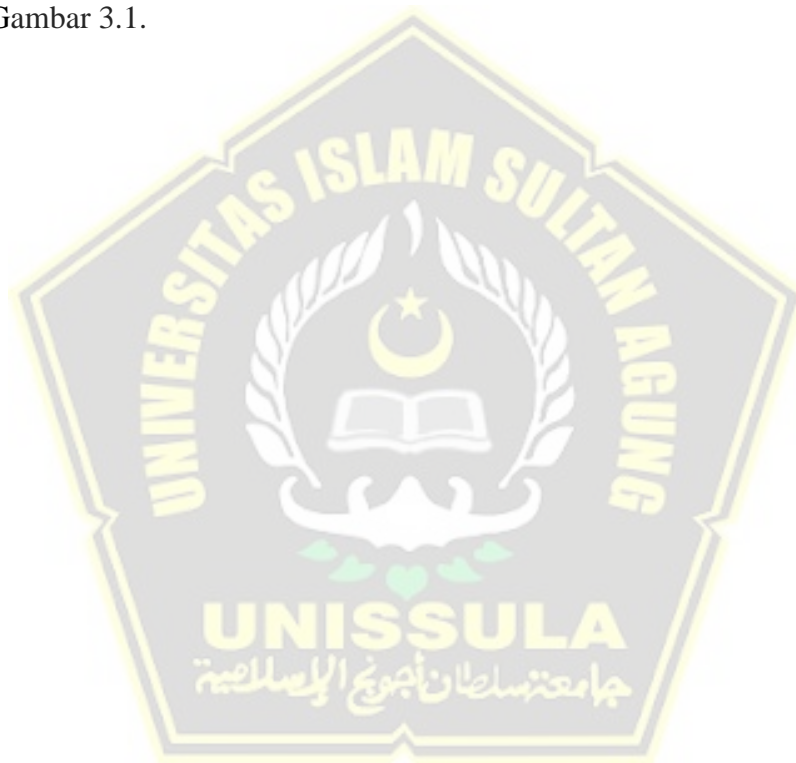
ekspresi gen MMP. Aktivitas NF-kB bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas dermal.⁵⁹⁻⁶¹

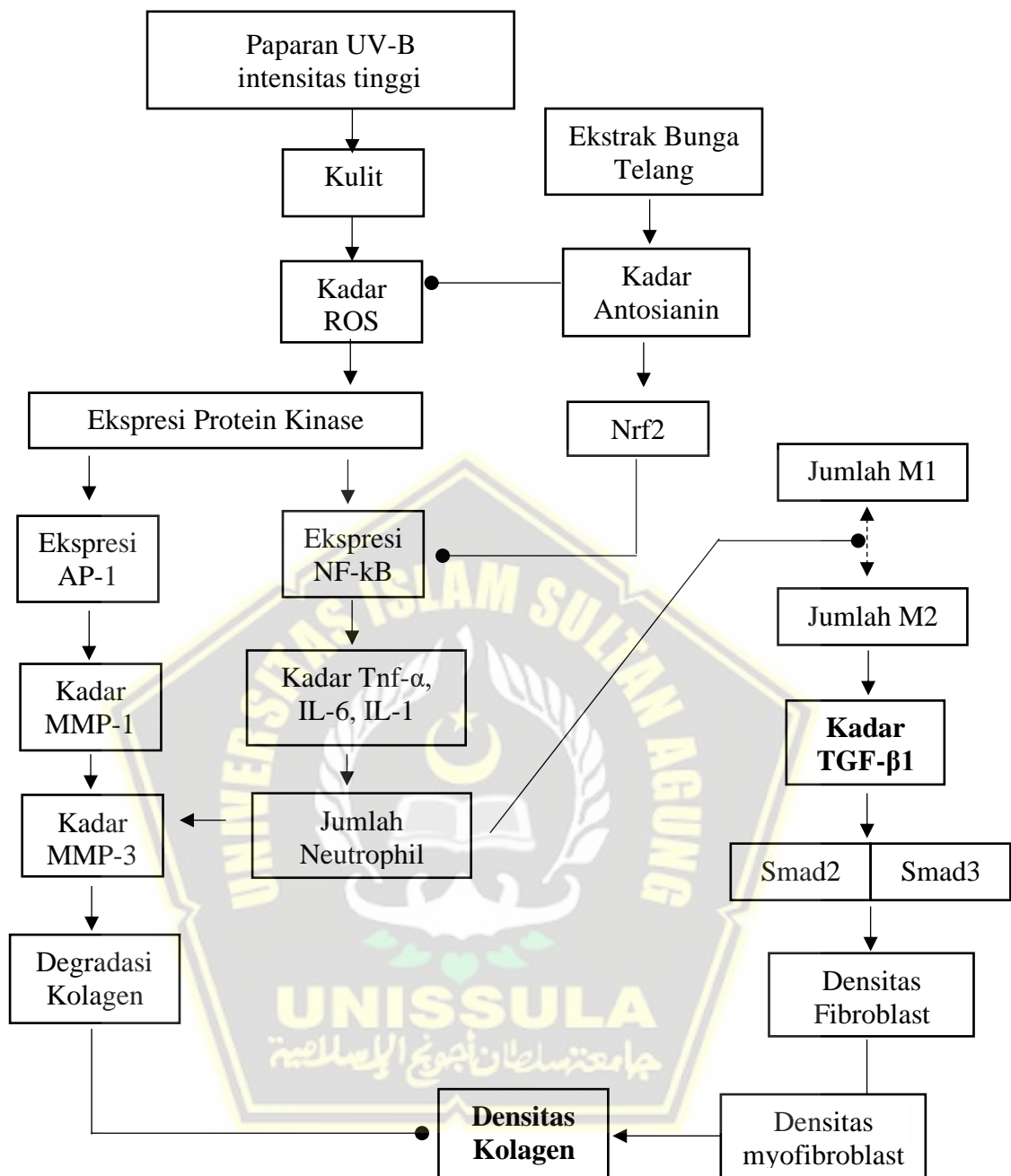
Aktivasi AP-1 yang diinduksi UV meningkatkan ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. Ketiga MMP tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronectin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktivasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama pergantian ECM. Produksi MMP-1 dan MMP-3 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-1.^{39,62-64}

Di jalur yang lain peningkatan ROS juga mengaktifkan Mitogen Activated protein kinase (MAPK ekspresi protein kinase) yang mengakibatkan ekspresi Nf-kB memproduksi koenzim dan memicu sekresi sitokin inflamasi salah satunya interleukin (IL)-6, yang mengakibatkan overekspresi MMP yang merupakan kolagenase terakumulasi pada kulit yang menua, dan ekspresinya juga diaktifkan oleh faktor transkripsi protein-1 (AP-1) yang diaktifkan, yang terdiri dari c-Fos dan c-Jun. Degradasi kolagen diprakarsai oleh MMP-1 dan dilanjutkan oleh MMP-3. Kolagen memainkan peran utama dalam mempertahankan elastisitas kulit. Kolagen tipe 1 adalah protein struktural utama ECM dermal dan sintesis kolagen tipe 1 diinisiasi oleh TGF- β 1 melalui aktivasi kompleks smad2 dan smad3 yang berujung pada sintesis prokolagen 1 sebagai prekursor kolagen tipe 1.

Bunga Telang diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti Antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian

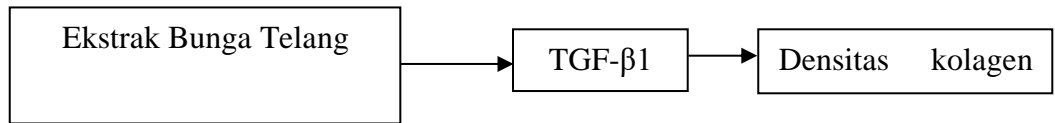
terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen. Selain itu penghambatan ROS juga mampu menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu proses polarisasi M1 menjadi M2 yang mampu mensekresikan TGF- β 1. Sekresi faktor pertumbuhan ini dapat mengaktifasi kompleks smad 2/3 yang berperan dalam produksi kolagen. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian gel ekstrak bunga Telang berpengaruh terhadap kadar TGF-β dan densitas kolagen pada kulit tikus dengan penurunan kolagen akibat paparan UVB intensitas tinggi.



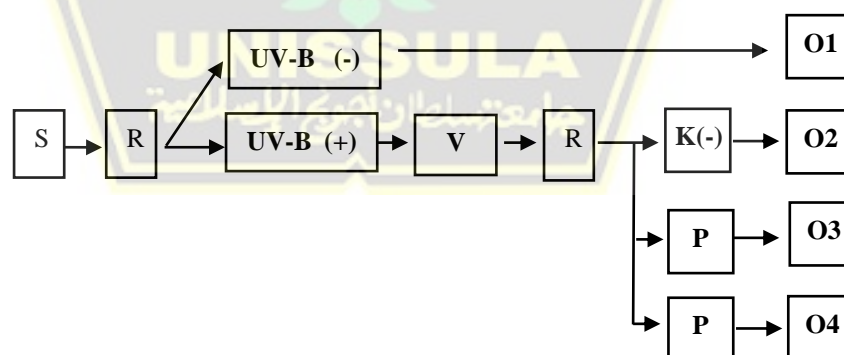
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan post test only control group dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan 200-250 gr. Perlakuan terdiri dari:

1. Tikus sehat tanpa penyinaran UVB.
2. Kontrol Negatif (Tikus dengan penurunan kolagen dengan perlakuan *base gel*),
3. Perlakuan 1 (Tikus dengan penurunan kolagen dengan perlakuan ekstrak bunga telang dosis 1 secara topikal).
4. Perlakuan 2 (Tikus dengan penurunan kolagen dengan perlakuan ekstrak bunga telang dosis 2 secara topikal)



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan: S :Sample, R:Randomisasi, V:Validasi, K:Kontrol, P:Perlakuan

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Gel Ekstrak Bunga Telang dosis 5% dan 10% secara topikal.

4.2.1.2. Variabel Antara : Kadar TGF- β

4.2.1.3. Variabel terikat : Densitas kolagen

4.2.1.4. Variabel Prakondisi : Sinar UVB

4.2.2. Defenisi Operasional

4.2.2.1. Ekstrak gel bunga Telang (*Clitorea ternatea extract*)

Yang dimaksud ekstrak bunga Telang adalah ekstrak dari bunga Telang yang dilarutkan dengan etanol dan dibuat menjadi sediaan gel (dosis 5% dan 10%). Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk bunga Telang dicampur dengan etanol 96% perendaman dilakukan 24 jam dengan sesekali dilakukan pengadukan. Perlakuan ini dilakukan pengulangan sampai tiga kali pada masing-masing sediaan. Hasil maserasi dilakukan evaporasi pada suhu 60 °C menggunakan rotary evaporator merk Ika. Hasil evaporasi kemudian dikentalkan dengan menggunakan *waterbath*. Ekstrak kental yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan gel. Pembuatan gel dilakukan

dengan mencampurkan basis gel hydrogel (Katecho) sebanyak 200 mg dengan ekstrak bunga Telang kental pada P1 dan P2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop.

Skala : Rasio

4.2.2.2. TGF- β

TGF- β adalah sitokin multifungsional yang berperan penting dalam regulasi beberapa proses seluler termasuk self renewal dan diferensiasi sel. TGF- β merupakan salah satu *growth factor* yang berperan penting dalam pembentukan kolagen, mampu mengaktifasi fibroblast dan dapat dianalisis dari serum darah menggunakan metode PCR.

Skala : Ordinal

4.2.2.3. Kolagen

Kolagen adalah protein matriks ekstraselular yang dihasilkan oleh fibroblast yang teraktivasi pada hari ke 15 setelah awal pemberian perlakuan dan berwarna biru pada pengecatan Masson Trichome. Metode penghitungan kolagen menggunakan aplikasi computer J.

Skala : Rasio

4.2.2.4. Paparan UVB

Paparan UVB adalah sinar UVB yang dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal eritema 160 Mj/cm²/15 menit selama 5 hari.^{33,34}

Skala : Ordinal

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh team Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang yang dipapar sinar UVB 302 nm dengan MED 160 mJ/cm²/hari selama hari 5 hari.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar yang mengalami penurunan kolagen pada kulit akibat paparan UVB
2. Kondisi sehat.
3. Berat badan 200-250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok 1 tikus sehat tanpa penurunan kolagen akibat paparan UVB, kelompok 2 kontrol negatif (tikus model penurunan kolagen yang diberi perlakuan dengan base gel), kelompok 3 perlakuan 1 (tikus model penurunan kolagen yang diberi gel ekstrak bunga telang secara topikal dosis 5%) dan kelompok 4 perlakuan 2 (tikus model penurunan kolagen yang diberi gel ekstrak bunga telang secara topikal dosis 10%).

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dari rumus tersebut didapat hasil n adalah 6. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan yaitu 4 dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

⁵⁰ Sehingga sampel yang digunakan adalah 6 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 4 kelompok sehingga jumlahnya adalah 24 ekor tikus ditambah cadangan 4 ekor menjadi total 30 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL.

Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk perlakuan seperti water base gel, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Gel Ekstrak Bunga Telang

Tanaman bunga Telang diperoleh dari ecopark Surabaya, kemudian dilakukan determinasi di laboratorium Ekologi dan Biosistematika MIPA di Universitas Diponegoro Semarang, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan adalah bunganya. Bunga yang dipetik adalah bunga yang mekar sempurna dan terlihat segar serta berwarna ungu kebiruan. Bunga yang digunakan telah disortasi sehingga terpisah dari kotoran atau benda asing saat pemetikan. Bunga Telang ± 600 gram dipotong menjadi bagian kecil, dikeringkan pada suhu $50-60^{\circ}\text{C}$ dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Proses pembuatan ekstrak bunga Telang menggunakan teknik maserasi. Bubuk bunga Telang kering diekstraksi menggunakan etanol 96% kemudian disaring dan filtrat tersebut ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Pemilihan pelarut ini dikarenakan etanol mampu menyaring bahan aktif yang lebih banyak mulai dari yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Diharapkan menghasilkan jumlah ekstrak yang optimal. Kandungan etanol diupayakan menggunakan

rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. Hasil evaporasi kemudian dikentalkan dengan menggunakan *waterbath*. Ekstrak kental yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan gel. Pembuatan gel dilakukan dengan mencampurkan basis gel hydrogel (Katecho) sebanyak 200 mg dengan ekstrak bunga Telang kental pada P1 dan P2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop

4.5.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Penelitian sebelumnya menggunakan gel ekstrak bunga telang dosis 5% untuk penggunaan secara topikal.¹⁸ Penggunaan gel bunga telang dilakukan setiap hari sebanyak 2 mg/tikus sehingga dosis ekstra bunga telang yang digunakan adalah 0,1 mg/tikus untuk dosis 5% dan 0,2 mg/tikus untuk dosis 10%.

4.5.4. Paparan UV-B

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm

3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160 mJ/cm²/ 15 menit perhari selama lima hari ^{33,34}.
4. Tikus Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak bunga telang dengan dosis 5% dan 10% yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari pasca penyinaran UV-B.

4.5.5. Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Masson Trichome dengan tahapan sebagai berikut Pertama dilakukan deparafinisasi slide jaringan, kemudian panaskan Cairan Bouin ke suhu 54-64°C. Tahap berikutnya dilakukan inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu dilakukan inkubasi slide di Hematigoksin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian dibilas kembali dengan air. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/ fosfotungstat selama 10-15 menit. Tahap berikutnya inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit kemudian dibilas

kembali dengan air. Tahap selanjutnya inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit kemudian dehidrasi, dan pasang *desk glass*.

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan serum dilakukan pada hari ke 14 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Dan dimasukkan didalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alcohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke

dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.8. Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Masson Trichome dengan tahapan sebagai berikut :

1. Deparafinisasi slide jaringan
2. Panaskan Cairan Bouin ke 54-64°C
3. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit
4. Bilas dengan air mengalir
5. Inkubasi slide di Hematigoksin Besi Weigert selama 5 menit
6. Bilas dengan air
7. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit

8. Bilas dengan air
9. Inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit
10. Inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit
11. Bilas dengan air
12. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit
13. Dehidrasi, dan pasang desk glass

4.5.9. Analisis Kuantitatif Ekspresi TGF beta menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁵²

Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cyclers C1000 (Bio-Rad).

2. Penentuan Ekspresi Gen TGF beta⁵³

Gen TGF beta diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti⁹⁶.

Tabel 4.1. Komponen PCR Mix TGF Beta

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward TGF beta	5'- TACCTGAACCCGTGT
	Reverse TGF beta	TGCTCTC-3' 5'- GTTGCTGAGGTATCG CCAGGAA-3'
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
cDNA	SYBR Green	

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

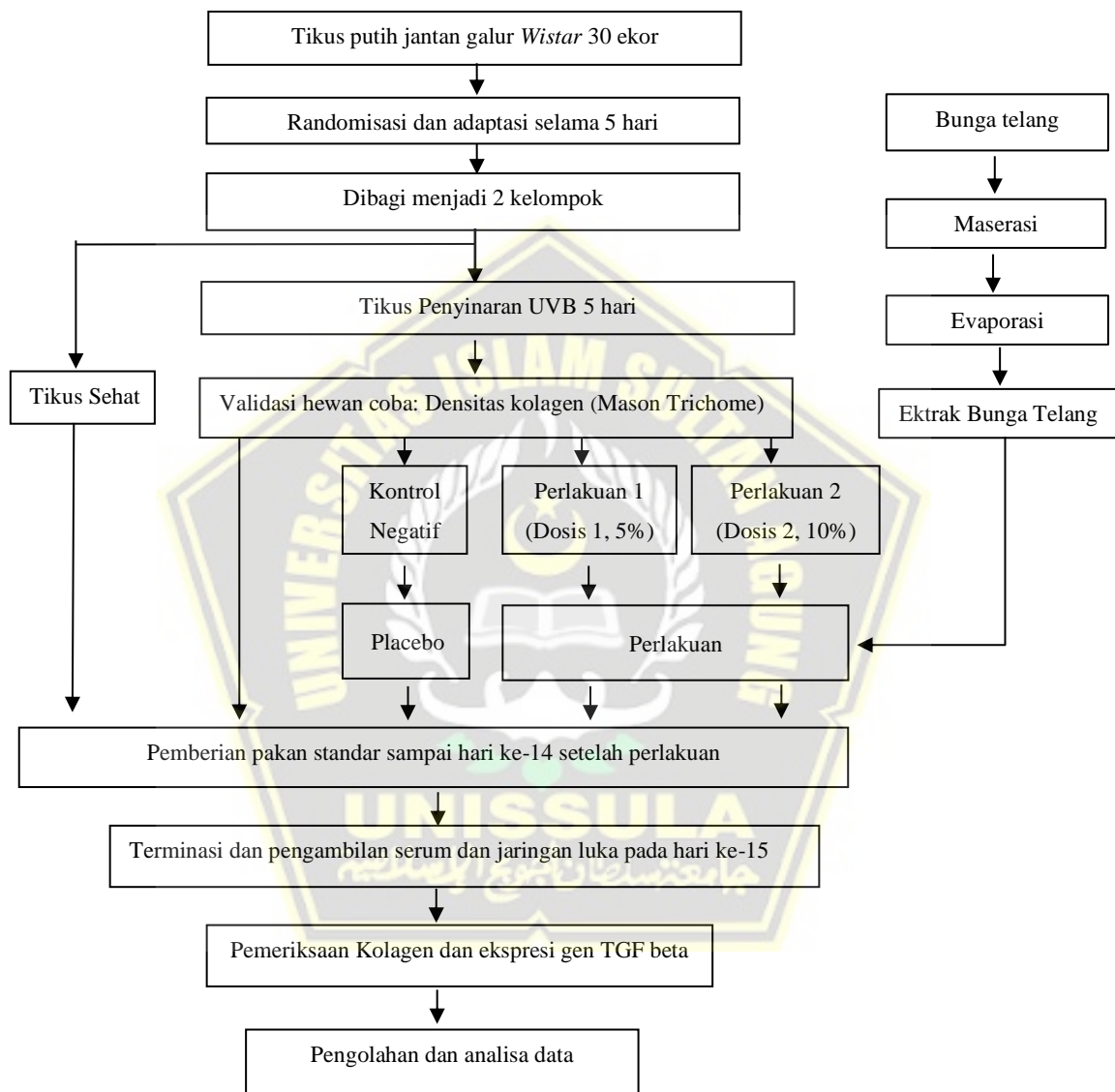
Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem cell* and Cancer Research Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian rencana akan dilakukan pada Juni-Juli 2022.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh kemudian diproses, disunting, dan ditabulasi, untuk dilakukan uji deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Apabila data yang dihasilkan normal dan homogen, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD dan Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila terdapat sebaran data tidak normal dan varian tidak sama, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk

mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang telah dilakukan pada bulan Juli hingga Agustus 2022 di laboratorium Steam Cell and Cancer Reaseach Fakultas Kedokteran Unissula Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berat 200-250 gram dan berusia 3-4 bulan. Tikus di induksi menggunakan sinar UVB panjang gelombang 100 mJ selama 15 menit perhari hingga hari kelima. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus dan tidak ada yang dieksklusi selama penelitian berlangsung penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat, kontrol yang terdiri dari tikus terpapar UVB, perlakuan 1 yang terdiri dari tikus terpapar UVB dan diberi gel ekstrak bunga Telang 5%, dan perlakuan 2 yang terdiri dari tikus terpapar UVB dan diberi gel ekstrak bunga Telang 10 %.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi Ekstrak Bunga Telang

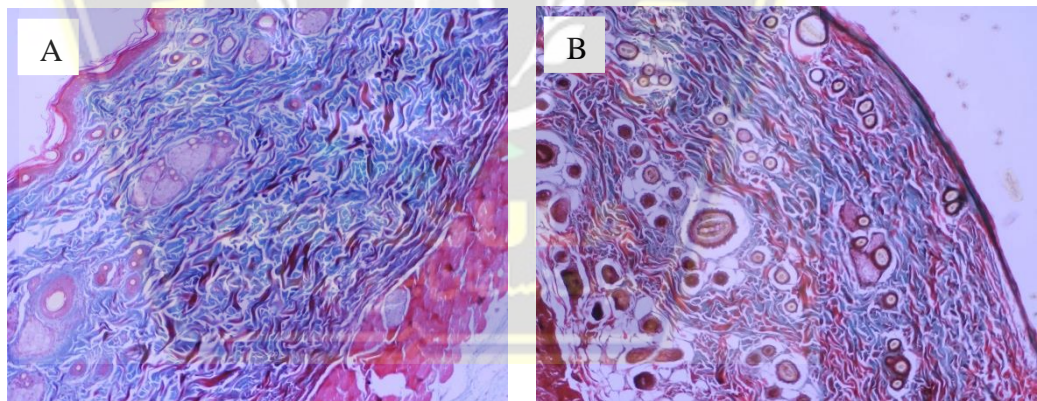
Ekstraksi Bunga Telang dilakukan di laboratorium terpadu Undip. Ekstraksi bunga Telang dilakukan secara maserasi menggunakan larutan etanol 96%. Hasil uji screening fitokimia ekstrak bunga Telang dijelaskan pada tabel 5.1

Tabel 5.1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Bunga Telang.

Nama Sampel	Parameter Uji	Hasil Uji (Kualitatif)
Ekstrak bunga telang	Alkaloid	Positif
	Saponin	Positif
	Tanin	Positif
	Flavonoid	Positif
	Steroid	Negatif
	Triterpenoid	Positif

5.1.2. Densitas Kolagen pasca induksi UVB pada tikus

Tikus diinduksi sinar UVB dengan intensitas 160 mJ per 15 menit perhari selama 5 hari. Tikus kemudian diterminasi setelah dilakukan anestesi. Jaringan kulit tikus yang terpapar UVB dianalisis menggunakan Mason Trichome. Tikus yang terpapar UVB mengekspresikan lebih sedikit kolagen dibandingkan dengan tikus sehat. Hasil uji Mason Trichome ditunjukkan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. (A) Jaringan kulit tikus sehat (B). Penurunan densitas kolagen pada jaringan kulit tikus yang diinduksi UVB.

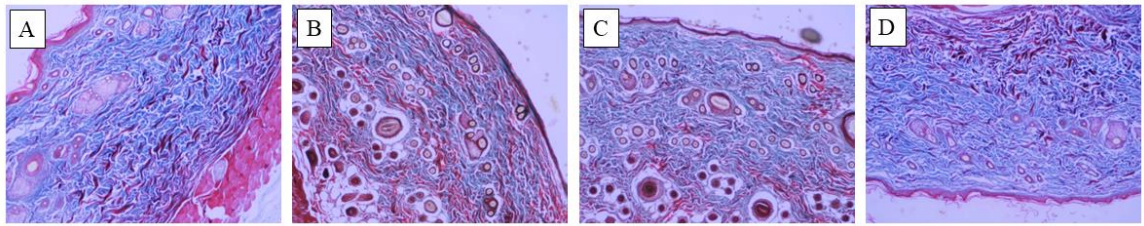
Pada gambar diatas terlihat bahwa jaringan kulit tikus sehat tanpa penyinaran menunjukkan lebih banyak warna biru dibandingkan dengan jaringan kulit tikus yang diinduksi UVB. Densitas kolagen ditunjukkan dengan warna biru.

5.1.3. Gel ekstrak Bunga Telang meningkatkan densitas kolagen jaringan kulit tikus yang terpapar UVB

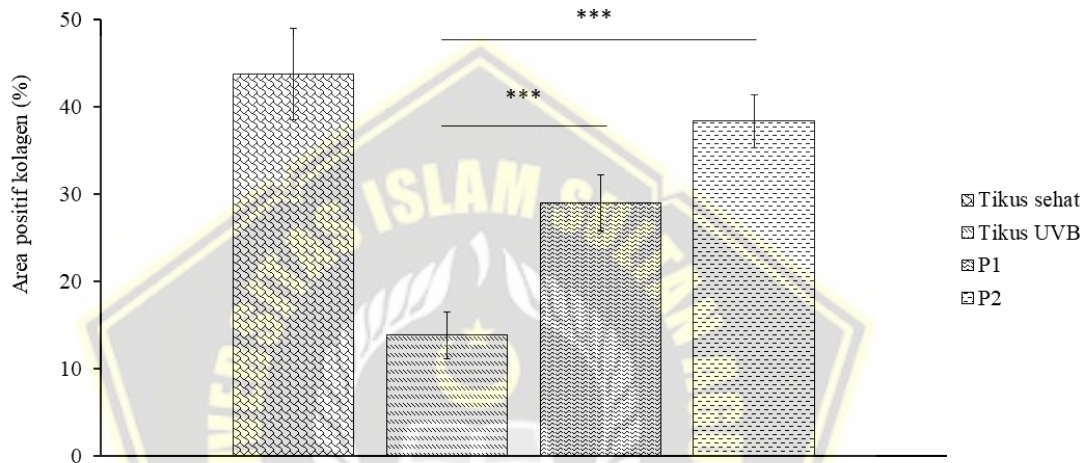
Jaringan tikus yang terpapar UVB diberikan gel ekstrak bunga Telang dengan dosis 5% (P1) dan 10% (P2) selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga telang meningkatkan densitas kolagen secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.2, Gambar 5.2 dan 5.3).

Tabel 5.2. Data Hasil Penelitian Densitas Kolagen dan Ekspresi Gen TGF- β

Variabel	Kelompok				P value
	Tikus sehat (n=6) Mean \pm SD	Tikus UVB (n=6) Mean \pm SD	P1 (n=6) Mean \pm SD	P2 (n=6) Mean \pm SD	
Densitas kolagen (%)	43.83 \pm 5.25	13.87 \pm 2.68	29.04 \pm 3.20	31.28 \pm 3.02	
<i>Saphiro wilk</i>	0.242	0.661	0.512	0.979	
<i>Levene test</i>					0.170
<i>One-way anova</i>					0.000
Ekspresi relatif gen TGF β	1.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.02	0.49 \pm 0.29	3.29 \pm 1.34	
<i>Saphiro wilk</i>	0.000	0.229	0.963	0.248	
<i>Kruskall wallis</i>					0.000



Gambar 5.2. Penampang densitas kolagen pada (A) jaringan kulit tikus sehat (B) kontrol negatif tikus yang diinduksi UVB (C) kelompok P1 (5%) dan (D) kelompok P2 (10%). Densitas kolagen ditunjukkan dengan warna biru.



Gambar 5.3. Grafik Representatif Densitas Kolagen pada Semua Kelompok Perlakuan (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tabel 5.3. Uji *Post-Hoc* LSD Densitas Kolagen

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan (95%)	
			Batas Bawah	Batas Atas
Tikus Sehat	Tikus UVB	0.003	0.001	0.003
	P1	0.139	0.002	0.003
	P2	0.139	0.001	0.003
Tikus UVB	P1	0.139	0.001	0.003
	P2	0.000	0.002	0.004
P1	P2	0.003	0.001	0.003

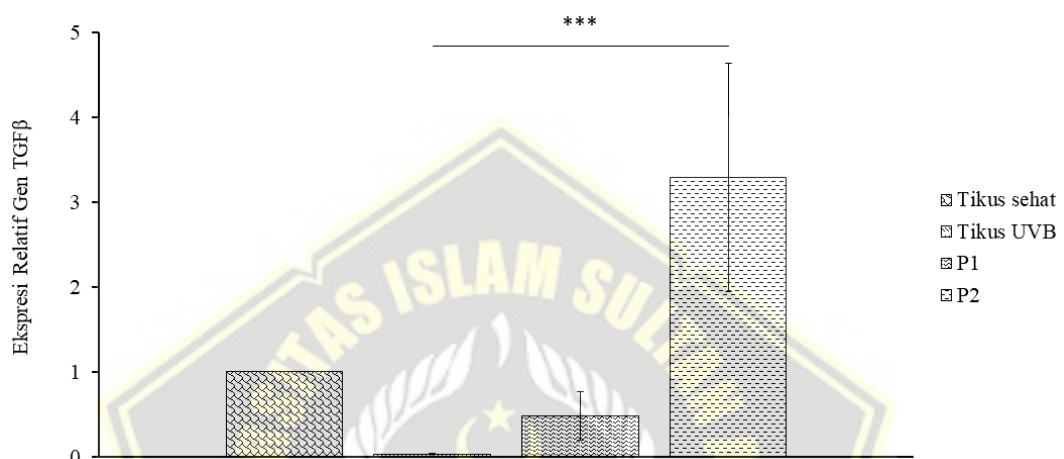
Berdasarkan data diatas, P1 dan P2 secara signifikan meningkatkan densitas kolagen dibanding kontrol ($p < 0.05$). P1 meningkatkan densitas kolagen jaringan tikus UVB sebanyak $29.04 \pm 3.20\%$ sedangkan P2 meningkatkan densitas kolagen sebanyak $31.28 \pm 3.02\%$. Kelompok P2 menunjukkan peningkatan densitas kolagen paling optimal dan nilainya mendekati kelompok tikus sehat, menunjukkan peningkatan densitas kolagen yang terkontrol.

Data densitas kolagen telah diuji normalitas menggunakan *saphiro wilk* dan diuji homogenitas menggunakan uji *levene*. Hasil uji normalitas adalah $p > 0.05$ yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas adalah $p > 0.05$ yang menunjukkan bahwa data bersifat homogen. Data yang normal dan homogen dapat dilanjutkan ke uji parametrik menggunakan ANOVA. Hasil ANOVA menunjukkan nilai $p < 0.05$ pada semua kelompok. Hasil tersebut menjelaskan bahwa terdapat perbedaan nilai densitas kolagen yang signifikan pada tiap kelompok. Hasil uji *post-hoc* LSD ditunjukkan pada tabel 5.3.

5.1.4. Gel ekstrak Bunga Telang meningkatkan ekspresi gen TGF β jaringan kulit tikus yang terpapar UVB

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga telang meningkatkan TGF- β secara signifikan pada P2 (Tabel 5.2 dan Gambar 5.4). Berdasarkan data diatas, P2 secara signifikan

meningkatkan densitas kolagen dibanding kontrol ($p < 0.05$). P1 menunjukkan tren peningkatan densitas kolagen jaringan tikus UVB dengan nilai 0.49 ± 0.29 , sedangkan P2 meningkatkan densitas kolagen secara signifikan dengan nilai 3.29 ± 1.34 . Kelompok P2 menunjukkan peningkatan densitas kolagen paling optimal.



Gambar 5.4. Analisis ekspresi relative gen TGFβ menggunakan qRT-PCR (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tabel 5.4. Uji *Post-Hoc* LSD Ekspresi Relatif Gen TGFβ

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan (95%)	
			Batas Bawah	Batas Atas
Tikus Sehat	Tikus UVB	0.000	25.53	34.39
	P1	0.000	10.35	19.21
	P2	0.019	1.00	9.86
Tikus UVB	P1	0.000	-19.61	-10.75
	P2	0.000	-28.96	-20.10
P1	P2	0.000	-13.77	-4.92

Data densitas kolagen telah diuji normalitas menggunakan *saphiro wilk* dan diuji homogenitas menggunakan uji *levene*. Hasil uji normalitas adalah $p>0.05$ yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas adalah $p>0.05$ yang menunjukkan bahwa data bersifat homogen. Data yang normal dan homogen dapat dilanjutkan ke uji parametrik menggunakan ANOVA. Hasil ANOVA menunjukkan nilai $p<0.05$ pada semua kelompok. Hasil tersebut menjelaskan bahwa terdapat perbedaan nilai densitas kolagen yang signifikan pada tiap kelompok. Hasil uji *post-hoc* LSD ditunjukkan pada tabel 5.4.

5.2. Pembahasan

Paparan sinar UVB dengan intensitas tinggi merupakan penyebab utama timbulnya kerutan pada kulit yang ditandai dengan berkurangnya kolagen. Paparan sinar UVB dengan intensitas tinggi menginduksi terbentuknya ROS pada kulit. Peningkatan ROS yang berlebihan akan mengaktifasi jalur protein kinase yang kemudian memicu peningkatan produksi enzim MMP yang disekresikan oleh neutrofil untuk mendegradasi kolagen. Sisi lain, peningkatan ROS juga berdampak pada produksi berbagai sitokin proinflamasi, seperti interleukin-6 (IL-6) sehingga berdampak pada apoptosis sel. Kondisi proinflamasi yang berkelanjutan berdampak pada inhibisi produksi *growth factor* prokolagen seperti TGF- β yang akan menghambat sintesis kolagen. Tingginya produksi enzim MMP

serta penghambatan sintesis kolagen berdampak pada berkurangnya densitas kolagen yang menyebabkan timbulnya keriput pada wajah. Senyawa yang terkandung dalam bunga Telang, seperti antosianin sebagai agen fotoprotektif diketahui berperan sebagai mediator antiinflamasi dan mampu menghambat produksi ROS paparan sinar UVB sehingga dapat menghambat degradasi kolagen pada jaringan kulit.¹⁹ Namun hingga saat ini peran ekstrak bunga Telang pada tikus yang dipapar UVB dengan intensitas tinggi, dilihat dari kadar ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen belum pernah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen pada tikus jantan galur Wistar dengan penurunan kolagen akibat terpapar UVB.

Penelitian ini menggunakan hewan model tikus wistar yang diberi paparan sinar UVB pada kulit dengan intensitas radiasi 160 mJ/cm² selama 15 menit per hari. Induksi sinar UVB dilakukan selama 5 hari. Hasil analisis MT menunjukkan bahwa terdapat penurunan densitas kolagen pada kulit tikus yang diberi paparan sinar UVB dibandingkan dengan tikus sehat (Gambar 5.1). Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa paparan UVB intensitas tinggi menyebabkan peningkatan ROS yang akan memicu sekresi IL-6 yang mengakibatkan oversekresi MMP yang diaktifkan oleh factor transkripsi protein (AP-1). Overekspresi MMP akan berdampak pada ketidakseimbangan regulasi fibroblast, penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan berdampak pada degradasi kolagen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak bunga Telang dosis 5% dan 10% mampu meningkatkan kadar kolagen secara signifikan dan *dose-dependent* pada tikus yang dipapar sinar UVB dibanding control ($P < 0.05$). Berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada bunga Telang terdapat flavonoid yang secara tidak langsung dapat memperbaiki kulit yang mengalami penurunan kolagen. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk $TNF\alpha$ yang berakibat pada peningkatan MMP serta penurunan densitas kolagen.¹⁰² Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit. Bunga telang dengan kandungan flavonoidnya terutama antosianin berpotensi sebagai agen fotoprotektif karena memiliki kemampuan dalam menyerap sinar UVB, berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi.¹⁹ Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam bunga Telang, seperti antosianin diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk $TNF-\alpha$.¹⁰⁴

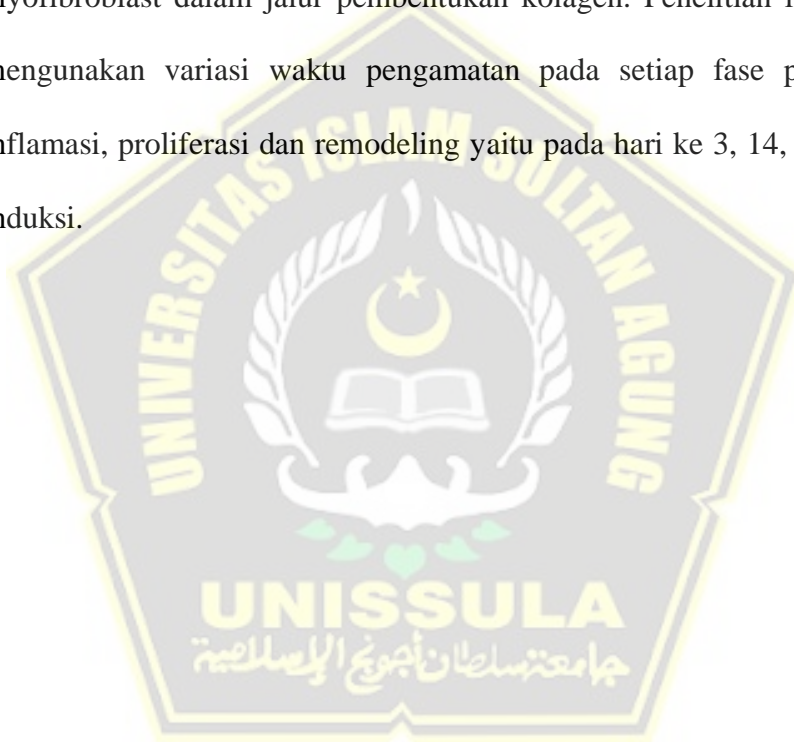
Peningkatan kolagen pada kulit tikus UVB yang diberi gel ekstrak bunga Telang dosis 5% dan 10% juga berkorelasi dengan peningkatan ekspresi $TGF\beta$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga telang dosis 10% meningkatkan ekspresi relatif gen $TGF\beta$ secara signifikan dibandingkan kontrol ($P < 0.05$). $TGF-\beta$ adalah sitokin fibrogenik prototipe, yang dapat meningkatkan ekspresi gen matriks ekstraseluler (ECM) pada sel

fibroblast teraktivasi dan mengatur penurunan enzim pendegradasi matriks melalui jalur SMAD, terutama terkait dengan sintesis kolagen. Fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler.⁷⁷ Myofibroblast diregulasi oleh TGF- β 1 yang akan berikatan dengan kompleks TGF- β receptor (TGF- β R) dan menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA untuk mengaktivasi jalur smad 2/3 yang berdampak pada sintesis type 1 procollagen lalu menjadi kolagen.^{79,80} Smad 2/3 yang teraktivasi akan berikatan dengan smad 4 yang berdampak pada masuknya kompleks protein tersebut ke inti sel. Disisi lain TGF- β melalui jalur ERK $\frac{1}{2}$ mengaktivasi protein co-factor, lalu masuk ke inti sel dan membantu penempelan kompleks smad pada gene site pro-collagen-1.⁸¹⁻⁸⁴ Bunga Telang berperan dalam peningkatan ekspresi TGF- β sehingga mengaktivasi kompleks SMAD dan ERK $\frac{1}{2}$ yang berdampak pada aktivasi fibroblast menjadi myofibroblast dan peningkatan densitas kolagen pada kulit yang terpapar UVB.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga Telang memiliki mampu berperan dalam meningkatkan densitas kolagen melalui peningkatan ekspresi TGF β pada model tikus yang diinduksi sinar UVB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga Telang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi alternatif tertarget pada kulit yang terpapar UVB.

5.3. Keterbatasan Penelitian

Kelamahan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian gel ekstrak bunga telang terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UVB. Penelitian ini juga tidak menganalisis SMAD dan ERK1/2 sebagai jalur sintesis kolagen. Disisi lain, penelitian ini juga tidak menganalisa ekspresi α -SMA sebagai penanda perubahan fibroblast menjadi myofibroblast dalam jalur pembentukan kolagen. Penelitian ini juga tidak menggunakan variasi waktu pengamatan pada setiap fase penyembuhan inflamasi, proliferasi dan remodeling yaitu pada hari ke 3, 14, dan 21 pasca induksi.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan

1. Pemberian gel ekstrak bunga telang 10% secara topikal meningkatkan ekspresi gen TGF- β pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB dibandingkan dengan kontrol.
2. Pemberian gel ekstrak bunga telang 5% dan 10% secara topikal meningkatkan kadar kolagen pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB dibandingkan dengan kontrol.

6.2. Saran

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian ekstrak bunga telang pada tikus yang dipapar sinar UVB
2. Perlu pengukuran ekspresi SMAD setelah dilakukan pemberian ekstrak bunga telang pada tikus yang dipapar sinar UVB
3. Perlu pengukuran ekspresi ERK1/2 setelah dilakukan pemberian ekstrak bunga telang pada tikus yang dipapar sinar UVB
4. Perlu pengukuran ekspresi α -SMA setelah dilakukan pemberian ekstrak bunga telang pada tikus yang dipapar sinar UVB
5. Perlu pengukuran pada beberapa variasi waktu pengamatan difase inflamasi, proliferasi dan remodeling setelah dilakukan pemberian pemberian ekstrak bunga telang pada tikus yang dipapar sinar UVB

DAFTAR PUSTAKA

1. Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients*. 2020;
2. Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *J Funct Foods*. 2020;
3. Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY, et al. Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater*. 2020;
4. Geng R, Kang SG, Huang K, Tong T. Boosting the photoaged skin: The potential role of dietary components. *Nutrients*. 2021.
5. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatology Venereol*. 2021;
6. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;
7. Wongthai N, Tanticharakunsiri W, Mangmool S, Ochaikul D. Characteristics and antioxidant activity of royal lotus pollen, butterfly pea flower, and oolong tea kombucha beverages. *Asia-Pacific J Sci Technol*. 2021;
8. Nair V, Bang WY, Schreckinger E, Andarwulan N, Cisneros-Zevallos L. Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *J Agric Food Chem*. 2015;
9. Fitrilia T, Kurniawan MF, Kurniawati FR, Setiawan T. The POTENTIAL OF BUTTERFLY PEA FLOWER METHANOL EXTRACT AS AN ANTIOXIDANT BY IN SILICO. *Indones J Appl Res*. 2020;

10. Mori K, Uchida T, Yoshie T, Mizote Y, Ishikawa F, Katsuyama M, et al. A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. *FEBS J.* 2019;
11. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2017.
12. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine.* 2015.
13. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology.* 2007.
14. Zasada M, Budzisz E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postępy Dermatologii i Alergologii.* 2019.
15. Cohen AJ, Lassová L, Golden EB, Niu Z, Adams SL. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. *J Cell Biochem.* 2006;
16. Sadgrove NJ, Simmonds MSJ. Topical and nutricosmetic products for healthy hair and dermal antiaging using “dual-acting” (2 for 1) plant-based peptides, hormones, and cannabinoids. *FASEB BioAdvances.* 2021.
17. Siti Azima AM, Noriham A, Manshoor N. Anthocyanin content in relation to the antioxidant activity and colour properties of *Garcinia mangostana* peel, *Syzigium cumini* and *Clitoria ternatea* extracts. *Int Food Res J.* 2014;
18. Pasukamonset P, Pumalee T, Sanguansuk N, Chumyen C, Wongvasu P, Adisakwattana S, et al. Physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of sponge cakes fortified with *Clitoria ternatea* extract. *J Food Sci Technol.* 2018;
19. Saritani ATB, Wiraguna, Anak Agung Gde Putra, Maker LPII, 3. *Clitoria ternatea* L. extract cream 5% inhibits the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) dermic skin exposed to ultraviolet B. *Neurol Spinale Med Chir.* 2021;4(4):109–13.

20. Zhong J, Hu N, Xiong X, Lei Q, Li L. A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF- β /Smad and p38 MAPK signaling pathway. *Med Hypotheses*. 2011;
21. Rahayu S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap. Skripsi Program Studi Farmasi Univ Ngudi Waluyo. 2020;
22. Zakaria NNA, Okello EJ, Howes MJ, Birch-Machin MA, Bowman A. In vitro protective effects of an aqueous extract of *Clitoria ternatea* L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes. *Phyther Res*. 2018;
23. Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH. Application of butterfly pea flower extract in mask development. *Sci Pharm*. 2018;
24. Adhikary R, Sultana S, Bishayi B. *Clitoria ternatea* flower petals: Effect on TNFR1 neutralization via downregulation of synovial matrix metalloproteases. *J Ethnopharmacol*. 2018;
25. Wilson SE. TGF beta -1, -2 and -3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs. *Experimental Eye Research*. 2021.
26. Bhaskar B, Shantaram M. Morphological and Biochemical Characteristics Of *Averrhoa* Fruits. *Int J Pharm Chem Biol Sci*. 2013;
27. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2017.
28. Li S, Gu X, Yi S. The regulatory effects of transforming growth factor- β on nerve regeneration. *Cell Transplantation*. 2017.
29. Gallo-Oller G, Di Scala M, Aranda F, Dotor J. Transforming growth factor beta (TGF- β) activity in immuno-oncology studies. In: *Methods in Enzymology*. 2020.
30. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*. 2012.
31. Chen J, Ding ZY, Li S, Liu S, Xiao C, Li Z, et al. Targeting transforming

- growth factor- β signaling for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*. 2021.
32. Krepela E, Vanickova Z, Hrabal P, Zubal M, Chmielova B, Balaziová E, et al. Regulation of fibroblast activation protein by transforming growth factor beta-1 in glioblastoma microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;
 33. Sheen YY, Kim MJ, Park SA, Park SY, Nam JS. Targeting the transforming growth factor- β signaling in cancer therapy. *Biomolecules and Therapeutics*. 2013.
 34. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci*. 2018;
 35. Miao Y, Yang H, Levorse J, Yuan S, Polak L, Sribour M, et al. Adaptive Immune Resistance Emerges from Tumor-Initiating Stem Cells. *Cell*. 2019;
 36. Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2012.
 37. Kawakami T, Soma Y, Kawa Y, Ito M, Yamasaki E, Watabe H, et al. Transforming growth factor β 1 regulates melanocyte proliferation and differentiation in mouse neural crest cells via stem cell factor/KIT signaling. *J Invest Dermatol*. 2002;
 38. Blank U, Warsi S, Andradottir S, Rörby E, Karlsson S. A Critical Role for BMP Signaling in Adult Hematopoietic Stem Cells. *Blood*. 2012;
 39. Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2002.
 40. Liu Y, He K, Hu Y, Guo X, Wang D, Shi W, et al. YAP modulates TGF- β 1-induced simultaneous apoptosis and EMT through upregulation of the EGF receptor. *Sci Rep*. 2017;
 41. Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2005.
 42. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell*

- Biol. 2002;
43. Liu Y, Li Y, Li N, Teng W, Wang M, Zhang Y, et al. TGF- β 1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via up-regulating MicroRNA-21. *Sci Rep.* 2016;
 44. Albers RE, Selesniemi K, Natale DRC, Brown TL. TGF- β induces Smad2 phosphorylation, ARE induction, and trophoblast differentiation. *Int J Stem Cells.* 2018;
 45. Kikuchi R, Maeda Y, Tsuji T, Yamaguchi K, Abe S, Nakamura H, et al. Fenofibrate inhibits TGF- β -induced myofibroblast differentiation and activation in human lung fibroblasts in vitro. *FEBS Open Bio.* 2021;
 46. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B, et al. TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;
 47. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, et al. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2011;
 48. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;
 49. Liu Z, Bandyopadhyay A, W. Nichols R. Blockade of Autocrine TGF- β Signaling Inhibits Stem Cell Phenotype, Survival, and Metastasis of Murine Breast Cancer Cells. *J Stem Cell Res Ther.* 2012;
 50. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- β in Skin Chronic Wounds: A Keratinocyte Perspective. *Cells.* 2020.
 51. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair and Regeneration.* 2016.
 52. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in

- wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*. 2012;
53. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*. 2010.
 54. Huai G, Markmann JF, Deng S, Rickert CG. TGF- β -secreting regulatory B cells: unsung players in immune regulation. *Clinical and Translational Immunology*. 2021.
 55. Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, et al. Tgf-Beta signaling in development. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2007.
 56. Xiao L, Du Y, Shen Y, He Y, Zhao H, Li Z. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. *Front Biosci*. 2011;
 57. Hutzen B, Chen CY, Wang PY, Sprague L, Swain HM, Love J, et al. TGF- β Inhibition Improves Oncolytic Herpes Viroimmunotherapy in Murine Models of Rhabdomyosarcoma. *Mol Ther - Oncolytics*. 2017;
 58. Sun MM, Li JF, Guo LL, Xiao HT, Dong L, Wang F, et al. TGF- β 1 suppression of microRNA-450b-5p expression: A novel mechanism for blocking myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2014;
 59. Wang S, Guo L, Dong L, Guo L, Li S, Zhang J, et al. TGF- β 1 signal pathway may contribute to rhabdomyosarcoma development by inhibiting differentiation. *Cancer Sci*. 2010;
 60. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016.
 61. Mi B, Liu G, Zhou W, Lv H, Zha K, Liu Y, et al. Bioinformatics analysis of fibroblasts exposed to TGF- β at the early proliferation phase of wound repair. *Mol Med Rep*. 2017;
 62. Lu C, Yang Z, Yu D, Lin J, Cai W. RUNX1 regulates TGF- β induced migration and EMT in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2020;
 63. Luo Y, Huang K, Zheng J, Zhang J, Zhang L. TGF- β 1 promotes cell

- migration in hepatocellular carcinoma by suppressing reelin expression. *Gene*. 2019;
64. Bureta C, Setoguchi T, Saitoh Y, Tominaga H, Maeda S, Nagano S, et al. TGF- β promotes the proliferation of microglia in vitro. *Brain Sci*. 2020;
 65. Sorensen DW, van Berlo JH. The Role of TGF- β Signaling in Cardiomyocyte Proliferation. *Current Heart Failure Reports*. 2020.
 66. Hao Y, Baker D, Dijke P Ten. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
 67. Guan R, Lin R, Jin R, Lu L, Liu X, Hu S, et al. Chitinase-like protein YKL-40 regulates human bronchial epithelial cells proliferation, apoptosis, and migration through TGF- β 1/Smads pathway. *Hum Exp Toxicol*. 2020;
 68. Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF- β regulation and wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014.
 69. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF- β and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019.
 70. Munger JS, Sheppard D. Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;
 71. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2017.
 72. Klincumhom N, Tharasanit T, Thongkittidilok C, Tiptanavattana N, Rungarunlert S, Dinnyés A, et al. Selective TGF- β 1/ALK inhibitor improves neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett*. 2014;
 73. Zhang Q, Xiao M, Gu S, Xu Y, Liu T, Li H, et al. ALK phosphorylates SMAD4 on tyrosine to disable TGF- β tumour suppressor functions. *Nat Cell Biol*. 2019;

74. McCabe MC, Hill RC, Calderone K, Cui Y, Yan Y, Quan T, et al. Alterations in extracellular matrix composition during aging and photoaging of the skin. *Matrix Biol Plus*. 2020;
75. Watson REB, Gibbs NK, Griffiths CEM, Sherratt MJ. Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014.
76. Song L, Dong W, Gao M, Li J, Hu M, Guo N, et al. A novel role of IKK α in the mediation of UVB-induced G0/G1 cell cycle arrest response by suppressing Cyclin D1 expression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010;
77. Clark RAF, An JQ, Greiling D, Khan A, Schwarzbauer JE. Fibroblast Migration on Fibronectin Requires Three Distinct Functional Domains. *J Invest Dermatol*. 2003;
78. Putra A, Alif I, Hamra N, Santosa O, Kustiyah AR, Muhar AM, et al. Msc-released tgf- β regulate α -sma expression of myofibroblast during wound healing. *J Stem Cells Regen Med*. 2020;
79. Ding H, Chen J, Qin J, Chen R, Yi Z. TGF- β -induced α -SMA expression is mediated by C/EBP β acetylation in human alveolar epithelial cells. *Mol Med*. 2021;
80. Abdel-Rahman RF, Fayed HM, Asaad GF, Ogaly HA, Hessin AF, Salama AAA, et al. The involvement of TGF- β 1 /FAK/ α -SMA pathway in the antifibrotic impact of rice bran oil on thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *PLoS One*. 2021;
81. Lei BK, Zhao S, Xu T, Zhou Y, Xu SS, Wang RY, et al. TGF- β 1/ERK/CTGF pathway involved in effect of acupuncture on exercise-induced skeletal muscle fibrosis. *Zhen ci yan jiu = Acupunct Res*. 2021;
82. Hough C, Radu M, Doré JJE. TGF-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One*. 2012;
83. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, et al. TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of

- ShcA. *EMBO J.* 2007;
84. Li B, Yin GF, Wang YL, Tan YM, Huang CL, Fan XM. Impact of fecal microbiota transplantation on TGF- β 1/Smads/ERK signaling pathway of endotoxic acute lung injury in rats. *3 Biotech.* 2020;
 85. Li C, Fu Y, Dai H, Wang Q, Gao R, Zhang Y. Recent progress in preventive effect of collagen peptides on photoaging skin and action mechanism. *Food Science and Human Wellness.* 2022.
 86. Liu Z, Li Y, Song H, He J, Li G, Zheng Y, et al. Collagen peptides promote photoaging skin cell repair by activating the TGF- β /Smad pathway and depressing collagen degradation. *Food Funct.* 2019;
 87. Mukhopadhyay R, Bhattacharya S, Biswas M. In vitro free radical scavenging activity of *Clitoria ternatea* leaf extracts. *J Adv Pharm Educ \& Res Oct-Dec.* 2012;2(4).
 88. Kalmankar N V., Hari H, Sowdhamini R, Venkatesan R. Disulfide-Rich Cyclic Peptides from *Clitoria ternatea* Protect against β -Amyloid Toxicity and Oxidative Stress in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Med Chem.* 2021;
 89. Li SH, Tseng YH. The Antioxidant activity and mutagenicity of flower petal extracts of *matthiola incana* and *clitoria ternatea*. *Taiwan J Agric Chem Food Sci.* 2019;
 90. Zussiva A, Lauren BK, Budiayati CS. Ekstraksi dan analisis zat warna biru (anthosianin) dari bunga telang (*Clitoria ternatea*) sebagai pewarna alami. *J Teknol Kim dan Ind.* 2012;1(1):356–65.
 91. Gomez SM, Kalamani A. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*): A Nutritive Multipurpose Forage Legume for the Tropics-An Overview. *Pakistan J Nutr.* 2003;
 92. Sintyadewi PR, Rabani RS IGAY, Wulansari NT. Analysis of chemical characteristics and antioxidant activity test of kombucha black tea and butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.) based on fermentation time. *Int J Chem Mater Sci.* 2021;

93. Taur DJ, Patil RY. Evaluation of antiasthmatic activity of *Clitoria ternatea* L. roots. *J Ethnopharmacol.* 2011;
94. Syafa'Atullah AQ, Amira A, Hidayati S, Mahfud M. Anthocyanin from butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea*) by ultrasonic-assisted extraction. In: *AIP Conference Proceedings.* 2020.
95. Cronquist A, Takhtadzhian AL. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia university press; 1981.
96. . SMG, . AK. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*): A Nutritive Multipurpose Forage Legume for the Tropics - An Overview. *Pakistan J Nutr.* 2003;
97. Harlan L, Mena LT, Ramalingam L, Jayarathne S, Shen CL, Moustaid-Moussa N. Mechanisms mediating anti-inflammatory effects of delta-tocotrienol and tart cherry anthocyanins in 3t3-l1 adipocytes. *Nutrients.* 2020;
98. McAnulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Shooter LA, Henson DA, Utter AC, et al. Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011;
99. Li K, Zhang M, Chen H, Peng J, Jiang F, Shi X, et al. Anthocyanins from black peanut skin protect against UV-B induced keratinocyte cell and skin oxidative damage through activating Nrf 2 signaling. *Food Funct.* 2019;
100. Zhou Q, Xu H, Yu W, Li E, Wang M. Anti-inflammatory effect of an apigenin-maillard reaction product in macrophages and macrophage-endothelial cocultures. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;
101. Le K, Song Z, Deng J, Peng X, Zhang J, Wang L, et al. Quercetin alleviates neonatal hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting microglia-derived oxidative stress and TLR4-mediated inflammation. *Inflamm Res.* 2020;
102. Boukhedouni N, Martins C, Darrigade AS, Drullion C, Rambert J, Barrault C, et al. Type-1 cytokines regulate MMP-9 production and E-cadherin disruption to promote melanocyte loss in vitiligo. *JCI Insight.* 2020;
103. Sun J, Wu Y, Long C, He P, Gu J, Yang L, et al. Anthocyanins isolated

- from blueberry ameliorates CCl₄ induced liver fibrosis by modulation of oxidative stress, inflammation and stellate cell activation in mice. *Food Chem Toxicol.* 2018;
104. Serra D, Henriques JF, Serra T, Silva AB, Bronze MR, Dinis TCP, et al. An anthocyanin-rich extract obtained from portuguese blueberries maintains its efficacy in reducing microglia-driven neuroinflammation after simulated digestion. *Nutrients.* 2020;
105. Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Özkurt Ş. The Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey. *Turkish J Zool.* 1998;
106. Sharma MR, Mitrani R. Effect of TNF alfa blockade on UVB induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice *J. Photocem Photobiol B Biol* 2020, doi :10.1016/j.jphotobiol.2020.112072.
107. un Nabi SAA, Sheraz MA, Ahmed S, Mustaan N, Ahmad I. Pharmaceutical gels: a review. *RADS J Pharm Pharm Sci.* 2016;4(1):40–8.