

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUNGA
TELANG TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN
EKSPRESI CASPASE-3**

(Studi *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar yang dipapar UVB)

Tesis

**untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

Elvana Cahyani

MBK. 20.16.010197

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUNGA
TELANG TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN
EKSPRESI CASPASE-3**

(Studi *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar yang Dipapar UVB)

Disusun oleh :

Elvana Cahyani

MBK.20.16.010197

yang dipertahankan di depan Tim Penguji
pada 24 Agustus 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui, Pembimbing

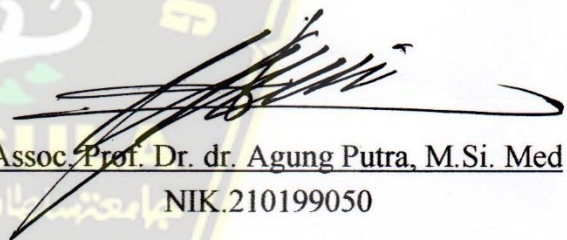
Pembimbing I,

Pembimbing II,



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. KK (K)

NIK.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.



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Elvana Cahyani
Tempat / tanggal lahir : Jakarta / 06 Desember 1984
Agama : Buddha
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Galatia : Lulus tahun 1991
2. SD Hati Kudus : Lulus tahun 1997
3. SMP Hati Kudus : Lulus tahun 2000
4. SMA Methodist : Lulus tahun 2003
5. S1 Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara : Lulus tahun 2009
6. Profesi Dokter FK Universitas Tarumanagara : Lulus tahun 2011
7. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA Semarang : 2020 - sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Alm. Johan S
Ibu : Trishia
2. Nama Suami : Jimmy
3. Nama Anak : -

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis berjudul, **“PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUNGA TELANG TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN EKSPRESI CASPASE-3 (Studi *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar yang dipapar UVB)”** 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, S.H., S.E., Akt., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister 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.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K), Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med, selaku dosen pembimbing I dan II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

5. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji I, Dr. dr. Sri Priyantini, Sp. A selaku penguji II, Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku penguji III yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran kritik yang membangun dalam penyusunan tesis ini.
6. Seluruh tenaga pendidik dan staff di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unissula Semarang : Iffan Alif, Syifa, Dina, Ariq, Ardi, dan staff lainnya yang belum disebutkan. Terima kasih atas arahan dan informasi serta bantuan selama proses penelitian dan penyusunan tesis saya sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
8. Keluarga, 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, 24 Agustus 2022



(Elvana Cahyani)

ABSTRAK

Latar belakang: Iradiasi Ultraviolet B (UVB) dapat menurunkan jumlah kolagen akibat dari peningkatan produksi Reactive Oxygen Species (ROS) yang meningkatkan pelepasan faktor inflamasi serta memodulasi apoptosis sel fibroblast. Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diketahui memiliki kandungan berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat antioksidan. Namun, peran ekstrak bunga telang terhadap ekspresi gen TNF- α dan Caspase-3 masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh pemberian topikal Ekstrak Bunga Telang dalam sediaan gel terhadap ekspresi TNF- α dan Caspase-3 pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.

Metode: Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain post test only control group. Penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok sehat, kontrol UVB, perlakuan gel ekstrak bunga telang 5% (P1) dan 10% (P2). Masing-masing diberi paparan UVB setiap hari selama 5 hari dengan MED 160 mJ/cm², kecuali kelompok sehat tidak diberi paparan UVB. Pemberian topikal gel ekstrak bunga telang dilakukan setiap hari selama 14 hari. Pada hari ke-20, dilakukan terminasi dan dianalisis Ekspresi TNF- α dan Caspase-3 menggunakan qRT-PCR. Analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis dilanjutkan uji Mann Whitney.

Hasil: Pada kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang 10% didapatkan penurunan ekspresi gen TNF- α ($2,8 \pm 1,0$) dan Caspase-3 ($1,04 \pm 0,23$) dibandingkan kelompok kontrol UVB memiliki ekspresi gen TNF- α ($6,1 \pm 2,2$) dan Caspase-3 ($3,80 \pm 1,39$).

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak bunga telang berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan ekspresi TNF- α dan Caspase-3 pada tikus yang dipapar UVB.

Kata Kunci: Ekstrak bunga telang, TNF- α , Caspase-3, UVB.

ABSTRACT

Background: Ultraviolet B (UVB) irradiation can reduce the amount of collagen due to increased production of Reactive Oxygen Species (ROS) which increases the inflammatory factors release and modulates apoptosis of fibroblast. Clitoria ternatea extract is known to contain various secondary metabolites which have antioxidant. However, Clitoria ternatea extract role on TNF- α and Caspase-3 gene expression is still unclear. This study aimed to examine the effect of topical gel Clitoria ternatea extract on the expression of TNF- α and Caspase-3 in Wistar strain rats UVB induced.

Methods: This research is experimental with a post test only control group design. This study was divided into 4 groups consisting of a healthy group, UVB control, treatment with clitoria ternatea extract gel 5% (P1) and 10% (P2). Each was exposed to UVB daily for 5 days with MED 160 mJ/cm², except the healthy group did not receive UVB exposure. Clitoria ternatea extract gel is given every day for 14 days. On day 20, TNF- α and Caspase-3 expression were terminated and analyzed using qRT-PCR. Data analysis used Kruskal Wallis followed by Mann Whitney test.

Results: In the 10% clitoria ternatea extract gel treatment group, there was a decrease in TNF- α (2.8 ± 1.0) and Caspase-3 (1.04 ± 0.23) gene expression compared to the UVB control group which had TNF- α (6.1 ± 2.2) and Caspase-3 (3.80 ± 1.39) gene expression.

Conclusion: Giving Clitoria ternatea extract gel significantly affected the decrease in TNF- α and Caspase-3 expression in rats induced by UVB.

Keywords: Clitoria Ternatea Extract, TNF- α , Caspase-3, UVB.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Originalitas Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. TNF- α	9
2.2. Caspase 3	13
2.3. Ekstrak Bunga Telang.....	16

2.4	Anatomi dan Histologi Kulit	20
2.5	Ultraviolet B (UVB)	24
2.6	Farmakokinetik Obat Topikal.....	32
2.7	Pengaruh gel ekstrak bunga telang terhadap ekspresi TNF- α dan Caspase-3	42
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	45
3.1.	Kerangka Teori	45
3.2.	Kerangka Konsep.....	49
3.3.	Hipotesis	49
BAB IV	METODE PENELITIAN.....	50
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	50
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	51
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	52
4.4.	Alat dan Bahan	54
4.5.	Cara Penelitian.....	55
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	62
4.7.	Analisa Data.....	62
4.8.	Alur Penelitian	63
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	64
5.1.	Hasil Penelitian.....	65
5.2.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	72
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	76
6.1.	Kesimpulan	76

6.2. Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
DAFTAR LAMPIRAN.....	93



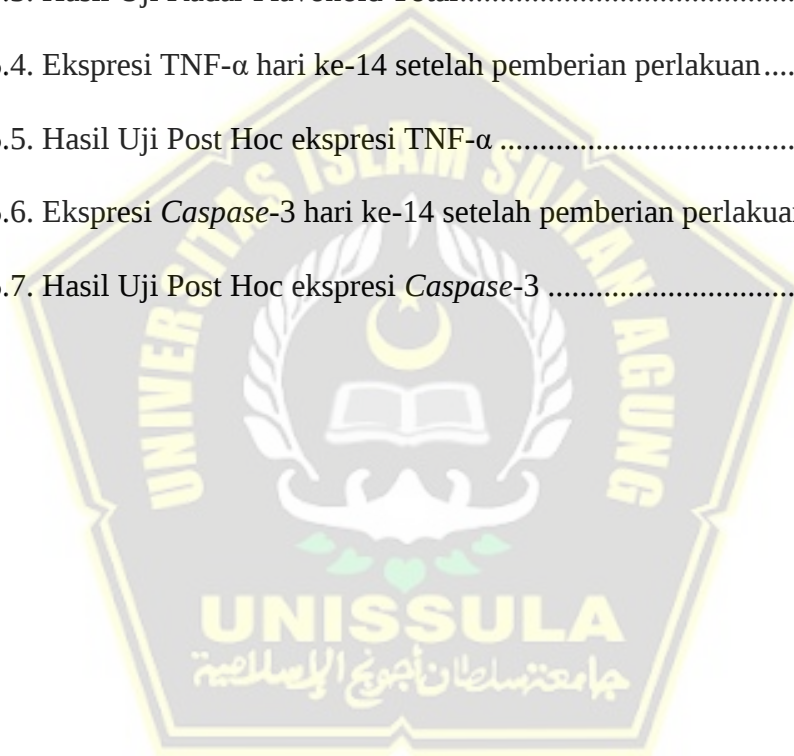
DAFTAR SINGKATAN

AIF	: <i>Apoptosis Induction Factor</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
ARE	: <i>Antioksidan Respons Elemen</i>
ATP	: <i>Adenosin Trifosfat</i>
BAK	: <i>Bcl-2 antagonist/killer-1</i>
BAX	: <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase 2</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FADD	: <i>Fas-Associated Death Domain</i>
GSH-Px	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
IAP	: <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
JNK	: <i>The c-Jun N-terminal Kinase</i>
kDa	: <i>kiloDaltons</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
mg	: <i>miligram</i>

MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
NOXO1	: <i>NADPH-oxidase 1</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid-2 related factor</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
Smac	: <i>Second Mitochondrial Activator of Caspases</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPF	: <i>Sun Protection Factor</i>
TLR4	: <i>Toll Like Receptor 4</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TRAIL	: <i>TNF-α Receptor Apoptosis Inducing Ligand</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>
VCO	: <i>Virgin Coconut Oil</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 2. Perbandingan penuaan kronologis dan Photoaging	25
Tabel 4. Komponen PCR mix TNF- α dan Caspase-3.....	61
Tabel 5.1. Hasil Determinasi Ekstrak Bunga Telang.....	65
Tabel 5.2. Kandungan Ekstrak Bunga Telang	66
Tabel 5.3. Hasil Uji Kadar Flavonoid Total.....	67
Tabel 5.4. Ekspresi TNF- α hari ke-14 setelah pemberian perlakuan.....	68
Tabel 5.5. Hasil Uji Post Hoc ekspresi TNF- α	68
Tabel 5.6. Ekspresi <i>Caspase-3</i> hari ke-14 setelah pemberian perlakuan.....	70
Tabel 5.7. Hasil Uji Post Hoc ekspresi <i>Caspase-3</i>	71



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Jalur pensinyalan faktor nekrosis tumor umum alfa (TNF- α) dari TNFR1 dan TNFR2	10
Gambar 2.2. Aktivasi Caspase-3 melalui Jalur Apoptosis Intrinsik dan Ekstrinsik (Boland et al., 2013).....	16
Gambar 2.3. Simplisia Clitoria Ternatea.....	17
Gambar 2.4. Lapisan kulit.....	20
Gambar 2.5. Lapisan-lapisan Epidermis	21
Gambar 2.6. Penetrasi melalui tiga kompartemen kulit.....	33
Gambar 2.7. Jalur penetrasi sediaan topikal.....	34
Gambar 2.8. Skema rute sediaan topikal.....	37
Gambar 2.9. Formulasi vehikulum sediaan topikal	40
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	48
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	49
Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian.....	50
Gambar 4.2. Alur Renelitian	63
Gambar 5.1. Grafik Ekspresi TNF- α	69
Gambar 5.2. Grafik Ekspresi <i>Caspase-3</i>	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi UVB merupakan sinar UV yang dapat menembus epidermis dan mencapai bagian atas dermis dan dapat menginduksi kerusakan DNA sel-sel kulit dengan meningkatkan konsentrasi *Reactive Oxygen Species* (ROS)¹. Selain menyebabkan kerusakan DNA, ROS akibat radiasi UVB juga dapat menyebabkan generasi faktor inflamasi seperti TNF- α serta dapat modulasi apoptosis sel melalui aktivasi *Caspase-3* yang berujung pada masalah kulit yang mengurangi nilai estetika seseorang^{2,3}. Kulit kasar, kerutan, pigmentasi, telangiektasis, berbagai lesi jinak, premaligna, bahkan neoplasma ganas merupakan masalah kulit yang disebabkan oleh paparan sinar UVB secara kronis dan menyumbang hampir 80% dari penuaan wajah^{1,4,5}.

Iradiasi UV dapat menyebabkan perubahan kolagen dermal melalui dua jalur utama yaitu jalur stimulasi kerusakan kolagen oleh MMPs, serta jalur penghambatan sintesis prokolagen yang mengakibatkan hilangnya kandungan kolagen³. Sejumlah penelitian selama beberapa dekade terakhir telah menunjukkan bahwa kerusakan kulit yang diinduksi UV diprakarsai oleh generasi ROS dan berbagai faktor inflamasi⁶. ROS yang diinduksi UV dapat menyebabkan kerusakan DNA, peroksidasi lipid dan degradasi protein pada sel kulit, serta dapat mengurangi aktivitas enzim antioksidan di kulit, termasuk *superoksida dismutase* (SOD) dan *glutathione peroksidase* (GSH-

Px) ^{6,7}. Produksi ROS berlebih dapat berdampak pada peningkatan kondisi inflamasi yang ditandai dengan pelepasan berbagai molekul proinflamasi, termasuk TNF- α ⁸. Produksi molekul TNF- α yang berkepanjangan dapat menginduksi produksi ROS yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA melalui jalur NOXO1 (NADPH-Oxidase 1) sehingga mengaktifkan gen p53 yang berujung pada ekspresi *Caspase-3* dan memicu terjadinya apoptosis sel-sel kulit, termasuk sel fibroblas ^{9,10}. Beberapa penelitian lain mengungkapkan bahwa paparan UVB kronis menyebabkan stress oksidatif ¹¹, sehingga mengaktifasi fosforilasi *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), aktivasi jalur p38, JNK, ERK dan p53, yang kemudian dapat memicu ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang menyebabkan degradasi *extracellular matrix* (ECM) seperti kolagen ^{6,12}.

Dalam beberapa tahun terakhir, peningkatan paparan sinar UV dari kerusakan lapisan ozon dan perubahan gaya hidup yang melibatkan aktivitas di luar ruangan menjadi perhatian karena faktor-faktor ini dapat menyebabkan *photoaging* ¹. Individu yang memiliki kulit berwarna cerah, serta usia yang lebih tua akan lebih rentan mengalami *photoaging* ¹³. Meski belum banyak penelitian mengenai angka kejadian *photoaging*, pada sebuah penelitian di Australia oleh Green menyebutkan sekitar 72% laki-laki dan 42% perempuan di bawah usia 30 tahun serta sekitar 98% laki-laki dan 92% perempuan pada usia 50 tahun mengalami *photoaging* ^{14,15}. Hiperpigmentasi dan kerutan wajah merupakan tanda *photoaging* yang sering dijumpai, hal ini dapat mempengaruhi interaksi sosial seseorang dalam kehidupan sehari-hari.

Pengobatan dengan berbagai agen kimiawi seperti *retinoic acid*^{16,17}, *hidroquinone*¹⁶, *kojic acid*¹⁸, *glycolic acid*¹⁸, dan arbutin¹⁹ merupakan pilihan utama^{16,18–20}, namun dilaporkan bahwa agen kimia tersebut dapat menimbulkan berbagai efek samping seperti iritasi kulit, dermatitis kontak, genotoksisitas bahkan kanker kulit^{16,19,21}.

Tumbuhan Bunga Telang merupakan tumbuhan dengan banyak kandungan nutrisi ini dan dikenal sebagai tanaman obat di berbagai belahan dunia^{22,23}. Semua bagian tumbuhan termasuk akar, biji dan daun, digunakan sebagai obat dan diakui memiliki berbagai efek seperti efek dalam menurunkan inflamasi^{23,24}. Bagian petal bunga telang merupakan sumber antosianin dan berbagai macam jenis flavonoid yang memiliki efek antioksidan²⁵. Penelitian terkini melaporkan bahwa ekstrak bunga telang (*Clitorea ternatea*) mempunyai kadar antioksidan tinggi yang mampu menghambat produksi ROS dan menurunkan kondisi inflamasi sehingga dapat menghambat peningkatan MMP, mencegah apoptosis sel fibroblast serta menghambat penurunan kolagen^{26–29}. Penelitian lainnya menyatakan bahwa antosianin merupakan antioksidan kuat yang dapat menurunkan ROS yang dapat diberikan secara topical atau pun oral³⁰. Namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji peran bunga telang terhadap ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada kulit yang mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB. Berlatar belakang masalah tersebut, penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh pemberian topikal Gel Ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, maka rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah : Apakah terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak bunga telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB?.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang secara topikal 5% dan topikal 10% terhadap Ekspresi TNF- α pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB dibandingkan kontrol.
2. Untuk membuktikan pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang secara topikal 5% dan topikal 10% terhadap Ekspresi *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB dibandingkan kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Meode Penelitian	Hasil
1	Merly Jayanti, Ade Maria Ulfa and Angga Saputra Yasir, 2021 ²⁶	The Formulation and Physical Evaluation Tests of Ethanol in Telang Flower (Clitoria ternatea L.) Extract Losio Form as Antioxidant	In Vitro Eksperimental	Formula lotion ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan berpotensi melindungi kulit dari radikal bebas.
2	Ayu Tamara Barito Saritani, Anak Agung Gde Putra Wiraguna, Luh Putu Lin Indrayani Maker, 2021 ²⁹	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	In Vivo, Eksperimental	Terjadi penurunan MMP-1 dan Peningkatan Kolagen.
3	Sintya Suherlan, Taufik Muhammad Fakhri and Diar Herawati Effendi, 2021 ³¹	Uji In-Silico Aktivitas Melanogenesis Senyawa Ternatin Bunga Kembang Telang (Clitoria ternatea) terhadap Reseptor Tirosinase	In Vitro, Eksperimental	Ternatin A1 baik sebagai kandidat antimelanogenesis, sementara ternatin D1, ternatin B1 dan ternatin C1 tidak disarankan menjadi kandidat antimelanogenesis.
4	Nia Boru Ritonga, Rini and Tuty Anggraini, 2020 ³²	Formulation and Evaluation of Sun Block Lotion Made from Virgin Coconut Oil (VCO) with the addition of the Extract of Telang Flower (Clitoria ternatea, L) and Pandan Leaves (Pandanumusa paradisiaca, L)	In Vitro, Eksperimental	Penambahan ekstrak bunga telang terbukti aman untuk jenis kulit normal dan memberikan efek perlindungan sinar matahari, dengan nilai SPF yang relatif tinggi.
5	Dian Puspitasari, Diah Pratimasari and Disa Andriani, 2019 ³³	Penentuan nilai SPF krim ekstrak Etanol Bunga Telang (Clitoria Ternatea) secara in vitro menggunakan metode Spektrofotometri.	In Vitro, Eksperimental	Konsentrasi optimum ekstrak bunga telang adalah 5% yang terkandung dalam krim tabir surya Formula III.

6	Li Hsien Chen, I Chia Chen, Pei Yen Chen, Ping Hsin Huang, 2018 ³⁴	Application of Butterfly Pea Flower Extract in Mask Development	In Vitro, Eksperimental	The organic butterfly pea flower extract not only did not cause redness, itching, allergy / irritation to the skin but also improved moisture retention and had whitening effects, and these effects increased as its concentration increased. As a result, the butterfly pea flower fermentation solution can be added to cosmetic formulas as a natural raw material of skin care products.
7	N.N.A. Zakaria, E.J. Okello, M-J. Howes, M.A. Birch- Machin, A. Bowman, 2018 ³⁵	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	In Vitro, Eksperimental	Terjadi penurunan kerusakan mtDNA.
8	Vimal Nair, Woo Young Bang, Elisa Schreckinger, Nuri Andarwulan, Luis Cisneros Zevallos, 2015 ²⁸	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	In Vitro, Eksperimental	The anti-inflammatory properties of polyphenols from butterfly pea extracts and identify two fractions, F3 and F4, suppressing the LPS- induced inflammation process through two distinct actions in the TLR pathway. Fraction F3 (quercetin glycosides), plays an important role as an inhibitor of COX-2 activity and as an antioxidant. Fraction F4 (the ternatin anthocyanins) suppress the nuclear NF-κB translocation.

Berdasarkan Tabel 1 terdiri dari beberapa penelitian terdahulu mengenai khasiat ekstrak bunga telang. Saritani et al melaporkan bahwa krim ekstrak bunga telang dapat menghambat peningkatan MMP-1 level dan penurunan kolagen pada tikus yang terpapar UVB, dengan menggunakan metode ELISA untuk pemeriksaan kadar MMP-1 dan pewarnaan Picro Sirius Red untuk pemeriksaan jumlah kolagen²⁹. Ritonga et al melakukan penelitian untuk mengetahui formulasi terbaik berupa penambahan ekstrak bunga telang dan ekstrak daun pandan pada lotion kulit VCO untuk melindungi dari sinar matahari, serta mengetahui karakteristik fisik dan kimia lotion kulit dengan menggunakan metode eksploratif dengan 2 perlakuan dan 3 ulangan³². Pada penelitian yang dilakukan Chen et al, mengaplikasikan ekstrak bunga telang konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10% sebagai bahan baku produk perawatan kecantikan alami menunjukkan hasil bahwa larutan fermentasi bunga telang tidak hanya menghambat kemerahan, gatal, alergi, dan iritasi kulit, tetapi juga memiliki sifat antioksidan, meningkatkan kelembaban dan efek memutihkan, dan hasilnya meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi³⁴.

Penelitian-penelitian tersebut berbeda dengan penelitian kami dimana penelitian kami menggunakan gel ekstrak bunga telang pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB dan menganalisis ekspresi TNF- α dan ekspresi *Caspase-3*, dengan menggunakan metode RT-PCR. Investigasi untuk mengetahui pengaruh Gel Ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada kulit tikus akibat paparan UVB belum dilakukan,

sehingga penelitian-penelitian dengan “Pengaruh Pemberian gel ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* Studi In Vivo pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB” yang akan dilakukan masih layak untuk dilakukan karena memiliki novelitas.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Secara teoritis manfaat yang diberikan dari penelitian ini adalah menyajikan ilmu pengetahuan kepada masyarakat terkait peran pemberian gel ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada kulit akibat paparan UVB.

1.5.2 Manfaat Praktis

Secara praktis manfaat dari penelitian ini yaitu dapat menjadi data dasar bagi penelitian terapan lanjutan yang bermuara pada produksi produk untuk terapi photoaging akibat paparan UVB dimana salah satu karakteristiknya yaitu penurunan kolagen.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ekspresi TNF- α

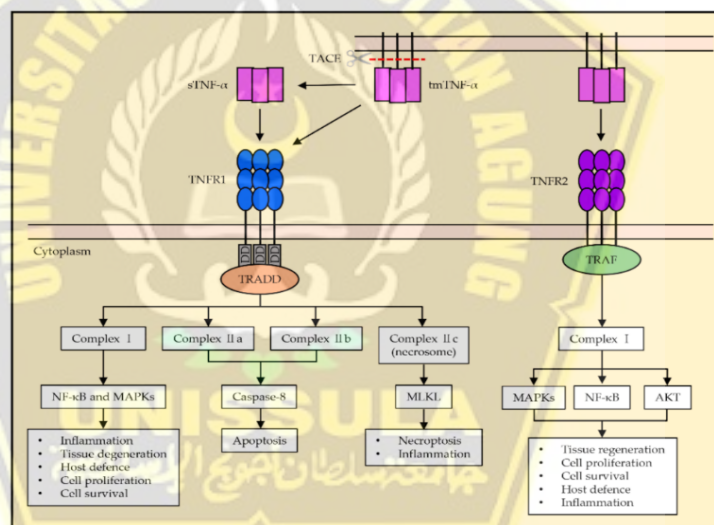
2.1.1. Definisi TNF- α

TNF- α merupakan sitokin proinflamasi dan pleiotropik yang sebagian besar diproduksi oleh makrofag, monosit, sel T, sel NK. TNF- α juga diekspresikan pada tingkat yang lebih rendah oleh berbagai sel lain, termasuk fibroblas, keratinosit, sel otot polos, dan sel tumor³⁶⁻³⁸. Molekul TNF- α memiliki berat molekul 51 kDa dan dibentuk oleh 212 asam amino homotrimers yang stabil. Terdapat dua bentuk TNF- α yaitu bentuk transmembran (tmTNF- α) dan bentuk terlarut (sTNF- α). Secara umum, TNF- α bekerja dengan berikatan pada dua reseptor yang berbeda yaitu TNFR1 (p55) dan TNFR2 (p75), yang kemudian mentransmisikan sinyal molekuler untuk berbagai macam fungsi biologis, diantaranya menjadi reseptor pengatur respon kekebalan serta mampu menimbulkan efek seluler yang beragam termasuk apoptosis, nekroptosis, efek peradangan, efek proliferasi atau yang menginduksi pertumbuhan dan efek hematopoietik^{36,38,39}.

2.1.2. Aktivitas TNF- α

Peran TNF- α pada sistem imunologik adalah mengaktivasi sel limfosit T, serta meningkatkan ekspresi antigen MHC kelas I pada sel

endotel dan fibroblast. Selain itu, TNF- α merupakan mediator utama yang berperan dalam proses peradangan dan juga sitotoksik bagi sel yang mengalami hambatan sintesis protein⁴⁰. Secara fisiologis TNF- α memiliki berbagai efek selain sebagai pro-inflammatory pada luka yaitu dapat memicu apoptosis sel dan sebagai inhibited apoptosis^{37,41}. Hal tersebut dikarenakan kadar TNF- α yang dapat berpengaruh langsung pada sistem sel. Kadar TNF- α rendah (0,1–10 $\mu\text{g/ml}$) dapat menghambat apoptosis sel dengan menurunkan fragmentasi DNA sel. Sedangkan kadar TNF- α yang tinggi (100 $\mu\text{g/ml}$) dapat memicu apoptosis sel melalui jalur NF- κB ⁴¹.



Gambar 2.1. Jalur pensinyalan faktor nekrosis tumor umum alfa (TNF- α) dari TNFR1 dan TNFR2. TNFR-1 diekspresikan pada semua jenis sel, sedangkan ekspresi TNFR-2 terutama terbatas pada sel imun. Perbedaan utama antara kedua reseptor tersebut adalah TNFR-2 tidak memiliki death domain (DD) yang dimiliki oleh TNFR-1. TNFR-1 memainkan peran ganda: tidak hanya terlibat dalam menginduksi apoptosis, tetapi juga dapat mentransduksi sinyal kelangsungan hidup sel. Jalur pensinyalan TNFR1 diaktifkan oleh ligasi sTNF- α dan tmTNF- α , dan domain kematian dari TNFR1 merekrut TRADD. Kompleks I mengaktifkan NF- κB dan MAPKs, yang menyebabkan peradangan, degenerasi jaringan, pertahanan inang, proliferasi sel, dan sel survival. Kompleks IIa dan IIb diaktifkan Caspase-8 dan menginduksi apoptosis. Kompleks IIc diketahui menginduksi nekroptosis dan peradangan melalui aktivasi MLKL. Jalur pensinyalan TNFR2 terutama diaktifkan oleh tmTNF- α . TNFR2 tidak

memiliki domain kematian dan merekrut TRAF melalui domain TRAF-nya, yang mengaktifkan formasi kompleks I, menghasilkan NF- κ B dan MAPKs dan aktivasi AKT. Aktivasi TNFR2 dikaitkan dengan bioaktivitas homeostatik seperti regenerasi jaringan, proliferasi sel, dan sel survival, juga sebagai pertahanan host dan inflamasi³⁸.

Efek dari TNF- α diinisiasi oleh ikatan sitokin terhadap reseptor, yang menyebabkan aktivasi dari faktor utama transkripsi diantaranya nuclear factor kappa B (NF- κ B). Aktivasi tersebut kemudian menginduksi gen yang terlibat dalam respon inflamasi. Selain itu TNF- α juga dapat memicu apoptosis melalui ikatannya dengan death receptor⁴². Apoptosis melalui jalur ini melibatkan protein reseptor CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam TNF- α receptor family) beserta Fas Ligand yang disebut TRAIL (TNF- α Receptor Apoptosis Inducing Ligand). Keduanya membentuk jalur yang disebut *extrinsic pathway* atau *death receptor pathway*⁴³. Jalur apoptosis melalui TNF- α ini selanjutnya akan mengaktifasi caspase dengan dimediasi oleh *Caspase-8* sampai mengaktifasi *Caspase-3* (*Caspase* efektor yang meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein dan menginisiasi jalur *Caspase* menjadi program kematian sel)

38,44

Jalur apoptosis ekstrinsik ini dibedakan dengan *Mitochondrial pathway* yang disebut juga sebagai *Intrinsic Pathway*. Jalur mitokondria apoptosis diinisiasi oleh berbagai rangsangan dan erat diatur oleh berbagai faktor, termasuk protein pro dan anti apoptosis dari keluarga Bcl-2, juga jalur phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/

AKT/mamalia target rapamycin (mTOR). Kaskade pensinyalan PI3K/AKT/mTOR termasuk dalam program kelangsungan hidup kritis yang biasanya lebih diaktifkan pada kanker manusia, mempromosikan kelangsungan hidup sel dengan menghambat apoptosis. Jalur apoptosis melibatkan Bax (Bcl-2 family) yang merupakan protein proapoptosis. Bax dapat menghambat Bcl-2 sehingga membuat efek anti-apoptotik Bcl-2 terhalang, atau dapat berikatan secara langsung dengan membran luar mitokondria (bekerja dengan membuka saluran Ca^{2+}) sehingga terjadinya pelepasan sitokrom-c ke sitosol. Jalur intrinsik apoptosis ditandai dengan permeabilitas membran yang menyebabkan pembengkakan mitokondria, pecahnya membran luar dan pelepasan faktor proapoptosis (sitokrom c, *second mitochondrial activator of caspases* / Smac dan faktor penginduksi apoptosis / AIF) dari ruang antarmembran ke sitosol. Sitokrom-c yang terlepas ke sitosol, akan berikatan dengan Apaf-1, procaspase-9 dan ATP membentuk *apoptosome*, yang kemudian menghasilkan aktivasi *Caspase-9*, dan selanjutnya mengaktifasi *Caspase-3* sehingga terjadi kematian sel (*apoptosis*) jalur internal^{43,44}. Pelepasan Smac dari ruang intermembran mitokondria ke dalam sitosol mempromosikan apoptosis dengan menghambat aktivitas inhibitor protein apoptosis (IAP). Protein penekan tumor p53 juga memainkan peran penting, dianggap sebagai "penjaga gerbang seluler untuk pertumbuhan dan

pembelahan" dengan mengontrol pos pemeriksaan siklus sel kritis. Apoptosis dimediasi p53 melalui aktivasi APO-1/Fas dan reseptor kematian lainnya dan/atau regulasi naik dan turun masing-masing Bax dan Bcl-2. p53 diaktifkan oleh berbagai kondisi stres, termasuk radiasi. Peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) akibat stress, akan mengaktifkan jalur responsif stres (p38 MAPK), dengan demikian mempromosikan apoptosis ⁴⁴.

2.2. Ekspresi Caspase-3

2.2.1. Definisi dan Peran Caspase dalam Apoptosis

Caspase adalah keluarga protease sistein yang berfungsi sebagai efektor utama selama apoptosis untuk pembongkaran sebagian besar struktur seluler secara proteolitik, termasuk sitoskeleton, cell junctions, mitokondria, retikulum endoplasma, Golgi, dan nukleus ⁴⁵. *Caspase* adalah pendorong utama apoptosis sel di antara seluruh protein yang terlibat dalam aktivasi apoptosis yang berperan penting untuk merombak sel yang mati ⁴⁶.

Caspase disintesis di dalam sel sebagai zimogen tidak aktif yang tidak memiliki aktivitas protease yang signifikan, sehingga *Caspase* diregulasi ketika sintesis protein di mana *Caspase* tidak diaktifkan hingga menerima rangsangan kematian tertentu ⁴⁷. Struktur utama *Caspase* adalah prodomain amino-terminal dan domain protease carboxy-terminal yang mengandung *key catalytic cysteine residue* ⁴⁶.

Caspase dikategorikan sebagai *Caspase* inisiator atau efektor, berdasarkan posisinya dalam kaskade pensinyalan apoptosis. *Caspase* inisiator (*Caspase-2*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, dan *Caspase-10*) bekerja secara apikal dalam jalur kematian sel dan semuanya memiliki prodomain yang panjang dan serupa secara struktural^{48,49}. Sebaliknya, *Caspase* efektor (*Caspase-3*, *Caspase-6*, dan *Caspase-7*) memiliki prodomain yang lebih pendek dan ada di dalam sel sebagai homodimer yang terbentuk sebelumnya tetapi tidak aktif⁵⁰.

2.2.2. Definisi Caspase-3

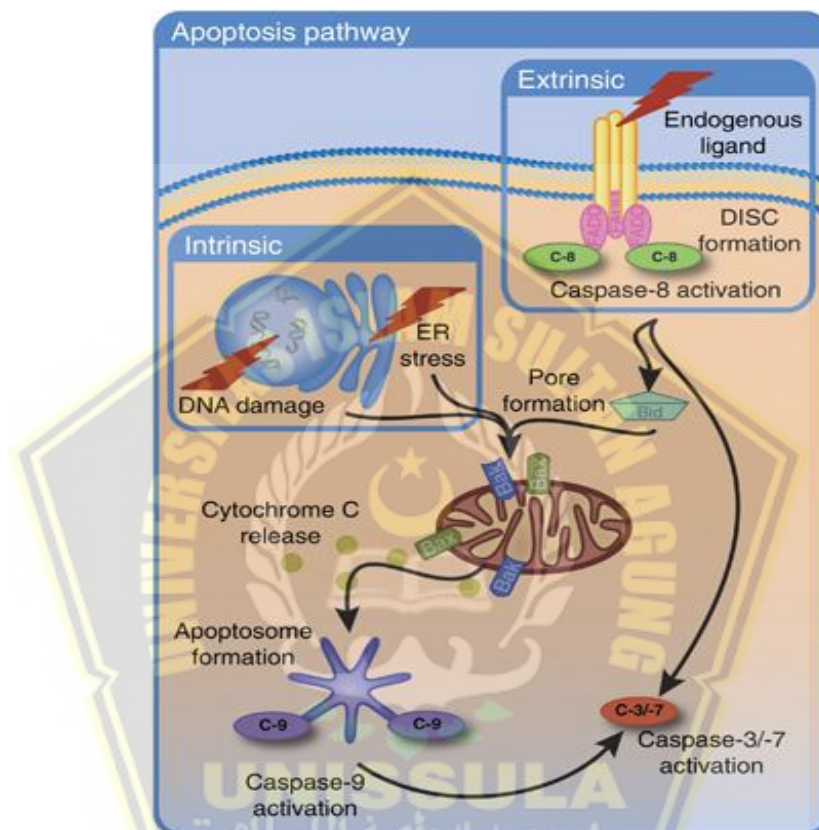
Caspase-3 adalah protein yang relatif kecil yang terdiri dari 2 subunit, subunit 12- dan 17-kDa. Aktivasi *Caspase-3* tergantung pada dimerisasinya menjadi heterotetramer, di mana Cys-285 yang diaktifkan histidin di situs aktif subunit p17 *conserved* dalam superfamili *Caspase* dan diperlukan untuk aktivitas enzimatis⁵¹. Peran *Caspase-3* dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan *Caspase-6*, *Caspase-7*, dan *Caspase-9* untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein *Caspase-3* dibelah dan dipecah sendiri oleh *Caspase-8* dan *Caspase-10*^{52,53}. Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap apoptosis execution⁵³.

2.2.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis

Aktivasi *Caspase-3* dapat melalui dua jalur apoptosis, yaitu jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik^{54,55}. Apoptosis intrinsik diinduksi

oleh stres seluler, yang menyebabkan aktivasi protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family^{56,57}. Oligomer Bcl-2 homologous antagonist killer (BAK) dan Bcl-2-associated X (BAX) kemudian menginduksi pembentukan pore di membran luar mitokondria yang menyebabkan pelepasan berbagai intermembrane space proteins terjadi^{58,59}. Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1), menginduksi oligomerisasi APAF1 untuk membentuk apoptosom^{60,61}. Apoptosom merekrut procaspase-9, yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi *Caspase-9*⁵⁵. Aktivasi *Caspase-9* merangsang kaskade *Caspase* yang berpuncak pada aktivasi *Caspase-3* dan *Caspase-7*. *Caspase* ini bertanggung jawab untuk pembelahan banyak protein seluler, yang mengarah ke ciri biokimia dan morfologi apoptosis⁶²⁻⁶⁴. Jalur apoptosis ekstrinsik dirangsang melalui pengikatan ligan ke reseptor kematian yang sesuai dan recruitment *Fas-associated death domain* (FADD) ke *death receptor* terjadi. FADD berasosiasi dengan procaspase-8 / procaspase-10 melalui domain efektor kematiannya untuk membentuk multiprotein *death-inducing signaling complex* (DISC)^{62,65-67}. Pembentukan DISC memfasilitasi pembelahan dan aktivasi *Caspase-8*⁵⁵. Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur pensinyalan tipe I atau jalur pensinyalan tipe II^{55,68}. Dalam pensinyalan tipe I, *Caspase-8* secara langsung memotong dan mengaktifkan *Caspase-3* yang menyebabkan kematian sel⁴⁶. Dalam

pensinyalan tipe II, *Caspase-8* memotong *Caspase-8-cleaved* (BID) untuk mengaktifkan BAK dan BAX⁶⁹. Protein ini kemudian menginduksi pembentukan pore di mitokondria yang mengarah ke aktivasi kaskade *Caspase* dan berpuncak pada aktivasi *Caspase-3* / *Caspase-7*⁵⁴.



Gambar 2.2. Aktivasi *Caspase-3* melalui Jalur Apoptosis Intrinsik dan Ekstrinsik (Boland et al., 2013)

2.3. Ekstrak Bunga Telang

2.3.1. Definisi Bunga Telang

Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) atau *Butterfly Pea Flower* merupakan tumbuhan perenial yang termasuk dalam famili Fabaceae dan berasal dari Amerika Selatan. Bunga telang telah menyebar ke

daerah tropik sejak abad 19 termasuk Indonesia⁷⁰. Tumbuhan ini tidak memerlukan intensitas cahaya yang tinggi untuk tumbuh sehingga mampu tumbuh dengan lebat di bawah naungan seperti di perkebunan karet dan kelapa.



Gambar 2.3. Simplisia *Clitoria Ternatea*

Menurut Cronquist (1981) Bunga Telang secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut:

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

Hasil analisis profil kandungan senyawa biologis yang dilakukan penelitian terdahulu menyebutkan Bunga Telang mengandung tanin, flobatanin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenol flavonoid, flavanol glikosida, protein, alkaloid, antrakuinon, stigmasit 4-ena-3,6

dion, minyak volatil, steroid dan flavonoid. Flavonoid yang banyak terdapat dalam Bunga Telang antara lain terdiri antosianin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi ^{71,72}.

2.3.2. Manfaat Bunga Telang dalam Medis

Penggunaan Bunga Telang dalam pengobatan tradisional telah mendorong para peneliti untuk menjelaskan aktivitas farmakologi ekstrak yang diperoleh dari berbagai bagian Bunga Telang. Sejumlah penelitian pada hewan coba telah melaporkan bahwa ekstrak menunjukkan sifat diuretik, nootropik, antiasma, anti-inflamasi, analgesik, antipiretik, antidiabetik, antilipidemik, anti-rematik, antioksidan, immunomodulator dan penyembuhan luka. Sifat Bunga Telang tersebut diketahui disebabkan oleh adanya flavonol, antosianin dan siklotida ⁷²⁻⁷⁴.

2.3.3. Manfaat Bunga Telang dalam Menekan Inflamasi

Senyawa flavonoid seperti antosianin yang terkandung dalam Bunga Telang diketahui dapat menekan inflamasi serta hipersensitivitas pada penderita asma dengan menghambat aktivasi NF-kB sehingga berkorelasi terhadap penurunan konsentrasi mediator pro-inflamasi ^{72,75}. Senyawa Apigenin yang melimpah terkandung dalam petal Bunga Telang mampu menekan ekspresi gen mediator pro-inflamasi MCP-1. Penelitian terdahulu juga melaporkan adanya kandungan kaempferol dan quercetin pada Bunga Telang yang

mampu menekan produksi TNF- α dari makrofag melalui inaktivasi jalur pensinyalan AP-1 dan Nrf-2 serta penghambatan faktor sinyal yang terlibat dalam jalur TLR4. Beberapa turunan kaempferol pada Bunga Telang juga telah terbukti memiliki efek penghambatan pada enzim COX-2 aktivitas yang berperan penting dalam pelepasan mediator pro-inflamasi seperti PGE2 dan PGD2.

2.3.4. Manfaat Bunga Telang pada *Photoaging* dan Kolagen Kulit

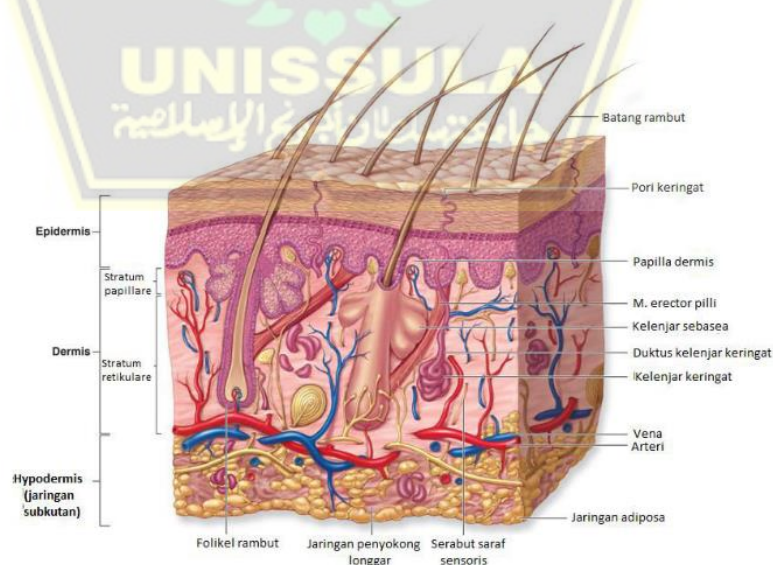
Berdasarkan penelitian terdahulu Paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF- α yang berakibat pada peningkatan enzim matrix metalloproteinase (MMP) serta penurunan densitas kolagen. Peningkatan produksi TNF- α juga dapat berakibat pada aktivasi *Caspase-3* yang merupakan protein kunci dalam apoptosis sel, termasuk sel fibroblast yang merupakan sel utama memproduksi kolagen⁸. 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 Bunga Telang dalam memperbaiki kulit yang mengalami photoaging akibat paparan UVB masih jarang dilakukan. Namun berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada Bunga Telang terdapat kemungkinan Bunga Telang dapat memperbaiki kulit yang mengalami photoaging.

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam Bunga Telang diketahui mampu menghambat jalur NF- κ B, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF- α . Penurunan factor inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti. Selain itu Turunnya factor inflamasi TNF- α dapat menurunkan aktivasi *Caspase-3* sehingga proses apoptosis sel kulit, termasuk sel fibroblast, dapat terhenti. Hal ini akan menyebabkan dapat terbentuknya kolagen dan kembalinya kekenyalan serta hilangnya kerutan kulit ⁷⁶.

2.4 Anatomi dan Histologi Kulit

Kulit merupakan organ tubuh terbesar yang menyumbang sekitar 15% dari total berat badan pada orang dewasa serta melakukan banyak fungsi vital yaitu sebagai pelindung (penyerapan sinar UV, patogen, mekanis), persepsi (sentuhan, suhu, nyeri) dan regulasi (termal, hidrasi, ekskresi) ⁷⁷.

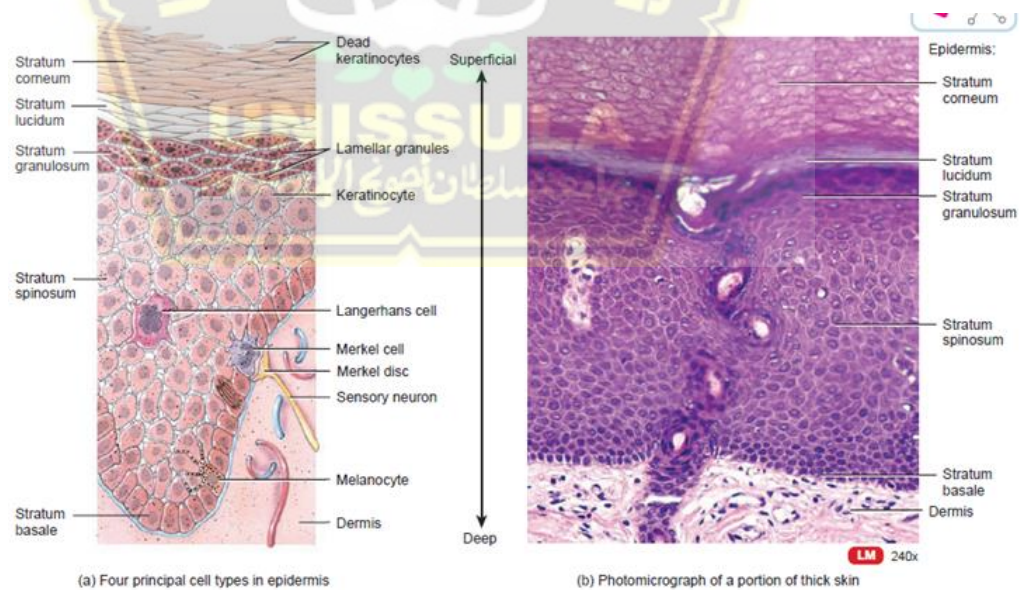


Gambar 2.4. Lapisan kulit ⁷⁸

Struktur kulit terdiri dari ⁷⁸⁻⁸⁰ :

1. Lapisan kulit pertama dan terluar adalah Epidermis.

Epidermis merupakan lapisan terluar kulit dan tersusun atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk; tidak mempunyai pembuluh darah ataupun limfe sehingga semua nutrien dan O₂ diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis ⁸¹. Terdapat empat jenis sel epidermis, yaitu: keratinosit (merupakan sel terbanyak 85-95%, berasal dari ektoderm permukaan, merupakan sel epitel yang mengalami keratinisasi, menghasilkan lapisan kedap air dan perisai pelindung tubuh), melanosit (meliputi 7-10% sel epidermis, berfungsi sebagai tirai penahan radiasi ultraviolet yang berbahaya), sel Langerhans (sel yang berperan dalam respon imun kulit, sel pembawa-antigen yang merangsang reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada kulit), dan sel Merkel (merupakan mekano-reseptor atau reseptor rasa sentuh) ^{78,81}.



Gambar 2.5. Lapisan-lapisan Epidermis ⁸¹

Epidermis adalah epitel skuamosa berlapis yang mengandung 5 lapisan tergantung pada lokasinya⁷⁹⁻⁸¹ :

- a. *Stratum Basalis* (Lapisan sel basal): Lapisan yang paling dalam dan paling dekat dengan dermis; aktif secara mitosis dan mengandung melanosit (jenis sel yang bertanggung jawab untuk memproduksi melanin), satu baris keratinosit, dan sel induk. Keratinosit dari lapisan ini berkembang dan matang saat mereka melakukan perjalanan ke luar untuk membuat lapisan yang tersisa.
- b. *Stratum Spinosum* (lapisan sel prickle): Lapisan ini terdiri atas beberapa lapis sel yang besar-besar berbentuk poligonal dengan inti lonjong; dengan sitoplasmanya kebiruan. Lapisan ini mengkompromikan sebagian besar epidermis dan mengandung beberapa lapisan sel yang dihubungkan oleh desmosom. Desmosom ini memungkinkan sel untuk tetap terikat erat satu sama lain dan menyerupai "duri" secara arsitektur.
- c. *Stratum Granulosum* (lapisan sel granular): Lapisan ini mengandung beberapa lapisan sel yang mengandung butiran kaya lipid. Di lapisan ini, sel-sel mulai mengabdikan dan kehilangan intinya, saat mereka menjauh dari nutrisi yang terletak di jaringan yang lebih dalam.
- d. *Stratum Lucidum*: Lapisan ini dibentuk oleh 2-3 lapisan sel gepeng yang tembus cahaya, dan agak eosinofilik; umumnya hanya ada di kulit tebal telapak kaki dan telapak tangan dan sebagian besar terdiri dari sel-sel yang diabadikan.

- e. *Stratum Corneum* (lapisan keratin): Lapisan berkeratin ini berfungsi sebagai lapisan pelindung dan merupakan lapisan terluar dari epidermis. Karena keratinisasi dan kandungan lipid, lapisan ini memungkinkan pengaturan kehilangan air dengan mencegah penguapan cairan internal

2. Dermis

Terdiri dari stratum papilaris dan stratum retikularis, batas antara kedua lapisan tidak tegas, serat antaranya saling menjalin. Lapisan dermis ini tersusun atas jaringan ikat yang sangat kuat, protein fiber elastin dan kolagen yang memberikan keelastisitasan pada kulit; serta terdapat pembuluh darah, saraf, kelenjar-kelenjar, dan folikel rambut. Sel-sel yang terlihat pada jaringan ikat antara lain adalah fibroblast, makrofag, dan sedikit sel adiposa karena lapisan dermis terletak di atas lapisan subkutan^{81,82}.

3. Hipodermis

Sebuah lapisan subkutan di bawah retikularis dermis, berupa jaringan ikat lebih longgar dengan serat kolagen halus terorientasi terutama sejajar terhadap permukaan kulit, dengan beberapa di antaranya menyatu dengan yang dari dermis⁸¹. Lapisan ini merupakan tempat penyimpanan suatu lemak dalam tubuh; memiliki fungsi untuk melindungi dari suatu benturan benda keras, dapat sebagai penjaga suhu tubuh karena suatu lemak dapat menyimpan panas, dan sebagai sumber energi cadangan^{81,82}.

2.5 Ultraviolet B (UVB)

Radiasi ultraviolet (UV) sinar matahari dibagi menjadi UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) dan UVC (200–280 nm). Sekitar 90% Sinar UV yang mencapai bumi merupakan UVA, 10% merupakan UVB, sedangkan UVC seluruhnya diserap oleh atmosfer bumi. Berdasarkan kedua UV yang mampu menembus permukaan bumi, UVB merupakan UV yang memiliki energi lebih besar dari UVA, dapat menembus epidermis dan mencapai bagian atas dermis dan dapat menginduksi kerusakan DNA sel-sel kulit dengan meningkatkan konsentrasi ROS^{2,4}. ROS yang diinduksi UV dapat menyebabkan kerusakan DNA, peroksidasi lipid dan degradasi protein pada sel kulit, serta dapat mengurangi aktivitas enzim antioksidan di kulit^{6,7}. Paparan jangka panjang terhadap UVB dapat menyebabkan *photoaging* yang memfasilitasi penuaan kulit (penurunan kolagen) dan melanogenesis⁸³.

2.5.1. Photoaging

Photoaging merupakan penuaan kulit ekstrinsik yang menyebabkan penuaan dini pada kulit melalui paparan kumulatif radiasi ultraviolet (UV) dari Matahari maupun sumber UV buatan⁸⁴. *Photoaging* secara klinis ditandai dengan warna kulit yang tidak merata (hiperpigmentasi), rona kulit yang memucat kekuningan, kerutan (bisa halus, kasar atau keduanya), kulit yang atrofi, kulit menjadi kendur, telangiectasis, solar elastosis, actinic purpura, hingga pembentukan lesi prakanker, kanker kulit, dan melanoma⁸⁵.

Tabel 2. perbandingan perubahan histologis dan klinis yang terbukti pada penuaan kronologis dan Photoaging ¹⁷

	Chronological aging	Photoaging
Histological features	Loose, short, thin, disorganized collagen Epidermal atrophy Loss of rete pegs Flattening of epidermal–dermal junction Reduced melanocytes, Langerhans, and mast cells	Elastosis Collagen fragmentation Irregular epidermal thickness Increased glycosaminoglycans and proteoglycans Increased inflammatory markers (mast cells, eosinophils, mononuclear cells) Melanogenesis
Clinical features	Thin skin Fine wrinkles Xerosis Laxity Cherry angioma Seborrheic keratoses	Atrophic skin Coarse wrinkles Leathery skin Lentigines Bronzed appearance Yellow cobblestone appearance Telangiectasia Bruising Sun-induced dermatitis

Sinar UV yang mencapai lapisan dermis lebih banyak pada kulit yang berwarna cerah dibandingkan dengan kulit berwarna gelap sehingga individu dengan tipe kulit Fitzpatrick rendah cenderung lebih rentan terhadap *photoaging* ⁸⁶. Terdapat enam tipe warna kulit yang diklasifikasikan Fitzpatrick berdasarkan reaksinya terhadap paparan sinar matahari serta radiasi sinar UV, mulai dari sangat pucat (tipe kulit I) hingga sangat gelap (tipe kulit VI). Warna alami atau pigmentasi kulit ditentukan oleh jumlah, tipe dan susunan melanin di kulit. Pigmen melanin memberikan perlindungan alami terhadap paparan sinar UV yakni *Sun Protection Factor* (SPF) ⁸⁷. Kulit yang

gelap lebih tahan terhadap kerusakan kulit akibat paparan sinar UV dikarenakan kulit yang lebih gelap memiliki SPF alami yang lebih tinggi yakni 13,4 jika dibandingkan kulit bangsa Kaukasia yang hanya memiliki SPF alami 3-4 atau bahkan kurang, sehingga manifestasi penuaan kulit lebih ringan dan terjadi lebih lambat 10 hingga 20 tahun dibandingkan dengan kulit yang lebih terang ⁸⁸.

2.5.2. Kolagen

Kolagen merupakan salah satu makromolekul / protein matriks ekstraseluler vertebrata (ECM) yang paling banyak dan kompleks. Sekitar 30 kolagen yang berbeda secara genetik diekspresikan dalam jaringan ikat manusia, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia ^{89,90}. Sebagian besar, urutan mayoritasnya berupa heliks rangkap tiga (*triple helices*), yang membuatnya unik di antara protein. Heliks rangkap tiga adalah konformasi protein seperti tali yang kaku, yang tergantung pada jenis kolagennya, dapat diselingi antara daerah heliks non-triple fleksibel kecil, atau daerah non-kolagen globular yang lebih besar. Daerah triple heliks terdiri dari pengulangan tripeptida Gly-XY yang berdekatan, dengan residu Gly yang didukung pada posisi ini karena mereka cukup kecil untuk menyesuaikan batas tiga rantai peptida yang membentuk triple helix ⁹⁰.

Kolagen terdiri dari beberapa jenis, salah satunya adalah kolagen tipe I yang paling melimpah di jaringan mamalia. Sekitar 80-

90% dari kolagen yang ditemukan di tubuh merupakan kolagen tipe I^{91,92}. Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut⁹³. Kolagen tipe I juga terkait dengan interaksi sel, migrasi, perlekatan, diferensiasi, dan organisasi⁹¹. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah⁹³.

Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 75% dari massa kering kulit serta berperan memberikan kekuatan tarik dan elastisitas, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit^{92,94}. Penelitian-penelitian sebelumnya membuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 (membentuk 80 – 90% dari total kolagen) dan kolagen-3 (membentuk 8 – 12 % dari total kolagen) yang berfungsi pada pertahanan mekanik^{89,92}. Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-

6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas⁸⁹. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat UV. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro* kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen oleh MMPs (menghasilkan kolagen yang terfragmentasi dan tidak teratur) dan secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMPs (yang mengakibatkan hilangnya kandungan kolagen). Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya^{3,95}. Paparan UV berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya bermanifestasi menjadi penuaan kulit berupa kerutan (wrinkle), hilangnya elastisitas, dan kekenduran (sagging)^{92,94,96}.

2.5.3. Melanin dan Hiperpigmentasi

Melanin merupakan senyawa biologis yang terdapat pada manusia, hewan dan tanaman yang berfungsi sebagai pigmen yang memberikan warna pada kulit, mata, dan rambut⁹⁷. Hiperpigmentasi adalah suatu keadaan bertambahnya jumlah melanin pada lapisan kulit yang mengakibatkan perubahan warna kulit menjadi lebih gelap.

Salah satu penyebab hiperpigmentasi adalah paparan UVB⁸⁵. UVB merupakan UV yang dapat menembus epidermis dan mencapai bagian atas dermis dan dapat menginduksi kerusakan DNA sel-sel kulit dengan meningkatkan konsentrasi *Reactive Oxygen Species* (ROS)^{2,4}. Macam-macam bentuk hiperpigmentasi : Melasma, Ephelids/freckles, HPI (Hiperpigmentation post inflammation)⁸⁸

Sistem pigmentasi kulit melibatkan melanosit, melanosom, melanin, enzim tirosinase, dan proses melanogenesis. Pada kulit melanin di bentuk oleh sel melanosit dengan bantuan enzim tirosinase. Melanosit menghasilkan dua jenis pigmen melanin yaitu eumelanin (pigmen berwarna coklat-hitam) dan pheomelanin (pigmen warna kuning-kemerahan)⁹⁷. Warna kulit tergantung pada jenis dan jumlah dua pigmen utama melanin tersebut di epidermis dan bagaimana penyebarannya. Eumelanin bersifat fotoprotektif yang memiliki kemampuannya untuk menyerap dan menyebarkan radiasi ultraviolet dan mengais spesies oksigen reaktif. Sebaliknya, pheomelanin bersifat photosensitizing dan menghasilkan spesies oksigen reaktif ketika terkena UVA. Setelah melanin disintesis, pigmen yang mengandung melanosom diangkut ke keratinosit, diinternalisasi, dan diperdagangkan ke lokasi perinuklear di mana mereka dapat menyerap sinar UV dan melindungi inti keratinosit dari kerusakan radiasi terkait UV⁹⁸.

2.5.4. Pengobatan

Ada dua pendekatan utama dalam pengelolaan photoaging yaitu strategi untuk mencegah kerusakan akibat sinar UV dan obat-obatan yang dapat memperbaiki kerusakan kulit yang ada ^{17,99}.

Tabir surya merupakan salah satu komponen pencegahan utama photoaging. Bahan tabir surya dapat dibagi menjadi dua kelompok besar : organik (atau bahan kimia) yang menyerap foton spesifik sinar UV dan anorganik (atau penghambat fisik) yang memantulkan dan menyebarkan sinar UV. Penggunaan tabir surya yang direkomendasikan yaitu tabir surya spektrum luas (pelindung terhadap keduanya Radiasi UVA dan UVB) dan memiliki faktor perlindungan matahari (SPF) 30+. Terlepas dari jenis tabir surya, faktor terpenting untuk efektivitas tabir surya adalah jumlah total tabir surya yang diterapkan pada kulit, diikuti oleh keseragaman aplikasi dan spektrum penyerapan spesifik dari bahan yang digunakan. Kuantitas tipikal yang direkomendasikan adalah 2 mg/cm². Selain itu, disarankan agar tabir surya diterapkan 15 hingga 30 menit sebelum paparan sinar matahari dan diterapkan kembali setiap 2 hingga 3 jam terutama setelah berenang dan berkeringat ¹⁷.

Obat-obatan yang dapat memperbaiki kerusakan kulit akibat photoaging seperti retinoids topikal, antioksidan, ginseng, teh, dan lainnya. Tretinoin dan tazarotene adalah dua retinoid topikal (turunan vitamin A) yang saat ini disetujui FDA untuk pengobatan photoaging.

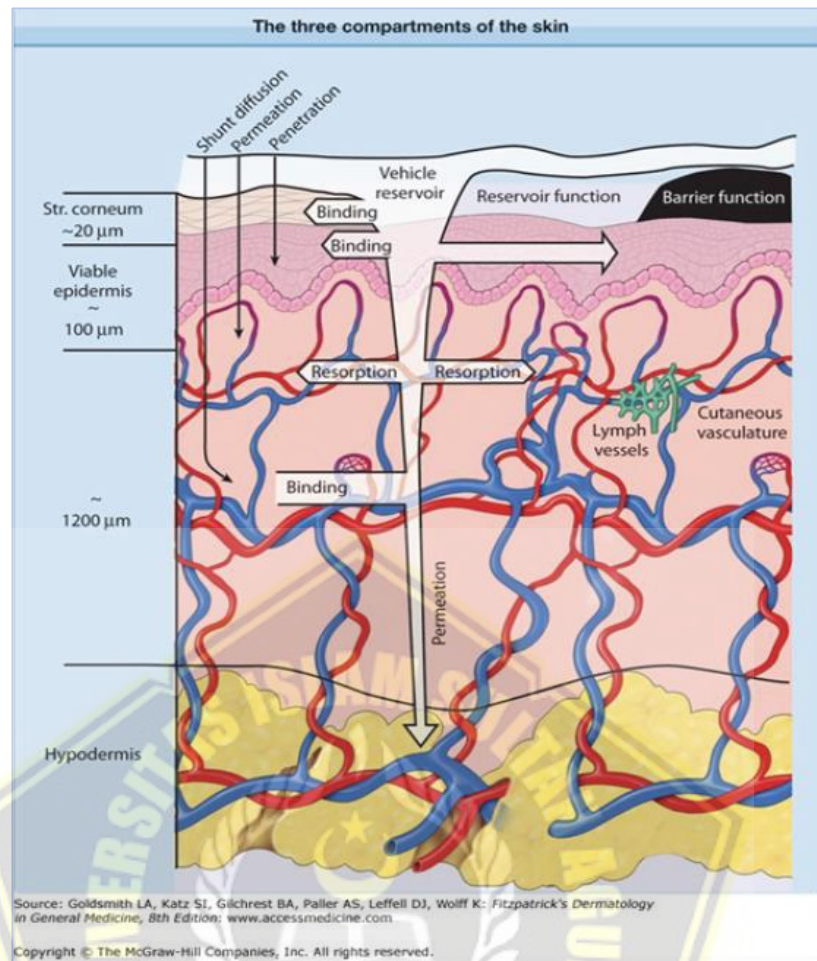
Pada tingkat molekuler, retinoid telah dipostulatkan untuk mengarahkan efeknya melalui reseptor asam retinoat nuklir mereka yang bertindak sebagai faktor transkripsi dalam regulasi gen, selain itu retinoid telah terbukti meningkatkan produksi kolagen, meningkatkan regulasi proliferasi fibroblas, dan memblokir degradasi matriks dermal setelah paparan sinar matahari ¹⁷. Antioksidan merupakan radikal bebas *scavenger* dan dapat melindungi sel normal, protein dan lemak dari kerusakan. Antioksidan ini termasuk koenzim Q, asam lipoat, vitamin C, dan vitamin E ¹⁰⁰. Dalam sebuah penelitian yang membandingkannya dengan vitamin E, vitamin C, dan asam lipoat, turunan koenzim Q yang dikenal sebagai idebenone memiliki skor tertinggi dalam fotoproteksi dan pencegahan oksidasi. Ginseng adalah komponen umum dari banyak produk kosmetik dan telah dianggap memiliki kombinasi sifat antioksidan, anti-penuaan, dan anti-inflamasi. Hal ini terutama karena bahan aktif ginsenoside. Ginseng merah telah terbukti untuk memperbaiki kerutan wajah dan meningkatkan sintesis prokolagen tipe 1 di kulit manusia. Teh berasal dari tanaman *Camellia sinensis* dengan bahan aktif termasuk polifenol teh hijau (GTP), *epigallocatechin* dan *epicatechin-3-gallate* ¹⁰¹. GTP telah ditemukan untuk menghambat metalloproteinase yang diaktifkan oleh radiasi UV. Ini juga telah ditemukan untuk mengurangi penciptaan dimer siklobutana pirimidin, yang merupakan biomarker kerusakan foto. Sebuah studi 2005 dari 40 wanita

menunjukkan bahwa 300 mg suplemen teh hijau dua kali sehari bersama dengan krim teh hijau 10% topikal setiap hari menyebabkan peningkatan elastisitas kulit ¹⁷.

2.6 Farmakokinetik Obat Topikal.

Farmakokinetik obat topikal secara umum menggambarkan perubahan konsentrasi obat setelah aplikasinya pada permukaan kulit, perjalanannya menembus sawar kulit dan jaringan di bawahnya, dan distribusinya ke dalam sirkulasi sistemik. Mekanisme ini penting dipahami untuk membantu memilih sediaan topikal yang akan digunakan dalam terapi sehingga dapat menunjang keberhasilan suatu pengobatan topikal ^{102,103}.

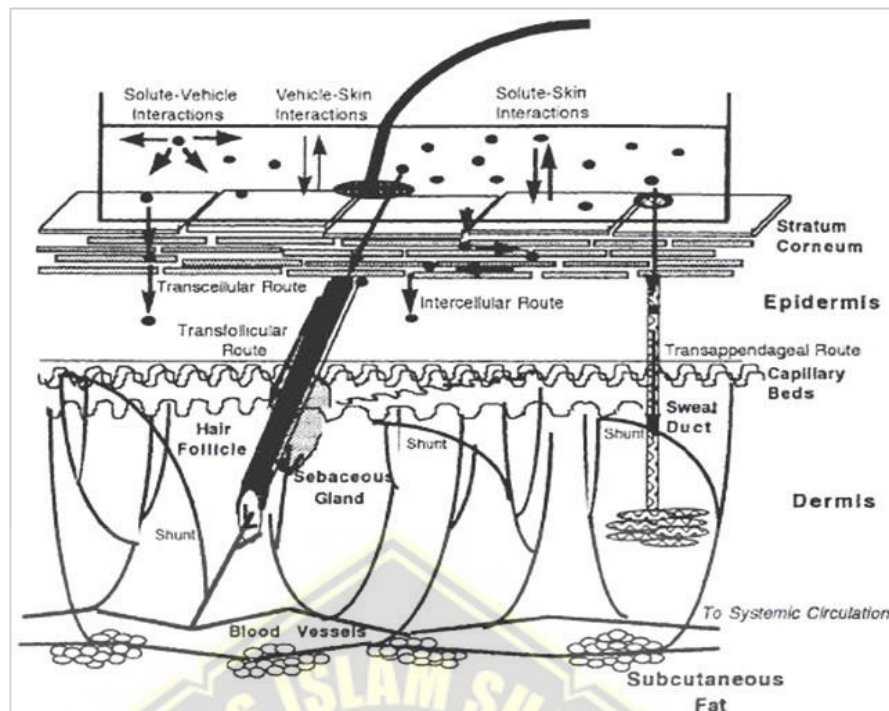
Secara umum perjalanan sediaan topikal setelah diaplikasikan melewati tiga kompartemen yaitu: permukaan kulit, stratum korneum, dan jaringan sehat. Stratum korneum dapat berperan sebagai reservoir bagi vehikulum tempat sejumlah unsur pada obat masih berkontak dengan permukaan kulit namun belum berpenetrasi tetapi tidak dapat dihilangkan dengan cara digosok atau terhapus oleh pakaian. Unsur vehikulum sediaan topikal dapat mengalami evaporasi, selanjutnya zat aktif berikatan pada lapisan yang dilewati seperti pada epidermis, dermis. Pada kondisi tertentu sediaan obat dapat membawa bahan aktif menembus hipodermis. Sementara itu, zat aktif pada sediaan topikal akan diserap oleh vaskular kulit pada dermis dan hipodermis ^{102,104}.



Gambar 2.6. Penetrasi melalui tiga kompartemen kulit

Penetrasi sediaan topikal melewati beberapa macam jalur seperti pada Gambar 2. Saat sediaan topikal diaplikasikan ke kulit, terjadi 3 interaksi¹⁰³:

1. *Solute vehicle interaction*: interaksi bahan aktif terlarut dalam vehikulum. Idealnya zat aktif terlarut dalam vehikulum tetap stabil dan mudah dilepaskan. Interaksi ini telah ada dalam sediaan.
2. *Vehicle skin interaction*: merupakan interaksi vehikulum dengan kulit. Saat awal aplikasi fungsi reservoir kulit terhadap vehikulum.
3. *Solute Skin interaction*: interaksi bahan aktif terlarut dengan kulit (lag phase, rising phase, falling phase).



Gambar 2.7. Jalur Penetrasi Sediaan Topikal¹⁰²

2.6.1 Farmakologi Dermatologik

Berbagai variabel utama yang menentukan respons farmakologik terhadap obat yang dioleskan ke kulit antara lain :

1. Variasi regional dalam penetrasi obat: Sebagai contoh; skrotum, wajah, ketiak, dan kulit kepala bersifat jauh lebih permeabel ketimbang lengan bawah sehingga memerlukan lebih sedikit obat untuk menimbulkan efek yang serupa.
2. Gradien kosentrasi: Meningkatkan gradient kosentrasi berarti meningkatkan massa obat yang disalurkan dalam tiap unit waktu, seperti halnya difusi melalui sawar lainnya. Oleh sebab itu, resistensi terhadap kortikosteroid topikal sesekali dapat diatasi dengan menggunakan kosentrasi obat yang lebih tinggi.

3. Jadwal pemberian obat: Karena sifat fisiknya, kulit berperan sebagai reservoir berbagai macam obat. Akibatnya, “waktu-paruh setempat” yang dimiliki oleh suatu obat mungkin cukup panjang sehingga obat dengan waktu-paruh sistemik yang singkat dapat diberikan sekali sehari. Sebagai contoh, pemberian kortikosteroid sekali tampaknya sama efektifnya dengan pemberiannya beberapa kali pada banyak keadaan.
4. Vehikulum dan oklusi: Vehikulum yang tepat dapat memaksimalkan kemampuan obat untuk menembus lapisan terluar kulit. Selain itu, melalui sifat fisiknya (efek melembabkan dan mengeringkan), vehikulum sendiri dapat memiliki efek terapeutik yang penting. Oklusi (penggunaan pembungkus plastik untuk menahan obat dan vehikulumnya agar tetap menempel pada kulit) sangat efektif memaksimalkan efikasi terapi ^{104–106}.

2.6.2 Obat Topikal

Obat topikal adalah obat yang mengandung dua komponen dasar yaitu zat pembawa (vehikulum) dan zat aktif. Zat aktif merupakan komponen bahan topikal yang memiliki efek terapeutik, sedangkan zat pembawa adalah bagian inaktif dari sediaan topikal dapat berbentuk cair atau padat yang membawa bahan aktif berkontak dengan kulit. Idealnya zat pembawa mudah dioleskan, mudah dibersihkan, tidak mengiritasi serta menyenangkan secara kosmetik. Untuk mendapatkan sifat zat pembawa yang ideal, maka

ditambahkanlah bahan senyawa tertentu yang berperan dalam memaksimalkan fungsi dari zat pembawa. Farmakokinetik obat topikal menggambarkan perubahan konsentrasi obat setelah aplikasinya pada permukaan kulit, perjalanannya menembus sawar kulit dan jaringan di bawahnya, dan distribusinya ke dalam sirkulasi sistemik. Senyawa yang diaplikasikan pada permukaan kulit, termasuk obat topikal, masuk ke dalam kulit mengikuti suatu gradien konsentrasi (difusi pasif) yang ditimbulkan oleh perbedaan konsentrasi obat aktif dalam sediaan yang diaplikasikan pada kulit dan konsentrasi obat aktif dalam jaringan kulit serta jaringan di bawahnya (dermis dan subkutan). Analisis farmakokinetik dari suatu sediaan topikal yang diaplikasikan pada kulit meliputi tiga kompartemen yang dilalui obat aktif, yaitu vehikulum sebagai pembawa obat aktif, stratum korneum, dan lapisan epidermis serta dermis¹⁰².

Saat suatu sediaan dioleskan ke kulit, absorpsinya akan melalui beberapa fase :¹⁰²

a. *Lag phase*

Periode ini merupakan saat sediaan dioleskan dan belum melewati stratum korneum, sehingga pada saat ini belum ditemukan bahan aktif obat dalam pembuluh darah.

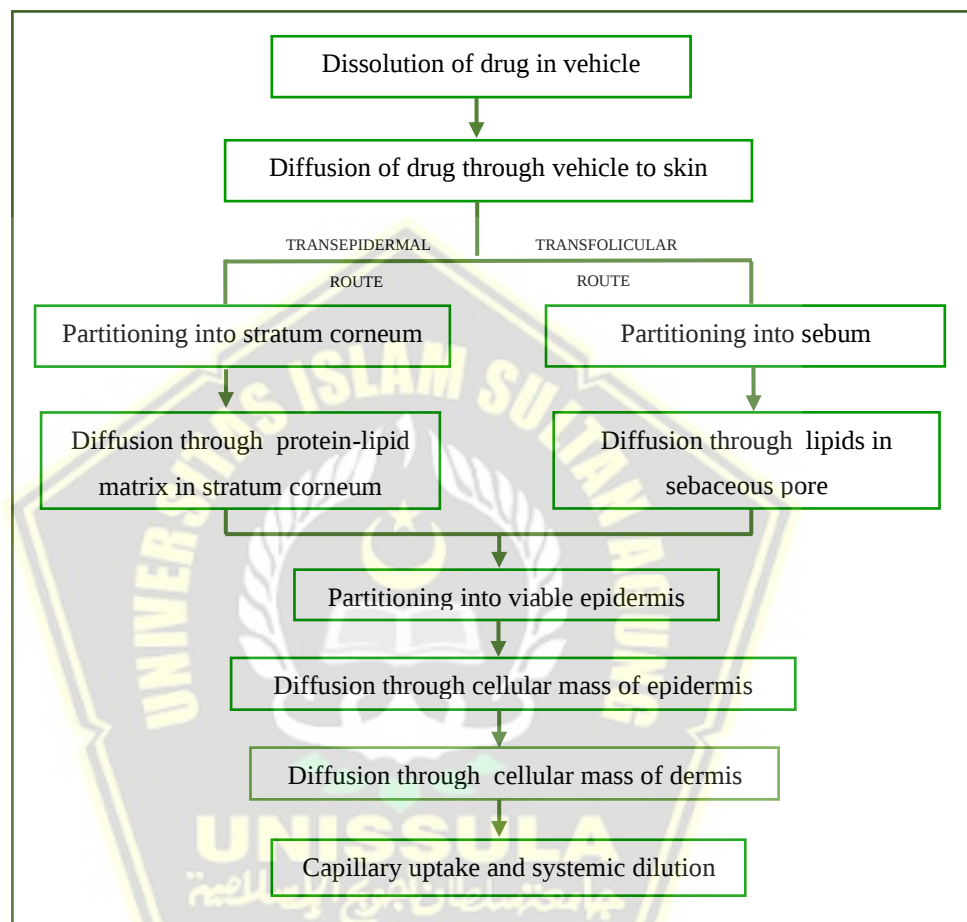
b. *Rising phase*

Fase ini dimulai saat sebagian sediaan menembus stratum korneum, kemudian memasuki kapiler dermis, sehingga dapat

ditemukan dalam pembuluh darah.

c. *Falling phase*

Fase ini merupakan fase pelepasan bahan aktif obat dari permukaan kulit dan dapat dibawa ke kapiler dermis.



Gambar 2.8. Skema Rute Sediaan Topikal ¹⁰²

Prinsip pemilihan obat topikal ¹⁰²:

1. Pada kulit tidak berambut, secara umum dapat dipakai sediaan salep (pada lesi yang tebal / kronis), krim (pada lesi kulit yang kering dan superfisil), emulsi.
2. Pada daerah berambut, losion dan gel merupakan pilihan yang

cocok.

3. Pada lipatan kulit, formulasi bersifat oklusif seperti salep, emulsi W/O dapat menyebabkan maserasi sehingga harus dihindari.
4. Pada daerah yang mengalami ekskoriasi, sebaiknya hindari formulasi berisi alkohol dan asam salisilat karena sering menyebabkan iritasi.
5. Sediaan cairan dipakai untuk kompres pada lesi basah, mengandung pus, berkrusta.

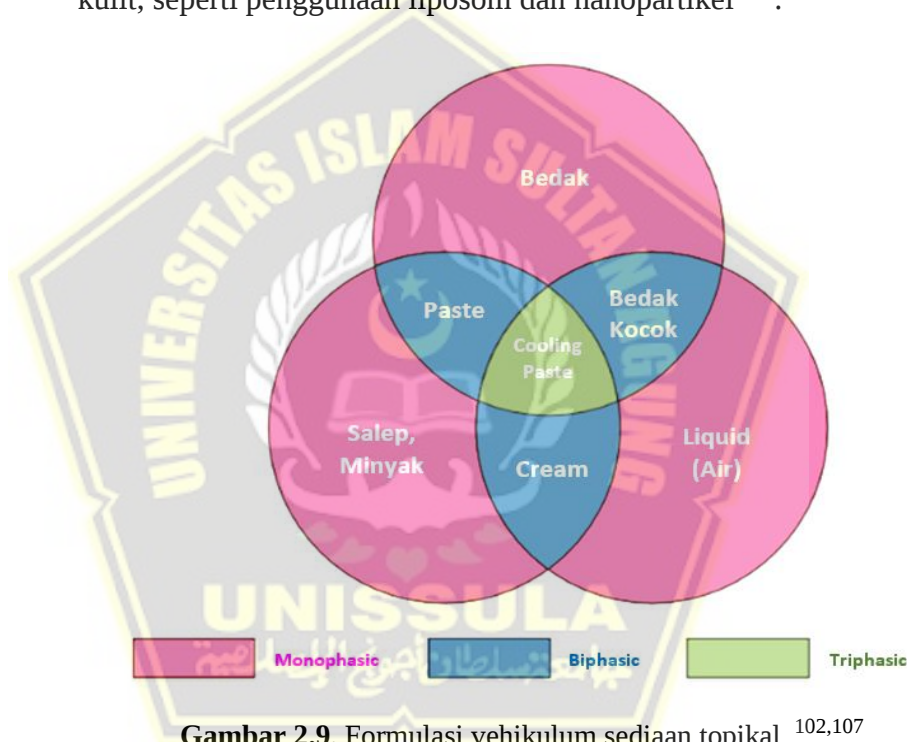
2.6.3 Vehikulum dermatologik

Vehikulum adalah zat inaktif / inert yang digunakan dalam sediaan topikal sebagai pembawa obat / zat aktif agar dapat berkontak dengan kulit. Meskipun inaktif, aplikasi suatu vehikulum pada kulit dapat memberikan beberapa efek yang menguntungkan, meliputi efek fisik (misalnya efek proteksi, mendinginkan, hidrasi, mengeringkan, dan lubrikasi), serta efek kimiawi / farmakologis (misalnya efek analgesik, sebagai astringent, antipruritus, dan bakteristatik). Obat topikal biasanya terdiri atas bahan aktif yang digabungkan dalam suatu vehikulum yang memfasilitasi aplikasi kutaneus. Beberapa pertimbangan penting dalam memilih vehikulum antara lain kelarutan agen aktif dalam vehikulum; laju pelepasan agen dari vehikulum; kemampuan vehikulum untuk menghidrasi stratum korneum sehingga meningkatkan penetrasi; stabilitas agen terapeutik dalam vehikulum;

serta interaksi baik kimiawi maupun fisik, antara vehikulum, stratum korneum, dan agen aktif. Sediaan dermatologik berdasarkan kemampuan vehikulumnya untuk menghambat penguapan dari permukaan kulit dari paling lemah sampai paling kuat dikelompokkan menjadi tinktur, wet dressing, losion, gel, aerosol, bubuk, pasta, krim dan salep. Umumnya inflamasi akut yang disertai dengan keluarnya cairan, vesikulasi, dan pembentukan krusta paling tepat diobati dengan sediaan pengering seperti tinktur, wed dressing, dan losion, sementara inflamasi kronik yang disertai dengan xerosis, pembentukan skuama, dan likenifikasi paling tepat diobati dengan sediaan yang lebih bersifat membasahi seperti krem dan salep. Tinktur, losion, gel dan aerosol baik untuk digunakan pada kulit kepala dan area berambut ¹⁰⁷.

Klasifikasi vehikulum berdasarkan komponen penyusunnya, vehikulum dapat digolongkan dalam monofasik, bifasik, dan trifasik. Yang termasuk vehikulum monofasik di antaranya adalah bedak, salep, dan cairan. Bedak kocok, pasta, dan krim tergolong dalam vehikulum bifasik. Sementara pasta pendingin merupakan contoh vehikulum trifasik. Selain ketiga kelompok besar vehikulum di atas, terdapat vehikulum lain yang tidak dapat dimasukkan ke dalam salah satu golongan tersebut, yaitu gel. Pembagian lain vehikulum adalah berdasarkan kelarutannya dalam air, yaitu vehikulum hidrofobik dan vehikulum hidrofilik. Vehikulum hidrofobik meliputi

berbagai hidrokarbon, silikon, alkohol, sterol, asam karboksilat, ester dan poliester, serta eter dan polieter. Sementara vehikulum hidrofilik meliputi berbagai poliol dan poliglikol, sebagian dari golongan ester dan poliester, serta beberapa macam eter dan polieter. Berdasarkan konsistensinya, vehikulum dibagi menjadi cair, solid, dan semisolid. Selain berbagai kelompok vehikulum di atas, berbagai penelitian juga telah dilakukan untuk meningkatkan penetrasi obat topikal ke dalam kulit, seperti penggunaan liposom dan nanopartikel ¹⁰⁷.



Gambar 2.9. Formulasi vehikulum sediaan topikal ^{102,107}

2.6.4 Topikal Gel

Gel merupakan sediaan semipadat yang terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel organik dan anorganik ^{108,109}. Gel dikelompokkan ke dalam gel fase tunggal dan fase ganda. Gel fase tunggal dapat dibuat dari makromolekul sintetik (misalnya karbomer

yang membuat gel menjadi jernih dan halus) atau dari gom alam (seperti tragakan); terdiri dari makromolekul organik yang tersebar dalam suatu cairan sedemikian hingga tidak terlihat adanya ikatan antara molekul besar yang terdispersi dan cairan. Gel fase ganda merupakan suatu suspensi yang terdiri dari aluminium hidroksida yang tidak larut dan aluminium oksida hidrat; sediaan ini berbentuk kental, berwarna putih, yang efektif untuk menetralkan asam klorida dalam lambung ^{102,107}.

Sifat-sifat gel : ^{109,110}

- a. Idealnya, bahan pembentuk gel untuk penggunaan farmasi atau kosmetik harus inert, aman, dan tidak boleh bereaksi dengan komponen formulasi lainnya.
- b. Bahan pembentuk gel yang termasuk dalam sediaan harus menghasilkan sifat seperti padatan yang wajar selama penyimpanan yang dapat dengan mudah pecah ketika mengalami gaya geser (mengocok botol atau selama aplikasi topikal).
- c. Harus memiliki anti mikroba yang sesuai untuk mencegah serangan mikroba.
- d. Gel topikal tidak boleh lengket.
- e. Gel oftalmik harus steril.

Gel segera mencair jika berkontak dengan kulit dan membentuk satu lapisan. Absorpsi pada kulit lebih baik daripada krim. Gel juga baik dipakai pada lesi di kulit yang berambut. Penetrasi gel mampu

menembus lapisan hipodermis sehingga banyak digunakan pada kondisi yang memerlukan penetrasi seperti sediaan gel analgetik. Rute difusi jalur transfolikuler gel juga baik, disebabkan kemampuan gel membentuk lapisan absorpsi ^{102,107}. Berdasarkan sifat dan komposisinya, sediaan gel memiliki keistimewaan yaitu mampu berpenetrasi lebih jauh dari krim ¹⁰⁷, sangat baik dipakai untuk area berambut ¹⁰⁷, adanya efek pendinginan pada kulit saat digunakan sehingga cocok untuk penggunaan pada luka ¹¹¹, mudah dicuci dengan air ¹¹¹, kemampuan penyebaran pada kulit baik ¹¹¹, serta disukai secara kosmetik ^{102,107}.

United States Pharmacopeia (USP) merekomendasikan beberapa uji yang perlu dilakukan untuk mengevaluasi kualitas dari sediaan gel yang telah diformulasi yaitu minimum pengisian, pH, viskositas, antimicrobial, dan kandungan alkohol pada sediaan tertentu. Terdapat juga uji lainnya yaitu uji karakter reologi, uji daya lekat serta uji stabilitas maupun uji extrudability, uji iritasi dan uji homogenitas ¹⁰⁹.

2.7 Pengaruh gel ekstrak bunga telang terhadap ekspresi TNF- α dan Caspase 3 pada tikus Galur Wistar yang dipapar UVB.

Bunga telang merupakan suatu bahan alami yang telah diteliti memiliki kandungan kimia flavonoid, antosianin, flavonol glikosida, kaempferol glikosida, quersetin glikosida, mirisetin glikosida terpenoid, tannin dan

steroid^{33,72}. Antosianin yang terdapat dalam Bunga kembang telang merupakan antosianin khas yaitu ternatin merupakan antosianin yang memiliki pigmen berwarna biru yang ditemukan dalam kelopak bunga kembang telang³¹. Antosianin merupakan golongan flavonoid yang berpotensi sebagai agen fotoprotektif karena memiliki kemampuan dalam menyerap sinar UV^{31,99} serta berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi^{31,112}.

Penelitian terdahulu (Jayanti et al) mengemukakan bahwa Formula lotion dengan konsentrasi 0,1% ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena memiliki nilai IC₅₀ < 50 ppm²⁶. Sifat antioksidan Bunga Telang menghambat produksi ROS yang diinduksi UVB dan Bunga Telang melindungi sel kulit dari stres oksidatif dan apoptosis yang diinduksi UVB dengan menghilangkan ROS yang berlebihan^{31,113}. Beberapa penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah penurunan kolagen^{24,113}. Selain itu Antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Kompleks Nrf2 dan Keap1 yang terikat bersama di dalam sitoplasma, ketika teraktivasi maka Nrf2 akan melepaskan diri melalui ubiquitinasi dari kompleks Keap1 dan mentranslokasi ke dalam nukleus; kemudian Nrf2 akan berikatan dengan ARE (Antioksidan Respons Elemen) untuk mengaktifkan gen antioksidan (transkripsi gen antioksidan) yaitu SOD dan CAT, yang selanjutnya memicu respon antioksidan. Respon antioksidan tersebut berupa mengurangi kadar

ROS, yang kemudian akan mengurangi peradangan dengan menghambat aktivitas berlebih Akt, dan mengurangi / memblok sinyal inflamasi AP-1 dan NF- κ B. Pemblokkan sinyal inflamasi tersebut dapat mencegah produksi sitokin proinflamasi (TNF- α), serta dapat mengurangi pelepasan Cyt c yang pada akhirnya dapat menghambat protein pemicu apoptosis (inisiator) seperti *Caspase-9* serta protein pelaksana apoptosis (eksekutor) seperti *Caspase-3*¹¹⁴.

Gel merupakan suatu suspensi yang terdiri dari alumunium hidroksida yang tidak larut dan alumunium oksida hidrat, sediaan ini berbentuk kental serta berwarna putih. Berdasarkan sifat dan komposisinya, sediaan gel memiliki keistimewaan yaitu mampu berpenetrasi lebih jauh dari krim¹⁰⁷, sangat baik dipakai untuk area berambut¹⁰⁷, adanya efek pendinginan pada kulit saat digunakan sehingga cocok untuk penggunaan pada luka¹¹¹, mudah dicuci dengan air¹¹¹, kemampuan penyebaran pada kulit baik¹¹¹, serta disukai secara kosmetik^{102,107}. Rute difusi jalur transfolikuler gel juga baik, disebabkan kemampuan gel membentuk lapisan absorpsi^{102,107}. Diharapkan dengan pemberian gel ekstrak bunga telang pada kulit tikus yang dipapar uvb dapat memperbaiki kerusakan jaringan kulit yang terjadi serta menjaga kesehatan kulit, dengan menurunkan ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* melalui efek antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak bunga telang.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan terhadap radiasi UVB akut atau kronis dapat menginduksi penuaan kulit dini (photoaging)⁵, menyebabkan perubahan kolagen dermal³, hiperpigmentasi¹⁹, peradangan kulit¹¹⁵ dan kanker kulit^{4,7}. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam photoaging yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA, produksi ROS, peradangan, dan apoptosis^{11,83,116}.

Peradangan dan apoptosis adalah dua peristiwa terkait erat yang diamati pada paparan iradiasi UVB. Jalur pensinyalan MAPK, seperti Akt, JNK, ERK, dan p38 memainkan peran penting dalam respons terhadap generasi ROS yang diinduksi UVB, yang mengarah ke proses inflamasi yang diperantarai AP-1 dan NF- κ B di kulit. Iradiasi UV menginduksi respon sinyal inflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi, termasuk AP-1 (c-Fos / c-Jun) dan NF- κ B, yang kemudian akan meningkatkan produksi sitokin inflamasi seperti TNF- α . Protein keluarga AP-1 c-Jun dan faktor transkripsi NF- κ B adalah gen respons UV dominan yang memainkan peran penting dalam proses inflamasi^{6,41}.

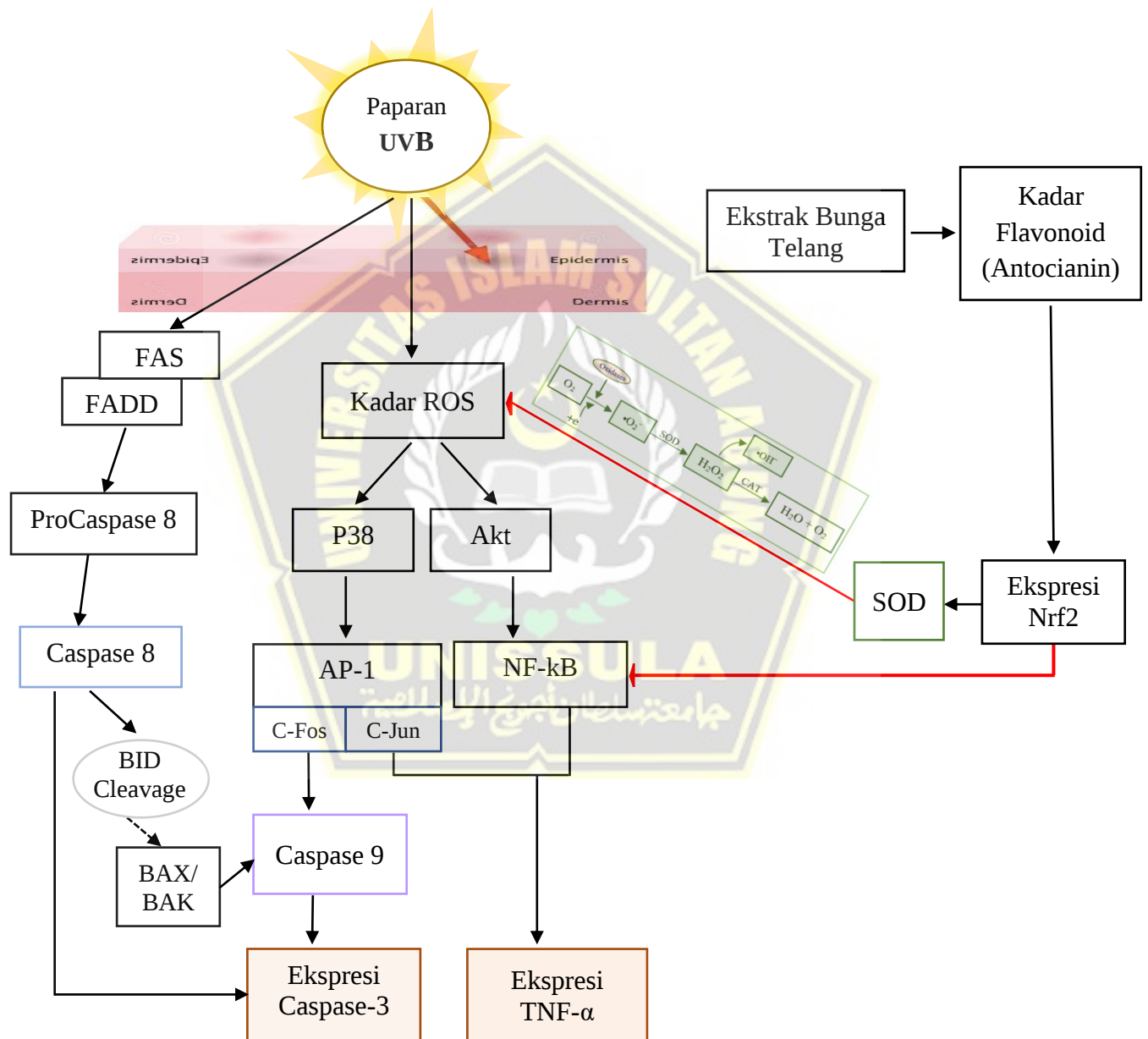
Radiasi UVB, selain menginduksi proses inflamasi juga dapat menginduksi kerusakan DNA, penghentian siklus sel, dan apoptosis. Stres oksidatif akibat paparan UVB menginduksi bentuk-bentuk modul MAPK terfosforilasi yang berlebihan, seperti JNK, p38, dan ERK, yang akan

mengarah pada kaskade apoptosis melalui sinyal pro-apoptosis.^{41,117} Peran p38 dalam respon terhadap ROS yang diinduksi UVB yaitu mempromosikan translokasi Bax dari sitosol ke mitokondria, sehingga menyebabkan pelepasan Cytochrome c (Cyt c) ke sitosol dan mengaktivasi *Caspase-9* (faktor apoptosis inisiator jalur intrinsik), kemudian diikuti dengan aktivasi *Caspase-3* (*Caspase* eksekutor). Proses kematian sel terprogram biasanya ditandai dengan perubahan fisiologis dan morfologis yang bergantung pada tahap apoptosis, dimana pada tahap akhir apoptosis, sel-sel kehilangan integritas membran dan terfragmentasi menjadi badan-badan apoptosis. Jalur intrinsik yang menginduksi apoptosis berasal dari produksi ROS yang berlebihan, yang mengarah ke pelepasan Cyt c dari mitokondria.⁴¹ Apoptosis juga dapat terjadi melalui jalur ekstrinsik yang dirangsang melalui pengikatan ligan ke reseptor kematian yang sesuai dan recruitment FADD ke *death receptor* terjadi. FADD berasosiasi dengan procaspase-8 melalui domain efektor kematiannya untuk membentuk multiprotein DISC^{62,65-67}. Pembentukan DISC memfasilitasi pembelahan dan aktivasi *Caspase-8*⁵⁵. Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur pensinyalan tipe I (*Caspase-8* secara langsung memotong dan mengaktifkan *Caspase-3* yang menyebabkan kematian sel) atau jalur pensinyalan tipe II (*Caspase-8* memotong *Caspase-8-cleaved* (BID) untuk mengaktifkan BAK dan BAX, Protein ini kemudian menginduksi pembentukan pore di mitokondria yang mengarah ke aktivasi kaskade *Caspase* dan berpuncak pada aktivasi *Caspase-3*)^{54,55,68,118}.

Sifat antioksidan Bunga Telang menghambat produksi ROS yang diinduksi UVB sehingga dapat melindungi sel kulit dari stres oksidatif dan apoptosis yang diinduksi UVB. Bunga Telang diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti Antosianin, flavonol, flavon¹¹⁹ yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi^{112,113}. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB. Selain itu Antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Kompleks Nrf2 dan Keap1 yang terikat bersama di dalam sitoplasma, ketika teraktivasi maka Nrf2 akan melepaskan diri melalui ubiquitinasi dari kompleks Keap1 dan mentranslokasi ke dalam nukleus; kemudian Nrf2 akan berikatan dengan ARE untuk mentranskripsikan / mengaktifkan gen antioksidan (SOD dan CAT), yang selanjutnya memicu respon antioksidan. Respon antioksidan tersebut berupa mengurangi kadar ROS, yang kemudian akan mengurangi peradangan dengan menghambat aktivitas berlebih Akt, dan memblokir sinyal inflamasi AP-1 dan NF- κ B. Nrf2 juga merupakan antagonis protein regulator tubuh NF- κ B sehingga dapat menurunkan proses inflamasi dengan menghambat faktor transkripsi NF- κ B^{28,120}. Pemblokkan sinyal inflamasi tersebut dapat mencegah produksi sitokin proinflamasi (TNF- α), serta dapat mengurangi pelepasan Cyt c yang pada akhirnya dapat menghambat protein pemicu apoptosis (inisiator) seperti *Caspase-9* serta protein pelaksana apoptosis (eksekutor) seperti *Caspase-3*. Perlu diketahui bahwa mempertahankan pensinyalan Akt sangat penting untuk homeostasis seluler

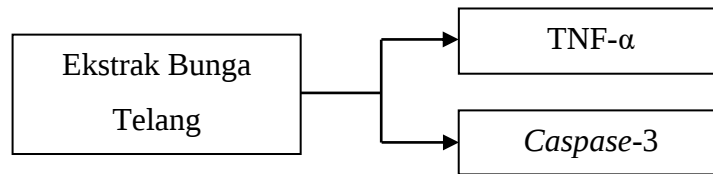
dan adaptasi seluler yang mempromosikan kelangsungan hidup sel keratinosit dan menghambat kematian sel yang diinduksi UVB¹¹⁴.

Ringkasan kerangka teori mengenai mekanisme Bunga Telang dalam melindungi sel keratinosit dari stres oksidatif yang diinduksi UVB, peradangan, dan apoptosis diringkaskan dan ditunjukkan pada gambar 6.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah :

Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak bunga telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.



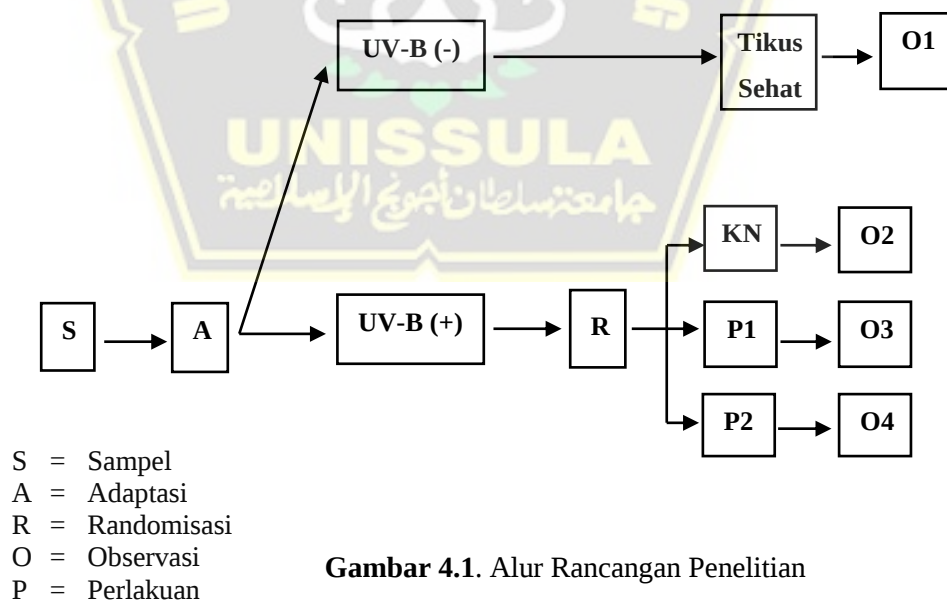
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subyek penelitian adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot badan 200-250 gr. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Tikus sehat (Tikus sehat tanpa paparan UVB),
2. Kontrol Negatif (Tikus yang dipapar UVB dengan pemberian *base gel* secara topikal),
3. Perlakuan 1 (Tikus yang dipapar UVB dengan perlakuan ekstrak bunga telang secara topikal 5 %).
4. Perlakuan 2 (Tikus yang dipapar UVB dengan perlakuan ekstrak bunga telang secara topikal 10 %)



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini terdiri dari:

1. Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang dosis 5% secara topikal^{29,33}
2. Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang dosis 10% secara topikal³⁴

4.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah Ekspresi TNF- α dan Ekspresi *Caspase-3*

4.2.2 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

1. Ekstrak Bunga telang didapat dari perkebunan lokal di Surabaya, merupakan ekstrak dari Bunga Telang (*Clitorea ternatea*) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan gel dengan dosis 5% dan 10%. Gel ekstrak bunga telang 200 mg dioleskan di punggung tikus 1x sehari, selama 14 hari.

Unit : mg.

Skala : Ordinal.

2. Ekspresi TNF- α adalah jumlah ekspresi relatif mRNA TNF- α yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel

penelitian. Molekul TNF- α memiliki berat molekul 51 kDa dan dibentuk oleh 212 asam amino homotrimers yang stabil. Ekspresi TNF- α dianalisis menggunakan metode RT-PCR menggunakan sampel jaringan kulit terpapar UVB yang diambil pada hari ke 20.

Unit : Ekspresi relatif (x).

Skala : Rasio.

3. Ekspresi *Caspase-3* adalah jumlah ekspresi relatif mRNA *Caspase-3* yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel penelitian. Ekspresi *Caspase-3* dianalisis menggunakan metode RT-PCR menggunakan sampel jaringan kulit terpapar UVB yang diambil pada hari ke 20.

Unit : Ekspresi relatif (x).

Skala : Rasio.

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dan dipapar sinar UVB 302 nm yang berjarak 20 cm dengan MED 160 mJ/cm²/hari^{3,121} selama 5 hari hingga terjadi penurunan densitas kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan galur wistar
2. Umur 2-3 bulan.
3. Tikus sehat dan tidak cacat
4. 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 yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Tikus sehat (tikus sehat tanpa paparan UVB), Kontrol Negatif (tikus dipapar UVB dengan pemberian *base gel* secara topikal), Perlakuan 1 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan gel ekstrak bunga telang 5% secara topikal) dan Perlakuan 2 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan gel ekstrak bunga telang 10% secara topikal).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal mengikuti kriteria WHO yaitu sebanyak 5 ekor per kelompok. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari ke 20 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian adalah 20 ekor tikus wistar.

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan rumus sampel eksperimental dari Federer ¹²², dengan rumus:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

keterangan : t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

Penelitian ini dilakukan pada empat kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor sehingga total sampel penelitian berjumlah 24 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan untuk membuat hewan model yang terdiri dari UV *light* (puncak emisi 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², alat potong rambut elektrik, kandang paparan, kandang

pemeliharaan, dan tempat air minum tikus. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan data antara lain *swing sentrifuge*, vacutainer EDTA, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan *vial tube* 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data adalah RT-PCR.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri ekstrak bunga telang, RNA later, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), DNA isolation kit, PCR analisis kit, aquades, ketamin, xylazine *water base gel*, etanol, akuades, pakan tikus, dan kloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Permohonan *ethical clearence* penelitian diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Bunga Telang sebanyak ± 600 gram dicacah, didehidrasi pada suhu 50 – 60° C dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol 96% kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol dihilangkan dengan cara diuapkan menggunakan rotary

evaporator hingga membentuk ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 2-8°C.

4.5.3. Skrining Fitokimia dan Uji Flavonoid

Fitokimia yang terdapat didalam ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternatea L.*) yaitu antosianin yang dapat membentuk warna pada bunga ini. Dalam hasil skrining senyawa fitokimia ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dapat dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing-masing senyawa^{123,124}. Uji skrining fitokimia terdiri dari uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin, uji tanin, uji steroid dan triterpenoid¹²⁴.

Kandungan kimia simplisia flavonoid total dapat dipengaruhi oleh ketinggian tempat tumbuh suatu tanaman. Sebelum penentuan kadar flavonoid total pada sampel dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui λ yang memiliki serapan tertinggi¹²⁵⁻¹²⁷.

4.5.4. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Bunga Telang

1. Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan cara mencampurkan basis gel sebanyak 200 mg dengan ekstrak bunga telang 5% (10 mg) dan 10% (20 mg).
2. Pengadukan dilakukan dengan gerakan konstan hingga homogen.

4.5.5. Penetapan Dosis

Dosis pemberian ekstrak bunga telang secara topical ditentukan sebelum penelitian dengan studi literatur. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dosis ekstrak bunga telang sebanyak 5% untuk penggunaan secara topikal mampu menunjukkan aktivitas anti-inflamasi yang berujung pada perbaikan kolagen kulit ²⁹. Terdapat penelitian lainnya yang mengaplikasikan ekstrak bunga telang konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10% sebagai bahan baku produk perawatan kecantikan alami menunjukkan hasil bahwa larutan fermentasi bunga telang tidak hanya menghambat kemerahan, gatal, alergi, dan iritasi pada kulit, tetapi juga memiliki sifat antioksidan dan meningkatkan retensi kelembaban dan efek pemutihan, dan hasilnya meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ³⁴. Sehingga penelitian ini menggunakan dosis 5 % dan 10 % pada pemberian ekstrak Bunga Telang secara topical. Penggunaan topikal gel bunga telang dilakukan setiap hari sebanyak 200 mg/tikus, sehingga dosis ekstrak Bunga Telang yang digunakan adalah 10 mg/tikus untuk dosis 5% dan 20 mg/tikus untuk dosis 10%.

4.5.6. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diadaptasi selama 5 hari setelah sampai di tempat penelitian
2. Tikus dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgBB) dan xylasine (20mg/kgBB) secara intra muscular sebanyak 0,5 mL

3. Rambut pada bagian punggung tikus dipotong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm
4. Punggung tikus dipapar dengan UVB yang berjarak 20 cm dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm², $\pm$ 15 menit/hari, selama 5 hari ³. Ditandai dengan eritema pada punggung tikus akibat efek kumulatif penyerapan UVB ke epidermis.
5. Tikus Perlakuan 1 diberi perlakuan gel ekstrak bunga telang secara topikal 5% yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari. Tikus Perlakuan 2 diberi perlakuan gel ekstrak bunga telang secara topikal 10% yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari.
6. Pada hari ke-15 dilakukan terminasi.

4.5.7. Pengambilan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan sampel jaringan. Jaringan kulit diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan kulit disimpan dalam tabung yang berisi RNA later dan kemudian disimpan dalam freezer suhu -80⁰ C hingga proses analisis RT-PCR dilakukan.

4.5.8. Ekstraksi DNA dan Analisis PCR

1. Ekstraksi DNA diawali dengan menghancurkan jaringan secara manual menggunakan *cordless pellet pestle* di dalam vial tube yang berisi RNA later.

2. Tambahkan 5 μL RNAase lalu inkubasi 37°C selama 30 menit.
3. Tambahkan 10 μL proteinase, lalu inkubasi pada suhu 56°C selama 1 jam.
4. Lakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 24°C.
5. Supernatan dipindahkan ke mikrotube yang baru dan steril, kemudian ditambahkan 500 μL larutan (fenol : kloroform : isoamil alkohol) dengan perbandingan (25:24:1). Homogenkan campuran dengan cara inversi beberapa kali.
6. Lakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 24°C.
7. Supernatan dipindahkan ke mikrotube yang baru dan steril, kemudian ditambahkan 500 μL larutan isopropanol dan 20 μL larutan NaCl 5 M. Homogenkan campuran dengan cara inversi beberapa kali. Perhatikan benang putih yang terbentuk !
8. Lakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu minimal 4°C.
9. Supernatan dibuang, pellet ditambahkan 300 μL larutan etanol 70%.
10. Lakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu minimal 4°C.
11. Supernatan dibuang, keringkan tube pada kertas tissue dan diamkan selama 10 menit.

12. Larutkan pellet DNA dengan penambahan 200 μ L larutan dapar TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 dan 1 mM EDTA pH 8.0).
13. Kadar DNA diukur pada panjang gelombang 260 nm.
14. Pembacaan ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* dilakukan menggunakan RT-PCR.

4.5.9. Perhitungan Ekspresi TNF- α dan *Caspase 3*

Perhitungan Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* menggunakan metode *Quantitative real time* PCR (qRT-PCR).

a. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Isolasi RNA menggunakan TRIzol® reagent literature, Invitrogen Life Technologies. Pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) pada alat Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

b. Penentuan Ekspresi Gen TNF- α

Gen TNF- α diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®) kit with Ref No.25027. Campuran reaksi dibuat dalam 0,2 mL Eppendorf tabung dengan volume total 50 L untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

c. Penentuan Ekspresi Gen *Caspase-3*

Gen *Caspase-3* diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®) kit with Ref No.25027. Campuran reaksi dibuat dalam 0,2 mL Eppendorf tabung dengan volume total 50 L untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

Table 4. Komponen PCR Mix TNF- α dan Caspase-3

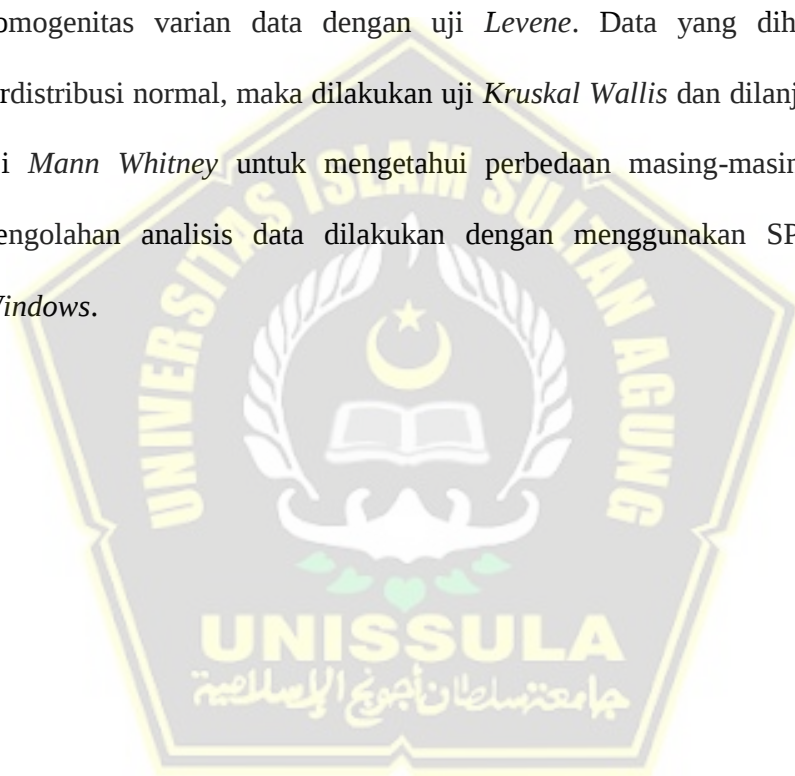
Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward TNF- α	5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'
	Reverse TNF- α	5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'
Primer	Forward <i>Caspase-3</i>	5'-GTGGAAGTACGATGATATGGC-3'
	Reverse <i>Caspase-3</i>	5'-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3'
Primer	Forward GAPDH	5'- GACGTTGACATCCGTAAAGACC -3'
	Reverse GAPDH	5'- CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT -3'
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
cDNA	SYBR Green	

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

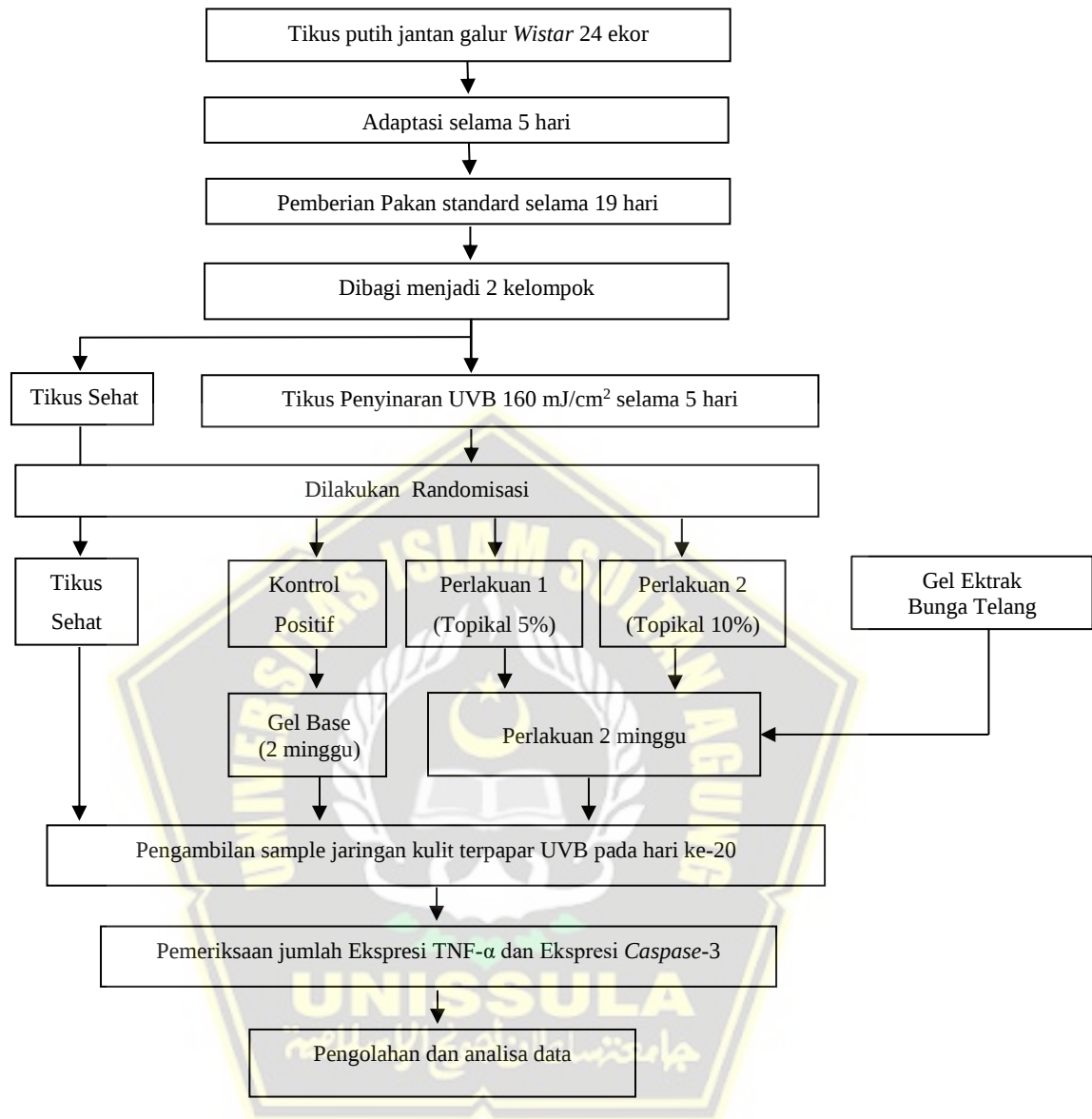
Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang. Penelitian rencana akan dilakukan pada Juli-Agustus 2022.

4.7. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas varian data dengan uji *Levene*. Data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 25.0 *for Windows*.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli 2022 hingga Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh Gel Ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen $TNF-\alpha$ dan *Caspase 3* pada tikus yang terpapar UVB. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200 - 250 gram dan berumur 2 - 3 bulan diberi paparan sinar UVB 302 nm dengan intensitas energi 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari^{3,121}. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar yang merupakan salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian UVB dan memiliki struktur kulit mirip kulit manusia^{128,129}. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 24 ekor tikus putih galur wistar dan tidak ada eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok, 1 kelompok tikus sehat, 1 kelompok tikus kontrol negatif, dan 2 kelompok perlakuan. Kelompok tikus sehat merupakan tikus sehat tanpa perlakuan dan tanpa intervensi. Kelompok kontrol negatif mendapatkan basis gel 200 mg tanpa ekstrak bunga telang. Kelompok perlakuan pertama (P1) mendapatkan gel ekstrak bunga telang dosis 5% (10mg) dan kelompok kedua (P2) mendapatkan gel ekstrak bunga telang dosis 10% (20mg) selama 14 hari. Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang dilakukan secara topikal di area kulit yang dipapar UVB secara merata.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Determinasi dan Ekstraksi Bunga Telang

Bunga Telang (*Clitoria Ternatea L*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari perkebunan lokal di Kota Surabaya. Determinasi bahan dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang (Tabel 5.1.).

Nama Sampel	Bunga Telang
Sampel	Tanaman lengkap dan simplisia
Kingdom	Plantae
Divisio	Tracheophyta
Classis	Magnoliopsida
Ordo	Rosales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Papilionoidae
Genus	Clitoria
Spesies	<i>Clitoria ternatea L.</i>
Sinonim	<i>Clitoris principissae</i>
Nama Lokal	Kembang telang

Tabel 5.1. Hasil Determinasi Bunga Telang

Bunga Telang dikeringkan dan dimaserasi dalam etanol 96% selama 3 hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Residu dilakukan proses remaserasi dengan sisa pelarut etanol selama 2 hari untuk mengekstrak zat aktif pada Bunga Telang. Filtrat yang didapat digabungkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* sehingga didapatkan Ekstrak kental Bunga Telang. Kandungan zat aktif pada Ekstrak Bunga Telang kemudian dianalisis menggunakan metode Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total.

5.1.2. Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total

Uji kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Hal-hal yang berperan penting pada skrining fitokimia antara lain pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Dalam hasil skrining senyawa fitokimia ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dapat dinilai kandungan senyawa metabolit sekunder yang dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing-masing senyawa^{123,124,130}. Uji skrining fitokimia terdiri dari uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin, uji tanin, uji steroid dan triterpenoid, dapat dilihat pada tabel 5.2.^{124,130}. Pada uji kualitatif flavonoid dengan pereaksi warna, jika setelah ditambahkan serbuk magnesium dan HCl 2N terbentuk warna merah hingga merah muda maka menunjukkan adanya flavonoid^{131,132}.

Zat aktif	Metode	Hasil Uji
Alkaloid	Wagner	+
Saporin	Forth	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	+
Flavonoid	Wilstater	+
Triterpenoid	Lieberman Burchard	+
Steroid	Lieberman Burchard	-

Tabel 5.2 Pemeriksaan Kandungan Ekstrak Bunga telang

Uji Flavonoid secara kuantitatif dengan menganalisis kandungan flavonoid total pada ekstrak etil asetat dan etanol bunga telang¹³³. Pengukuran kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode

spektrofotometri dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5.3. Hasil kadar rata-rata flavonoid total pada 1 gr sampel Ekstrak Bunga Telang adalah 682,0238 mg, yang membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung didalam ekstrak bunga telang adalah golongan flavonoid.

Tabel 5.3. Hasil Uji Kadar Flavonoid Total

Extract Concentration	TFC (<i>Total Flavonoid Count</i>)
1000 ppm	690,2143
1000 ppm	671,6429
1000 ppm	684,2143

5.1.3. Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus jantan Galur Wistar yang dipapar UVB.

Inflamasi merupakan proses patologis dasar yang melibatkan reaksi pertahanan jaringan dengan sistem vaskuler sebagai respon terhadap rangsangan berbagai faktor kerusakan termasuk irradiasi sinar UVB. Paparan sinar UVB terbukti menginduksi pelepasan sitokin inflamasi seperti TNF- α , yang berkaitan dengan berbagai masalah kulit seperti penurunan kolagen, hiperpigmentasi, dan masalah kulit lainnya.

Hasil analisa ekspresi gen TNF- α pada hari ke-14 pasca induksi UVB didapatkan data sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 5.4. Data penelitian ini dianalisis menggunakan uji Saphiro Wilk untuk mengetahui normalitas data. Berdasarkan uji tersebut, data yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan nilai tidak normal (terdapat nilai $p < 0,05$). Data hasil penelitian yang tergolong tidak

normal ini kemudian dianalisis menggunakan uji beda Non-parametrik *Kruskal Wallis*. Berdasarkan analisis statistik didapatkan hasil p value 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat beda signifikan ekspresi gen TNF- α pada hari ke-14 setelah pemberian perlakuan gel.

Tabel 5.4. Ekspresi TNF- α hari ke-14 setelah pemberian perlakuan

Variabel	Kelompok				p value
	Sehat n = 6 Mean $\pm$ SD	Kontrol n = 6 Mean $\pm$ SD	P1 n = 6 Mean $\pm$ SD	P2 n = 6 Mean $\pm$ SD	
Ekspresi TNF- α	1,00 $\pm$ 0,00	6,1 $\pm$ 2,2	3,3 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 1,0	
<i>Sapiro wilk</i>	0,000	0,239	0,776	0,058	
<i>Kruskal Wallis</i>					0,000

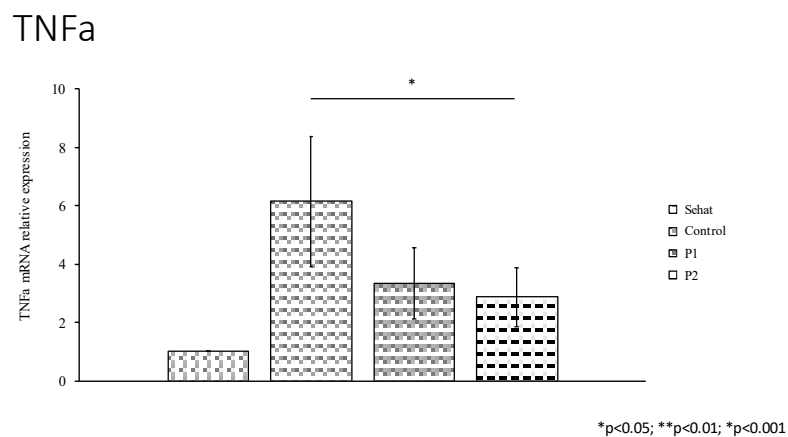
Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.5. didapatkan bahwa ekspresi gen TNF- α P2 berbeda signifikan dengan Kontrol dan Sehat ($p < 0,05$), namun tidak signifikan apabila dibandingkan dengan P1 ($p > 0,05$). Data juga menunjukkan bahwa P1 tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol ($p > 0,05$), namun berbeda secara signifikan dengan Tikus Sehat ($p < 0,05$).

Tabel 5.5. Hasil Uji *Mann Whitney* ekspresi TNF- α

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sehat	Kontrol*	0,000	0.002	0.004
	P1*	0,011	0.001	0.003
	P2*	0,036	0.001	0.003
Kontrol	P1	0,084	0.013	0.018
	P2*	0,031	0.004	0.007
P1	P2	0,666	0.515	0.534

Uji Post Hoc: * mean difference significant $P < 0,05$

Berdasarkan Gambar 5.1. dapat dilihat bahwa P2 mampu menurunkan ekspresi gen TNF- α secara signifikan dibanding Kontrol dan P1. Data juga menunjukkan bahwa P1 dan P2 dapat menurunkan ekspresi gen TNF- α .



Gambar 5.1. Grafik Ekspresi TNF- α pada semua kelompok penelitian (*p < 0,05 = signifikan)

5.1.4. Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Tikus jantan Galur Wistar yang dipapar UVB.

ROS akibat iradiasi UVB selain dapat meningkatkan generasi faktor inflamasi seperti TNF- α juga dapat memodulasi apoptosis sel melalui aktivasi *Caspase-3* sehingga dapat terjadi kematian sel-sel fibroblast yang menyebabkan penurunan kolagen dan masalah kulit lainnya yang mengurangi nilai estetika seseorang^{2,3,134}.

Hasil analisis ekspresi gen *Caspase-3* pada hari ke-14 pasca induksi didapatkan data sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 5.6. Data yang dihasilkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui normalitas. Berdasarkan uji tersebut,

data *Caspase-3* yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan nilai tidak normal ($p < 0,05$). Data ekspresi gen *Caspase-3* yang tergolong tidak normal kemudian dianalisis menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*. Berdasarkan analisis statistik didapatkan hasil p value 0,001 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat beda signifikan ekspresi gen *Caspase-3* pada hari ke-14 setelah pemberian perlakuan gel.

Tabel 5.6. Ekspresi gen *Caspase-3* setelah pemberian perlakuan.

Variabel	Kelompok				p value
	Sehat	Kontrol	P1	P2	
	n = 6 Mean±SD	n = 6 Mean±SD	n = 6 Mean±SD	n = 6 Mean±SD	
Ekspresi <i>Caspase-3</i>	1,00±0,00	3,80±1,39	1,59±0,57	1,04±0,23	
<i>Sapiro wilk</i>	0,000	0,218	0,290	0,333	
<i>Kruskal Wallis</i>					0,001

Berdasarkan analisis *Post Hoc Mann Whitney* didapatkan ekspresi gen *Caspase-3* pada Tikus Sehat berbeda secara signifikan dibandingkan dengan Kontrol dan P1 ($p < 0,05$), namun tidak signifikan apabila dibandingkan P2 ($p > 0,05$). Data juga menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara Kontrol dan P2 ($p < 0,05$), sedangkan data antara Kontrol dan P1 tidak signifikan ($p > 0,05$). Selain itu ekspresi gen *Caspase-3* perlakuan P1 tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan perlakuan P2 ($p > 0,05$). Hasil uji Post Hoc secara lengkap ditampilkan pada tabel 5.7.

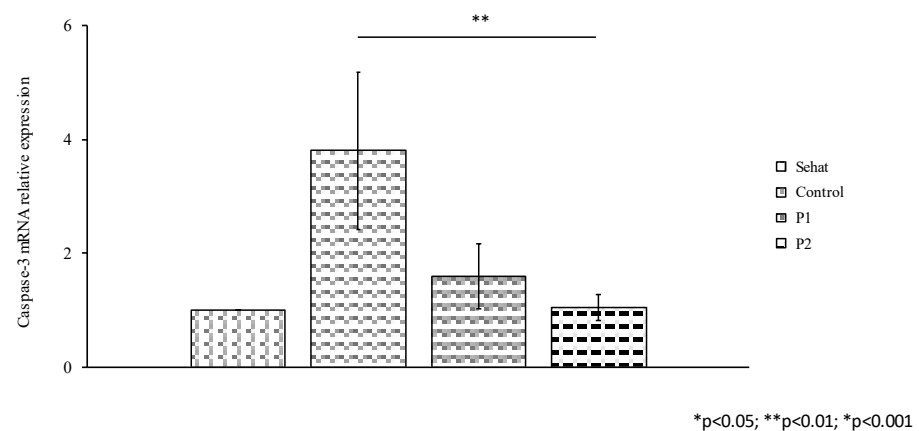
Tabel 5.7. Hasil Uji *Post Hoc* Mann Whitney *Caspase-3*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sehat	Kontrol*	0,001	0.002	0.004
	P1*	0,029	0.001	0.003
	P2	0,773	1.000	1.000
Kontrol	P1	0,202	0.023	0.029
	P2*	0,002	0.008	0.011
P1	P2	0,058	0.040	0.048

Uji Post Hoc: * mean difference significant $P < 0,05$

Data pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi *Caspase-3* pada P1 dan P2 menurun dibandingkan dengan Kontrol Negatif dan pada P2 mendekati Tikus Sehat. Selain itu, berdasarkan hasil perbandingan ekspresi *Caspase-3* menunjukkan bahwa P2 secara signifikan lebih menurunkan ekspresi *Caspase-3* dibandingkan dengan P1 (Gambar 5.2).

Caspase-3

**Gambar 5.2.** Grafik ekspresi *Caspase-3* pasca pemberian perlakuan

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Radiasi sinar UVB dianggap sebagai salah satu faktor eksternal yang paling berbahaya karena dapat mengakibatkan perubahan fisik dan kimia pada organisme hidup^{135,136}. Akibat iradiasi UVB, radikal bebas (ROS) terakumulasi dalam sel dan matriks ekstraseluler, menyebabkan kerusakan struktur makromolekul sel yaitu dari membran sel lipid bilayer, protein sel sampai ke DNA sel^{136,137}. Selain itu, ROS akibat iradiasi UVB juga dapat meningkatkan generasi faktor inflamasi seperti TNF- α serta dapat memodulasi apoptosis sel melalui aktivasi *Caspase-3* sehingga menyebabkan penurunan kolagen dan masalah kulit lainnya yang mengurangi nilai estetika seseorang^{2,3,134}. Kulit yang merupakan lapisan terluar tubuh manusia menjadi organ yang paling sering terpapar radiasi UVB. Fibril kolagen tipe I, komponen paling melimpah dari jaringan ikat manusia selalu berada di bawah tekanan UVB. Fotodegradasi kolagen telah terlibat dalam kerutan kulit dan kemungkinan berperan dalam kanker kulit¹³⁷.

Bunga telang merupakan suatu bahan alami yang telah diteliti memiliki kandungan kimia flavonoid seperti antosianin, quersetin alkaloid, saponin, dan tannin^{33,72,130}. Antosianin merupakan golongan flavonoid yang berpotensi sebagai agen fotoprotektif karena memiliki kemampuan dalam menyerap sinar UV^{31,99} serta berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi^{31,112}. Penelitian terdahulu mengemukakan bahwa Formula ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dan dapat menghambat produksi ROS yang diinduksi UVB sehingga ekstrak bunga telang dapat

melindungi sel kulit dari stres oksidatif dan apoptosis yang diinduksi UVB dengan menghilangkan ROS yang berlebihan^{26,31,113}. Radiasi UVB dilaporkan mempercepat penurunan kolagen yang seharusnya terjadi secara perlahan pada penuaan fisiologis^{138–140}. Proses penurunan kolagen dimulai dari induksi inflamasi oleh UVB pada jaringan kulit karena diketahui sebelumnya bahwa paparan UVB menyebabkan peningkatan ROS yang dapat memicu inflamasi, mampu merusak DNA dan menyebabkan kematian pada sel^{141–145}. Menurut penelitian terdahulu TNF- α menjadi salah satu faktor kunci dalam proses apoptosis melalui aktivasi protein *Caspase-3*^{9,146,147}. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi TNF- α dan *Caspase-3* pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.

Hasil penelitian ini menemukan bahwa pemberian gel ekstrak Bunga Telang pada dosis 10% mampu menurunkan kadar TNF- α secara signifikan ($p < 0,05$). Penurunan kadar TNF- α dapat disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid dalam ekstrak Bunga Telang. Bunga Telang diketahui mengandung beberapa jenis flavonoid seperti antosianin, quercetin dan kaempferol. Ketiga jenis flavonoid ini diketahui memiliki kemampuan antioksidan yang tinggi. Menurut penelitian sebelumnya menemukan peran antosianin dalam menginduksi aktivasi Nrf-2 yang dapat secara langsung menginaktivasi NF-kB^{34,148,149}.

Penelitian terkini menyatakan bahwa NF-kB berperan krusial dalam perkembangan inflamasi akibat paparan UVB pada kulit^{150–152}. Hal ini

mengimplikasikan bahwa penghambatan ekspresi NF-kB dapat menekan respon inflamasi kulit akibat diinduksi radiasi sinar UVB. Berdasarkan penelitian sebelumnya, aktivasi NF-kB dapat memicu pelepasan sitokin inflamasi seperti IFN- γ , IL-6 dan TNF- α ^{151,153}.

Aktivasi jalur pensinyalan NF-kB dapat terjadi melalui banyak rangsangan yang berbeda termasuk sitokin TNF- α yang disekresikan oleh makrofag lokal akibat adanya infeksi dan stres seluler yang diakibatkan oleh faktor eksternal seperti paparan sinar ultraviolet ^{154,155}. Dengan tidak adanya rangsangan pengaktif, dimer NF-kB dipertahankan dalam sitoplasma melalui asosiasi dengan protein penghambat, anggota dari keluarga penghambat NF-kB (I κ B). Paparan UVB dapat melepaskan ikatan NF-KB dan faktor penghambat sehingga terjadi aktivasi NF-kB. Penelitian terdahulu menemukan adanya peran ekstrak bunga telang dalam menghambat ekspresi NF-kB ^{72,156}. Penekanan faktor transkripsi NF-kB berhubungan dengan pemotongan jalur produk sitokin inflamasi, termasuk TNF- α ¹⁵³. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini yang menemukan adanya penurunan ekspresi TNF- α pasca pemberian gel ekstrak bunga telang.

Sitokin TNF- α menyediakan berbagai sinyal biologis, yang berpartisipasi dalam pengaturan homeostasis imun dan terlibat dalam pengaturan kematian sel ^{9,146,147}. Mekanisme induksi apoptosis oleh TNF- α terkait erat dengan kaskade protease sistein apoptosis yang dikenal sebagai *Caspases*, yang mewakili sekelompok enzim yang bertanggung jawab untuk inisiasi dan eksekusi apoptosis. Sinyal kematian dari reseptor TNF- α adalah

ditransduksi ke protein adaptor TRADD, yang menggunakan protein adaptor berikutnya FADD dan mengatur DISC untuk mengaktifkan *Caspase-8* hingga *Caspase-3* yang berujung pada apoptosis sel^{55,118,143}. Penurunan ekspresi TNF- α berkorelasi terhadap pemutusan sinyal produksi enzim apoptosis, termasuk *Caspase-3*^{55,143}.

Sejalan dengan hal tersebut, penelitian ini menemukan adanya perbedaan ekspresi *Caspase-3* secara signifikan pada kelompok P2 dibanding kontrol ($p < 0,05$). Hasil tersebut diduga disebabkan karena penurunan ekspresi TNF- α pada kelompok P2. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menjelaskan bahwa penurunan ekspresi *Caspase-3* dan TNF- α pada jaringan kulit akibat pemberian gel ekstrak bunga telang pada tikus yang terpapar UVB berimplikasi terhadap penghentian kematian sel-sel kulit, termasuk sel fibroblast^{134,157,158}. Sel fibroblast penting bagi kulit untuk memproduksi kolagen dan mempertahankan kekencangan kulit. Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian ekstrak bunga telang dapat mempertahankan kekencangan kulit yang terpapar UVB melalui penghambatan ekspresi TNF- α dan ekspresi *Caspase-3*, namun demikian penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan karena tidak dilakukan pengukuran kadar ROS, tidak terdapat pengujian kadar kolagen untuk memvalidasi tingkat densitas kolagen pada kulit, serta tidak diukur ekspresi Nf-KB pada jaringan kulit tikus yang terpapar UVB setelah dilakukan pemberian gel ekstrak bunga telang.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan :

1. Pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 10% berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan ekspresi $TNF-\alpha$ pada kulit tikus galur Wistar yang diinduksi paparan sinar UVB.
2. Pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 10% berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan ekspresi *Caspase-3* pada kulit tikus galur Wistar yang diinduksi paparan sinar UVB.

6.2 Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel ekstrak bunga telang pada tikus galur Wistar yang dipapar UVB.
2. Perlu pengukuran terhadap kadar kolagen pada kulit yang terpapar UVB setelah dilakukan pemberian gel ekstrak bunga telang.
3. Perlu pengukuran ekspresi Nf-KB pada jaringan kulit tikus yang terpapar UVB setelah dilakukan pemberian gel ekstrak bunga telang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Research and Therapy*. 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-020-01994-z
2. Xu H, Yan Y, Li L, et al. *Ultraviolet B-Induced Apoptosis of Human Skin Fibroblasts Involves Activation of Caspase-8 and-3 with Increased Expression of Vimentin Conflicts of Interest.*; 2010.
3. Sharma MR, Mitrani R, Werth VP. Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;213. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112072
4. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *International Journal of Dermatology and Venereology*. Published online 2021;37-42. doi:10.1097/JD9.0000000000000068
5. Han A, Chien AL, Kang S. Photoaging. *Dermatologic Clinics*. 2014;32(3):291-299. doi:10.1016/j.det.2014.03.015
6. Feng XX, Yu XT, Li WJ, et al. Effects of topical application of patchouli alcohol on the UV-induced skin photoaging in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;63:113-123. doi:10.1016/j.ejps.2014.07.001
7. Kunchana K, Jarisarapurin W, Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK. Potential use of amla (*Phyllanthus emblica* L.) fruit extract to protect skin keratinocytes from inflammation and apoptosis after uvb irradiation. *Antioxidants*. 2021;10(5). doi:10.3390/antiox10050703
8. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*. 2015;21:16-29. doi:10.1016/j.arr.2015.01.001
9. Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00365
10. Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. Cell death in the skin. *Apoptosis*. 2009;14(4):549-569. doi:10.1007/s10495-009-0324-z

11. Wölflé U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(9):1081-1093. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.027
12. Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Research Reviews*. 2014;13(1):65-74. doi:10.1016/j.arr.2013.12.001
13. Ahmad Z. *Penuaan Kulit: Patofisiologi Dan Manifestasi Klinis (Skin Aging: Pathophysiology and Clinical Manifestation)*.
14. Green AC. *Premature Ageing of the Skin in a Queensland Population.*; 1991. doi:10.5694/j.1326-5377.1991.tb93845.x
15. Manríquez JJ, Cataldo K, Vera-Kellet C, Harz-Fresno I. *Wrinkles.*; 2014. www.clinicalevidence.com
16. Kim GH, Cheong KA, Lee AY. Increased skin irritation by hydroquinone and retinoic acid used in combination. *Annals of Dermatology*. 2017;29(6):715-721. doi:10.5021/ad.2017.29.6.715
17. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 2015;31(2):65-74. doi:10.1111/phpp.12145
18. Chowdhury WK, Wahab MA, Khondker L, Anwar MH, Khan MSI. Efficacy and safety of hydroquinone, kojic acid and glycolic acid combination in the treatment of melasma. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2012;11(3):191-196. doi:10.3329/bjms.v11i3.11720
19. Chang NF, Chen YS, Lin YJ, et al. Study of hydroquinone mediated cytotoxicity and hypopigmentation effects from UVB-irradiated arbutin and deoxyarbutin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(5). doi:10.3390/IJMS18050969
20. Couteau C, Coiffard L. Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products. *Cosmetics*. 2016;3(3). doi:10.3390/cosmetics3030027
21. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with

- phytochemicals. *Antioxidants*. 2015;4(2):248-268. doi:10.3390/antiox4020248
22. Oguis GK, Gilding EK, Jackson MA, Craik DJ. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide-bearing plant with applications in agriculture and medicine. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10. doi:10.3389/fpls.2019.00645
 23. Kumar RT, Kumar SR, Rajesh Kumar CT. Phytochemical and antibacterial activities of crude leaf and root extracts of *Clitoria ternatea* varieties (Fabaceae). ~ 1104 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017;6(6).
 24. Syafa'Atullah AQ, Amira A, Hidayati S, Mahfud M. Anthocyanin from butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea*) by ultrasonic-assisted extraction. In: *AIP Conference Proceedings*. Vol 2237. American Institute of Physics Inc.; 2020. doi:10.1063/5.0005289
 25. Xiang Y, Lai F, He G, et al. Alleviation of Rosup-induced oxidative stress in porcine granulosa cells by anthocyanins from red-fleshed apples. *PLoS ONE*. 2017;12(8). doi:10.1371/journal.pone.0184033
 26. Jayanti M, Ulfa AM, Saputra Yasir A. The Formulation and Physical Evaluation Tests of Ethanol in Telang Flower (*Clitoria ternatea* L.) Extract Losio Form as Antioxidant. *Biomedical Journal of Indonesia*. 2021;7(3):488-495. doi:10.32539/BJI.v7i3.543
 27. Nevriansyah E, Retno D, Faradina R, Dani A. Computational Study of Telang Flower Extract (*Clitoria ternatea*) As an Anti-inflammantory Drug. 2022;1:8-17. doi:10.54482/ELECTROLYTE/DOI
 28. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(28):6355-6365. doi:10.1021/acs.jafc.5b00928
 29. Saritani ATB, Wiraguna AAGP, Maker LPII. *Clitoria ternatea* L. extract cream 5% inhibited the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in wistar rats (*Rattus norvegicus*) dermic skin exposed to ultraviolet B. *Neurologico Spinale Medico Chirurgico*. 2021;4(3). doi:10.36444/NSMC.V4I3.183

30. Xiang Y, Lai F, He G, et al. Alleviation of Rosup-induced oxidative stress in porcine granulosa cells by anthocyanins from red-fleshed apples. *PLoS ONE*. Published online 2017. doi:10.1371/journal.pone.0184033
31. Suherlan S, Fakihi TM, Effendi DH. Uji In-Silico Aktivitas Melanogenesis Senyawa Ternatin Bunga Kembang Telang (*Clitoria ternatea*) terhadap Reseptor Tirosinase. 2021;7(2):849-856. doi:10.29313/v0i0.31566
32. Ritonga NB, Rini R, Anggraini T. Formulation and Evaluation of Sun Block Lotion Made from Virgin Coconut Oil (VCO) with the addition of the Extract of Telang Flower (*Clitoria ternatea*, L) and Pandan Leaves (*Pandanus paradisiaca*, L). *AJARCDE | Asian Journal of Applied Research for Community Development and Empowerment* . 2020;4(1):54-59. doi:10.29165/ajarcde.v4i1.39
33. Puspitasari D, Pratimasari D, Andriani D. PENENTUAN NILAI SPF (SUN PROTECTION FACTOR) KRIM EKSTRAK ETANOL BUNGA TELANG (*CLITORIA TERNATEA*) SECARA IN VITRO MENGGUNAKAN METODE SPEKTROFOTOMETRI. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 2019;2(1):118-125.
34. Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH. Application of butterfly pea flower extract in mask development. *Scientia Pharmaceutica*. 2018;86(4). doi:10.3390/scipharm86040053
35. 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. *Phytotherapy Research*. 2018;32(6):1064-1072. doi:10.1002/ptr.6045
36. Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Tumor Necrosis Factor. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Published online February 27, 2013:229-231. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01594-1
37. Gough P, Myles IA. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.585880
38. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):1-16. doi:10.3390/ijms22052719

39. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7(May). doi:10.3389/fcell.2019.00091
40. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Elsevier Saunders; 2015.
41. Kankaanranta H, Ilmarinen P, Zhang X, et al. Tumour necrosis factor- α regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF- κ B and AP-1. *PLoS ONE*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0090298
42. Kim YS, Ahn Y, Moon $\dagger$, et al. *Curcumin Attenuates Inflammatory Responses of TNF- α -Stimulated Human Endothelial Cells*.
43. Husada J. The Role of Apoptosis in Brain Injury. *Malang Neurological Journal*. Published online October 2004.
44. Kalimuthu S, Se-Kwon K. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: Marine bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):2334-2354. doi:10.3390/ijms14022334
45. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(3):231-241. doi:10.1038/nrm2312
46. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(6). doi:10.1101/cshperspect.a008672
47. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. *MAMMALIAN CASPASES: STRUCTURE, ACTIVATION, SUBSTRATES, AND FUNCTIONS DURING APOPTOSIS*.; 1999. www.annualreviews.org
48. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. *A Unified Model for Apical Caspase Activation the Cellular Effects That Distinguish Apoptosis from Other Forms of Cell Death (Reviewed in Earnshaw et Al. Vol 11. Thornberry and Lazebnik; 2003*.
49. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(5):405-413. doi:10.1038/nrm2153

50. van Damme P, Martens L, van Damme J, et al. Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nature Methods*. 2005;2(10):771-777. doi:10.1038/nmeth792
51. Sengupta R, Ryter SW, Zuckerbraun BS, Tzeng E, Billiar TR, Stoyanovsky DA. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry*. 2007;46(28):8472-8483. doi:10.1021/bi700449x
52. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*. 2015;22(4):526-539. doi:10.1038/cdd.2014.216
53. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
54. Boland K, Flanagan L, Prehn JHM. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death and Disease*. 2013;4(7). doi:10.1038/cddis.2013.250
55. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, et al. A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(17). doi:10.3390/ijms20174133
56. Wei Y, Cao Y, Sun R, et al. Targeting Bcl-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.584974
57. Aouacheria A, le Goff E, Godefroy N, Baghdiguian S. Evolution of the BCL-2-regulated apoptotic pathway. In: *Evolutionary Biology: Convergent Evolution, Evolution of Complex Traits, Concepts and Methods*. Springer International Publishing; 2016:137-156. doi:10.1007/978-3-319-41324-2_9
58. Wei MC, Zong WX, Cheng EHY, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (1979)*. 2001;292(5517):727-730. doi:10.1126/science.1059108
59. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. *Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane*. Vol 20.; 2000. <http://mcb.asm.org/>
60. Dorstyn L, Read S, Cakouros D, Huh JR, Hay BA, Kumar S. The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *Journal of Cell Biology*. 2002;156(6):1089-1098. doi:10.1083/jcb.200111107

61. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Ladron R, Guevara D, Cepero E, Boise LH. *Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 Have Distinct Roles during Intrinsic Apoptosis.*; 2013. <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/14/32>
62. Dobson CC, Langlois S, Grynspan D, Cowan KN, Holcika M. Engaging cell death pathways for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Critical Reviews in Oncogenesis.* 2016;21(3-4):221-239. doi:10.1615/CritRevOncog.2016016996
63. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. *Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization.* Vol 1.; 1998.
64. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. *Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade.* Vol 91.; 1997.
65. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2013;5(4):1-28. doi:10.1101/cshperspect.a008656
66. Zhuang J, Xie L, Zheng L. A Glimpse of Programmed Cell Death Among Bacteria, Animals, and Plants. Published online 2022. doi:10.3389/fcell.2021.790117
67. Chen D, Texada DE, Duggan C, Deng Y, Redens TB, Langford MP. Caspase-3 and -7 mediate apoptosis of human Chang's conjunctival cells induced by enterovirus 70. *Virology.* 2006;347(2):307-322. doi:10.1016/j.virol.2005.12.005
68. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2011;1813(4):558-563. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.026
69. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene.* 2008;27:S93-S104. doi:10.1038/onc.2009.47
70. Zussiva A, Laurent B, Budiayati C. *EKSTRAKSI DAN ANALISIS ZAT WARNA BIRU (Anthosianin) DARI BUNGA TELANG (Clitoria Ternatea) SEBAGAI PEWARNA ALAMI.*; 2012. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jtki>

71. Gomez SM, Kalamani A. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*): A Nutritive Multipurpose Forage Legume for the Tropics-An Overview. *Pakistan Journal of Nutrition*. Published online 2003.
72. Quazi S, Yogekar T. A Review on Ethanopharmacological Importance of *Clitoria Ternatea*. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2020;08(03):63-67. doi:10.36347/sajb.2020.v08i03.002
73. Thell K, Hellinger R, Sahin E, et al. Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 2016. doi:10.1073/pnas.1519960113
74. Gründemann C, Thell K, Lengen K, et al. Cyclotides Suppress Human T-Lymphocyte Proliferation by an Interleukin 2-Dependent Mechanism. *PLoS ONE*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0068016
75. Taur DJ, Patil RY. Evaluation of antiasthmatic activity of *Clitoria ternatea* L. roots. *Journal of Ethnopharmacology*. Published online 2011. doi:10.1016/j.jep.2011.04.064
76. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*. Published online 2018. doi:10.3390/nu10040495
77. Persinal-medina M, Llames S, Chacón M, et al. Polymerizable Skin Hydrogel for Full Thickness Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9). doi:10.3390/IJMS23094837
78. Robinson JK. *Anatomy for Procedural Dermatology*. Dalam: Robinson JK, Hanke CW, Siegel DM, Fratila A, Editor. *Surgery of the Skin: Procedural Dermatology*. . Edinburg: Elsevier; 2010.
79. Murphrey MB MJZP. Histology, Stratum Corneum. *PubMed, StatPearls Publishing; Treasure Island (FL)*. Published online November 20, 2021.
80. Yousef H; Alhajj M; Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. Published online November 19, 2021.
81. Kalangi Bagaian SJR, Fakultas AH, Universitas K, Manado SR. *HISTOFISIOLOGI KULIT*.; 2013.

82. Adigbli G, Alshomer F, Maksimcuka J, Ghali S. *Principles of Plastic Surgery, Wound Healing, Skin Grafts and Flaps. Dalam: Kalaskar DM, Butler PE, Ghali S, Editor. Textbook of Plastic and Reconstructive Surgery.* UCL Press; 2016.
83. Yan J, Ma LP, Liu F, et al. Effect of Ultraviolet B Irradiation on Melanin Content Accompanied by the Activation of p62/GATA4-Mediated Premature Senescence in HaCaT Cells. *Dose-Response.* 2022;20(1). doi:10.1177/15593258221075321
84. Sachs DL, Varani J, Chubb H, et al. Atrophic and hypertrophic photoaging: Clinical, histologic, and molecular features of 2 distinct phenotypes of photoaged skin. *J Am Acad Dermatol.* 2019;81(2):480-488. doi:10.1016/j.jaad.2019.03.081
85. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatology.* 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/930164
86. Ward WH, Farma JM. *CUTANEOUS MELANOMA Etiology and Therapy.*; 2017. doi:http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017
87. Fitzpatrick. *The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI.*; 1988. doi:10.1001/archderm.1988.01670060015008
88. Ahmad Z, Damayanti. *Penuaan Kulit: Patofisiologi Dan Manifestasi Klinis (Skin Aging: Pathophysiology and Clinical Manifestation).*; 2018.
89. Hoenig LJ. *Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases.* Vol 15. 3rd ed. Skinmed; 2017.
90. Antonio JDS, Jacenko O, Fertala A, Orgel JPRO. Collagen structure-function mapping informs applications for regenerative medicine. *Bioengineering.* 2021;8(1):1-23. doi:10.3390/bioengineering8010003
91. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials.* 2019;31(1). doi:10.1002/adma.201801651
92. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092126

93. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78:929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
94. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatology*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/930164
95. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(18):6098-6107. doi:10.1128/AEM.00883-15
96. Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Laboratory Animal Research*. 2011;27(1):1. doi:10.5625/lar.2011.27.1.1
97. Carletti G, Nervo G, Cattivelli L. Flavonoids and melanins: A common strategy across two kingdoms. *International Journal of Biological Sciences*. 2014;10(10):1159-1170. doi:10.7150/ijbs.9672
98. Yardman-Frank JM, Fisher DE. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Experimental Dermatology*. 2021;30(4):560-571. doi:10.1111/exd.14260
99. Saewan N, Jimtaisong A. Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(9):129-141. doi:10.7324/JAPS.2013.3923
100. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Kader AA. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(17):4976-4982. doi:10.1021/jf020136b
101. Kim E, Hwang K, Lee J, et al. Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate. *International Journal of Molecular Sciences Article*. 2018;19:173. doi:10.3390/ijms19010173
102. Yanhendri., Yenny SW. *Berbagai Bentuk Sediaan Topikal Dermatologi*.; 2012.
103. Nuryati. *Farmakologi*. Vol 1.; 2017.

104. Schaefer H, Redelmeier TE, Nohynek GJ, Lademann J. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.*; 2008.
105. de Souza A, Strober BE, Bruce S, Strober E. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.*; 2008.
106. Katzung Bertram G. *Farmakologi Dasar & Klinik*. 10th ed. EGC; 2010.
107. Asmara A, Daili SF, Noegrohowati T, et al. *VEHIKULUM DALAM DERMATOTERAPI TOPIKAL.*; 2013. Accessed March 13, 2022. <https://adoc.pub/download/vehikulum-dalam-dermatoterapi-topikal.html>
108. Patil PB, Datir SK, Saudagar RB. A Review on Topical Gels as Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019;9(s). doi:10.22270/jddt.v9i3-s.2930
109. Kaur LP, Guleri TK. Topical Gel: A Recent Approach for Novel Drug delivery. 2013;3(17):1-5. <http://www.jbiopharm.com>
110. Ahmed MM. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Quality Assurance Topical Gel Formulation : A Review*. Vol 2.; 2016.
111. Allen L.V. PNG and AHC. *Bentuk Sediaan Farmasetis & Sistem Penghantaran Obat* . 9th ed. EGC; 2014.
112. Suganya G. *In Vitro Antidiabetic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Clitoria Ternatea L.*; 2014.
113. Al-Snafi AE. *Pharmacological Importance of Clitoria Ternatea-A Review*. Vol 6.; 2016. www.iosrphr.org
114. Rahman S, Mathew S, Nair P, Ramadan WS, Vazhappilly CG. Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. *Inflammopharmacology*. 2021;29(4):907-923. doi:10.1007/s10787-021-00799-7
115. Na EJ, Ryu JY. Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomedical Dermatology*. 2018;2(1). doi:10.1186/s41702-018-0024-9
116. Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. Title: The ultraviolet B inflammation model: postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. Running

- head: Risk and benefits of the UVB inflammation model. Published online 2018. doi:10.1002/ejp.01353
117. Anwar A, Anwar H, Yamauchi T, et al. Bucillamine Inhibits UVB-Induced MAPK Activation and Apoptosis in Human HaCaT Keratinocytes and SKH-1 Hairless Mouse Skin. *Photochemistry and Photobiology*. 2020;96(4):870-876. doi:10.1111/php.13228
 118. Mandal R, Barrón JC, Kostova I, Becker S, Strebhardt K. Caspase-8: The double-edged sword. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2020;1873(2). doi:10.1016/j.bbcan.2020.188357
 119. Marpaung AM. Tinjauan manfaat bunga telang (*clitoria ternatea* l.) bagi kesehatan manusia. *Journal of Functional Food and Nutraceutical*. 2020;1(2):63-85. doi:10.33555/jffn.v1i2.30
 120. Layal K. *Peran Nrf2 Dalam Patogenesis Stres Oksidatif Dan Inflamasi Pada Penyakit Ginjal Kronik*. Vol 7.; 2016.
 121. Ayala M, Strid H, Jacobsson U, Söderberg PG. p53 expression and apoptosis in the lens after ultraviolet radiation exposure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2007;48(9):4187-4191. doi:10.1167/iovs.06-0660
 122. Syahdrajat T. *Panduan Menulis Tugas Akhir Kedokteran Dan Kesehatan*. 1st ed. Jakarta: Prenadamedia Group; 2015.
 123. Cahyaningsih E, Era Sandhi PK, Santoso P. *SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BUNGA TELANG (Clitoria Ternatea L.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS (PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TELANG FLOWER EXTRACT (Clitoria Ternatea L.) USING UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY)*. Vol 5.; 2019.
 124. Ramdani R, Abriyani E, Frianto D, Farmasi Universitas Buana Perjuangan F. *SKRINING FITOKIMIA DAN UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN BUNGA TELANG (Clitoria Ternatea L.) TERHADAP BAKTERI Staphylococcus Aureus*.
 125. Makasana J, Dholakiya BZ, Gajbhiye NA, Raju S. Extractive determination of bioactive flavonoids from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Linn.). *Research on Chemical Intermediates*. 2017;43(2):783-799. doi:10.1007/s11164-016-2664-y

126. Magharaniq Safira Purwanto U, Aprilia K. Antioxidant Activity of Telang (*Clitoria ternatea* L.) Extract in Inhibiting Lipid Peroxidation. *Curr. Biochem.* 2022;9(1):26-37.
127. Jaafar NF, Ramli ME, Salleh RM. Optimum extraction condition of clitoria ternatea flower on antioxidant activities, total phenolic, total flavonoid and total anthocyanin contents. *Tropical Life Sciences Research.* 2020;31(2):1-17. doi:10.21315/tlsr2020.31.2.1
128. Fitria L. Profil Hematologi Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Jantan dan Betina Umur 4, 6, dan 8 Minggu. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi.* 2014;2(2):94-100. doi:10.24252/bio.v2i2.473
129. Weber B, Lackner I, Haffner-Luntzer M, et al. Modeling trauma in rats: Similarities to humans and potential pitfalls to consider. *Journal of Translational Medicine.* 2019;17(1). doi:10.1186/s12967-019-2052-7
130. Sahoo S, Bhagat A, Chakraborty S, Dixit S. Sangita Dixit Siksha O Anusandhan University STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY, PHYTOCHEMICAL SCREENING TESTS, BIOCHEMICAL EVALUATION OF CLITOREA TERNATEA LINN. PLANT EXTRACTS. *PLANT EXTRACTS Article in International Journal of Research-GRANTHAALAYAH.* 2017;5(10):197-208. doi:10.5281/zenodo.1040675
131. Juniarti dan. *ANALISIS SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK METANOL DAUN SURIAN YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIOKSIDAN.* Vol 15.; 2011.
132. Ghaisani Yumni G, Nuraini I, Jauharoh Nafis I, Sarjana Farmasi J, Farmasi F, Wahid Hasyim Jl Menoreh Tengah UX. PROFIL ANTIOKSIDAN DAN KADAR FLAVONOID TOTAL FRAKSI AIR DAN ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L.).
133. Adebisi OE, Olayemi FO, Ning-Hua T, Guang-Zhi Z. In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences.* 2017;6(1):10-14. doi:10.1016/j.bjbas.2016.12.003
134. Gary AS, Rochette PJ. Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation. *Scientific Reports.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-75873-1

135. Buglewicz DJ, Mussallem JT, Haskins AH, Su C, Maeda J, Kato TA. Cytotoxicity and mutagenicity of narrowband UVB to mammalian cells. *Genes (Basel)*. 2020;11(6):1-16. doi:10.3390/genes11060646
136. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/8416763
137. Kim DJ, Iwasaki A, Chien AL, Kang S. UVB-mediated DNA damage induces matrix metalloproteinases to promote photoaging in an AhR- and SP1-dependent manner. *JCI Insight*. 2022;7(9). doi:10.1172/jci.insight.156344
138. Tanaka Y, Uchi H, Furue M. Antioxidant cinnamaldehyde attenuates UVB-induced photoaging. *Journal of Dermatological Science*. 2019;96(3):151-158. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.11.001
139. Her Y, Shin BN, Lee YL, et al. Oenanthe javanica extract protects mouse skin from UVB radiation via attenuating collagen disruption and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(6). doi:10.3390/ijms20061435
140. Her Y, Lee TK, Kim JD, et al. Topical application of aronia melanocarpa extract rich in chlorogenic acid and rutin reduces UVB-induced skin damage via attenuating collagen disruption in mice. *Molecules*. 2020;25(19). doi:10.3390/molecules25194577
141. Wu CL, Qiang L, Han W, Ming M, Viollet B, He YY. Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control. *Oncogene*. 2013;32(21):2682-2689. doi:10.1038/onc.2012.279
142. Luangpraditkun K, Charoensit P, Grandmottet F, Viennet C, Viyoch J. Photoprotective Potential of the Natural Artocarpin against In Vitro UVB-Induced Apoptosis. Published online 2020. doi:10.1155/2020/1042451
143. Wang N, Lv J, Zhang W, Lu H. *Crucial Role of TNF- α in UVB-Induced Apoptosis in the Immortalized Keratinocytes*. Vol 2.; 2014.
144. Vera M, Torramade-Moix S, Martin-Rodriguez S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;51(3):1287-1300. doi:10.1159/000495540

145. Nisr RB, Shah DS, Ganley IG, Hundal HS. Proinflammatory NF κ B signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(24):4887-4904. doi:10.1007/s00018-019-03148-8
146. Wang WM, Xu XS, Miao CM. Kupffer Cell-Derived TNF- α Triggers the Apoptosis of Hepatic Stellate Cells through TNF-R1/Caspase 8 due to ER Stress. *BioMed Research International*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/8035671
147. Shirazi M, Eslahi A, Sharifi V, Rahimi F, Safarpour A. Evaluation of caspase 3 enzyme and TNF-alpha as biomarkers in ureteropelvic junction obstruction in children- a preliminary report. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2017;33(2):315-319. doi:10.12669/pjms.332.11934
148. Thuy NM, Minh VQ, Ben TC, Nguyen MTT, Ha HTN, van Tai N. Identification of anthocyanin compounds in butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea* L.) by ultra performance liquid chromatography/ultraviolet coupled to mass spectrometry. *Molecules*. 2021;26(15). doi:10.3390/molecules26154539
149. Aditiyarini D, Iswuryani EO. Effect of various factors on anthocyanins extraction from butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* l.). *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2021;20(1). doi:10.36547/nbc.817
150. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF- α production in the skin. *Archives of Dermatological Research*. 2009;301(1):87-91. doi:10.1007/s00403-008-0893-7
151. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
152. Zhao HC, Xiao T, Chen YJ. Ultraviolet Induced Skin Inflammation. *International Journal of Dermatology and Venereology*. 2021;4(4):229-235. doi:10.1097/jd9.0000000000000144
153. Biswas R, Bagchi A. NF κ B pathway and inhibition: an overview. *Computational Molecular Biology*. Published online 2016. doi:10.5376/cmb.2016.06.0001
154. Zhao HC, Xiao T, Chen YJ. Ultraviolet Induced Skin Inflammation. *International Journal of Dermatology and Venereology*. 2021;4(4):229-235. doi:10.1097/jd9.0000000000000144

155. Lewis DA, Spandau DF. UVB activation of NF- κ B in normal human keratinocytes occurs via a unique mechanism. *Archives of Dermatological Research*. 2007;299(2):93-101. doi:10.1007/s00403-006-0729-2
156. Maneesai P, Iampanichakul M, Chaihongsa N, et al. Butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* linn.) extract ameliorates cardiovascular dysfunction and oxidative stress in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Antioxidants*. 2021;10(4). doi:10.3390/antiox10040523
157. Peloi KE, Contreras Lancheros CA, Nakamura C v., et al. Antioxidative photochemoprotector effects of cerium oxide nanoparticles on UVB irradiated fibroblast cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;191. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111013
158. Ha JH, Rang Kim A, Lee KS, et al. Anti-Aging activity of *lavandula angustifolia* extract fermented with *pediococcus pentosaceus* DK1 isolated from *diospyros kaki* fruit in UVB-irradiated human skin fibroblasts and analysis of principal components. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;29(1):21-29. doi:10.4014/jmb.1809.09037