

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA
TELANG TERHADAP EKSPRESI GEN GP α
DAN GEN PDGF**

(Studi eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Dipapar Sinar UV-B)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

Rizka Sofyanti Putri

MBK. 2016010214

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

2022

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA TELANG TERHADAP
EKSPRESI GEN GPX DAN GEN PDGF
(Studi eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Dipapar Sinar UV-B)**

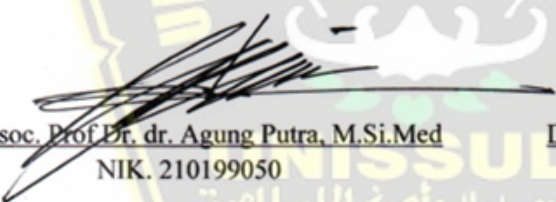
Disusun oleh
Rizka Sofyanti Putri
MBK. 2016010214


Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
Pada tanggal 30 Agustus 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I,


Pembimbing II,


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


Dr. dr. Chodidjah, M.Kes
NIK. 220186023

Mengetahui,

Ketua Proqram Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


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

PERNYATAAN

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

Semarang, 30 Agustus 2022



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Rizka Sofyanti Putri
Tempat / tanggal lahir : Jakarta, 07 Oktober 1982
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK : 1986 - 1988
2. SD : 1988 - 1994
3. SMPN : 1994 - 1997
4. SMAN : 1997 - 2000
5. S1 Fakultas Kedokteran : 2000 - 2004
6. Profesi Dokter : 2000 - 2004
7. S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang : (2020-sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Drs. Sofyan, M.Si
Ibu : Elly Arfiati
2. Nama Anak : M. Athalla Arif Yusuf

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis yang berjudul, **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen GPx dan PDGF (Studi eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Model Dipapar Sinar UV-B)”** ini dapat terselesaikan.

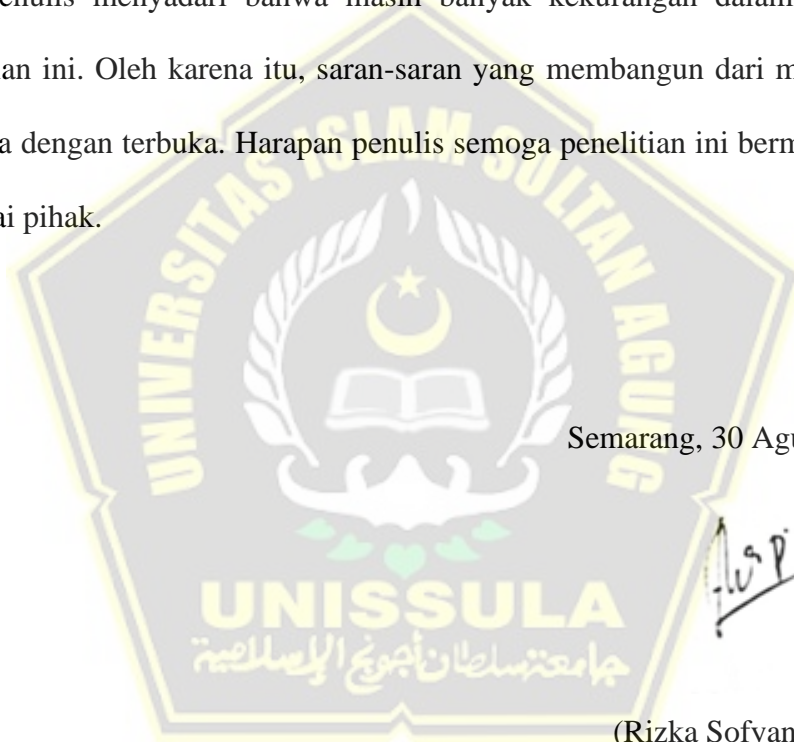
Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., 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. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
4. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Dewi Masyitah Darlan, Sp.ParK; Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF; Dr. dr. Siti Thomas Z, SKM, M.Kes selaku dosen penguji I, II, dan III yang

telah memberi masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini menjadi lebih baik.

6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. 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, 30 Agustus 2022

Rizka Sofyanti Putri
(Rizka Sofyanti Putri)

ABSTRAK

Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen GPx dan PDGF

Latar belakang: Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab penurunan kolagen melalui peningkatan kadar stress oksidatif dan penurunan ekspresi *growth factor*. Ekstrak bunga telang (*Clitorea ternatea*) mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan. Namun, peran ekstrak bunga telang terhadap ekspresi gen GPx dan PDGF pada pembentukan kolagen hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bunga telang dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi GPx dan PDGF pada kulit tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan sinar UVB.

Metode: Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *post test control group design*. Penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok sehat, kelompok kontrol UVB, kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang 5% (P1) dan kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang 10% (P2). Setiap kelompok diberi perlakuan UVB dengan 302 nm dengan MED 160 mJ/cm² selama 5 hari, sedangkan kelompok sehat tidak menerima paparan UVB. Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 di berikan gel ekstrak bunga telang pada hari ke-6 sampai hari ke-14. Pada hari ke 14 semua kelompok perlakuan diterminasi dan dianalisis ekspresi gen GPx dan PDGF menggunakan qRT-PCR. Data dianalisis dengan metode parametrik *one way ANOVA* dengan nilai signifikansi $p < 0.05$.

Hasil: Pada kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang 10% didapatkan peningkatan ekspresi gen GPx (9.51 ± 1.83) dan PDGF (4.36 ± 1.18) dibandingkan dengan kelompok kontrol UVB memiliki ekspresi gen GPx (4.90 ± 1.64) dan ekspresi gen PDGF (0.032 ± 0.01).

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak bunga telang berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan ekspresi gen GPx dan PDGF.

Kata Kunci: Ekstrak bunga telang, GPx, PDGF, *collagen loss*

ABSTRACT

The effect of Buterlly Pea (*Clitorea ternatea*) Extract on GPx and PDGF Gene Expression

Background: UVB radiation is the main factor causing collagen loss through increased levels of oxidative stress and decreased expression of growth factors. Butterfly pea flower extract (*Clitorea ternatea*) contains various secondary metabolites that have antioxidant activity. However, the role of butterfly pea flower extract on the expression of GPx and PDGF genes in collagen formation is still unclear. This study aims to determine the effect of butterfly pea flower extract in the form of a gel preparation on the expression of GPx and PDGF in the skin of rat models of collagen loss due to exposure to UVB rays.

Methods: The design of this research is experimental research with post test control group design. This study was divided into four treatment groups consisting of a healthy group, a UVB control group, a treatment group with gel of butterfly pea flower extract 5% (P1) and gel of butterfly pea flower extract 10% (P2). Each group was treated with UVB at 302 nm with a MED of 160 mJ/cm² for 5 days, whereas the healthy group did not receive UVB exposure. In the treatment groups P1 and P2 were given gel flower extract of telang flower on the 6th day to the 14th day. On day 14 all treatment groups were discontinued and GPx and PDGF gene expression were analyzed using qRT-PCR. Data were analyzed using one way ANOVA parametric method with a significance value of $p < 0.05$.

Results: In the group of gel of butterfly pea flower extract 10%, there was an increase in GPx gene expression (9.51 ± 1.83) and PDGF (4.36 ± 1.18) compared to the UVB control group which had GPx gene expression (4.90 ± 1.64) and PDGF gene expression (0.032 ± 0.01).

Conclusion: The administration of gel of butterfly pea flower extract had a significant effect on increasing the expression of GPx and PDGF genes.

Keywords: Butterfly pea flower extract, GPx, PDGF, collagen loss

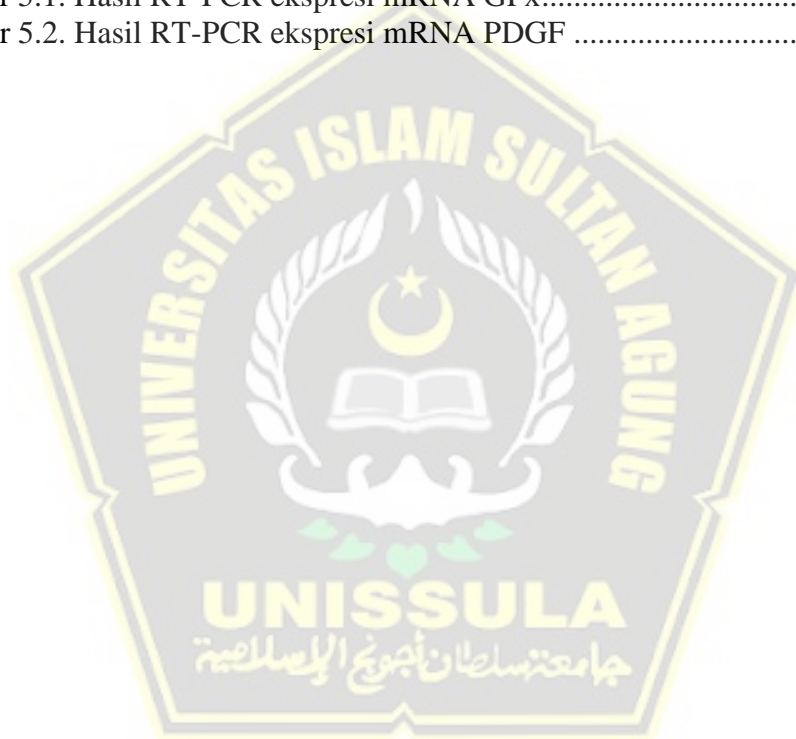
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Originalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat penelitian	7
1.5.1. Manfaat Teoritis	7
1.5.2. Manfaat Praktis	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Platelet Derived Growth Factor.....	8
2.2. Glutathione Peroksidase x	10
2.3. Ekstrak Bunga Telang	13
2.3.1. Definisi Bunga Telang	13
2.3.2. Manfaat Bunga Telang dalam Menekan Inflamasi	15
2.4. Kolagen	16
2.4.1. Definisi	16
2.4.2. Perubahan Pada Kolagen	19
2.4.3. Mekanisme Kerusakan Kolagen	20
2.4.4. Sintesis Kolagen.....	21
2.4.5. Sintesis Pro Kolagen	21
2.5. Sediaan Gel	24
2.6. Farmakokinetik Obat Topikal	28
2.6.1. Jalur Penetrasi Sediaan Topikal	28
2.6.2. Absorpsi Sediaan Topikal Secara Umum	29
2.7. Efek Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen GPx dan PDGF.....	30
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	31
3.1. Kerangka Teori.....	31
3.2. Kerangka Konsep	32

3.3.	Hipotesis	33
BAB IV METODE PENELITIAN		34
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	34
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	35
4.2.1.	Variabel Penelitian	35
4.2.2.	Definisi Operasional	35
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	36
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	36
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	36
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	37
4.3.4.	Besar Sampel.....	37
4.4.	Alat dan Bahan	37
4.4.1.	Alat.....	37
4.4.2.	Bahan.....	38
4.5.	Cara Penelitian	38
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	38
4.5.2.	Cara Pembuatan Ekstrak Bunga Telang.....	38
4.5.3.	Penetapan Dosis	39
4.5.4.	Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	39
4.5.5.	Pengambilan Sampel Jaringan	40
4.5.6.	Pembuatan Blok Parafin.....	41
4.5.7.	Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen	41
4.5.8.	Analisis Kuantitatif Ekspresi GPx dan PDGF menggunakan RT-PCR.....	42
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	43
4.7.	Analisa Data	44
4.8.	Alur Penelitian.....	45
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		46
5.1.	Hasil Penelitian	46
5.1.1.	Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang pada Ekspresi Gen GPx Tikus Model dipapar sinar UV-B.....	48
5.1.2.	Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang pada Ekspresi Gen PDGF Tikus Model dipapar sinar UV-B	51
5.2.	Pembahasan.....	53
5.3.	Kelemahan Penelitian	57
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		58
6.1.	Kesimpulan	58
6.2.	Saran	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Mekanisme PDGF	9
Gambar 2.2. Mekanisme antioksidan GPx.....	11
Gambar 2.3. Diagram skematis mekanisme stres oksidatif	13
Gambar 2.4. Clitoria Ternatea.....	14
Gambar 2.5. Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua.	17
Gambar 2.6. Sintesis Kolagen.....	23
Gambar 2.7. Procollagen.....	24
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	32
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	32
Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian.....	34
Gambar 4.2. Alur penelitian.....	45
Gambar 5.1. Hasil RT-PCR ekspresi mRNA GPx.....	49
Gambar 5.2. Hasil RT-PCR ekspresi mRNA PDGF	51



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 4.1. Definisi Operasional	35
Tabel 4.2. Komponen PCR Mix GPx.....	43
Tabel 5.1. Data Hasil Penelitian Ekspresi Gen GPx dan PDGF	47
Tabel 5.2. Uji Post Hoc LSD Ekspresi mRNA GPx Kelompok Perlakuan	59
Tabel 5.3. Uji Post Hoc LSD Ekspresi mRNA PDGF Kelompok Perlakuan .	52



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCS	: <i>Mesenchymal stem cell v</i>

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan kronik sinar *Ultraviolet B* (UV-B) menimbulkan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah kolagen di kulit.¹⁻³ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa 82% orang berusia dibawah 30 tahun mengalami penurunan kolagen akibat paparan UV-B yang berakibat munculnya kerutan dan penurunan elastisitas kulit.⁴ Peningkatan kadar NO dan ROS dapat menginduksi pelepasan diacylglycerol (DAG) dan asam arachidonate yang mengaktifkan *protein kinase C-3* (PKC3) sehingga menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dan menghambat pelepasan *growth factor* seperti *platelet derived growth factor* (PDGF).⁵ PDGF meningkatkan sintesis kolagen dengan merangsang *transforming growth factor-β* (TGF-β).^{3,5} Penghambatan sintesis kolagen juga dipengaruhi oleh peningkatan stress oksidatif yang tidak di imbangi dengan peningkatan sistem pertahanan antioksidan seperti *glutathione peroxidase* (GPx).⁶ Saat ini, penggunaan senyawa seperti retinoid telah terbukti meningkatkan produksi kolagen, melalui induksi proliferasi fibroblas.⁷⁻⁹

Penggunaan jangka Panjang senyawa retinoid menimbulkan berbagai efek samping berbahaya seperti ruam, iritasi, kemerahan, hingga kanker kulit. Hal ini menunjukkan bahwa menekan stress oksidatif dengan senyawa antioksidan yang juga dapat meginduksi pelepasan *growth factor* prokolagen

dibutuhkan untuk menghambat efek UV-B terhadap kulit. Bunga Telang (*Clitorea ternatea*) diketahui memiliki kandungan berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, dan tanun yang bersifat antioksidan sehingga mampu mengurangi kadar stress oksidatif.¹⁰⁻¹² Saat ini, pengaruh ekstrak bunga telang terhadap ekspresi PDGF dan GPx pada UV-B yang menginduksi penurunan kolagen masih belum jelas.

Pada tahun 2015, 4.2% dari 142 subjek positif mengalami penurunan kolagen setelah terpapar tiga kali UV-B *minimal erythema dose* (MED).¹³ Kasus wrinkle dan pigmentasi semakin meningkat pada tahun 2020 hingga ~100.350 kasus baru.¹⁴ Pengobatan standar pada penurunan kolagen kulit berfokus pada perlindungan terhadap paparan UV-B serta perbaikan kerusakan jaringan dengan menggunakan bahan kimia seperti 5-fluorouracil dan retinoid¹⁵ yang menimbulkan efek samping hingga menyebabkan kanker. Kultur sel primer yang terpapar UV-B 40-60% nya menunjukkan peningkatan sitokin proinflamasi dan penurunan ekspresi berbagai *growth factor*¹⁶, seperti PDGF, TGF- β , dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF)¹⁷. Penurunan ini menyebabkan pencegahan sintesis kolagen, dan terjadinya proses inflamasi yang berperan pada pigmentasi kulit.^{18,19}

Ekstrak bunga telang diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti antosianin dan quercetin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi yang mampu menghentikan proses inflamasi akibat paparan UV-B. Proses inflamasi yang telah berhasil dihentikan akan memicu transisi menjadi

proses proliferasi sel yang ditandai dengan peningkatan senyawa faktor pertumbuhan, termasuk PDGF.

Adanya potensi ekstrak bunga telang sebagai agen alternatif untuk menginduksi pembentukan kolagen pada kulit akibat paparan sinar UV-B. Maka dalam penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh pemberian ekstrak bunga telang pada konsentrasi 5% dan 10% terhadap ekspresi gen PDGF dan GPx pada kulit tikus model collagen loss yang diinduksi iradiasi UV-B secara *in vivo*. Namun hingga saat ini peran ekstrak Bunga Telang pada penurunan kolagen belum dikaji, sehingga dalam penelitian ini ingin menginvestigasi peran ekstrak Bunga Telang pada penurunan kolagen yang dilihat dari ekspresi gen GPx dan PDGF pada tikus model dipapar sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah "Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen GPx dan PDGF pada tikus model dipapar sinar UVB ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen GPX dan gen PDGF pada tikus model dipapar sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengetahui ekspresi gen GPx pada tikus model dipapar sinar UV-B setelah diberi gel ekstrak Bunga Telang secara topikal dengan dosis 5% dan 10% dibandingkan control secara *in vivo*.
- b. Mengetahui ekspresi gen PDGF pada tikus model dipapar sinar UV-B setelah diberi gel ekstrak Bunga Telang secara topikal dengan dosis 5% dan 10% dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	Saritani et al., 2021 ²⁰	Clitoria ternatea L. extract cream 5% inhibits the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in Wistar rats (Rattus norvegicus) dermic skin exposed to ultraviolet B	<i>In vivo</i> , eksperimental	Cream Bunga Telang	MMP-1 dan Kolagen	Terjadi penurunan MMP-1 dan Peningkatan Kolagen
2	Chen et al., 2018 ²¹	<i>Application of butterfly pea flower extract in mask development</i>	<i>In vitro</i> , eksperimental	Ekstrak Bunga Telang	tingkat pemutihan wajah, aktivitas antiradikal bebas	Bunga telang memiliki aktivitas antiradikal bebas serta mampu

						memutihkan kulit
3	Rahayu S, 2020 ²²	Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (<i>Clitoria Ternatea L.</i>) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap	<i>In vitro</i> , eksperimental	Ekstrak Bunga Telang	Kapasitas antioksidan bunga telang	nilai IC50 ekstrak Bunga Telang sebesar 4,19 ppm dan 3,08 ppm
4	Zakaria et al., 2018 ²³	<i>In vitro protective effects of an aqueous extract of Clitoria ternatea L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes</i>	Studi klinik	Ekstrak Bunga Telang	mtDNA sel keratinosit	Ekstrak Bunga Telang menekan kerusakan
5	Zagórska-Dziok et al., 2021 ²⁴	<i>Cosmetic and dermatological properties of selected ayurvedic plant extracts</i>	<i>In vitro</i> , eksperimental	Ekstrak Bunga Telang	Potensi antiinflamasi dan antiaging	Bunga Telang memiliki potensi antiinflamasi dan antiaging karena mampu

						menghambat enzim kolagenase
--	--	--	--	--	--	-----------------------------

Penelitian terdahulu oleh Saritani *et al.*²⁰ berbeda dengan penelitian ini karena mengemukakan krim ekstrak bunga telang untuk menekan kadar MMP1 dan menurunkan kolagen pada tikus yang terpapar UV-B menggunakan metode ELISA dan pewarnaan Pico Sirius Red. Penelitian Chen *et al.*²⁵ melaporkan bahwa penggunaan ekstrak bunga telang sebagai bahan baku dasar produk perawatan kecantikan alami selain dapat menghambat gatal, kemerahan, alergi dan iritasi kulit, juga memiliki sifat antioksidan dan meningkatkan kelembaban serta efek memutihkan, hasil yang diperoleh makin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Penelitian lainnya oleh Rahayu *et al.*²⁶ menguji tentang aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450nm. Sehingga berdasarkan penelitian terdahulu dapat disimpulkan bahwa belum terdapat kajian yang menginvestigasi pengaruh ekstrak Bunga Telang dengan dosis 5% dan 10% terhadap ekspresi gen GPx dan PDGF pada tikus model diinduksi UV-B sehingga penelitian dengan judul Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen GPx dan PDGF (Studi eksperimental In Vivo pada Tikus Galur Wistar Model Dipapar Sinar UV-B) layak dilakukan.

1.5. Manfaat penelitian

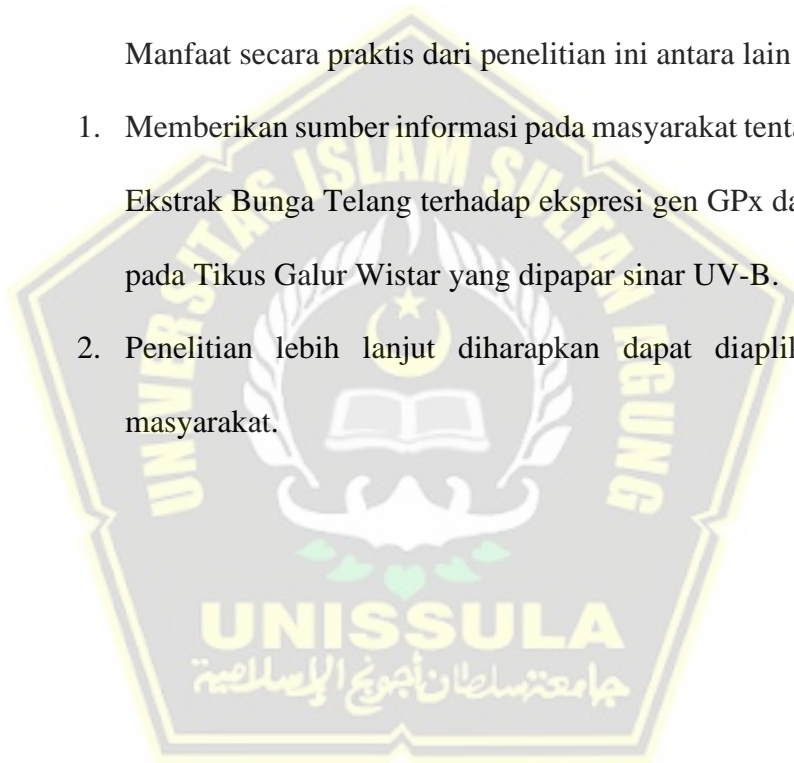
1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen GPx dan gen PDGF pada tikus model penurunan kolagen yang dipapar sinar UV-B.

1.5.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah :

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh Ekstrak Bunga Telang terhadap ekspresi gen GPx dan gen PDGF pada Tikus Galur Wistar yang dipapar sinar UV-B.
2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan bagi masyarakat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

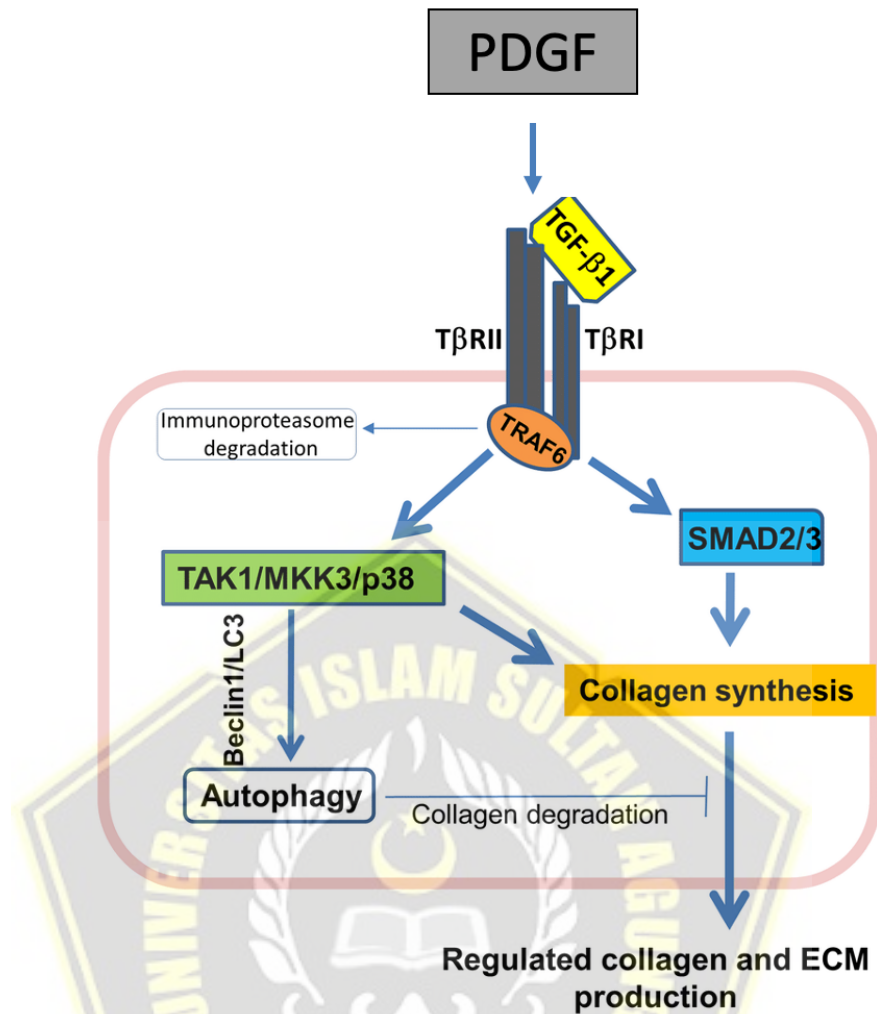
2.1. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

2.1.1. Definisi PDGF

Platelet-derived growth factors (PDGFs) terdiri dari PDGF-A (211 amino acids, 24 kDa), PDGF-B (241 amino acids, 27 kDa), PDGF-C (345 amino acids, 39 kDa), dan PDGF-D (370 amino acids, 43 kDa) yang memiliki kemampuan dalam mengendalikan proliferasi sel fibroblas.²⁷⁻²⁹ Faktor pertumbuhan PDGF mampu merangsang pertumbuhan sel targetnya dan dapat mempengaruhi kemosistesis dan reorganisasi sistem filamen aktin.³⁰ Faktor pertumbuhan PDGF juga dapat mempengaruhi diferensiasi jenis sel tertentu seperti sel fibroblast menjadi myofibroblas yang aktif memproduksi kolagen.³¹⁻³³

2.1.2. Aktivitas PDGF dalam Sintesis Kolagen

PDGF meningkatkan ekspresi kolagen tipe III melalui stimulasi *growth factor transforming growth factor-β* (TGF-β).³⁴ TGF-β1 mengatur sintesis dan akumulasi kolagen untuk mempertahankan produksi dan deposisi *extracellular matrix* (ECM) yang diatur dalam kondisi fisiologis. Kondisi ini melibatkan jalur pensinyalan positif yang memulai sintesis kolagen yang dimediasi oleh protein adaptor sinyal nuklir TRAF6 melalui jalur SMAD2,3 (kanonik) dan TAK1/MKK3/p38 (non-kanonik). Mekanisme degradasi kolagen melalui autophagy terkait dengan TAK1/MKK3/p38. TRAF6 diatur melalui degradasi immunoproteasome.



Gambar 2.1. Mekanisme PDGF menginduksi produksi kolagen melalui jalur TGF-β³⁴

PDGF dan TGF-β memainkan peran penting dalam produksi matriks yang merupakan mediator penting dari efek produksi matriks sel dan kolagen. PDGF-BB merangsang kontraksi kolagen melalui interaksi dengan PDGF-Reseptor (PDGF-R). PDGF-R adalah reseptor tirosin kinase yang terdiri dari isoform reseptor-α dan reseptor-β. Pengikatan PDGF ligan dan PDGF-R mengalami dimerisasi, yang menyebabkan auto-fosforilasi beberapa residu tirosin yang memulai jalur sinyal, di antara 5 isoform PDGF,

hanya PDGF-BB yang dapat mengikat PDGF-R α dan PDGF-R β . Pensinyalan terstimulasi PDGF-BB melalui PDGF-R β , tetapi tidak PDGF-AA/PDGF-R α , terlibat dalam homeostasis cairan dan regulasi tekanan cairan interstisial pada dermis tikus normal dengan mengatur kontraksi jaringan yang dimediasi sel.³⁵

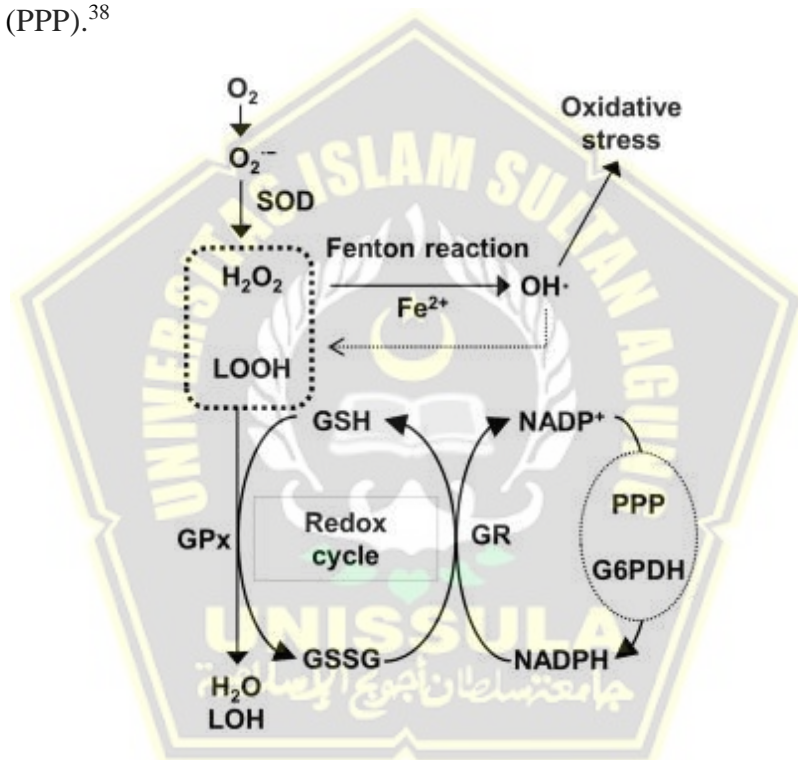
PDGF menginduksi *phosphatidylinositol 3'-kinase* (PI3K) dalam pergantian aktin yang menginduksi pertumbuhan sel, kontraksi sel, dan induksi sintesis kolagen secara in vitro. Serupa dengan PI3K, PDGF juga mengaktifkan *protein kinase C* (PKC) dan fosfolipase C γ (PLC γ) yang akan meningkatkan Ca²⁺ intraseluler. Aktivasi PLC γ akan mengaktifkan pensinyalan kemotaksis sehingga terjadi kontraksi matriks dan produksi kolagen.^{35,36}

2.2. *Glutathione Peroxidase x*

2.2.1. Definisi GPx

Glutathione peroxidase (GPx) adalah glikoprotein tetramerik dengan kofaktor logam berupa selenium, yang meningkatkan aktivitas antioksidan.³⁷ GPx juga merupakan salah satu selenoenzim yang paling penting karena perannya dalam beragam fungsi biologis termasuk detoksifikasi hydrogen peroksida (H₂O₂) dan hidroperoksida. GPx memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme yang diperantari oleh *superoxide dismutase* (SOD). SOD mendorong pembentukan H₂O₂ dan selanjutnya katalase bersama *glutathione peroxidase* (GPx) dapat mereduksi H₂O₂ bebas menjadi dioksigen (O₂) dan hidrogen (H₂O) di dalam sel. GPx dapat

memecah tidak hanya H_2O_2 tetapi juga lipid hidroperoksida (LOOH) dengan glutathione tereduksi (GSH) sebagai substrat untuk alkohol yang sesuai. Dalam proses ini, GSH diubah menjadi glutathione teroksidasi (GSSG). Setelah teroksidasi, GSH dapat direduksi kembali oleh glutathione reductase (GR), menggunakan nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) sebagai donor elektron. NADPH disuplai oleh aktivasi glukosa 6-fosfat dehidrogenase (G6PDH) di *pentose phosphate pathway* (PPP).³⁸



Gambar 2.2. Mekanisme antioksidan GPx

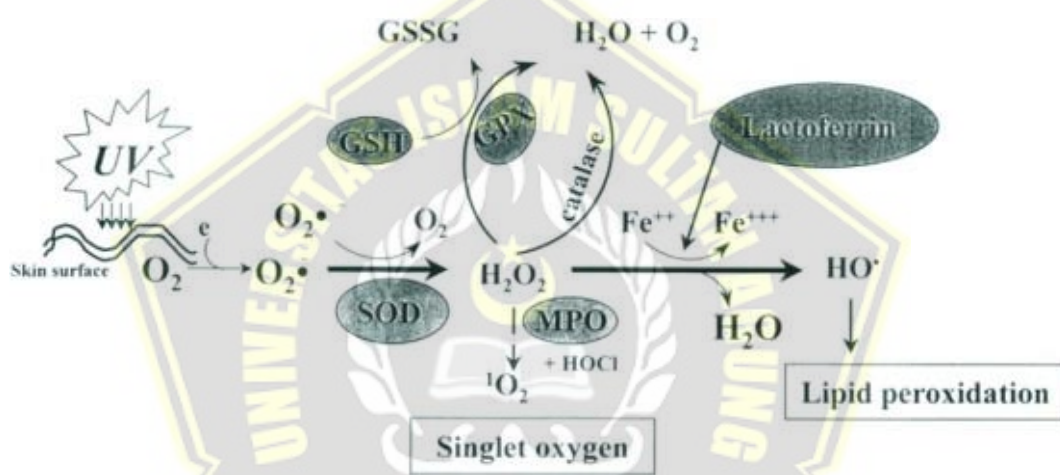
2.2.2. Aktivitas GPx sebagai antioksidan terhadap UVB

GPx adalah enzim intraseluler yang menggunakan peroksida lipid sebagai substrat (Gambar 2.3). GPx mengkatalisis konversi H_2O_2 yang diinduksi UV menjadi air dan oksigen menggunakan GSH sebagai kofaktor. GPx mengurangi peroksida lipid beracun menjadi asam lemak hidroksi yang

kurang beracun dengan menggunakan glutathione.³⁸ Ada dua bentuk GPx, GPx yang bergantung pada selenium (Se) dan GPx yang tidak bergantung pada Se.³⁹ GPx bergantung Se menunjukkan reaktivitas tinggi terhadap H₂O₂ dan hidroperoksida organik. Hal ini ditemukan baik di sitosol dan mitokondria. Aktivitas enzim ini tidak terlalu dipengaruhi oleh UV dan dianggap sebagai sistem pertahanan antioksidan terpenting di kulit. Defisiensi Se menghasilkan penurunan aktivitas GPx di kulit dan peningkatan karsinogenesis kulit yang diinduksi UV-B pada tikus dan peroksidasi lipid yang diinduksi UV-A pada fibroblas yang dikultur. Dalam model kulit tikus paparan UVB akut (300 mJ/cm²).^{40,41}

Penelitian lain juga mengamati penurunan glutathione reduktase dan aktivitas katalase, sementara superoksida dismutase dan GPx tidak terpengaruh. Memeriksa kerusakan enzim antioksidan dalam sel dan pola pemulihan setelah paparan UV tunggal mungkin merupakan metode yang berguna untuk menganalisis mekanisme iradiasi UV kronis, karena iradiasi UV kronis berarti paparan tunggal berulang. Dalam konteks ini, Shindo dan Hashimoto menyinari fibroblas manusia dengan paparan tunggal UV-A (1, 6 atau 12 J/cm²) dan memeriksa perjalanan waktu perubahan enzim antioksidan selama beberapa hari. Hanya aktivitas katalase yang ditemukan tidak aktif pada akhir iradiasi, pulih pada hari ke-5. Aktivitas superoksida dismutase menurun pada hari ke-3, dan pulih pada hari ke-5, meskipun tidak berubah pada akhir paparan. Aktivitas GPx dan glutathione reduktase hampir tidak berubah dengan iradiasi. Jika paparan UV berulang terjadi

sebelum aktivitas enzim yang tidak aktif pulih, kerusakan sel akan menjadi signifikan karena penurunan sistem pertahanan antioksidan. Studi yang dilakukan pada kulit manusia oleh Katiyar et al. [65] menunjukkan bahwa paparan UV tunggal $4 \times$ dosis eritema minimal tidak mempengaruhi aktivitas GPx di epidermis ketika diukur pada 6 jam setelah paparan UV tetapi ditemukan menurun pada 24 dan 48 jam setelah penyinaran UV. Dalam studi yang sama, tingkat glutathione ditemukan menipis di epidermis setelah 6, 24 dan 48 jam setelah penyinaran UV pada kulit manusia.



Gambar 2.3. Diagram skematis mekanisme stres oksidatif yang diinduksi sinar UVB dan sistem pertahanan atau detoksifikasi antioksidan di kulit.

2.3. Ekstrak Bunga Telang

2.3.1. Definisi Bunga Telang

Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) atau *Blue Pea Flower* merupakan tumbuhan dari famili Fabaceae yang memiliki habitus berupa perdu yang dapat tumbuh hingga mencapai 6 meter baik di tempat terbuka atau pun di bawah naungan dan memiliki ciri morfologi berupa ranting halus dengan daun majemuk⁴². Menurut Cronquist Bunga Telang diklasifikasikan sebagai berikut (1981) :

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



Gambar 2.4. *Clitoria Ternatea*

Beberapa bagian dari tumbuhan Bunga Telang seperti akar, batang, daun, dan bunga mengandung beberapa jenis senyawa yang memiliki nilai nutrisi tinggi seperti asam lemak yang terdiri dari stearat, asam palmitat, linolenat oleat dan linoleat serta flavonoid yang terdiri dari anthocyanin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones. Menurut beberapa penelitian flavonoid yang terkandung dalam Bunga Telang memiliki aktivitas antiinflamasi.⁴³⁻⁴⁶

2.3.2. Kandungan Senyawa Aktif Bunga Telang

Bunga telang mengandung berbagai senyawa metabolit dbioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan terpenoid.⁴⁷ Senyawa golongan flavonoid bunga telang yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu quersetin dan kaemferol.⁴⁸ Hasil analisis profil kandungan senyawa biologis yang dilakukan penelitian terdahulu menyebutkan *C. ternatea* 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 *C. ternatea* antara lain terdiri anthocyanin, apigenin, kaemferol flavanol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi.⁴⁹

2.3.3. Manfaat Bunga Telang dalam Menekan Inflamasi

Senyawa antosianin dalam Bunga Telang dilaporkan bersifat anti-inflamasi yang mampu menekan hipersensitivitas dengan menghambat aktivitas NF-kB dalam monosit sehingga menekan konsentrasi TNF- α yang merupakan mediator pro-inflamasi yang kuat.⁵⁰⁻⁵² Turunan flavonoid pada Bunga Telang juga mampu menekan produksi TNF- α melalui penghambatan jalur pensinyalan AP-1 dan Nrf-2.⁵³ Apigenin pada Bunga Telang dilaporkan mampu menekan transkripsi gen MCP-1 yang merupakan salah satu mediator inflamasi.⁵⁴ Kaempferol dan quercetin juga dilaporkan mampu menekan produksi berbagai mediator pro-inflamasi dari sel-sel seperti makrofag, endotel, epitel, atau sel hati dengan menghambat

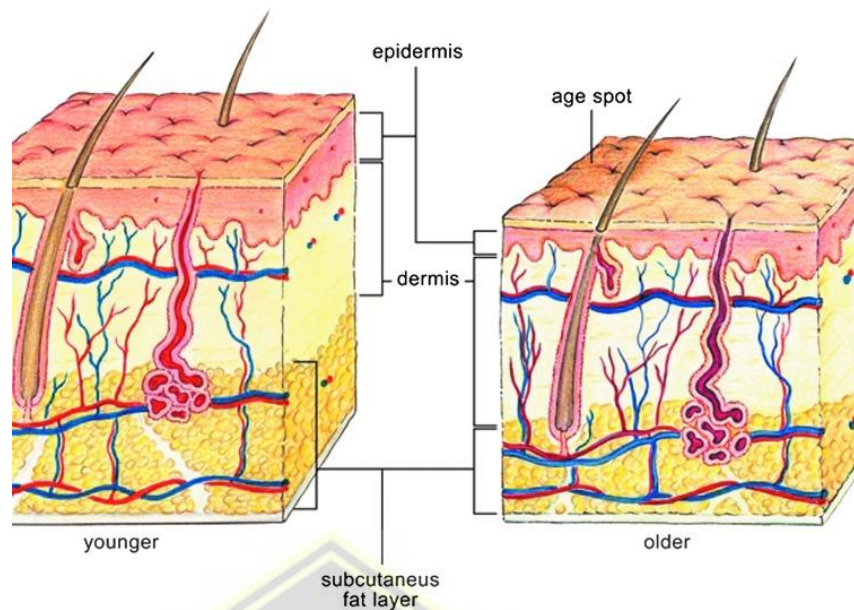
jalur TLR4.⁵⁵⁻⁵⁷ Beberapa turunan kaempferol juga terbukti memiliki efek penghambatan aktivitas enzim COX-2 yang berperan penting dalam pelepasan mediator pro-inflamasi seperti PGE2 dan PGD2.^{58,59}

2.4. Kolagen

2.4.1. Definisi

Kolagen Merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia⁶⁰.

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 parut. 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 darah⁶¹.



Gambar 2.5. Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah Kolagen pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua⁶².

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. 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 jelas⁶⁰. Karena kolagen-1 yang mendominasi organ kulit, maka kolagen-1 yang akan diukur pada penelitian kali ini.

Pada umumnya jumlah kolagen akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe kolagen mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak kolagen-3 (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses penuaan intrinsik akan terjadi penurunan kolagen-3 dan peningkatan kolagen-1. Kolagen-1 terus

meningkat sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu kolagen-1 akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah kolagen sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah kolagen manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda ⁶¹.

Kolagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah kolagen merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan kolagen sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UV-B dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage* ⁶⁰.

Walaupun kolagen-1 merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi kolagen tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. Kolagen-7 yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papilla dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UV-B kronis akan menurunkan jumlah kolagen-7 dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena

degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan kolagen-7 pada pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan kolagen-4 pada tempat yang sama ⁶³.

2.4.2. Perubahan pada kolagen

Pada kulit yang mengalami *Photoaging*, serat kolagen mengalami disorganisasi. Serabut kolagen dan kumpulan serat kolagen berkurang serta mengalami homogenisasi. Kulit yang mengalami *Photoaging* prekursor kolagen Tipe I dan III dan *crosslink*-nya berkurang ⁶⁴. Dengan menggunakan antibody terhadap kolagen Tipe I, tidak ditemukan ada perubahan kolagen setelah radiasi UV-B selama 10 minggu. Peningkatan kolagen pada Tipe III dimulai setelah terpapar UV-B selama 12 minggu (5 hari perminggu dengan ½ MED setiap pemaparan).

Kolagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik meliputi sinar ultraviolet, polusi, dan diet. Faktor ekstrinsik dapat memperberat kerusakan kolagen yang disebabkan oleh faktor intrinsik. Pengaruh faktor genetika tampak pada studi penuaan kulit pada berbagai etnis. Etnis dengan pigmentasi lebih gelap, seperti ras Afrika-Amerika, memiliki daya perlindungan yang lebih tinggi terhadap Ultraviolet. Sinar Ultraviolet memicu pembentukan radikal bebas sehingga merusak kolagen kulit. Kulit ras Afrika - Amerika mengandung lipid interseluler lebih banyak daripada ras Kaukasia sehingga lebih resisten terhadap penuaan. Kerutan wajah pada ras Asia terjadi lebih lambat dan lebih ringan daripada ras Kaukasia ⁶².

Penurunan kolagen kulit tampak signifikan pada wanita menopause. Kolagen kulit orang dewasa berkurang 1 % setiap tahun. Penurunan kolagen ini lebih tampak pada wanita daripada pria. Kulit kendur dan kerutan wajah disebabkan kerusakan akumulasi kolagen. Sinar ultraviolet juga memicu pembentukan radikal bebas, yang dapat bereaksi dengan protein seperti kolagen sehingga terjadi kerusakan kolagen⁶⁵.

2.4.3. Mekanisme kerusakan kolagen

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat Ultraviolet. 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 secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMP. Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya⁶⁶. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UVB pada jaringan kulit. Paparan ultraviolet (panah bergerigi) mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan keratinosit dan fibroblast. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam fibroblas, AP-1 juga menghambat ekspresi gen prokolagen. MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dan memecah kolagen dan

protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna akan mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{67,68}.

2.4.4. Sintesis Kolagen

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai prokolagen α , dimana terjalin dalam sistena retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam kolagen dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁶⁹.

2.4.5. Sintesis Prokolagen

Bentuk *triple helix* dari rantai α berbetnuk molekul prokolagen seperti sebuah batang, dimana kolagen tipe 1 dan 2 berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul prokolagen mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai prokolagen α sangat bertanggung jawab atas bermacam-macam tipe dari kolagen dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada kolagen tipe I, II, III, molekul kolagen bersatu dan menjadi berkelompok bersama- sama membentuk fibril⁷⁰.

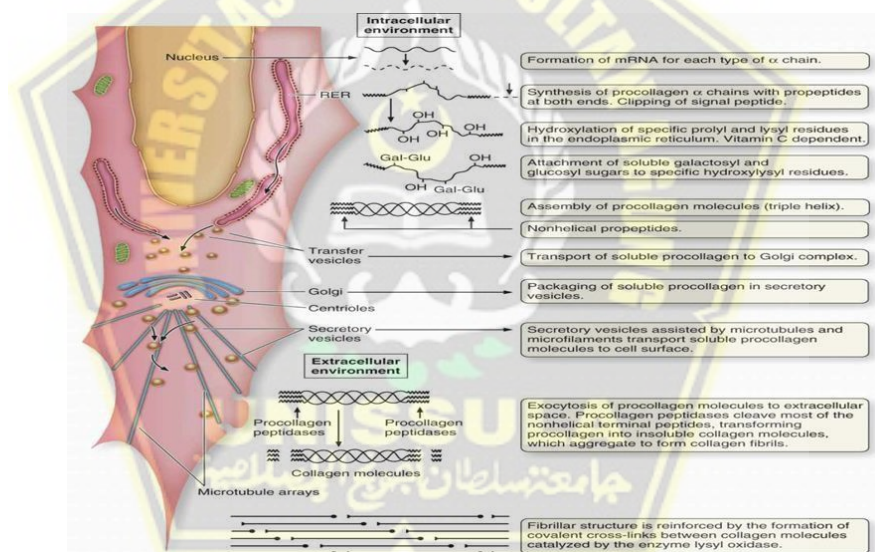
Karena kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini. Sintesis dari protein penting ini

meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada gambar 2.3 ⁷¹:

1. lipetida rantai prokolagen α diproduksi pada ikatan poliribosom yang berikatan dengan membrane dari Retikulum Endoplasma yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum tertentu dan masih terikat pada ribosom. Enzim yang menyertai adalah prolil hidroxilase dan lisil hidroxilase dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai kofaktor.
3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari kolagen yang memiliki jumlah ikatan galaktosa-hidroksilisin yang berbeda-beda.
4. Gugus amino dan karboksil akhir dari setiap rantai α membentuk polipeptida non helix, kadang disebut propeptida ekstensi, dimana membantu rantai α (α_1 , α_2) membentuk dengan posisi yang benar menjadi *triplehelix*. Sebagai tambahan, propeptida nonhelix membuat molekul prokolagen soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan pengendapan dari fibril kolagen. Prokolagen ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositososis ke lingkungan ekstraselular.
5. Diluar sel, protease spesifik disebut peptidase prokolagen menyingkirkan perpanjangan propeptida, perubahan dari molekul prokolagen menjadi molekul kolagen. Sekarang ini sesuai untuk

pembentukan sendiri kedalam fibril kolagen polimerik, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.

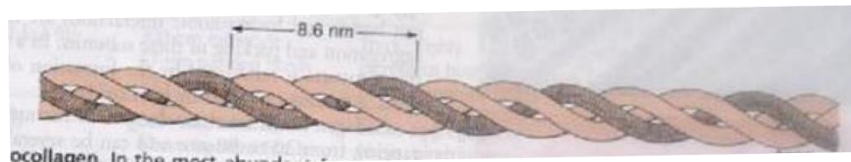
6. Pada beberapa tipe kolagen, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe kolagen (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul kolagen untuk membentuk *fibril-fibril* dan formasi *fiber* yang berasal dari *fibril* dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen ekstraselular matrik lainnya.
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul kolagen, sebuah proses dikatalisis oleh enzim lisil oksidase.



Gambar 2.6. Sintesis Kolagen ⁷²

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α prokolagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan prokolagen. Karena ada sedikit perbedaan

pada gen rantai α prokolagen dan produksi kolagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa kolagen yang telah dijelaskan ⁷³.



Gambar 2.7. Procollagen ⁷²

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu α_1 dan α_2 . Massa 1 buah molecular kira-kira 100 kDa, terjalin helix pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan helix, dengan jarak 8,6 nm. Panjang setiap molekul tropokolagen adalah 300nm dan lebarnya 1,5 nm ⁷².

2.5. Sediaan Gel

Beberapa bentuk sediaan topikal antara lain gel, krim, pasta dan salep. Bentuk sediaan yang nyaman untuk penggunaan topical adalah bentuk sediaan gel. Gel terdiri dari suspensi semipadat yang terbuat dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar, yang terpenetrasi oleh suatu cairan. Sediaan gel memiliki kelebihan antara lain mempunyai sifat tiksotropi sehingga bila dioles mudah merata, tidak mudah mengalir pada permukaan kulit karena mempunyai viskositas dan daya lekat yang tinggi, tidak berbekas, hanya lapisan tipis seperti *film* saat dipakai, terdapat sensasi dingin saat digunakan dan mudah dicuci dengan air, penetrasinya lebih dalam dibandingkan krim,

dapat digunakan pada area berambut dan secara kosmetika lebih disukai, gel cepat mencair bila kontak dengan kulit ⁷⁴.

Polimer-polimer yang umum digunakan untuk membuat gel-gel farmasetik antara lain pektin gom alam tragakan, karagen, asam alginat, agar, serta bahan semisintetis dan sintetis seperti hidroksi etil selulosa, metil selulosa, karboksi metil selulosa, dan karbopol yang merupakan polimer vinil sintetis dengan gugus karboksil yang terionisasi. Gel dibuat melalui proses peleburan, atau memerlukan prosedur khusus berkaitan dengan sifat mengembang gel. Bahan pembentuk gel idealnya harus bersifat inert, tidak ada perubahan viskositas pada penyimpanan yang normal, aman dan tidak bereaksi dengan bahan-bahan lain dalam formula ⁷⁵.

Konsistensi gel dikarenakan bahan pembentuk gel yang setelah mengabsorpsi air akan membentuk struktur tiga dimensi. Gel mengabsorpsi larutan dan mengembang, dengan meningkatkan volume. Pengembangan merupakan tahap awal disperse yaitu terjadi penetrasi fase dari luar kedalam matriks gel dan menimbulkan interaksi diantara pembentuk gel dan solven. Gel merupakan interaksi diantara unit-unit fase koloidal dari senyawa anorganik dan organik, tidak terpisah dari fase luar, membentuk *structural viscosity*. Karakteristik gel harus disesuaikan dengan tujuan penggunaan gel, misalnya pada gel topikal jangan terlalu liat, konsentrasi dan berat molekul bahan pembentuk gel yang digunakan jangan terlalu tinggi sehingga dapat menyebabkan gel sulit didispersikan dan dioleskan ⁷⁶.

Pemilihan basis dalam pembuatan gel, dapat mempengaruhi karakter gel yang terbentuk. Basis gel terbagi atas basis gel hidrofilik dan hidrofobik. Basis gel hidrofilik memiliki sifat yang memperlambat pengeringan sehingga cocok digunakan secara topikal karena kemampuannya bertahan lama di permukaan kulit. Gel hidrofilik mempunyai sistem koloid yang lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan gel hidrofobik. Gel hidrofobik memiliki dasar yang terdiri atas fase anorganik, hanya sedikit interaksi diantara dasar gel hidrofobik dengan fase pendispersinya. Bahan hidrofobik tidak menyebar dengan spontan.

Karakteristik cairan gel terbagi menjadi gel hidrofilik dan gel hidrofobik⁷⁷:

- a. Gel hidrofilik, mempunyai basis terdiri dari molekul organik yang besar dan larut dengan fase pendispersi. Sistem koloidnya lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan hidrofobik. Gel hidrofilik mengandung bahan pengembang, penahan lembab, air, dan pengawet. Karakteristik gel hidrofilik ini mempunyai aliran tiksotropik, kompatibel dengan beberapa eksipien, tidak lengket, larut dalam air, mudah menyebar dan mudah dibersihkan.
- b. Gel hidrofobik, basisnya mengandung minyak lemak atau polietilen dan parafin cair dengan bahan pembentuk gel koloidal silika atau zink sabun atau aluminium. Gel ini tersusun dari partikel anorganik, kemudian akan terjadi interaksi dengan basis gel jika ditambahkan ke dalam fase pendispersi. Basis gel hidrofobik tidak secara spontan menyebar.

Kontrol kualitas sediaan gel, meliputi ⁷⁸:

- a. Organoleptis, merupakan diskripsi sediaan gel yang terdiri atas warna, bentuk, bau, dan kejernihan. Pengamatan dilakukan secara makroskopis.
- b. Homogenitas, sediaan gel yang dihasilkan harus tercampur homogen dan merata. Pengujian homogenitas dapat dilakukan dengan cara visual. Homogenitas gel diamati di atas kaca objek dengan adanya bantuan cahaya.
- c. Daya sebar, berkaitan dengan kenyamanan pada pemakaian, mudah dioles tanpa perlu penekanan yang berlebih. Sediaan topikal diharapkan memiliki daya sebar yang baik.
- d. Daya lekat, adalah kemampuan menempel pada lapisan epidermis, pengujiannya untuk mengetahui kemampuan melekat atau waktu retensi yang dihasilkan saat digunakan.
- e. Viskositas, mempengaruhi sifat sediaan dalam campuran dan sifat alirnya pada saat proses produksi, proses pengemasan, serta sifat-sifat penting pada saat pemakaian, seperti daya sebar, konsistensi atau bentuk, dan kelembaban. Selain itu, viskositas dapat mempengaruhi bioavailabilitas dan stabilitas fisik. Semakin tinggi viskositas, menyebabkan daya lekatnya semakin besar, sedangkan daya sebar akan semakin kecil. Viskositas sediaan dapat dinaikkan dengan penambahan polimer.
- f. pH, diukur segera pada saat sediaan telah selesai dibuat diharapkan nilai pHnya sama dengan nilai pH tempat pemakaian atau kulit untuk mencegah terjadi iritasi. Kulit manusia memiliki pH normal antara 4,5-6,5.

2.6. Farmakinetik Obat Topikal

Farmakokinetik sediaan topikal merupakan gambaran terhadap jalannya bahan aktif yang diaplikasikan ke kulit pada konsentrasi tertentu, lalu diserap oleh lapisan kulit, kemudian didistribusikan secara sistemik. Hal ini penting dalam menentukan sediaan topikal yang akan dipakai untuk terapi ⁷⁹. Sediaan topikal setelah diaplikasikan secara umum akan melewati tiga bagian yaitu: permukaan kulit, stratum korneum, dan jaringan yang sehat. Stratum korneum merupakan reservoir bagi vehikulum, dimana kandungan didalam obat kontak dengan permukaan kulit tetapi belum terjadi penetrasi, namun tidak dapat dihilangkan walaupun dihapus oleh pakaian atau digosok.

Sediaan obat tertentu dapat menyebabkan bahan aktif langsung menembus hipodermis. Vehikulum sediaan topikal mengandung unsur yang dapat mengalami evaporasi, sehingga kemudian zat aktif berikatan pada lapisan yang dilewatinya misalnya epidermis, dermis, selanjutnya zat aktif akan diserap oleh vaskuler dermis dan hipodermis kulit ⁷⁵.

2.6.1. Jalur Penetrasi sediaan Topikal

a. Penetrasi transepidermal

Penetrasi transepidermal melalui jalur interseluler dan intraseluler. Jalur penetrasi yang utama melalui interseluler, menembus lapisan stratum korneum melewati ruang antar sel korneosit yang dikelilingi lapisan lipid, berdifusi pada matriks lipid protein stratum korneum, kemudian akan menembus epidermis di bawahnya, dan berdifusi ke pembuluh kapiler. ⁴⁰ Jalur penetrasi intraseluler, obat berdifusi menembus dinding sel korneosit

dan melewati matriks lipid protein stratum korneum, kemudian menuju sel di lapisan bawahnya sampai ke pembuluh kapiler di bawah stratum basal epidermis dan berdifusi ke kapiler.

b. Penetrasi transfolikular

Penetrasi folikular diperlihatkan pada percobaan in vivo, terdapat molekul yang kecil seperti kafein berpenetrasi melalui rute folikular selain melalui sel korneum. Difusi obat melewati celah folikel rambut serta kelenjar sebacea dan selanjutnya berdifusi ke pembuluh kapiler⁸⁰.

2.6.2. Absorpsi sediaan topikal secara umum

Absorpsi sediaan topikal yang dioleskan ke kulit, melalui beberapa fase:⁴⁰

- a. Lag phase, fase ini saat sediaan dioleskan ke kulit dan belum menembus stratum korneum, sehingga bahan aktif obat pada fase ini belum ada dalam pembuluh darah.
- b. Rising phase, sebagian sediaan sudah mulai menembus stratum korneum kulit, dan masuk pembuluh kapiler dermis, sehingga obat sudah ditemukan di pembuluh darah.
- c. Falling phase, adalah fase dimana bahan aktif obat dilepaskan dari permukaan kulit dan dibawa ke pembuluh kapiler lapisan dermis.

Gel mampu berpenetrasi menembus lapisan hipodermis, serta mampu membentuk lapisan absorpsi yang menyebabkan difusi secara transfolikulernya juga baik, sehingga banyak digunakan pada sediaan gel analgetik yang memerlukan penetrasi yang baik⁷⁴.

2.7. Efek Ekstrak Bunga Telang Terhadap Ekspresi Gen GPx dan PDGF

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa Bunga Telang memiliki kemampuan antioksidan dengan meningkatkan enzim-enzim antioksidan, termasuk GPx.⁸¹ Enzim GPx diketahui memiliki kemampuan dalam mendegradasi ROS menjadi senyawa non radikal bagi tubuh sehingga tidak menyebabkan induksi inflamasi dan kerusakan oksidatif yang memicu penurunan kolagen.⁸² Senyawa flavonoid bunga telang seperti antosianin, quercetin, dan keempferol dapat menghambat kadar ROS melalui peningkatan produksi enzim antioksidan seperti GPx.^{48,83} Senyawa quercetin menurut penelitian terdahulu dapat meningkatkan konsentrasi PDGF.⁸⁴ Peningkatan PDGF pada kulit diketahui dapat mengaktifkan fibroblast menjadi myofibroblas untuk dapat mensintesis kolagen.⁸⁵ Hal ini menjadikan konsumsi Bunga Telang memiliki potensi untuk dapat meningkatkan sintesis kolagen melalui peningkatan produksi PDGF akibat kandungan senyawa quercetin.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

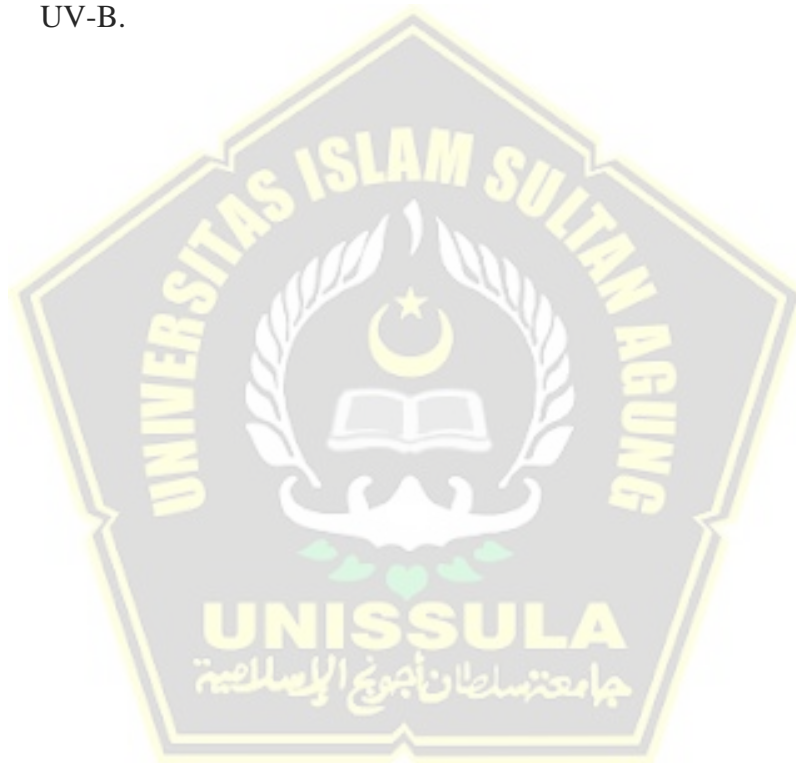
Penurunan kolagen adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Penetrasi UV-B pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS dan mengaktifkan protein kinase sehingga mengaktifkan jalur NF-kB dan berujung pada produksi molekul-molekul proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1. Produksi terus menerus sitokin proinflamasi ini berakibat pada penghambatan polarisasi makrofag tipe 1 (M1) menjadi makrofag tipe 2 (M2) yang bersifat antiinflamasi. Hal ini menyebabkan produksi faktor pertumbuhan PDGF terhambat. Terhambatnya ekspresi PDGF menyebabkan penurunan ekspresi TGF-B sehingga tidak terjadi perubahan myofibroblast menjadi fibroblast, dan tidak terbentuk kolagen.⁸⁶

Bunga Telang diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti golongan flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Kandungan senyawa golongan flavonoid pada bunga telang seperti antosianin, kuersetin, dan kaemperol memiliki peran sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.⁴⁸ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat produksi ROS dengan meningkatkan produksi enzim GPx dan meningkatkan ekspresi Nrf2 yang berakibat pada inaktivasi jalur NF-kB sehingga terjadi penurunan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF-a, IL-6, dan IL-1.^{87,88} Penghentian inflamasi akan menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi sehingga proses polarisasi M1 menjadi M2 yang mampu mensekresikan PDGF yang

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah :

- a. Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang dosis 5% dan 10% terhadap ekspresi gen GPx pada kulit tikus yang dipapar sinar UV-B.
- b. Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak Bunga Telang dosis 5% dan 10% terhadap ekspresi gen PDGF pada kulit tikus yang dipapar sinar UV-B.



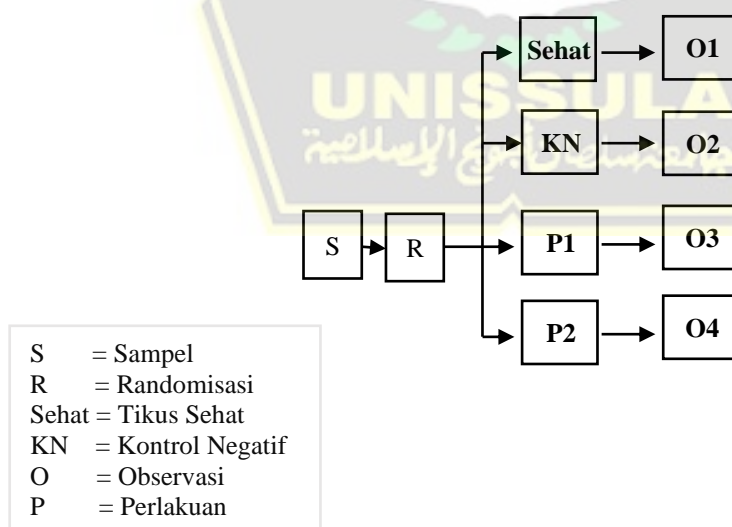
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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

1. Sehat (Tikus sehat tanpa penyinaran UV-B),
2. Kontrol (KN) (Tikus dipapar UV-B dengan pemberian *base gel* secara topikal),
3. Perlakuan 1 (P1) (Tikus dipapar UV-B dengan perlakuan gel ekstrak bunga telang 5% secara topikal),
4. Perlakuan 2 (P2) (Tikus dipapar UV-B dengan perlakuan gel ekstrak bunga telang 10% secara topikal).



Gambar 4.3. Alur Rancangan Penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

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

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat: ekspresi gen GPx dan gen PDGF,

4.2.2. Definisi Operasional

Tabel 4.1. Definisi Operasional

No	Variable	Deskripsi	Unit	Skala
1	Ekstrak Bunga Telang	adalah cairan kental hasil proses ekstraksi remaserasi terhadap serbuk bunga Bunga Telang (<i>Clitorea ternatea</i>) dengan pelarut etanol 96%.	mg	Nominal
2	Gel Ekstrak Bunga Telang	adalah sediaan gel yang mengandung ekstrak bunga telang dengan variasi dosis 5% dan 10%	mg	Nominal
3	Paparan UV-B	adalah paparan sinar <i>ultraviolet</i> dengan panjang gelombang sebesar 302 nm dan MED 160 mJ/cm ² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 5 hari pada punggung tikus yang dicukur bulunya.	λ	Rasio
4	Ekspresi gen GPx	adalah ekspresi gen GPx yang merupakan glikoprotein tetramerik dengan kofaktor logam berupa selenium, yang meningkatkan aktivitas antioksidan. Ekspresi gen GPx dianalisis dari jaringan kulit yang diambil pada hari ke 20 setelah pemberian perlakuan pertama. Analisis menggunakan metode RT-PCR	Ekspresi relative	Rasio
5	Ekspresi gen PDGF	adalah ekspresi gen PDGF yang merupakan mitogen kuat yang mengontrol pertumbuhan sel jaringan ikat seperti fibroblas dan <i>smooth muscle cells</i> . Ekspresi gen PDGF dianalisis dari jaringan kulit yang diambil pada hari ke 20 setelah pemberian perlakuan pertama. Analisis menggunakan metode RT-PCR	Ekspresi relative	Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200–250-gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory*, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang yang dipapar sinar UV-B 302 nm dengan MED 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 5 hari hingga berkurangnya densitas kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan Galur Wistar yang mengalami paparan UV-B.
2. Umur 2-3 bulan.
3. Kondisi sehat.
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 mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Simple Randomized Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sehat (tikus sehat tanpa paparan UV-B), Kontrol (tikus dipapar UV-B dengan pemberian *base gel* secara topikal), Perlakuan 1 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan ekstrak bunga telang secara topikal) dan Perlakuan 2 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan ekstrak bunga telang 10% secara topikal).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per jenis perlakuan dikali dengan jumlah waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan satu kali pada hari ke 25 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus Wistar.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV *light* (broadband dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data

adalah *vacutainer*, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, sentrifus, mikropipet, 1000 uL mikropipet tip, dan *vial tube* 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yang terdiri :

- seperti *gel base*,
- ketamin,
- *xylazine*,
- etanol,
- akuades,
- kloroform,
- *Primer GPx*
- *Primer PDGF*

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Bunga Telang ± 600 gram dipotong menjadi bagian kecil, dikeringkan pada suhu 50 – 60° C dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Kemudian bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi

menggunakan etanol 96% kemudian disaring dan filtrat tersebut ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan dalam suhu 2-8°C. Proses ekstraksi ini menghasilkan 10% ekstrak dari Bunga Telang segar. Konsentrasi ekstrak tersebut dilarutkan dalam aquades sebelum diberikan ke hewan coba.⁴⁸

4.5.3. Penetapan Dosis

Penelitian terdahulu telah menemukan bahwa 5% ekstrak bunga telang secara topikal memiliki efek dalam mengurangi berkurangnya kolagen²⁰, sehingga dalam penelitian ini menggunakan dosis 5% ekstrak bunga telang sebagai dosis 1 dan menggunakan dosis 10% sebagai dosis 2. Penggunaan ekstrak 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%.

4.5.4. Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kg BB) dan xylazine (20mg/kg BB).
2. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih.

3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 5 hari ⁸⁹.
4. Tikus Perlakuan 1 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak bunga telang yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari. Tikus pada Perlakuan 2 diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak bunga telang yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari.

4.5.5. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan untuk analisis RT-PCR dilakukan pada hari ke 25 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UV-B. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam dan untuk dimasukkan ke dalam RNA Later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian disimpan dalam suhu -80°C hingga proses analisis RT-PCR

4.5.6. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

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

4.5.7. Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen

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

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.

3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.
5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
12. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
13. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.

4.5.8. Analisis Kuantitatif Ekspresi GPx dan PDGF menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

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

2. Penentuan Ekspresi Gen GPx dan PDGF

Gen GPx dan PDGF diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (Invitrogen Life Technologies®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

Tabel 4.2. Komponen PCR Mix GPx

Komponen	Jenis
Primer GPx	Forward GPx 5'- AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA-3'
Primer PDGF	Reverse GPx 5'- TCACCATTACCTCGCACTTCTCA -3'
Reagen RNA transcribed cDNA	Forward PDGF 5'- GAGCTAGCG AGA ATC CCA AAA GCC TCA A-3'
	Reverse PDGF 5'- CTCTCGAGG CGG GGT TGC AGA AGT GT -3'
	Trizol Reagen
	High Capacity cDNA Reverse Transcription
	SYBR Green

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

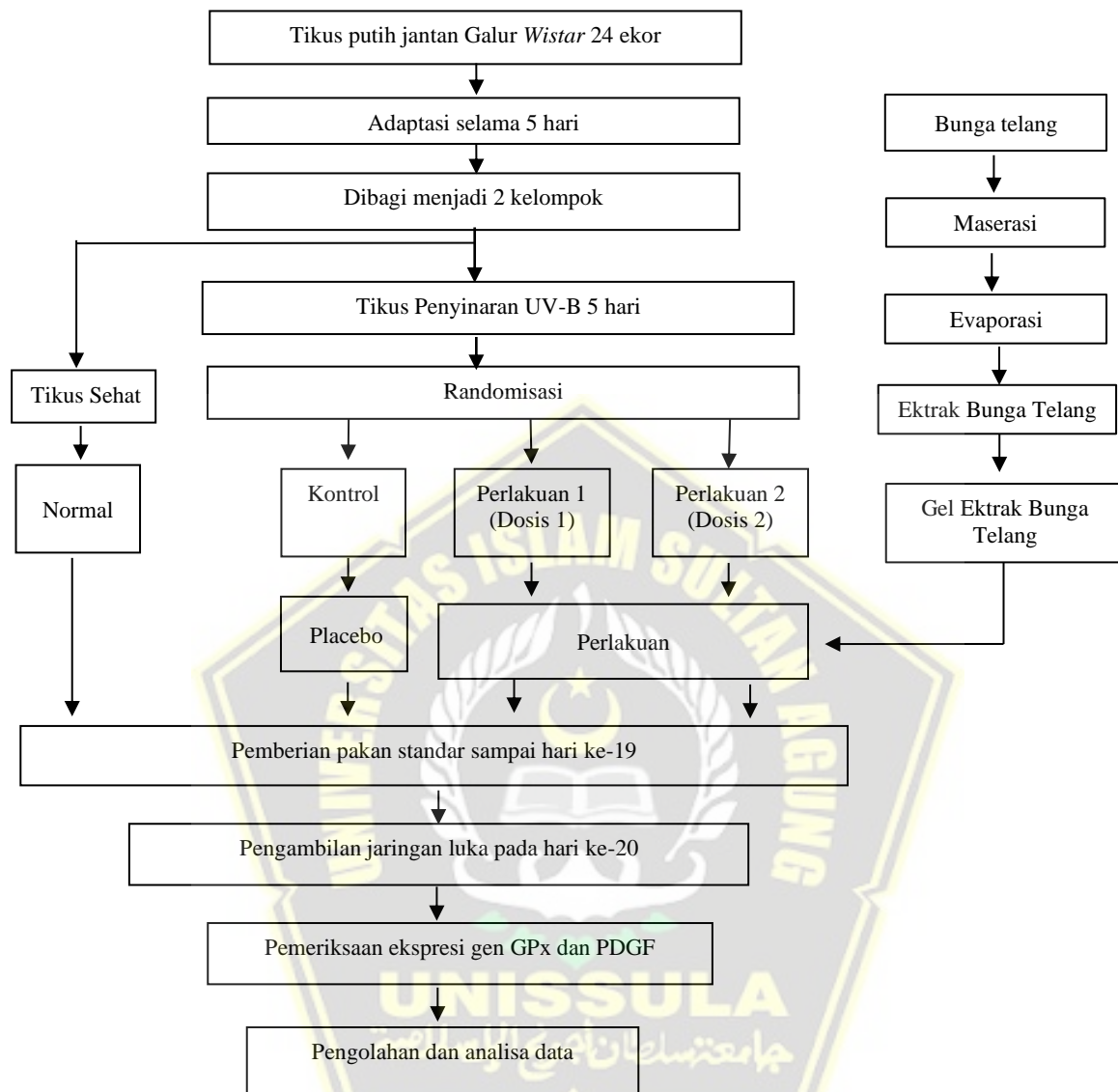
Penelitian dilakukan di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian rencana akan dilakukan pada Juli-Agustus 2022.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh kemudian diproses, disunting, dan ditabulasi, untuk dilakukan uji deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.4. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juni 2022 hingga Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 250- 300 gram dan berumur 4-6 bulan yang di induksi *collagen loss* menggunakan UV-B 302 nm dengan intensitas energi 160mJ/cm² selama 15 menit⁹⁰. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 24 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yaitu 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol UV-B, dan 1 kelompok sehat. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 5 hewan uji dengan pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 5% dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 5 hewan uji dengan pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 10%. Untuk kelompok kontrol terdiri dari 5 hewan uji yang mendapatkan paparan UV-B tanpa pengobatan, sedangkan kelompok sehat adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

Ekstrak bunga telang pada penelitian ini diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 9,78%. Hasil skrining fitokimia ekstrak bunga telang menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang positif mengandung senyawa golongan alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, dan terpenoid (Lampiran 3). Senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam bunga telang seperti antosianin, kaemperol, asam galat, dan quercetin⁹¹ terbukti

berperan terhadap aktivitas antioksidan. Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan total flavonoid dalam ekstrak bunga telang dengan menggunakan metode spektrofotometri. Dalam 1 gram ekstrak bunga telang mengandung flavonoid sebesar 682,0238 mg \pm 9,48. Hasil ini membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung didalam ekstrak bunga telang adalah golongan flavonoid. Hasil kolom yang terdeteksi flavonoid dapat dipekatkan untuk memperoleh senyawa flavonoid murni. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme auto-oksidasi secara enzimatik dan kimiawi menghasilkan radikal semikuinon flavonoid, yang dapat ditangkap oleh glutathione tereduksi (GSH), sehingga menghasilkan radikal thiyl glutathione. Radikal *thiyl glutathione* ini dapat bereaksi dengan GSH untuk menghasilkan anion radikal disulfida yang secara cepat mereduksi molekul *oxygen superoxide anion radical* yang dapat didetoksifikasi lebih lanjut oleh enzim antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroxidase (GPx).⁹²

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen GPx dan PDGF

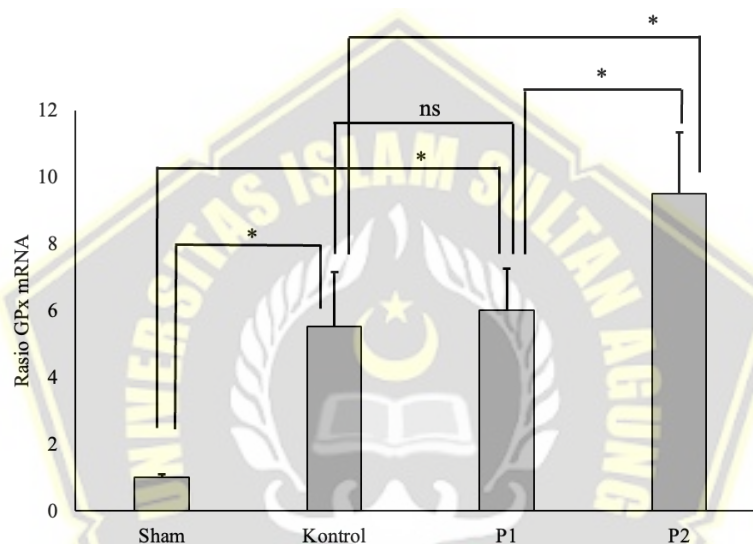
Variabel	Kelompok				pvalue
	Sehat n=5 Mean \pm SD	Kelompok UVB n=5 Mean \pm SD	P1 n=5 Mean \pm SD	P2 n=5 Mean \pm SD	
Ekspresi gen GPx	1.02 \pm 0.01	4.90 \pm 1.64	6.01 \pm 1.25	9.51 \pm 1.83	
<i>Saphiro wilk</i>	0.894	0.804	0.980	0.845	
<i>Levene test</i>					0.179
<i>One way Anova</i>					0.005
Ekspresi gen PDGF	1.02 \pm 0.01	0.032 \pm 0.01	0.44 \pm 0.15	4.36 \pm 1.18	
<i>Saphiro wilk</i>	0.962	0.877	0.878	0.904	
<i>Levene test</i>					0.052
<i>One way Anova</i>					0.000

Pada penelitian ini diperoleh hasil ekspresi gen GPx dan PDGF pada model tikus *collagen loss* akibat paparan UV-B yang di terapi dengan ekstrak bunga telang. Pada kelompok sehat rasio ekspresi gen GPx sebesar 1.02 ± 0.01 , kelompok kontrol UVB sebesar 4.90 ± 1.64 , kelompok P1 sebesar 6.01 ± 1.25 dan kelompok P2 sebesar 9.51 ± 1.83 . Berdasarkan uji statistik data ekspresi setiap kelompok terdistribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi uji *Shapiro wilk* > 0.05 setiap kelompok dan *Levene test* sebesar 0.179. Hasil analisis *one way Anova* nilai *p value* 0.005 ($p < 0.05$) yang menyatakan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Pada penelitian ini juga dianalisis ekspresi gen PDGF, pada kelompok sehat rasio ekspresi gen PDGF sebesar 1.02 ± 0.01 , terdapat penurunan ekspresi pada kelompok kontrol UV-B sebesar 0.032 ± 0.01 , kelompok P1 sebesar 0.44 ± 0.15 dan kelompok P2 mengalami peningkatan ekspresi gen sebesar 4.36 ± 1.18 . Berdasarkan uji statistik data ekspresi setiap kelompok terdistribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi uji *Shapiro wilk* > 0.05 setiap kelompok dan *Levene test* sebesar 0.052. Hasil analisis *one way Anova* nilai *p value* 0.000 ($p < 0.05$) yang menyatakan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan (Tabel 5.2). Perbedaan signifikan pada uji *one-way Anova* menunjukkan terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan. Perbedaan antar kelompok dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD.

5.1.1. Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang pada Ekspresi Gen GPx Tikus Model dipapar sinar UV-B

Radikal bebas terbentuk selama metabolisme oksigen dan terakumulasi dengan terjadinya hambatan proses produksi kolagen pada penuaan. Enzim

antioksidan seluler dapat melindungi jaringan dari cendera oksidatif yang diperantarai radikal bebas seperti enzim *glutathione peroxidase* (GPx).⁹³ Penurunan ekspresi GPx berkaitan erat dengan peningkatan stress oksidatif akibat paparan irradasi UV-B yang secara langsung menekan produksi kolagen. Pada pemberian gel ekstrak bunga telang ekspresi gen GPx meningkat tergantung dosis (Gambar 5.1). Hal ini menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan.



Gambar 5.1. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA GPx pada jaringan kulit masing-masing kelompok perlakuan. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan ($p < 0.05$) dan ns menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

Tabel 5.2. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi MRNA GPx antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol	0.004*
	P1	0.021*
	P2	0.000*
Kelompok kontrol	P1	0.578 ^{ns}
	P2	0.031*
P1	P2	0.042*

Uji *Post Hoc*:

* mean difference significant $P < 0.05$

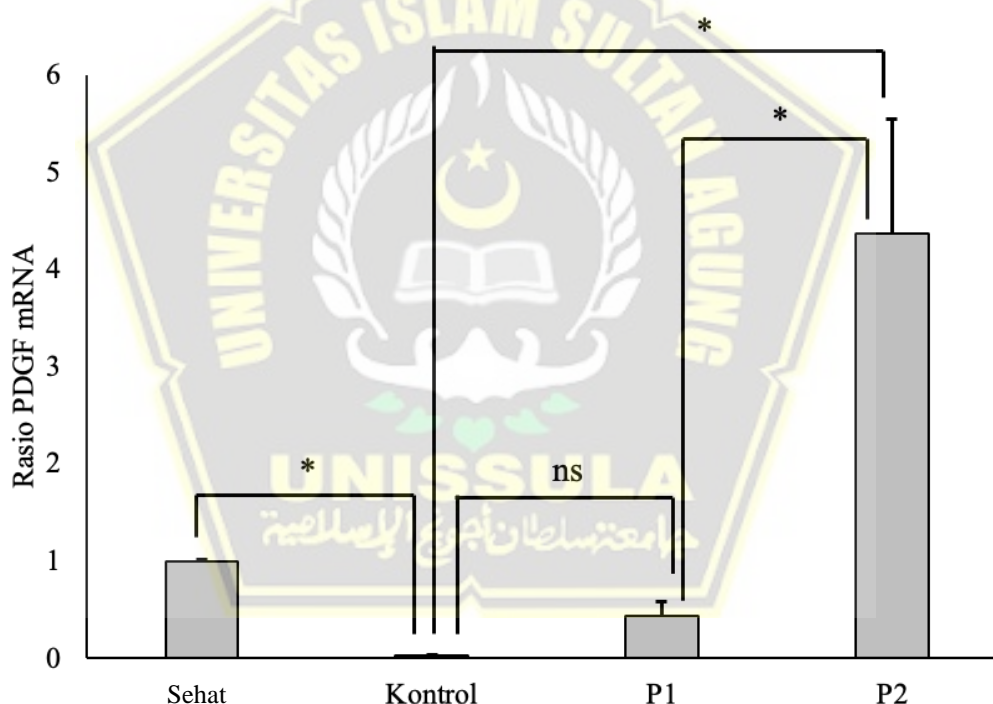
^{ns} mean not difference significant $P > 0.05$

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian gel ekstrak bunga telang 5% (6.01 ± 1.25) dan 10% (9.51 ± 1.83) secara berturut-turut meningkatkan ekspresi gen GPx lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol perlakuan UV-B (4.90 ± 1.64). Perlakuan dosis 10% memberikan perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi gen GPx dibandingkan kontrol, namun perlakuan 5% tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Ekspresi gen GPx kelompok perlakuan sehat (1.02 ± 0.01) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa adanya perlakuan ekspresi gen GPx secara normal terjadi peningkatan untuk menstabilkan stress oksidatif yang terbentuk. Namun pemberian ekstrak bunga telang terbukti lebih optimal dalam meningkatkan ekspresi gen GPx. Hal ini bisa di lihat dari ekspresi gen GPx perlakuan jika di bandingkan dengan kelompok sehat menunjukkan terdapat peningkatan yang signifikan.

Pada data deskriptif ekspresi gen GPx masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikasi semua kelompok $p > 0.05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji *Post-hoc* LSD. Uji beda One-way ANOVA didapatkan $p < 0.05$. Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.4 dan tabel 5.3. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang dengan kelompok kontrol.

5.1.2. Efek Pemberian Gel Ekstrak Bunga Telang pada Ekspresi Gen PDGF Tikus Model dipapar sinar UV-B

Platelet-derived growth factor (PDGF) adalah mitogen yang terkait dengan proses sintesis kolagen dan remodeling *interstitial collagenase*. PDGF meningkatkan ekspresi kolagen tipe III melalui stimulasi *growth factor transforming growth factor- β* (TGF- β).³⁴ Penurunan ekspresi PDGF menyebabkan penurunan ekspresi TGF- β , sehingga tidak terjadi perubahan fibroblas menjadi myofibroblast. Kondisi tersebut mencegah pembentukan *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) untuk menginduksi sintesis kolagen.



Gambar 5.2. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA PDGF pada jaringan kulit masing-masing kelompok perlakuan. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan ($p < 0.05$) dan ns menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

Tabel 5.3. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi mRNA PDGF antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol	0.025*
	P1	0.499 ^{ns}
	P2	0.001*
Kelompok kontrol	P1	0.639 ^{ns}
	P2	0.000*
P1	P2	0.000*
Uji <i>Post Hoc</i> :		* mean difference significant $P < 0.05$ ^{ns} mean not difference significant $P > 0.05$

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian gel ekstrak bunga telang 5% (0.44 ± 0.15) dan 10% (4.36 ± 1.18) secara berturut-turut meningkatkan ekspresi gen PDGF lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol perlakuan UV-B (0.032 ± 0.01) (Gambar 5.2). Pada kelompok kontrol UV-B terjadi penurunan ekspresi gen PDGF di bandingkan dengan kelompok sehat (1.02 ± 0.01). Perlakuan dosis 10% memberikan perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi gen PDGF dibandingkan kontrol, namun perlakuan 5% tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hal ini disebabkan kandungan senyawa flavonoid yang rendah pada P1, menunjukkan efek yang tidak signifikan, meskipun terlihat trend terjadi peningkatan ekspresi gen PDGF pada kelompok P1 di bandingkan kontrol. Ekspresi gen PDGF kelompok perlakuan sehat berbeda signifikan dengan kelompok kontrol, kelompok kontrol terjadi penurunan ekspresi gen PDGF. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak bunga telang meningkatkan ekspresi gen PDGF terkait dengan paparan sinar UV-B. Pada pemberian perlakuan ekstrak bunga telang 10% juga terlihat terdapat peningkatan ekspresi gen PDGF lebih tinggi secara signifikan di bandingkan kelompok normal, sehingga menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang mengupregulasi PDGF untuk mencegah terjadinya degradasi kolagen pada kulit yang dipapar sinar UV-B.

Pada data deskriptif ekspresi gen PDGF masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0.05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji *Post-hoc* LSD. Uji beda One-way ANOVA didapatkan $p < 0.05$. Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.5 dan tabel 5.4. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel ekstrak bunga telang dengan kelompok kontrol.

5.2. Pembahasan

Paparan iradiasi UV-B adalah faktor resiko utama penurunan produksi kolagen yang ditandai dengan penurunan produksi protein terkait jalur sintesis kolagen. Paparan iradiasi UV-B menginduksi pelepasan stress oksidatif yang menupregulasi produksi *matrix mettaloproteinase* (MMPs) terutama MMP-1, yang bertanggung jawab pada proses degradasi kolagen.⁹³ Kondisi ini menyebabkan penurunan produksi enzim antioksidan seperti GPx, *superoxide dismutase* (SOD), dan katalase, serta penurunan sekresi *growth factor* seperti PDGF dan *transforming growth factor-β* (TGF-β) yang menyebabkan penekanan produksi prokolagen tipe 2.⁹⁴ Penekanan produksi ROS dapat dihambat dengan berbagai senyawa yang dapat menyeimbangkan O_2 radikal seperti senyawa flavonoid, fenolik, dan alkaloid.⁹⁵ Senyawa flavonoid dapat menginduksi pelepasan GPx, GPx merupakan enzim yang dapat menekan ROS dengan mekanisme menghilangkan hidrogen peroksida melalui interaksi dengan GSH membentuk GSH teroksidasi yang stabil.⁹⁶

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa senyawa aktioksidan memiliki sifat penangkap radikal bebas dari ROS yang berkaitan dengan kemampuannya untuk membentuk radikal stabil. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas secara efektif dengan membentuk radikal semikuinon yang akan berikatan dengan radikal bebas untuk membentuk struktur kuinon yang stabil.⁹⁷

Bunga telang merupakan salah satu tanaman biodiversitas Indonesia yang terbukti mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol bunga telang mengandung glikosida flavonol, flavonol seperti kaempferol dan quercetin, myrcetin dan antosianin.⁹⁸

Hasil pada penelitian ini mendukung penelitian terdahulu, pada penelitian ini ekstrak etanol bunga telang dianalisis fitokimia senyawa dalam ekstrak. Ekstrak bunga telang terbukti positif mengandung senyawa golongan alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, dan terpenoid. Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa 60% ekstrak mengandung senyawa golongan flavonoid yang dibuktikan dengan flavonoid total rata-rata per-gram ekstrak adalah $682,0238 \text{ mg} \pm 9,48$. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa kandungan senyawa flavonoid bunga telang terbanyak adalah senyawa antosianin dengan berbagai struktur seperti ternatin A1, A2, B1, B2, D1, D2, Preternatin A3 dan A4, dan delphinidine.⁹⁸ Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa golongan flavonoid pada bunga telang yang paling berperan dalam aktivitas biologisnya.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah mengkonfirmasi bahwa senyawa antioksidan seperti flavonoid mampu menurunkan dan menjaga keseimbangan kadar ROS dengan cara meningkatkan pembentukan antioksidan.⁹⁹⁻¹⁰² Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler diantaranya pengaturan diferensiasi, proliferasi, migrasi, kelangsungan hidup, dan apoptosis¹⁰³. GPx atau adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis 2GSH teroksidasi menjadi molekul GSH stabil (GSSG) dan dua molekul air ($2\text{H}_2\text{O}$).⁸⁷ GSH teroksidasi diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan lipid, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Dengan demikian, GPx merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal.¹⁰⁴

Telah dilaporkan bahwa GPx adalah salah satu faktor yang menghambat degradasi kolagen akibat paparan sinar UV-B.¹⁰⁵ Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa iradiasi UV-B mampu menekan GPx secara signifikan, sedangkan diinduksi oleh paparan UV-B yang terus menerus dapat mengakibatkan stres fotooksidatif kronis^{106,107}. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang dapat menginduksi ekspresi gen GPx secara signifikan di bandingkan kelompok kontrol UV-B. Senyawa golongan flavonoid seperti quercetin membentuk ikatan hidrogen dengan Ser212 melalui gugus 3'-OH menyebabkan penghambatan aktivitas protein kinase kinase (MEK1). Quercetin juga menghambat aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan mengaktifasi protein kinase (MAPK) untuk menginduksi ekspresi enzim antioksidan.⁹⁵ Adanya

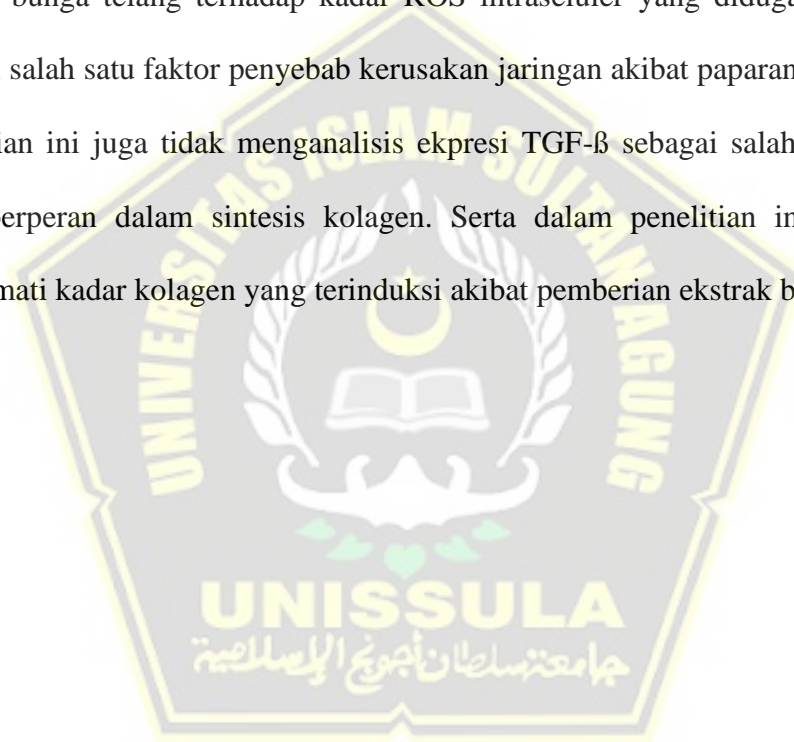
kemampuan senyawa golongan flavonoid sebagai antioksidan terbukti menurunkan kondisi stress oksidatif dengan meningkatkan enzim GPx.

Pada penelitian ini juga mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak bunga telang terhadap ekspresi gen PDGF akibat paparan UV-B. PDGF berperan menginduksi ekspresi TGF- β dalam jalur sintesis kolagen.^{86,108} TGF- β adalah sitokin fibrogenik prototipe, yang dapat meningkatkan ekspresi gen matriks ekstraseluler (ECM) dan mengatur penurunan enzim pendegradasi matriks melalui jalur SMAD, terutama terkait dengan sintesis kolagen.¹⁰⁹ Waktu yang tepat untuk proses sintesis kolagen dan berakhirnya sintesis kolagen merupakan indikator penting dalam proses perbaikan jaringan dan maturasi penyembuhan luka akibat paparan UV-B tanpa menimbulkan fibrosis. *Masive* TGF- β merupakan penyebab krusial aktivasi fibroblast menjadi myofibroblast sehingga akan mengekspresikan *α -smooth muscle actin* (α -SMA) untuk mengaktifkan sintesis kolagen. Pada penelitian ini, ekspresi PDGF meningkat pada pemberian ekstrak bunga telang secara tergantung dosis. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa struktur C-6 pada flavonoid menghambat ekspresi TGF- β /Smad dan PI3K/mTOR *signaling pathway*.¹¹⁰ Dengan struktur tersebut, maka ekspresi α -SMA juga terhadap dan menghambat sintesis kolagen. Struktur cicin B flavonoid juga berperan sebagai hidroksil penangkap radikal bebas, sehingga ROS yang dihasilkan akibat paparan sinar UV-B bisa ditekan.¹¹¹ Jika tidak terbentuk overekspresi ROS maka jalur aktivasi growth faktor tidak terhalang dan sintesis kolagen dapat terjadi secara normal.¹¹² Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak bunga telang dapat menghambat degradasi kolagen akibat paparan sinar UV-B.

Secara keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan dan menginduksi faktor pertumbuhan untuk mencegah efek paparan sinar UV-B terhadap sintesis kolagen. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen penginduksi produksi kolagen.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian ekstrak bunga telang terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UV-B. Penelitian ini juga tidak menganalisis ekspresi TGF- β sebagai salah satu protein yang berperan dalam sintesis kolagen. Serta dalam penelitian ini juga tidak mengamati kadar kolagen yang terinduksi akibat pemberian ekstrak bunga telang.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 5% dan 10% berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen GPx pada kulit tikus model yang diinduksi paparan sinar UV-B.
2. Pemberian gel ekstrak bunga telang dosis 5% dan 10% berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen PDGF pada kulit tikus model yang diinduksi paparan sinar UV-B.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel ekstrak bunga telang pada tikus model yang diinduksi UV-B.
2. Perlu pengamatan mekanisme molekuler pemberian ekstrak bunga telang secara *in vivo* terhadap TGF- β dan kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients* 2020. doi:10.3390/nu12020300.
- 2 Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *Journal of Functional Foods* 2020. doi:10.1016/j.jff.2020.103870.
- 3 Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY *et al.* Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Journal of Functional Biomaterials* 2020. doi:10.3390/jfb11010003.
- 4 Green AC, Hughes MCB, McBride P, Fournanier A. Factors associated with premature skin aging (photoaging) before the age of 55: A population-based study. *Dermatology* 2011. doi:10.1159/000322623.
- 5 Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *International Journal of Dermatology and Venereology* 2021. doi:10.1097/JD9.000000000000068.
- 6 Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z *et al.* Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017. doi:10.1080/10408398.2014.1003365.
- 7 Zasada M, Budzisz E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 2019. doi:10.5114/ada.2019.87443.
- 8 Cohen AJ, Lassová L, Golden EB, Niu Z, Adams SL. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006. doi:10.1002/jcb.20937.
- 9 Sadgrove NJ, Simmonds MSJ. Topical and nutricosmetic products for healthy hair and dermal antiaging using “dual-acting” (2 for 1) plant-based peptides, hormones, and cannabinoids. *FASEB BioAdvances*. 2021. doi:10.1096/fba.2021-00022.
- 10 Wongthai N, Tanticharakunsiri W, Mangmool S, Ochaikul D. Characteristics and antioxidant activity of royal lotus pollen, butterfly pea flower, and oolong tea kombucha beverages. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology* 2021. doi:10.14456/apst.2021.47.
- 11 Fitrilia T, Kurniawan MF, Kurniawati FR, Setiawan T. The POTENTIAL OF BUTTERFLY PEA FLOWER METHANOL EXTRACT AS AN ANTIOXIDANT BY IN SILICO. *Indonesian Journal of Applied Research (IJAR)* 2020. doi:10.30997/ijar.v1i3.64.
- 12 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. doi:10.1021/acs.jafc.5b00928.
- 13 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
 - 14 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2020; **70**: 7–30.
 - 15 Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 2015. doi:10.1111/phpp.12145.
 - 16 Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D'Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021; **2021**. doi:10.1155/2021/1208690.
 - 17 Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **129**: 994–1001.
 - 18 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2010; **174**: 299–306.
 - 19 Pittayaprupek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
 - 20 Saritani ATB, Wiraguna, Anak Agung Gde Putra, Maker LPII, 3. litoria 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. *Neurologico Spinale Medico Chirurgico* 2021; **4**: 109–113.
 - 21 Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH. Application of butterfly pea flower extract in mask development. *Scientia Pharmaceutica* 2018. doi:10.3390/scipharm86040053.
 - 22 Rahayu S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria Ternatea L.*) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap. *Skripsi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo* 2020.
 - 23 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. doi:10.1002/ptr.6045.

- 24 Zagórska-Dziok M, Ziemlewska A, Bujak T, Nizioł-Łukaszewska Z, Hordyjewicz-Baran Z. Cosmetic and dermatological properties of selected ayurvedic plant extracts. *Molecules* 2021. doi:10.3390/molecules26030614.
- 25 Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH. Application of butterfly pea flower extract in mask development. *Scientia Pharmaceutica* 2018. doi:10.3390/scipharm86040053.
- 26 Rahayu S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria Ternatea* L.) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap. *Skripsi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo* 2020.
- 27 Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2016. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.10.002.
- 28 Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, Canouil M, Cauchi S, Raverdy V *et al.* Increased hepatic PDGF-AA signaling mediates liver insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes. *Diabetes* 2018. doi:10.2337/db17-1539.
- 29 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CRC, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2007. doi:10.1016/j.jhep.2007.01.029.
- 30 Nagano K, Bornhauser BC, Warnasuriya G, Entwistle A, Cramer R, Lindholm D *et al.* PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO Journal* 2006. doi:10.1038/sj.emboj.7601059.
- 31 Zhou L, Shao CY, Xie YJ, Wang N, Xu SM, Luo BY *et al.* Gab1 mediates PDGF signaling and is essential to oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *Elife* 2020. doi:10.7554/eLife.52056.
- 32 Liu Q, Zhou Y, Li Z. PDGF-BB promotes the differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells through the Src/JAK2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 2018. doi:10.3892/mmr.2018.9351.
- 33 Heasley LE, Johnson GL. The β -PDGF receptor induces neuronal differentiation of PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell* 1992. doi:10.1091/mbc.3.5.545.
- 34 Laurence J, Elhadad S, Ahamed J. HIV-associated cardiovascular disease: Importance of platelet activation and cardiac fibrosis in the setting of specific antiretroviral therapies. *Open Heart* 2018; **5**. doi:10.1136/openhrt-2018-000823.
- 35 Reyhani V, Tsioumpekou M, van Wieringen T, Rask L, Lennartsson J, Rubin K. PDGF-BB enhances collagen gel contraction through a PI3K-PLC γ -PKC-cofilin pathway. *Scientific Reports* 2017; **7**. doi:10.1038/s41598-017-08411-1.
- 36 Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-13 mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. 1995.

- 37 Villa NA, Moreno W, Ceballos A. Activity of glutathione peroxydase and superoxide dismutase in whole blood, blood plasma and seminal plasma in normande bulls. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2008.
- 38 Higuchi M. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. Elsevier Inc., 2014, pp 181–199.
- 39 Buday K, Conrad M. Emerging roles for non-selenium containing ER-resident glutathione peroxidases in cell signaling and disease. *Biological Chemistry*. 2021; **402**: 271–287.
- 40 Deficient selenium status of a healthy adult Spanish Population. doi:10.1590/S0212-16112012000200026.
- 41 Bell JG, Pirie BJS, Adron JW, Cowey CB. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) . *British Journal of Nutrition* 1986; **55**: 305–311.
- 42 Santos KC, Magalhães ALR, Silva DKA, Araújo GGL, Fagundes GM, Ybarra NG *et al.* Nutritional potential of forage species found in Brazilian Semiarid region. *Livestock Science* 2017. doi:10.1016/j.livsci.2016.12.002.
- 43 Wu HY, Yang KM, Chiang PY. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules* 2018. doi:10.3390/molecules23061357.
- 44 Yildiz E, Guldaz M, Ellergezen P, Acar AG, Gurbuz O. Obesity-associated pathways of anthocyanins. *Food Science and Technology (Brazil)*. 2021. doi:10.1590/fst.39119.
- 45 Wang M, Firrman J, Liu LS, Yam K. A review on flavonoid apigenin: Dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota. *BioMed Research International*. 2019. doi:10.1155/2019/7010467.
- 46 Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A *et al.* The therapeutic potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. doi:10.3390/ijms20061305.
- 47 Chakraborty S, Sahoo S, Bhagat A, Dixit S. Cite This Article: Sriyeta Chakraborty, Souvagyalaxmi Sahoo, Anjana Bhagat, and Sangita Dixit. *International Journal of Research-Granthaalayah* 2017; **5**: 197–208.
- 48 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**: 783–799.
- 49 Mohan C. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF CLITORIA TERNATEA LINN., A VALUABLE MEDICINAL PLANT Molecular characterization of endangered medicinal plants, *Saraca asoca* and *Commiphora wightii* and their conservation through Micropropagation View project. <https://www.researchgate.net/publication/277247891>.
- 50 Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF-κB and AP-1 signaling pathways. *Asian*

- Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015. doi:10.7314/APJCP.2015.16.10.4277.
- 51 Aboonabi A, Meyer RR, Singh I, Aboonabi A. Anthocyanins reduce inflammation and improve glucose and lipid metabolism associated with inhibiting nuclear factor-kappaB activation and increasing PPAR- γ gene expression in metabolic syndrome subjects. *Free Radical Biology and Medicine* 2020. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.004.
- 52 Khan MS, Ali T, Kim MW, Jo MH, Jo MG, Badshah H *et al.* Anthocyanins protect against LPS-induced oxidative stress-mediated neuroinflammation and neurodegeneration in the adult mouse cortex. *Neurochemistry International* 2016. doi:10.1016/j.neuint.2016.08.005.
- 53 Shi X, Zhang B, Chu Z, Han B, Zhang X, Huang P *et al.* Wogonin Inhibits Cardiac Hypertrophy by Activating Nrf-2-Mediated Antioxidant Responses. *Cardiovascular Therapeutics* 2021. doi:10.1155/2021/9995342.
- 54 Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G. Apigenin inhibit release and gene expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in J774.2 macrophages. *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)* 2006.
- 55 Sanjay S, Girish C, Toi PC, Bobby Z. Quercetin modulates NRF2 and NF- κ B/TLR-4 pathways to protect against isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity in vivo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2021. doi:10.1139/cjpp-2021-0008.
- 56 Bhaskar S, Sudhakaran PR, Helen A. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway. *Cellular Immunology* 2016. doi:10.1016/j.cellimm.2016.08.011.
- 57 Bhaskar S, Helen A. Quercetin modulates toll-like receptor-mediated protein kinase signaling pathways in oxLDL-challenged human PBMCs and regulates TLR-activated atherosclerotic inflammation in hypercholesterolemic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2016. doi:10.1007/s11010-016-2824-9.
- 58 Basu A, Das AS, Sharma M, Pathak MP, Chattopadhyay P, Biswas K *et al.* STAT3 and NF- κ B are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2017. doi:10.1016/j.bbrep.2017.08.005.
- 59 Lee KM, Lee KW, Jung SK, Lee EJ, Heo YS, Bode AM *et al.* Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. *Biochemical Pharmacology* 2010. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.042.
- 60 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 61 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
- 62 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care* 2013; **2**: 5–10.

- 63 Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics* 2010; **28**: 93–105.
- 64 Edwards QA, Lunat I, Neale LDG, Kulikov SM. Water-Organic Solvent Media. 2015; **13**: 1218–1226.
- 65 Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SEG, Kang S, Fisher GJ *et al.* Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology* 2006; **168**: 1861–1868.
- 66 Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; **81**: 6098–6107.
- 67 Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC *et al.* Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; **32**: 428–438.
- 68 Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Frontiers in Microbiology* 2018; **8**: 1–13.
- 69 Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *The Journal of Cell Biology* 1967; **33**: 27–42.
- 70 Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science* 2005; **118**: 1341–1353.
- 71 Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 2020; : 1–16.
- 72 Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
- 73 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 74 Shoma Suresh K, Bhat S, Guru BR, Muttigi MS, Seetharam RN. A nanocomposite hydrogel delivery system for mesenchymal stromal cell secretome. *Stem Cell Research and Therapy* 2020; **11**: 1–14.
- 75 Waters R, Alam P, Pacelli S, Chakravarti AR, Rafeeq PH, Paul A *et al.* HHS Public Access. 2019; : 95–106.
- 76 Maxey J. AADE-11-NTCE-23 Viscosity and Gel Structure : The Unseen Results of Their Manipulation. 2011.
- 77 Trostyanskaya YB, Makarova SB, Aptova TA, Murashko IN. Hydrophobic and hydrophilic gels of various permeabilities prepared by copolymerization of styrene with p-divinylbenzene. *Polymer Science USSR* 1965; **7**: 2282–2289.

- 78 Cabral MES, Ramos AN, Macedo AJ, Trentin DS, Treter J, Manzo RH *et al.* Formulation and quality control of semi-solid containing harmless bacteria by-products: Chronic wounds pro-healing activity. *Pharmaceutical Development and Technology* 2015; **20**: 911–918.
- 79 Nair A, Jacob S, Al-Dhubiab B, Attimarad M, Harsha S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; **49**: 423–434.
- 80 Xie WJ, Zhang YP, Xu J, Sun XB, Yang FF, Kalia Y. The effect and mechanism of transdermal penetration enhancement of Fu's cupping therapy: New physical penetration technology for transdermal administration with Traditional Chinese Medicine (TCM) characteristics. *Molecules* 2017; **22**. doi:10.3390/molecules22040525.
- 81 Kom HH, Nageshwar M, Srilatha K, Reddy KP. Protective effect of quercetin on weight drop injury model-induced neuroinflammation alterations in brain of mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2019. doi:10.7324/JAPS.2019.90412.
- 82 Musaogullari A, Mandato A, Chai YC. Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation on Caspase-3 Activation: A Study With the Kinase Inhibitor Staurosporine. *Frontiers in Physiology* 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00998.
- 83 Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014; **2**. doi:10.3389/fenvs.2014.00053.
- 84 Huang H, Fu J, Tian H. Effects of quercetin and enalapril on amount of PDGF-B and VEGF-1 in kidney of diabetic rats. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005.
- 85 Takamura N, Renaud L, da Silveira WA, Feghali-Bostwick C. PDGF Promotes Dermal Fibroblast Activation via a Novel Mechanism Mediated by Signaling Through MCHR1. *Frontiers in Immunology* 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.745308.
- 86 Al-Qattan MM, Abd-Elwahed MM, Hawary K, Arafah MM, Shier MK. Myofibroblast expression in skin wounds is enhanced by collagen III suppression. *BioMed Research International* 2015; **2015**. doi:10.1155/2015/958695.
- 87 Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, Sakamoto T, Koumura T, Minagawa S *et al.* Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *The Journal of Immunology* 2019; **203**: 2076–2087.
- 88 Karan S, Dash P, Kaushik H, Sahoo PK, Garg LC, Dixit A. Structural and Functional Characterization of Recombinant Interleukin-10 from Indian Major Carp *Labeo rohita*. *Journal of Immunology Research* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/3962596.
- 89 Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery* 2015. doi:10.1097/SCS.0000000000001902.

- 90 You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC *et al.* Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants* 2019; **8**: 1–16.
- 91 Kumar A, Patel SV. Phytochemical analysis and bioactivity of selected medicinal plant of butterfly-pea (*Clitoria ternatea* L.) used by Kolam tribe Addjoing region of Telangana and Maharashtra states. 2019 <https://www.researchgate.net/publication/331166912>.
- 92 Ahmad BA, Zakariyya A, Abubakar M, Sani M, Ahmad MA. Pharmacological Activities of Banana. www.intechopen.com.
- 93 Wang Z, Wang Q, Wang L, Xu W, He Y, Li Y *et al.* Improvement of skin condition by oral administration of collagen hydrolysates in chronologically aged mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017; **97**: 2721–2726.
- 94 Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8379539.
- 95 Brunetti C, di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; **14**: 3540–3555.
- 96 Kim TY, Leem E, Lee JM, Kim SR. Control of reactive oxygen species for the prevention of parkinson's disease: The possible application of flavonoids. *Antioxidants* 2020; **9**: 1–28.
- 97 Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. 2001.
- 98 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.
- 99 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
- 100 Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA, Savarimuthu I. Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* 2017. doi:10.5772/68095.
- 101 Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sciences* 2018; **208**: 111–122.
- 102 Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 2014; **23**: 239–244.
- 103 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sciences* 2018; **210**: 201–208.
- 104 Richter K, Konzack A, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kietzmann T. Redox-fibrosis: Impact of TGFβ1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biology*. 2015; **6**: 344–352.

- 105 Li X, Zhang L, Xu YW, Wang C, Zhao Y, Yu P *et al.* The protective effects of 6-CySeCD with GPx activity against UVB-induced injury in HaCaT cells. *Australasian Journal of Dermatology* 2013; **54**: 120–125.
- 106 Oh CT, Lee D, Koo K, Lee J, Yoon HS, Choi YM *et al.* Superoxide Dismutase 1 Inhibits Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Ultraviolet B-Induced Melanogenesis in Murine Skin. *Annals of Dermatology* 2014; **26**: 681–687.
- 107 Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Frontiers in Plant Science* 2016; **6**: 1–10.
- 108 Karamichos D. Regulation of corneal fibroblast morphology and collagen. *Journal of Tissue Viability* 2009; **33**: 1–15.
- 109 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 110 Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y *et al.* Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.
- 111 Yuslianti ER, Bachtiar BM, Suniarti DF, Sutjiatmo AB, Mozef T. Effect of rambutan-honey and its flavonoid on TGF- β 1 induce fibroplasia oral wound healing. *Research Journal of Medicinal Plant* 2016; **10**: 435–442.
- 112 Ismardianita E, Elianora D, Rosalina W, Nofrike L, Khairani VY. The effectiveness methanol extract clausena excavate on number of fibroblast and density of collagen fibers after tooth extraction. 2019; **4**: 170–175.