

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Clitoria ternatea*
TERHADAP EKSPRESI GEN MMP-3 DAN EKSPRESI
GEN α -SMA PADA TIKUS MODEL YANG DIINDUKSI
UVB**

Tesis

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



Magister Ilmu Biomedik

Nugraheni Itsnal Muna

MBK2016010216

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Clitoria ternatea*
TERHADAP EKSPRESI GEN MMP-3 DAN
EKSPRESI GEN α -SMA PADA TIKUS MODEL YANG
DIINDUKSI UVB**

Disusun oleh :

Nugraheni Itsnal Muna

MBK. 2016010216

telah dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 22 Agustus 2022

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui, Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,


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

NIK. 8951110021


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

NIK. 210199050

Mengetahui,

Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Unissula


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, 22 Agustus 2022



(Nugraheni Itsnal Muna)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Nugraheni Itsnal Muna
 Tempat / tanggal lahir : Semarang, 23 April 1986
 Agama : Islam
 Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Nurul Islam : 1990 – 1992
2. SDN Ngaliyan 5 : 1992 – 1998
3. SMPN 1 Semarang : 1998 – 2001
4. SMAN 3 Semarang : 2001 – 2004
5. S1 Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang : 2004 – 2008
6. Profesi Dokter UNDIP Semarang : 2008 – 2010
7. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA Semarang : 2020 – sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
 - Ayah : Prof. DR. HM. Amin Syukur, M.A (alm)
 - Ibu : Dra. Hj. Fathimah Usman, M.Si (almh)
2. Nama Saudara : Ratih Rizqi Nirwana, S.Si., M.Pd.
3. Nama Suami : Bagus Panuntun Nugrohadi, S.E
4. Nama Anak : Alvaro Firaz Bagaskara
 Shaqila Emily Avani

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Mahaesa, sehingga tesis penulis berjudul, **“Pengaruh Pemberian Ekstrak *Clitoria Ternatea* Terhadap Ekspresi Gen MMP-3 dan Ekspresi Gen α -SMA pada Tikus Model yang Diinduksi UVB”** ini dapat terselesaikan.

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

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH,SE, M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc.Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K) dan Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med, selaku dosen pembimbing I dan II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan thesis.
5. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF, Dr. Ir. Titik Sumarawati, M.Kes, Dr. Atina Husana selaku dosen penguji I, II, dan III yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk mereview dan memberikan masukan dalam pembuatan thesis ini.

6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan thesis.
7. Mbak Dina, Mbak Syifa, Mas Iffan, Mas Husein, serta tim laboratorium SCCR lainnya yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian untuk thesis ini.
8. Suami, Bagus beserta kedua anak yang telah memberikan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan thesis ini dengan baik
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini.

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, Juni 2022

(Nugraheni Itsnal Muna)

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Clitoria ternatea* TERHADAP EKSPRESI GEN MMP-3 DAN EKSPRESI GEN α -SMA PADA TIKUS MODEL YANG DIINDUKSI UVB

Latar belakang: Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab penurunan kolagen melalui peningkatan kadar stress oksidatif dan penurunan ekspresi *growth factor*. Ekstrak *C. ternatea* (*Clitoria ternatea*) mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan. Namun, peran ekstrak *C. ternatea* terhadap ekspresi gen MMP-3 dan α -SMA pada pembentukan kolagen hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi MMP-3 dan α -SMA pada kulit tikus model 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 *C. ternatea* 5% (P1) dan kelompok perlakuan gel ekstrak *C. ternatea* 10% (P2). Kelompok kontrol UVB, P1, dan P2 diberi perlakuan UVB dengan 302 nm energi 160 mJ/cm² selama 5 hari. Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 diberikan gel ekstrak bunga telang pada hari ke-6 sampai hari ke-14. Pada hari ke 15 semua kelompok perlakuan diterminasi dan dianalisis ekspresi gen MMP-3 dan α -SMA menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Pada kelompok perlakuan gel ekstrak *C. ternatea* 10% didapatkan penurunan ekspresi gen MMP-3 ($0,73 \pm 0,26$) dan peningkatan ekspresi gen α -SMA ($16,4 \pm 8,3$) dibandingkan dengan kelompok kontrol UVB memiliki ekspresi gen MMP-3 ($3,24 \pm 1,05$) dan ekspresi gen α -SMA ($0,1 \pm 0,0$).

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak *C. ternatea* 10% berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan ekspresi gen MMP-3 dan peningkatan ekspresi gen α -SMA.

Kata Kunci: Ekstrak *C. ternatea*, MMP-3, α -SMA

ABSTRACT

THE EFFECT OF *Clitoria ternatea* EXTRACT ON MMP-3 GENE EXPRESSION AND α -SMA GENE EXPRESSION IN UVB-INDUCED MODEL RATS

Background: UVB radiation is the main factor causing collagen decline through increased levels of oxidative stress and decreased expression of growth factors. *C. ternatea* (*Clitoria ternatea*) extract contains various secondary metabolites that have antioxidant activity. However, the role of *C. ternatea* extract on MMP-3 and α -SMA gene expression on collagen formation is still unclear. This study aimed to determine the effect of administration of *C. ternatea* extract in the form of a gel on the expression of MMP-3 and α -SMA in the skin of rat models induced by UVB light exposure.

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 5% *C. ternatea* extract gel treatment group (P1) and a 10% *C. ternatea* extract gel treatment group (P2). UVB, P1, and P2 control groups were given UVB treatment with 302 nm energy of 160 mJ/cm² for 5 days. In the treatment groups P1 and P2 were given the gel of telang flower extract on the 6th day until the 14th day. On day 15, all treatment groups were terminated and the expression of MMP-3 and α -SMA genes analyzed using qRT-PCR.

Results: In the 10% *C. ternatea* extract gel treatment group, there was a decrease in MMP-3 gene expression (0.73 ± 0.26) and an increase in α -SMA gene expression (16.4 ± 8.3) compared to the UVB control group which had gene expression. MMP-3 (3.24 ± 1.05) and α -SMA gene expression (0.1 ± 0.0).

Conclusion: The administration of 10% *C. ternatea* extract gel had a significant effect on decreasing MMP-3 gene expression and increasing α -SMA gene expression.

Keywords: *C. ternatea* extract, MMP-3, α -SMA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	16
1.1 Latar Belakang	16
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis	4
1.5 Originalitas Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)	7
2.1.1 Definisi dan Fungsi α -Smooth Muscle Actin.....	7

2.1.2 Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen.....	7
2.2 Matrix metalloproteinases (MMPs)	9
2.2.1 Definisi.....	9
2.2.2 Peran dan Mekanisme Seluler MMP-3 dalam Proses <i>Photoaging</i>	10
2.3 Ekstrak <i>C. ternatea</i>	13
2.3.1 Definisi <i>C. ternatea</i>	13
2.3.2 Manfaat <i>C. ternatea</i> dalam Medis.....	14
2.3.3 Manfaat <i>C. ternatea</i> dalam Menekan Inflamasi.....	14
2.3.4 Manfaat <i>C. ternatea</i> untuk Meningkatkan Kolagen.....	15
2.4 Penuaan Kulit	16
2.5 Tikus Model yang Diinduksi UVB	17
2.5.1 Klasifikasi Tikus Putih.....	17
2.5.2 Karakteristik Tikus Putih sebagai Hewan Uji.....	17
2.6 Gel	18
2.6.1 Definisi dan Karakteristik	18
2.6.2 Kelebihan dan Kekurangan	19
2.6.3 Klasifikasi	21
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	23
3.1. Kerangka Teori.....	23
3.2 Kerangka Konsep.....	25
3.3 Hipotesis.....	25
BAB IV METODE PENELITIAN	26
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	26
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	27
4.2.1 Variabel Penelitian.....	27

4.2.2 Definisi Operasional.....	27
4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	29
4.3.1 Subjek Penelitian.....	29
4.3.2 Sampel Penelitian.....	29
4.3.3 Cara Pengambilan Sampel Penelitian	30
4.3.4 Besar Sampel.....	30
4.4 Alat dan Bahan.....	31
4.4.1 Alat.....	31
4.4.2 Bahan.....	31
4.5 Cara Penelitian	31
4.5.1 Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	31
4.5.2 Cara Pembuatan Ekstrak <i>C. ternatea</i>	32
4.5.3 Penetapan Dosis	32
4.5.4 Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan ..	32
4.5.5 Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen MMP-3 dan α -SMA menggunakan RT-PCR	33
4.5.6 Pengambilan Sampel Jaringan	34
4.5.7 Uji Kualitatif Ekstrak <i>C. ternatea</i>	35
4.5.8 Pemeriksaan Flavonoid Total Ekstrak <i>C. ternatea</i>	36
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.7 Analisis Data	37
4.8 Alur Penelitian.....	38
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Hasil Penelitian	40
5.1.1 Hasil Determinasi, Uji Kualitatif dan Flavonoid Total <i>C. ternatea</i>	40
5.1.2 Analisis Ekspresi Gen MMP-3.....	41

5.1.3 Analisis Ekspresi Gen α -SMA	43
5.2 Pembahasan.....	45
5.3 Kelemahan Penelitian.....	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	50
6.1 Kesimpulan	50
6.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	59

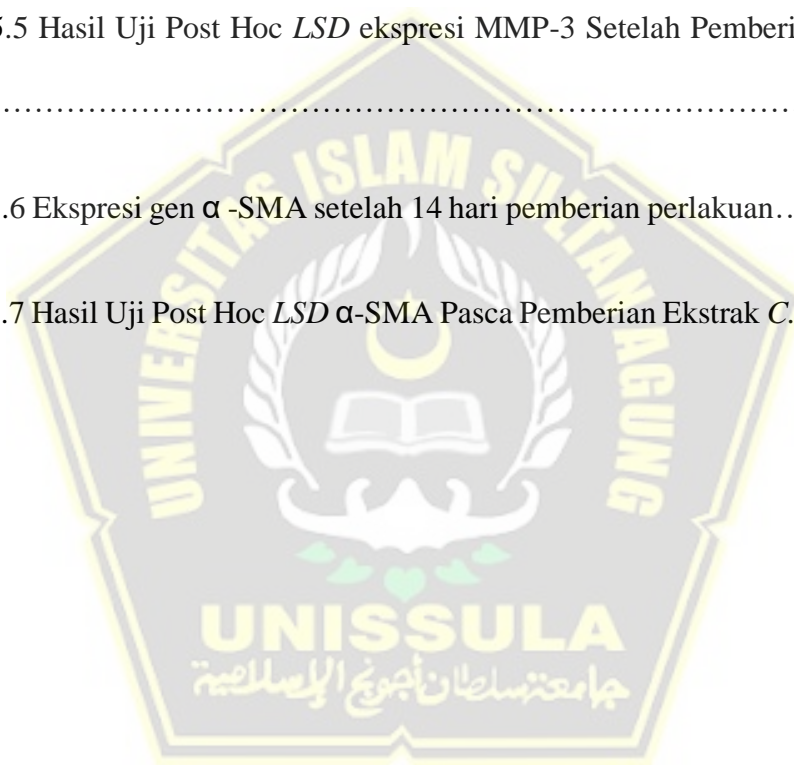


DAFTAR SINGKATAN

UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
α -SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNFR1	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
UVA	: <i>Ultraviolet A</i>
FA	: <i>Focal Adhesion</i>
EDA-FN	: <i>Extra-Domain A Containing Fibronectin</i>
LAP	: <i>Latency Associated Peptide</i>
MRTF	: <i>Myocardin-Related Transcription Factor</i>
SRF	: <i>Serum Response Factor</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
MAPKs	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
$^1\text{O}_2$: <i>Oksigen Singlet</i>
O_2^-	: <i>Anion Superoksida</i>
H_2O_2	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
OH	: <i>Radikal Hidroksil</i>
ERKs	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
JNK	: <i>c-Jun NH₂-Terminal Kinase</i>
Nrf2	: <i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>

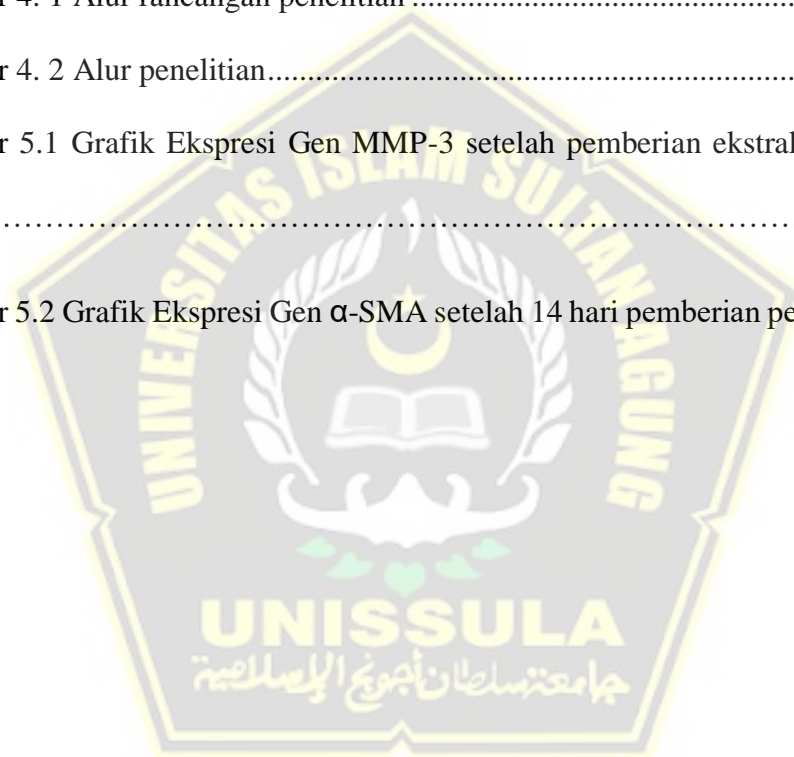
DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1 Originalitas penelitian.....	5
Tabel 5.1 Hasil uji determinasi.....	40
Tabel 5.2 Kandungan ekstrak <i>C. ternatea</i>	41
Tabel 5.3 Kandungan flavonoid total.....	42
Tabel 5.4 Ekspresi MMP-3 hari ke-14 setelah pemberian perlakuan	43
Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc <i>LSD</i> ekspresi MMP-3 Setelah Pemberian Perlakuan	44
Tabel 5.6 Ekspresi gen α -SMA setelah 14 hari pemberian perlakuan.....	45
Tabel 5.7 Hasil Uji Post Hoc <i>LSD</i> α -SMA Pasca Pemberian Ekstrak <i>C. ternatea</i> ...41	



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β	9
Gambar 2. 2 Peran MMPs dalam Proses <i>Photoaging</i>	11
Gambar 3. 1 . Kerangka Teori.....	24
Gambar 3. 2 Kerangka Konsep	25
Gambar 4. 1 Alur rancangan penelitian	26
Gambar 4. 2 Alur penelitian.....	38
Gambar 5.1 Grafik Ekspresi Gen MMP-3 setelah pemberian ekstrak <i>C. ternatea</i>	43
Gambar 5.2 Grafik Ekspresi Gen α -SMA setelah 14 hari pemberian perlakuan...	45



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paparan iradiasi UVB pada kulit menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species (ROS)* sehingga mengaktifasi inflamasi dan inaktivasi proliferasi sel fibroblast serta menurunkan kolagen kulit^{1,2}. Inaktivasi proliferasi sel fibroblast ditandai dengan penurunan ekspresi gen *alpha smooth muscle actin (α -SMA)* dan peningkatan ekspresi gen *matrix metalloproteinase (MMP)* seperti MMP-3³⁻⁵. Paparan UV berlebih dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen sehingga terjadi penurunan kadar kolagen pada kulit^{6,7,8}. Terapi yang umum diterapkan dalam mengurangi efek kondisi penurunan kolagen masih terbatas pada zat kimia seperti tretinoin yang dilaporkan memiliki efek samping berupa iritasi⁸.

α -SMA adalah stress fibers yang terlibat dalam aktivitas kontraktile fibroblas dan reorganisasi kolagen^{9,10}. α -SMA diekspresikan oleh myofibroblast yang merupakan bentuk aktif dari fibroblast¹⁰. Myofibroblast yang teraktivasi akan berhenti berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix (ECM)*, termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak^{10,11}. α -SMA yang diekspresikan oleh myofibroblast merupakan sumber utama kolagen fibrillar, yaitu kolagen tipe I, II, III, V, dan XI yang

sangat penting untuk tensile strength dan mechanical properties kulit, sehingga photoaging tidak terjadi¹².

Clitoria ternatea merupakan tumbuhan yang sudah banyak dimanfaatkan karena diketahui memiliki kandungan senyawa antioksidan kuat seperti antosianin yang mampu mengurangi kadar ROS. Penggunaan *C. ternatea* pada kulit masih langka dilakukan sedangkan tanaman ini memiliki antosianin yang bermanfaat pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat menekan produksi MMP-3 yang berujung pada penghambatan degradasi kolagen^{13,14,15}. Selain itu, penurunan kadar ROS juga mampu menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu produksi TGF- β 1 yang berperan dalam produksi kolagen dengan mengaktifasi kompleks smad2/3 dan mengaktifasi myofibroblast sehingga dapat mengekspresikan α -SMA¹⁶.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian ekstrak mengandung antosianin secara topikal ataupun oral dapat menurunkan ROS²⁰ sehingga berpotensi untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* yang diberikan terhadap ekspresi gen MMP-3 dan ekspresi gen α -SMA pada kulit tikus yang terinduksi UVB kronis. Berlatarbelakang masalah tersebut, penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* terhadap ekspresi gen MMP-3 serta dan ekspresi gen α -SMA pada kulit tikus yang mengalami penurunan kolagen akibat paparan sinar UVB. Selain itu penelitian ini juga bertujuan membandingkan ekspresi gen MMP-3 serta dan ekspresi gen α -SMA antara dua dosis pemberian topikal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan permasalahan penelitian yaitu apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi gen MMP-3 dan α -SMA tikus yang diinduksi sinar UVB?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi gen MMP-3 dan α -SMA pada tikus yang diinduksi sinar UVB.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui penurunan ekspresi gen MMP-3 pada tikus yang diinduksi UVB setelah pemberian gel ekstrak *C. ternatea* pada dosis (P1) 5% dan (P2) 10% dibandingkan kontrol.
2. Mengetahui peningkatan ekspresi gen α -SMA pada tikus yang diinduksi UVB setelah pemberian gel ekstrak *C. ternatea* pada dosis (P1) 5% dan (P2) 10% dibandingkan kontrol.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Secara teoritis manfaat yang diberikan dari penelitian ini adalah menyajikan ilmu pengetahuan terkait peran pemberian ekstrak *C. ternatea* terhadap ekspresi gen MMP-3 dan ekspresi gen α -SMA pada tikus yang diinduksi UVB.

1.4.2 Manfaat Praktis

Secara praktis manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah menjadi data dasar bagi penelitian terapan lanjutan yang bernuara pada produksi produk untuk terapi penurunan kolagen akibat paparan UVB.



1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1. 1 Originalitas penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Saritani ATB, Wiraguna AAGP, Maker LPII, 2021 ¹⁷	Clitoria ternatea L. extract cream 5% inhibits the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in Wistar rats (Rattus norvegicus) dermic skin exposed to ultraviolet B	In vivo, eksperimental	Terjadi penurunan MMP-1 dan Peningkatan Kolagen
2	Adhikary R, Sultana S, Bishayi B., 2018 ¹⁸	Clitoria ternatea Flower Petals: Effect of TNFR1 Neutralization Via Downregulation of Synovial Matrix Metalloproteinase	In vivo, eksperimental	Pemberian ekstrak <i>C. ternatea</i> meningkatkan kadar TNFR1 dan menurunkan kadar MMP 2 sinovial
3	Rahayu S, 2020 ¹⁹	Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol <i>C. ternatea</i> (Clitoria Ternatea L.) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap	In vitro, eksperimental	Kadar flavonoid dan kandungan antioksidan ekstrak <i>C. ternatea</i> Wonosobo lebih tinggi dibandingkan dari Lombok Utara
4	Zakaria NNA, Okello EJ, Howes MJ, Birch-Machin MA, Bowman A, 2018 ²⁰	In vitro protective effects of an aqueous extract of Clitoria ternatea L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes	In vivo, eksperimental	Ekstrak <i>C. ternatea</i> menekan kerusakan
5	Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH., 2018 ²¹	Application of butterfly pea flower extract in mask development	In vivo, eksperimental	Terjadi peningkatan tingkat kecerahan dan kelembaban kulit

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian Saritani et al., 2021 adalah parameter yang dianalisis pada penelitian tersebut adalah MMP-1 dan kolagen, sedangkan penelitian yang akan dilakukan menganalisis parameter MMP-3 dan α -SMA. Penelitian Adhikary et al., 2017 berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan karena penelitian ini meneliti kadar TNFR1 dan MMP 2 pada synovial, sedangkan pada penelitian ini membandingkan MMP 3 dan α -SMA di kulit. Pada penelitian Rahayu S, 2020 berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan karena pada penelitian tersebut menguji kadar antioksidan sedangkan pada penelitian ini menganalisis parameter MMP-3 dan α -SMA. Penelitian yang dilakukan oleh Zakaria et al., 2018 juga berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan, karena penelitian tersebut dilakukan secara in vitro pada populasi sel keratinosit, sedangkan penelitian yang akan dilakukan dilakukan secara in vivo pada tikus model *wrinkle skin*. Penelitian Chen et al., 2018 juga berbeda dengan penelitian ini karena penelitian tersebut menilai peningkatan kecerahan dan kelembaban kulit, sedangkan penelitian ini menganalisis parameter MMP-3 dan α -SMA kulit secara biomolekuler.

Berdasarkan Tabel 1.1 investigasi untuk mengetahui pengaruh ekstrak *C. ternatea* terhadap ekspresi gen MMP-3 dan ekspresi gen α -SMA pada tikus yang diinduksi UVB belum dilakukan, sehingga penelitian penelitian dengan “Pengaruh Pemberian Ekstrak Clitoria Ternatea Terhadap ekspresi gen Mmp-3 Dan ekspresi gen α -SMA (Studi Ekspreimental In Vivo Tikus Galur Wistar yang Dipapar Sinar UVB yang akan dilakukan masih layak untuk dilakukan karena memiliki novelitas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)

2.1.1 Definisi dan Fungsi α -Smooth Muscle Actin

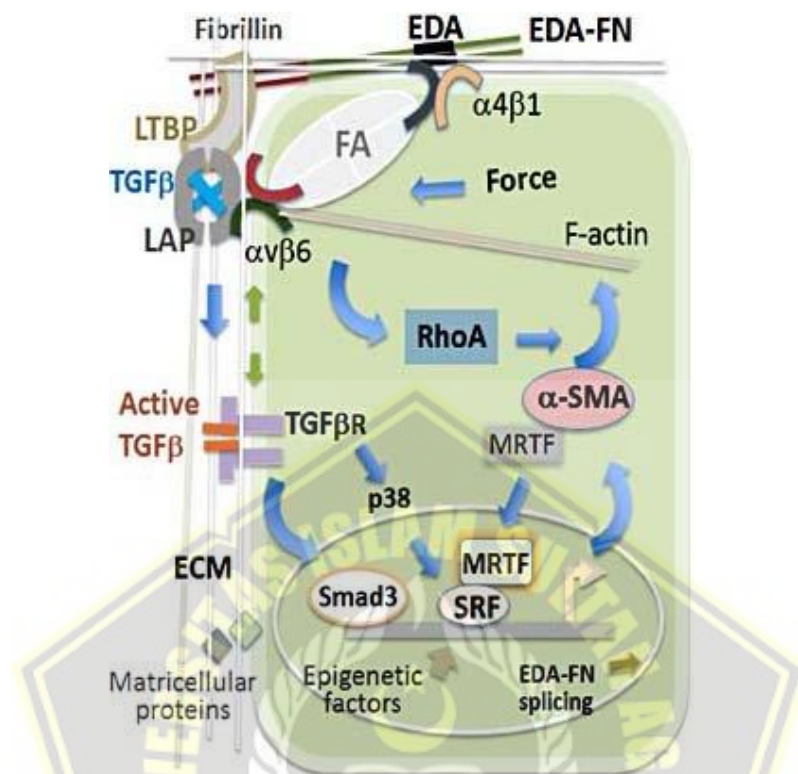
Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) adalah isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42 kD^{9,16,23}. α -SMA diekspresikan oleh *myofibroblast* dan ekspresi α -SMA berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast*^{9,16}. *Myofibroblast* merupakan bentuk sel fibroblas yang telah berdiferensiasi sebagian menuju fenotipe *smooth-muscle* termasuk ke dalam fibroblas metabolik, dan memiliki morfologis yang khas²⁴. *Myofibroblast* yang teraktivasi akan berhenti berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak^{11,16}. α -SMA yang diekspresikan oleh *myofibroblast* merupakan sumber utama kolagen fibrillar, yaitu kolagen tipe I, II, III, V, dan XI yang sangat penting untuk *tensile strength* dan *mechanical properties* kulit, sehingga *photoaging* tidak terjadi¹².

2.1.2 Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen

Paparan UV dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen⁷. Kolagen merupakan ECM paling penting di dermis kulit, sehingga hilangnya kolagen secara langsung dapat menyebabkan kulit kendur, menua, dan

menurunnya elastisitas^{5,6}. Paparan UV juga dapat menginduksi penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel yang disebut dengan *photoaging*⁹. *Photoaging* merupakan perubahan karakteristik pada kulit akibat paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi radikal bebas dan peroksidasi lipid dalam sel dan merusak serat kolagen dan serat elastis di jaringan dermal²⁵. Untuk berinteraksi dengan serat kolagen, fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler, seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler, seperti α -SMA²⁶. α -SMA adalah *stress fibers* yang terlibat dalam aktivitas kontraktile fibroblas dan reorganisasi kolagen⁹. *Myofibroblast* yang mengekspresikan α -SMA diregulasi oleh sitokin *transforming growth factor beta* (TGF- β)²⁷. TGF- β 1 yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β *receptor* (TGF- β R) yang menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA. Transduksi mekanis ECM ke sel melalui jalur *focal adhesion* (FA) mengaktifkan RhoA yang mengarah pada produksi *stress fibers* α -SMA. Selain itu, *extra-domain A containing fibronectin* (EDA-FN) yang diaktifkan TGF- β 1 meningkatkan protein EDA-FN dalam ECM dan kontraksi sel yang dilakukan oleh *stress fibers* α -SMA mengubah konformasi *latency associated peptide* (LAP) melalui interaksi integrin/LAP yang melepaskan TGF- β 1 dari LAP. Perakitan G-aktin (monomer α -SMA) menjadi F-aktin (*stress fibers*) memungkinkan keluarnya *myocardin-related transcription factor* (MRTF) dari sekuestrasi G-aktin di sitosol dan translokasi nuklirnya serta aktivasi *serum response factor* (SRF), yang pada gilirannya menyebarkan α -SMA dan produksi

stress fibers (Gambar 2.1)²⁸. Produksi α -SMA yang meningkat menyebabkan terjadinya sintesis kolagen dan dapat memodulasi remodeling kolagen^{9,29}.



Gambar 2. 1 Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β ²⁸

2.1 Matrix metalloproteinases (MMPs)

2.2.1 Definisi

Matrix metalloproteinases (MMPs) adalah endopeptidase yang mengandung zinc dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix* (ECM)^{30,31,32}. Berdasarkan struktur dan spesifisitas substratnya, MMPs dapat dikategorikan ke dalam lima subkelompok utama, yaitu (1) kolagenase (MMP-1, MMP-8 dan MMP-13); (2) gelatinase (MMP-2 dan MMP-9); (3) stromelisin (MMP-3, MMP-10 dan MMP-11); (4) matrilisin (MMP-

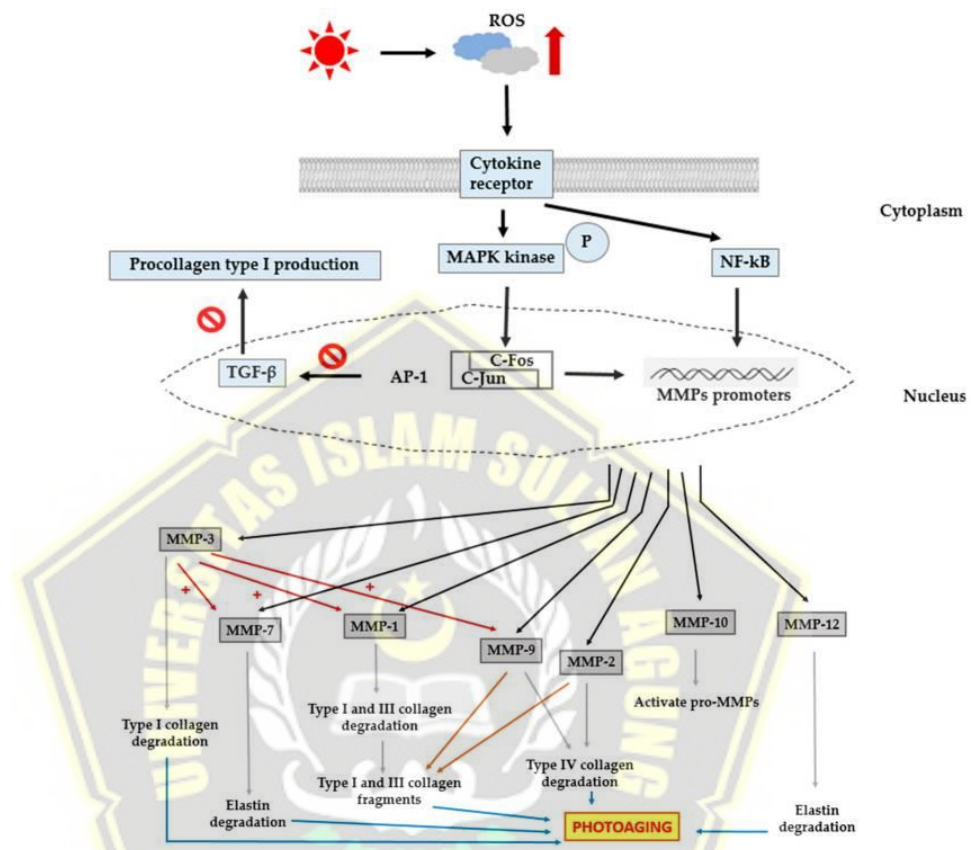
7 dan MMP-26); dan (5) MMP tipe membran (MT) (MMP-14, MMP-15, dan MMP-16)³³. Endopeptidase ini disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dermal sebagai respons terhadap berbagai rangsangan seperti stres oksidatif, radiasi *ultraviolet*, dan sitokin³⁴.

Hingga saat ini, setidaknya ada 28 jenis MMPs yang berbeda telah diidentifikasi dan memainkan peran penting dalam berbagai proses patofisiologis termasuk penyembuhan luka, pertumbuhan tulang dan *remodelling*, arthritis, inflamasi, angiogenesis, kanker, dan *photoaging*^{30,35,36}. Beberapa penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa radiasi UV meningkatkan setidaknya tiga MMPs yang berbeda pada kulit manusia secara *in vivo*, yaitu *interstitial collagenase* (MMP-1), *stromelysin-1* (MMP-3), dan 92 -kD *gelatinase* (MMP-9)^{37,38,39}. Ketiga MMP ini diatur secara kuat oleh faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1), yang secara cepat diinduksi dan diaktifkan oleh radiasi UV pada kulit manusia secara *in vivo* serta memiliki kapasitas untuk mendegradasi sebagian besar protein yang menyusun ECM dermal^{40,41,42}.

2.2.2 Peran dan Mekanisme Seluler MMP-3 dalam Proses *Photoaging*

Photoaging merupakan perubahan karakteristik pada kulit yang disebabkan oleh paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi stres oksidatif pada kulit manusia dan menyebabkan kerusakan genetik temporal dan persisten, peningkatan regulasi aktivitas *activator protein* (AP)-1, dan peningkatan ekspresi MM⁴³⁻⁴⁶. Dalam proses *photoaging*, *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler berlebih yang diinduksi UV mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase*

(MAPKs) dan *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) yang berpuncak pada regulasi transkripsi MMP, dan menghasilkan degradasi kolagen dan elastin, yang berlanjut ke *photoaging* (Gambar 2.2).



. **Gambar 2. 2** Peran MMPs dalam Proses *Photoaging*³³

Menariknya, di antara MMPs yang diekspresikan pada kulit manusia normal, hanya tiga yang diinduksi secara signifikan sebagai respons terhadap penyinaran *ultraviolet* (UV), yaitu MMP-1 (kolagenase), MMP-3 (stromelysin-1), dan MMP-9 (92kD gelatinase). Di kulit, keratinosit epidermis dan fibroblas dermal mensekresi kolagenase MMP-1 yang yang mendegradasi kolagen fibrilar tipe I dan III menjadi fragmen-fragmen spesifik di dalam triple heliks sentral. Gelatinase MMP-9 kemudian menghidrolisis fragmen ini yang pada akhirnya merusak fungsi

dermis kaya kolagen^{33,35,47}. Iradiasi UV menginduksi peningkatan sintesis dan ekspresi gen MMP-1 oleh fibroblast dermal, yang dirangsang oleh pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) berlebih, dan memainkan peran penting dalam penurunan kolagen. Iradiasi UV menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^\cdot) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)⁴⁸. *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun³³. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dan mengakibatkan degradasi kolagen^{32,48}. Selain itu, AP-1 menghambat *transforming growth factor-β* (TGF-β) yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen tipe I pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen^{49,50}. Selain AP-1, ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF-κB dan regulasi ekspresi gen MMP. Aktivitas NF-κB bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas dermal^{51,52}. Aktivasi AP-1 yang diinduksi UV meningkatkan ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. Ketiga MMP tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronektin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktifasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama

pergantian ECM. Produksi MMP-1 dan MMP-3 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-1^{36,53}.

2.2 Ekstrak *C. ternatea*

2.2.1 Definisi *C. ternatea*

C. ternatea (*Clitoria ternatea*) atau *Butterfly Pea Flower* merupakan tumbuhan perenial yang termasuk dalam famili Fabaceae dan berasal dari Amerika Selatan. *C. ternatea* telah menyebar ke daerah tropik sejak abad 19 termasuk Indonesia⁵⁴. Tumbuhan ini tidak memerlukan intensitas cahaya yang tinggi untuk tumbuh sehingga mampu tumbuh dengan lebat di bawah naungan seperti di perkebunan karet dan kelapa. Menurut Cronquist and Takhtadzhian (1981) *C. ternatea* secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut:

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

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 antosianin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi⁵³.

2.2.2 Manfaat *C. ternatea* dalam Medis

Penggunaan *C. ternatea* dalam pengobatan tradisional telah mendorong para peneliti untuk menjelaskan aktivitas farmakologi ekstrak yang diperoleh dari berbagai bagian *C. ternatea*. Sejumlah penelitian pada hewan coba telah melaporkan bahwa ekstrak menunjukkan sifat diuretik, nootropik, antiasma, anti-inflamasi, analgesik, antipiretik, antidiabetik, antilipidemik, anti-rematik, antioksidan, dan penyembuhan luka. Sifat *C. ternatea* tersebut diketahui disebabkan oleh adanya alkaloid, flavonoid, antosianin dan siklotida yang telah dilaporkan memiliki sifat immunosupresif^{54,55}.

2.2.3 Manfaat *C. ternatea* dalam Menekan Inflamasi

Senyawa flavonoid seperti antosianin yang terkandung dalam *C. ternatea* diketahui dapat menekan inflamasi serta hipersensitivitas pada penderita asma dengan menghambat aktivasi NF-kB sehingga berkorelasi terhadap penurunan konsentrasi mediator pro-inflamasi⁵⁶. Senyawa Apigenin yang melimpah terkandung dalam petal *C. ternatea* mampu menekan ekspresi gen mediator pro-inflamasi MCP-1. Penelitian terdahulu juga melaporkan adanya kandungan kaempferol dan quercetin pada *C.*

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

2.2.4 Manfaat *C. ternatea* untuk Meningkatkan Kolagen

Berdasarkan penelitian terdahulu Paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF alpha yang berakibat pada peningkatan enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) serta penurunan densitas kolagen. Peningkatan produksi MMP-3 juga dapat berakibat pada aktivasi α -SMA yang merupakan protein kunci dalam apoptosis sel, termasuk sel fibroblast yang merupakan sel utama memproduksi kolagen⁵⁷. Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit sehingga berujung pada hilangnya kekenyalan kulit hingga timbulnya kerutan pada kulit.

Hingga saat ini kajian mengenai peran *C. ternatea* dalam memperbaiki kulit yang mengalami penuaan dini akibat paparan UVB masih jarang dilakukan. Namun berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada *C. ternatea* terdapat kemungkinan *C. ternatea* dapat memperbaiki kulit yang mengalami Penuaan dini. Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam *C. ternatea* diketahui mampu menghambat jalur NF-

kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF alpha. Penurunan factor inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti. Selain itu Turunnya factor inflamasi TNF alpha dapat menurunkan aktivasi α -SMA sehingga proses apoptosis sel kulit, termasuk sel fibroblast, dapat terhenti. Hal ini akan menyebabkan dapat terbentuknya kolagen dan kembalinya kekenyalan serta hilangnya kerutan kulit⁵⁸ .

2.3 Penuaan Kulit

Penuaan kulit ditandai oleh proses intrinsik dan ekstrinsik⁵⁹ . Penuaan intrinsik atau kronologis ditentukan secara genetik dan merupakan proses yang tak terhindarkan di kulit. Kulit yang menua secara intrinsik ditandai dengan kelemahan dan beberapa garis ekspresi yang berlebihan^{60,61} . Secara histologis, epidermis lebih tipis dengan pendataran dermal-epidermal *junction*. Hilangnya luas permukaan antarmuka dermal-epidermal berkontribusi pada peningkatan kerapuhan kulit dan pengurangan transfer nutrisi antara dermis dan epidermis. Pergantian sel epidermis menurun, yang dapat menyebabkan penyembuhan luka lebih lambat dan deskuamasi kurang efektif^{62,63} . Dermis menjadi atrofi dengan berkurangnya jumlah fibroblas dan terjadi penurunan jaringan adiposa subdermal. Jumlah dan diameter berkas serat kolagen menurun seiring bertambahnya usia dan rasio kolagen tipe III terhadap kolagen tipe I meningkat⁶² .

2.4 Tikus Model yang Diinduksi UVB

2.4.1 Klasifikasi Tikus Putih

Klasifikasi tikus putih (*Rattus novergicus*) menurut Wilson *et al.* (2005) adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Animalia*

Phylum : *Chordata*

Subphylum : *Vertebrata*

Class : *Mamalia*

Ordo : *Rodentia*

Family : *Muridae*

Genus : *Ratus*

Spesies : *Rattus novergicus*

2.4.2 Karakteristik Tikus Putih sebagai Hewan Uji

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

kemudahan pemeliharaan, siklus hidup yang pendek, dan sumber daya genetik yang melimpah⁶⁴.

Tikus merupakan jenis hewan omnivora dengan kebutuhan pakan setiap harinya sebanyak 10%-15% dari bobot tubuhnya yang dipengaruhi oleh temperatur kandang, kelembaban, kesehatan tikus, dan kualitas makanan itu sendiri. Kebutuhan minum tikus kira-kira sebanyak 15-30 mL air yang bergantung pada kandungan air pada pakannya⁶⁵.

2.5 Gel

2.5.1 Definisi dan Karakteristik

Gel adalah sediaan semipadat yang dimaksudkan untuk aplikasi pada kulit atau selaput lendir yang dapat dijangkau seperti rongga mulut. Gel terdiri dari dua sistem interpenetrasi dimana partikel koloid, juga dikenal sebagai gelator atau *gellant* didistribusikan secara merata di seluruh media dispersi atau pelarut dan membentuk matriks tiga dimensi yang dikenal sebagai gel. Gel dibuat dengan bahan pembentuk gel (*gelling agent*) yang dapat berupa polimer alami, sintetik atau semi-sintetik. Polimer dalam gel bertindak sebagai *backbone* matriks gel yang memberi kekuatan struktural pada gel, meningkatkan daya rekat ke permukaan tempat pengaplikasian dan menurunkan permeasi molekul yang lebih besar sehingga memungkinkan retensi⁶⁶.

Gel dapat bersifat reversibel atau ireversibel berdasarkan jenis ikatannya. Gel reversibel terbentuk karena adanya ikatan hydrogen,

sedangkan gel ireversibel terbentuk karena adanya ikatan kovalen. Gel dapat terlihat sebagai sistem tunggal tanpa *apparent boundaries* atau sebagai sistem dua fase dengan flokulan partikel diskrit. Pada saat pembentukan gel, terjadi *swelling* akibat penetrasi pelarut yang menyebabkan jaringan polimer meregang dan menahan bentuknya serta *entwining* partikel obat di dalamnya⁶⁷.

2.5.2 Kelebihan dan Kekurangan

Beberapa keuntungan utama bentuk sediaan gel dibandingkan bentuk sediaan semipadat lainnya adalah sebagai berikut⁶⁷:

Gel lebih mudah diformulasikan dibandingkan dengan bentuk sediaan semipadat lainnya.

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

- h. *Gelling agent* dapat mengendap dan mengakibatkan *in salting out*.
 - i. Beberapa obat dapat terdegradasi dalam formulasi gel karena adanya polimer⁶⁶.
- 3 Gel memberikan daya sebar dan sensasi dingin yang sangat baik karena penguapan pelarut.
- 4 Gel dapat digunakan untuk memformulasikan obat yang bersifat polar dan non-polar.

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

Efek gel relatif lebih lambat dan berkelanjutan.

- a. *Gelling agent* yang digunakan dapat menyebabkan iritasi.
- b. Kadar air yang tinggi dapat meningkatkan kemungkinan kontaminasi pada gel.
- c. Sineresis dapat terjadi pada gel selama masa penyimpanan.
- d. Penguapan pelarut dari formulasi dapat menyebabkan pengeringan gel.
- e. Ikatan kovalen yang terdapat pada beberapa gel dapat membuatnya menjadi *unbreakable* sehingga bahan aktif obat akan terperangkap di dalam matriks gel.
- f. Flokulasi dalam beberapa gel dapat menghasilkan gel yang tidak stabil.
- g. Rheologi beberapa gel dapat berubah karena pengaruh suhu, kelembaban dan faktor lingkungan lainnya.

2.6.3 Klasifikasi

Berdasarkan sifat pelarut, afinitasnya, dan keadaan fisiknya, gel diklasifikasikan menjadi dua kelompok yaitu organogel dan hidrogel.

a. Organogel

Organogel atau *oleaginousgels* terdiri dari bagian polar dan non-polar dengan rasio bagian non-polar lebih tinggi. Adanya bagian polar dan nonpolar memungkinkan sediaan yang akan digunakan dengan obat hidrofilik dan hidrofobik. Organogel mengandung 35% air karena gel cenderung *swelling* dalam air. Organogelator biasanya merupakan molekul kecil dengan berat molekul rendah yang memiliki kemampuan untuk mengentalkan pelarut anorganik. Beberapa contoh organogelator antara lain sterol, turunan kolesteril antrakuinon dan disakarida.

b. Hidrogel

Hidrogel adalah sistem polimer yang dapat dibentuk melalui *cross-linking* fisika atau kimia dari homopolimer atau kopolimer, yang bila dikenakan lingkungan berair menghasilkan *swelling*. Hidrogel mengandung sebagian besar air sebanyak 90% dari total kandungan gel. Hidrogel bersifat biokompatibel dan merupakan pilihan yang paling menguntungkan dalam implikasinya sebagai sistem modifikasi permukaan. Hidrogel adalah sistem tiga dimensi yang kompleks dimana inti *meshwork* polimer memiliki kemampuan menyerap air dalam jumlah besar. Predileksi polimer dan pelarut, serta jenis dan tingkat *cross-linking* memberikan tingkat *swelling* pada hidrogel. Hidrogel bersifat sangat

berpori yang dapat meningkatkan kemampuan untuk menahan bahan aktif obat yang tersebar sebagai koloid atau dapat larut dalam air. Hidrogel dapat dimodifikasi menjadi *hydrogel slabs*, mikropartikel, nanopartikel, *coatings* dan *films*.



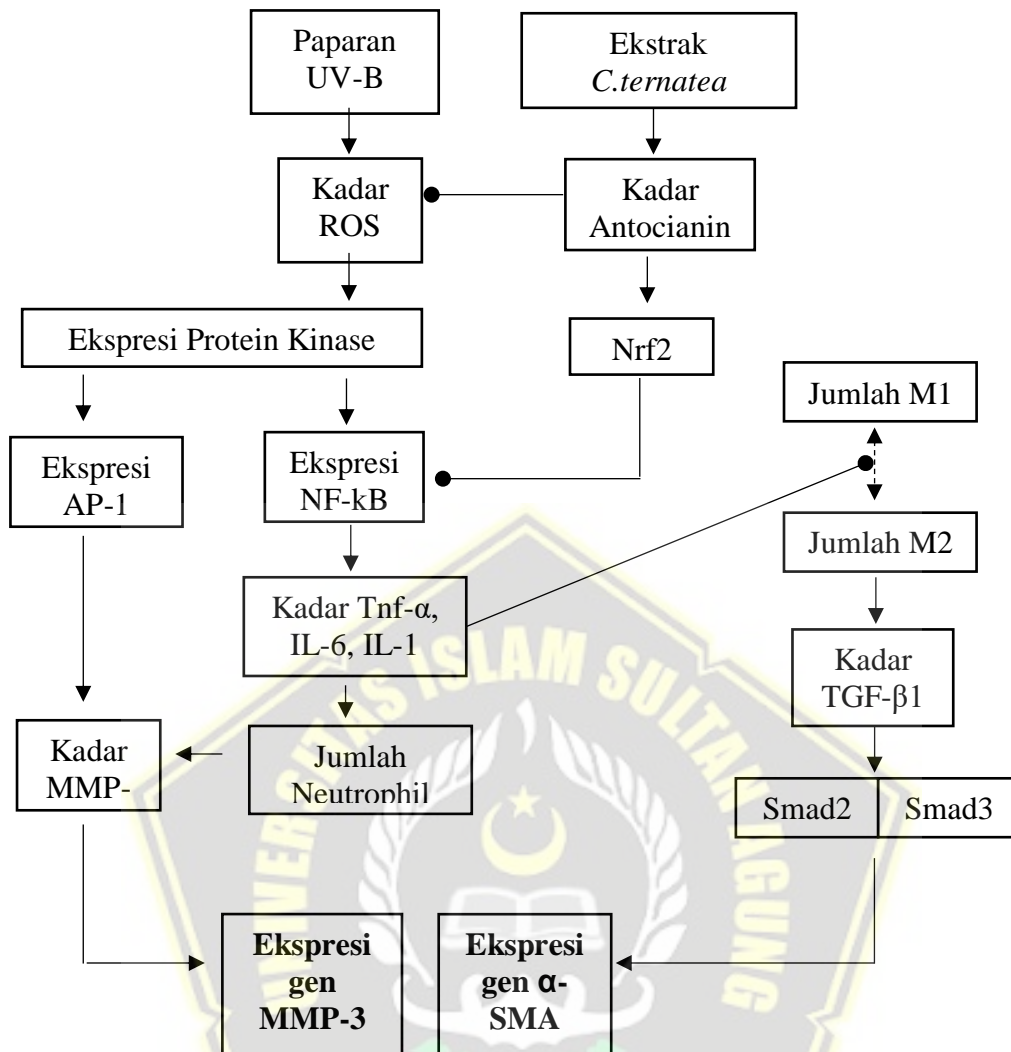
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

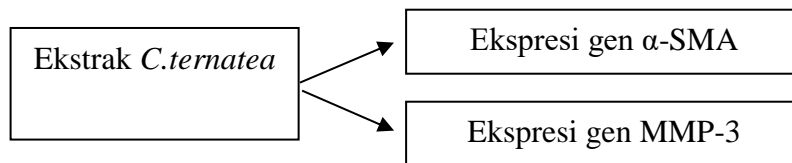
Paparan sinar UVB secara kronis menyebabkan mekanisme penurunan kolagen, penetrasi UVB pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS meningkatkan peningkatan ekspresi protein kinase yang memicu transkripsi faktor protein-1 (AP-1) dan memicu pembentukan enzim MMP-3.

C. ternatea diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid. Flavonoid yang banyak terdapat dalam *C. ternatea* antara lain terdiri antosianin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi⁵³. Antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah aktivasi NF-kB dan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF alpha. Selain itu antosianin juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang dapat memblokir jalur *TNF alpha*. Pemblokiran TNF alpha oleh Nrf2 dapat mencegah terjadinya sekresi sitokin inflamasi. Penurunan sitokin inflamasi memicu polarisasi makrofag tipe 1 menjadi makrofag tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi serta mampu mensekresi TGF-beta yang dapat mengaktifasi fibroblas menjadi myofibroblas yang ditandai ekspresi α -SMA. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 . Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep

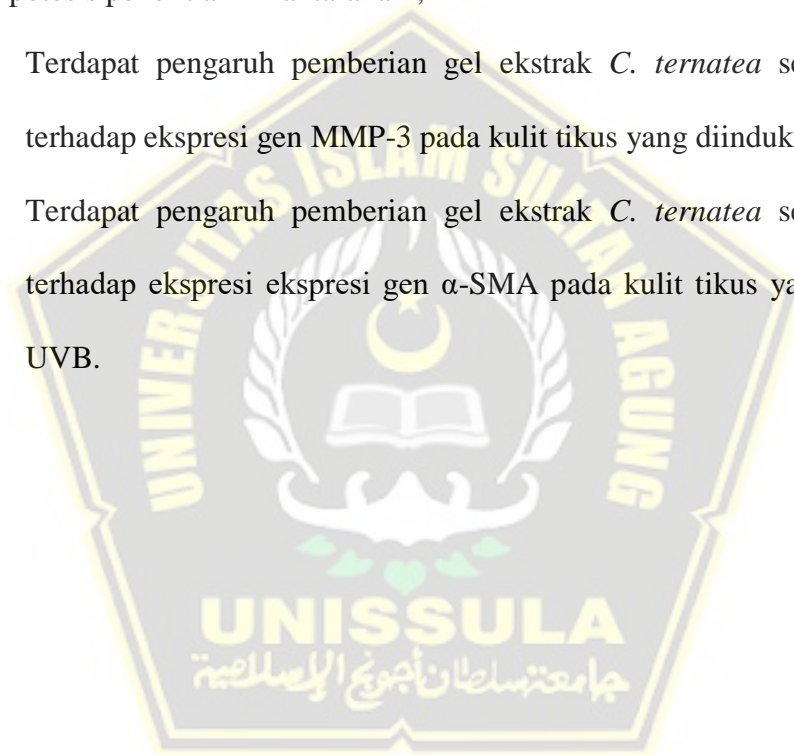


Gambar 3. 2 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini antara lain,

1. Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak *C. ternatea* secara topikal terhadap ekspresi gen MMP-3 pada kulit tikus yang diinduksi UVB.
2. Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak *C. ternatea* secara topikal terhadap ekspresi ekspresi gen α -SMA pada kulit tikus yang diinduksi UVB.



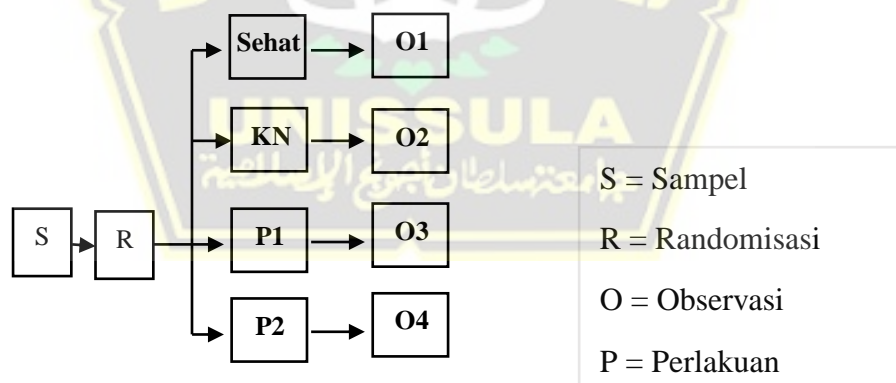
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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

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



Gambar 4. 1 Alur rancangan penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini terdiri dari Pemberian Gel Ekstrak *C. ternatea* dosis 5% dan 10% secara topikal¹⁷ .

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah ekspresi gen MMP-3 dan ekspresi gen α -SMA.

4.2.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak *C. ternatea*

adalah cairan kental hasil proses ekstraksi remaserasi terhadap serbuk bunga Bunga Telang (*Clitorea ternatea*) dengan pelarut etanol 96%.

Unit : mg

Skala : nominal

2. Gel ekstrak *C. ternatea*

adalah sediaan gel yang mengandung ekstrak bunga telang dengan variasi dosis 5% dan 10%

Unit : mg

Skala : nominal

3. Paparan UV-B

adalah paparan sinar *ultraviolet* dengan panjang gelombang sebesar 302 nm dan energi 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 5 hari pada punggung tikus yang dicukur bulunya.

Unit : λ

Skala : rasio

4. Ekspresi gen MMP-3

Adalah ekspresi gen MMP-3 yang merupakan endopeptidase yang mengandung *zinc* dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix*. Ekspresi gen MMP-3 dianalisis dari jaringan kulit yang diambil pada hari ke 15 setelah pemberian perlakuan. Analisis menggunakan metode qRT-PCR

Unit : ekspresi relatif

Skala : rasio

5. Ekspresi gen α -SMA

Adalah ekspresi gen α -SMA yang merupakan isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42 kD. Ekspresi gen α -SMA dianalisis dari jaringan kulit yang diambil pada hari ke 15 setelah pemberian perlakuan. Analisis menggunakan metode qRT-PCR

Unit : ekspresi relatif

Skala: rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian dan dipapar sinar UVB 302 nm dengan energi 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari⁶⁸.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar
2. Umur 2-3 bulan.
3. Tikus sehat
4. Berat badan 200-250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

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

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

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

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal mengikuti ketentuan WHO yaitu sebanyak minimal 5 ekor per jenis perlakuan dikali dengan jumlah waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari ke 15 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan untuk membuat hewan model yang terdiri dari UVB *light* (Philips TL 20W/01 Narrowband UVB). Puncak emisi 302 nm diukur menggunakan UV meter, dengan energi 160 mJ/cm² diukur menggunakan rumus ($UV\ erythema\ dose = (UV_{Ery} \times 3600s\ per\ hour)$), alat potong rambut elektrik, kandang paparan, kandang pemeliharaan, dan tempat air minum tikus. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan data antara lain pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data terdiri dari *microplate reader*, mikroskop binokular, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop dengan RAM 2GB.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri aquades, ketamin, *xylazine water base gel*, etanol, akuades, pakan tikus, dan kloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak *C. ternatea*

Bunga *C. ternatea* sebanyak ± 600 gram dicacah, didehidrasi pada suhu 50 – 60° C dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol 95% kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol dihilangkan dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga membentuk ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 2-8°C.

4.5.3. Penetapan Dosis

Dosis pemberian ekstrak *C. ternatea* baik secara topical atau pun oral ditentukan sebelum penelitian dengan studi literatur. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dosis ekstrak *C. ternatea* sebanyak 5% dan 10% untuk penggunaan secara topikal mampu menunjukkan aktivitas antinflamasi yang berujung pada perbaikan kolagen kulit¹⁷. Sehingga penelitian ini menggunakan dosis 5% dan 10% pada pemberian ekstrak *C. ternatea* secara topical. Penggunaan *C. ternatea* dilakukan setiap hari sebanyak 2 mg/tikus sehingga dosis ekstrak *C. ternatea* yang digunakan adalah 0,1 mg/tikus untuk dosis 5% dan 0,2 mg/tikus untuk dosis 10%.

4.5.4. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diadaptasi selama 5 hari setelah sampai di tempat penelitian.

2. Tikus dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb) secara intra muskular sebanyak 0,5 mL.
3. Rambut pada bagian punggung tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm.
4. Punggung tikus dipapar dengan UVB yang berjarak 20 cm dengan energi 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari ⁸⁴.
5. Tikus Perlakuan 1 diberi perlakuan gel ekstrak *C. ternatea* 5% secara topikal yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari. Tikus pada Perlakuan 2 diberi perlakuan ekstrak *C. ternatea* 10% secara topikal yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari.

4.5.5. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen MMP-3 dan α -SMA menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA ⁷⁵

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

2. Penentuan Ekspresi Gen MMP3 ⁷⁶

Gen MMP-3 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR *Master mix solution* (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL

dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

Table 4.3. komponen PCR Mix MMP-3

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward MMP-3	5'- CACTCACAGACCTGACT
	Reverse MMP-3	CGGTT-3 5'- AAGCAGGATCACAGTTG GCTGG-3'
Primer	Forward α -SMA	5' – GCGTGAGATTGTCCGTG ACAT-3
	Reverse α -SMA	5' – GCGTTCGTTTCCAATGGT GAT-3'
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
Cdna	SYBR Green	

4.5.6 Pengambilan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan jaringan. Jaringan kulit diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan kulit kemudian disimpan pada larutan RNA later pada suhu -80°C .

4.5.7 Uji Kualitatif Ekstrak *C. ternatea*

1. Pemeriksaan Kandungan Alkaloid⁹²

Pemeriksaan kandungan alkaloid menggunakan pemeriksaan *Wagner*. Prosedur pemeriksaan *Wagner* ini menggunakan ekstrak *C. ternatea* sebanyak 3 mL diletakkan dalam cawan porselin kemudian ditambahkan 5 mL HCl 2 M, diaduk dan didinginkan pada temperatur ruangan. Ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes dan ditambahkan pereaksi *Wagner*. Terbentuknya endapan menandakan adanya kandungan alkaloid.

2. Pemeriksaan Kandungan Saponin⁹²

Pemeriksaan kandungan saponin menggunakan pemeriksaan *Forth*. Prosedur pemeriksaan *Forth* menggunakan ekstrak *C. ternatea* sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok selama 30 detik kemudian diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk busa yang menetap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

3. Pemeriksaan Kandungan Tanin⁹²

Pemeriksaan kandungan tanin menggunakan pemeriksaan FeCl_3 1%. Prosedur pemeriksaan FeCl_3 1% adalah 3 mL ekstrak *C. ternatea* dicampur aquades panas kemudian dinginkan ekstrak. Tambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila filtrat mengalami perubahan warna maka identifikasi menunjukkan adanya tanin.

4. Pemeriksaan Kandungan Flavonoid⁹²

Pemeriksaan kandungan flavonoid menggunakan pemeriksaan *Wilstater*. Prosedur pemeriksaan *Wilstater* adalah sebanyak 3 mL ekstrak *C. ternatea* diuapkan, dicuci dengan heksana sampai jernih. Residu kemudian dilarutkan dalam 20 mL etanol kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mL HCl dan logam Mg. Diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna filtrat dari merah tua hingga jingga menunjukkan adanya flavonoid.

5. Pemeriksaan Kandungan Steroid dan Triterpenoid⁹²

Pemeriksaan kandungan steroid dan triterpenoid menggunakan pemeriksaan *Lieberman-Burchard*. Prosedur pemeriksaan *Lieberman-Burchard* adalah ekstrak diuapkan sampai kering. Kemudian ditambahkan kedalamnya 10 mL heksana dan diaduk selama beberapa menit lalu biarkan. Selanjutnya diuapkan diatas penangas air dan ditambahkan 0,1 g Na₂SO₄ anhidrat lalu diaduk. Larutan disaring sehingga diperoleh filtrat. Kemudian filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi asam asetat glasial dan H₂SO₄. Perubahan warna menjadi merah hingga ungu menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid.

4.5.8 Pemeriksaan Flavonoid Total Ekstrak *C. ternatea*

1. Pembuatan Kurva Standar Quersetin⁹³

Metode untuk penentuan kandungan total flavonoid dengan membuat kurva kalibrasi standar quersetin. Prosedur pembuatan larutan quersetin dengan membuat variasi konsentrasi larutan quersetin sebesar 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/L yang masing-masing larutan diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 0,1 mL CH₃COONa 1 M. Campuran didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit, dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum

pada salah satu konsentrasi. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengukur absorbansi dari masing-masing fraksi.

2. Penentuan Total Flavonoid Ekstrak *C. ternatea*⁹³

Penentuan total flavonoid pada ekstrak *C. ternatea* adalah masing-masing fraksi ditimbang 0,06 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol. Larutan tersebut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 0,1 mL CH₃COONa 1 M. Campuran kemudian didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 433 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran panjang gelombang ini kemudian dibandingkan dengan kurva standar quersetin.

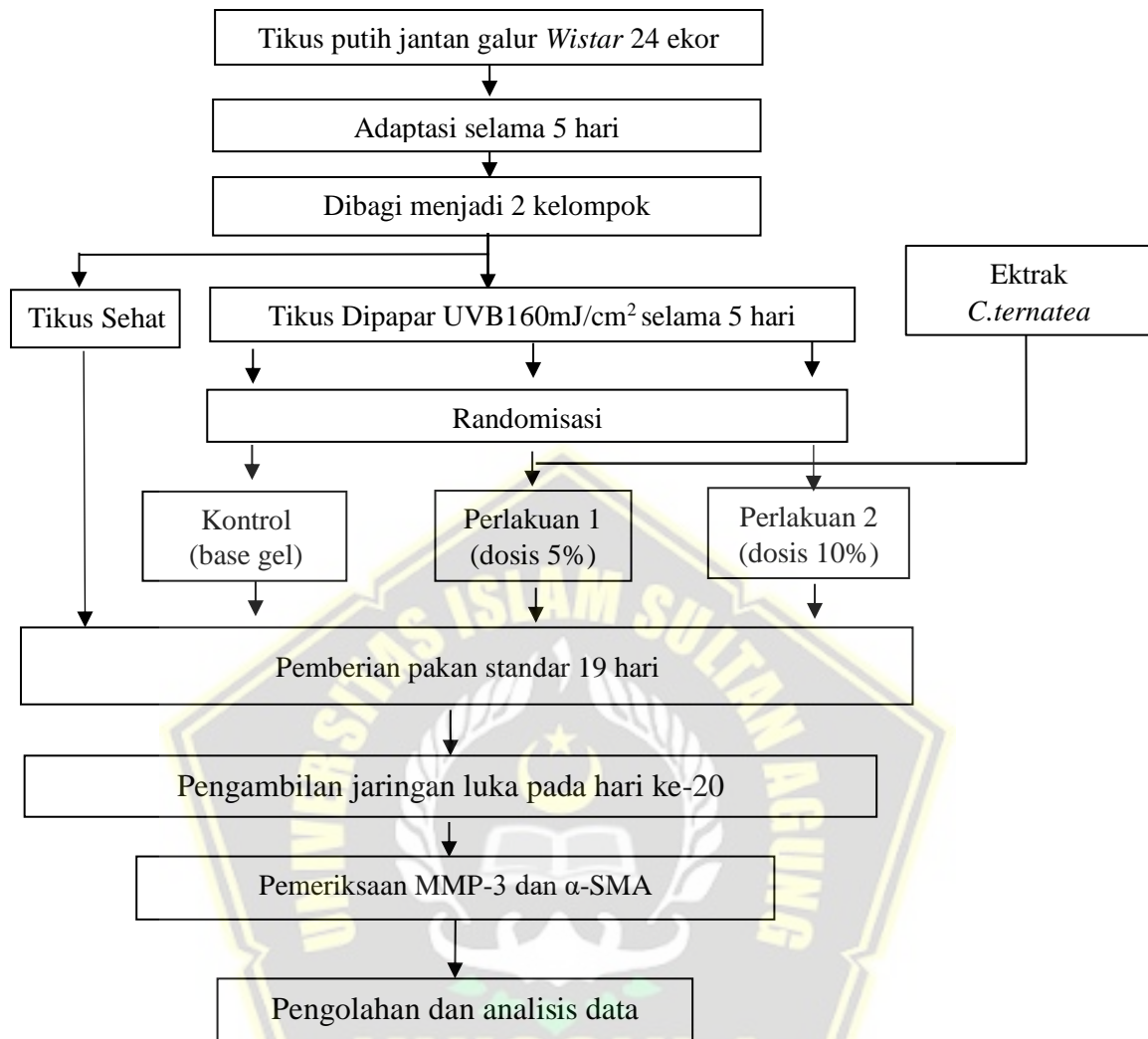
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di lab SCCR Unissula Semarang. Penelitian dilakukan pada Juli-Agustus 2022.

4.7 Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang dihasilkan normal dan homogen, sehingga dilakukan uji beda *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD dan Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* yang dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh Ekstrak bunga telang terhadap ekspresi gen MMP-3 dan α -SMA pada tikus yang terpapar UVB. Simplisia bunga telang dilakukan determinasi dan dianalisis kandungan flavonoid yang terkandung menggunakan metode kualitatif.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Determinasi, Uji Kualitatif dan Flavonoid Total *C. ternatea*

Uji determinasi dilakukan di laboratorium UPT Laboratorium Terpadu UNDIP dengan nomor seri: DT.01.03/7/986/2022 dengan hasil pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil uji determinasi

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

Ekstrak *C. ternatea* memiliki beberapa kandungan senyawa aktif yang tercantum dalam tabel 5.2.

Tabel 5.2. Kandungan ekstrak *C. ternatea*

Zat aktif	Metode
Alkaloid	Wagner
Saponin	Forth
Tanin	FeCl ₃ 1%
Flavonoid	Wilstater
Triterpenoid	Lieberman Burchard

Kandungan flavonoid total dilakukan secara 3 kali pengulangan didapatkan hasil seperti pada tabel 5.3.

Tabel 5.3. Kandungan flavonoid total

Extract Concentration	TPC (mg/1 gram ekstrak)
1000 ppm	690,21
1000 ppm	671,64
1000 ppm	684,21
Rata-rata	± 682,02

Kandungan flavonoid total dari ekstrak *C. ternatea* yang digunakan dalam penelitian ini ± 682,02mg setiap 1 gram ekstrak *C. ternatea*.

5.1.2. Analisis Ekspresi Gen MMP-3

Hasil analisis ekspresi gen MMP-3 pada hari ke-14 pasca pemberian perlakuan didapatkan data sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 5.4. Uji *Saphiro Wilk* digunakan untuk mengetahui normalitas data. Berdasarkan uji tersebut, data ekspresi gen MMP-3 yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan nilai normal ($p > 0,05$). Data ekspresi gen MMP-3 pada hasil penelitian yang tergolong normal kemudian dilanjutkan analisis menggunakan

uji beda parametrik *One Way Anova* dengan uji post hoc menggunakan *LSD*. Berdasarkan analisis *One Way Anova* didapatkan bahwa ekspresi gen MMP-3 menunjukkan bahwa data ekspresi MMP-3 pada hari ke-14 pasca pemberian perlakuan berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Tabel 5.4. Ekspresi MMP-3 hari ke-14 setelah pemberian perlakuan

	Sehat (pg/mL)	Kontrol (pg/mL)	P1 (pg/mL)	P2 (pg/mL)	Sig.
Ekspresi Gen MMP-3	1,01±0,01	3,24±1,05	1,11±0,15	0,73±0,26	
<i>Sapiro wilk</i>	0,80	0,78	0,60	0,15	>0,05
<i>Levene test</i>					>0,05
<i>One Way Anova</i>					<0,05

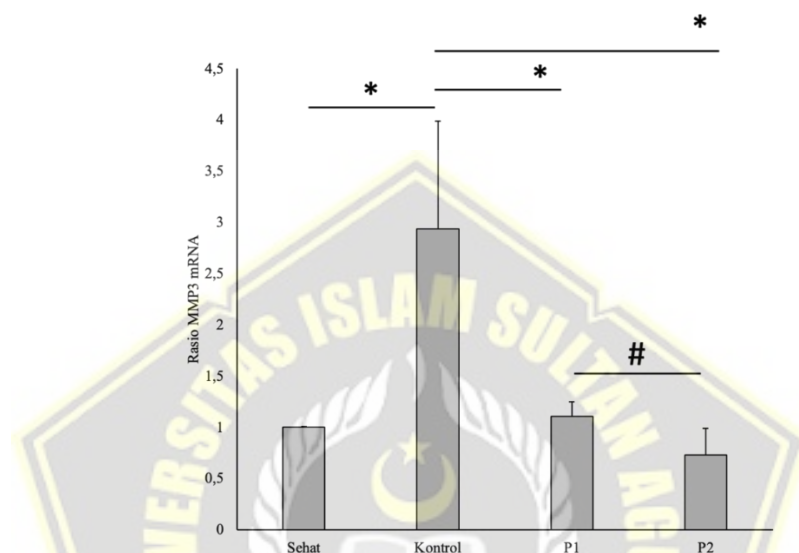
Berdasarkan hasil uji Post Hoc menggunakan uji *LSD* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.5 didapatkan bahwa terdapat signifikansi ekspresi gen MMP-3 antara P1 dan P2 dengan Kontrol ($p < 0,05$), namun tidak terdapat signifikansi ekspresi gen MMP-3 antara P1 dan P2 dengan Kelompok Sehat ($p > 0,05$). Data perbandingan gen MMP-3 antara P1 dan P2 tidak menunjukkan beda signifikan ($p > 0,05$).

Tabel 5.5. Hasil Uji Post Hoc *LSD* ekspresi MMP-3 Setelah Pemberian Perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sehat	Kontrol	0,01*	-3,84	-0,57
	P1	0,93	-1,71	1,57
	P2	0,70	-1,34	1,94
Kontrol	P1	0,01*	0,49	3,77
	P2	0,01*	0,87	4,15
P1	P2	0,63	-1,26	2,02

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

Berdasarkan Gambar 5.1 Data ekspresi gen MMP-3 menunjukkan bahwa perlakuan kontrol memiliki ekspresi gen MMP-3 paling tinggi dibandingkan dengan semua perlakuan, kemudian data juga menunjukkan bahwa ekspresi gen MMP-3 pada kedua perlakuan baik P1 dan P2 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol.



Gambar 5.1. Grafik Ekspresi Gen MMP-3 setelah perlakuan

5.1.3 Analisis Ekspresi Gen α -SMA

Hasil analisis ekspresi gen α -SMA pada ke-14 pasca induksi didapatkan data sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 5.6. Berdasarkan analisis data normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk* diketahui bahwa data ekspresi gen α -SMA yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan nilai normal ($p > 0,05$). Data ekspresi gen α -SMA yang tergolong normal kemudian dianalisis menggunakan uji beda parametrik *One Way Annova*. Berdasarkan analisis statistik didapatkan bahwa terdapat beda signifikan ekspresi gen α -SMA pada hari ke-14 setelah pemberian perlakuan ($p < 0,05$).

Tabel 5.6. Ekspresi gen α -SMA setelah 14 hari pemberian perlakuan

Pengamatan	Sehat (%)	Kontrol (%)	P1 (%)	P2 (%)	Sig.
Ekspresi gen α -SMA	1±0,0	0,1±0,0	3,4±1,3	16,4±8,3	
<i>Sapiro wilk</i>	0,42	0,98	0,95	0,53	>0,05
<i>Levene test</i>					>0,05
<i>One Way Annova</i>					<0,05

Berdasarkan analisis Post Hoc menggunakan uji *LSD* didapatkan ekspresi gen α -SMA pada perlakuan P1 dan P2 berbeda secara signifikan dibandingkan dengan perlakuan Kontrol dan Sehat ($p < 0,05$). Selain itu perbandingan ekspresi gen α -SMA pada P1 berbeda nyata dengan P2 ($p < 0,05$). Hasil uji Post Hoc secara lengkap ditampilkan pada tabel 5.7.

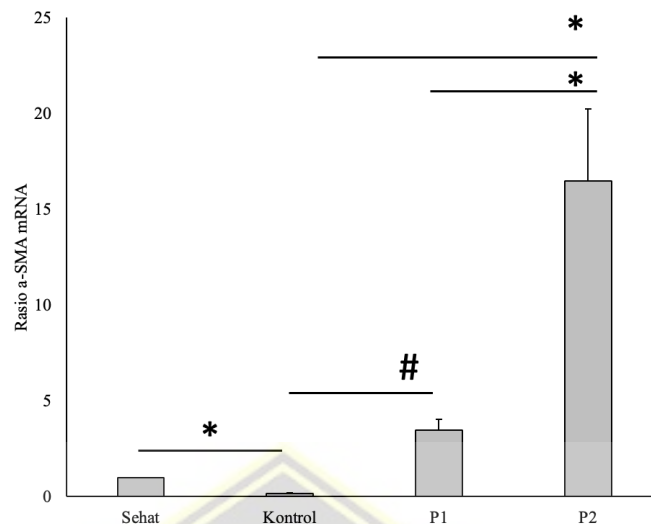
Tabel 5.7. Hasil Uji Post Hoc *LSD* α -SMA Pasca Pemberian Ekstrak *C. ternatea*

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sehat	Kontrol	0,01*	-4,84	6,54
	P1	0,38	-8,14	3,24
	P2	0,00*	-21,18	9,80
Kontrol	P1	0,24	-8,99	2,39
	P2	0,00*	-22,02	-10,64
P1	P2	0,00*	-18,72	-7,34

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

Berdasarkan Tabel 5.7 data pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen α -SMA pada Kontrol menurun secara signifikan dan paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya ($P < 0,05$). Selain itu, data juga menunjukkan bahwa ekspresi gen α -SMA pada P2 meningkat secara signifikan dibandingkan dengan Kontrol dan Sehat, dengan ekspresi gen α -

SMA P2 meningkat paling tinggi dibandingkan dengan P1 (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Grafik Ekspresi Gen α -SMA setelah 14 hari perlakuan

5.2. Pembahasan

Penurunan kolagen merupakan salah satu dampak negatif yang diakibatkan oleh iradiasi UV-B secara berkepanjangan yang menyebabkan kerutan pada beberapa bagian kulit.¹ Iradiasi UVB menyebabkan merusak struktur DNA yang berujung pada kematian beberapa jenis sel, termasuk fibroblast yang merupakan sel yang dapat memproduksi kolagen.⁶⁹ Iradiasi UVB juga diketahui menyebabkan peningkatan ROS yang dapat mengaktifasi jalur intraseluler MAP kinase yang kemudian mengaktifkan factor transkripsi AP-1 yang merupakan factor transkripsi nukleus, terdiri dari dua sub unit yaitu c-jun dan c-fos yang berfungsi untuk mengontrol transkripsi MMP yang dapat mendegradasi kolagen. Selain itu paparan UVB juga menginduksi aktivasi jalur Nf-kB yang berujung pada sintesis faktor-faktor inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α .⁷⁰⁻⁷² Paparan UVB yang berkepanjangan menyebabkan proses

inflamasi juga terus terjadi yang menyebabkan terhambatnya proses proliferasi dan aktivasi sel fibroblast.⁷³

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *C. ternatea* selama 14 hari pada dosis 5% dan 10% mampu menurunkan ekspresi gen MMP-3. Kemampuan ekstrak *C. ternatea* dalam menekan ekspresi gen MMP-3 dikarenakan adanya kandungan antioksidan dalam *C. ternatea*. Penelitian terdahulu menemukan bahwa *C. ternatea* memiliki beberapa kandungan zat aktif seperti alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, dan triterpenoid yang menurut penelitian terdahulu zat aktif tersebut memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat menurunkan stres oksidatif dan antiinflamasi dan mampu meredakan radang.^{74,75} Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyebutkan bahwa kandungan antioksidan dan antiinflamasi yang terdapat dalam berbagai jenis tumbuhan dapat mereduksi ekspresi gen MMP.⁷⁶

Penelitian terdahulu menemukan adanya peran Polifenol yang terkandung dalam *C. ternatea* memiliki sifat anti-inflamasi pada peradangan yang diinduksi lipopolisakarida pada sel makrofag.¹³ Selain itu kandungan flavonol dalam *C. ternatea* diketahui dapat menghambat secara kuat aktivitas COX-2 dan menghambat produksi ROS parsial. Di sisi lain, flavonoid menghambat translokasi NF- κ B, ekspresi protein iNOS, dan produksi NO. Penghambatan produksi ROS diketahui dapat memicu penghambatan jalur MAPK dan AP-1 yang berakibat pada penurunan ekspresi enzim MMP.

Penelitian lain juga menyebutkan bahwa kandungan bahan aktif yang terkandung dari ekstrak *C. ternatea* antara lain flavonoid. Flavonoid terdiri dari

flavon, flavonol, flavanol, flavanone, antosianin, dan kalkon^{53,92}. Kandungan flavonoid dalam *C. ternatea* dapat menekan produksi enzim MMP melalui penghambatan aktivasi jalur sinyal MAP kinase.⁷⁷ Selain itu juga disebutkan bahwa flavonoid mampu menekakan aktivasi jalur Nf-kB yang berkorelasi terhadap penekanan inflamasi dan penghambatan infiltrasi sel-sel imun yang dapat mensekresikan enzim MMP ke jaringan-jaringan kulit. Hal ini akan mempertahankan struktur kolagen pada kulit dari kerusakan sehingga tidak timbul kerutan. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa senyawa aktif triterpenoid yang juga terdapat dalam *C. ternatea* diketahui juga mampu menekan aktivasi jalur MAPK sehingga dapat menurunkan aktivasi AP-1 yang berujung pada penghentian sintesis MMP-3.⁷⁸

Hasil pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu karena ekstrak *C. ternatea* terbukti positif mengandung senyawa golongan alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, dan terpenoid. Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa 60% ekstrak mengandung senyawa golongan flavonoid dengan rata-rata flavonoid total adalah $\pm 682,0238$ mg dalam 1 gram ekstrak *C. ternatea*. Berdasarkan hal tersebut maka dapat disimpulkan bahwa senyawa golongan flavonoid pada *C. ternatea* yang paling berperan dalam aktivitas biologisnya.

Penurunan ekspresi gen MMP-3 pada pemberian ekstrak *C. ternatea* kadar 5% dan 10% hingga mendekati normal menunjukkan adanya perlindungan terhadap penurunan kolagen. Enzim MMP secara fisiologi berfungsi dalam degradasi kolagen pada tubuh, sehingga penurunan ekspresi

MMP berkorelasi terhadap penurunan tingkat degradasi kolagen dan mempertahankan kelenturan kulit.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak *C. ternatea* dengan kadar 10% dapat mempertahankan kelenturan kulit dengan meningkatkan ekspresi gen α -SMA. α -SMA yang merupakan salah satu karakteristik myofibroblast menjadi penanda aktivasi fibroblas yang dapat memproduksi kolagen.⁷⁹⁻⁸¹ Peran ekstrak *C. ternatea* dalam meningkatkan ekspresi gen α -SMA dapat disebabkan oleh kandungan senyawa aktif yang bersifat antioksidan. Hal ini dijelaskan oleh penelitian terdahulu yang menemukan adanya peran zat aktif flavonoid dalam memicu proses produksi kolagen oleh sel fibroblast.⁸² Penelitian sebelumnya yang menemukan adanya peran antioksidan dalam proses percepatan proliferasi fibroblast dan aktivasi sel fibroblast menjadi myofibroblas yang dapat memproduksi kolagen.⁸³

Peran *C. ternatea* dalam mengaktivasi fibroblast menjadi myofibroblast yang ditandai dengan peningkatan α -SMA dapat disebabkan antioksidan yang mengurangi kadar ROS. Menurut penelitian sebelumnya ROS berperan dalam proses inisiasi inflamasi dengan mengaktifkan jalur Nf-kB dan berujung pada sekresi sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α .⁸⁴⁻⁸⁸ Proses inflamasi yang terjadi secara terus menerus menghambat polarisasi M1 menjadi M2 yang dapat mensekresi factor-faktor pro kolagen seperti PDGF dan TGF-beta.⁸⁹⁻⁹¹ Penurunan kadar ROS akibat pemberian antioksidan berkorelasi terhadap polarisasi M1 menjadi M2 sehingga dapat memicu sekresi

PDGF dan TGF-beta yang dapat mengaktivasi fibroblast menjadi myofibroblas yang ditunjukkan dari peningkatan ekspresi α -SMA.

5.3 Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah tidak menilai kandungan antosianin dalam ekstrak *C. ternatea*. Dalam penelitian ini hanya menilai total flavonoid tanpa dilakukan pemeriksaan kadar antosianin yang merupakan salah satu derivat flavonoid, sehingga diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk menilai kandungan antosianin.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian gel ekstrak *C. ternatea* secara topikal dosis 5% dan 10% berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi gen MMP-3 pada kulit tikus yang diinduksi UVB.
2. Pemberian gel ekstrak *C. ternatea* secara topikal dosis 10% berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen α -SMA pada kulit tikus yang diinduksi UVB.

6.2. Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penilaian kadar antosianin dari ekstrak *C. ternatea*, karena antosianin merupakan senyawa utama yang diprediksi terkandung dalam ekstrak *C. ternatea* dan memiliki efek antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci*. 2001;27(SUPPL. 1):19–25.
2. Yang X, Wang J, Wang H, Li X, He C, Liu L. Metabolomics study of fibroblasts damaged by UVB and BaP. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90186-7>
3. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatology Venereol*. 2021;0(August 2019):37–42.
4. Di Gregorio J, Robuffo I, Spalletta S, Giambuzzi G, De Iuliis V, Toniato E, et al. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition as a Possible Therapeutic Target in Fibrotic Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(December):1–32.
5. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015;31(2):65–74.
6. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
7. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):35–43.
8. Kim GH, Cheong KA, Lee AY. Increased skin irritation by hydroquinone and retinoic acid used in combination. *Ann Dermatol*. 2017;29(6):715–21.
9. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2730–41.
10. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(1):42–9.
11. Aziz J, Shezali H, Radzi Z, Yahya NA, Abu Kassim NH, Czernuszka J, et al. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2016;29(4):190–203.
12. Quan T, Fisher GJ. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. *Gerontology*. 2015;61(5):427–34.

13. Nair V, Bang WY, Schreckinger E, Andarwulan N, Cisneros-Zevallos L. Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *J Agric Food Chem*. 2015;63(28):6355–65.
14. Fitrilia T, Kurniawan MF, Kurniawati FR, Setiawan T. The Potential Of Butterfly Pea Flower Methanol Extract As An Antioxidant By In Silico. *Indones J Appl Res*. 2020;1(3):163–9.
15. Wongthai N, Tanticharakunsiri W, Mangmool S, Ochaikul D. Characteristics and antioxidant activity of royal lotus pollen, butterfly pea flower, and oolong tea kombucha beverages. *Asia-Pacific J Sci Technol*. 2021;26(4):1–11.
16. Holm Nielsen S, Willumsen N, Leeming DJ, Daniels SJ, Brix S, Karsdal MA, et al. Serological Assessment of Activated Fibroblasts by alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA): A Noninvasive Biomarker of Activated Fibroblasts in Lung Disorders. *Transl Oncol* [Internet]. 2019;12(2):368–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.004>
17. Saritani ATB, Wiraguna AAGP, Maker LPII. *Clitoria ternatea* L. extract cream 5% inhibited the increase of MMP-1 levels and decrease of collagen amount in wistar rats (*Rattus norvegicus*) dermic skin exposed to ultraviolet B. *Neurol Spinale Med Chir*. 2021;4(3):109–13.
18. Adhikary R, Sultana S, Bishayi B. *Clitoria ternatea* flower petals: Effect on TNFR1 neutralization via downregulation of synovial matrix metalloproteases. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;210:209–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.017>
19. Rahayu S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol *C. ternatea* (*Clitoria Ternatea* L.) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode Frap. *Skripsi Progr Stud Farm Univ Ngudi Waluyo*. 2020;3–10.
20. Zakaria NNA, Okello EJ, Howes MJ, Birch-Machin MA, Bowman A. In vitro protective effects of an aqueous extract of *Clitoria ternatea* L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes. *Phyther Res*. 2018;
21. Chen LH, Chen IC, Chen PY, Huang PH. Application of butterfly pea flower extract in mask development. *Sci Pharm*. 2018;
22. Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Ohara S, Takano K, Suyama K, et al. Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(6):913–9.
23. Elberg G, Chen L, Elberg D, Chan MD, Logan CJ, Turman MA. MKL1 mediates TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2008;294(5):1116–28.

24. Geng R, Kang SG, Huang K, Tong T. Boosting the photoaged skin: The potential role of dietary components. *Nutrients*. 2021;13(5):1–27.
25. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care*. 2016;5(3):119–36.
26. Satish L, Gallo PH, Baratz ME, Johnson S, Kathju S. Reversal of TGF-1stimulation of -smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren’s - Derived fibroblasts. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:1–9.
27. Zent J, Guo LW. Signaling mechanisms of myofibroblastic activation: Outside-in and inside-out. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):848–68.
28. Cáceres M, Oyarzun A, Smith PC. Defective wound-healing in aging gingival tissue. *J Dent Res*. 2014;93(7):691–7.
29. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Investig Dermatology Symp Proc*. 2009;14(1):20–4.
30. Sekton B. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res Rep Biol*. 2010;1.
31. Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, et al. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2011;137(1):427–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.072>
32. Pittayapruerk P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
33. 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. *Nutr Res [Internet]*. 2012;32(6):428–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2012.04.005>
34. Jung SK, Lee KW, Kim HY, Oh MH, Byun S, Lim SH, et al. Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf. *Biochem Pharmacol [Internet]*. 2010;79(10):1455–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.004>
35. Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, et al. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med [Internet]*. 2012;33(2):119–208. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.015>

36. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;973:31–43.
37. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Sci-Hub | Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Archives of Dermatology*, 138(11) | 10.1001/archderm.138.11.1462. 2002;138. Available from: <https://sci-hub.ru/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12437452/>
38. Wang F, Garza LA, Cho S, Kafi R, Hammerberg C, Quan T, et al. Effect of increased pigmentation on the antifibrotic response of human skin to UV-A1 phototherapy. *Arch Dermatol.* 2008;144(7):851–8.
39. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: A review. Vol. 4, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 1993. 197–250 p.
40. Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 1990;9(7):2241–6.
41. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.* 1993;53(4):288–95.
42. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK, et al. Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- κ B. *Int J Mol Med.* 2013;31(2):477–83.
43. Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shih IC, Chiang HM. *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2012;
44. Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: Potential implications for photoaging. *J Invest Dermatol.* 2014;
45. Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell.* 2015;
46. Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P. UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(3):486–91.
47. Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb

- exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013.
48. Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type i and MMP-1 expression. *J Med Food*. 2014;17(9):985–95.
 49. Sun ZW, Hwang E, Lee HJ, Lee TY, Song HG, Park SY, et al. Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice. *J Nat Med*. 2015;69(1):22–34.
 50. Vicentini FTMC, He T, Shao Y, Fonseca MJV, Verri WA, Fisher GJ, et al. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2011;61(3):162–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.002>
 51. Park JE, Pyun HB, Woo SW, Jeong JH, Hwang JK. The protective effect of kaempferia parviflora extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2014;30(5):237–45.
 52. Son WC, Yun JW, Kim BH. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts: Therapeutic potential in skin wrinkling. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(6):919–25.
 53. Cronquist A, Takhtadzhian AL. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia university press; 1981.
 54. Zussiva A, Bertha KL, Budiyati CS. Ekstraksi dan Analisis Zat Warna Biru (Anthosianin Anthosianin) dari *C. ternatea* (*Clitoria ternatea*) Sebagai Pewarna Alami. *J Teknol Kim dan Ind*. 2012;1(1):356–65.
 55. Gründemann C, Thell K, Lengen K, Garcia-Käufer M, Huang YH, Huber R, et al. Cyclotides Suppress Human T-Lymphocyte Proliferation by an Interleukin 2-Dependent Mechanism. *PLoS One*. 2013;8(6):1–12.
 56. Taur DJ, Patil RY. Evaluation of antiasthmatic activity of *Clitoria ternatea* L. roots. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;136(2):374–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.064>
 57. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2015;21:16–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001>
 58. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*. 2018;10(4):1–15.

59. Fang JY, Wang PW, Huang CH, Chen MH, Wu YR, Pan TL. Skin aging caused by intrinsic or extrinsic processes characterized with functional proteomics. *Proteomics*. 2016;16(20):2718–31.
60. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care*. 2013;2(1):5–10.
61. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. 2018;27(5):729–38.
62. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3).
63. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am* [Internet]. 2011;19(2):229–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>
64. Amir N, Suprayitno E, Nursyam H. PENGARUH SIPERMETRIN PADA JAMBAL ROTI TERHADAP KADAR UREUM DAN KREATININ TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) Effect of Jambal Roti Cypermethrin on Ureum and Creatinine Levels of Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). *J IPTEKS PSP*. 2015;2(3):283–93.
65. Priyambodo S. Identifikasi Tikus. *Ipb*. 2021;1–41.
66. Sayuti NA. Formulasi dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.). *J Kefarmasian Indones*. 2015;5(2):74–82.
67. Emelda E. FORMULASI DAN UJI SIFAT FISIK SEDIAAN GEL TUNGGAL DAN KOMBINASI EKSTRAK ETANOLIK DAUN SIRIH MERAH (*Pipper Crocatum*) Dan MINYAK KAYU MANIS (*Cinnamon Oil*). *INPHARMED J (Indonesian Pharm Nat Med Journal)*. 2020;4(2):43.
68. Ayala M, Strid H, Jacobsson U, Söderberg PG. P53 Expression and Apoptosis in the Lens After Ultraviolet Radiation Exposure. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4187–91.
69. Gary AS, Rochette PJ. Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation. *Sci Rep*. 2020;
70. Ali F, Khan BA, Sultana S. Wedelolactone mitigates UVB induced oxidative stress, inflammation and early tumor promotion events in murine skin: plausible role of NFkB pathway. *Eur J Pharmacol*. 2016;
71. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF- α production in the skin. *Archives of Dermatological Research*. 2009.
72. Cooper, S.J and Bowden GT. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of NFkB and AP1 in UVB induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targts*. 2007;

73. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. *Bioengineering*. 2021.
74. Havananda T, Luengwilai K. Variation in floral antioxidant activities and phytochemical properties among butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) germplasm. *Genet Resour Crop Evol*. 2019;
75. Pavithra MKS, Ilakiya S, Kavipriya S. *Clitoria ternatea* - phytochemical and pharmacological evaluation. *Int J Pharm Res*. 2019;
76. Sugianto M, Achadiyani A, Nugraha GI. Antioxidant Effects of Red Fruit Oil on MMP-1 Gene Expression and Malondialdehyde Levels on Skin Exposed to UVB Rays. *Mol Cell Biomed Sci*. 2019;
77. Wongwichai T, Teeyakasem P, Pruksakorn D, Kongtawelert P, Pothacharoen P. Anthocyanins and metabolites from purple rice inhibit IL-1 β -induced matrix metalloproteinases expression in human articular chondrocytes through the NF- κ B and ERK/MAPK pathway. *Biomed Pharmacother*. 2019;
78. Huang Y, Xu J, Wang Y, Lei Y, Mai Y, He X. Q43, a new triterpenoid extracted from Chinese acorn, exhibits pronounced anti-neuroinflammatory activity through the MAPK and NF- κ B pathways. *J Funct Foods*. 2021;
79. Wang S, Ma N, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Xie Y, et al. Relationships of alpha-SMA-positive fibroblasts and SDF-1-positive tumor cells with neoangiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;
80. Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). *J Am Sci*. 2008;
81. Hillsley A, Santos JE, Rosales AM. A deep learning approach to identify and segment alpha-smooth muscle actin stress fiber positive cells. *Sci Rep*. 2021;
82. Rimdusit T, Thapphasaraphong S, Puthongking P, Priprem A. Effects of anthocyanins and melatonin from purple waxy corn by-products on collagen production by cultured human fibroblasts. *Nat Prod Commun*. 2019;
83. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski J, Svoboda KKH. Bioactive antioxidant mixtures promote proliferation and migration on human oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011;
84. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in Cell Biology*. 2016.
85. El-Kenawi A, Ruffell B. Inflammation, ROS, and Mutagenesis. *Cancer Cell*. 2017.
86. Zuo L, Wijegunawardana D. Redox Role of ROS and Inflammation in Pulmonary Diseases. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021.

87. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*. 2011.
88. Sho T, Xu JX. Role and mechanism of ROS scavengers in alleviating NLRP3-mediated inflammation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2019.
89. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;
90. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. Pillars Article: M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol* . 2000. 164: 6166–6173 . *J Immunol*. 2017;
91. Motz K, Lina I, Murphy MK, Drake V, Davis R, Tsai HW, et al. M2 Macrophages Promote Collagen Expression and Synthesis in Laryngotracheal Stenosis Fibroblasts. *Laryngoscope*. 2021;
92. Faizal Alfaridz, Riezki Amalia. Review Jurnal: Klasifikasi dan Aktivitas Farmakologi dari Senyawa Aktif Flavonoid. *Jurnal Farmaka Vol 16 no 3*. 2018;
93. Afrida Yeti, Rafita Yuniarti. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Rumput Bambu (*Lopatherum Gracile Brongn.*) Dengan Metode Spektrofotometri Visible . *Farmasainkes Vol 1 No 1*. 2021;

