

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR
TERHADAP EKSPRESI GEN PDGF DAN ALPHA
SMA**

**(Studi eksperimental *in vivo* pada tikus Wistar yang mengalami kolagen
akibat terpapar UV-B)**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Sarjana S2**



**Magister Biomedik
Rima Arvina Lubis
MBK 2016010211**

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR TERHADAP EKSPRESI GEN PDGF DAN ALPHA SMA (Studi eksperimental *in vivo* pada tikus Wistar yang mengalami penurunan kolagen akibat terpapar UV-B)

Diajukan oleh :

Rima Arvina Lubis

MBK 2016010211

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,



Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes
NIK. 220198045

Pembimbing II,



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

Mengetahui,
Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula

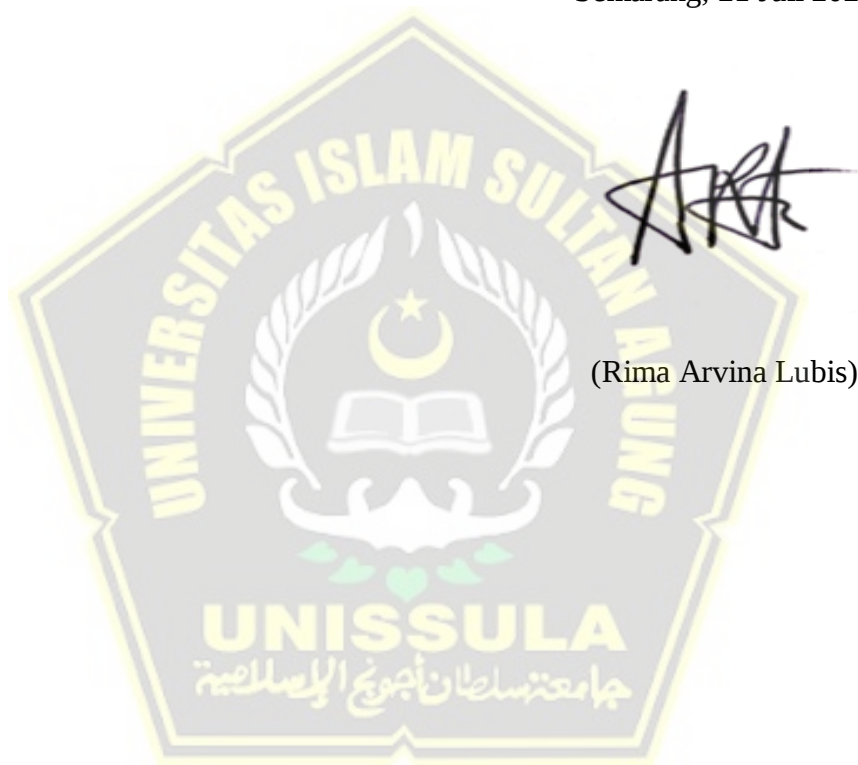


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

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, 21 Juli 2022



(Rima Arvina Lubis)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Rima Arvina Lubis
Tempat / tanggal lahir : Medan / 21 Juli 1983
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Palma Sari Kalimantan Timur : lulus tahun 1989
2. SD 023 Metokuman Kalimantan Timur : lulus tahun 1995
3. SMP Kartika 1-2 Medan : lulus tahun 1998
4. SMA N 12 Medan : lulus tahun 2001
5. S1 FK UISU : lulus tahun 2005
6. Profesi Dokter UISU : lulus tahun 2009
7. S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang : (2020-sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H. Amir Syarifuddin Lubis, M.BA.
Ibu : Hj. Nur 'Ainun Rangkuti
2. Nama Suami : KBP Kobul Syahrin Ritonga, S.IK., M.Si.
3. Nama Anak : Syahira Arvisyahwika Ritonga
Muhammad Alsyahreza Ritonga
Syahluka Nabilah Ritonga

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis berjudul, “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor Terhadap Ekspresi Gen PDGF dan Alpha SMA (Studi Eksperimental In Vivo Pada Tikus Wistar yang mengalami Penurunan Kolagen Akibat Terpapar 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 sebesar-besarnya 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. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes. selaku dosen pembimbing I dan Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med. selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
4. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku penguji I, Prof.Dr.dr. Prasetyowati Subchan, SpKK (K) selaku penguji II & Dr.dr. Chodijah, M.Kes selaku penguji III yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan tesis ini

5. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan thesis.
6. Seluruh staf program Magister Biomedik FK UNISSULA yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama masa pendidikan penulis
7. Seluruh staf Stem Cell & Cancer Research (SCCR) yang telah meluangkan waktu untuk membantu penulis selama melakukan penelitian di dalam laboratorium
8. 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 beberapa pihak akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk ilmu kedokteran dan masyarakat.

Semarang, 21 Juli 2022



(Rima Arvina Lubis)

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR TERHADAP EKSPRESI GEN PDGF DAN ALPHA SMA (Studi eksperimental *in vivo* pada tikus Wistar yang mengalami penurunan kolagen akibat terpapar UV-B)

Latar Belakang : Paparan sinar ultraviolet dari matahari menyebabkan terjadinya peradangan dan akumulasi *reactive oxygen species* (ROS). Proses inflamasi yang berkepanjangan dapat melisiskan beberapa growth factor termasuk *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Smooth muscle Actin* (α -SMA), sehingga berdampak pada penurunan kolagen. Beberapa golongan senyawa aktif seperti antosianin, tanin, antraquinon dan sinamat memiliki kemampuan sebagai perlindungan terhadap sinar UV. Daun kelor merupakan salah satu tanaman yang banyak mengandung senyawa antosianin.

Tujuan : mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

Metode : Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Subyek penelitian sebanyak 24 ekor tikus galur Wistar yang masuk kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak yaitu KS, KN, P1, dan P2. Kelompok P1 diberi perlakuan gel ekstrak Daun Kelor secara topikal dosis 5 %, sedangkan kelompok P2 diberi perlakuan ekstrak Daun Kelor secara topikal dosis 10%. Pengambilan jaringan dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Data dianalisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test*.

Hasil : Rerata ekspresi gen PDGF tertinggi pada kelompok P2 $6,1000 \pm 2,85799$, sedangkan rerata ekspresi gen α SMA tertinggi pada kelompok P2 $2,8400 \pm 1,06243$. Uji *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF (0,001) dan Alpha SMA (0,000) pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

Kesimpulan : Pemberian ekstrak daun kelor dengan dosis 5% dan 10% berpengaruh terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

Kata Kunci : Ekstrak Daun Kelor, Ekspresi gen PDGF, dan Ekspresi gen α SMA.

ABSTRACT

THE EFFECT OF MORINGA LEAF EXTRACT ON PDGF AND ALPHA SMA GEN EXPRESSION

(Experimental in vivo study in Wistar rats with decreased collagen due to exposure to UV-B)

Background: Exposure to ultraviolet light from the sun causes inflammation and accumulation of reactive oxygen species (ROS). A prolonged inflammatory process can lyse several growth factors, including Platelet Derived Growth Factor (PDGF) and Smooth muscle Actin (α -SMA), which results in a decrease in collagen. Several groups of active compounds such as anthocyanins, tannins, anthraquinones and cinnamates have the ability to protect against UV rays. Moringa leaves are one of the plants that contain lots of anthocyanin compounds.

Destination : Determine the effect of giving Moringa leaf extract on the expression of PDGF and α -SMA genes in wistar rats that have decreased collagen.

Methods: This study used a post test only control group design. The research subjects were 24 wistar rats that met the inclusion criteria and were divided into 4 groups randomly, namely KS, KN, P1, and P2. The P1 group was treated with topical Moringa Leaf extract gel at a dose of 5%, while the P2 group was treated with a 10% Moringa Leaf extract topically. Tissue collection was carried out on the 15th day after the first day of treatment. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis Test.

Results: The highest mean PDGF gene expression was in the P2 group 6.1000 ± 2.85799 , while the highest mean SMA gene expression was in the P2 group 2.8400 ± 1.06243 . The Kruskal-Wallis Test showed that there was an effect of giving Moringa leaf extract on the expression of the PDGF (0.001) and Alpha SMA (0.000) genes in wistar rats that had decreased collagen

Conclusion: Administration of Moringa leaf extract with doses of 5% and 10% affected the expression of PDGF and α -SMA genes in wistar rats that experienced a decrease in collagen.

Keywords: Moringa Leaf Extract, PDGF gene expression, and α -SMA gene expression.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	ivii
ABSTRACT	iviii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR BAGAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoretis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Ekspresi Gen PDGF	9
2.1.1. Definisi Ekspresi Gen PDGF	9
2.1.2. Fungsi Ekspresi Gen PDGF	11
2.1.3. Reseptor PDGF	12
2.2 Ekspresi Gen Alpha SMA	13
2.2.1. Definisi dan Fungsi Alpha SMA	13
2.2.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler ekspresi gen Alpha SMA dalam Sintesis Kolagen	14
2.3 Ekstrak Daun Kelor	17
2.3.1. Definisi Daun Kelor	17
2.3.2. Kandungan Kimia Daun Kelor	18
2.3.3. Manfaat Daun Kelor dalam Menekan Inflamasi	19
2.3.4. Hubungan Antara Variable Ekstrak Daun Kelor Terhadap Ekspresi Gen PDGF & Alpha SMA pada tikus yang dipapar UV-B	20
2.4 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	22
2.5 Gel	24
2.5.1. Definisi Gel	24
2.5.2. Struktur Gel	25

2.5.3. Sifat Sediaan Gel.....	25
2.5.4. Kegunaan Gel	26
2.5.5. Sediaan Gel yang Baik	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP & HIPOTESIS	28
3.1 Kerangka Teori.....	28
3.2 Kerangka Konsep	30
3.3 Hipotesis	30
BAB IV METODE PENELITIAN	31
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	31
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	32
4.2.1. Variabel Penelitian	32
4.2.2. Definisi Operasional	32
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	33
4.3.1. Subjek Penelitian.....	33
4.3.2. Sampel Penelitian.....	34
4.4. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	34
4.5. Besar Sampel.....	35
4.6. Alat dan Bahan.....	36
4.6.1. Alat.....	36
4.6.2. Bahan.....	36
4.7. Cara Penelitian	36
4.7.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	36
4.7.2. Cara Pembuatan Ekstrak Daun Kelor.....	37
4.7.3. Penetapan Dosis	37
4.7.4. Paparan UV -B.....	37
4.7.5. Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen.....	38
4.7.6. Pengambilan Sampel Jaringan	39
4.7.7. Pembuatan Blok Parafin.	39
4.7.8. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen PDGF & Alpha SMA Menggunakan <i>Real Time</i> - PCR	40
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian	41
4.9. Analisa Data.....	41
4.10. Alur Penelitian	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
5.1. Hasil Penelitian	Error! Bookmark not defined.
5.1.1. Pengaruh Penyinaran UV-B Terhadap Gambaran Mikroskopik Kolagen Tikus.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.2. Determinasi dan Ekstraksi Daun Kelor.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.3. Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan uji kadar Flavonoid Total ..	46
5.1.4. Efek pemberian gel ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar model penurunan kolagen	47
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	Error! Bookmark not defined.
5.3. Kelemahan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	55

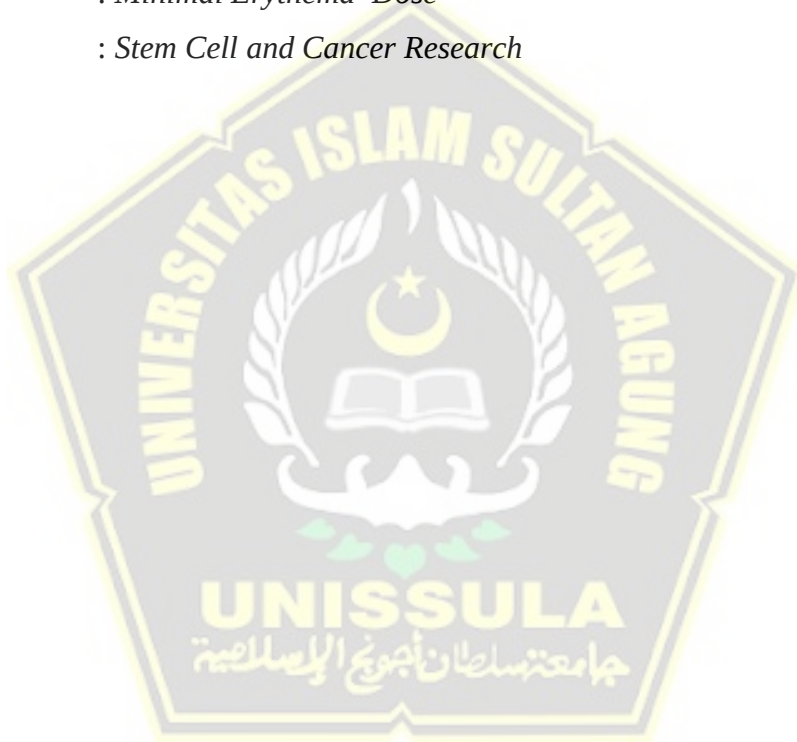
6.1. Kesimpulan	55
6.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	61



DAFTAR SINGKATAN

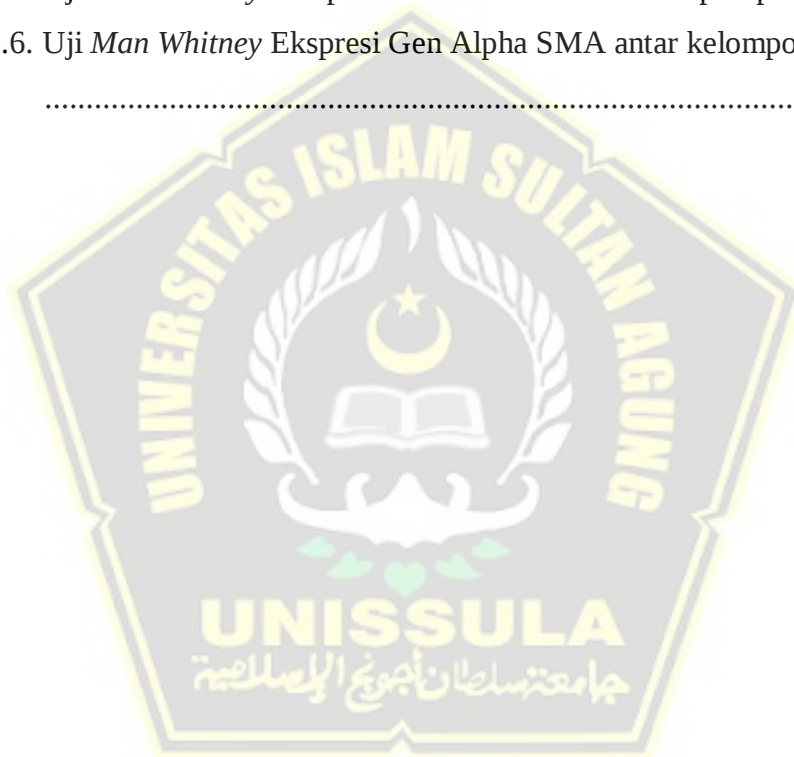
DNA	: <i>Deoxy Nucleat</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
TIMP	: <i>Tissue Inhibitor Metalloproteinase</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
α -SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
TGF- β R	: <i>Transforming Growth Factor beta receptor</i>
FA	: <i>Focal Adhesion</i>
MRTF	: <i>Myocardin-Related Transcription Factor</i>
SRF	: <i>Serum Response Factor</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Nrf-2	: <i>Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
TLR4	: <i>Toll Like Receptor 4</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
UV B	: <i>Ultra Violet B</i>
UV A	: <i>Ultra Violet A</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
PDGFR β	: <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor-Beta</i>
IGF 1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
PDGF AA	: <i>Platelet-derived growth factor-AA</i>
PDGF BB	: <i>Platelet-derived growth factor-BB</i>
PDGF CC	: <i>Platelet-derived growth factor-CC</i>

PDGF DD	: <i>Platelet-derived growth factor-DD</i>
PDGF R	: <i>Platelet-derived growth factor-Receptor</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
LAP	: <i>Latency Associated Peptide</i>
EDA-FN	: <i>Extra Domain A Containing Fibronectin</i>
IL 6	: <i>Interleukin 6</i>
IL 1	: <i>Interleukin 1</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
SSCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>



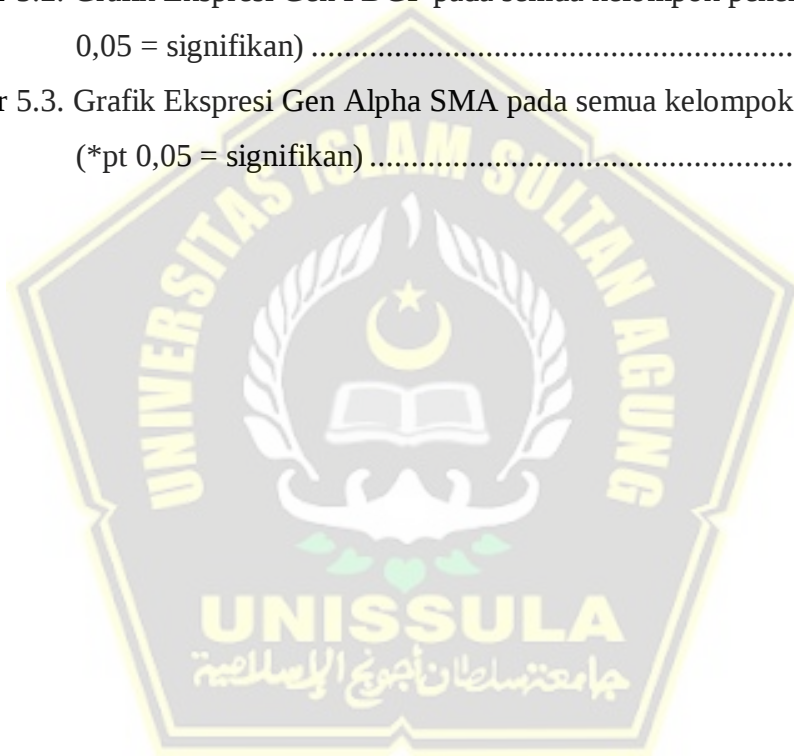
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	6
Tabel 4.1. Komponen PCR Mix PDGF Dan Alpha SMA	41
Tabel 5.1. Hasil Determinasi Daun Kelor	41
Tabel 5.2. Kandungan Ekstrak Daun Kelor	46
Tabel 5.3. Hasil Uji Kadar Flavonoid Total.....	41
Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	6
Tabel 5.5. Uji <i>Man Whitney</i> Ekspresi Gen PDGF antar kelompok penelitian	41
Tabel 5.6. Uji <i>Man Whitney</i> Ekspresi Gen Alpha SMA antar kelompok penelitian	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Ekspresi Gen PDGF	Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.2. Ekspresi Gen Alpha SMA	16
Gambar 2.3. Daun Kelor	18
Gambar 2.4. Tikus Putih Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	23
Gambar 2.5. Representasi Struktur Gel	25
Gambar 5.1. Kontrol Sehat	44
Gambar 5.1. Kontrol Negatif	16
Gambar 5.2. Grafik Ekspresi Gen PDGF pada semua kelompok penelitian (*pt 0,05 = signifikan)	49
Gambar 5.3. Grafik Ekspresi Gen Alpha SMA pada semua kelompok penelitian (*pt 0,05 = signifikan)	50



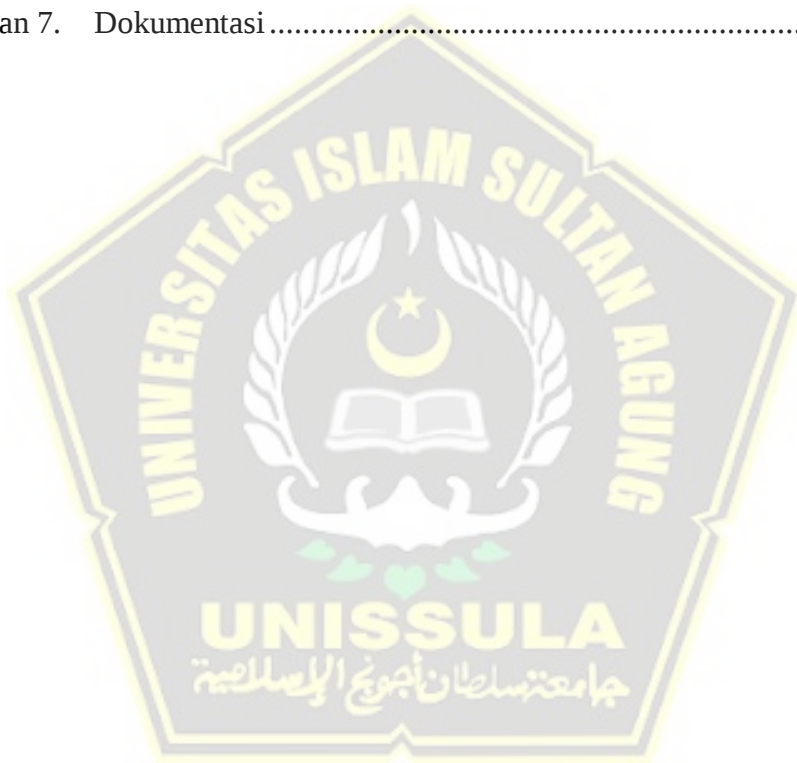
DAFTAR BAGAN

Bagan 3.1. Kerangka Teori	29
Bagan 3.2. Kerangka konsep	30
Bagan 4.1. Alur Rancangan penelitian	32
Bagan 5.1. Alur penelitian.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	62
Lampiran 2.	Laporan Hasil Determinasi	63
Lampiran 3.	Hasil Uji Skrining Fitokimia	64
Lampiran 4.	Hasil Uji Kadar Flavonoid Total.....	65
Lampiran 5.	Data Statistik.....	66
Lampiran 6.	Surat Keterangan Penelitian	67
Lampiran 7.	Dokumentasi	68



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah Penelitian

Indonesia merupakan negara tropis yang penuh dengan limpahan sinar matahari sepanjang tahunnya. Matahari dapat memancarkan berbagai macam sinar baik yang dapat dilihat (visibel) maupun yang tidak dapat dilihat.¹ Paparan sinar ultraviolet dari matahari menyebabkan terjadinya peradangan dan akumulasi *reactive oxygen species* (ROS), Proses inflamasi yang berkepanjangan dapat melisiskan beberapa growth factor termasuk *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Smooth muscle Actin* (α -SMA), sehingga berdampak pada penurunan kolagen.² Pada saat ini pemanfaatan kosmetik kecantikan berupa krim yang mengandung antioksidan dirasa menjadi solusi untuk menangkal radikal bebas dari sinar UV B yang tinggi. Hal ini sesuai penelitian terdahulu, yang menyatakan bahwa krim tabir surya dapat menyerap sedikitnya 85% sinar matahari pada panjang gelombang 290-320 nm dan penggunaan antioksidan pada sediaan krim dapat meningkatkan aktivitas fotoprotektif.³ Beberapa kosmetik dapat ditemukan berbagai bahan kimia yang berbahaya bagi kulit, seperti merkuri, hidroquinon, asam retinoat dan zat warna sintetis seperti Rhodamin B dan Merah K3. Bahan-bahan ini sebetulnya telah dilarang penggunaannya sejak tahun 1998 melalui Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 445/MENKES/PER/V/1998.⁴ Berdasarkan penelitian terdahulu yang menyatakan penggunaan bahan kimia dapat menimbulkan masalah pada

kulit seperti reaksi alergi.⁵ Beberapa golongan senyawa aktif seperti antosianin, tanin, antraquinon dan sinamat telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai perlindungan terhadap sinar UV. Golongan antosianin banyak berada di tanaman contohnya daun kelor. Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati diantaranya tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) yang dikenal memiliki banyak manfaat yang tinggi akan antioksidan sehingga dirasakan perlu untuk meneliti kandungan khasiat yang ada di dalamnya pada kasus penurunan kolagen yang dapat mengakibatkan terjadi kanker kulit.⁶ Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Posttest Only Control Group Design*.

Kanker kulit merupakan salah satu penyakit yang mematikan. Diperkirakan lebih dari 2 orang mati akibat penyakit kanker kulit setiap jamnya. Jumlah penderita kanker kulit sendiri cukup banyak di dunia. *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa ada lebih dari 14 juta pasien kanker baru dan lebih dari 9,6 juta kematian akibat kanker di seluruh dunia.. Jumlah ini akan terus meningkat. Diperkirakan akan ada kenaikan sebesar 5.8% pada jumlah kasus baru penyakit kanker kulit (melanoma) pada tahun 2021.⁷ Indonesia sendiri panyakit kanker kulit merupakan penyakit yang perlu diwaspadai. Di Indonesia penyakit kanker kulit berada di urutan ketiga setelah kanker rahim dan kanker payudara. Dari seluruh keganasan yang diperiksa pada 17 laboratorium Patologi Anatomi diseluruh Indonesia, keganasan kulit menduduki urutan ke tiga. Data dari 13 pusat Patologi Anatomi, jenis kanker kulit di Indonesia didapatkan squamous cell

ca 42,9% dan basal cell ca 32,9%. Di Semarang, keganasan kulit menduduki urutan kedua pada seluruh keganasan laki-laki dan urutan ketiga dari pada wanita. Faktor peningkatan radiasi sinar ultraviolet, faktor genetik, pola hidup yang tidak sehat, dan infeksi *human papillomavirus* dapat menjadi pencetus untuk timbulnya kanker kulit. Sepanjang tahunnya dikarenakan Indonesia berada di garis khatulistiwa. Mayoritas masyarakat Indonesia sering melakukan aktivitas di bawah sinar matahari langsung, sehingga masyarakat Indonesia berisiko terkena kanker kulit akibat seringnya terpapar sinar matahari langsung.

Hal ini disebabkan oleh peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) pada kulit, berakibat penuaan sel, aktivasi inflamasi, inhibisi produksi *Growth Factor Pro-Colagen* seperti *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) yang berujung pada penghambatan sintesis kolagen. Penghambatan sintesis kolagen berdampak pada berkurangnya kekenyalan kulit, timbulnya keriput yang berujung pada berkurangnya kecantikan seseorang. Pemberian antioksidan menurut penelitian terdahulu dapat menurunkan kadar ROS sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada inisiasi sintesis kolagen.⁸ Jalur pensinyalan faktor pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit (PDGF). Pengikatan ligan PDGF dimer yang berbeda ke dimer reseptor masing-masing mengarah ke autofosforilasi residu tirosin dalam domain intraselulernya. *Smooth muscle Actin* (α -SMA) digunakan sebagai penanda untuk subset sel fibrogenik.

Moringa oleifera berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa *Antosianin* dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UV-B sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen. Selain itu penghambatan ROS juga mampu menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu proses polarisasi M1 menjadi M2 yang mampu mensekresikan TGF- β 1. Sekresi faktor pertumbuhan ini dapat mengaktivasi kompleks smad2/3 yang berperan dalam produksi kolagen.⁹ Namun hingga saat ini peran ekstrak Daun Kelor pada penurunan kolagen belum dikaji, sehingga dalam penelitian ini ingin menginvestigasi peran ekstrak daun kelor yang dilihat dari ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen yang terpapar UV-B dengan pemberian topical dengan konsentrasi 5% dan 10 %.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan “Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen?”.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen

PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus Wistar yang dipapar UV- B setelah diberi ekstrak daun kelor secara topikal dengan dengan konsentrasi 5% dan 10% dibandingkan kontrol.
2. Untuk membuktikan peningkatan ekspresi gen Alpha SMA Pada tikus Wistar yang dipapar UV-B setelah diberi ekstrak daun kelor secara topikal dengan konsentrasi 5% dan 10 % dibandingkan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoretis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus yang mengalami penurunan kolagen.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah

1. Memberikan sumber informasi pada ilmu kedokteran dan masyarakat tentang pengaruh ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan pada ilmu kedokteran kepada masyarakat luas.

1.5. Originalitas Penelitian

Originalitas penelitian ini menyajikan perbedaan dan persamaan bidang kajian yang diteliti antara peneliti dengan peneliti-peneliti sebelumnya. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari terjadinya pengulangan kajian terhadap hal-hal yang sama, dengan demikian akan diketahui sisi-sisi apa saja yang membedakan dan akan diketahui pula letak persamaan penelitian ini dengan penelitian terdahulu. Peneliti memaparkannya dalam bentuk tabel seperti di bawah ini:

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Ali et al, 2014. ¹⁰	Enhancement of Human Skin Facial Revitalization by Moringa Leaf Texture Extract Cream	Parameter revitalisasi kulit, yaitu parameter permukaan, tekstur dan permukaan kulit hidup (SELS) dinilai secara komparatif setelah aplikasi basis dan krim aktif pada wajah manusia menggunakan Visioscan(®) VC 98 selama 3 bulan.	Ekstrak kelor mampu memperbaiki tekstur kulit dengan mengurangi kekasaran dan kerutan kulit
2.	Zhou et al., 2018 ¹¹	Moringa oleifera stem extract protect skin keratinocytes against oxidative stress injury by enhancement of antioxidant degense systems and	Studi docking molekuler digunakan untuk menilai komponen utama dalam MSE untuk mengaktifkan PPAR α .	Ekstrak batang kelor mampu melindungi keratinosit dari kerusakan dengan mengaktifkan PPAR α

activation of PPAR α				
3.	Engsuwan <i>et al.</i> , 2021 ¹²	Anti-inflammatory Effect of Moringa Oleifera Lam, Leaf Extract on UVB-Irradiated Human Keratinocytes	Tingkat mediator inflamasi IL-1 α , IL-8, NO dan PGE2 dilepaskan dari keratinosit diukur menggunakan ELISA dan Griess assays	Terjadi penurunan faktor inflamasi pada pemberian ekstrak daun kelor
4.	Alfares Roman <i>et al.</i> , 2021 ¹³	Moisturizing and antioxidant Evaluation of Moringa Oleifera Leaf Extract in Topical Formulations by Biophysical Techniques	Analisis fitokimia HFM oleh ESI-IT- MSn menunjukkan adanya tujuh senyawa (flavonoid dan asam fenolik). Viskositas, pH dan partikel ukuran formulasi HFM memastikan kesesuaian untuk aplikasi topikal.	Ekstrak daun kelor memiliki kapasitas antioksidan
5	Saritani <i>et al.</i> , 2021 ⁶	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	Rancangan acak kelompok kontrol post-test-only dilakukan pada 24 ekor tikus wistar betina umur 8-10 minggu dengan berat badan 130-150 gram. Mereka dibagi menjadi tiga kelompok: kelompok yang tidak diberi perlakuan, kelompok plasebo, dan kelompok krim ekstrak Clitoria ternatea L. 5%. Dua kelompok terakhir terpapar UV-B. Setelah empat minggu kulit mereka diperiksa kadar MMP-1 menggunakan ELISA dan jumlah kolagen menggunakan pewarnaan Picro Sirius Red.	Terjadi penurunan MMP-1 dan Peningkatan Kolagen
6	Wang <i>et al.</i> , 2022 ¹⁴	Anti-Penurunan kolagen Effects of Flexible nanoliposomes encapsulated Moringa Oleifera	Nanoliposome daun kelor diberikan pada sel HaCat yang telah diinduksi UVB dan dianalisis MMP1, MMP3, MMP9 dan kemampuan pengaisan	Ekstrak daun kelor yang dienkapsulasi dapat menurunkan ROS dan enzim

Lam, Isothiocyanate in UVB-Induced Cell Damage in HaCat Cells	ROS	MMP
--	-----	-----

Berdasarkan Tabel 1.1. dapat diketahui bahwa pada penelitian Ali et al hanya meneliti tentang ekstrak daun kelor dengan parameter revitalisasi kulit, Zhou *et al* meneliti tentang batang daun kelor mampu melindungi keratinosit dari kerusakan dengan mengaktifkan PPAR α melalui *study Docking Molecular*, Engsuwan et al meneliti daun kelor terhadap kemampuan menurunkan faktor inflamasi dengan mengukur kadar mediator inflamasi dengan metode ELISA dan *Griess Assay Test*, Alfares Roman *et al* meneliti tentang ekstrak daun kelor evaluasi memiliki kapasitas antioksidan dalam formulasi topikal dengan analisa fitokimia HFM, Saritani *et al* meneliti tentang krim ekstrak Clitoria ternatea L. 5% terhadap penurunan kadar MMP-1 dan peningkatan jumlah kolagen pada tikus Wistar betina (*Rattus norvegicus*) yang terpapar sinar ultraviolet B dengan menggunakan metode ELISA untuk mengukur kadar MMP-1 dan Picro Sirius Red untuk mengukur jumlah kolagen, dan Wang *et al* meneliti tentang Ekstrak daun kelor yang dienkapsulasi dapat menurunkan ROS dan enzim MMP sehingga pada penelitian terdahulu belum terdapat kajian yang menginvestigasi pengaruh ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus yang mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB, oleh karena itu penelitian yang akan dilakukan ini masih tergolong original dan layak untuk dilanjutkan.

BAB II

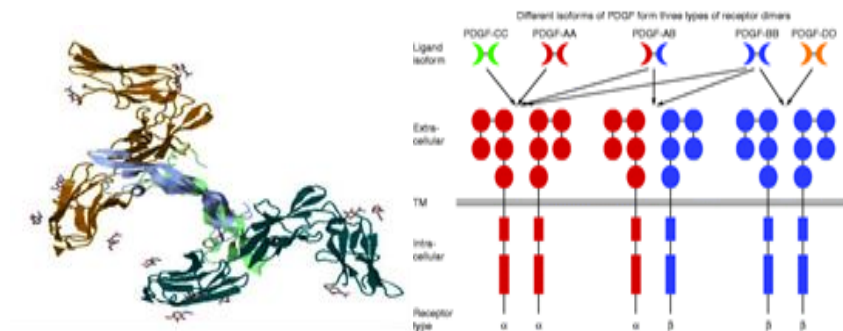
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ekspresi Gen PDGF

2.1.1. Definisi Ekspresi Gen PDGF

Ekspresi gen *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) adalah ekspresi gen faktor pertumbuhan yang berasal dari pemecahan trombosit atau platelet dan disimpan di dalam alfa granule platelet kemudian dilepaskan ke lokasi luka ketika ada cedera.¹⁵ PDGF berperan penting dalam proses penyembuhan luka dengan merangsang proliferasi fibroblast. Fibroblast tersebut akan mensekresi *matriks metalloproteinase* (MMP).¹⁶ Selain itu, fibroblast mampu mensintesis matriks ekstraseluler baru (fibronektin dan fibrinogen) serta mensintesis myofibroblast yang aktivasiya distimulasi oleh TGF- β .¹⁷ Selain itu, TGF- β juga meningkatkan aktivitas enzim *Tissue Inhibitor Metalloproteinase* (TIMP). *Tissue Inhibitor Metalloproteinase* (TIMP) tersebut akan menghambat *matriks metalloproteinase 1* (MMP-1) sehingga terjadi sintesis kolagen. Kadar PDGF mengalami pengikatan pada minggu awal dan mengalami penurunan sejalan dengan fase penyembuhan luka.¹⁸ Adapun jenis tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis Wistar dengan jumlah per kelompok 6 ekor tikus.

Meskipun awalnya murni dari platelet, PDGF banyak juga dibuat oleh jenis sel lainnya termasuk fibroblas, keratinosit, myoblas, sel epitel dan makrofag. Sel endotel mikrovaskuler mengekspresikan PDGFR- β dan dengan demikian penambahan PDGF-BB ke sel endotel mikrovaskuler akan merangsang sintesis DNA dan pembentukan neovaskularisasi dalam uji in vitro. Mungkin lebih penting untuk pembentukan pembuluh baru adalah peran PDGF dalam perekrutan dan proliferasi sel otot polos dan pericytes. Tikus yang kekurangan PDGF-B atau PDGFR- β mengalami gangguan perkembangan pembuluh darah, dan dijumpai mati di dalam rahim akibat pendarahan mikrovaskular otak dan edema. Pada tikus yang dimodifikasi secara genetik ini, pembuluh darah otak kekurangan pericytes dan lumens pembuluh melebar. Pericytes mungkin telah ada (tetapi disfungsi) di organ lain, meskipun mungkin sulit untuk membedakan pericytes dari sel otot polos karena kurangnya penanda spesifik. PDGF dengan demikian memainkan peran penting dalam stabilisasi pembuluh darah yang baru terbentuk dengan bertindak sebagai kemoatraktif perisit. Sebaliknya, defisiensi PDGF ataupun perisit menyebabkan pembuluh darah yang gampang bocor, tortuositas, pembentukan mikroaneurisma, dan perdarahan.¹⁹



Gambar 2.1. Ekspresi Gen PDGF

2.1.2. Fungsi Ekspresi Gen PDGF

Ekspresi gen *Platelet derived growth factor* berperan dalam proses penyembuhan luka. PDGF dilepaskan dari degranulasi trombosit pada cedera sehingga akan menstimulasi mitogenesis dan kemotaksis neutrofil, makrofag, fibroblas, dan sel otot polos menuju lokasi luka untuk membantu inisiasi respons inflamasi. Studi in vivo menunjukkan bahwa PDGF penting dalam merekrut pericytes dan sel otot polos ke kapiler sehingga meningkatkan integritas struktural kapiler. Selama fase epitelisasi penyembuhan luka, PDGF meningkatkan produksi insulin growth factor 1 (IGF-1) dan trombospodin-1. Selain itu, IGF-1 telah terbukti meningkatkan motilitas keratinosit dan trombospodin-1, yang melindungi degradasi proteolitik dari PDGF dan meningkatkan pertumbuhan fibroblas in vitro. PDGF juga meningkatkan proliferasi fibroblas untuk membangun matriks kolagen.²⁰

Growth factors mengikat reseptor yang sesuai pada permukaan sel dan akan mengaktifkan molekul pensinyalan yang

relevan untuk dapat mengaktifkan protein sitoplasma atau menginduksi transkripsi protein baru. Kondisi-kondisi seperti tipe sel dan lingkungan mikro, *growth factor* dan reseptor yang sama dapat mengaktifkan jalur transduksi sinyal yang berbeda dan menunjukkan respons seluler yang berbeda. *Growth factor* berperan dalam memodulasi respon peradangan yang dapat meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, dan menginduksi angiogenesis yang penting dalam pembentukan matriks selama proses penyembuhan luka. Defisiensi faktor pertumbuhan, termasuk penurunan kadar FGF, PDGF, EGF, dan TGF- β , telah dilaporkan pada ulkus kronik yang dibandingkan terhadap luka akut, dan ekspresi PDGF terbukti lebih rendah pada ulkus dermal kronis dibandingkan pada luka akut pasca pembedahan.²¹

2.1.3. Reseptor PDGF

PDGF terdiri dari lima isoform yaitu empat homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) dan satu heterodimer (PDGF-AB). Kelima isoform PDGF tersebut mampu berikatan pada reseptor PDGF (PDGF-R). Dari kelima isoform PDGF, PDGF-BB adalah isoform yang paling kuat untuk merangsang proliferasi fibroblast. Ketika PDGF-BB berikatan dengan reseptornya (PDGF-R) maka akan terjadi penarikan molekul sinyal ke daerah luka seperti fosfolipase-C dan fosfatidilinositol-3 kinase. Aktivasi molekul sinyal tersebut menyebabkan aktivasi

protein tirosin kinase. Aktivase protein tirosin kinase ini akan menyebabkan aktivasi MAPK (*mitogen activated protein kinase*) sehingga memicu migrasi sel fibroblast. Sel fibroblast sendiri berkembang dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi atau dari sel fibrosit. Sel fibrosit merupakan sel yang terdapat dalam jaringan ikat dan dalam keadaan tidak aktif, apabila sel fibrosit tersebut aktif, maka disebut dengan sel fibroblast.²²

2.2 Ekspresi Gen Alpha SMA

2.2.1. Definisi dan Fungsi Ekspresi Gen Alpha SMA

Ekspresi gen *Alpha-Smooth Muscle Actin* (α -SMA) adalah ekspresi gen dari isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42. Alpha-SMA diekspresikan oleh *myofibroblast* dan ekspresi alpha-SMA berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast*. *Myofibroblast* merupakan bentuk sel fibroblas yang telah berdiferensiasi sebagian menuju fenotipe *smooth-muscle* termasuk ke dalam fibroblas metabolik, dan memiliki morfologis yang khas. *Myofibroblast* yang teraktivasi akan berhenti berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak. Alpha-SMA yang diekspresikan oleh *myofibroblast* merupakan sumber utama kolagen fibrillar, yaitu kolagen tipe I, II,

III, V, dan IX yang sangat penting untuk *tensile strength* dan *mechanical properties* kulit, sehingga penurunan kolagen tidak terjadi.²³

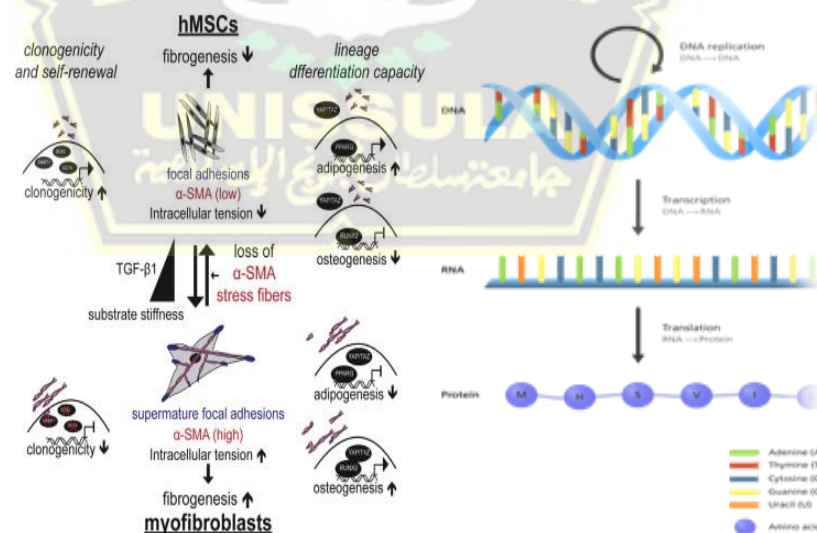
2.2.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler ekspresi gen Alpha SMA dalam Sintesis Kolagen

Paparan UV-B dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen. Kolagen merupakan ECM paling penting di dermis kulit, sehingga hilangnya kolagen secara langsung dapat menyebabkan kulit kendur, menua, dan menurunnya elastisitas.²⁴ Paparan UV juga dapat menginduksi penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel yang disebut dengan penurunan kolagen. Penurunan kolagen 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 dermal. 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 -SMA adalah *stress fibers* yang terlibat dalam aktivitas kontraktile fibroblas dan reorganisasi kolagen.²⁵

Sintesis kolagen oleh fibroblas mencapai puncaknya pada hari kelima sampai hari ketujuh. Semakin banyak fibroblas yang terbentuk maka akan mempercepat kontraksi luka dan akan mempercepat penyembuhan luka. Paparan sinar UV-B terhadap kulit dapat menimbulkan terbentuknya radikal bebas dalam sel-sel dan jaringan struktural kulit. Senyawa radikal bebas tersebut adalah Reaktif Oxygen Spesies (ROS). ROS yang dihasilkan adalah Ion Superoxide, Hydrogen peroxide, hydroxyl radical, peroxy radical. Energi sinar UV-B dengan reaksi radikal bebasnya dapat merusak molekul pada lapisan epidermis dan sedikit dilapisan dermis, khususnya DNA dan membran sel, sehingga menyebabkan pembuluh darah kulit berdilatasi dan menarik sel-sel inflamasi. Dengan adanya ROS bisa mengaktifkan reseptor permukaan sel, sehingga dapat menginduksi sinyal intra seluler dan mengaktifkan Activator Protein-1 terdiri dari dua subunit, yaitu c-Jun dan c-Fos. Komponen c-Jun dari AP-1 yang berlebihan bisa menghambat proliferasi fibroblas sehingga terjadi kerusakan aktivitas MMP (Matrix Metalloproteinase) yang akhirnya mengalami penurunan sintesis kolagen.²

Myofibroblast yang mengekspresikan α -SMA diregulasi oleh sitokin *transforming growth factor beta* (TGF- β). 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*. Produksi α -SMA yang meningkat menyebabkan terjadinya sintesis kolagen dan dapat memodulasi remodeling kolagen.²⁶



Gambar 2.1. Ekspresi Gen Alpha SMA

2.3 Ektrak Daun Kelor

2.3.1. Definisi Daun Kelor

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman tropis yang mudah tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia dan berbagai kawasan tropis lainnya di dunia. Tanaman kelor merupakan tanaman dengan ketinggian 7-11 meter. Tanaman ini berupa semak atau pohon dengan akar yang kuat, berumur panjang, batangnya berkayu getas (mudah patah), tegak, berwarna putih kotor, berkulit tipis, permukaan kasar, dan jarang bercabang. Tanaman kelor memiliki bunga yang berwarna putih kekuning-kuningan yang keluar sepanjang tahun dengan aroma semerbak yang khas. Tanaman kelor memiliki buah yang berbentuk panjang dan segitiga dengan panjang sekitar 20-60 cm. Buah tanaman kelor berwarna hijau ketika masih muda dan berubah menjadi coklat ketika tua ²⁷.

Penanaman kelor di Indonesia tersebar di seluruh daerah, mulai dari Aceh hingga Meurauke. Oleh karena itu, tanaman kelor dikenal berbagai daerah, seperti murong (Aceh), munggai (Sumatera Barat), kilor (Lampung), kelor (Jawa Barat dan Jawa Tengah), marongghi (Madura), kiloro (Bugis), parongge (Bima), kawona (Sumba), dan kelo (Ternate) ²⁷. Klasifikasi tanaman kelor adalah sebagai berikut :

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *capparales*

Famili : *Moringaceae*

Genus : *Moringa*

Spesies : *Moringa oleifera Lam*



Gambar 2.2. Daun Kelor

Daun Kelor mengandung asam lemak yang meliputi asam palmitat, stearat, oleat linoleat dan linolenat. Selain itu Daun Kelor juga memiliki kandungan tanin, flobatanin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenol flavonoid, flavanol glikosida, protein, alkaloid, antrakuinon, stigmasit 4-ena-3,6 dion, minyak volatil, steroid dan flavonoid. Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa polifenol yang dihasilkan dari tanaman dan terdiri dari berbagai kelas seperti antosianin, apigenin, kaemferol flavonol, flaveur, flavanon, dan isoflavones, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi.²⁸

2.3.2. Kandungan Kimia Daun Kelor

Tanaman kelor mangandung 539 senyawa yang dikenal dalam pengobatan tradisional Afrika dan India yaitu bertindak sebagai

stimulan jantung dan peredaran darah, antitumor, antipiretik, antiepilepsi, antiinflamasi, diuretik, antihipertensi, menurunkan kolesterol, antioksidan, antidiabetik, antibakteri, dan antijamur.²⁹

Menurut penelitian terdahulu, ekstrak daun kelor mengandung tanin 8,22%, saponin 1,75%, dan fenol 0,19%. Daun kelor memiliki kandungan bahan aktif seperti flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol sebagai antimikrobia. Mekanisme bahan aktif antibakteri ini yaitu dengan peningkatan permeabilitas dari dinding sel bakteri sehingga membran sel bakteri rusak dan bakteri lisis.³⁰

Daun kelor sebagai sumber antioksidan alami yang baik karena kandungan berbagai jenis senyawa antioksidan pada daun kelor seperti asam askorbat, flavonoid, fenolik, dan karotenoid. Tingginya konsentrasi asam askorbat, zat estrogen dan β -sitosterol, besi, kalium, fosfor, tembaga, vitamin A, B, C yang membuat daun kelor memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Kandungan kimia asam amino yang terdapat pada daun kelor berbentuk asam aspartat, asam glutamat, alanin, valin, leusin, isoleusin, histidin, arginin, triptofan, sistein, dan metionin.³¹

2.3.3. Manfaat Daun Kelor dalam Menekan Inflamasi

Kandungan Antosianin dalam Daun Kelor diketahui dapat menghambat peradangan dan hipersensitivitas dalam aktivitas asma dengan menghambat aktivasi NF- κ B dalam monosit dan mengurangi konsentrasi plasma mediator pro-inflamasi (7,8). Turunan flavon

pada Daun Kelor memiliki kemampuan dalam menekan produksi TNF α dari makrofag yang teraktivasi melalui penghambatan jalur pensinyalan AP-1 dan Nrf-2. Selain itu Apigenin memiliki kemampuan dalam menekan pelepasan dan ekspresi gen MCP-1 yang merupakan salah satu mediator pro-inflamasi dalam makrofag. Kaempferol dan quercetin juga dilaporkan mampu menekan produksi berbagai mediator pro-inflamasi dari makrofag, endotel, epitel, atau sel hati dengan menghambat faktor sinyal yang terlibat dalam jalur TLR4. Beberapa turunan kaempferol antara lain kaempferol 3-(2-G-rhamnosylrutinoside), kaempferol 3-neohesperidoside, kaempferol 3-(2"-rhamnosyl-6"-malonyl) glucoside, kaempferol 3rutinoside, dan kaempferol 3-glucoside dan turunan quercetin seperti quercetin 3-(2G). -rhamnosylrutinoside), quercetin 3-neohesperidoside, quercetin 3-(2-rhamnosyl-6- malonyl) glucoside, quercetin 3-rutinoside, dan quercetin 3-glucoside telah terbukti memiliki efek penghambatan pada enzim COX-2 aktivitas yang berperan penting dalam pelepasan mediator pro-inflamasi seperti PGE2 dan PGD2.³²

2.3.4. Hubungan Antara Variable Ekstrak Daun Kelor Terhadap Ekspresi Gen PDGF & Alpha SMA pada tikus yang dipapar UV-B

Beberapa golongan senyawa aktif seperti antosianin, tanin, antraquinon dan sinamat telah dilaporkan memiliki kemampuan

sebagai perlindungan terhadap sinar UV. Berbagai penelitian melaporkan bahwa disamping antosianin mempunyai kemampuan sebagai pelindung alami dari paparan UV B, senyawa tersebut juga berperan sebagai agen antioksidan dan anti-inflamasi pada jaringan kulit.³³ Salah satu tumbuhan yang dikenal mempunyai kandungan senyawa antosianin yang tinggi adalah daun kelor.³⁴ Senyawa antosianin dalam daun kelor dapat berperan penting dalam menghambat kondisi inflamasi pasca paparan UV B pada jaringan kulit. Hal tersebut akan berdampak pada percepatan proliferasi sel kulit yang terpapar UV B yang ditandai dengan peningkatan ekspresi gen PDGF. Peningkatan ekspresi PDGF akan berdampak pada aktivasi alpha-SMA pada myofibroblast kulit sehingga ekspresi kolagen dapat meningkat.³⁵

Paparan UV-B diketahui dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan faktor inflamasi yang dapat berujung pada penurunan kolagen akibat dari peningkatan enzim matrix metalloproteinase MMP dan penurunan Transforming Growth Factor β (TGF- β). Peningkatan enzim MMP akan mendegradasi kolagen pada kulit sehingga menyebabkan hilangnya kekenyalan kulit serta timbulnya kerutan pada kulit. Faktor pertumbuhan TGF- β merupakan faktor kunci dalam aktivasi sel fibroblas untuk memproduksi kolagen, sehingga penurunan TGF- β berujung pada penurunan ekspresi Alpha SMA.³⁶

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam Daun Kelor diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF alfa yang berperan dalam peningkatan enzim MMP. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa pemberian antosianin mampu meningkatkan ekspresi Alpha SMA pada kulit yang terpapar UVB.⁶

2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah, yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset biomedis, dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai, serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) termasuk hewan nokturnal dan sosial. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan baik ditinjau dari segi lingkungan adalah temperatur dan kelembaban. Temperatur yang baik untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*), yaitu 19°C–23°C, sedangkan kelembaban 40-70%.³⁷



Gambar 2.3. tikus putih wistar (*Rattus Norvegicus*)

Data Taksonomi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*):³⁷

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Klas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Family	: Muridae
Subfamily	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: Norvegicus

Kelebihan dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai binatang percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia, dan gizi yang dibutuhkan juga hampir sama dengan manusia. Selain itu dari segi ekonomi memiliki harga yang murah, ukuran yang kecil, dan berkembang dengan cepat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) percobaan galur Wistar yang dikembangkan secara luas sangat mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Makanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) juga mempunyai variasi susunan, meliputi: protein 20-25 %, karbohidrat 45- 50%, serat 5%. Setiap hari seekor tikus putih (*Rattus*

norvegicus) dewasa membutuhkan makanan antara 12-20 gr, air minum antara 20-45 ml, mineral berupa besi sebesar 35 mg/kg.³⁷

2.5 Gel

2.5.1. Definisi Gel

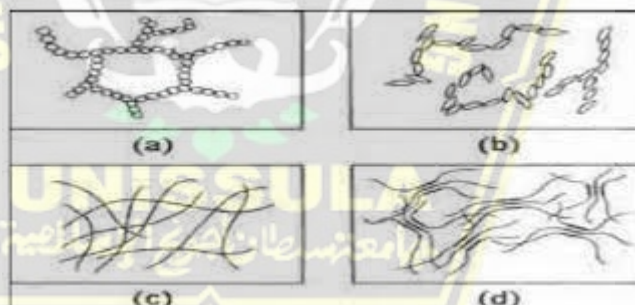
Gel (kadang-kadang disebut Jeli) merupakan sistem semipadat terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar, terpenetrasi oleh suatu cairan. Jika massa gel terdiri dari jaringan partikel kecil yang terpisah, gel digolongkan sebagai sistem dua fase. Dalam sistem dua fase, jika ukuran partikel dari fase terdispersi relatif besar, massa gel kadangkadang dinyatakan sebagai magma (misalnya Magma Bentonit). Gel fase tunggal terdiri dari makromolekul organik yang tersebar merata dalam suatu cairan sedemikian hingga tidak terlihat adanya ikatan antara molekul makro yang terdispersi dan cairan. Gel fase tunggal dapat dibuat dari makromolekul sintetik (misalnya Karbomer) atau dari gom alam (misalnya Tragakan). Sediaan tragakan disebut juga musilago. Walaupun gel-gel ini umumnya mengandung air, etanol dan minyak dapat digunakan sebagai fase pembawa. Gel dapat digunakan untuk obat yang pemberiannya secara topikal atau dimasukkan ke dalam lubang tubuh (USP38/NF33, 2015; Depkes RI, 2020). Contoh Voltaren gel, bioplasenton. Penyimpanan dalam wadah tertutup baik, dalam

bermulut lebar terlindung dari cahaya dan ditempat sejuk. Konsentrasi gelling agent sebagian besar kurang dari 10%, biasanya dalam kisaran 0,5% hingga 2,0%, dengan beberapa pengecualian. Thixotropy gel adalah reversibel tanpa terjadi perubahan volume atau suhu, berupa aliran non-Newtonian.³⁸

2.5.2. Struktur Gel

Terdapat empat macam struktur gel yaitu :³⁹

1. Partikel flokulasi dalam struktur gel dua fase.
2. Jaringan partikel atau bentuk batang yang memanjang membentuk struktur gel.
3. Serat kusut seperti yang ditemukan dalam sabun gel.
4. Daerah kristal dan amorf dalam gel karboksimetil selulosa (CMC).



Gambar 2.4. Representasi Struktur Gel

2.5.3. Sifat Sediaan Gel

1. Idealnya, gelling agent harus inert, aman dan tidak bereaksi dengan formulasi bahan lain.
2. Gelling agent harus menghasilkan sifat padat yang baik pada saat penyimpanan, tidak mudah pecah saat terkena geseran kekuatan

yang dihasilkan dengan menggetarkan botol atau pada saat aplikasi topikal.

3. Sediaan gel harus memiliki agen anti-mikroba yang sesuai untuk mencegah aktivitas mikroba.
4. Gel topikal tidak boleh lengket.
5. Gel oftalmik harus steril.
6. Viskositas sediaan gel meningkat dengan adanya peningkatan efektif kepadatan ikatan silang gel. Namun, apabila terjadi peningkatan suhu maka dapat meningkatkan atau menurunkan viskositas, tergantung pada interaksi molekuler antara polimer dan pelarut.
7. Terdapat ikatan yang kuat antara fase terdispersi dan media air sehingga gel tetap homogen dan tidak mengendap dengan bebas.³⁸

2.5.4. Kegunaan Gel

1. Sebagai sistem penghantaran obat yang diberikan secara topikal.
2. Untuk obat topikal yang dioleskan langsung ke kulit, selaput lendir atau mata.
3. Sebagai obat injeksi long acting secara intramuskuler.
4. Sebagai pengikat dalam granulasi tablet, koloid pelindung dalam suspensi, pengental dalam cairan oral dan basis supositoria.
5. Sebagai kosmetik seperti sampo, produk wewangian, pasta gigi, sediaan perawatan kulit dan rambut.

6. Gel NaCl untuk elektrokardiografi Sodium fluoride dan gel asam fosfat untuk profilaksis perawatan gigi
7. Basis untuk patch testing.
8. Pelumas (*lubricant*) untuk kateter.³⁹

2.5.5. Sediaan Gel yang Baik

Sediaan Gel untuk dermatologis harus *thixotropic*, tidak berminyak, mudah dilepas, tidak menodai, larut dalam air atau larut dan kompatibel dengan sejumlah bahan. Mereka juga harus memiliki sifat *demulcent*, *emollient* dan *spreadability* yang baik.³⁹



BAB III

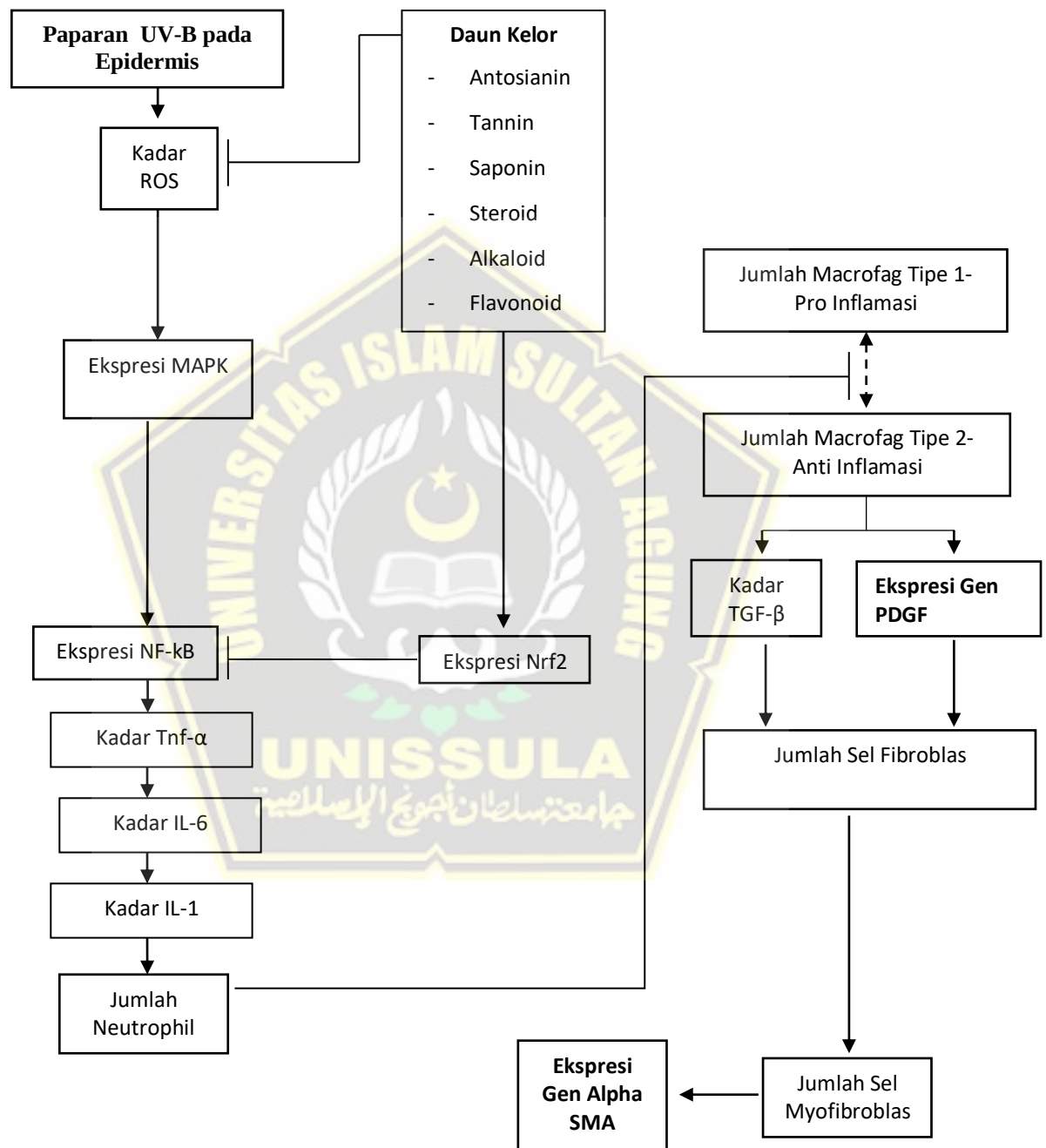
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP & HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

3.1.1. Penuaan dini adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Sehubungan dengan mekanisme penuaan dini, penetrasi UV-B pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS meningkatkan peningkatan ekspresi protein kinase yang memicu transkripsi faktor protein-1 (AP-1) dan memicu pembentukan enzim MMP-3.

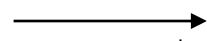
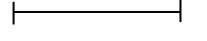
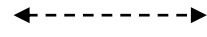
3.1.2. Daun Kelor diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti Antosianin yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UV-B sehingga dapat mencegah aktivasi NF-kB dan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF alpha. Senyawa antosianin dalam daun kelor berperan penting dalam menghambat kondisi inflamasi pasca paparan UV B pada jaringan kulit. Hal tersebut akan berdampak pada percepatan proliferasi sel kulit yang terpapar UV B yang ditandai dengan peningkatan ekspresi gen PDGF. 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 antiinflamasi serta mampu mensekresi TGF-beta yang dapat mengaktivasi fibroblas menjadi myofibroblas yang ditandai ekspresi Alpha-SMA. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Bagan 3.1.

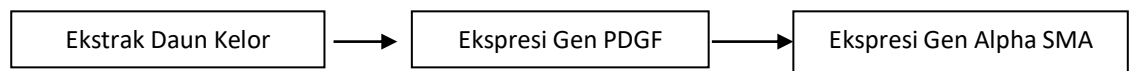


Bagan 3.1. Kerangka Teori

Keterangan :

 : Penginduksian
 : Penghambatan
 : Polarisasi

3.2 Kerangka Konsep



Bagan 3.2. Kerangka konsep

3.3 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini antara lain adalah :

- a. Terdapat peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus Wistar yang dipapar UV- B setelah diberi ekstrak daun kelor secara topikal dengan konsentrasi 5% dan 10% dibandingkan kontrol.
- b. Terdapat peningkatan ekspresi gen Alpha SMA Pada tikus Wistar yang dipapar UV-B setelah diberi ekstrak daun kelor secara topikal dengan konsentrasi 5% dan 10 % dibandingkan kontrol.

BAB IV

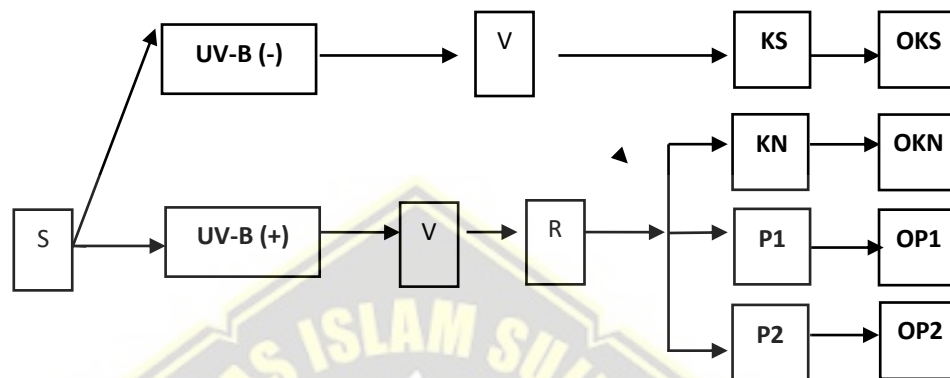
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Sesuai dengan tujuan penelitian, jenis penelitian ini dikategorikan sebagai penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan kegiatan penelitian untuk mengontrol, memanipulasi dan mengobservasi subjek penelitian. Desain eksperimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain eksperimen sederhana (*Posttest Only Control Group Design*). Dalam desain eksperimen sederhana terdapat dua kelompok yang dipilih secara random.⁴⁰ Satu kelompok bertindak sebagai kelompok kontrol dan kelompok lain bertindak sebagai kelompok eksperimen. Kelompok yang diberikan perlakuan disebut sebagai kelompok eksperimen, sedangkan yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Kemudian pada kurun waktu yang telah ditentukan kelompok eksperimen tersebut diberi perlakuan. Setelah perlakuan selesai, dilakukan pengukuran terhadap kedua kelompok. Perbandingan hasil antara kedua kelompok menunjukkan efek dari perlakuan yang telah diberikan.⁴¹ Kelompok kontrol berfungsi sebagai pembanding dengan kelompok eksperimen yang telah diberikan perlakuan selama kurun waktu tertentu. Kelompok penelitian terdiri dari:

1. Kontrol Sehat (Tikus sehat tanpa paparan UV-B),
2. Kontrol Negatif (Tikus dengan *Penurunan kolagen* diberikan perlakuan yaitu pemberian *Water base Gel*)

3. Perlakuan 1 (Tikus dengan *Penurunan kolagen* dengan perlakuan gel ekstrak Daun Kelor secara topikal dosis 5 %.)
4. Perlakuan 2 (Tikus dengan *Penurunan kolagen* dengan perlakuan ekstrak Daun Kelor secara topikal dosis 10%.)



Bagan 4.1. Alur Rancangan penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Gel ekstrak daun Kelor 5% dan 10 %

2. Variabel Perantara

Ekspresi gen PDGF

3. Variabel Terikat

Ekspresi gen Alpha SMA

4.2.2. Definisi Operasional

1. Ekstrak Daun Kelor Adalah ekstrak dari Daun Kelor (*Moringa oleifera*) menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan gel dengan konsentrasi 5 % dan 10 %. Daun kelor mengandung

senyawa aktif flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan untuk membantu menetralkan dan menstabilkan radikal bebas sehingga tidak lagi merusak sel-sel dan jaringan sehat. Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman perdu yang mengandung flavonoid, saponin sitokinin, asam-*caffeoylquinat* dan mengandung asam lemak tak jenuh seperti linoleat (omega 6) dan alfa-linolenat (omega 3).

2. Ekspresi Gen PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) adalah ekspresi gen dari protein berperan dalam pengaturan pembelahan dan pertumbuhan sel, yang diambil dari sampel jaringan dengan metode PCR.
3. Ekspresi Gen Alpha SMA adalah ekspresi gen dari isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *Smooth Muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42 kD berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast*.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory-SCCR Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang yang

dipapar sinar UV-B 302 nm dengan MED 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari dan timbul gejala penurunan kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

- a. Tikus putih jantan galur dengan penurunan kolagen akibat paparan UVB
- b. Umur 2-3 bulan.
- c. Kondisi sehat.
- d. Berat badan 200-250 gram.

2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

- a. Memiliki kelainan anatomis.
- b. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

3. Kriteria Drop Out

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.4. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat (tikus sehat tanpa penurunan kolagen akibat paparan UV-B), Kontrol Negatif (tikus model penurunan kolagen yang tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 (tikus model penurunan

kolagen yang diberi gel ekstrak daun Kelor konsentrasi 5 % secara topikal) dan Perlakuan 2 (tikus model penurunan kolagen yang diberi gel ekstrak daun Kelor konsentrasi 10% secara topikal).

4.5. Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok. Sampel diambil dari populasi tersebut dan besarnya ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut :⁴²

Rumus Federer : $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

Keterangan : n = Jumlah Sampel

: t = Jumlah Kelompok

Banyak Kelompok : 4 kelompok (t=)

Sampel tiap kelompok : $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

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

$$(n-1) \times 3 \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq (15+3) / 3$$

$$n \geq 6$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 6 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 6 ekor tikus perkelompok.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. 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 *micropipet tip*, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.6.2. Bahan

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

4.7. Cara Penelitian

4.7.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.7.2. Cara Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Daun Kelor ± 600 gram dipotong menjadi bagian kecil, dikeringkan pada suhu $50 - 60^{\circ}\text{C}$ dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Kemudian bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol 95% 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 $2-8^{\circ}\text{C}$. Proses ekstraksi ini menghasilkan 5% dan 10% ekstrak dari Daun Kelor segar. Konsentrasi ekstrak tersebut dilarutkan dalam aquades sebelum diberikan ke hewan coba.⁴¹

4.7.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Penelitian sebelumnya menggunakan dosis ekstrak daun kelor sebanyak 5% dan 10 % untuk penggunaan secara topikal.⁶ Penggunaan gel ekstrak daun kelor dilakukan setiap hari sebanyak 2 mg per tikus, sehingga dosis ekstrak daun kelor yang digunakan adalah 0,1 per tikus untuk dosis 5 % dan 0,2 mg per tikus untuk dosis 10%.

4.7.4. Paparan UV -B⁴³

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).

2. Rambut pada bagian dorsal tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm
3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari.
4. Tikus Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak daun kelor dengan dosis 5% dan 10% yang diberikan satu kali sehari selama 15 hari pasca penyinaran UV-B.

4.7.5. Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen⁴⁴

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan protokol

pengecatan Masson Trichome dengan tahapan sebagai berikut :

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

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

4.7.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam.

Dan dimasukkan didalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.7.7. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

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

2. Parafinisasi dan Embedding

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

4.7.8. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen PDGF & Alpha SMA Menggunakan *Real Time - PCR*

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagent TRIzol® reagent (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 PDGF Dan Alpha SMA

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

Tabel 4.1. Komponen PCR Mix PDGF Dan Alpha SMA

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward	PDGF 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3
	Dan	Alpha 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'
	SMA	
	Reverse	PDGF
	Dan	Alpha
	SMA	
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
cDNA	SYBR Green	

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

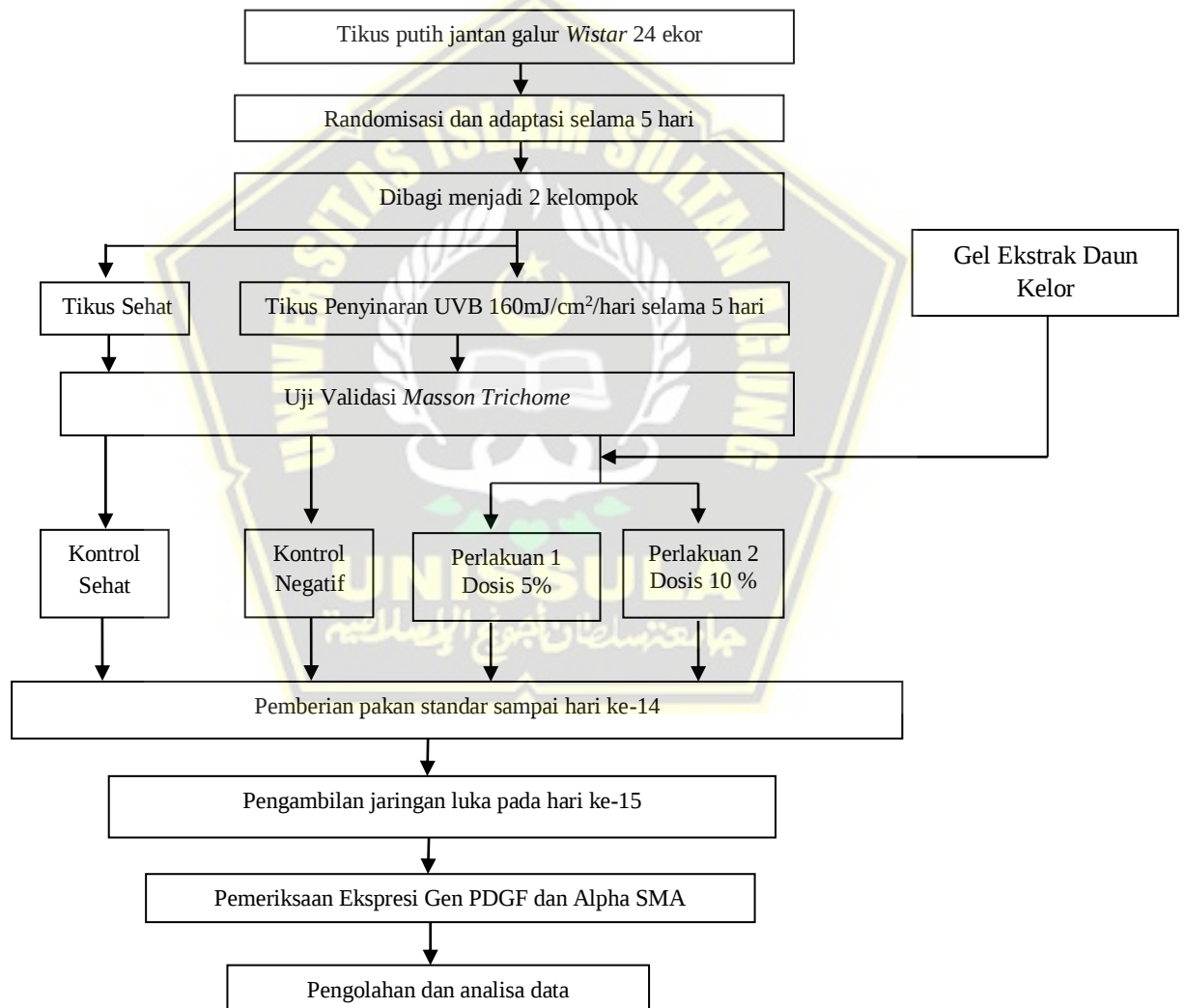
Penelitian dilakukan di Unit SCCR Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung dan rencana telah dilakukan pada Juli sampai dengan Agustus 2022.

4.9. Analisa Data

Data yang diperoleh kemudian diproses, disunting, dan ditabulasi, untuk dilakukan uji deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Apabila data yang dihasilkan normal dan homogen, maka akan dilakukan uji

beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD dan Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila terdapat sebaran data tidak normal dan varian tidak sama, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.

4.10. Alur Penelitian



Bagan 5.1. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

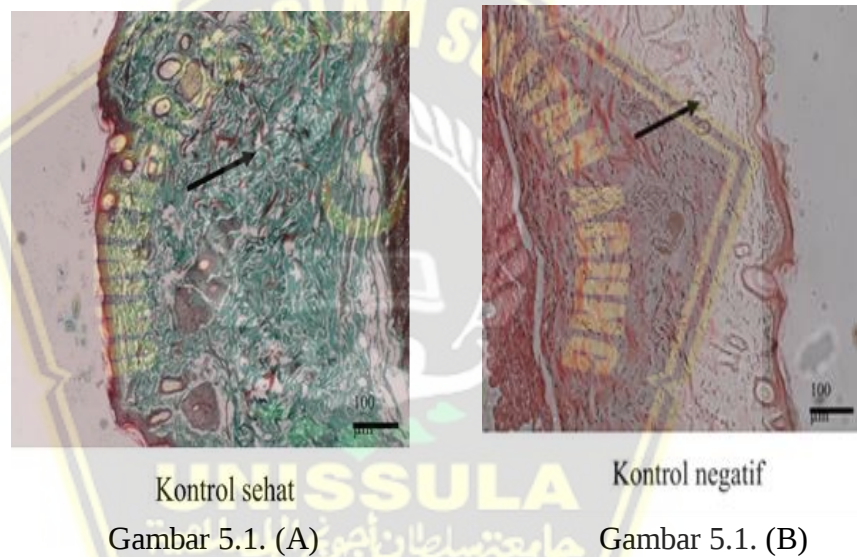
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli 2022 hingga Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) , Fakultas Kedokteran Islam Sultan Agung , Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar dengan berat 150-250 gram dan berumur 4-6 bulan yang diinduksi dengan sinar UV-B 302 nm dengan intensitas energi 160 mJ/cm. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yang terdiri dari 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok sehat dan 1 kelompok negatif, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus sebagai subjek penelitian. Kelompok perlakuan pertama (P1) dengan pemberian gel ekstrak daun Kelor 0,5 % dan kelompok perlakuan 2 (P2) dengan pemberian gel ekstrak daun Kelor 10% . Kelompok negatif (KN) diberi perlakuan dengan pemberian base gel sedangkan kelompok kontrol sehat (KS) adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan layak etik dari Komisi Bioetik Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran UNISSULA dengan No. 276/VIII/2022/Komisi Bioetik.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Pengaruh Penyinaran UV-B Terhadap Gambaran Mikroskopik Kolagen Tikus

Induksi model tikus UV-B dilakukan dengan penyinaran panjang gelombang UV-B 160mJ/cm²/hari selama 5 hari pada tikus kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 & kelompok perlakuan 2 selanjutnya dilakukan uji validasi *Masson Trichome* pada hari ke-6 dengan pengamatan mikroskopis didapatkan hasil seperti gambar 5.1.



Gambar 5.1 (A) mengenai histologi kulit pada kelompok sehat. Penelitian ini menghasilkan gambaran histologi pada kelompok tikus yang tidak dipapar UV-B terdiri dari epidermis, dermis, dan hidodermis. Lapisan paling luar adalah epidermis dengan lapisan tipis keratin terhampar di atasnya. Dibawah epidermis terdapat dermis yang

mengandung jaringan ikat dengan kolagen dan jaringan elastis yang padat.

Gambar 5.1 (B) mengenai histologi kulit pada kelompok yang dipapar UV-B. Penelitian ini menghasilkan gambaran histologi berupa lapisan epidermis, dermis dan hidodermis. Dari kedua gambar diatas, secara kasar dapat dilihat terdapat perbedaan pada jaringan ikat dan kolagen pada kelompok yang dipapar UV-B lebih longgar. Paparan UV-B dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen.

5.1.2. Determinasi dan Ekstraksi Daun Kelor

Daun Kelor (*Moringa oleifera*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari perkebunan di Kota Semarang. Determinasi bahan dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang (Tabel 5.1.)

Tabel 5.1. Hasil Determinasi Daun Kelor

Nama Sampel	Daun Kelor
Sampel	Tanaman Lengkap
Kingdom	Plantae
Divisio	Magnoliophyta
Classis	Magnoliopsida
Ordo	Capparales
Familia	Moringaceae
Subfamilia	Beassicales
Genus	Moringa
Species	Moringa oleifera Lamk
Sinonim	Kelor
Nama Lokal	Kelor

Daun kelor dikeringkan dan dimaserasi dalam etanol 96% selama 3 hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Residu

dilakukan proses remaserasi dengan sisa pelarut etanol selama 2 hari untuk mengekstrak zat aktif pada Daun Kelor. Filtrat yang didapat digabungkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* sehingga didapatkan ekstrak kental daun kelor. Kandungan zat aktif pada ekstrak daun kelor kemudian dianalisis menggunakan metode Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total.

5.1.3. Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total

Uji kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Hal – hal yang berperan penting pada skrining fitokimia antara lain pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Dalam hasil skrining senyawa fitokimia ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dapat dinilai kandungan senyawa metabolit sekunder yang dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing – masing senyawa. Uji skrining fitokimia terdiri dari uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin, uji tanin, uji steroid, dan uji triterpenoid, dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Kandungan Ekstrak Daun Kelor

Zat Aktif	Hasil Uji Kualitatif
Alkaloid	Negatif
Saporin	Positif
Tanin	Positif
Flavonoid	Positif
Steroid	Negatif
Triterpenoid	Positif

Pada uji kualitatif flavonoid dengan pereaksi warna, jika setelah ditambahkan serbuk magnesium dan HCL 2N terbentuk warna merah hingga merah muda maka menunjukkan adanya flavonoid. Uji flavonoid secara kuantitatif dengan menganalisis kandungan flavonoid total pada ekstrak etil asetat dan etanol daun kelor. Hasil kadar rata – rata flavonoid total adalah $20,6916 \pm \text{stdev}$.

Tabel 5.3. Hasil uji Kadar Flavonoid Total

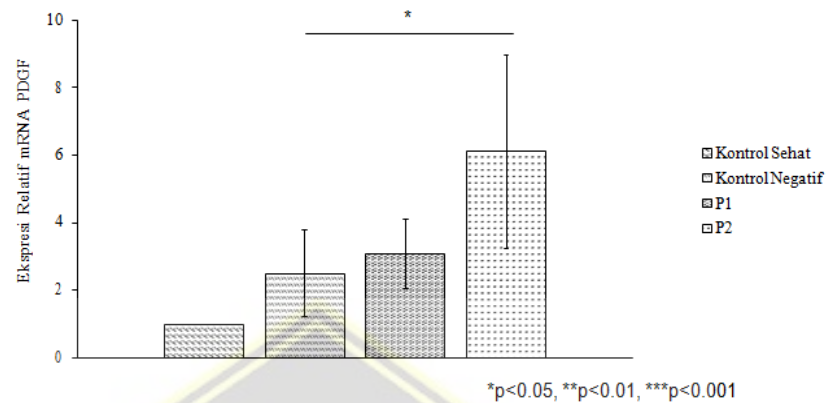
Extract Consentration	TFC
1000 ppm	21,5738
1000 ppm	20,9885
1000 ppm	19,5125

5.1.4. Efek Pemberian Gel Ekstrak Daun Kelor terhadap Ekspresi Gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus Wistar Model Penurunan Kolagen

Penelitian ini pada kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan gel ekstrak daun Kelor masing – masing 5% & 10% selama 14 hari untuk dibandingkan pengaruh pemberian gel ekstrak daun Kelor tersebut terhadap kelompok sehat (KS) dan Kelompok Negatif (KN). Paparan UV juga dapat menginduksi penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel yang disebut dengan penurunan kolagen. Penurunan kolagen merupakan perubahan karakteristik pada kulit akibat paparan UVA dan UVB yang dapat

a. Efek Pemberian Gel Ekstrak Daun Kelor terhadap Ekspresi Gen PDGF pada tikus Wistar Model Penurunan Kolagen

PDGF



Gambar 5.2. Grafik Ekspresi Gen PDGF pada semua kelompok penelitian (*pt 0,05 = signifikan)

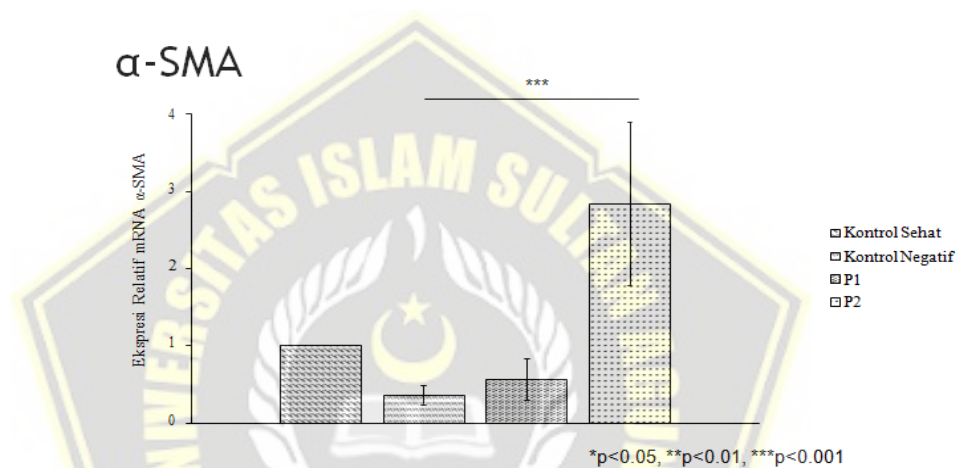
Tabel 5.5. Uji *Man Whitney* Ekspresi Gen PDGF antar kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Std. Test Statistic	Test Statistic	Sig.
Kontrol Sehat	Kontrol Negatif	-2.098	-8.500	0,036
Kontrol Sehat	P1	-2.674	-10.833	0,007
Kontrol Sehat	P2	-4.114	-16.667	0,000
Kontrol Negatif	P1	-576	-2.333	0,565
Kontrol Negatif	P2	-2.016	-8.167	0,044
P1	P2	-1.440	-5.833	0,150

Pada data deskriptif, Ekspresi Gen PDGF masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikasi semua kelompok $p > 0,05$ kecuali pada kelompok sehat dengan nilai $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi tidak normal sehingga dapat dilakukan uji *Kruskal-Wallis Test* untuk menguji perbedaan yang signifikan antara kelompok, didapatkan

$p < 0,05$. Hasil uji *Kruskal-Wallis Test* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.2 dan tabel 5.5. Penelitian ini menunjukkan pengaruh yang signifikan $p < 0,05$ antara gel ekstrak daun Kelor terhadap ekspresi gen PDGF pada tikus Wistar Model Penurunan Kolagen.

b. Efek Pemberian Gel Ekstrak Daun Kelor terhadap Ekspresi Gen Alpha SMA pada tikus Wistar Model Penurunan Kolagen



Gambar 5.3. Grafik Ekspresi Gen Alpha SMA pada semua kelompok penelitian (* $p < 0,05$ = signifikan)

Tabel 5.6. Uji *Man Whitney* Ekspresi Gen Alpha SMA antar kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Std. Test Statistic	Test Statistic	Sig.
Kontrol Negatif	P1	-741	-3.000	0,459
Kontrol Negatif	Kontrol Sehat	2.592	10.500	0,010
Kontrol Negatif	P2	-4.074	-16.500	0,000
P1	Kontrol Sehat	1.852	7.500	0,064
P1	P2	-3.333	-13.500	0,001
Kontrol Sehat	P2	-1.481	-6.000	0,139

Pada data deskriptif, Ekspresi Gen Alpha SMA masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan

Saphiro Wilk. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$ kecuali pada kelompok sehat dengan $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi tidak normal sehingga dapat dilakukan uji *Kruskal-Wallis Test*, didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji *Kruskal-Wallis Test* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3 dan tabel 5.6. Penelitian ini menunjukkan pengaruh yang signifikan $p < 0,05$ antara Gel Ekstrak Daun Kelor terhadap Ekspresi Gen Alpha SMA pada tikus Wistar Model Penurunan Kolagen.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Radiasi sinar UV-B merupakan penyebab utama fotoaging kulit yang berdampak pada hiperpigmentasi yang ditandai dengan kondisi inflamasi yang berlebihan. Hal ini disebabkan oleh peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) pada kulit, berakibat penuaan sel, aktivasi inflamasi, inhibisi produksi *Growth Factor Pro-Colagen* seperti *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) yang berujung pada penghambatan sintesis kolagen. Respon inflamasi yang diinduksi UV-B dan penurunan kolagen pada kulit yang disebabkan oleh aktivasi jalur pensinyalan NF-kB di epidermis yang berdampak pada sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-6.⁴⁵ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa NF-kB berperan penting dalam maintenance dan ekspansi proses penurunan kolagen. Hal ini mengesankan bahwa penekanan jalur pensinyalan NF-kB diharapkan dapat menekan respon inflamasi dan penurunan kolagen

yang diinduksi radiasi sinar UV-B. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen. Analisis kemampuan anti-inflamasi gel ekstrak daun kelor tersebut dilakukan menggunakan model penurunan kolagen pada kulit tikus jantan wistar karena merupakan mamalia dengan struktur kulit yang mirip dengan manusia. Tikus diinduksi menggunakan paparan sinar UV-B 302 nm dengan MED 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari.

Penelitian ini menganalisis ekspresi gen PDGF dan ekspresi gen Alpha SMA yang merupakan protein actin penanda aktivasi myofibroblast. Ekspresi gen PDGF dan ekspresi gen Alpha SMA secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA) maupun translasi (protein). Real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan pada ekspresi gen PDGF dan ekspresi gen Alpha SMA secara signifikan pada semua kelompok perlakuan dibanding kontrol, dimana peningkatan optimum terjadi pada gel ekstrak daun kelor dengan dosis 5% dan 10%. Hal ini diduga dapat terjadi karena produksi PDGF dan Alpha SMA yang secara terus menerus juga akan berakibat pada terbentuknya jaringan parut dengan mengaktivasi fibroblas menjadi myofibroblas yang akan terus menerus menghasilkan kolagen.⁴⁶ Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, selain berperan sebagai anti inflamasi, ekstrak daun kelor juga berperan sebagai antioksidan dengan

meningkatkan permeabilitas dari dinding sel bakteri sehingga membrane sel bakteri rusak dan lisis.

Growth factors mengikat reseptor yang sesuai pada permukaan sel dan akan mengaktifkan molekul pensinyalan yang relevan untuk dapat mengaktifkan protein sitoplasma atau menginduksi transkripsi protein baru. Kondisi-kondisi seperti tipe sel dan lingkungan mikro, *growth factor* dan reseptor yang sama dapat mengaktifkan jalur transduksi sinyal yang berbeda dan menunjukkan respons seluler yang berbeda. *Growth factor* berperan dalam memodulasi respon peradangan yang dapat meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, dan menginduksi angiogenesis yang penting dalam pembentukan matriks selama proses penyembuhan luka. Defisiensi faktor pertumbuhan yaitu seperti penurunan kadar FGF, PDGF, EGF, dan TGF- β hal tersebut telah dilaporkan pada ulkus kronik yang dibandingkan terhadap luka akut dan ekspresi PDGF terbukti lebih rendah pada ulkus dermal kronis dibandingkan pada luka akut pasca pembedahan.⁴⁷

Ekspresi gen *Alpha-Smooth Muscle Actin* (α -SMA) adalah ekspresi gen dari isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42. Alpha-SMA diekspresikan oleh *myofibroblast* dan ekspresi alpha-SMA berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast*. *Myofibroblast* merupakan bentuk sel fibroblas yang telah berdiferensiasi sebagian menuju fenotipe *smooth-muscle* termasuk ke dalam fibroblas metabolik, dan memiliki morfologis yang khas. *Myofibroblast* yang teraktivasi akan berhenti

berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak.²³

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gel ekstrak daun kelor memiliki aktivitas anti-inflamasi pada model tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen melalui peningkatan ekspresi gen PDGF dan ekspresi gen Alpha SMA. Hal ini menjelaskan bahwa gel ekstrak daun kelor memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi yang tertarget dalam penekanan proses inflamasi, terutama pada kulit yang mengalami penurunan kolagen.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan pada penelitian ini adalah peneliti tidak mengeksplorasi efek pemberian gel ekstrak daun kelor terhadap kadar, ekspresi protein intraseluler maupun ekspresi mRNA sitokin anti-inflamasi seperti IL-6 dan IL-10 yang diduga kuat sebagai salah satu faktor dalam penekanan proses inflamasi. Penelitian ini juga tidak menganalisis TGF- β yang berperan dalam sintesa kolagen. Sisi lain penelitian ini juga tidak menggunakan variasi waktu pengamatan pada setiap fase penyembuhan inflamasi, proliferasi dan remodelling yaitu pada hari ke 3, 6, dan pasca induksi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen PDGF dan Alpha SMA pada tikus wistar yang mengalami penurunan kolagen selama 14 hari dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak daun kelor secara topikal dengan konsentrasi 5% dan 10% berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus Wistar yang dipapar UV- B.
2. Pemberian ekstrak daun kelor secara topikal dengan konsentrasi 5% dan 10 % berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan Alpha SMA pada tikus Wistar yang dipapar UV-B.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ekspresi protein intraseluler dan ekspresi mRNA sitokin anti-inflamasi seperti IL-6 dan IL-10 setelah dilakukan pemberian gel ekstrak daun kelor pada tikus yang mengalami penurunan kolagen.
2. Perlu pengukuran terhadap TGB- β yang berperan dalam sintesa kolagen setelah dilakukan pemberian gel ekstrak daun kelor pada tikus yang

mengalami penurunan kolagen.

3. Perlu pengukuran pada beberapa variasi waktu pengamatan di fase inflamasi, proliferasi dan remodeling setelah dilakukan pemberian gel ekstrak daun kelor pada tikus yang mengalami penurunan kolagen.



DAFTAR PUSTAKA

1. Isfardiyana, S. H. & Safitri, S. R. Pentingnya melindungi kulit dari sinar ultraviolet dan cara melindungi kulit dengan sunblock buatan sendiri. *J. Inov. dan Kewirausahaan* **3**, 126–133 (2014).
2. Biniek, K., Levi, K. & Dauskardt, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17111–17116 (2012).
3. Zulkarnain, A. K., Ernawati, N. & Sukardani, N. I. Activities of Yam Starch (*Pachyrrizus Erosus* (L.) Urban) As Sunscreen in Mouse and the Effect of Its Concentration To Viscosity Level. *Tradit. Med. J.* **18**, 1–8 (2013).
4. Ardan, M., Agustina, R. & Masruhim, M. A. ANALISIS BAHAN KIMIA BERBAHAYA PADA KRIM PENCERAH WAJAH YANG BEREDAR DI KOTA SAMARINDA. *Pros. Semin. Nas. Kefarmasian Ke-3* 64–71 (2016).
5. Pangaribuan, L. Efek Samping Kosmetik Dan Penanganannya Bagi Kaum Perempuan. *J. Kel. Sehat Sejah.* **15**, 20–28 (2017).
6. Saritani, A. T. B., Wiraguna, A. A. G. P. & Maker, L. P. I. I. *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.* **4**, 109–113 (2021).
7. Yohannes, R. & Al Rivan, M. E. Klasifikasi Jenis Kanker Kulit Menggunakan CNN-SVM. *J. Algoritm.* **2**, 133–144 (2022).
8. Mori, K. *et al.* A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. *FEBS J.* **286**, 459–478 (2019).
9. Wilson, S. E. Interleukin-1 and transforming growth factor beta: commonly opposing, but sometimes supporting, master regulators of the corneal wound healing response to injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **62**, 1–16 (2021).
10. Ali, A., Akhtar, N. & Chowdhary, F. Enhancement of human skin facial revitalization by moringa leaf extract cream. *Postep. Dermatologii i Alergol.* **31**, 71–76 (2014).
11. Zhou, Y. *et al.* Moringa oleifera stem extract protect skin keratinocytes against oxidative stress injury by enhancement of antioxidant defense systems and activation of PPAR α . *Biomed. Pharmacother. J.* **107**, 44–53 (2018).
12. Engsuwan, J., Waranuch, N., Limpeanchob, N. & Ingkaninan, K. Anti-inflammatory effect of moringa oleifera lam. Leaf extract on uvb-irradiated

- human keratinocytes. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **43**, 774–780 (2021).
13. Álvarez-Román, R. *et al.* Moisturizing and antioxidant evaluation of *Moringa oleifera* leaf extract in topical formulations by biophysical techniques. *South African J. Bot.* **129**, 404–411 (2020).
 14. Wang, Y. *et al.* Anti-photoaging effects of flexible nanoliposomes encapsulated *Moringa oleifera* Lam. isothiocyanate in UVB-induced cell damage in HaCaT cells. *Drug Deliv.* **29**, 871–881 (2022).
 15. Chen, H. *et al.* Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 287–295 (2017).
 16. Pratama, A. F., Tarsim & Susanti, O. Kajian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam) sebagai Immunostimulan untuk Meningkatkan Imunitas Non Spesifik Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*). *J. Sains Teknol. Akuakultur* **2**, 16–21 (2018).
 17. Gallo-Oller, G., Scala, M. Di, Aranda, F. & Dotor, J. Chapter Six - Transforming growth factor beta (TGF- β) activity in immuno-oncology studies. *Methods Enzymol.* **636**, 129–172 (2020).
 18. Masir, O., Manjas, M., Eka Putra, A. & Agus, S. Pengaruh Cairan Kultur Filtrate Fibroblast (CFF) Terhadap Penyembuhan Luka; Penelitian eksperimental pada Rattus Norvegicus Galur Wistar. *J. Kesehat. Andalas* **1**, 1–6 (2012).
 19. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *NIH Public Access* **473**, 298–307 (2011).
 20. Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V. & Stojanovic, P. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. *Open Med.* **11**, 242–247 (2016).
 21. Park, C. S., Helmbrecht, A., Htoo, J. K. & Adeola, O. Comparison of amino acid digestibility in full-fat soybean, two soybean meals, and peanut flour between broiler chickens and growing pigs. *J. Anim. Sci.* **95**, 3110–3119 (2017).
 22. Lee, D. E., Ayoub, N. & Agrawal, D. K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: Novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 1–8 (2016).
 23. Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 415–424 (2010).
 24. Sobeh, M. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. *J. Ethnopharmacol.* **240**, (2019).

25. Geng, T. *et al.* Flow-through electroporation based on constant voltage for large-volume transfection of cells. *J. Control. Release* **144**, 91–100 (2010).
26. Smith, P. C., Cáceres, M., Martínez, C., Oyarzún, A. & Martínez, J. Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam). *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **94**, 395–402 (2015).
27. Saputra, A., Arfi, F. & Yulian, M. Literature Review: Analisis Fitokimia Dan Manfaat Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Amin. J.* **2**, 114–119 (2020).
28. Toripah, S. S., Abidjulu, J. & Wehantouw, F. Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam). *PHARMACON J. Ilm. Farm.* **3**, 37–43 (2014).
29. Yuliani, N. N. & Dienina, D. P. Uji aktivitas antioksidan infusa daun kelor (Infusa *Moringa*). *J. Info Kesehat.* **14**, 1060–1082 (2015).
30. Ojiako, E. N. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Screening Of *Moringa Oleifera* Leaves Extract. *Int. J. Eng. Sci.* **3**, 32–35 (2014).
31. Pratama Putra, I., Dharmayudha, A. & Sudimartini, L. Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L) di Bali. *Indones. Med. Veterinus* **5**, 464–473 (2016).
32. Purba, E. C. Kelor (*Moringa oleifera* Lam.): Pemanfaatan Dan Bioaktivitas. *Pro-Life* **7**, 1–12 (2020).
33. Nanashima, N. *et al.* Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients* **10**, 1–15 (2018).
34. Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A. K. & Chanda, D. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using in vitro and in vivo assays. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 1–12 (2012) doi:10.1155/2012/519084.
35. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 301–311 (2014).
36. Ekawati, N. & Wulandari, F. Review : Pengaruh Suplementasi Astaxhantin dalam Mencegah Photoaging. *Generics J. Res. Pharm.* **2**, 64–72 (2021).
37. Wolfensohn, S. & Lloyd, M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. (2013).
38. Rathod, H. J. & Mehta, D. P. Acta Scientifica International Journal of Pharmaceutical Science. *Int. J. Pharm. Sci.* **1**, 33–47 (2015).
39. Sharma, B. & Singh, L. R. Pharmaceutical Gels for Topical Drug Delivery: An Overview. *Int. Journal Res. Pharm. Pharm. Sci.* 19–24 (2018).
40. Sugiyono. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. (Alfabeta.,

2012).

41. Rao, P. V. & Gan, S. H. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 1–11 (2014) doi:10.1155/2014/642942.
42. Federer, W. T. *Experimental Design Theory And Application*. (Oxford and IBH Publishing Co).
43. Fan, Y. *et al.* An Experimental Model Design for Photoaging. *J. Cardiofac Surg* (2015).
44. Blank, U. & Karlsson, S. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood* **125**, 3542–3550 (2015).
45. Tanaka, R. & Shimizu, M. The relationship between reactive oxygen species and cardiac Fibrosis in the Dahl salt-sensitive rat under ACEI administration. *Vet. Med. Int.* 1- (2012).
46. Donovan, J., Shiwen, X., Norman, J. & Abraham, D. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts. *Fibrogenes. Tissue Repair* **6**, 1–9 (2013).
47. Nagano, K. *et al.* PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO J.* **25**, 1871–1882 (2006).

