

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK MENGGUDU
TERHADAP EKSPRESI P53 DAN JUMLAH KOLAGEN PADA
TIKUS JANTAN WISTAR YANG TERPAPAR SINAR UV-B**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2



Magister Ilmu Biomedik

Wida Mariane Indriyana

MBK 21.170.10248

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023**

TESIS
PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUAH
MENGKUDU TERHADAP EKSPRESI P53 DAN
DENSITAS KOLAGEN

Studi Eksperimental Pada Kulit Tikus Jantan Galur wistar Yang Dipapar
Radiasi UVB

Disusun Oleh :

Wida Mariane Indriyana
MBK.2117.010.248

Menyetujui

Pembimbing I

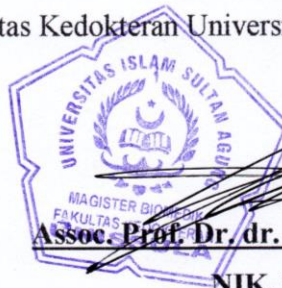
Pembimbing II

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

Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes
NIK. 210186023

Mengetahui

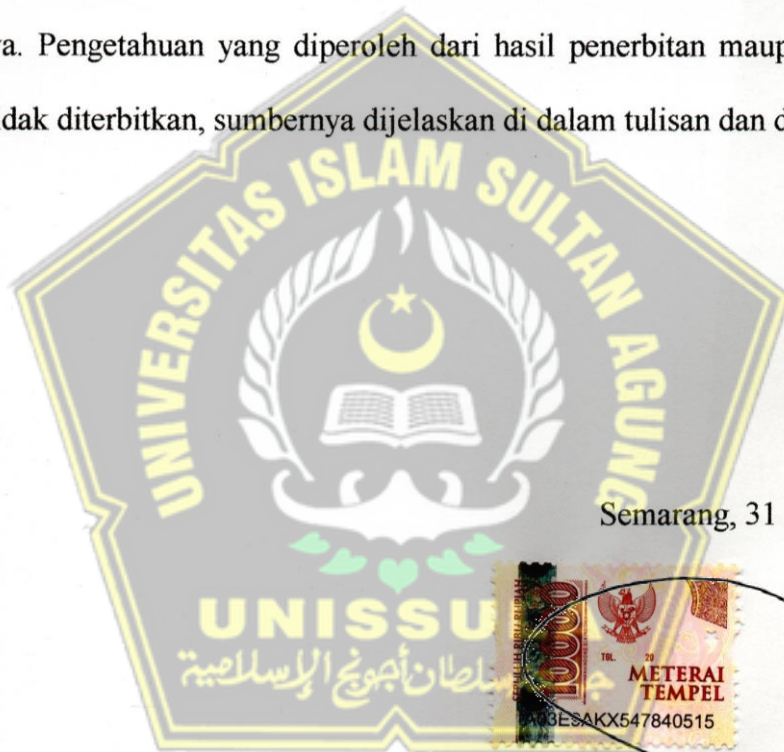
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang



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 di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di satu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.



Semarang, 31 Agustus 2023

(Wida Mariane Indriyana)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Wida Mariane Indriyana
Tempat/Tanggal lahir : Jakarta, 29 Maret 1980
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri Barongan 2 Kudus : Lulus tahun 1991
2. SMP Negeri 1 Kudus : Lulus tahun 1994
3. SMA Negeri 1 Kudus : Lulus tahun 1997
4. Fakultas Kedokteran Universitas
Diponegoro Semarang : Lulus tahun 2004
5. S2 Biomedik Fakultas Kedokteran
Universitas Sultan Agung Semarang : -

C. Riwayat Pekerjaan

1. Pelaksana Harian BP Asy-Syifa Kudus : tahun 2004 - 2008
2. Dokter jaga RS Aisyiah Kudus : tahun 2004 - 2006
3. Manager Rawat Jalan Rawat Inap
RS KSH Pati : tahun 2005 - 2006

4. Dokter ASN

Dinas Kesehatan Kabupaten Kudus : tahun 2006 - 2022

5. Dokter FKTP Klinik Mariane Medika : tahun 2007 - sekarang

6. Dokter Klinik Mariane Aesthetic : tahun 2018 - sekarang

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua

Ayah : Supriyono

Ibu : Siti Maryamah

2. Nama Suami : Donny Sigit Nugroho, SE, MM

3. Nama Anak : Putri Athaillah Jacinda Edsel

Aluna Calista Gadis Athaillah

Varen Athaillah Rafqi Nugroho



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan ridhloNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Pengaruh pemberian gel ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen”** (Studi eksperimental pada kulit tikus jantan galur wistar yang dipapar radiasi UVB).

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang sudah membantu dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, perkenankan penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Gunarto, S.H., M.H., selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk melanjutkan Studi S2 di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk Studi S2 di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med., selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan

Agung Semarang yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.

4. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.
5. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.
6. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK(K), selaku penguji I yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.
7. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, SKM., M.Kes., selaku penguji II yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.
8. Dr. Atina Hussana, M.Si., Apt., selaku penguji III yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan penelitian ini.
9. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
10. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Reseach) Semarang, atas bantuan dalam penelitian ini.
11. Donny Sigit Nugroho SE., MM., suamiku yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materiil, serta ketiga anakku : Putri Athaillah Jacinda Edsel, Aluna Calista Gadis Athaillah, dan Varen Athaillah Rafqi Nugroho yang selalu menjadi penyemangat untuk menyelesaikan penelitian ini.

12. Bp. H. Supriyono (alm), Ibu Hj. Siti Maryamah, Bp H. Budiyo, S.Pd, Ibu Hj. Wahdati Ulfah, keempat orang tuaku dan Wulan Oktavina Brilian, Drg. Wenni Kannis Qorinna, Yustina Linasari, ST, MT, M.Hum, adik-adikku serta semua keluarga yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan tangan terbuka. Semoga penelitian ini dapat diterima.



Semarang, 31 Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

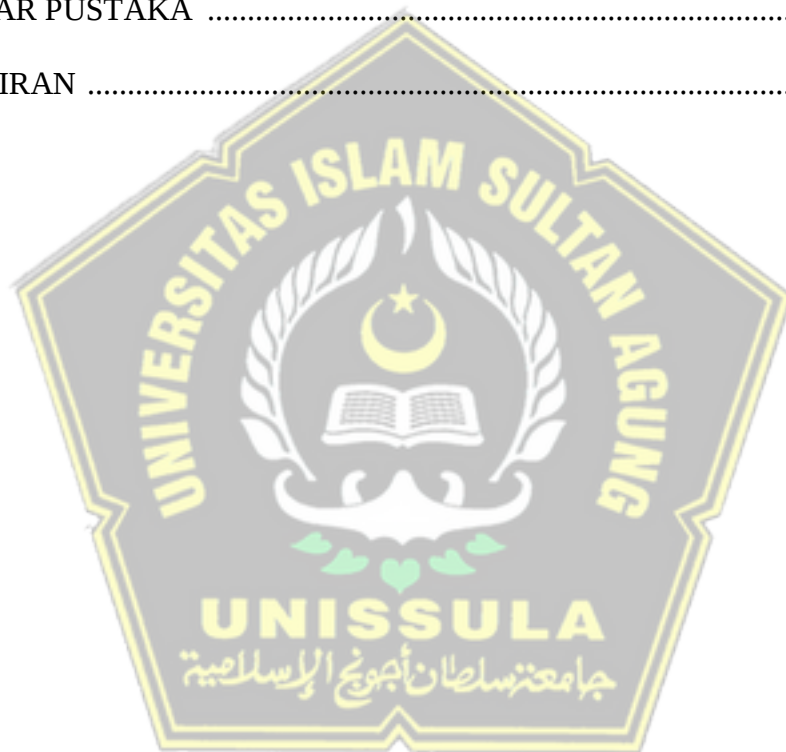
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
ABSTRAK	xx
ABSTRACT	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Originalitas Penelitian	5

1.5	Manfaat Penelitian	7
1.5.1	Manfaat Teoritis	7
1.5.2	Manfaat Praktis	8
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1	Protein P53	9
2.1.1	Siklus Sel	12
2.1.2	Peran P53 pada Siklus Sel	14
2.1.3	Peran P53 terhadap Kerusakan DNA Akibat Paparan UV	17
2.2	Kolagen	18
2.2.1	Kolagen Berperan pada Proses Inflamasi	18
2.2.2	Kolagen Mempengaruhi Transkripsi Sel pada ROS ..	19
2.3	Mengkudu	20
2.3.1	Klasifikasi Mengkudu	21
2.3.2	Morfologi dan Ciri-ciri Mengkudu	22
2.3.3	Manfaat dan Senyawa Aktif Mengkudu	25
2.4	Peran Antioksidan sebagai Penangkal Radikal Bebas Kulit .	29
2.5	Sinar Ultraviolet (UV)	30
2.5.1	Efek yang Ditimbulkan dari Sinar UV	32
2.5.2	Komponen Seluler Kulit yang Ikut Rusak Terkena Radiasi	34
2.5.3	Proses Inflamasi Akibat Sengatan Radiasi	35

2.5.4	Radikal Bebas Akibat UV	37
2.6	Tretinoin	41
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN		
	HIPOTESIS	43
3.1	Peran Ekstrak Mengkudu terhadap Ekspresi P53 dan Jumlah Kolagen pada Tikus yang terpapar UVB	45
3.2	Kerangka Teori	46
3.3	Kerangka Konsep	47
3.4	Hipotesis	47
BAB IV METODE PENELITIAN		
4.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	49
4.2	Variabel dan Definisi Operasional	50
4.3	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	50
4.3.1	Subjek Penelitian	50
4.3.2	Hewan Uji Penelitian	51
4.3.2.1	Kriteria Inklusi	51
4.3.2.2	Kriteria Eksklusi	51
4.3.3	Cara Penentuan Sampel Penelitian	52
4.3.4	Besar Sampel	52
4.4	Alat dan Bahan Penelitian	53
4.4.1	Alat Penelitian	53
4.4.2	Bahan Penelitian	53

4.5	Cara Penelitian	54
4.5.1	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	54
4.5.2	Cara Pembuatan Gel Ekstrak Buah Mengkudu	54
4.5.3	Penetapan Dosis	55
4.5.4	Paparan UVB	55
4.5.5	Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen	56
4.5.6	Pengambilan Sampel Jaringan	57
4.5.7	Pembuatan Blok Parafin	57
4.5.8	Pengecatan Kolagen	58
4.5.9	Uji Ekspresi P53 dengan qRT-PCR	60
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian	61
4.7	Analisa Data	61
4.8	Alur Penelitian	61
BAB V	PEMBAHASAN	63
5.1	Hasil Penelitian	63
5.1.1	Hasil Uji Fitokima Ekstrak Buah Mengkudu	63
5.1.2	Validasi Kolagen Pasca Induksi UVB pada Tikus	64
5.1.3	Gel Ekstrak Buah Mengkudu Menurunkan Ekspresi Gen p53 Jaringan Kulit Tikus yang Terpapar UVB ..	65
5.1.4	Gel Ekstrak Buah Mengkudu Meningkatkan Densitas Kolagen Jaringan Kulit Tikus yang Terpapar	

UVB	68
5.2 Pembahasan	71
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	77
6.1 Kesimpulan	77
6.2 Saran	77
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN	85



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Tabel Originalitas Penelitian	5
Tabel 2.1	Kandungan Bioaktif Mengkudu dan Manfaatnya	26
Tabel 5.1	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Buah Mengkudu	64
Tabel 5.2	Data Hasil Penelitian Ekspresi p53	66
Tabel 5.3	Uji Post-Hoc LSD Ekspresi p53	67
Tabel 5.4	Data Hasil Penelitian Densitas Kolagen	68
Tabel 5.5	Uji Post-Hoc LSD Densitas Kolagen	70



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Siklus Sel	13
Gambar 2.2	Peran P53 pada Siklus Sel	15
Gambar 2.3	Mengkudu : Daun, Bunga, dan Buah	24
Gambar 2.4	Perbedaan Jangkauan Sinar Ultraviolet	30
Gambar 2.5	Penetrasi Sinar UV pada Kulit	37
Gambar 2.6	Antioksidan Menetralkan Radikal Bebas	39
Gambar 2.7	Skema Degradasi Kolagen Akibat Ketidakseimbangan Activator Protein (AP-1) dan TGF- β	40
Gambar 3.1	Kerangka Teori Penelitian	46
Gambar 3.2	Kerangka Konsep Penelitian	47
Gambar 4.1	Gambar Rancangan Penelitian	49
Gambar 4.2	Alur Penelitian	62
Gambar 5.1	(A) Jaringan Kulit Tikus Sehat (B) Penurunan Densitas Kolagen pada Jaringan Kulit Tikus yang diinduksi UVB	65
Gambar 5.2	Grafik Representatif Ekspresi p53 pada Semua Kelompok Perlakuan	66
Gambar 5.3	Penampang Densitas Kolagen pada (A) Jaringan Kulit Tikus Sehat (B) Kontrol Negatif Tikus yang diinduksi UVB (C) Kelompok Base Gel (D) Kelompok Ekstrak Mengkudu	

10% (E) Kontrol Positif Kelompok Tretinoin	69
Gambar 5.4 Grafik Representatif Densitas Kolagen pada Semua	
Kelompok Perlakuan	69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	<i>Ethical Clearance</i>	85
Lampiran 2	Hasil Ekstraksi Mengkudu	86
Lampiran 3	Analisa Kualitatif Fitokimia	87
Lampiran 4	Surat Keterangan Kesehatan Hewan	88
Lampiran 5	Surat Keterangan Penelitian	89
Lampiran 6	Hasil Uji Kuantitatif Ekstrak Mengkudu	90
Lampiran 7	Data dan Analisa Statistik p53	95
Lampiran 8	Kulit Tikus Sehat (K1)	102
Lampiran 9	Kelompok Kulit Tikus UVB (K2)	103
Lampiran 10	Kulit Tikus Kelompok Plasebo (K3)	104
Lampiran 11	Kulit Tikus Kelompok Gel Ekstrak Mengkudu (K4)	105
Lampiran 12	Kulit Tikus Kelompok Kontrol Positif (K5)	106
Lampiran 13	Data Kolagen	107
Lampiran 14	Dokumentasi Penelitian	110

DAFTAR SINGKATAN



UV	: <i>Ultra Violet</i>
UVA	: <i>Ultra Violet A</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>
UVC	: <i>Ultra Violet C</i>
DPPH	: <i>2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
IC	: <i>Inhibition Concentration</i>
CD34	: <i>Cluster of Differentiation</i>
TAD	: <i>Transcription Activation Domain</i>
MDM	: <i>Murine Double Minute</i>
HMD	: <i>Human Double Minute</i>
ATM	: <i>Ataxia Teleangiectasia Mutated (ATM)</i>
CHK1	: <i>Checkpoint Kinase 1</i>
CDKs	: <i>Cyclin Dependent Kinase (CDKs)</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
MMP	: <i>Metalloproteinase</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor</i>
ROS	: <i>Reactive OxygenSpecies</i>



O ₂	: <i>Superoksida</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen Peroksida</i>
OH	: <i>Hidroksil</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
ARE	: <i>Antioksidan Respons Elemen</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
mg	: <i>miligram</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid-2 related factor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
SPF	: <i>Sun Protection Factor</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>

ABSTRAK

Latar Belakang: UV-B yang terpapar pada lapisan kulit dapat menyebabkan berkurangnya produksi kolagen pada jaringan kulit. P53 adalah protein yang berperan pada perbaikan DNA dan apoptosis. Buah mengkudu telah terbukti menambah aktivitas antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh gel ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus galur wistar yang terpapar UVB.

Metode: Jenis penelitian ini adalah eksperimental desain *post test only control group*. Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok 1 tikus sehat tanpa dipapar UVB, kelompok 2 tikus terpapar UVB (kontrol negatif), kelompok 3 tikus terpapar UVB dengan basis gel (plasebo), kelompok 4 tikus terpapar UVB dengan gel ekstrak buah mengkudu 10%, dan kelompok 5 tikus terpapar UVB dengan gel tretinoin 0,025% (kontrol positif). Masing-masing dipapar UVB selama 5 hari dengan MED 160 mJ/cm². Pemberian topikal gel ekstrak buah mengkudu dilakukan setiap hari selama 14 hari. Ekspresi p53 dan densitas kolagen dianalisa dianalisis menggunakan *one Way ANOVA* dan *LSD test*.

Hasil : Ekspresi p53 kelompok I ($1,00 \pm 0,10$), kelompok II ($1,58 \pm 0,38$), kelompok III ($1,30 \pm 0,22$), kelompok IV ($0,40 \pm 0,25$), dan kelompok V ($0,43 \pm 0,19$). Densitas kolagen kelompok I ($54,06 \pm 4,96$), kelompok II ($30,36 \pm 2,52$), kelompok III ($30,79 \pm 2,85$), kelompok IV ($43,99 \pm 4,99$) dan kelompok V ($46,017 \pm 5,59$). Hasil uji statistic menunjukkan ekspresi p53 $p=0,000$ ($p<0,05$) dan densitas kolagen $p=0,006$ ($p<0,05$).

Kesimpulan : Pemberian gel ekstrak buah mengkudu berpengaruh secara bermakna terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus yang dipapar UVB.

Kata Kunci : Mengkudu, UVB, kolagen, p53

ABSTRACT

Background : UV-B exposure to the skin causes a decrease in collagen production in skin tissue. P53 is a protein that functions in apoptosis and DNA repair. Noni is a traditional medicinal plant that has been proven to increase antioxidant activity. The aim of the research was to determine the effectiveness on p53 protein expression and collagen density.

Method: Experimental research with a post-test only control group design. A sample of 25 rats was divided into 5 groups, 5 of which were group I healthy rats without UVB exposure, group II rats exposed to UVB (negative control), group III rats exposed to UVB and given base gel (placebo), group IV rats were exposed to UV-B and given noni extract gel 10%, and group V mice were exposed to UV-B and tretinoin gel 0,025% (positive control), each was exposed to daily for 5 days with MED 160 mJ/cm². Noni extract gel is given everyday for 14 days. Collagen density and p53 data were tested using one way anova and LSD tests.

Results: Expression p53 group I ($1,00 \pm 0,10$), group II ($1,58 \pm 0,38$), group III ($1,30 \pm 0,22$), group IV noni extract ($0,40 \pm 0,25$) and group V ($0,43 \pm 0,19$). The mean density of collagen in the group I ($50.10 + 12.34$), group II ($33.08 + 7.48$), group III ($32.75 + 6.60$), group IV ($41.08 + 10.83$) and group V ($41.90 + 13.36$). Statistic test show that P53 expression $p=0,000$ ($p<0,05$) and collagen density $p=0.006$ ($p<0,05$).

Conclusion: Giving Noni extract gel significantly affected P53 expression and collagen density.

Key Word: Noni, UVB, collagen, p53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada dasarnya manusia pasti mengalami proses penuaan atau sering disebut juga dengan *aging process*. Terjadinya proses penuaan tersebut dapat dapat dipengaruhi dari beberapa kondisi, baik secara langsung maupun tidak langsung. Salah satunya adalah sinar matahari yang menjadi faktor tidak langsung yang dapat menyebabkan penuaan pada kulit manusia.¹ Iklim tropis yang terjadi di Indonesia beresiko terhadap paparan ultraviolet (UV) yang cukup tinggi. Efek jangka lama terjadi penebalan epidermis, kulit tampak keriput dan menua, terjadi supresi respon imun akibat terjadi stress oksidatif dan akhirnya dapat menimbulkan kanker kulit.² Radiasi UV memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang menyebabkan stress oksidatif, memicu kerusakan sel, inflamasi, apoptosis dan proses penuaan. Upaya dilakukan untuk menangani penuaan dini, antara lain dengan penggunaan krim, pelembab dan antioksidan.^{3,4} Kolagen adalah salah satu struktur yang paling banyak menyusun lapisan dermis pada kulit, kontribusinya lebih dari 70% pada kulit yang mengalami penuaan kulit yang disebabkan oleh radiasi sinar UV (photoaging) sehingga produksi ROS di lapisan dermis meningkat.^{5,6} Protein P53 memiliki peran yang signifikan

sebagai guardian sel dalam melindungi DNA dari kerusakan yang disebabkan oleh pancaran sinar UVB. Kerusakan DNA yang terjadi karena pancaran radiasi UVB memicu suatu proses yang bertujuan untuk mengeliminasi DNA yang rusak, memperlambat lanjutan siklus sel, memperbaiki kerusakan DNA atau menginduksi apoptosis.^{7,8} Di Indonesia, tanaman noni (*Morinda Citrifolia*) cukup umum dan telah digunakan secara turun temurun oleh beberapa kelompok masyarakat sebagai pengobatan tradisional. Hasil analisis fotokimiawi menunjukkan bahwa ekstrak biji noni atau mengkudu mempunyai kadar anti oksidan, flavanoid, senyawa fenol, tannin dan juga Vitamin C.⁹ Antioksidan berkolaborasi secara efektif untuk menjaga stabilitas radikal bebas yang memainkan peran dalam proses penuaan akibat paparan sinar matahari, perkembangan kanker serta penekanan sistem kekebalan tubuh.⁴ Penelitian terdahulu Ekstrak mengkudu aman untuk penggunaan topikal dan bermanfaat dalam mengurangi eritema pada luka *injury* karena induksi UVB,¹⁰ maka perlu dikembangkan dan diteliti lebih lanjut, bagaimana pengaruh gel ekstrak mengkudu terhadap penurunan ekspresi p53 dan kolagen dalam pencegahan proses penuaan kulit yang terpapar UVB mencegah proses penuaan.

Enviromental Protection Agency menyatakan bahwa proses penuaan akibat paparan sinar matahari terjadi lebih umum daripada kasus kanker. Kanker kulit menempati urutan ketiga setelah kanker serviks dan kanker payudara.¹¹ *United Nations Environment Programme* memperkirakan jika

radiasi UVB bertambah 10%, tingkat terjadinya kasus kanker kulit akan bertambah 26% di seluruh dunia, pada kulit putih pancaran radiasi UVB memengaruhi epidermis hingga 30%.¹² Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan RI, Riskesdas, menyatakan penuaan dini di usia muda pada kulit, 80% diakibatkan radiasi ultraviolet (*photoaging*) atau sinar matahari. Kanker kulit di Indonesia berada di peringkat ketiga setelah kanker serviks dan kanker payudara. Persentase tingkat kasus kanker kulit sebesar 5,9% hingga 7,8% dari seluruh jenis kanker per tahun.¹³

Ekstrak buah mengkudu menunjukkan aktivitas anti oksidan dengan metode DPPH (IC50) mencapai 48,924% ug/ml. Kandungan total flavanoid dalam ekstrak adalah sebesar 34,6% quercetin, sementara kadar vitamin C dalam ekstrak adalah sebesar 13,399%.¹⁴ Dalam penelitian ini ditemukan bahwa ekstrak buah mengkudu memiliki kapasitas antioksidan yang sangat kuat, dengan nilai IC50 sebesar 48,924% ug/ml.¹⁵ Protein p53 berperan pada jalur respon stress. Aktivasi p53 adalah respon sel yang mengalami stress, sehingga bisa dikatakan p53 sebagai pengawal genom dan dapat meredam pertumbuhan dan perkembangan sel yang mengalami kerusakan agar tidak terjadi keganasan sel, mutasi sel dan stress genotoksik.^{7,16,17} Kolagen berperan sebagai pembentuk elastisitas kulit, terjadinya *photoaging* karena pajanan kronis sinar UVA dan UVB, menyebabkan berkurangnya jumlah kolagen pada lapisan dermis.^{4,5} Beberapa penelitian sudah dilakukan berkaitan dengan efektivitas ekstrak mengkudu terhadap proses penuaan. Penelitian yang

dilakukan oleh Rahmi Sofiana, krim yang mengandung ekstrak biji buah mengkudu sebesar 4% sangat efektif dalam menghindari peningkatan produksi melanin pada kulit yang terkena sinar radiasi UVB.¹⁴ Indah Putri Ramayani meneliti penggunaan ekstrak etanol daun mengkudu secara topikal memiliki dampak yang signifikan pada penyembuhan luka, seperti yang dapat diamati dari analisis histopatologis yang mencakup perubahan dalam jumlah sel fibroblas, infiltrasi sel inflamasi, imunoekspresi *cluster of differentiation* 34 (CD34), dan deposisi kolagen.¹⁸ Penelitian lain yang dilakukan oleh Brett West membuktikan bahwa terdapat pengurangan eritema pada kulit volunteer yang terpapar UVB yang diberikan kombinasi ekstrak etanol mengkudu topikal.¹⁹

Dari uraian diatas, akan dilakukan penelitian untuk menginvestigasi efek pemberian ekstrak buah mengkudu pada kulit tikus jantan wistar yang terkena sinar UVB dari sebuah lampu, dengan melihat ekspresi p53 dan melihat densitas kolagen pada kulit. Efektifitas ekstrak mengkudu terhadap proses penuaan kulit dapat dilihat dengan menurunnya ekspresi p53 dan meningkatnya densitas kolagen.

1.2 Rumusan Masalah

Adakah pengaruh gel ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus jantan wistar yang terpapar sinar UVB?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan dampak yang diberikan oleh gel ekstrak buah mengkudu pada ekspresi P53 serta kerapatan kolagen pada tikus yang terkena pancaran radiasi UVB.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh gel ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 pada tikus yang terpapar UVB.
2. Mengetahui pengaruh gel ekstrak buah mengkudu terhadap densitas kolagen pada tikus yang terpapar UVB.
3. Membedakan ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus yang terpapar UVB, kelompok placebo, kelompok perlakuan, kelompok kontrol positif dan kelompok sehat.

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Tabel Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Rahmi Sofiana, AnakA.G.P. Wiraguna, Wimpie Pangkahila, 2017	Krim Ekstrak etanol Biji mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>) Sama Efektifnya dengan Krim Hidrokuinon Dalam	<i>Randomized posttest only control</i>	Krim ekstrak biji mengkudu 4% dapat mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut

	Mencegah Peningkatan Jumlah Melanin Kulit Marmut (<i>Cavia porcellus</i>) Yang Dipapar Sinar Ultraviolet B Terhadap Jumlah Kolagen Dermis Pada Tikus Wistar Jantan Yang Dipapar Sinar Ultraviolet B	<i>group design</i>	yang dipapar sinar UVB, serta mempunyai tingkat keefektifan yang sebanding dengan krim hidroquinon 4%.
Indah Puti Rahmayani S., Ani Melani Maskoen, Bethy S. Hernowo, 2019	Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar	<i>Posttest only control group design</i>	ekstrak etanol topikal daun mengkudu cenderung bermanfaat pada penyembuhan luka, walaupun secara statistik tidak bermakna
ER Yuslianti, IPR Sabirin, E Sovia, 2013	<i>Effect of topical ethanol extracts of Morinda citrifolia L. leaves on excisional wound healing</i>	<i>Posttest only control group design</i>	Ekstrak daun mengkudu dapat mempercepat penyembuhan luka eksisi.
Brilliant Gareda Airlangga, Naela Fadhila, Siti Nur Chasanah, 2021	Pengaruh Ekstrak <i>Morinda Citrifolia</i> L. terhadap penyembuhan Luka Insisi Penelitian ditinjau dari kolagen pada tikus jantan jalur wistar	<i>Posttest only control group design</i>	Terdapat perbedaan tingkat kolagen yang signifikan dalam jumlah setelah diberikan salep ekstrak buah mengkudu dengan konsentrasi 20% dan 30% pada luka pada tikus galur wistar.
Brett J. West, ShixinDeng, Afa K. Palu, C. Jarakae Jense, 2009	<i>Morinda citrifolia</i> Linn. (<i>Rubiaceae</i>) leaf extracts mitigate UVB-induced erythema	<i>Posttest only control group design</i>	Ekstrak daun mengkudu aman untuk penggunaan topikal dan mungkin bermanfaat dalam mengurangi erythema pada luka injury karena induksi UVB
Denni, Marlina	Formulasi dan Uji	<i>Posttest</i>	Ekstrak gel buah

Karmelia, Triawan Kausar, 2023	Al	Efektifitas Gel Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda Citrifolia L.</i>) dan Lidah Buaya (<i>Aloe Vera L.</i>) Terhadap Luka Bakar Pada Mencit (<i>Mus Musculus</i>)	<i>only control group design</i>	mengkudu dengan konsentrasi 5% terbukti efektif dalam membantu proses penyembuhan luka bakar.
Asri, Adrianto, A. & Fadhila, N. (2021).	H., A., N.	Efektivitas Pemberian Topikal Salep Ekstrak Buah Mengkudu Dengan Konsentrasi Bertingkat Terhadap Jumlah Fibroblas (Penelitian pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Dibuat Luka Sayat).	<i>Posttest only control group design</i>	Penggunaan ekstrak dari buah mengkudu pada luka goresan dapat merangsang peningkatan jumlah fibroblas, yang selanjutnya dapat mempercepat proses penyembuhan luka.
Soo-Cheol Choi, Young Han Youn (2020)		<i>Anti-Wrinkling Effect of Noni (Morinda citrifolia) by Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties</i>	<i>Posttest only control group design</i>	Ekstrak buah mengkudu mempunyai kemampuan photoprotective dengan mengurangi mediator proinflamasi elastase, memproduksi MMP-1 dan meningkatkan sintesis kolagen.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

- 1.5.1.1 Mengumpulkan bukti mengenai efek yang diberikan oleh gel ekstrak buah mengkudu dalam melindungi kulit dari proses penuaan akibat pancaran sinar UVB.
- 1.5.1.2 Menyediakan landasan teoritis yang lebih mendalam untuk peningkatan studi mengenai dampak pemakaian gel ekstrak

buah mengkudu berhubungan dengan dampak melindungi kulit dari penuaan yang disebabkan oleh pancaran radiasi UVB secara repetitif.

1.5.2 Manfaat Praktis

1.5.2.1 Menawarkan opsi kepada masyarakat bahwasannya menggunakan gel ekstrak buah mengkudu dapat menjaga kulit dari dampak pancaran sinar UVB serta berfungsi untuk pencegahan penuaan dini.

1.5.2.2 Menyediakan keuntungan bagi masyarakat dengan mendukung penemuan salah satu solusi terapi dalam beragam pilihan perawatan dan pencegahan penuaan dini. Hasil penelitian ini diharapkan akan berkontribusi pada literatur tentang tanaman obat dan upaya mengatasi risiko dari paparan radiasi UVB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein p53

Protein p53 merupakan faktor transkripsi, akan teraktifkan bagian dari respon sel terhadap stress, sehingga p53 berperan pada jalur respon stress mengatur banyak sel target yang mencegah pertumbuhan dan survival dari sel-sel yang memiliki potensi keganasan.⁷ Beberapa tipe stress mengaktivasi p53, termasuk kerusakan DNA, erosi telomere, aktivasi onkogen, hipoksis, stress metabolik, dan berkurangnya sinyal pertumbuhan normal dan survival. Protein p53 berperan dalam mencegah pertumbuhan sel tumor pada beberapa proses keganasan.¹⁶

Protein p53 berperan sebagai tumor suppressor, yang berperan penting dalam pengaturan siklus sel serta sering mengalami mutasi dalam berbagai kasus kanker manusia, yakni kisaran 50% dari semua kasus kanker manusia. Protein P53 pertama kali ditemukan pada akhir tahun 1970 dalam bentuk phosphoprotein nuklear seluler dengan berat molekul 53-kilodalton yang berikatan dengan DNA virus SV40. Selain memiliki dampak pengendalian siklus sel, P53 juga memainkan peran penting dalam memperbaiki DNA yang rusak, memfasilitasi sintesis DNA, mengatur diferensiasi sel serta menginisiasi program kematian sel (apoptosis). Gen P53 pada manusia

terletak di lengan pendek kromosom 17. Protein P53 membentuk struktur tetramer dengan berinteraksi antara domain C-terminal pada protein ini. Selanjutnya, tetramer ini dapat mengidentifikasi tempat-tempat ikatan spesifik dan mengaktifkan gen target sebagai langkah selanjutnya dalam regulasi sel. P53 pada manusia terdiri dari 393 asam amino dan memiliki 5 domain yang berbeda, yaitu:

- *N-terminal transcription-activation domain* (TAD) memiliki peran dalam mengaktifkan faktor-faktor transkripsi, terletak pada residu 1-42.
- Domain yang mengandung banyak prolin, memiliki peranan penting dalam aktivitas apoptosis, terletak pada residu 80-94.
- *Central-DNA binding core domain* (DBD) terdiri dari satu atom zinc dan beberapa asam amino arginin, terletak pada residu 100-300.
- *Homo-oligomerisation domain* (OD). P53 memerlukan domain ini dalam bentuk tetramer untuk kegiatannya dalam kondisi di dalam sel, dan domain tersebut terletak pada residu 307-355.
- *C-terminal* merupakan Residu 356-393 berperan dalam proses regulasi penurunan ikatan DNA pada domain inti.

Mutasi dalam aktivasi P53 dan pembentukan sel kanker dapat mengakibatkan terjadinya DBD. Mutasi ini kemudian akan mengganggu proses protein dalam berikatan dengan target sequence DNA sehingga kemudian dapat menghambat proses mobilisasi transkripsi target gen, dimana gen tersebut adalah *down stream* P53.⁷

P53 diasumsikan menjadi sasaran utama paparan radiasi sinar UV. Mutasi pada P53 menjadi langkah awal dalam proses perkembangan kanker. Stres sel, yang meliputi kerusakan DNA, hipoksia, stres oksidatif, dan aktivasi onkogen, dapat memicu berbagai mediator upstream yang mengaktifkan P53. Aktivasi P53 terjadi ketika satu atau lebih residu serin pada bagian N atau C terminus mengalami fosforilasi, yang kemudian menyebabkan P53 berikatan dengan elemen enhancer/promotor sebagai target downstream. Terdapat tiga jalur utama sebagai jalur downstream P53, yakni: ⁷

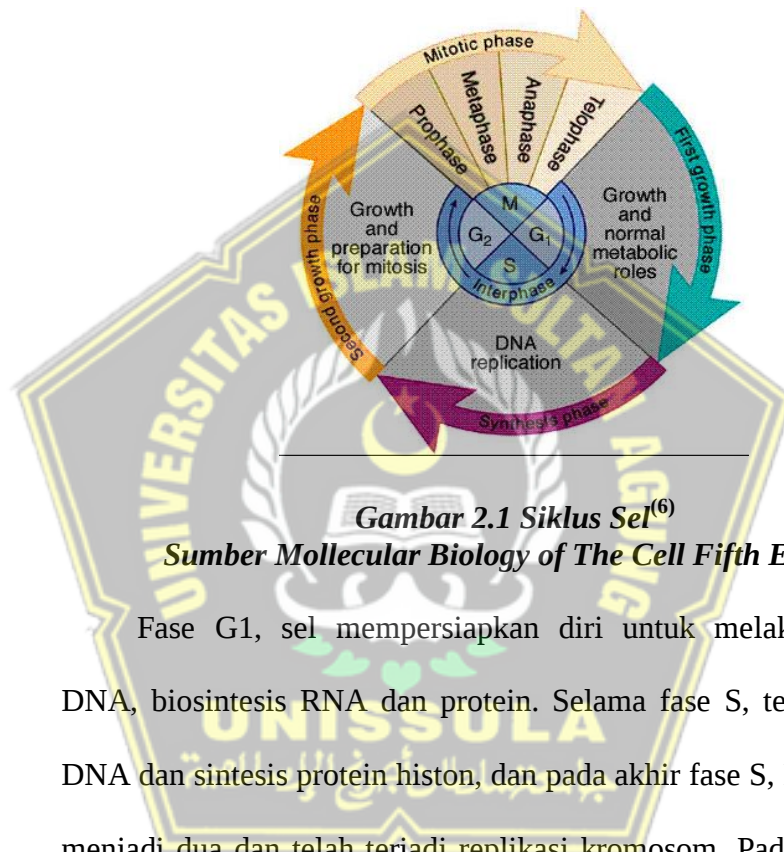
- a. Mengaktifkan perbaikan kerusakan pada DNA adalah fungsi yang penting. Ketika P53 dalam keadaan tidak aktif dan berikatan dengan protein *Murine Double Minute* (MDM2) atau *Human Double Minute* (HMD2), itu menghalangi aktivasi P53. Namun, jika terpapar radiasi UV yang berpotensi protein seperti *Ataxia Teleangiectasia Mutated* (ATM), *Checkpoint Kinase 1* (CHK1), dan CHK2, yang kemudian membuat P53 menjadi aktif. Setelah P53 aktif, sel akan masuk ke dalam fase istirahat untuk memungkinkan perbaikan kerusakan sel dan mengaktifkan proses apoptosis. Di samping itu, P53 juga memiliki fungsi dalam memfasilitasi proses perbaikan DNA, termasuk *Nucleotide Excision Repair* (NER) dan *Base Excision Repair* (BER).
- b. Menghentikan perkembangan siklus sel di titik regulasi G1/S ketika terjadi kerusakan DNA adalah peran penting P53. Kemampuan P53

dalam mengendalikan pertumbuhan sel kanker memiliki dampak negatif, dan pertama kali ditemukan dalam konteks karsinoma. Dalam peran negatif regulasinya, P53 bertindak sebagai penahan yang mengatur proliferasi sel yang tidak terkendali. Ketika siklus sel sedang diawasi oleh P53, jika terdapat kelainan atau kerusakan genetik selama pembelahan sel yang berkelanjutan, sel akan memasuki fase istirahat (G1), memberikan waktu yang cukup untuk menghancurkan sel-sel abnormal tersebut. Peningkatan jumlah P53 setelah kerusakan DNA memicu masuknya siklus sel ke dalam fase G1/S dengan merangsang ekspresi P21, yang selanjutnya membuat kompleks cdk-cyclin tidak aktif. Selain itu, P53 juga mendorong sel untuk masuk ke dalam fase G2/M.

- c. Mengatur proses apoptosis ketika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki adalah salah satu fungsi P53. Mekanisme apoptosis ini mengakibatkan sel-sel yang mengalami kerusakan yang tidak dapat diperbaiki untuk mengalami kematian sel, sehingga mencegah kelanjutan proses replikasi. P53 yang normal, yang merupakan hasil dari P53, mempunyai keahlian untuk memeriksa apakah sel yang bermasalah telah dihapus dan tidak lagi melakukan pembelahan. Namun, peran apoptosis ini menjadi terganggu jika terjadi mutasi pada P53.

2.1.1 Siklus Sel

Siklus sel dibagi menjadi 4 tahapan atau fase, yaitu fase G₁, fase S (sintetik), fase G₂, dan fase M (mitosis).



Gambar 2.1 Siklus Sel⁽⁶⁾

Sumber Molecular Biology of The Cell Fifth Edition

Fase G₁, sel mempersiapkan diri untuk melakukan sintesis DNA, biosintesis RNA dan protein. Selama fase S, terjadi replikasi DNA dan sintesis protein histon, dan pada akhir fase S, DNA sel telah menjadi dua dan telah terjadi replikasi kromosom. Pada fase G₂, sel mempersiapkan diri untuk melakukan pembelahan sel, melakukan replikasi kompleks DNA-protein dan biosintesis lanjutan. Pada fase M, inti sel dan sitoplasma akan terbagi dua dan dihasilkan dua sel anak. Nutrisi yang kurang memadai dan tidak ada suatu mitogen, maka sel akan memasuki fase istirahat G₀. Transisi dari satu fase ke fase berikutnya diregulasi oleh sejumlah mekanisme *checkpoint* yang

mencegah kerusakan DNA memasuki fase berikutnya. Progres dari satu fase siklus sel ke fase berikutnya dikontrol oleh aktivasi dan degradasi protein siklin (*cyclin*), enzim *cyclin-dependent kinase* (CDKs) dan inhibitor CDK/CDKI. Setiap kompleks siklin-CDKs bersama-sama dengan CDKIs bertanggungjawab untuk mengontrol berbagai tahapan siklus sel melalui mekanisme kontrol pada *checkpoint*.^{7,17}

2.1.2 Peran P53 pada Siklus Sel

Kerusakan DNA menyebabkan siklin inhibitor kinase akan teraktivasi berfungsi memfosforilasi p53. Pada keadaan tidak terfosforilasi p53 berikatan erat dengan protein MDM2. Pada keadaan normal, kadar p53 dalam sel sangat rendah karena dipegangi MDM2. Akan tetapi, pada keadaan terjadi kerusakan DNA, p53 yang mengalami fosforilasi maka p53 dengan mudah lepas dari MDM2. P53 merupakan factor transkripsi untuk siklin inhibitor yang lainnya, sehingga ketika DNA rusak berhentinya siklus sel untuk melakukan *repairing* sel. Setelah transkripsi akan menghasilkan mRNA kemudian ditranslasi untuk melakukan perbaikan sel. Bila p53 tidak bisa memperbaiki atau sel tidak bisa direparasi maka menunjukkan sel untuk apoptosis. P53 juga merupakan penjaga genom, sehingga 9% karsinoma terjadi karena mutasi pada p53.¹⁷

Gambar 2.2 Peran P53 pada Siklus Sel ⁷

Protein p53 adalah protein yang memegang peranan penting dalam menjaga stabilitas DNA dan mencegah kanker. P53 wild-type (wtp53) terikat untuk menjadi regulator negatif, menginaktivasi atau menggradasi sel. Kerusakan DNA di sel menginduksi protein p53, menyebabkan siklus sel terhenti. Ini memberi waktu sel untuk perbaikan. P53 mutasi (mtp53) berikatan dengan berbagai macam cancer. Mutasi DNA akan berikatan dengan p53 gen. p53 wild-type (wtp53) yang sukses berinteraksi dengan factor-faktor transkripsi akan merepresi atau mengaktivasi target gen yang sesuai. Proses ini akan terdisrupsi dengan kehadiran dari protein p53 mutan atau mtp53. Perubahan p53 mutan menjadi p53 wild type Kembali akan menjadi jalan untuk mencegah dan mereverse progetifitas tumor.^{8,17}

P53 terekspresi sangat rendah pada normal sel pada individu yang sehat, sistem imun mentoleransi wild-type p53 yang rendah. P53

mutan pada DNA sel, atau auto anti p53 antibodi serum, bagaimanapun juga, dapat digunakan untuk mengetahui lebih awal adanya sejumlah tumor dengan p53 mutan yang terdeteksi pada stase awal pertumbuhan tumor.^{7,8}

P53 wild type pada sel normal tidak terprediksi dengan pewarnaan imunohistokimia karena waktu hidup yang pendek, 20-30 menit (Ozbun dan Butel, 1997), p53 mutasi mempunyai waktu paruh yang lebih panjang sampai 2 jam, sehingga dapat terakumulasi dan terwarnai dengan imunohistokimia. P53 normal wild type terwarnai hanya sedikit pada nucleus sel tumor.^{8,16}

Pemeriksaan p53 imunohistokimia adalah cara akurat, termurah dan tercepat untuk menginvestigasi status p53 mutasi. p53 mutasi juga ditemukan pada pengecatan sitoplasma, dan sekitar 5% pada p53 wild type. Pola overekspresi pewarnaan nuclear diprediksi sangat tinggi mendasari p53 mutasi, sedangkan pada pola wild type tidak. Sebagai kesimpulan p53 IHC dapat menginterpretasikan p53 wild type maupun p53 mutan, dengan presentasi yang berbeda.^{7,8}

Pemeriksaan dan penelitian kadar p53 menggunakan pemeriksaan PCR masih sangat sedikit. Pemeriksaan p53 dengan menggunakan PCR secara real time, mendeteksi seluruh jenis p53 wild type dan p53 mutant.⁸

Anna Colomer meneliti kekurangan dari p53 nuclear imunohistokimia, bukan indikasi dari absennya p53 mutasi di sel kanker. Pada beberapa studi monitoring p53 dengan kombinasi metode IHC dan molekuler assay dapat menjadi pendekatan yang lebih kritis, dengan kualitas kontrol dan kesiapan interpretasi.¹⁷

2.1.3 Peran P53 terhadap Kerusakan DNA Akibat Paparan UV

P53 memiliki peran utama dalam melindungi sel dari kerusakan DNA yang disebabkan oleh pancaran radiasi UVB. Pancaran radiasi UVB dapat merusak DNA dan sebagai respons terhadap kerusakan ini, aktivasi mekanisme yang menghasilkan penghapusan DNA yang rusak, penundaan dalam siklus sel, perbaikan DNA atau apoptosis melalui aktivasi gen-gen yang terhubung secara langsung dengan P53, seperti P21, MDM2 dan BAX. Pada kondisi normal, P53 selalu berikatan dengan protein MDM-2, dan ikatan ini menghamnat proses apoptosis. Namun, dalam respons terhadap radiasi UV, kadar P53 meningkat. Kenaikan kadar P53 ini mengakibatkan siklus sel memasuki fase istirahat (G1), yang memungkinkan perbaikan seluler dan menghilangkan kerusakan pada DNA sebelum proses sintesis dan mitosis DNA berlanjut. Proses apoptosis juga menjadi lebih aktif, yang mengindikasikan bahwa P53 berfungsi sebagai alat untuk memperbaiki kerusakan DNA atau menghilangkan sel yang

mengalami kerusakan DNA yang signifikan. Kehadiran kerusakan DNA yang tidak diperbaiki tidak dapat menyebabkan perkembangan sel kanker. Dalam konteks kanker, apoptosis dan proliferasi sel adalah karakteristik yang sering digunakan dalam merumuskan strategi kuratif dan preventif, dimana jumlah sel yang mengalami apoptosis biasanya rendah sementara proliferasi sel sangat tinggi.^{8,16}

2.2 Kolagen

Kolagen berasal dari bahasa Yunani yakni “cola” yang berarti lem (glue) dan “genno” yang berarti kelahiran (*birth*). Kolagen sebagai pelekatsel untuk membentuk kerangka jaringan dan organ tubuh. Terdapat 19 jenis kolagen, yaitu tipe I sampai XIX, jenis kolagen tipe I sampai V termasuk kolagen fibrous. Molekul kolagen memiliki diameter 1,5 nm dan berat molekul 290.000 dalton. Kolagen tersusun oleh tiga rantai polipeptida (*triple helix*) dengan masing-masing rantai terdapat lebih dari 1000 asam amino.^{20,21}

2.2.1 Kolagen Berperan pada Proses Inflamasi

Kolagen memiliki peran penting dalam tahap-tahap penyembuhan luka, yang terdiri dari fase inflamasi, proliferasi dan maturasi (remodeling). Kolagen adalah komponen utama dalam pembentukan matriks ekstraseluler (ECM) yang memberikan dampak positif pada keseimbangan internal, memiliki kemampuan rendah

untuk menyebabkan reaksi antigen, baik dalam kompatibilitas biologis dan memberikan kekuatan mekanik yang tinggi pada jaringan lunak. Setelah fase inflamasi, sel fibroblast berperan mensintesis kolagen sebagai unsur utama ECM untuk meningkatkan integritas struktur kulit.^{20,23} Pada fase awal dapat diperlihatkan dari regulasi ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) mempengaruhi migrasi sel endotel. $\text{TNF-}\alpha$ mempengaruhi migrasi sel PMN, apoptosis sel fibroblas dan sintesis *matriks metalloproteinase* (MMP). Pada sintesis MMP-1 untuk kolagenase sehingga mempengaruhi jumlah kolagen dermis. Jumlah kolagen di dermis yang mengalami penurunan jumlah dapat menyebabkan terbentuknya garis-garis halus keriput. Keriput muncul sebagai tanda penuaan kulit dan paling banyak disebabkan oleh sinar matahari disebut *photoaging*.^{24,25}

2.2.2 Kolagen Mempengaruhi Transkripsi Sel pada ROS

Kolagen paling banyak menyusun lapisan dermis, kontribusinya lebih dari 70% pada kulit yang mengalami penuaan kulit. Penuaan dapat terjadi secara instrinsik dan ekstrinsik. Pada penuaan instrinsik disebabkan oleh penurunan $\text{TGF-}\beta$ dan akumulasi ROS, sedangkan penuaan ekstrinsik disebabkan oleh radiasi sinar UV (*photoaging*) sehingga menyebabkan produksi ROS di lapisan dermis meningkat.²⁵

Pada kulit, ROS yang terbentuk akibat stress oksidatif akan mengaktivasi dua regulator utama pembentuk kolagen, yaitu *transforming growth factor* (TGF- β) dan *activator protein* (AP-1), dimana TGF- β memiliki peran penting dalam pengaturan kolagen. TGF- β adalah suatu sitokin yang merangsang produksi kolagen, sementara AP-1 adalah faktor transkripsi yang dapat menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- β . Kemudian TGF- β akan mengirimkan signal transduksi intraseluler dan menginduksi MMP-1 akibatnya terjadilah peningkatan degradasi kolagen dan penurunan jumlah kolagen (deposisi kolagen) yang memperkuat struktur lapisan dermis. Keadaan ini merupakan patofisiologi dari penuaan kulit.^{25,26}

2.3 Mengkudu

Mengkudu merupakan tanaman yang sudah lama dimanfaatkan hampir di seluruh dunia. Sejarah mengkudu berasal dari Cina yang ditemukan oleh Dinasti Han sekitar 2000 tahun lalu dituliskan pada tulisan-tulisan kuno. Bahkan di Hawaii menganggap mengkudu sebagai tanaman keramat/tanaman suci karena dipakai sebagai obat tradisional yang berkhasiat terhadap

berbagai penyakit.⁽²⁷⁾ Orang-orang Barat merujuk kepada mengkudu sebagai “*queen of the morinda*,” sementara di Hawaii disebut sebagai “*noni*,” di Tahiti disebut “*nounu*” atau “*nono*,” di Inggris dikenal sebagai “*Indian mulberry*,” dan di Australia disebut dengan “*cheese fruit*”, di negara Asia seperti Malaysia menyebutkan dengan *mengkudu besar*, *mengkudu jantan*, di Thailand *yo-ban*, di Filipina *tambong-aso*, di Myanmar *ungcoikan*, di Cina *ba ji tian*. Masyarakat Indonesia menamakan mengkudu dapat berbeda-beda penyebutannya menurut daerah, seperti *eodu*, *mengkudu* (Sumatra); *keumudee* (Aceh); *bangkudu* (Batak); *makudu* (Nias); *cangkudu* (Sunda), *bentis*, *kemudu*, *mengkudu*, *pace* (Jawa), *kondhuk* (Madura), *wangkudu*, *manakudu*, *bakulu* (Nusa Tenggara), *tibah* (Bali), dan di Kalimantan dikenal dengan nama *mangkudu*, *wangkudu*, *labanan*.^{28,29,30}

2.3.1 Klasifikasi Mengkudu

Van Steenis (2008) mengklarifikasikan tanaman mengkudu sebagai berikut :³⁰

- Divisi : *Spermatophyta*
- Kelas : *Dicotyledone*
- Ordo : *Rubiales*
- Famili : *Rubiaceae*
- Genus : *Morinda*
- Spesies : *Morinda citrifolia L*

Mengkudu (*Morinda sp*) memiliki 20 spesies tetapi yang sering dijumpai di Indonesia jenis spesies *Morinda citrifolia L*, termasuk dalam famili *Rubiaceae* yaitu famili kopi-kopian.³¹

2.3.2 Morfologi dan Ciri-ciri Mengkudu

a. Batang

Mengkudu merupakan tanaman yang tidak begitu besar, tingginya sekitar 4-6 m (15-20 kaki).²⁸ Secara umum bentuk batang bengkok, dahan batang kaku, kasar, dan tidak berbulu. Percabangannya berbentuk segi empat (monopoidal). Kulit batang coklat keabu-abuan atau cokelat kekuningan. Mengkudu merupakan tanaman tahunan (*perennial*) sehingga warna hijau tahunan sering disebut tanaman *evergreen*. Akar tunggang dan dalam. Batang kayu mengkudu bisa digunakan sebagai kayu bakar dan tiang.^{29,30}

b. Daun

Daun mengkudu memiliki ukuran besar dengan panjang 10-20 cm dan lebar 8-15 cm, terletak saling berhadapan dan menyilang, berbentuk bulat telur, lebar sampai lonjong dengan ujung lancip, tepi daun rata, pangkal menyempit berbentuk pasak dengan ukuran 0,5-2,5 cm, urat daun menyirip, tidak berbulu, warna hijau mengkilap. Daun mengkudu terkadang digunakan

sebagai sayuran, rasanya agak pahit, memiliki nilai gizi tinggi banyak mengandung vitamin A.^{29,30}

c. Buah

Berbentuk bonggol berukuran 1-4 cm, keluar dari ketiak. Satu bonggol dapat tumbuh 90 mahkota buah berwarna putih, berbentuk seperti terompet berbau harum. Buah tumbuh secara bertahap 1-3 mahkota setiap 3 hari.^{27,29} Buah mengkudu berkelamin dua dengan benangsari pada mahkota. Buah mengkudu bergerombol pada satu dasar sehingga membentuk benjol-benjol disebut bonggol.³⁰

d. Buah

Berasal dari dari bonggol dari buah yang menggerombol merupakan bakal buah.²⁷ Pada permukaan buah mengkudu terlihat terbagi menjadi banyak area berbentuk poligonal yang penuh dengan bintik-bintik dan kutil-kutil. Pada awalnya, buah ini memiliki warna hijau, ketika matang, buah ini berubah menjadi warna putih kekuningan dan saat matang penuh, warnanya menjadi putih transparan. Buahnya berbentuk bulat lonjong dengan diameter antara 7,5 hingga 10 cm. Daging buah mengkudu terdiri dari buah-buahan berbentuk piramida berwarna coklat merah.²⁹

e. Biji

Biji mengkudu yang memiliki warna hitam dan albumin yang keras serta menunjukkan ruang udara yang jelas. Pada biji mengkudu memiliki kemampuan berkecambah yang baik setelah 3-9 minggu (atau 35 hari) bahkan setelah penyimpanan selama 6 bulan. Mengkudu dapat ditanam menggunakan bijinya, dan dalam waktu 6 bulan, tinggi tanaman bisa mencapai 1,2 – 1,5 meter. Pembuahan dimulai pada tahun ketiga, dan berlanjut sepanjang tahun, dengan umur maksimum tanaman yang mencapai lebih dari 25 tahun.²⁹

f. Bau dan rasa

Bau mengkudu khas seperti keju busuk. Bau khas tersebut akan muncul setelah buahnya matang dan lunak. Aroma tersebut muncul karena kombinasi asam kaprik dan asam kaproat, yang merupakan senyawa lipid atau lemak yang memiliki gugus molekul yang menguap menjadi minyak atsiri. Rasa tidak sedap berasal dari asam kaprilat. Diasumsikan bahwa kedua senyawa ini memiliki potensi sebagai antibiotik.^{29,30}



Gambar 2.3 Mengkudu : Daun, Bunga dan Buah ²⁸
 (Nelson SC. *Morinda citrifolia* L. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry* 2006;4)

2.3.3 Manfaat dan Senyawa Aktif Mengkudu

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) sebagai tanaman obat yang memiliki kemampuan sebagai anti bakteri, anti jamur, melawan tumor dan kanker, mengurangi rasa nyeri dan edema, membantu meningkatkan reseptor pada dinding sel, meningkatkan kadar serotonin, merangsang dan menyeimbangkan sistem kekebalan tubuh (imunitas) dan kadar hormon, meningkatkan kinerja kelenjar-kelenjar tubuh, mengatur fungsi sel dan regenerasi sel jaringan tubuh yang rusak, meningkatkan proses penyerapan zat-zat nutrisi, mengurangi rasa letih, membantu melancarkan peredaran darah dan antihipertensi.^{13,14} Dr. Nelson Rivers (1996), seorang dokter farmasi di pusat toksikologi California, meneliti mengkudu bisa untuk mengatasi kulit yang terbakar.²⁸

Mayoritas komponen yang ada dalam buah mengkudu mengandung beragam senyawa kimia yang memiliki manfaat untuk keseatan dan pengobatan manusia.³²

Kandungan Bioaktif	Manfaat
Alizarin	Pemutus hubungan pembuluh darah ke tumor.
Antrakuinon	Membunuh mikroba Pathogen.
Arginin	Bahan pembentuk protein, meningkatkan imunitas, memproduksi Nitric Oxide (NO).
Damnacantal	Anti Kanker dan anti biotik alami membantu penyerapan.
Lisin	Membantu penyerapan kalsium dan pembentukan kolagen pada tubuh pembentuka kolagen pada tulang.
Penilalanin	Penting untuk dikonsumsi karena tidak dapat diproduksi sendiri oleh tubuh, sehingga harus didapatkan dari luar .
Prolin	Mengatur sistem kekebalan tubuh, dan mencegah gejala penyakit autoimmun.
Proxeronin dan proxeronase	Mempercepat penyerapan zat makanan ke dalam sistem pencernaan dan menyelaraskan kerja sel dalam tubuh.
Skopoletin	Mengatur tekanan darah.
Selenium	Antioksidan.
Serotonin	Menghalau stress.
Sitosterol	Menahan pertumbuhan sel-sel kanker dan melindungi seseorang dari penyakit jantung.
Steroid	Antiseptik dan desinfektan.
Terpenoid	Membantu tubuh dalam proses sintesa organik dan pemulihan sel-sel tubuh.
Vitamin C	Antioksidan.
Xeronin	Mengaktifkan kelenjar tiroid & timus (fungsi kekebalan tubuh)

Tabel 2.1 Kandungan Bioaktif Mengkudu dan Manfaatnya
(Sumber : Djauhariya dkk, 2006)¹⁷

Sang dkk. (2001) menyebutkan kandungan fitokimia ekstrak buah mengkudu yang diduga berperan sebagai antioksidan adalah flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan buah mengkudu kaya flavonoid seperti *rutin* dan *quercetin*.³³

Senyawa aktif lainnya masih terdapat pada buah daun, dan bijinya dan telah dibuktikan pada beberapa penelitian tentang mengkudu.

a. Buah

Secara umum, buah mengkudu mengandung berbagai senyawa seperti alkaloid, saponin, flavanoid, terpenoid serta antraquinon. Di antara senyawa-senyawa aktif tersebut termasuk xeronine, proxeronine, proxeronaase, serotonin, dammacahtal (sebagai agen anti kanker), scopoletin, vitamin C, anti oksidan, mineral, protein, karbohidrat, enzim, alkaloid, kofaktor tanaman dan berbagai fitonutrisi lain yang sangat efektif dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh, memperbaiki fungsi sel dan mempercepat regenerasi sel yang rusak.³²

Xeronine merupakan salah satu alkaloid yang signifikan yang ada dalam buah mengkudu, karena dalam buah tersebut memiliki peran dalam mengaktifkan enzim-enzim serta mengatur peran protein pada sel. Dr. Ralph Heinicke merupakan seorang ahli biokimia yang menemukan *xeronine*. Meskipun buah mengkudu sendiri hanya mengandung sedikit *xeronine*, namun buah mengkudu mengandung jumlah besar bahan-bahan pembentuk *xeronine*, yang disebut dengan *proxeronine*.³²

Scopoletin yang ada dalam buah mengkudu bekerja dengan cara mengikat serotonin, yang berperan dalam melebarkan saluran pembuluh darah yang menyempit, sehingga meningkatkan aliran darah. *Scopoletin* telah terbukti memiliki

kemampuan membunuh beberapa jenis bakteri, bersifat fungisida terhadap *Pythium sp.*, serta memiliki sifat anti inflamasi serta anti alergi.³²

Vitamin C mengandung asam askorbat sebagai antioksidan alami sebagai penetralisir radikal bebas sehingga melindungi kerusakan membran sel, kerusakan materi genetik dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh.³²

Buah mengkudu juga mengandung senyawa antibakteri seperti *acubin*, *asperuloside*, *alizarin* dan beberapa *antraquinon* yang telah terbukti memiliki sifat antibakteri. Beberapa penelitian tentang manfaat buah mengkudu sebagai agen antibakteri telah menunjukkan efektivitasnya melawan berbagai jenis bakteri penyebab infeksi, termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* dan *Shigella*.³²

Buah mengkudu mengandung lebih dari ratusan substansi fitokimia termasuk quercetin, termasuk flavonoid yang mengandung 0,015 mg sampai 0,200 mg dalam satu gram buah. Sebagai antioksidan, *quercetine* mempunyai kemampuan untuk mengikat radikal bebas di dalam sel, melindungi sel epitel, fibroblast, keratinosit, dan sel endotel dari stress oksidatif.³⁴

b. Daun

Senyawa aktif pada daun mengkudu hampir sama dengan buah mengkudu. Daun mengkudu mengandung polifenol. Senyawa aktif pada daun mengkudu antara lain *saponin*, *triterpen*, *tanin*, *alkaloid*, *glikosida iridoid*, dan *avonoid*.³⁵ *Saponin* dan *tanin* banyak berperan pada proses penyembuhan luka, *alkaloid* memiliki manfaat sebagai pereda nyeri (*analgetik*), sementara *glikosida iridoid* memiliki efek anti inflamasi. Disisi lain, *flavanoid* memiliki peran sebagai antioksidan dan agen anti inflamasi. *Flavanoid* kuartetin juga memainkan peran penting dalam proses pemulihan luka pada tahap awal dengan mengatur ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* serta mempromosikan pembentukan kolagen tipe III.³⁶

c. Biji

Biji buah mengkudu mengandung senyawa polifenol (*flavonoid*) mempunyai efek sebagai penghambat proses *melanogenesis* sebagai tirosinase inhibitor. Sebuah studi laboratorium telah dilakukan untuk mengevaluasi efek mengkudu sebagai penghambat *melanogenesis* pada kulit. Penelitian ini melibatkan pengujian aktivitas penghambatan tirosinase dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada berbagai ekstrak mengkudu. Hasil penelitian menunjukka bahwa ekstrak

biji mengkudu pada konsentrasi 500ug/ml memiliki potensi tertinggi sebagai penghambat tirosinase dan juga sebagai antioksidan, jika dibandingkan dengan ekstrak dari buah dan daun mengkudu.³⁵

2.4 Peran Antioksidan sebagai Penangkal Radikal Bebas Kulit

Untuk menjaga tubuh dari dampak radikal bebas, seperti radiasi UV, maka dibutuhkan antioksidan yang berperan untuk menyeimbangkan radikal bebas dengan mengisi kekurangan elektron mereka, maka dengan begitu akan menghentikan reaksi berantai. Pada dasarnya antioksidan dapat berfungsi sebagai penyedia radikal hidrogen atau menerima radikal bebas, menghambat proses pembentukan radikal bebas pada tahap awal. Dalam hal ini, ada pilihan alternatif sumber antioksidan yang dapat mengurangi efek radikal bebas pada kulit, seperti yang terkandung pada buah mengkudu mempunyai senyawa proxeronin yang cukup banyak untuk mengaktifkan xeronin berfungsi mengatur regenerasi sel untuk mencegah kerusakan sel dan mencegah proliferasi sel yang berlebihan, serta kandungan vitamin C nya merupakan antioksidan tinggi.^{32,35} Antioksidan yang terkandung di buah mengkudu, seperti quercetin sebagai fitokima juga mempunyai peranan dalam regulasi TGF- β 1 level yang akselerasi perbaikan sel dan meningkatkan kolagen pada kulit.^{33,34,37}

2.5 Sinar Ultraviolet (UV)

Radiasi ultraviolet adalah suatu radiasi elektromagnetik yang dipancarkan oleh matahari dengan panjang gelombang 200-400 nanometer.³⁸

Radiasi elektromagnetik merupakan salah satu bentuk energi akan membentuk *photoproduct* yang memicu reaksi fotokimia.³⁹



Gambar 2.4 Perbedaan Jangkauan Sinar Ultraviolet⁴⁰

Spektrum sinar UV dibedakan menjadi tiga, yaitu :^{39,41}

1. Ultraviolet A (UVA)

Memiliki panjang gelombang 320-400nm. UVA merupakan sinar UV yang sebagian besar sinarnya bisa mencapai bumi sekitar 90-99%. UVA ini satu-satu sinar yang bisa menembus kulit manusia sehingga menyebabkan kulit menghitam (*tanning*) dan fotosensitivitas. Intensitas sinar 500-1000 kali lebih besar dibandingkan UVB. Radiasi UVA pada saat ini dapat menjadi penyebab utama pada kasus kerusakan kulit dan

menyebabkan pembentukan kerutan pada kulit. Kemampuan penetrasi kulit oleh UVA lebih dalam dibandingkan dengan UVB, mencapai lapisan dermis (lapisan kedua kulit) dan dapat merusak serat-serat di dalamnya. Akibatnya, kulit kehilangan elastisitas dan mengalami kerutan. Radiasi UVA memiliki intensitas yang lebih stabil sepanjang hari jika dibandingkan dengan UVB. Selain itu, kaca dapat ditembus oleh paparan sinar UVA.

2. Ultraviolet B (UVB)

Memiliki panjang gelombang 280-320 nm. Sehingga hanya sebagian sinar UVB matahari yang tersaring oleh lapisan ozon dan mencapai permukaan bumi hanya sekitar 1-10%. Selanjutnya, sinar UVB tidak dapat menembus kaca. Radiasi ini paling intens terjadi pada pukul 10:00 hingga 14:00 saat matahari bersinar terang. Pada skala rendah, radiasi UVB juga mendatangkan manfaat untuk menghasilkan vitamin D dalam tubuh, tetapi jika terlalu banyak paparan UVB dapat menyebabkan kulit menjadi merah atau terbakar serta memicu produksi radikal bebas yang berdampak pada peradangan kulit dan katarak. Sinar UVB juga berpotensi merusak DNA sel melalui kegagalan proses fotokimiawi, yang dapat memicu terjadinya kanker kulit karena memiliki efek karsinogenik 100-10000 kali dibandingkan UVA.

3. Ultraviolet C (UVC)

UVC merupakan sinar yang diabsorpsi oleh lapisan ozon, memiliki

panjang gelombang 200-280 nm. Sinar UVC memiliki peran dalam menginduksi sunburn (luka bakar matahari) dan kanker kulit. Akan tetapi beruntungnya, sebagian besar sinar ini telah diserap oleh lapisan ozon yang ada di atmosfer bumi, dengan meningkatnya kerusakan lapisan ozon yang disebabkan oleh pembuangan bahan kimia tertentu di lingkungan, seperti freon AC dan sebagainya, ada kekhawatiran bahwa lebih banyak sinar UVC dapat mencapai bumi dan menyebabkan berbagai dampak negatif pada manusia.

2.5.1 Efek Yang Ditimbulkan dari Sinar UV

Dampak buruk dari paparan sinar UV pada matahari atau lampu UV adalah salah satu permasalahan serius pada dunia kesehatan. Dampak yang ditimbulkan oleh paparan UV jika terkena pada kulit manusia meliputi peradangan (*eritema*), perubahan warna kulit (*tanning*) serta penurunan kekebalan lokal atau sistemik (*imunosupresi*). Sementara dampak jangka panjang dari paparan UV dapat mengakibatkan penuaan pada kulit, turunnya sistem kekebalan tubuh serta meningkatkan resiko terkena kanker kulit yang diakibatkan oleh paparan sinar matahari.³⁹

Paparan sinar matahari memiliki dua jenis dampak, yakni dampak positif dan dampak negatif, hal tersebut bergantung pada frekuensi, durasi, intensitas serta sensitivitas individu terhadap

paparan sinar matahari. Dampak yang timbul akibat paparan sinar matahari adalah sebagai berikut:³⁸

a. Efek yang bermanfaat

Tidak menimbulkan rasa sakit bagi seseorang. Sinar matahari sangat bermanfaat bagi tubuh yaitu dapat merangsang peredaran darah, membantu pembentukan hemoglobin, merubah provitamin D3 menjadi vitamin D3, merangsang pembentukan melanin kulit.

b. Efek yang merugikan

Menimbulkan rasa sakit berupa mulai eritem ringan hingga luka bakar (*sunburn*). Umumnya eritem terjadi 2-3 jam setelah terpapar UV tetap berjalan hingga 10-24 jam. Penyebab sunburn biasanya karena sengatan UVB yang terlalu lama. Akibatnya merusak lapisan epidermis dan terjadi denaturasi protein. Kerusakan pada sel mengakibatkan pelepasan histamin sebagai penghubung, dimana hal tersebut mengakibatkan *vasodilatasi*, kulit menjadi merah (*eritema*), munculnya edema pada kulit serta memicu pertumbuhan sel basal. Paparan sinar UV yang berlebihan dapat menyebabkan masalah kulit yang dapat ditandai dengan dermatitis ringan dengan gejala gatal dan kemerahan pada kulit hingga bahkan berpotensi terjadinya kanker kulit. Seseorang yang memiliki kulit putih memiliki resiko lebih tinggi terjadinya

kanker kulit jika dibandingkan dengan seseorang yang memiliki kulit hitam.³⁸

2.5.2 Komponen Selular Kulit yang Ikut Rusak Terkena Radiasi

Sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm dapat diabsorpsi ke pleksus vena, dapat merusak komponen selular di dalam pembuluh darah, seperti :³⁹

a. Limfosit

Setelah 2 jam terkena sengatan UVB, sel limfoid bergerak menuju nodus limfa perifer. Pada pajaran kronik, sel limfoid tadi tidak akan kembali lagi ke tempat asal, tapi menetap di RES sebagai indikasi adanya kerusakan kulit.

b. Sel endotel

Efek radiasi menyebabkan perubahan pleksus-pleksus vena dan superfisial kulit. Kerusakan sel endotel ditandai edema selama 30 menit. Edema di sekitar ven akan muncul setidaknya dalam waktu satu jam setelah paparan sampai dengan puncaknya dalam 3-4 jam setelah terkena sinar UV.

c. Sel mast

Ketika terjadi paparan sinar UV, tubuh akan merespons dengan memproduksi zat-zat vasoaktif yang akan menyebabkan sel mast di lapisan dermis atas melepaskan mediator yang dapat

mempengaruhi terjadinya pelebaran pembuluh darah (*vasodilatasi*) serta menghasilkan protaglandin, histamin, TNF, serotonin dan juga leukotriene. Pada edema perivenular diakibatkan keluarnya mediator sel mast, seperti histamine dan prostanoïd. Sel mast dapat mengalami degranulasi yang disebabkan oleh paparan sinar UVA maupun UVB.

d. Blister dan bula

Terjadinya perubahan pada permeabilitas pembuluh darah dapat mengakibatkan timbulnya edema, lepuh serta bula pada lapisan supradermis maupun dermis.

e. Sel PMN

Pelebaran pembuluh darah akibat penyinaran selama 6 jam sampai 24 jam terjadi akumulasi dari sel-sel PMN dan makrofag, setelah 48 jam perubahan neutrophil dan limfosit T muncul kedua sel tersebut.

f. Fibroblas

Radiasi UV menyebabkan meningkatkan jumlah fibroblast. Dengan penambahan fibroblast merangsang pembentukan serat-serat jaringan ikat seperti serat kolagen, serat retikuler dan serat elastin untuk perbaikan jaringan yang rusak.^{39,42}

2.5.3 Proses Inflamasi Akibat Sengatan Radiasi

Radiasi UV menginduksi batas ambang imun. Sinar UVB yang masuk ke bumi bisa menimbulkan kemerahan, panas, pembengkakan dan nyeri, bisa juga menimbulkan kerusakan kulit seperti *sunburn*, supresi imun, kanker dan penuaan kulit (*photoaging*). Reaksi eritema yang muncul merupakan reaksi inflamasi akut akibat terjadinya vasodilatasi pembuluh darah pada reaksi inflamasi sehingga melibatkan sitokin untuk infiltrasi netrofil dan limfosit. Molekul yang menyerap sinar UV akan merusak tubuh, seperti pada *sun burn* dan supresi imun bisa muncul segera setelah paparan kelebihan sinar matahari, sedangkan kanker kulit dan penuaan kulit muncul setelah terpapar berulang kali.^{43,44}

Di siang hari, saat sinar matahari terasa sangat terik selama 2-3 jam kulit akan terasa panas dan kemerahan (eritem).⁴⁵ Hal tersebut dapat mengakibatkan rusaknya lapisan dermis dikarenakan proses denaturasi protein. Rusaknya lapisan tersebut menyebabkan pelepasan mediator histamin sehingga kemudian akan terjadi perluasan pembuluh darah dan mengakibatkan pembengkakan kulit dan akan merangsang proliferasi sel basal. Bila terpapar sinar matahari berlangsung lama menyebabkan rasa terbakar pada kulit, disebut luka bakar. Luka bakar ringan pada umumnya bisa sembuh dalam rentang

waktu 24-48 jam, sementara luka bakar yang serius membutuhkan waktu 4-8 hari untuk proses penyembuhannya. Ketika tingkat peradangan menurun, maka kulit dapat mengalami pelupasan. Pada orang kulit putih lebih mudah terkena sengatan sinar matahari menimbulkan kerusakan dibandingkan dengan orang kulit hitam.³⁸

2.5.4 Radikal Bebas Akibat UV

Sinar UV dapat berkontribusi pada sistem kesehatan manusia, dimana sinar UV ini terbagi menjadi dua yaitu UVA dan UVB, dimana sinar tersebut adalah sinar ultraviolet yang mampu menembus lapisan bumi. Pada kasus yang sering terjadi pada manusia salah satunya adalah kulit yang rusak bahkan dapat merusak DNA, hal tersebut dapat disebabkan oleh pancaran sinar UVB. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sinar UV pada matahari dapat memberikan dampak yang serius bagi proses fotokimiawi, baik fotoisomerisasi maupun fotooksida. Dalam kasus reaksi fotooksidasi dapat terjadi yang disebabkan oleh terlepasnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti *Superoksida* (O_2), *hydrogen peroksida* (H_2O_2), dan *radikal hidroksil* (OH).⁴⁶ Apabila kulit manusia terlalu sering terkena paparan sinar UV matahari maka dapat merubah pola dan formasi pada kulit, selain itu juga dapat mengakibatkan kegagalan pada proses oksidasi, terjadi peningkatan radikal bebas menghasilkan ROS pada kulit yang

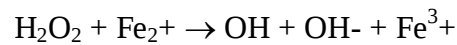
memicu kerusakan DNA akhirnya menyebabkan kanker kulit.^{2,43} Kegagalan proses oksidasi yang berlangsung dalam jangka waktu yang panjang dapat berpotensi menyebabkan keganasan, peradangan, ateroklerosis, penuaan, iskemia dan hemolisis.²⁵



Gambar 2.5 Penetrasi Sinar UV pada Kulit.³⁸

Superoksida terjadi di eritrosit, padahal membran eritrosit sangat peka jika mendapati serangan dari radikal hidroksil (-OH). Apabila (-OH) melakukan serangan pada membran eritrosit, maka akan menyebabkan terjadi lisis eritrosit sehingga jumlah eritrosit berkurang dan mengganggu hemoglobin (Hb) yang mengalami autooksida disebut methemoglobinemia, yang menghambat darah mengangkut oksigen.^{43,47} Radikal bebas pada metabolisme aerobik, misalnya hydrogen peroksida yang beradal dari reaksi metabolisme purin akibat dari Haber-Weiss, dapat menyebabkan radikal hidroksil.⁴⁸ Peroksida lipid melalui proses oksidasi diri dapat menyebabkan radikan bebas

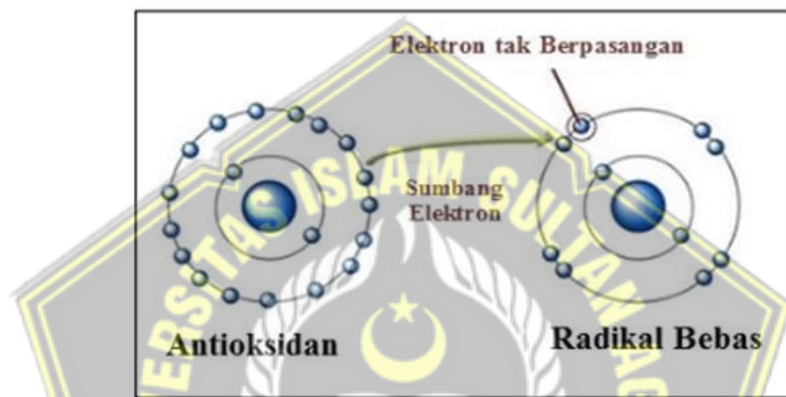
yang merusak sel, dan kondisi semacam ini seringkali menjadi salah satu penyebab terjadinya penyakit anemia hemolitik.⁴³



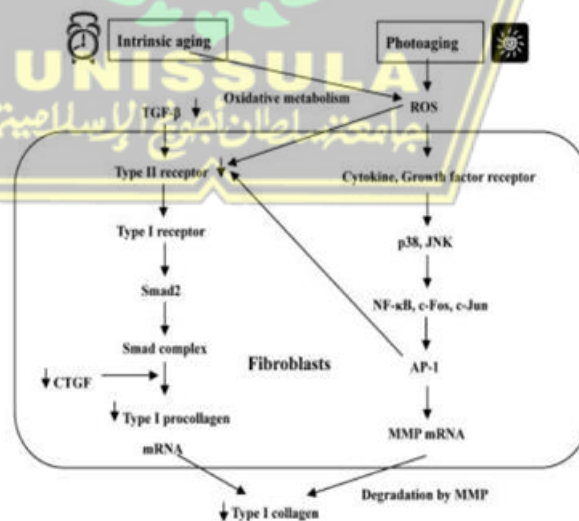
Radikal hidroksil menyerang membran sel membentuk peroksida lipid yang dapat menyebabkan bocor pada sel. Hal tersebut memungkinkan peroksida radikal hidroksil untuk memasuki inti sel yang terkandung DNA di dalamnya, yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan pada DNA dan dapat menjadi penyebab terjadinya karsinogenesis atau melanoma. Karsinogenesis merupakan perubahan sel normal menjadi sel ganas. Radikal bebas yang berkontribusi pada pertumbuhan kanker dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, seperti (1) Mengubah susunan DNA, (2) Memengaruhi alur transduksi sinyal pada sitoplasma dan nukleus, serta (3) Mengatur kegiatan protein dan gen yang terlibat dalam reaksi pada stres serta pengendalian gen yang terkait dengan pertumbuhan sel, perbedaan dan juga kematian sel.^{47,48}

Penelitian Saric dan Simavani (2016) menunjukkan bahwa kebiasaan terpapar sinar UV dapat meningkatkan aktifitas mutasi DNA mitokondria. Terpaparnya sinar UV menyebabkan *Sunburn cell*, yaitu sel tunggal dengan morfologi khas pada kulit dengan riwayat paparan sinar UV dikenal sebagai tanda sel keratin sedang melakukan

aktivitas apoptosis. Proses apoptosis berperan sebagai mekanisme protektif yang menyingkirkan sel rusak untuk menurunkan resiko keganasan yang bersifat kompleks meliputi kerusakan DNA.⁴³ Kerusakan sel akibat paparan sinar UVB dapat dicegah dengan zat antioksidan.²⁸



Gambar 2.6 Antioksidan Menetralkan Radikal Bebas⁴⁶



Gambar 2.7 Skema Degradasi Kolagen Akibat Ketidakseimbangan

Activator Protein (AP-1) dan TGF- β .¹¹

Regulasi transkripsi dari ekspresi gen kolagen mengikutsertakan elemen *cis-acting* serta faktor *trans-acting*. Elemen *cis-acting* merupakan serangkaian nukleotida di area promotor gen yang berguna sebagai pengikat urutan protein seluler, sedangkan *trans-acting* yang dapat membuat regulasi naik atau turun sebagai aktivitas promotor transkripsi. Ekspresi gen pada tahap awal, akan ditranskripsi menjadi mRNA, yang memiliki untaian DNA dengan heliks ganda, kemudian mRNA masuk ke dalam sitoplasma dan mengalami translasi di dalam sel menjadi polipeptida yang bersesuaian. Modulator yang paling kuat atas ekspresi gen jaringan ikat, salah satunya adalah faktor pertumbuhan transformasi- β (TGF- β).^{10,49}

2.6 Tretinoin

Tretinoin merupakan turunan dari vitamin A ataupun biasa disebut dengan *all-trans retinoic acid* (ATRA). Tretinoin termasuk derivad retinoid merupakan substansi kimia yang memiliki struktur seperti vitamin A (retinol). Tretinoin (asam retinoat) dapat membantu pemulihan pembentukan kolagen secara signifikan, pada kulit manusia yang mengalami kerusakan akibat sinar matahari.⁵⁰

Tretinoin telah diteliti sebagai retinoid yang diimplikasikan untuk pengobatan penuaan intrinsik ataupun penuaan ekstrinsik

fotoaging.⁵¹ Penggunaan tretinoin selama 10 minggu pada model hewan fotoaging menunjukkan perbaikan pada papila dermis, juga pada penampilan kerutan.

Tretinoin 0,1 % diaplikasikan pada penelitian ex-vivo memblokir intersisial kolagenase dan gelatinase yang mencegah terjadinya degradasi kolagen. Aplikasi tretinoin 0,1% juga memblokir induksi UV untuk mengaktifkan nekrosis transkripsi faktor AP-1 dan NF- κ B.⁵²

Observasi exvivo selanjutnya menunjukkan tretinoin 0,05% menunjukkan perbaikan klinis pada kulit wajah dan lengan yang mengalami fotoaging.⁵³ Tretinoin telah digunakan dan disetujui pada bidang dermatologi selama lebih dari 40 tahun untuk pengobatan *acne vulgaris* dan *photodamage*.^{54,55} Tretinoin memperbaiki kepadatan stratum korneum, mendispersi melanin granula, epidermis hiperplasia, sintesis kolagen, elastin dan fibronectin. Memperbaiki fotoaging dengan memblokir degradasi matriks dermis, mencegah induksi AP-1 dan MMPs.⁵⁶

Penelitian terbaru *stromal vascular fraction gel*, lipid dan tretinoin juga memperbaiki *photoaging*, aplikasi tretinoin 0,025% juga disarankan untuk pasien yang secara klinis mengalami kulit dengan *photoaging*.^{57,58,59}

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Peran Ekstrak Mengkudu terhadap Ekspresi P53 dan Jumlah Kolagen pada Tikus yang Terpapar UVB

Secara umum ekstrak mengkudu berisi suatu alkaloid, saponin, flavonoid, terpenoid, serta antraquinon, sedangkan senyawa aktif yang terdapat pada buah mengkudu diantaranya xeronine, proxeronine, proxeronase, serotonin, dammacanhtal, (zat anti kanker), scopoletin, vitamin C, anti oksidan, mineral, protein, karbohidrat, enzim, alkaloid, kofaktor tanaman serta fitonutrient lain yang begitu aktif dan begitu kuat untuk menambah dan menguatkan sistem kekebalan tubuh, mereparasi fungsi sel serta memicu regenerasi sel-sel yang rusak.²⁹ Komponen aktif ekstrak mengkudu bereaksi secara sinergis, mampu menstimulasi pertumbuhan fibroblast, berperan dalam angiogenesis dan reepitelisasi serta mampu mengurangi fase inflamasi. Proses proliferasi sel dipromotori oleh glycoprotein, polisakarida serta komponen fenol. Hasil akhir dari berbagai mekanisme ini adalah peningkatan jumlah kolagen dan glikosaminoglikan jaringan. Senyawa aktif pada mengkudu antara lain saponin, triterpen, tanin, alkaloid, glikosida iridoid, serta flavonoid.^{29,30} Saponin dan tanin banyak berperan pada proses penyembuhan luka, alkaloid berfungsi untuk analgetik,

glikosida iridoid berfungsi untuk anti inflamasi, sedangkan flavonoid berfungsi untuk antioksidan serta anti inflamasi. Flavonoid kuersetin juga berperan pada proses rehabilitasi luka ditahap awal melalui regulasi ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) serta pembentukan kolagen tipe III.³⁰

Sinar matahari mengandung ultraviolet, terdapat 3 macam ultraviolet (UV) yakni : UVA, UVB, dan UVC. Perbedaan ultraviolet berdasarkan radiasi panjang gelombang yang dikeluarkan :

1. UVA memiliki λ 320-400 nm, yang paling banyak menimbulkan radiasi tetapi memiliki efek paling minimal kerusakan kulit. Radiasi UVA bisa menembus sampai dermis, intensitasnya konstan, dapat menembus kaca.
2. UVB memiliki λ 280-320 nm, hanya merusak lapisan epidermis, tidak menembus kaca, bermanfaat mensintesis vitamin D tetapi jika terpapar berlebihan dapat menimbulkan kerusakan kulit hingga memicu radikal bebas.
3. UVC memiliki λ 200-280 nm, hanya sampai lapisan ozon, tetapi karena efek rumah kaca seperti freon AC bisa merusak lapisan ozon akibatnya sinar UVC bisa menembus bumi sehingga banyak menimbulkan efek kerusakan kulit.^{39,41}

Radiasi UVA dan UVB menimbulkan reaksi inflamasi akut berupa kemerahan (eritema) akibat *sunburn*.^{43,44} Senyawa aktif flavonoid, saponin,

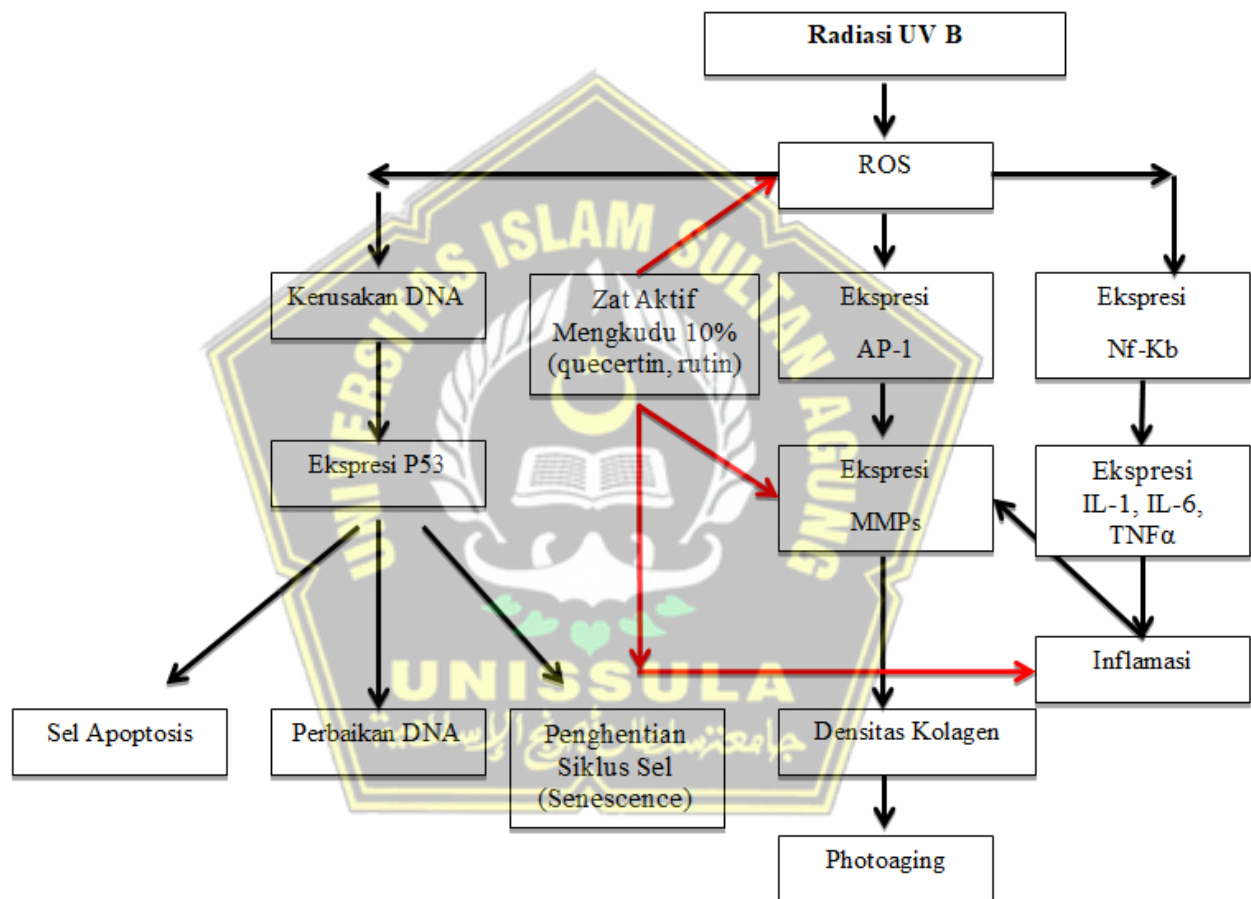
tannin yang banyak terkandung di bagian buah, biji dan daunnya dari mengkudu yang berperan pada proses inflamasi mulai dari fase inflamasi, fibroblast, dan maturasi (kolagen).^{32,34,35} Efek kemerahan lebih terlihat pada UVB daripada UVA. Terjadinya eritema karena vasodilatasi pembuluh darah merupakan reaksi inflamasi sehingga melibatkan sitokin untuk infiltrasi neutrofil dan limfosit.^{43,44} UVB bisa menembus lapisan dermis didalamnya terdapat sel melanosit untuk pigmen kulit, sehingga bisa menimbulkan gangguan pigmen berupa melasma.³³

Radiasi UV dapat mempengaruhi aktivitas sistem oksidan sehingga terlalu lama terpapar sinar UV dapat menyebabkan perubahan susunan serta komposisi dan menciptakan stress oksidatif terjadi peningkatan radikal bebas menghasilkan ROS pada kulit memicu kerusakan DNA akhirnya menyebabkan kanker kulit.^{2,43} Senyawa aktif mengkudu seperti alkaloid dan antioksidan yang berperan menahan atau mencegah ROS.^{32,33,34} Pada keadaan stress oksidatif akan mengaktifkan siklin inhibitor untuk menfosforilasi p53 sehingga yang seharusnya p53 berikatan erat dengan MDM2, akan tetapi pada kondisi stress oksidatif ikatan tersebut akan lepas. P53 melakukan transkripsi lalu translasi untuk mereparasi sel yang rusak, jika tidak bisa diperbaiki maka p53 memberikan signal untuk apoptosis.^{7,8}

Ekspresi MMP-1 teraktivasi oleh TGF- β oleh karena suatu keadaan yang terjadi didalam sel yang mengalami stress oksidatif yang mengganggu sintesis kolagen. Aktivasi MMP-1 akibatnya terjadilah peningkatan degradasi

kolagen dan penurunan jumlah kolagen (deposisi kolagen) yang memperkuat struktur lapisan dermis.^{10,11} Xeronin berfungsi mengatur regenerasi sel untuk mencegah kerusakan sel dan mencegah proliferasi sel yang berlebihan.³⁵

3.2 Kerangka Teori



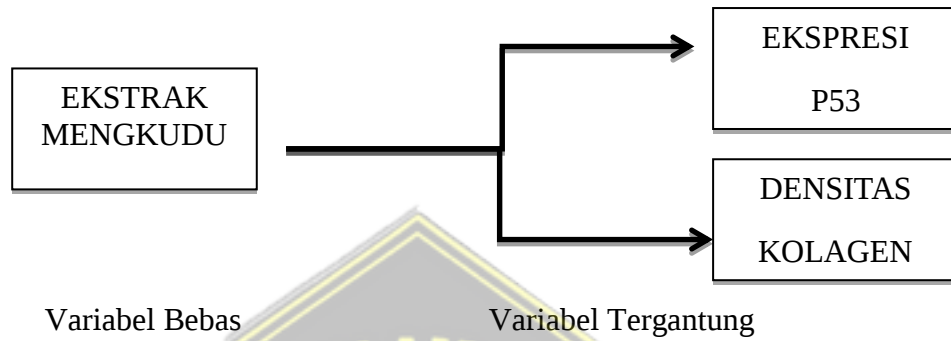
Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian

Ket :

→ Memacu

→ Menghambat

3.3 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

3.4 Hipotesis

Ditemukan adanya pengaruh pemberian ekstrak gel buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus yang terpapar UVB.

BAB IV

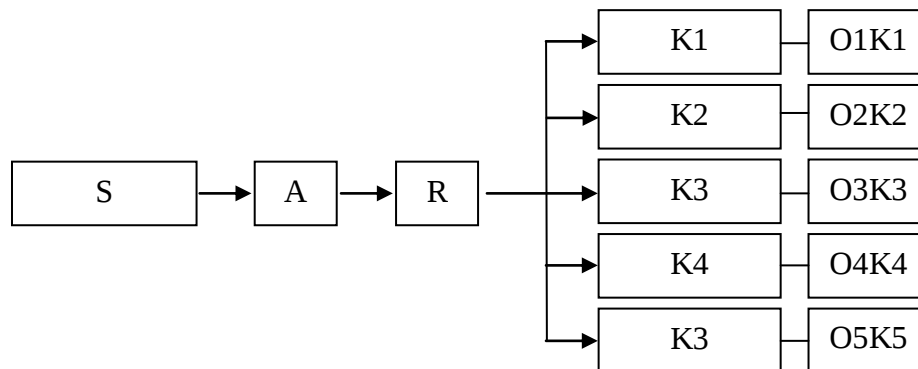
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Riset berikut adalah penelitian *post test only control group* yang menunakan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian yang diambil yaitu tikus jantan galur wistar dengan berat badan 200 – 250 gram. Tersusun atas:

1. K1: Kelompok tikus sehat
2. K2: Kelompok tikus radiasi UVB tanpa perlakuan (kontrol negatif)
3. K3: Kelompok tikus radiasi UVB dengan base gel (plasebo)
4. K4: Kelompok tikus radiasi UVB dengan gel mengkudu 10% (perlakuan)
5. K5: Kelompok tikus radiasi UVB dengan gel tretinoin 0,025% (kontrol positif)

S : Sample
A : Adaptasi
R : Randomisasi
O : Observasi



Gambar 4.1 Gambar Rancangan Penelitian

4.2 Variabel dan Definisi Operasional

a. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Ekstrak mengkudu

Variabel tergantung : Ekspresi p53 dan densitas kolagen

b. Definisi Operasional

a) Ekstrak mengkudu :

Ekstrak mengkudu merupakan suatu ekstrak yang berasal dari buah mengkudu yang dilarutkan dengan etanol serta di buat dengan sediaan gel dengan dosis 10%. Pembuatan tersebut dilaksanakan menggunakan teknik maserasi. Gel Ekstrak Mengkudu dioleskan setiap hari pada kulit tikus UVB dengan perlakuan gel ekstrak mengkudu sebanyak 2 mg/tikus, selama 5 hari.

Skala : Ordinal

b) Ekspresi p53 :

P53 adalah protein faktor transkripsi, merupakan salah satu respon sel terhadap stress. P53 pada jalur respon stress yang berperan sebagai pelindung sel dari rusaknya DNA yang diakibatkan dari paparan UVB. Sampel jaringan kulit di area penyinaran diambil dan dilaksanakan ekstraksi RNA guna di analisis dengan menggunakan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang akan dipaparkan dengan bentuk presentase.

Skala : Rasio

c) Densitas kolagen :

Kolagen merupakan protein matriks ekstraselular yang diciptakkan dari fibroblast yang teraktivasi setelah pemberian perlakuan serta berwarna biru pada pengecatan *Masson Trichrome*. Metode penghitungan kolagen dapat dihitung dengan menggunakan bantuan software Image J.

Skala : Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Pada riset berikut ini memiliki subjek penelitian yaitu tikus jantan galur wistar memiliki usia 2-3 bulan dan mempunyai berat

badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh team Animal House SCCR Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang yang dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal eritema 160 mj/cm²/15 menit selama 5 hari.

4.3.2. Hewan Uji Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam riset berikut ini yaitu :

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

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar yang memiliki kriteria:

1. Tikus mengalami penurunan berat badan < 200 gram
2. Tikus sakit atau infeksi
3. Tikus mengalami perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
4. Tikus mati saat penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pada riset berikut ini metode pengambilan sampelnya dengan mempergunakan *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar terbagi atas lima kelompok yakni kelompok 1 tikus sehat (tikus tanpa paparan UVB), kelompok 2 kontrol negatif (tikus dengan paparan UVB), kelompok 3 perlakuan 1 (tikus dipapar UVB dengan pemberian *base gel* secara topikal), kelompok 4 perlakuan 2 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan gel ekstrak buah mengkudu 10% secara topikal) dan kelompok 5 kontrol positif (tikus dipapar UVB dengan perlakuan gel tretinoin 0,025% secara topikal).

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung menurut sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer ialah : $(t-1)(n-1) \geq 15$, t yaitu banyaknya perlakuan, n yaitu banyaknya sampel dari tiap perlakuan, dari rumus tersebut didapat hasil $n \geq 5$. Riset berikut dilaksanakan dalam lima kelompok, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor, maka total sampel yaitu berjumlah 25 ekor.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat Penelitian

Penelitian berikut mempergunakan beragam peralatan agar dapat membuat hewan model diantaranya berbentuk *UV light* (broadband dengan puncak emisi 302 nm) yang berenergi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus serta alat pemotong rambut. Peralatan yang dipergunakan dalam mengumpulkan data yaitu vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, serta vial tube 1,5 mL. Peralatan yang dipergunakan dalam menganalisis data diantaranya *microplate reader*, *microskop*, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, serta komputer/laptop.

4.4.2. Bahan Penelitian

Pada riset berikut menggunakan bahan untuk perlakuan yang terdiri dari ekstrak buah mengkudu, RNA later, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), DNA *isolation* kit, PCR analisis kit, ketamin, *xylazine water base gel*, etanol, akuades, pakan tikus, dan kloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance riset diperoleh dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan no. 521/XII/2022/Komisi Bioetik.

4.5.2. Cara Pembuatan Gel Ekstrak Buah Mengkudu

Ekstrak Buah mengkudu diperoleh dari simplisia buah mengkudu dari BPOT Tawangmangu, kemudian dihaluskan agar menjadi bubuk kering. Proses pembuatan tersebut mempergunakan teknik maserasi. Buah mengkudu yang sudah menjadi bubuk kering selanjutnya akan di ekstraksi dengan mempergunakan etanol 70 % lalu di saring serta filtrat tersebut ditampung, residu selanjutnya dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Pemilihan pelarut tersebut disebabkan karena etanol dapat menyaring bahan aktif yang lebih banyak mulai dari yang bersifat polar, semi polar atau non polar. Diharapkan dapat menciptakan jumlah ekstrak yang maksimal. Kandungan etanol di uapkan dengan mempergunakan *rotary evaporator* agar memperoleh ekstrak kental. Hasil evaporasi selanjutnya dikentalkan dengan mempergunakan *waterbath*. Ekstrak kental yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan gel. Pembuatan

gel dilakukan dengan mencampurkan gelling agent polyacrylic acid (carbomer) dan anionic acrylamide copolymer (Himosap Gas 100) sebanyak 2 gram dengan 100 ml aquabidest, selanjutnya setiap 10 gram ekstrak buah mengkudu dicampurkan dengan basis gel sebanyak 90 gr dengan cara di aduk. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop.

4.5.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilaksanakan suatu riset, terlebih dahulu untuk menentukan dosis yang hendak dipergunakan dalam penelitian. Penelitian terdahulu mempergunakan gel ekstrak buah mengkudu dosis 4%, 5%, 10%, 20% dan 30%, untuk penggunaan secara topikal.^{14,29,31} Penelitian menggunakan dosis 10% topikal gel ekstrak buah mengkudu. Penggunaan topikal gel ekstrak mengkudu dilakukan setiap hari sebanyak 200 mg/tikus sehingga dosis ekstra buah mengkudu yang digunakan adalah 20 mg/tikus dengan dosis 10 %.

4.5.4 Paparan UVB

1. Tikus yang telah di adaptasi dengan waktu 1 minggu kemudian di bius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut dibagian dorsal tikus potong sampai bersih dengan ukuran 5x5 cm.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV *light* (broadband dengan peak emission 302 nm) yang berjarak 20 cm dengan dosis minimal eritema 160 mJ/cm²/15 menit perhari selama 5 hari.
4. Tikus diberi perlakuan secara topikal sesuai kelompok, kelompok kontrol negative menggunakan *gel base* dan kelompok perlakuan menggunakan gel ekstrak buah mengkudu dengan dosis 10%, kelompok kontrol positif yang diberikan tretinoin gel 0,025%, yang diberikan 1x sehari dengan kurun waktu selama 14 hari pasca penyinaran UVB.

4.5.5 Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilaksanakan dengan mempergunakan protokol pengecatan *Masson Trichome* yang memiliki beberapa tahap diantaranya :

Pertama dilaksanakan deparafinisasi slide jaringan, selanjutnya panaskan Cairan Bouin ke suhu 54-64°C. Tahap berikut yaitu

dilaksanakan inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu dilakukan inkubasi slide di Hematigoksin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian dibilas kembali dengan air. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi slide dalam larutan Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin selama 15 menit kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit. Tahap berikutnya inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit kemudian dibilas kembali dengan air. Tahap selanjutnya inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit kemudian dehidrasi, dan pasang *deck glass*.

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan serum dilaksanakan dihari ke 14 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm dibagian Kulit yang telah terpapar UVB. Sampel jaringan terbagi menjadi 2 guna difiksasi serta direndam kedalam formalin 10% dengan kurun waktu 24 jam. Kemudian dimasukkan kedalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan kedalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan

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

4.5.7. Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan kedalam alkohol yang bertingkat mulai dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) agar dapat mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukkan jaringan kedalam larutan alkohol-xylol dengan waktu kurang lebih 1 jam selanjutnya masukkan jaringan kedalam larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Jaringan dimasukkan kedalam parafin cair dengan waktu 2 x 2 jam. Tunggulah sampai parafin memadat, potong jaringan dalam paraffin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukkan jaringan dikaca obyek deparafinasi dalam inkubator serta di panaskan dengan suhu 56-58°C sampai parafin mencair

4.5.8. Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilaksanakan dengan mempergunakan protokol pengecatan *Masson Trichrome* (Bio – Optica, Milano, Italia) yang memiliki beberapa tahap diantaranya:

1. Deparafinisasi slide jaringan masing-masing selama 5 menit dengan menggunakan xylene 1 dan 2.
2. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan alcohol bertingkat (dari absolute ke 70%) dan aquades
3. Letakkan pada humidity chamber
4. Tambahkan preparat dengan reagen A (Weigert's iron hematoxylin - A solution) kemudian tambahkan reagen B (Weigert's iron hematoxylin - B solution) diamkan selama 10 menit, buang reagenya dan keringkan
5. Tambahkan reagen C (Picric acid alcoholic solution) diamkan selama 4 menit
6. Bilas preparate dengan aquabidest (selama 3-4 detik)
7. Tambahkan reagen D (Ponceau alcoholic fuchsin according to Mallory solution), diamkan selama 4 menit
8. Bilas preparate dengan aquabidest (selama 3-4 detik)

9. Tambahkan reagen E (Phosphomolybdic acid solution), diamkan selama 10 menit, selanjutnya buang reagen pada preparat dan keringkan
10. Tambahkan reagen F (Masson online blue), diamkan selama 5 menit, selanjutnya dibilas dengan aquabidest
11. Lakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat (dari 70% - 96%), selama 5-10 detik, kemudian selanjutnya alkohol absolute 100% selama 1 menit
12. Preparat dimasukkan ke dalam xylene selama 1 menit
13. Dilakukan proses Mounting, dengan entelan

4.5.9 Uji Ekspresi p53 dengan qRT-PCR

Total RNA diekstraksi dari jaringan kulit menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.) sesuai dengan protokol pabrik. Selanjutnya sintesis cDNA dilakukan dengan mencampurkan 1 µl RNA dan 5 uL nuclease free water (NFW) yang kemudian di inkubasi dalam suhu 65 C dengan waktu 5 menit. Larutan kemudian dicampur dengan 2 uL DNase I dan diinkubasi disuhu 37 C selama 5 menit. 2 uL RT master mix kemudian ditambahkan pada larutan tersebut serta di inkubasi dalam suhu 37 C 15 menit, 50 C 5 menit dan 98 C 5 menit. cDNA kemudian dapat disimpan pada suhu - 20 C. qPCR dilakukan dengan mencampurkan 1 uL cDNA, 1 uL

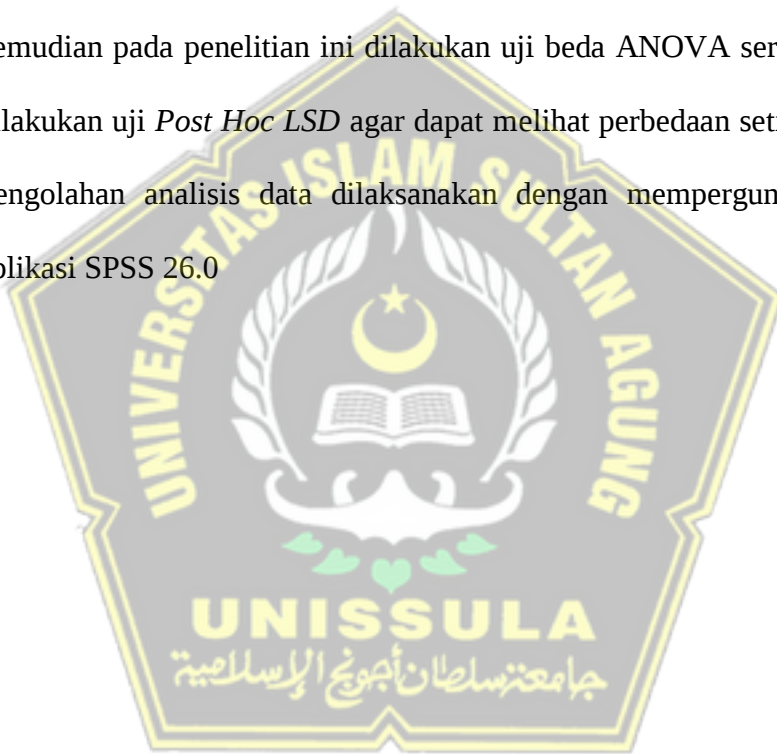
forward primer, 1 uL reverse primer, 10 uL KAPA sybr green dan 7 uL NFW. qPCR dilakukan dengan inkubasi suhu sebagai berikut: 95°C selama 2 menit, diikuti 40 siklus pada 95°C selama 50 detik, 62°C selama 20 detik. Metode Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) digunakan untuk menunjukkan hubuahn antara ekspresi gen target pada kelompok eksperimen dan ekspresi gen target pada kelompok kontrol. Urutan primer gen p53 yang digunakan forward primer 5'-CCA AGA AGG ACC AGT C TA -3' dan reverse primer 5'GAG GCA GTC AGT CTG AGT C-3'. Urutan primer gen GAPDH sebagai *housekeeping gene* yang digunakan forward primer 5'-GCG ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3' dan reverse primer 5'TCT CGC TCC TGG AAG ATG GTG A -3'. Hasil analisis direpresentasikan sebagai ekspresi relatif terhadap kelompok sehat.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

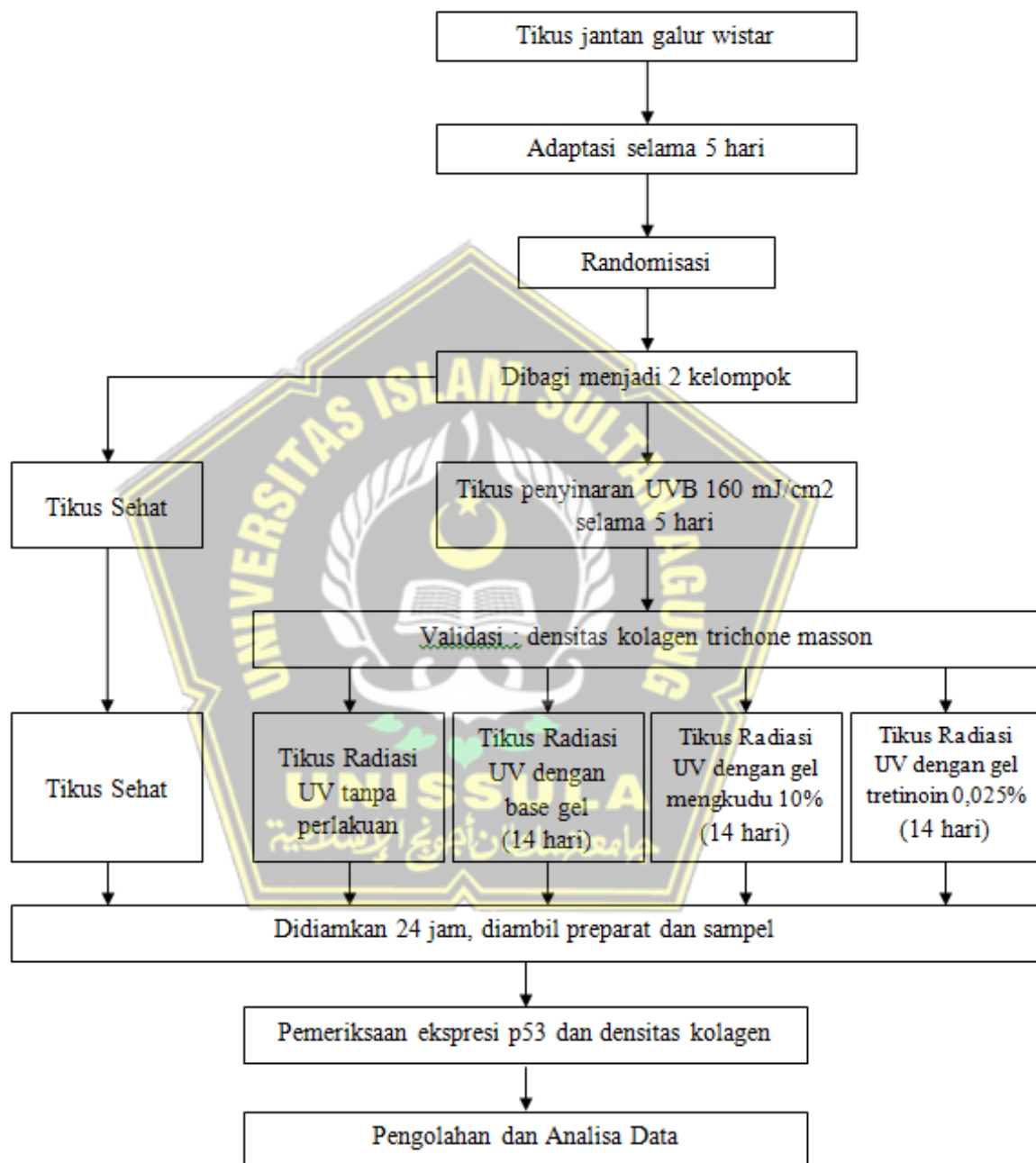
Riset berikut dilaksanakan di *Laboratorium Stem cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah. Waktu Penelitian ini berlangsung selama bulan Juni-Agustus 2023

4.7. Analisa Data

Data yang didapatkan selama penelitian akan diproses, disunting, serta ditabulasi, agar dapat dilakukan uji deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Data yang diperoleh bersifat normal dan homogen, sehingga kemudian pada penelitian ini dilakukan uji beda ANOVA serta selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc LSD* agar dapat melihat perbedaan setiap kelompok. Pengolahan analisis data dilaksanakan dengan mempergunakan bantuan aplikasi SPSS 26.0



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V

PEMBAHASAN

Riset berikut merupakan penelitian eksperimental dimana sudah dilaksanakan dibulan Juni-Agustus tahun 2023 di laboratorium Steam Cell and Cancer Reaseach Fakultas Kedokteran Unissula Semarang. Subjek dari riset berikut yaitu tikus jantan galur Wistar yang memiliki berat badan 200-250 gram serta memiliki usia 2-3 bulan. Tikus diinduksi dengan mempergunakan sinar UVB Panjang gelombang 302 nm dengan MED 160 mJ/cm²/hari setiap 15 menit selama 5 hari. Riset berikut mempergunakan 25 ekor tikus serta tidak ada yang dieksklusi selama penelitian terjadi, riset berikut tersusun atas lima kelompok yakni kelompok tikus sehat, kelompok kontrol negatif yang terdiri dari tikus terpapar UVB, kelompok tikus terpapar UVB dan diberi base gel, dan kelompok perlakuan yang terdiri dari tikus terpapar UVB dan diberi gel ekstrak mengkudu 10 %, kelompok kontrol positif yang terdiri dari tikus terpapar UVB yang diberikan tretinoin 0,025%

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Uji Fitokimia Buah Mengkudu

Ekstraksi Buah Mengkudu dilakukan di laboratorium SCCR Semarang. Ekstraksi dilaksanakan secara maserasi dengan

mempergunakan larutan etanol 70 %.

Hasil uji screening kualitatif fitokimia ekstrak buah mengkudu diperlihatkan dalam tabel 5.1 berikut :

Tabel 5.1 Hasil Uji Kualitatif Fitokimia Ekstrak Buah Mengkudu

	BioActive	Hasil
Ekstrak Buah Mengkudu	Phenol	++
	Phenolic	+
	Tannin	+
	Flavonoid	+++
	Flavones	-
	Alkaloid	+++
	Terpenoid	+++
	Saponin	+++

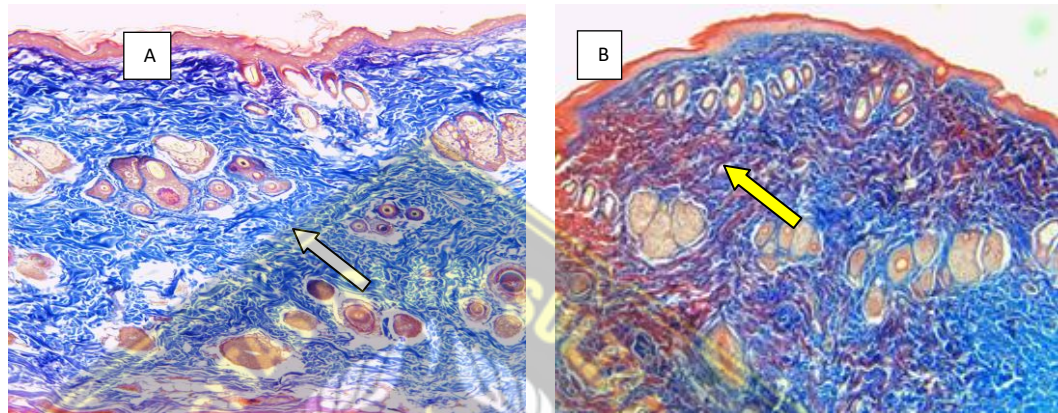
Ket : + intensitas lemah
 ++ intensitas medium
 +++ intensitas kuat
 - tidak terdeteksi

5.1.2 Validasi Kolagen pada Tikus Pasca Induksi UVB

Tikus akan di induksi sinar UVB dengan intensitas 160 mJ/cm², 15 menit/ hari akan dilakukan kurang lebih selama 5 hari. Selanjutnya tikus akan diterminasi sesudah dilaksanakan anastesi. Jaringan kulit tikus yang terpapar UVB akan dilakukan analisis dengan mempergunakan pengecatan *Mason Trichrome*.

Tikus yang terpapar UVB akan memperlihatkan lebih sedikit kolagen daripada dengan tikus yang sehat. Hasil uji validasi

jaringan mengalami fotoaging dengan melihat penurunan densitas kolagen, dengan pemeriksaan histologi menggunakan pengecatan *Mason Trichrome* diperlihatkan dalam Gambar 5.1 berikut.



Gambar 5.1 (A) Jaringan kulit tikus sehat (B). Jaringan kulit tikus yang diinduksi UVB
Serat kolagen tercat warna biru, densitas kolagen yang ditunjukkan dengan warna biru berkurang pada tikus yang diinduksi UVB

Berdasarkan gambar tersebut bisa diamati jika jaringan kulit tikus sehat tanpa penyinaran memperlihatkan dominan lebih banyak warna biru daripada dengan jaringan kulit tikus yang diinduksi dengan UVB. Densitas kolagen diperlihatkan dengan warna biru.

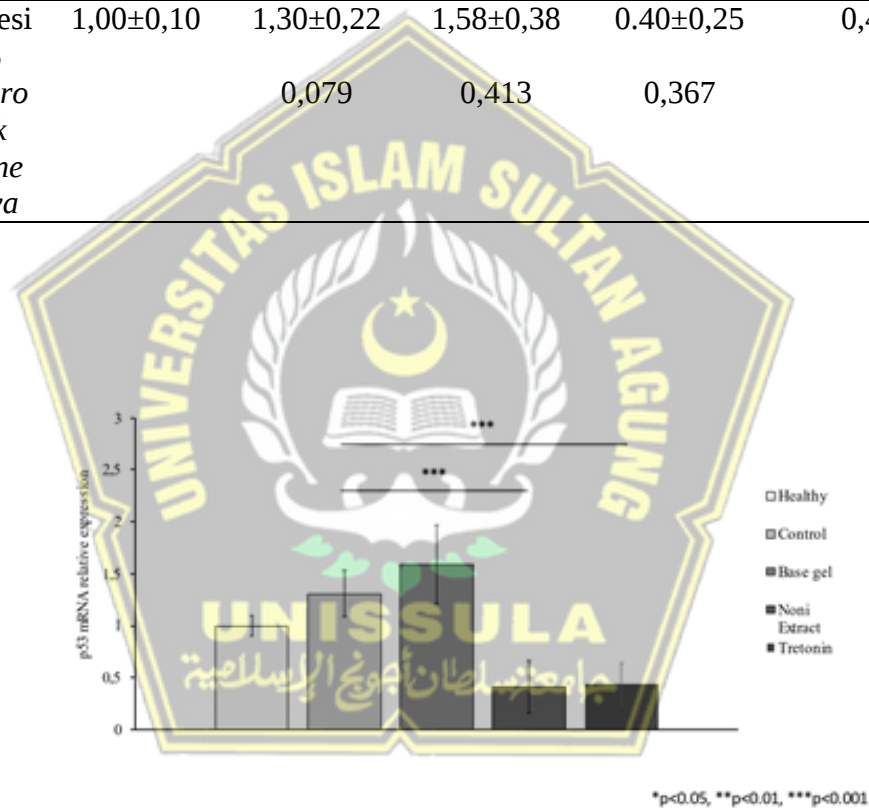
5.1.3 Gel Ekstrak Buah Mengkudu Menurunkan Ekspresi Gen P53 Jaringan Kulit Tikus yang Terpapar UVB

Berdasarkan hasil analisa ekspresi protein p53 pasca perlakuan sesuai kelompok, didapatkan data yang diperlihatkan dalam Tabel

5.2 berikut.

Tabel 5.2 Data Hasil Penelitian Ekspresi p53

	Tikus Sehat	Tikus UVB (kontrol negatif)	Tikus Base Gel	Tikus Ekstrak Mengkudu 10%	Tikus Tretinoin 0,025% (kontrol positif)	P Value
	N = 5	N=5	N = 5	N = 5	N = 5	
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
Ekspresi p53	1,00±0,10	1,30±0,22	1,58±0,38	0,40±0,25	0,43±0,19	
Saphiro Wilk		0,079	0,413	0,367	0,761	
Levene						0,098
Anova						0,000



Gambar 5.2 Grafik representatif ekspresi p53 pada semua kelompok perlakuan (*p<0.05, **p<0.01, *p<0.001)**

Tabel 5.3 Uji Post-Hoc LSD Ekspresi p53

Kelompok	Kelompok perbandingan	Signifikasi
Tikus Sehat	Kontrol Negatif	0.003
	Base Gel	0.009
	Ekstrak Mengkudu	0.003
	Kontrol positif	0.001
Kontrol Negatif	Base Gel	0.611
	Ekstrak Mengkudu	0.000
	Kontrol Positif	0.000
Base Gel	Ekstrak Mengkudu	0.000
	Kontrol Positif	0.000
Ekstrak Mengkudu	Kontrol Positif	0.490

Hasil riset memperlihatkan jika kepada tikus UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% (K4) $0,40 \pm 0,25$, jumlah rerata ekspresi p53 lebih rendah dibandingkan daripada rkelompok tikus yang hanya dipapar UVB (K2) $1,30 \pm 0,22$ serta kelompok tikus yang dipapar UVB dengan hanya diberikan base gel topical (K3) $1,58 \pm 0,38$, namun tidak lebih rendah menurunkan rerata jumlah ekspresi p53 dibandingkan dengan kelompok UVB yang diberikan gold standard tretinoin 0,025% topical (K5) $0,43 \pm 0,19$ dan tikus sehat (K1) $1,0 \pm 0,10$.

Hasil ANOVA memperlihatkan data ekspresi p53 mempunyai nilai $p=0,000$ ($p<0.05$). Hasil diatas menjelaskan bahwa terdapat perbedaan rerata nilai ekspresi protein p53 yang signifikan pada semua kelompok. Hasil uji *post-hoc* LSD menunjukkan ada perbedaan yang

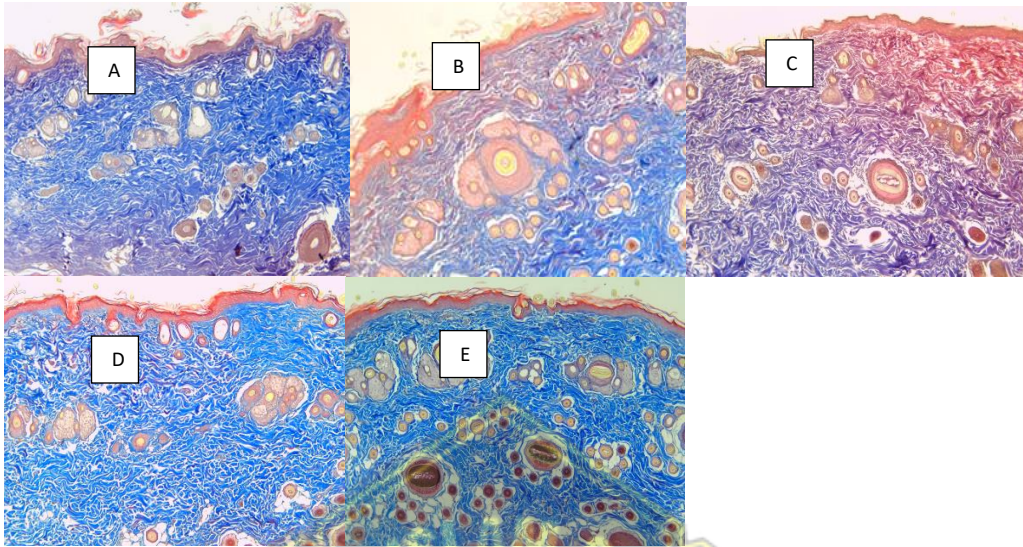
signifikan nilai rerata ekspresi p53 pada tiap-tiap kelompok, kecuali pada kelompok tikus yang hanya dipapar UVB atau kontrol negatif (K2) dengan kelompok tikus dipapar UVB hanya dengan base gel atau placebo (K3) serta kelompok tikus dipapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% (K4) dengan kelompok tikus diberikan tretinoin 0,025% atau control positif (K5) pada tabel 5.3.

5.1.4. Gel Ekstrak Buah Mengkudu Meningkatkan Densitas Kolagen Jaringan Kulit Tikus yang Terpapar UVB

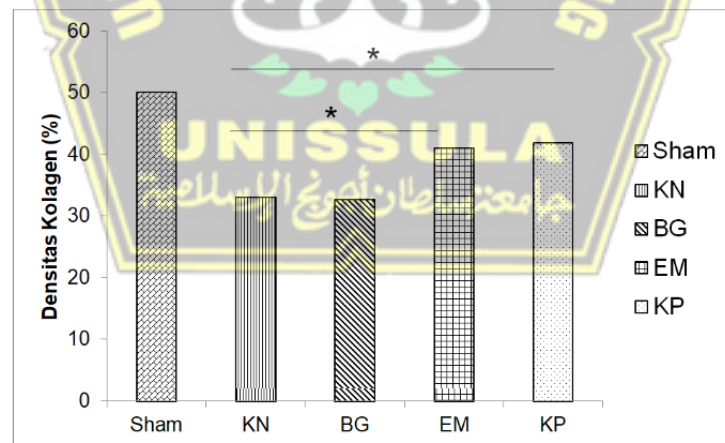
Hasil analisa densitas kolagen pasca perlakuan sesuai kelompok, didapatkan data yang ditunjukkan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Data Hasil Penelitian Densitas Kolagen

	Tikus Sehat N = 5 Mean±SD	Tikus UVB (kontrol negatif) N=5 Mean±SD	Tikus Base Gel N = 5 Mean±SD	Tikus Ekstrak Mengkudu10% N = 5 Mean±SD	Tikus Tretinoin 0,025% (kontrol positif) N = 5 Mean±SD	P Value
Ekspresi Kolagen	54,06±4,96	30,36±2,52	30,79±2,85	43,99±4,99	46,017±5,59	
Saphiro Wilk		0,983	0,632	0,203	0,920	
Levene						0,477
Anova						0,006



Gambar 5.3 Penampang densitas kolagen pada (A) jaringan kulit tikus sehat (B) kontrol negatif tikus yang diinduksi UVB (C) kelompok base gel (D) kelompok Ekstrak mengkudu 10% (E) kontrol positif kelompok tretinoin. Densitas kolagen ditunjukkan dengan warna biru.



Gambar 5.4 Grafik representatif densitas kolagen pada semua kelompok perlakuan (* $p < 0.05$)

Tabel 5.5 Uji Post-Hoc LSD Densitas Kolagen

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikasi
Tikus Sehat	Kontrol Negatif	0.002
	Base Gel	0.002
	Ekstrak Mengkudu	0.124
	Kontrol positif	0.212
Kontrol Negatif	Base Gel	0.944
	Ekstrak Mengkudu	0.043
	Kontrol Positif	0.023
Base Gel	Ekstrak Mengkudu	0.049
	Kontrol Positif	0.026
Ekstrak Mengkudu	Kontrol Positif	0.748

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata densitas kolagen pada kelompok tikus yang terpapar UVB (K2) $30,36 \pm 2,52$ dan pada kelompok tikus yang dipapar UVB dan diberikan base gel (K3) $30,79 \pm 2,85$, mengalami penurunan rerata densitas kolagen dibandingkan kelompok tikus sehat (K1) $54,06 \pm 4,96$.

Rerata densitas kolagen pada kelompok tikus yang dipapar UVB dan diberikan gel ekstrak mengkudu 10% (K4) $43,99 \pm 4,99$, hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan rerata densitas kolagen dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol negatif (K2) atau kelompok tikus plasebo (K3), meskipun hasilnya tidak setinggi rerata kelompok tikus dipapar UVB yang diberikan tretinoin gel 0,025% sebagai kontrol positif (K5) $46,017 \pm 5,59$ dan kelompok tikus sehat (K1).

Hasil uji statistik ANOVA, diperoleh nilai $p=0,006$ ($p<0,05$)

artinya terdapat perbedaan rerata densitas kolagen yang signifikan pada semua kelompok. Hasil uji *post-hoc* LSD menunjukkan terdapat perbedaan rerata densitas kolagen yang signifikan pada tiap-tiap kelompok, kecuali pada kelompok tikus sehat (K1) dengan kelompok tikus dipapar UVB hanya dengan base gel atau plasebo (K3), Kelompok tikus sehat (K1) dengan kelompok tikus dipapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% (K4), kelompok tikus yang hanya dipapar UVB atau kontrol negatif (K2) dengan kelompok tikus dipapar UVB hanya dengan base gel atau plasebo (K3), serta kelompok tikus dipapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% (K4) dengan kelompok tikus diberikan tretinoin 0,025% atau kontrol positif (K5). ditunjukkan pada tabel 5.5.

5.2 Pembahasan

Paparan radiasi sinar UVB memicu pembentukan ROS, yang menyebabkan stress oksidatif, memicu kerusakan sel, inflamasi, apoptosis dan proses penuaan.³⁸ Riset berikut memiliki tujuan yaitu agar dapat melihat efek pemberian ekstrak buah mengkudu secara topikal guna mencegah kerusakan kolagen pada kulit tikus jantan wistar yang di beri paparan sinar UVB, dengan melihat ekspresi p53 dan melihat densitas kolagen pada kulit.

Ekstrak buah mengkudu 10% mengandung banyak senyawa yang bersifat antioksidan. Antioksidan ini dapat menangkap ataupun

menetralkan radikal bebas maka reaksi–reaksi lanjutan yang dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif bisa berhenti serta induksi kerusakan sel bisa dihentikan juga.³⁴

Sang dkk. (2001) menyebutkan kandungan fitokimia ekstrak buah mengkudu yang diduga berperan sebagai antioksidan adalah flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan buah mengkudu kaya flavonoid seperti rutin dan quercetin.³³ Hal ini sesuai dengan uji screening kualitatif fitokimia pada penelitian ini.

Struktur quercetin dan rutin (quercetin-3-O-rutinosida) memperlihatkan fungsi penting disaat menetapkan potensi antioksidan flavonoid. Cincin B yang terdihidroksilasi memiliki fungsi paling penting dalam menyumbangkan hidrogen (elektron) agar dapat menyeimbangkan senyawa radikal. Gugus 2,3-tak jenuh yang terkonjugasi pada 4-oxo pada cincin C, dapat mengikat ion logam transisi (Fe dan Cu).³⁷ Senyawa fitokimia tersebut dapat memberikan elektron (hidrogen) pada radikal bebas guna menangkal kerusakan yang potensial.⁶⁰

Hasil Penelitian ini menunjukkan pada kelompok UVB dan pada kelompok base gel, terjadi peningkatan ekspresi p53 dibandingkan pada kelompok sehat. Kelompok ekstrak mengkudu, menunjukkan adanya penurunan ekspresi p53 dibandingkan dengan kelompok UVB (kontrol negatif) dan kelompok base gel. Rerata ekspresi p53 tertinggi pada kelompok base gel (1,54 +0,38) diikuti dengan kelompok kontrol negatif (UVB) ,

kelompok kontrol positif (tretinoin) dan terendah pada kelompok ekstrak mengkudu. Pada level molekuler, UVB dapat menginduksi intraseluler *reactive oxygen species* (ROS).^{61,62} Mengaktifkan signalling sel dan menstimulasi factor transkripsi seperti faktor nuclear kappa B (NF-kB), activator protein-1 (AP-1) dan p53.⁶³⁻⁶⁶ Faktor transkripsi ini memegang peranan penting dalam foto karsinogenesis dan fotoaging.^{63,64} Induksi dan regulasi protein p53 menyebabkan penghentian siklus sel, perbaikan kembali kerusakan DNA serta apoptosis.⁷ Hasil pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa paparan UVB, berpotensi merusak DNA, juga dapat menginduksi terbentuknya ROS pada sel, terbukti dengan mengaktivasi berbagai mediator upstream untuk transkripsi protein p53.⁵ Sebuah studi dari wang et al., quercetine dapat menghambat apoptosis dengan menurunkan regulasi ekspresi p53, Bax, dan caspase-3 di ARPE-19 cells, yang akan mencegah kerusakan DNA.⁶⁸ Studi dari Darband et al juga menunjukkan bahwa quercetine dapat menghambat kerusakan oxidative DNA dengan mengaktifkan jalur signaling Nrf2.⁶⁹ Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini.

Ekspresi p53 kelompok ekstrak mengkudu, menunjukkan tidak ada beda bermakna dengan kelompok kontrol positif (tretinoin). Studi terdahulu menyatakan topikal tretinoin terapi menginduksi pengurangan ekspresi p53 yang signifikan. Perubahan ekspresi p53 pada pemberian tretinoin ini mungkin sebagai efek dari pemberian terapi di epidermis, yang mencegah

terjadinya kanker dengan menyeimbangkan gangguan dari fotoaging pada kulit.⁷⁰

Dari data hasil penelitian didapatkan peningkatan densitas kolagen pada tikus terpapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10%, dibandingkan dengan kelompok tikus yang dipapar UVB (kontrol negatif) dan tikus yang dipapar UVB dengan di oles base gel. Dengan selisih perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), hasil tersebut memperlihatkan jika terdapat pengaruh pemberian ekstrak gel buah mengkudu 10% terhadap densitas kolagen. Kelompok kontrol negatif dan kelompok placebo (dipapar UVB dan diberikan base gel saja), berarti mengalami kerusakan atau pengurangan kolagen yang lebih besar. Paparan sinar UVB dengan intensitas tinggi menyebabkan fotoaging, secara klinis menyebabkan kerutan, kekenduran, kulit kasar, warna kulit tidak merata. Kulit yang mengalami penuaan dini akan menunjukkan perubahan secara histologis di beberapa komponen matriks intra serta ekstra seluler, seperti terjadinya akumulasi serabut elastin yang tidak teratur, serta berkurangnya atau hilangnya serabut kolagen.³⁸

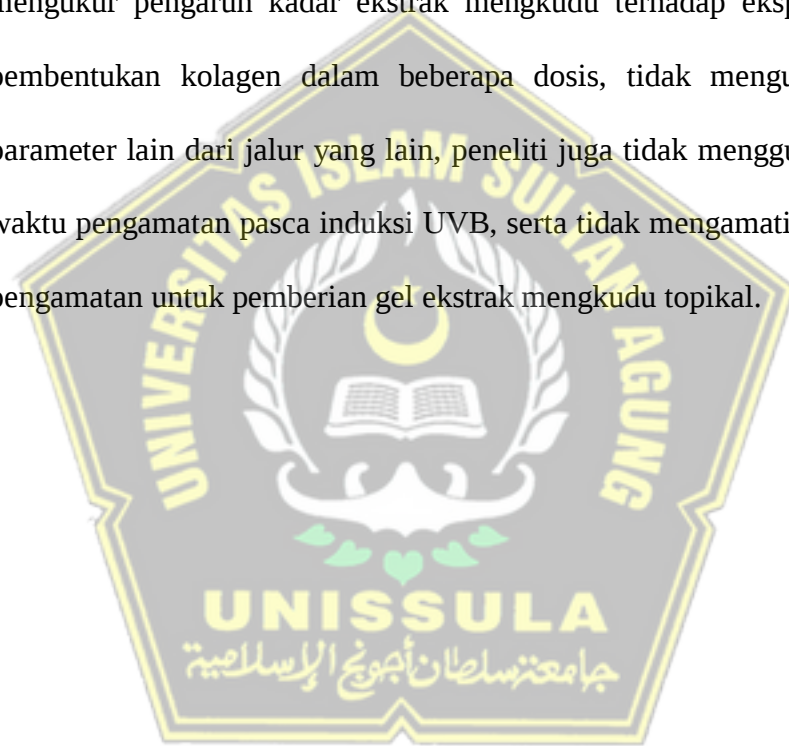
Radiasi Ultraviolet (UV) dari sinar matahari adalah kondisi mayor yang menyebabkan kanker kulit. Penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa exposure kulit terhadap UVB dapat menyebabkan banyak efek pada kulit termasuk inflamasi, imunosupresi,⁷¹ penuaan kulit secara prematur dan perkembangan sel kanker.^{72,73} Paparan UVB tersebut menyebabkan

peningkatan ROS, ROS yang terbentuk akibat stress oksidatif akan mengaktivasi dua regulator utama pembentuk kolagen, yaitu *transforming growth factor* (TGF- β) dan *activator protein* (AP-1). TGF- β adalah sitokin yang dapat menstimulus produksi kolagen, jika AP-1 adaah faktor transkripsi yang dapat mengganggu proses produksi kolagen dan menstimulus pemecahan kolagen. ROS dan AP-1 mempunyai peran penting pula dalam menghambat sintesis kolagen yaitu dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- β . Kemudian TGF- β akan mengirimkan signal transduksi intraseluler dan menginduksi MMP-1 akibatnya terjadilah peningkatan degradasi kolagen dan penurunan jumlah kolagen (deposisi kolagen) yang memperkuat struktur lapisan dermis.^{25,26} Senyawa yang terkandung dalam buah mengkudu, seperti quercetine, adalah flavonoid yang bersifat antioksidan. Senyawa ini merupakan agen fotoprotektif yang dapat berperan sebagai mediator anti inflamasi serta dapat menghambat produksi ROS paparan sinar UVB maka bisa menghambat rusaknya DNA ataupun degradasi kolagen di jaringan kulit.^{37,60} Hasil riset memperlihatkan jika pemberian gel ekstrak buah mengkudu 10% dapat meningkatkan densitas kolagen secara signifikan pada tikus yang dipapar sinar UVB dibanding kontrol ($p < 0.05$).

Berdasarkan keseluruhan, hasil riset beriku memperlihatkan jika gel ekstrak buah mengkudu mampu berfungsi dalam menurunkan ekspresi

p53, meningkatkan densitas kolagen, pada model tikus yang diinduksi sinar UVB. Peristiwa berikut memperlihatkan jika ekstrak buah mengkudu mempunyai potensi agar dapat ditumbuhkan sebagai terapi alternatif tertarget pada kulit yang terpapar UVB.

Riset kami berikut memiliki keterbatasan, dimana peneliti tidak mengukur pengaruh kadar ekstrak mengkudu terhadap ekspresi p53 dan pembentukan kolagen dalam beberapa dosis, tidak menguji parameter-parameter lain dari jalur yang lain, peneliti juga tidak menggunakan variasi waktu pengamatan pasca induksi UVB, serta tidak mengamati variasi waktu pengamatan untuk pemberian gel ekstrak mengkudu topikal.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil pemaparan diatas yaitu :

1. Gel ekstrak buah mengkudu berpengaruh terhadap ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus yang terpapar sinar UVB.
2. Gel ekstrak buah mengkudu dapat menurunkan ekspresi p53 pada tikus yang terpapar UVB.
3. Gel ekstrak buah mengkudu dapat meningkatkan densitas kolagen pada tikus yang terpapar UVB.
4. Terdapat perbedaan ekspresi p53 dan densitas kolagen yang signifikan pada tikus terpapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% dengan tikus terpapar UVB tanpa perlakuan.
5. Terdapat perbedaan ekspresi p53 dan densitas kolagen yang signifikan pada tikus terpapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% dengan tikus terpapar UVB yang diberikan plasebo.
6. Tidak ada perbedaan yang signifikan ekspresi p53 dan densitas kolagen pada tikus terpapar UVB yang diberikan gel ekstrak buah mengkudu 10% dengan tikus terpapar UVB yang diberikan gel tretinoin 0,025%.

6.2. Saran

Saran untuk penelitian berikut yaitu :

1. Melakukan uji pengaruh gel ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan pembentukan kolagen dalam beberapa dosis.
2. Melakukan uji pengaruh kadar ekstrak buah mengkudu terhadap ekspresi p53 dan pembentukan kolagen dalam dengan variasi waktu induksi UVB.



DAFTAR PUSTAKA

1. Rahmania NA. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor Terhadap Ketebalan Kornea Sentral Mencit Yang Diinduksi Sinar Ultraviolet-C; 2018.
2. Pratiwi S, Husni P. Artikel tinjauan: potensi penggunaan fitokonstituen tanaman Indonesia sebagai bahan aktif tabir surya. *J Farmaka*; 2017; 15(4):18–25.
3. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*; 2006; 55(1):1–19.
4. Cahyono WE. Dampak peningkatan radiasi ultraviolet b. Peneliti Bidang Pengkajian Ozon Dan Polusi Udara, LAPAN; 2005;7(1):22–6.
5. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. *Loose-leaf Version for Molecular Cell Biology*. Macmillan Higher Education; 2016.
6. Baumann LS, Baumann L. *Cosmetic dermatology*. McGraw-Hill Professional Publishing; 2009.
7. Brown, C.J. *et al.* ‘Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway’, *Nature Reviews Cancer*. 2009; 862–873. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2763>.
8. Nurindo F, Indra MR, Lyrawati D. Ekstrak Metanol Daun Kelor Mempengaruhi Ekspresi p53 Mukosa Kolon Tikus yang Diinduksi DMBA Methanol Extract Moringa oleifera Leaves Affects p53 Expression in Rattus novergicus Colon Mucosa Induced by DMBA. *Jurnal kedokteran Brawijaya*. 27(4):207–11.
9. Sitorus P, Suharyanisa S, Chandra D, Nurbaya S, Sitanggang B. Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Serta Analisis Flavonoid Dari Buah Mengkudu (*Morindacitrifolia* L) secara kromatografi lapis tipis. *Jurnal Farmanesia*. 2021;8(2):109–13.
10. Eka Junita, Sri Luliana, Liza Pratiwi, Penentuan Nilai Spf Dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) Secara In Vitro Junita E *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN* (2019) 4(1)
11. Bosch R, Philips N, González S, Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals Antioxidants. 2015; 4(2): 248-268
12. DeBuys H, Levy S, Pinnell S, Modern Approaches To Photoprotection *Dermatologic Clinics*. 2000; 18(4): 577-59
13. Siregar M, Rahmy H, Kecukupan Konsumsi Buah Dan Sayur Pada Remaja Pada Masa pandemic Covid-19 Berdasarkan Faktor Demografi. *Hearty: Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 2022; 1(2):89-97

14. Sofiana R, Wiraguna A, Pangkahila W, Krim ekstrak etanol biji mengkudu (*Morinda citrifolia*) sama efektifnya dengan krim hidrokuinon dalam mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut (*Cavia porcellus*) yang dipapar sinar ultraviolet B, *eBiomedik* 2017; 5(1)
15. Rohman A, Riyanto S, Hidayati N, Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total Dan Flavonoid Total daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L. 2007
16. Rosita C, Prakoeswa S. Peran p53 pada Patogenesis Karsinoma Sel Basal (The Role of p53 in the Pathogenesis of Basal Cell Carcinoma). *Journal.unair.ac.id*. 2008;20(3):261–5.
17. Yusuf H Y. Peran Gen P53 Dan Regulasi Apoptosis Pada Perkembangan Kanker, khususnya Karsinoma Kepala dan Leher. Vol. 6, *Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 1999. p. 44–9.
18. Maskoen A, Hernowo B, Peran ekstrak etanol topikal daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada penyembuhan luka ditinjau dari imunoekspresi CD34 dan kolagen pada tikus galur wistar *Majalah Kedokteran Bandung* (2013) 45(4) 226-233 *Indonesia*. 1999;6(3):44-49
19. *Morinda citrifolia* Linn.(Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB-induced erythema, West B, Deng S, Jensen C, *Journal of natural medicines*. 2009; 63:351-354
20. Kadler K E, Baldock C, Bella J, Boot – Handford RP. Collagens at a glance *J Cell*. 2007. Sci 120 : 1995 – 1958
21. Gartner, Hiatt, *Color Textbook of Histology*, 3rd. ed. Elsevier. 2007.
22. Ahmad, Z. & Damayanti. Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berk. Ilmu Kesehat. Kulit dan Kelamin – Period. Dermatology Venereol*. 2018;30:208–215
23. Rabe, J.H., Mamelak, A.J., Mc elgunn, P., Morison, W.L, Saunder, D.N. Photoaging : Mechanism and Repair, Continuing Medical Education, America Academy of Dermatology, Inc. 2006;1-19
24. Chung, J.H., Cho, S., and Kang, S. Why Does Skin Age? Intrinsic Aging Photoaging and Their Pathophysiology. In : Rigel, D.S., Weiss, R. A., Lim, HW., Dover, J.S.editors. Photoaging. New York: Marcel Dekker Inc. 2004;1-23
25. Fisher, G.J, Voorhees, J.J, Kang, S., Quan, T., He, T. Solar U V Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor – β Type Receptor/Smad Signaling. *American Journal of Pathology*. 2004;165(3):741 – 758
26. Wasliati, B., Pangkahila, W. & Wiraguna, A. A. G. P. Krim Ekstrak Bawang Hitam (*Allium sativum* Linn) Mencegah Peningkatan Ekspresi MMP-1 dan Penurunan Jumlah Kolagen Dermis Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan yang Dipapar Sinar UV-B. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2019; 27846: 487–490.

27. Hermawan, A. D. W. I. *et al.* Penggunaan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Secara Rendaman Terhadap Ikan patin (*Pangasius sp.*) Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *respiratory.ump.ac.id*, 2011.
28. Tajoeidin, T. H. & Iswanto, H. *Mengebunkan Mengkudu secara Intensif*. AgroMedia Pustaka. 2002.
29. Denni, Marlina Karmelia, Triawan Al Kausar. Formulasi dan Uji Efektifitas Gel Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*) dan Lidah Buaya (*Aloe Vera L.*) Terhadap Luka Bakar Pada Mencit (*Mus Musculus*). *Respiratory.radenintan.ac.id*. 2023.
30. Rahmayani, I. P., Maskoen, A. M. & Hernowo, B. S. Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar. *Maj. Kedokt. Bandung*. 2013;45 :226–233.
31. Soo-Cheol Choi, Young Han Youn. Anti-Wrinkling Effect of Noni (*Morinda citrifolia*) by Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties Journal of People Plants Environment. 2020;23(2):191-199
32. Sari, A. N. Antioksidan alternatif untuk menangkal bahaya radikal bebas pada kulit. *J. Islam. Sci. Technol.* 2015;1:63–68.
33. Sang S, Cheng X, Zhu N, Stark RE, Badmaev V, Ghai G, Rosen R, Ho CT. Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4478-4481
34. F . Gouma et al., “Healing effects of quercetin on full thickness epidermal thermal injury in Wistar rats,” *Int. J. Phytomedicine*, 2016;8(2):277–281.
35. Apsari, K. J. T. Pengaruh Pemberian Krim Ekstrak Etanol Kubis Ungu (*Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra*) Terhadap Jumlah Kolagen Dermis Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Dipapar Sinar Ultraviolet B. in *sinta.unud.ac.id*, 2018.
36. Afriani, M. Hubungan Analisa DOBI (Deteration Of Bleability Index) Dan β -Karoten Dalam CPO (Crude Palm Oil) Dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-Visible. *respiratory.usu.ac.id*, 2009.
37. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 335:166-180
38. Federer, W. *Statistics and Society : Data Collection and Interpretation* 2nd Edition. New York : Merckell dekker. 2008.
39. Nurlaylilatifah, T. Teori Ultraviolet. www.Academia.Edu. 2019.
40. Sumbayak, E. M. Fibroblas : Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. *J. Kedokt. Meditek*21. 2015;1-16
41. Alioes, Y. & Sy, E. Efek Pemberian Vitamin E Terhadap Katalase Tikus Akibat Paparan. 2008.
42. Nafiah, F. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daging Buah Kurma Terhadap Jumlah Sunburn Cell Mencit Terpapar Radiasi Sinar UV. *digilib.inisby.ac.id*. 2018.

43. Isfardiyana, S. H. *et al.* Pentingnya melindungi kulit dari sinar ultraviolet dan cara melindungi kulit dengan sunblock buatan sendiri. *J. Inov. dan Kewirausahaan* 3. 2014;126–133.
43. Pamungkas, A. D. Uji Aktivitas Antioksidan dan Fotoprotektif Fraksi Kloroform Ekstrak Etanolik Kulit Buah Naga Merah. *respiratory.ummy.ac.id*. 2016.
44. Alioes, Y. & Sy, E. Efek Pemberian Vitamin E Terhadap Jumlah Eritrosit Dan Aktivitas Enzim Katalase Tikus Akibat Paparan Sinar Ultraviolet. *jurnalmka.fk.unand.ac.id*. 2015.
45. Simanjuntak, K. Mekanisme Radikal Bebas Terhadap Induksi Karsinogenesis. *Bina Widya*. 2012;3:256–263.
46. Winaya, K. K. Aplikasi Topikal Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana*) Sebagai Kemoprevensi Alamiah Tumor Kulit Pada Mencit Albino Setelah Diinduksi 7,12 Dimethylbenz(a) Anthracene (Dmba) Melalui Ekspresi Malondialdehyde, Bcl-2 Yang Lebih Rendah, Ekspresi Bax. *sinta.unud.ac.id*. 2018.
47. Hanny Setyowati, W. S. Potensi Nanokolagen Limbah Sisik Ikan Sebagai Cosmeceutical. *J. Farm. Sains Dan Komunitas*. 2015;12:30–40.
48. Islami, S. I., Munawir, A. & Astuti, I. S. W. Efek Pemberian Membran Bakiko (Bayam- Kitosan- Kolagen) terhadap Jumlah Fibroblas pada Luka Bakar Derajat II. *Hang tuah Med. J.* 2018;15:93–111.
49. Wasliati, B., Pangkahila, W. & Wiraguna, A. A. G. P. Krim Ekstrak Bawang Hitam (*Allium sativum* Linn) Mencegah Peningkatan Ekspresi MMP-1 dan Penurunan Jumlah Kolagen Dermis Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan yang Dipapar Sinar UV-B. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2019;27846:487–490.
50. CE Griffith 1, Seorang Russman , G Majmudar , TA Hamilton , JJ Voorhees Retinoids: Literature Review and Suggested Algorithm for Use Prior to Facial Resurfacing Procedures N Engl J Med. 1993;329(8):530-5.
51. Kligman LH, Chen HD, Kligman AM. Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue. *Connect Tissue Res*. 1984;12:139
52. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. The molecular basis of sun induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;379:335–8.
53. Kligman DE, Draelos ZD. High-strength tretinoin for rapid retinization of photoaged skin. *Dermatol Surg*. 2004;30:864–6.
54. Baldwin, H.E.; Nighland, M.; Kendall, C.; Mays, D.A.; Grossman, R.; Newburger, J. 40 years of topical tretinoin use in review. *J. Drugs Dermatol*. 2013, 12, 638–642
55. Draelos, Z.D.; Peterson, R.S. A Double-Blind, Comparative Clinical Study of Newly Formulated Retinol Serums vs Tretinoin Cream in Escalating Doses: A Method for Rapid Retinization With Minimized Irritation. *J. Drugs Dermatol*. 2020, 19, 625–631.

56. Griffiths, C.; Finkel, L.; Tkanfaglia, M.; Hamilton, T.; Voorhees, J. An in vivo experimental model for effects of topical retinoic acid in human skin. *Br. J. Dermatol.* 1993, 129, 389–394.
57. Zhu, Shengqian M.D.; Cai, Junrong M.D.; Wang, Jing M.D.; Feng, Jingwei M.D.; Lu, Feng M.D., Ph.D. Protective Effect of Fat-Tissue–Derived Products against Ultraviolet Irradiation–Induced Photoaging in Mouse Skin. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2021;148(6):1290-1299.
58. MA Umborowati, I Citrashanty, IS Surono Beneficial Effect of Amniotic Membrane Stem Cell and Vitamin C after Fractional Carbon-Dioxide Laser for Photoaging Treatment in Asian Skin, *International ieeeexplore.ieee.org*, 2022.
59. B Rachmantyo, DM Indramaya. Peeling Asam Glikolat pada Pasien Photoaging (Retrospective Study: Glycolic Acid Peel in Photoaging Patient)-BIKKK Kesehatan, 2016 e-journal.unair.ac.id
60. Hossain M.S and Shah D.M. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of chemistry.* 2015;8(1):66-71.
61. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, et al. UV- induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189:21–39
62. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002;973:31–43.
63. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.* 2000;16:239–244.
64. Cooper SJ, Bowden GT. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7:325–334.
65. Brash DE. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *British Journal of Dermatology.* 2006;154:8–10.
66. Li D, Turi TG, Schuck A, Freedberg IM, Khitrov G, et al. Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination. *The FASEB Journal.* 2001;15:2533–2535
67. Tao Shi a, Daan M.K. van Soest a, Paulien E. Polderman a, Boudewijn M.T. Burgering a b, Tobias B. Dansen, DNA damage and oxidant stress activate p53 through differential upstream signaling pathways, *Free Radical Biology and Medicine.* 2021;172:298-311
68. Wang X., Li H., Wang H., Shi J. Quercetin attenuates high glucose-induced injury in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 by up-regulation of miR-29b. *J. Biochem.* 2020;167:495–502.
69. Darband S.G., Sadighparvar S., Yousefi B., Kaviani M., Ghaderi-Pakdel F., Mihanfar A., Rahimi Y., Mobaraki K., Majidinia M. Quercetin attenuated

- oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis. *Life Sci.* 2020;253
70. Moetaz M El-Domyati, Sameh K Attia, Fatma Y Saleh, Hesham M Ahmad, Frances P Gasparro, Jouni J Uitto, Effect of topical tretinoin, chemical peeling and dermabrasion on p53 expression in facial skin, *Eur J Dermatol.* 2003;13(5):433-8.
 71. Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, et al. Steroidogenesis in the skin: Implications for local immune functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* In pressed
 72. Thomas-Ahner JM, Wulff BC, Tober KL, Kusewitt DF, Riggensbach JA, et al. Gender Differences in UVB-Induced Skin Carcinogenesis, Inflammation, and DNA Damage. *Cancer Research.* 2007;67:3468–3474.
 73. Skobowiat C, Dowdy JC, Sayre RM, Tuckey RC, Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism.* 2001;301:484–493.

