

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK KULIT BUAH
NAGA SUPER MERAH (*HYLOCEREUS COSTARICENSIS*)
TERHADAP EKSPRESI GEN MMP-1 DAN COL1A1**

**Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Jantan Galur Wistar
dengan Penurunan Kolagen Akibat Paparan UVB**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Rahmadani Ayu Azari

MBK. 2015.01.0184

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2023

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK KULIT BUAH
NAGA SUPER MERAH (*HYLOCEREUS COSTARICENSIS*)
TERHADAP EKSPRESI GEN MMP-1 DAN COL1A1**

**Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Jantan Galur Wistar
dengan Penurunan Kolagen Akibat Paparan UVB**

Disusun oleh :


Rahmadani Ayu Azari

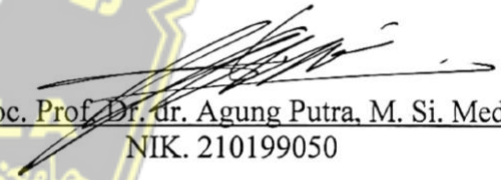
MBK. 2015.01.0184

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,


Pembimbing II,


Prof. Dr. dr. Praseyowati Subchan, Sp.KK(K)
NIDK. 8951110021


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

Mengetahui,

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


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

PERNYATAAN

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

Semarang, September 2023



(Rahmadani Ayu Azari)



ABSTRAK

Latar belakang: Buah naga super merah (*Hylocerus costaricensis*) dikenal memiliki kandungan antosianin yang berperan sebagai antioksidan. Antosianin dapat melindungi kulit dengan perannya sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan fotoprotektif. Mekanisme kerja buah naga super merah ini masih terbatas. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah terhadap ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1.

Metode : Penelitian eksperimental menggunakan *post test randomized control group design*. Dilakukan pada 24 ekor tikus jantan galur wistar yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok sham merupakan kelompok tikus sehat tanpa paparan sinar UVB, kontrol negatif merupakan kelompok yang dipapar sinar UVB dan perlakuan cream base, sedangkan dua kelompok lainnya merupakan kelompok yang dipapar sinar UVB dan mendapat perlakuan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5%(P1) dan 10%(P2). Ekspresi gen MMP-1 dan COLA1A diperiksa menggunakan RT-PCR. Ekspresi MMP-1 dan COL1A1 dianalisis dengan *One Way Anova* dan *Post Hoc* pada tingkat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa krim ekstrak kulit buah naga super merah secara signifikan menurunkan ekspresi gen MMP-1 pada kelompok P1 ($p=0,00$) dan P2 ($0,00$) dibanding kelompok kontrol negatif dengan nilai $p < 0,05$. Peningkatan ekspresi gen COL1A1 secara signifikan meningkat pada kelompok P1 ($p=0,04$) dan P2 ($0,00$) dibanding kelompok kontrol negatif dengan nilai $p < 0,05$.

Kesimpulan : Krim ekstrak kulit buah naga super merah berpengaruh terhadap ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 pada tikus jantan galur wistar dengan penurunan kolagen akibat paparan UVB.

Kata kunci : buah naga super merah, MMP-1, COL1A1

ABSTRACT

Background: *Hylocerus costaricensis* is known to contain anthocyanins which act as antioxidants. Anthocyanins can protect the skin with their role as antioxidants, anti-inflammatory and photoprotective. The working mechanism of this super red dragon fruit is still limited.

Objective: to determine the effect of cream super red dragon fruit skin extract on MMP-1 and COL1A1 gene expression.

Methods: Experimental research using a randomized control group post test design. Performed on 24 male Wistar rats divided into 4 groups. The sham group is a group of healthy rats without exposure to UVB light, the negative control group is the group that is exposed to UVB light and cream base treatment, while the other two groups are groups that are exposed to UVB light and receive cream treatment of super red dragon fruit peel extract dose of 5% (P1) and 10%(P2). MMP-1 and COL1A1 gene expression was examined using RT-PCR. MMP-1 and COL1A1 expressions were analyzed by One Way Anova and Post Hoc at a significance level of $p < 0.05$.

Results: The results showed that super red dragon fruit skin extract cream significantly reduced MMP-1 gene expression in the P1 and P2 groups compared to the negative control group with a $p < 0.05$. The increase in COL1A1 gene expression was significantly increased in the P1 and P2 groups compared to the negative control group with a $p < 0.05$.

Conclusion: Cream of super red dragon fruit skin extract affects the expression of MMP-1 and COL1A1 genes in male Wistar rats with decreased collagen due to UVB exposure.

Keywords: super red dragon fruit, MMP-1, COL1A1

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Rahmadani Ayu Azari
Tempat, tanggal lahir : Klaten, 21 Maret 1991
Agama : Islam
Jenis kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Kartini Slawi : Lulus tahun 1997
2. SDN 4 Slawi Kulon : 1997-2003
3. SMPN 1 Slawi : 2003-2006
4. SMAN 1 Slawi : 2006-2009
5. S1 Fakultas Kedokteran Unissula Semarang : 2009-2013
6. Profesi Dokter Unissula Semarang : 2013-2015
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula Semarang : 2020-sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H. Darmadi, SH, MM
Ibu : Hj. dr. Titiiek Sumarni
2. Nama Saudara : dr. Brantas Pra Azari, Sp.B
dr. Gesa Tidar Azari, Sp.An
3. Nama Suami : dr. Reza Dian Pratama, M.Biomed
4. Nama Anak : Muhammad Rasya Athaya
Rayhan Kautsar

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga proposal tesis dengan judul, “Pengaruh Pemberian Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah (*Hylocereus Costaricensis*) Terhadap Ekspresi Gen MMP-1 Dan COL1A1 (Studi Eksperimental In Vivo Pada Tikus Jantan Galur Wistar Dengan Penurunan Kolagen Akibat Paparan UVB)” ini dapat diselesaikan. Proposal tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister bidang Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada :

1. Prof. Dr. Gunarto, S.H., M. Hum. selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si. Med. selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K) selaku dosen pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
5. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si. Med. selaku dosen pembimbing II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.

6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes.; Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF; Dr. Dra. Atina Hussana, M.Si,Apt. selaku dosen penguji I, II, dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.
7. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
8. Orang tua tercinta, H. Darmadi dan Hj.dr. Titiek Sumarni yang selalu memberikan dukungan dan semangat, sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.
9. Suami tercinta dr. Reza Dian Pratama,M.Biomed yang memberikan dukungan. Serta anak kami Muhammad Rasya Athaya dan Rayhan Kautsar yang membantu saya berjuang dan selalu memberikan semangat.
10. Seluruh teman-teman pengajar FK Unissula yang selalu menyemangati dan memberikan masukan.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terima kasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, Januari 2023

Rahmadani Ayu Azari

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	6
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.5.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Kolagen.....	7

2.2. MMP-1	8
2.3. <i>Photodamage</i>	10
2.4 Buah Naga Super Merah	12
2.5. Hubungan Antosianin dan <i>Photodamage</i>	14
BAB III KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	16
3.1. Kerangka Teori.....	16
3.2. Kerangka Konsep.....	18
3.3. Hipotesis Penelitian.....	19
BAB IV METODE PENELITIAN.....	20
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	20
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	20
4.2.1. Populasi/Subjek Penelitian.....	20
4.2.2. Sampel Penelitian.....	21
4.2.3 Tehnik Sampling	22
4.3 Variabel dan Definisi Operasional	22
4.3.1. Variabel.....	22
4.3.1.1 Variabel Bebas	22
4.3.1.2 Variabel Antara	22
4.3.1.3 Variabel Terikat	23
4.3.2. Definisi Operasional Variabel.....	23
4.3.2.1 Dosis krim ekstrak kulit buah naga super merah.....	23
4.3.2.2 Ekspresi gen MMP-1 (Matriks Metalloproteinase-1)	23
4.3.2.3 Ekspresi gen COL1A1	23

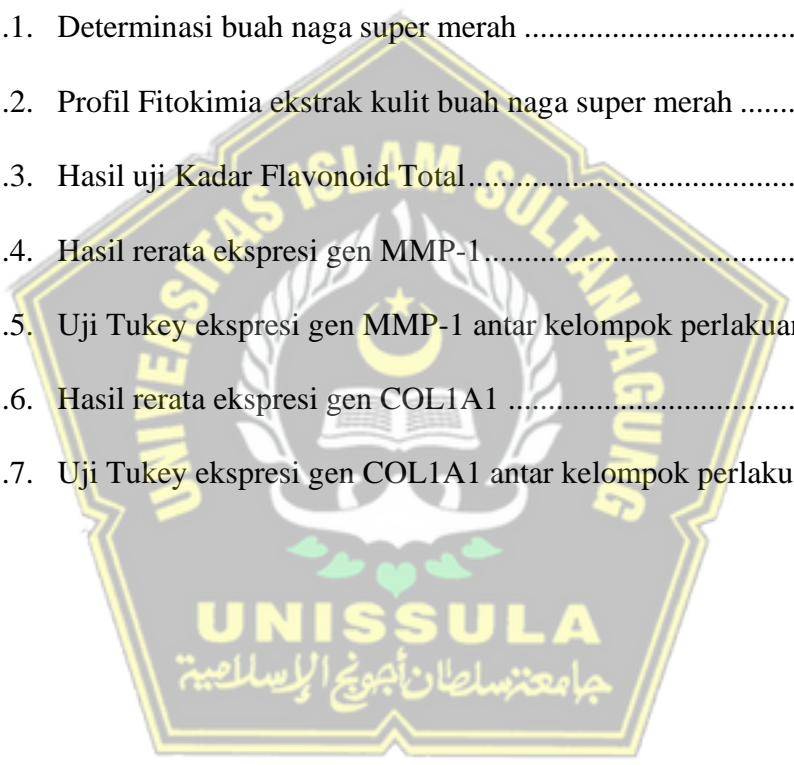
4.4. Bahan Penelitian	24
4.5 Peralatan Penelitian.....	24
4.5.1. Alat untuk membuat ekstrak kulit buah naga super merah.....	24
4.5.2. Alat untuk pemeliharaan tikus.....	24
4.5.3 Alat untuk pembuatan preparate	24
4.5.4. Alat untuk pemeriksaan histologi.....	25
4.6. Cara Penelitian	25
4.6.1. Perolehan <i>Ethical Clearence</i>	25
4.6.2. Persiapan Sebelum Perlakuan	25
4.6.2 Pembuatan Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah	26
4.6.3 Penetapan Dosis Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah	28
4.6.4 Cara Pemberian Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah dan Paparan sinar UVB	28
4.6.5 Terminasi Tikus.....	29
4.6.6 Pembuatan Blok Parafin.....	29
4.6.7 Ekstraksi mRNA	30
4.6.8 Analisis Ekspresi PCR	31
4.6.9 Pewarnaan <i>Masson Trichome</i>	32
4.6.10 Pengamatan Hasil.....	32
4.7. Analisis Data	33
4.8. Alur Penelitian	34
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
5.1. Hasil Penelitian	35
5.1.1 Determinasi dan Ekstraksi Buah Naga Super Merah .	35

5.1.2. Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total	36
5.1.3 Uji validasi penurunan kolagen.....	38
5.1.4 Ekspresi gen MMP-1 pada tikus wistar yang diradiasi penyinaran UVB setelah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah	38
5.1.5 Ekspresi gen COL1A1 pada tikus wistar yang diradiasi penyinaran UVB setelah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah	41
5.2. Pembahasan.....	43
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	45
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
6.1. Kesimpulan	46
6.2. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	53



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas penelitian	5
Tabel 2.1. Kandungan nilai gizi dalam 100 g buah naga merah	13
Tabel 4.1. Formula dasar krim	27
Tabel 4.2. Formula krim yang dibuat	28
Tabel 5.1. Determinasi buah naga super merah	36
Tabel 5.2. Profil Fitokimia ekstrak kulit buah naga super merah	37
Tabel 5.3. Hasil uji Kadar Flavonoid Total.....	37
Tabel 5.4. Hasil rerata ekspresi gen MMP-1.....	39
Tabel 5.5. Uji Tukey ekspresi gen MMP-1 antar kelompok perlakuan	39
Tabel 5.6. Hasil rerata ekspresi gen COL1A1	41
Tabel 5.7. Uji Tukey ekspresi gen COL1A1 antar kelompok perlakuan	42

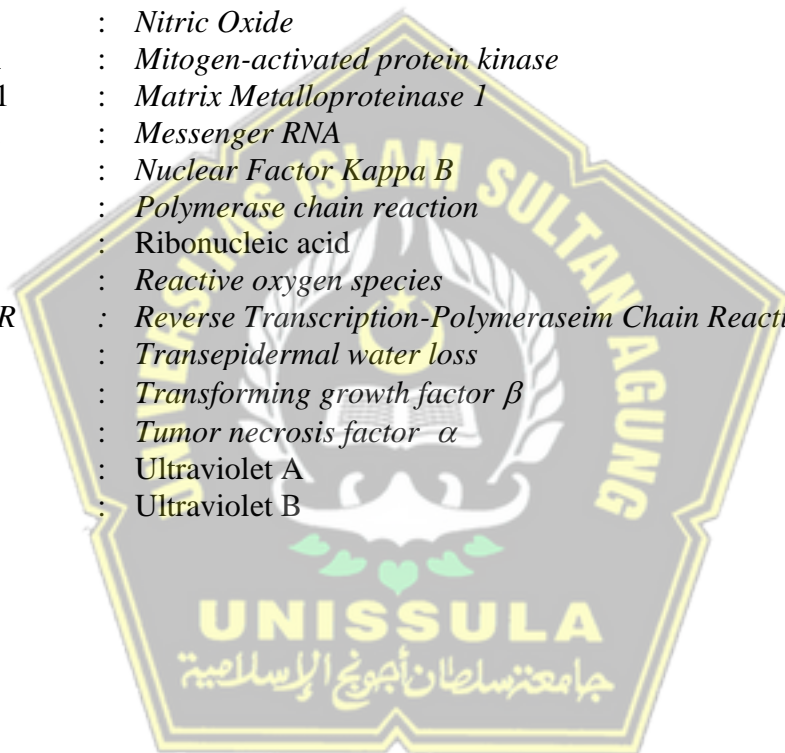


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	a) Kolagen kulit normal b) Kolagen pada kulit yang mengalami <i>photoaging</i>	8
Gambar 2.2.	Peran MMP dalam <i>photoaging</i>	9
Gambar 2.3.	Mekanisme <i>photodamage</i>	11
Gambar 2.4.	Buah naga daging super merah (<i>Hylocereus costaricensis</i>)....	12
Gambar 2.5.	Aktivasi jalur Nrf2-Keap1 oleh antosianin	15
Gambar 3.1.	Kerangka teori	18
Gambar 3.2.	Kerangka konsep	18
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian	20
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	34
Gambar 5.1.	Uji validasi penurunan kolagen dengan pengecatan Masson Trichome. Gambar (a) menunjukkan kulit tikus dengan penurunan kolagen, gambar (b) kulit tikus tanpa penyinaran. .	38
Gambar 5.2.	Ekspresi gen MMP-1 pada kelompok; Sham : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol negatif : subyek induksi penyinaran UVB tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% , P2 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 10%.	40

DAFTAR SINGKATAN

COL1A1	: <i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
cDNA	: <i>Complementary DNA</i>
DEPC	: <i>Diethyl pyrocarbonat</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
JNK	: <i>c-Jun-terminal kinase</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMP-1	: <i>Matrix Metalloproteinase 1</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription-Polymeraseim Chain Reaction</i>
TEWL	: <i>Transepidermal water loss</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor α</i>
UVA	: <i>Ultraviolet A</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Photodamage adalah perubahan pada kulit yang terjadi setelah lama terpapar radiasi matahari yang menyebabkan kerusakan molekuler dan seluler dengan hasil perubahan histopatologis dan degenerative klinis¹. Paparan sinar UVB yang berlebihan mengakibatkan perubahan reaksi biokimia pada kulit karena meningkatkan kadar ROS². MMP-1 disekresikan sebagai respon adanya peningkatan ROS, mendegradasi kolagen yang ada di kulit³. Penurunan kadar kolagen dan elastin terganggu karena penurunan sintesis protein kolagen tipe I dan III di dermis dan peningkatan pemecahan protein matriks ekstraseluler⁴. Kerusakan kolagen dan elastin lebih parah pada photoaging dibandingkan dengan kulit yang menua secara kronologis⁵. Perubahan yang terjadi akibat paparan sinar matahari dapat dicegah dengan pemberian nutrisi dari dalam maupun luar. Salah satu bahan yang memiliki kandungan antioksidan tinggi yaitu buah naga super merah. Potensi antioksidan yang dimiliki buah naga merah mampu meredakan inflamasi akibat peningkatan ROS.

Photodamage menyebabkan 90% masalah kosmetik terkait usia. Penelitian di Australia yang dilakukan pada 1539 penduduk Queensland berusia 20 hingga 55 tahun, menunjukkan perubahan tekstur kulit derajat sedang hingga berat akibat *photodamage* yaitu 72% pada pria dan 47% pada wanita dibawah usia 30 tahun⁶. Insiden *photodamage* pada populasi Eropa

dan Amerika Utara dengan tipe kulit Fitzpatrick I, II, dan III sekitar 80-90%, sedangkan pada kulit Asia tingkat keparahannya tidak separah kulit putih pada usia yang sama⁶. Penampilan menjadi perhatian penting beberapa dekade terakhir, dengan penuaan kulit wajah menjadi komponen penting.

Buah naga merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah beriklim tropis. Kulit buah naga super merah kaya akan polifenol. Senyawa polifenol yang terdapat pada kulit buah naga super merah adalah antosianin. Salah satu strategi menangani dampak photoaging yaitu penggunaan agen topikal yang bertujuan memberikan terapi langsung pada bagian yang terdampak langsung photoaging. Pemberian topikal krim antioksidan untuk mengatasi dampak dari *photodamage* semakin banyak diteliti. Pemilihan krim karena pengaplikasiannya mudah menyebar dan mudah dibersihkan, serta tidak mempengaruhi kadar antosianin.

Penggunaan retinoid topikal merupakan terapi gold standart pada kasus photoaging⁷. Namun, penggunaan retinoid topikal dapat menimbulkan beberapa efek samping seperti iritasi kulit dan memiliki efek teratogenik apabila digunakan pada ibu hamil⁸. Salah satu alternatif untuk memperbaiki photoaging yakni dengan antioksidan yang dikenal memiliki kemampuan dalam memperbaiki kerusakan akibat photoaging yaitu Antosianin. Antosianin memiliki berbagai aktivitas biologis termasuk kapasitas antioksidan, anti-inflamasi, dan anti mikroba⁹. Selain itu, antosianin yang diekstraksi dari tumbuhan alami seperti kedelai hitam, anggur, dan beri telah terbukti memiliki efek penundaan penuaan organisme⁹. Antosianin mampu

memodulasi keseimbangan antara oksidan dan antioksidan, melawan penghambatan biosintesis kolagen dengan mereduksi peroksidase lipid¹⁰. Antosianin memiliki efek terhadap Nrf2 dimana sebagai pengatur utama antioksidan endogen. Aktivasi jalur MAPK melalui reseptor tirosin kinase mengaktifasi ekspresi c-Jun dan c-Fos akan membentuk AP-1 yang berperan penting dalam regulasi transkripsi MMP-1. Selain itu AP-1 juga berperan dalam menghambat sinyal TGF-beta yang merupakan regulator mayor produksi prokolagen tipe 1 kulit. Terganggunya jalur TGF-beta mengarahkan pada penurunan sintesis kolagen.

Pemberian ekstrak blueberry yang diperkaya antosianin secara oral memperbaiki kondisi kulit melalui mekanisme regulasi sitokin inflamasi dan regulasi MAPK¹¹. Kandungan antosianin yang terdapat dalam ubi jalar ungu dapat memperbaiki kerusakan akibat *photodamage*¹². Fitokimia seperti polifenol merupakan antioksidan yang baik dan merupakan agen antiphotaging¹³. Pemberian krim ekstrak buah naga super merah hanya membuktikan dapat meningkatkan kelembaban pada kulit tikus wistar yang dipapar UVB belum sampai pada pengaruh terhadap ekspresi MMP-1 dan kolagen. Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini akan menguji krim ekstrak buah naga super merah yang diharapkan dapat memperbaiki *photodamage* pada tikus yang diinduksi UVB.

1.2. Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis*) terhadap ekspresi gen MMP-1 dan ekspresi gen COL1A1 pada kulit tikus jantan galur wistar yang dipapar sinar UVB ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah terhadap ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 pada tikus jantan galur wistar yang dipapar sinar UVB

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah secara topical dosis 5% dan 10% terhadap ekspresi gen MMP-1 pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB dibandingkan dengan kontrol.
2. Untuk membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah secara topical dosis 5% dan 10% terhadap ekspresi gen COL1A1 pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas penelitian

Peneliti	Judul penelitian	Metode Penelitian	Hasil
Devi Huaveni (2019)	Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Super Merah (<i>Hylocereus costaricensis</i>) Sebagai Anti Oksidan Dengan Menggunakan Metode (DPPH)	Randomized post test control group design <i>in vitro</i>	Ekstrak etanol kulit buah naga super merah memiliki kandungan senyawa antosianin yaitu sianidin yang berpotensi sangat kuat sebagai antioksidan. Melalui metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah naga super merah memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC50 sebesar 58,35 ppm.
Qi zhi, dkk (2019)	The anthocyanin extracts from purple-fleshed sweet potato exhibited anti-photoaging effects on ultraviolet B-irradiated BALB/c-nu mouse skin	Randomized post test control group design <i>in vivo</i>	Kulit ubi ungu manis memiliki potensi melemahkan stress oksidatif dan menghambat respon sitokin pro inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . Menurunkan ekspresi MMP-1 pada tikus yang diberi terapi ekstrak tersebut.
Ahmed A.H Abdellatif, dkk (2020)	Anthocyanin Rich pomegranate cream as topical formulation with anti-aging activity	Randomized post test control group design <i>in vivo</i>	The formulated cream was non-irritant, homogenous, and potentially reduced skin aging when apply in human volunteers skin
I Putu Dema Prasetya (2019)	Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah (<i>Hylocereus costaricensis</i>) Meningkatkan Kelembapan Kulit Tikus Wistar Yang Dipapar Sinar Ultraviolet-B	Randomized post test control group design <i>in vivo</i>	Terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah 5% dan 10% terhadap kelembapan kulit tikus wistar yang dipapar UVB
Kyungae Jo, dkk (2020)	An Anthocyanin-Enriched Extract from <i>Vaccinium uliginosum</i> Improves Signs of Skin Aging in UVB-Induced Photodamage	Randomized post test control group design <i>in vivo</i>	the extracts from <i>V. uliginosum</i> containing a high level of anthocyanins showed a photoprotective effect against UVB-induced skin damage in a hairless mouse model by inhibition of MMP expression and pro-inflammatory cytokines through increased antioxidant enzyme gene expression and reduced phospho-MAPK levels.

Peneliti akan melakukan penelitian dengan menggunakan krim ekstrak buah naga super merah pada tikus yang dipapar UVB. Qi zhi dkk (2019) mengamati pengaruh antosianin pada kulit ubi jalar ungu terhadap ekspresi MMP-1 pada tikus yang dipapar UVB. Kyungae dkk (2020) mengamati pengaruh pemberian ekstrak blueberry kaya antosianin terhadap ekspresi MMP dan sitokin pro inflamasi pada tikus yang diinduksi UVB. Penelitian yang dilakukan Prasetya tahun 2019 meneliti pengaruh krim ekstrak buah naga super merah terhadap TEWL. Tikus akan diberikan krim sebelum dan sesudah paparan UVB. Belum ada penelitian yang melakukan pengaruh pemberian krim ekstrak buah naga super merah terhadap ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 pada tikus model penurunan kolagen yang diinduksi UVB.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk rujukan penelitian selanjutnya mengenai efek lain pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah.

1.5.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai efek penggunaan krim ekstrak kulit buah naga super merah yang dapat digunakan sebagai terapi topikal terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh paparan sinar matahari sehingga bisa mencegah terjadinya penuaan dini.

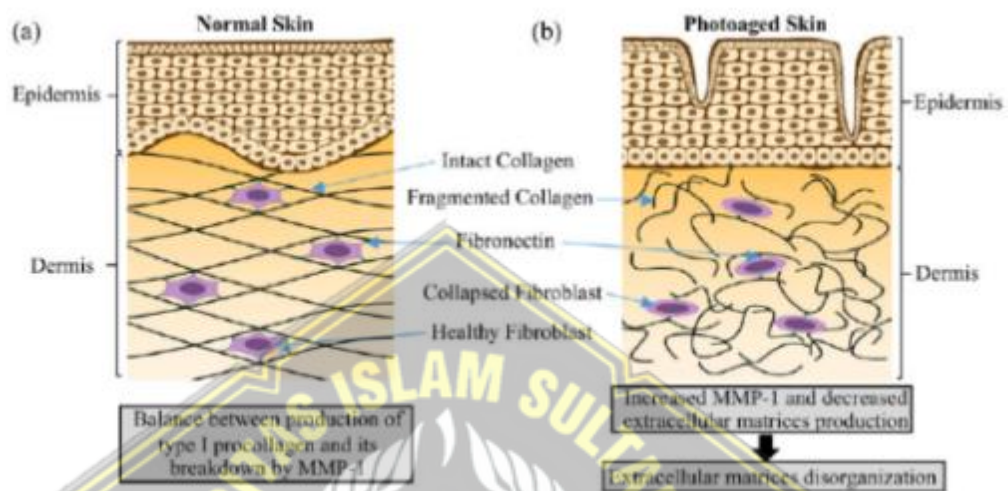
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kolagen

Dermis sebagian besar terdiri dari jaringan ikat dimana peran utamanya memberikan lapisan yang kuat dan fleksibel. Jaringan ikat dermal mengandung kolagen dan elastin. Molekul kolagen saling terikat satu sama lain sehingga tersusun tumpang tindih menjadi serat kolagen yang kuat yang memberi kekuatan tarikan pada jaringan tersebut. Kolagen utama yang terlibat dalam arsitektur dan fisiologi kulit adalah tipe pembentuk fibril, terutama Tipe I dan Tipe III. Pada kulit usia muda, kolagen tipe I terdiri dari 80 %. Tipe III umumnya ditemukan bersama Tipe I dan biasanya mewakili sekitar 15% kolagen kulit. Kolagen tipe I, prototipe dan juga anggota yang paling melimpah, memiliki struktur heliks rangkap tiga rantai panjang, terdiri dari heterotrimer dari dua rantai $\alpha 1$ yang identik dan satu rantai $\alpha 2$. Kolagen terus-menerus disintesis, didalam matrik ekstraseluler akan didegradasi oleh enzim, khususnya MMP. Pergantian kolagen ini cepat selama perkembangan dan kemudian diam selama tahun-tahun dewasa tetapi meningkat lagi di kemudian hari untuk mengkompensasi kerusakan kumulatif yang terkait dengan penuaan kronologis dan photoaging. Saat kadar kolagen mulai menurun, struktur kolagen menjadi lebih rapuh dan rapuh yang menyebabkan melemahnya dukungan struktural kulit. Kulit kehilangan volume dan kekencangan dan mulai menipis dan berkerut¹⁴. Dua regulator utama dalam proses produksi kolagen yaitu TGF- β dan AP-1. TGF- β memiliki peran

dalam meningkatkan produksi kolagen, sedangkan AP-1 menghambat produksi dan memecah kolagen. Keduanya dipengaruhi oleh kadar ROS dalam tubuh.

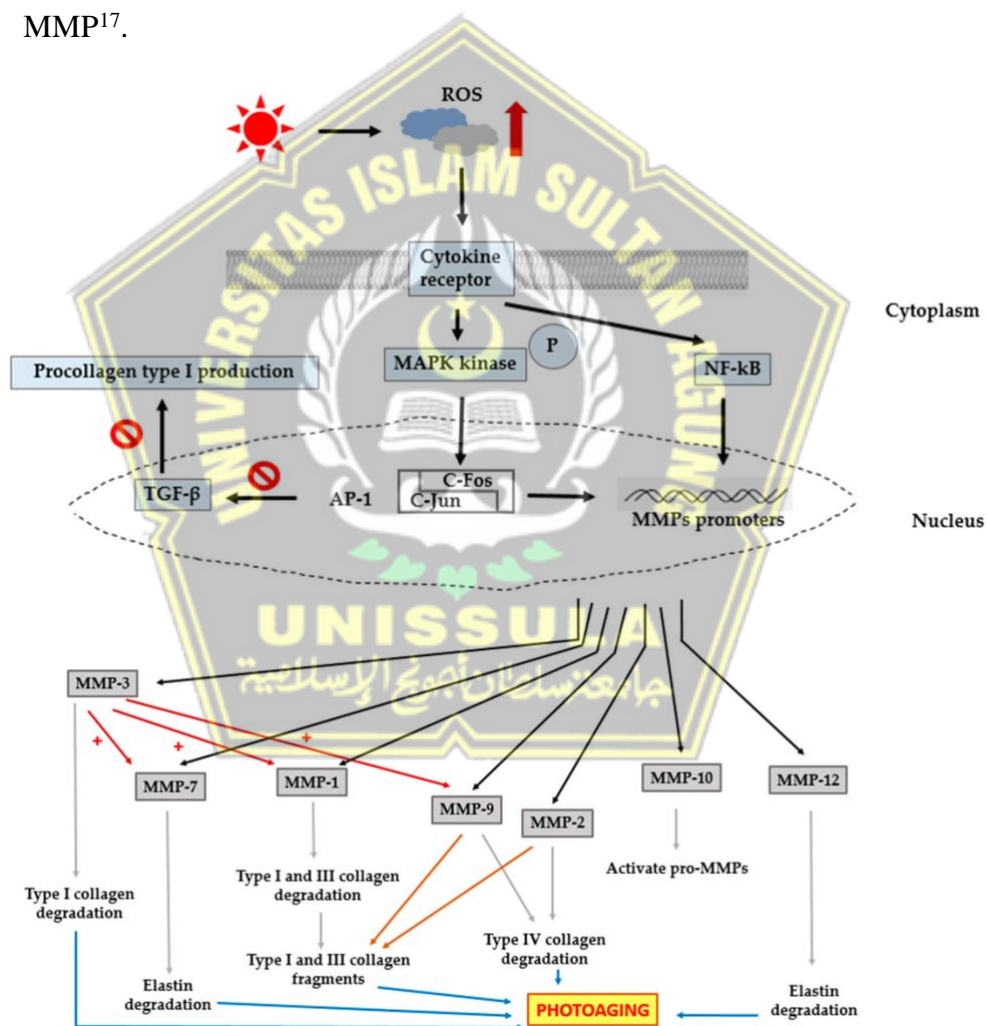


Gambar 2.1. a) Kolagen kulit normal b) Kolagen pada kulit yang mengalami *photoaging*¹⁵

2.2. MMP-1

Matrix metalloproteinases adalah keluarga endopeptidase yang mengandung Zink (Zn) bertanggung jawab mendegradasi protein di dalam matrik ekstraseluler. MMP disekresikan oleh fibroblast dan keratinosit sebagai respon adanya stress oksidatif. Ada berbagai macam klasifikasi MMP, antara lain kolagenase (MMP-1, MMP8 dan MMP-13), gelatinase (MMP-2 dan MMP-9), stromyelisin (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilisin (MMP-7, MMP-26) dan MT-MMP. MMP-1 adalah tipe yang bertanggung jawab terhadap degradasi protein akibat paparan sinar matahari. MMP1, atau collagenase-1, adalah MMP prototipikal, yang berfungsi terutama untuk mendegradasi kolagen tipe 1 dan 3. Ketika terjadi peningkatan aktivitas

sitokin dan growth factor sebagai akibat dari perbaikan jaringan, MMP terpicu untuk beraksi. Aksinya yang merusak matrik ekstraseluler diatur secara ketat dengan beberapa mekanisme¹⁶. AP-1 (Activator Protein-1) yang sebagian besar dirangsang oleh jalur MAPK, merangsang transkripsi beberapa MMP yang akan mendegradasi matrik ekstraseluler. Remodeling kolagen sebagian besar berasal dari peningkatan ekspresi atau aktivasi MMP¹⁷.

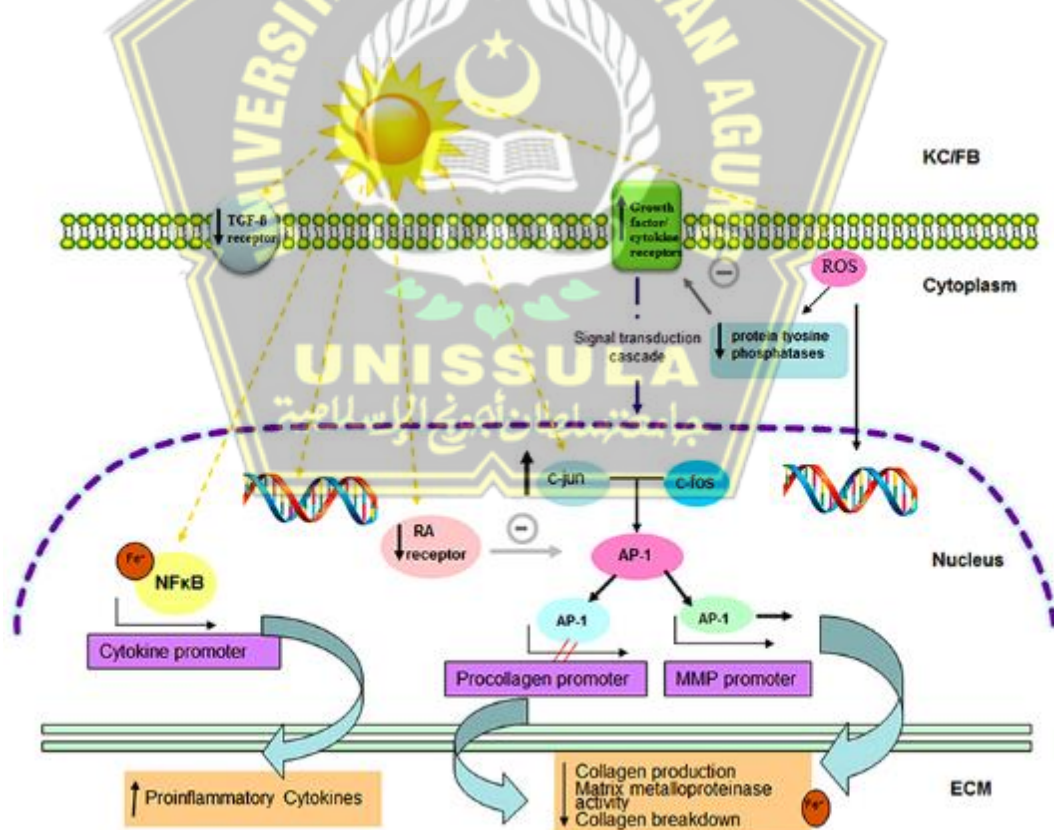


Gambar 2.2. Peran MMP dalam *photoaging*¹⁸.

2.3. *Photodamage*

Photodamage atau penuaan kronologis bergantung pada tingkat paparan sinar matahari dan jumlah melanin pada kulit individu. Tanda klinis berupa keriput, pigmentasi, kulit kasar, kulit kering, kulit kasar, telangiectasis. Perubahan sering terjadi pada bagian tubuh yang sering terpapar sinar matahari seperti wajah, leher, tangan, lengan, punggung kaki. Paparan sinar UVB dapat menstimulasi berbagai macam ROS salah satunya adalah NO. Terjadi peningkatan kadar NO setelah 24 jam paparan UVB yang memicu lesi pada kulit akibat peroksidase lipid, terbentuknya nitrotirosine dan menurunnya proliferasi sel¹⁹. Sinar matahari yang berlebihan menimbulkan ROS yang berlebihan yang memulai kaskade transduksi sinyal. MMP-1 disekresikan oleh fibroblast dan keratinosit sebagai respon adanya stress oksidatif dari paparan sinar matahari. Adanya peningkatan ROS mengaktifkan jalur MAPK. MAPK merupakan keluarga enzim yang terdiri dari tiga jenis yaitu ERK, c-Jun, c-Fos, dan p38 kinase. Aktivasi jalur MAPK melalui reseptor tirosin kinase mengaktifasi ekspresi c-Jun dan c-Fos akan membentuk AP-1 yang berperan penting dalam regulasi transkripsi MMP-1. Selain itu AP-1 juga berperan dalam menghambat sinyal TGF-beta yang merupakan regulator mayor produksi prokolagen tipe 1 kulit. Terganggunya jalur TGF-beta mengarahkan pada penurunan sintesis kolagen. Faktor lain yang teraktivasi karena radiasi sinar UV yaitu Nf-kB akan meregulasi ekspresi growth factor, kemokin, sitokin dan molekul sel adhesi. Aktivasi NF-kB mengakibatkan up-regulasi dari MMP-1¹⁶. Kerusakan kulit diikuti oleh perbaikan kulit namun

terjadi secara tidak sempurna, akumulasi jaringan parut menghasilkan defisit integritas struktural dari dermis. AP-1 menyebabkan peningkatan kerusakan kolagen tipe 1, menjadi tinggi dan tetap tinggi kadarnya dalam 24 jam setelah paparan sinar radiasi. Penurunan sintesis prokolagen terjadi dalam waktu 8 jam setelah paparan sinar UV. Akumulasi dari paparan sinar UV akan membentuk *solar scar* yang akan bermanifestasi sebagai kerutan. Pemecahan kolagen selalu diikuti dengan sintesis dan perbaikan, namun hampir semua proses penyembuhan luka menyisakan bekas yang secara klinis tidak tampak. Bersama dengan bertambahnya usia dan faktor eksternal, terjadi penumpukan *solar scar* dan membentuk kerutan³.



Gambar 2.3. Mekanisme *photodamage*

2.4 Buah Naga Super Merah

Buah naga merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah beriklim tropis. Habitat asli buah naga berasal dari negara Meksiko, Amerika Utara dan Amerika Selatan. Namun, saat ini buah naga sudah banyak dibudidayakan di Indonesia. Buah naga adalah buah sejenis pohon kaktus atau family *Cactaceae*. Daging buah naga berwarna putih, merah, kuning atau ungu bertabur biji-bijian berwarna hitam yang dapat dimakan. Bentuk kulitnya menyerupai sisik. Buah naga termasuk dalam genus *Hylocereus*, dimana terdapat sekitar 16 spesies. Ada 4 jenis buah naga yang sering dikonsumsi yaitu, *Hylocereus undatus* (buah naga daging putih), *Hylocereus costaricensis* (buah naga daging super merah), *Hylocereus polyrhizus* (buah naga daging merah), dan *Selenicereus megalanthus* (buah naga kulit kuning daging kuning). Menurut United States Department of Agriculture, taksonomi buah naga super merah sebagai berikut :



Gambar 2.4. Buah naga daging super merah (*Hylocereus costaricensis*)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivicion	: <i>Spermatophyta</i>
Divicion	: <i>Magnoliophyta</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Subclass	: <i>Hamamelidae</i>
Ordo	: <i>Caryophyllales</i>
Family	: <i>Cactaceae</i>
Genus	: <i>Hylocereus</i>
Species	: <i>Hylocereus costaricensis</i>

Kandungan nilai gizi dalam 100 g buah naga merah sebagai berikut:

Tabel 2.1. Kandungan nilai gizi dalam 100 g buah naga merah

Komposisi	Jumlah
Kadar Air (%)	96
Protein (g)	0,159-0,229
Lemak (g)	0,21-0,61
Serat Kasar (g)	0,7-0,9
Karoten (mg)	0,005-0,012
Kalsium (mg)	6,3-8,8
Fosfor (mg)	30,2-36,1
Iron (mg)	0,55-0,65
Vitamin B1 (mg)	0,028-0,043
Vitamin B2 (mg)	0,043-0,045
Vitamin B3 (mg)	0,297-0,43
Vitamin C (mg)	8-9
Thiamine (mg)	0,028-0,030
Riboflavin (mg)	0,043-0,044
Niacin (mg)	1,297-1,300
Abu (g)	0,28
Lain-lain (g)	0,54-0,68

Sumber : Taiwan Food Industry Development and Research Authorities dalam (Panjuantiningrum, 2009).

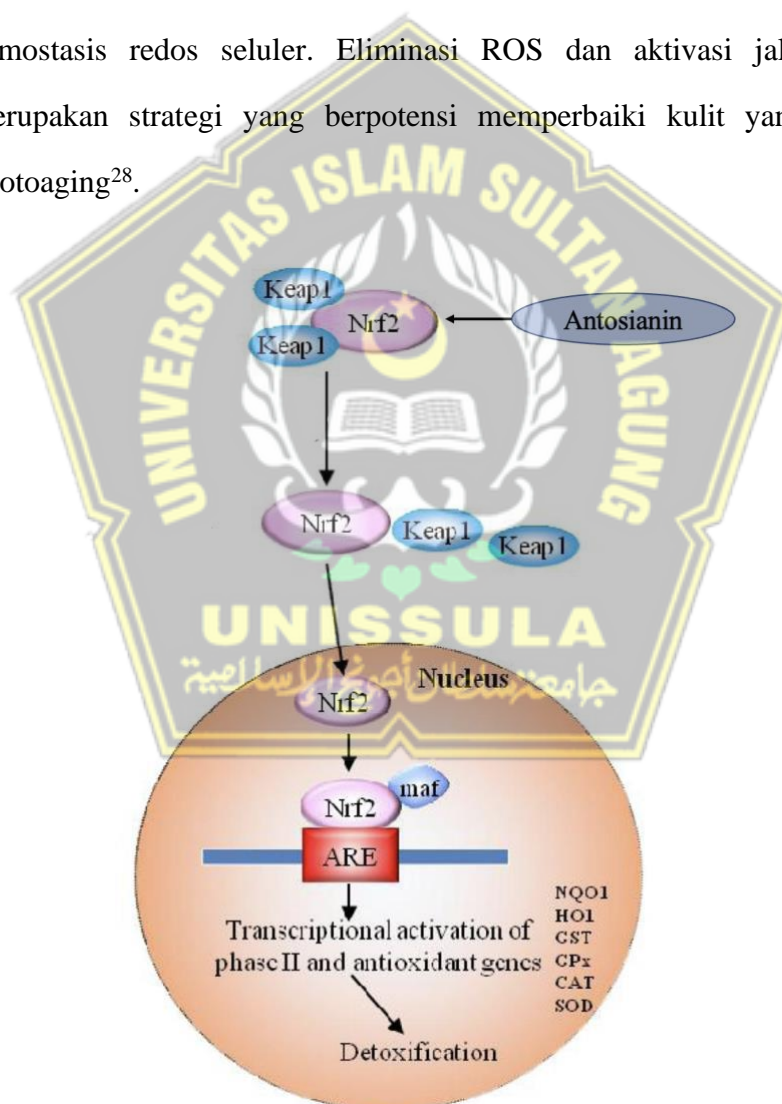
Berbagai macam unsur ada pada kulit buah naga. Kelebihan kulit buah naga adalah kaya akan polifenol yang merupakan sumber antioksidan. Serta aktivitas antioksidan kulit buah naga lebih besar dibandingkan daging buah

naga²⁰. Salah satu senyawa polifenol yang terdapat di kulit buah naga super merah adalah antosianin. Merupakan jenis flavonoid yang larut dalam air. Antosianin dikenal sebagai antioksidan yang kuat. Antosianin dengan kapasitas penangkal radikal bebas diketahui terkait dengan peradangan seperti interleukin, NF-kB, dan komponen matriks ekstraseluler pada jaringan kulit¹¹.

2.5. Hubungan Antosianin dan *Photodamage*

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa antioksidan dapat menghambat stress oksidatif pada kulit akibat paparan UVB sehingga menjanjikan sebagai agen yang mengurangi resiko penyakit kulit²¹. Senyawa alami yang digunakan untuk melawan photoaging terdiri dari senyawa fenolik seperti flavonoid (katekin, proantosianidin, antosianin), asam fenolik (benzoat, galat, dan asam sinamat). Senyawa tersebut dapat mencegah penetrasi radiasi ke dalam kulit dan mengurangi reaksi peradangan serta stress oksidatif pada fibroblast²². Senyawa fenolik memiliki struktur cincin aromatic dengan satu atau lebih gugus hidroksil sehingga aktivitas antioksidannya dapat bertindak sebagai reduktor dengan menyumbangkan elektron dan melindungi sel terhadap ROS²³. Antosianin adalah pigmen larut dalam air merupakan polifenol dari grup flavonoid yang banyak ditemukan pada buah dan sayuran. Selain sebagai antioksidan juga mempunyai efek anti-inflamasi, efek- anti diabetic, anti-kanker²⁴. Antosianin berperan sebagai scavenger ROS, yang bertanggung jawab dalam efek antioksidan adalah gugus hidroksil pada posisi 3 dari cincin C dan posisi 3', 4', 5' dari cincin B²⁵. Pada penelitian *in vitro*, pemberian antosianin dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi dengan menurunkan aktivasi factor transkripsi Nf-kB¹¹. Pemberian ekstrak antosianin dari kulit ubi jalar ungu memperbaiki

kehilangan cairan, degradasi kolagen, hiperplasia epidermal, dan pembentukan keriput akibat paparan sinar UVB melalui regulasi jalur MAPK dan sinyal Nf- κ B²⁶. Antosianin secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi dari Nrf2 yang berperan dalam mempertahankan antioksidan endogen²⁷ adalah salah satu dari sistem pertahanan seluler. Nrf2 yang terstimulasi akan bertranslokasi ke nukleus untuk berikatan dengan ARE yang akan mengaktifkan ekspresi dari gen terkait antioksidan untuk mempertahankan homeostasis redoks seluler. Eliminasi ROS dan aktivasi jalur Nrf2/ARE merupakan strategi yang berpotensi memperbaiki kulit yang mengalami photoaging²⁸.



Gambar 2.5. Aktivasi jalur Nrf2-Keap1 oleh antosianin

BAB III

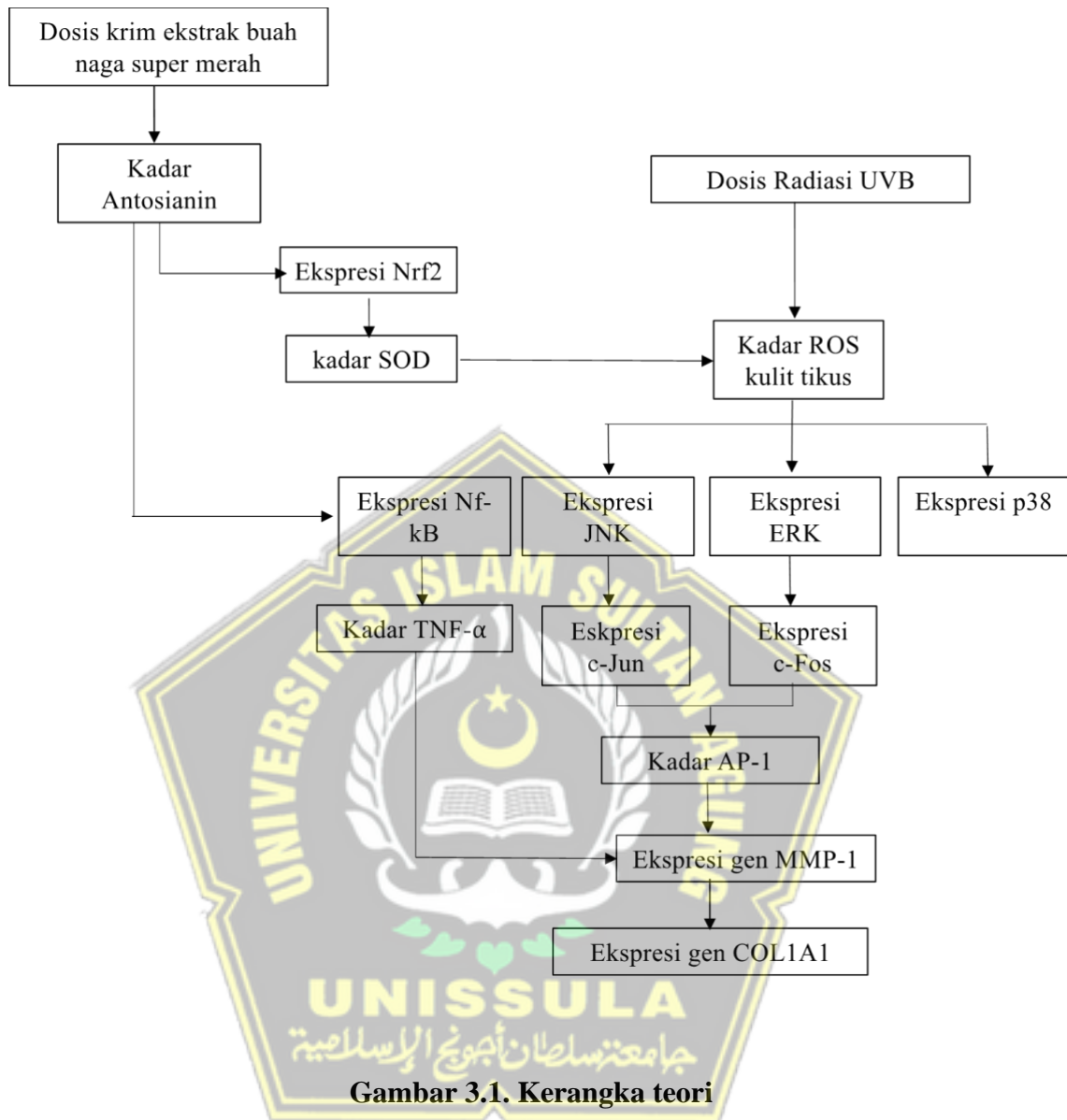
KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Teori

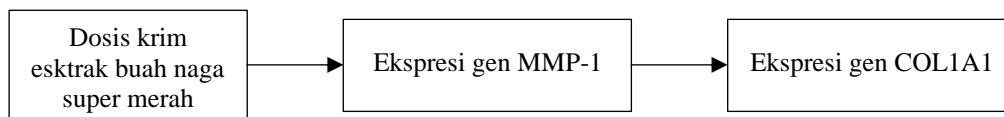
Paparan sinar UVB yang berlebihan mengakibatkan perubahan reaksi biokimia pada kulit karena meningkatkan kadar ROS¹. ROS akan kembali aktif dengan elektron yang tidak berpasangan dengan menyumbangkan atom tunggalnya atau menangkap satu atom agar menjadi stabil²⁹. Paparan radiasi sinar ultraviolet merupakan stimulator yang dapat menyebabkan pembentukan ROS pada tingkat molekuler dan seluler. Oleh karena itu, akumulasi ROS yang diakibatkan karena paparan UVB sangat berbahaya karena berkontribusi dalam stress oksidatif, kerusakan DNA, peroksidase lipid, dan kerusakan sel serta photoaging³⁰. Peningkatan sitokin pro-inflamasi juga terjadi sebagai respon akibat terbentuknya ROS pada kulit yang terpapar UVB. Respon inflamasi juga mempercepat penuaan kulit. Sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 memainkan peran penting dalam respon inflamasi. Sitokin yang diinduksi oleh UVB merupakan stimulator kuat untuk ekspresi MMP-1 yang akan menginduksi kehilangan kolagen kulit³¹. Pembentukan ROS oleh penyinaran UVB dapat menghasilkan stress oksidatif dan respon inflamasi, yang selanjutnya menginduksi pemecahan kolagen dengan menginduksi sintesis MMP-1. MMP-1 salah satu enzim utama yang memecah fibril kolagen menjadi fragmen sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan ikat dan merusak integritas kulit. Sehingga, kelebihan MMP-1 yang terbentuk akibat photoaging menyebabkan

timbulnya kerutan, hilangnya elastisitas, kendur dan tampilan kulit atrofi³². Kolagen tipe I yang merupakan struktur mendasar dalam fibroblast dermal, disintesis oleh molekul prekursor yaitu prokolagen.

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa kadar MMP-1 diatur oleh teraktivasinya jalur pensinyalan Nf-kB, AP-1, dan MAPK³³. Jalur pensinyalan MAPK termasuk JNK, ERK, dan p38. Radiasi UVB menyebabkan fosforilasi MAPK, yang kemudian secara langsung mempengaruhi fosforilasi AP-1. Hal ini, diikuti up-regulasi ekspresi MMP sehingga menyebabkan defisiensi kolagen³⁴. Nf-kB merupakan kompleks protein yang berperan penting dalam respon imun dan disregulasi Nf-kB berhubungan dengan inflamasi dan penuaan³⁴. Nf-kB mengalami aktivasi oleh stimulasi ROS. Nf-kB yang teraktivasi akan menginduksi up-regulasi ekspresi sitokin pro-inflamasi, yang selanjutnya menginduksi ekspresi MMP^{35,36}. Scavenger ROS memiliki potensi untuk melindungi sel dari penuaan dini yang disebabkan oleh radiasi UVB. Polifenol merupakan bahan kimia yang ditandai dengan adanya lebih dari satu gugus fenolik yang bertindak sebagai donor elektron, memberikan kepada radikal bebas. Hal ini yang mendasari penghambatan kerusakan yang dimediasi ROS³⁷. Antosianin bekerja melalui jalur direk dan indirek. Jalur direk antosianin berperan dalam mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga menjadi lebih stabil. Antosianin pada jalur indirek mempengaruhi pada aktivitas GSH melalui jalur Nrf2³⁸.



3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

3.3. Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konsep hipotesis yang diajukan adalah :

Krim ekstrak buah naga super merah secara topikal dosis 5% dan 10% berpengaruh terhadap ekspresi gen MMP-1 dan ekspresi gen COL1A1 pada kulit tikus jantan galur wistar dengan penurunan kolagen dibandingkan dengan kontrol.

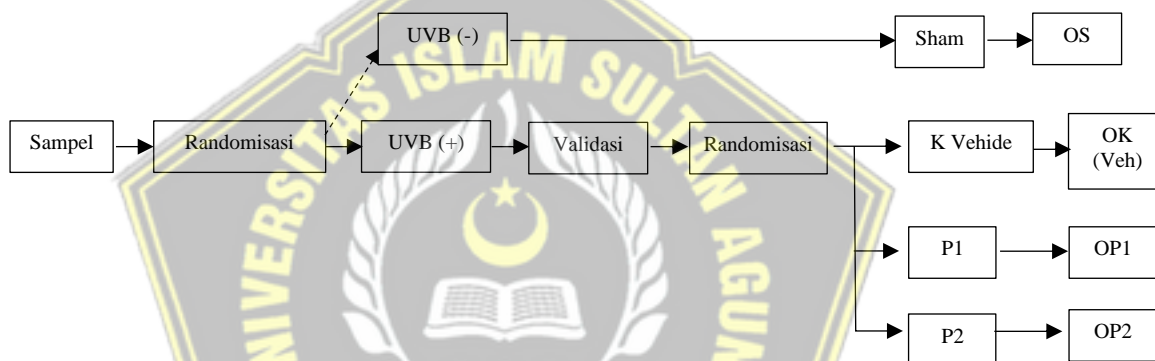


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *randomized post-test only control group*, dengan menggunakan hewan coba tikus jantan galur wistar sebagai objek penelitian dengan bobot 200-250 gr.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Sham : Kelompok tikus sehat tanpa penyinaran
- K Vehicle : Kelompok tikus dengan penurunan kolagen dengan perlakuan *cream base*
- P1 : Kelompok perlakuan dengan pengolesan krim ekstrak kulit buah naga super merah 5%
- P2 : Kelompok perlakuan dengan pengolesan krim ekstrak kulit buah naga super merah 10%

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi/Subjek Penelitian

Populasi pada penelitian ini tikus jantan galur wistar yang didapatkan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Tikus

jantan galur wistar dipelihara di kandang hewan dengan ventilasi yang cukup dan diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu, diberi makanan secukupnya kemudian dilakukan randomisasi.

Kriteria inklusi :

- a. Tikus jantan galur wistar yang mengalami pengurangan kolagen pada kulit akibat paparan UVB
- b. Berat badan 200-250 gram

Kriteria eksklusi :

- a. Tikus jantan galur wistar yang memiliki kelainan anatomis
- b. Tikus jantan galur wistar yang sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

Kriteria drop out : apabila tikus mengalami kematian atau infeksi pada saat penelitian

4.2.2. Sampel Penelitian

Penentuan besar sampel mengikuti rumus penentuan replikasi yang dilakukan oleh Federer yaitu dihitung berdasarkan rumus :

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t : banyaknya taraf perlakuan

n : banyaknya sampel setiap perlakuan

Dalam penelitian ini $t=4$ perlakuan, sehingga $(4-1)(n-1) \geq 15$, dengan memakai rumus tersebut akhirnya diperoleh jumlah $n = 6$

Untuk cadangan, setiap kelompok ditambah 10% ($10\% \times 4 = 1$) untuk mengantisipasi adanya kematian pada masing-masing kelompok.

Total sampel :

$$(5 \times 4) + (1 + 3) = 24 \text{ ekor}$$

Jadi, total sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus.

4.2.3 Tehnik Sampling

Tikus yang akan digunakan dalam penelitian harus masuk dalam kriteria inklusi terlebih dahulu. Sebelum dilakukan penelitian, diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Setelah diadaptasikan, 24 ekor tikus diambil secara random untuk dibagikan ke dalam 4 kelompok perlakuan.

4.3 Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

4.3.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% dan 10%

4.3.1.2 Variabel Antara

Variabel antara pada penelitian ini adalah ekspresi gen MMP-1

4.3.1.3 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen COL1A1

4.3.2. Definisi Operasional Variabel

4.3.2.1 Dosis krim ekstrak kulit buah naga super merah

Dosis krim ekstrak kulit buah naga super merah adalah pemberian krim yang mengandung ekstrak kulit buah naga super merah. Krim yang digunakan dalam basis m/a terbagi dalam 2 kelompok yaitu kelompok P1 diberikan 5% krim ekstrak kulit buah naga super merah dan P2 diberikan 10% krim ekstrak kulit buah naga super merah. Skala pengukuran adalah skala ratio.

4.3.2.2 Ekspresi gen MMP-1 (Matriks Metalloproteinase-1)

Ekspresi gen MMP-1 adalah jumlah ekspresi mRNA gen MMP-1 yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Sampel jaringan kulit di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Dihitung dengan rumus $RQ = 2^{-\Delta\Delta T}$. Unit satuan multiple (x). Skala data ratio.

4.3.2.3 Ekspresi gen COL1A1

Ekspresi gen COL1A1 adalah jumlah ekspresi mRNA kolagen tipe 1 yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Sampel jaringan kulit di analisis dengan

metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Dihitung dengan rumus $RQ = 2^{-\Delta\Delta T}$. Unit satuan multiple (x). Skala data ratio.

4.4. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan dasar krim m/a, krim ekstrak kulit buah naga super merah 5% dan 10%, krim ekstrak kulit buah naga super merah 5% dan 10%, lampu UVB, kit kolagen antibody kolagen tipe 1, kit MMP-1 antibody MMP-1

4.5 Peralatan Penelitian

4.5.1. Alat untuk membuat ekstrak kulit buah naga super merah

Peralatan yang digunakan untuk membuat ekstrak yaitu tempat penyimpanan steril, sendok kaca steril, juicer, dan vacuum dryer

4.5.2. Alat untuk pemeliharaan tikus

Peralatan untuk pemeliharaan tikus terdiri dari kandang tikus, tempat fiksasi, timbangan analitik, jarum 26, spuit 1 cc, alat cukur, sarung tangan.

4.5.3 Alat untuk pembuatan preparate

Alat yang digunakan untuk pembuatan preparate yaitu skapel, pinset, talenan, saringan, tissue casset, mesin processor otomatis, mesin vacuum, mesin blocking, freezer, mesin microtome, objek glass, kaca penutup, waterbath 46°C.

4.5.4. Alat untuk pemeriksaan histologi

Alat yang digunakan untuk pemeriksaan histologi yaitu pembuka tutup, mikropipet, wadah sampel, pinset anatomis, alat pengukuran pH, Detection kit “Biocare Medical”, Yellow Kit, Novapen.

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Perolehan *Ethical Clearence*

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

4.6.2. Persiapan Sebelum Perlakuan

- a. Adaptasikan 24 ekor tikus wistar dengan lingkungan selama 1 minggu
- b. Lakukan pencukuran punggung tikus sebesar 2x3 cm untuk area penyinaran UVB
- c. Dilakukan pengambilan sampel secara acak pada ke 24 tikus wistar yang masuk kriteria inklusi
- d. Dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sham, kontrol vehicle, perlakuan 1 dan perlakuan 2
- e. Letakkan tikus di kandang kawat yang dilengkapi dengan makanan dan minuman secukupnya. Setiap kandang berisi 6 tikus. Suhu ruangan dipertahankan pada suhu 28-32°C.

4.6.2 Pembuatan Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah

- a. Ambil kulit buah naga super merah kemudian dipotong kecil-kecil berukuran ± 1 cm.
- b. Pembuatan ekstrak etanol dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g kulit buah naga super merah yang sudah dipotong-potong dimasukkan ke dalam wadah kaca, tambahkan etanol 96% sebanyak 3,75 L, tutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk kemudian diserkai dengan kain flannel hingga diperoleh larutan ekstrak cair. Ampas saringan di maserasi kembali dengan larutan etanol 1,25 L. kemudian disaring kembali dimana hasil saringan digabungkan dengan hasil saringan pertama dibiarkan selama 2 hari. Hasil yang diperoleh dipekatkan dengan alat penguap dan dilanjutkan proses penguapan di atas penangas air sampai diperoleh ekstrak kental (Ditjen POM, 1979).
- c. Formula krim yang akan dibuat adalah :

R/Asam stearate	12 g
Setil alcohol	0,5 g
Trietanolamin	1 g
Metil parabean	0,1 g
Natrium Metabisulfit	0,1 g
Ekst. Kulit Buah Naga Super Merah	x %
Akuades ad	100 g

Keterangan :

X % : Konsentrasi ekstrak kulit buah naga super merah (5%, 10%)

Formula dasar krim yang dibuat, yaitu :

Tabel 4.1. Formula dasar krim

No	Komposisi (g)	Jumlah untuk 500 g
1	Asam stearate	60
2	Setil alcohol	2,5
3	Trietanolamin	5
4	Metil parabean	0,5
5	Natrium Metabisulfit	0,5
6	Akuades ad	500

Cara pembuatan : semua bahan ditimbang, pisahkan fase air dan fase minyak. Asam stearate dan setil alcohol dilebur di tas penangas air (fase minyak) pada suhu 70-75°C. metil parabean, trietanolamin, dan natrium metabisulfite dilarutkan dalam akuades yang telah dipanaskan (fase air). Kemudian, fase minyak dimasukkan ke dalam lumping porselin panas, ditambahkan fase air dan diaduk secara konstan sehingga diperoleh dasar krim yang homogen.

- d. Ekstrak kulit buah naga super merah dimasukkan dalam lumping porselin digerus halus, lalu ditambahkan dasar krim sedikit demi sedikit, kemudian digerus hingga homogen, setelah itu dimasukkan ke dalam wadah. Formula krim yang dibuat, yaitu :

Tabel 4.2. Formula krim yang dibuat

Bahan	Konsentrasi		
	F0 (Blanko)	F1 (5%)	F2 (10%)
Ekstrak kulit buah naga super merah (g)	-	5	10
Dasar krim (g)	100	95	90

4.6.3 Penetapan Dosis Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah

Penggunaan ekstrak kulit buah naga super merah dilakukan setiap hari sebanyak 200mg/tikus sehingga dosis ekstrak kulit buah naga super merah yang digunakan adalah 10 mg untuk dosis 5% dan 20 mg untuk dosis 10%.

4.6.4 Cara Pemberian Krim Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah dan Paparan sinar UVB

- a. Letakkan tikus dalam wadah yang memiliki tutup sehingga tikus tidak membalikkan badan saat diberikan paparan sinar UVB. Jarak penyinaran dari lampu ke punggung yaitu 40 cm. Dilakukan selama 5 hari dengan waktu penyinaran 15 menit dengan dosis 160 mJ/cm².
- b. Bahan dasar krim dan krim ekstrak kulit buah naga super merah diaplikasikan setelah paparan sinar UVB (setelah mengalami penurunan kolagen) selama 14 hari sehari sekali.
- c. Perlakuan masing-masing kelompok sebagai berikut :
 1. Sham = 6 ekor tikus sehat tanpa penyinaran
 2. Kontriol vehicle = 6 ekor tikus yang sudah dicukur sebelumnya diberikan paparan UVB dan perlakuan dengan *cream base*

3. P1 = 6 ekor tikus yang sudah dicukur sebelumnya diberikan paparan sinar UVB dan perlakuan dengan olesan krim ekstrak kulit buah naga merah super merah 5 %
4. P2 = 6 ekor tikus yang sudah dicukur sebelumnya diberikan paparan sinar UVB dan perlakuan dengan olesan krim ekstrak kulit buah naga merah super merah 10 %

4.6.5 Terminasi Tikus

Setelah pemberian krim hari ke-14, tikus dibiarkan terlebih dahulu selama 24 jam. Untuk mengambil sampel kulit pada tikus dilakukan biopsi. Sebelum dibiopsi, tikus di euthanasia dengan xylazine 20 mg/kgBB IM dan ketamin 60 mg/KgBB IM. Setelah tikus benar-benar mati, pengambilan sampel dapat dilakukan.

4.6.6 Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi

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

2. Parafinisasi dan Embedding

Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi

polilisin sebagai perekat. Masukkan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.6.7 Ekstraksi mRNA

Tikus di euthanasia dengan xylazine 20 mg/kgBB IM dan ketamin 60 mg/KgBB IM. Setelah tikus sudah tidak bernyawa, ambil sampel kulit sebanyak 100 mg kemudian dipotong-potong menjadi halus, masukkan ke dalam tabung dan campur dengan RNA Iso Plus sebanyak 50 mL dan di inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tambahkan 20 mL kloroform kemudian divortek hingga berubah menjadi putih susu. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit kemudian sentrifugasi Kembali selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C sehingga terbentuk 3 lapisan. Lapisan paling atas berupa RNA dipindahkan ke tabung baru, diukur volumenya kemudian tambahkan isopropanolol sebanyak volume RNA yang didapat. Goyangkan tabung tersebut hingga terbentuk benang putih, selanjutnya sentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 15.000 rpm. Buang supernatan dan sisakan sedimen. Sedimen dikeringkan lalu tambahkan dengan 100 mL etanol 70% dalam larutan DEPC (*Diethyl pyrocarbonat*), bolak balik tabung kemudian sentifugasi selama 5 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 15.000 rpm. Buang Kembali supernatan dan tambahkan kembali DEPC sebanyak 30-50 µm, inkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C.

simpan pada suhu -80°C , RNA dikuantifikasi dengan nanodrop dan hasilnya dihitung menjadi 3000ng.

Sintesis cDNA dibuat dengan mencampurkan antara campuran A dan campuran B yang akan diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit dan 85°C selama 5 menit. Untuk campuran A terdiri dari sampel RNA yang sudah dihitung, $1\ \mu\text{l}$ OligoDT serta PCR water sampai volume menjadi $10\ \mu\text{l}$ dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit. Sedangkan campuran B terdiri dari *5X buffer* $4\ \mu\text{l}$, *DEPC-Treated H₂O* $5\ \mu\text{l}$, *ReverTraAce 1* μl .

4.6.8 Analisis Ekspresi PCR

Ekspresi mRNA dari MMP-1 dan COL1A1 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Sebelumnya perlu dilakukan pembuatan master mix RT-PCR yang terdiri dari $3\ \mu\text{l}$ cDNA sampel, $12,5\ \mu\text{l}$ Taq master mix (*dNTPs*, *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer* and *MgCl₂*), $0,6\ \mu\text{l}$ primer spesifik pada masing-masing gen target, dan $8,3\ \mu\text{l}$ *Nuclease Free Water*. Primer Forward untuk MMP-1 : CCA CTA ACA TTC GAA AGG GTT T sedangkan primer untuk COL1A1: GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA. Primer Reserver untuk MMP-1: GGT CCA TCA AAT GGG TTA TTG, sedangkan Primer Reserver untuk COL1A1 : CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA. Homogenkan master mix kemudian masukkan ke dalam mesin PCR dan atur mesin PCR. GAPDH digunakan sebagai *housekeeping gene*. Visualisasi

PCR dengan menggunakan agarose elektroforesis, gel agarose didokumentasikan dengan gel doc dan densitas band dianalisis menggunakan software imageJ.

4.6.9 Pewarnaan *Masson Trichome*

1. Deparafinisasi slide jaringan
2. Panaskan Cairan Bouin ke 54-64°C
3. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit
4. Bilas dengan air mengalir
5. Inkubasi slide di Hematigoksin Besi Weigert selama 5 menit
6. Bilas dengan air
7. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit
8. Bilas dengan air
9. Inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit
10. Inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit
11. Bilas dengan air
12. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit
13. Dehidrasi, dan pasang desk glass

4.6.10 Pengamatan Hasil

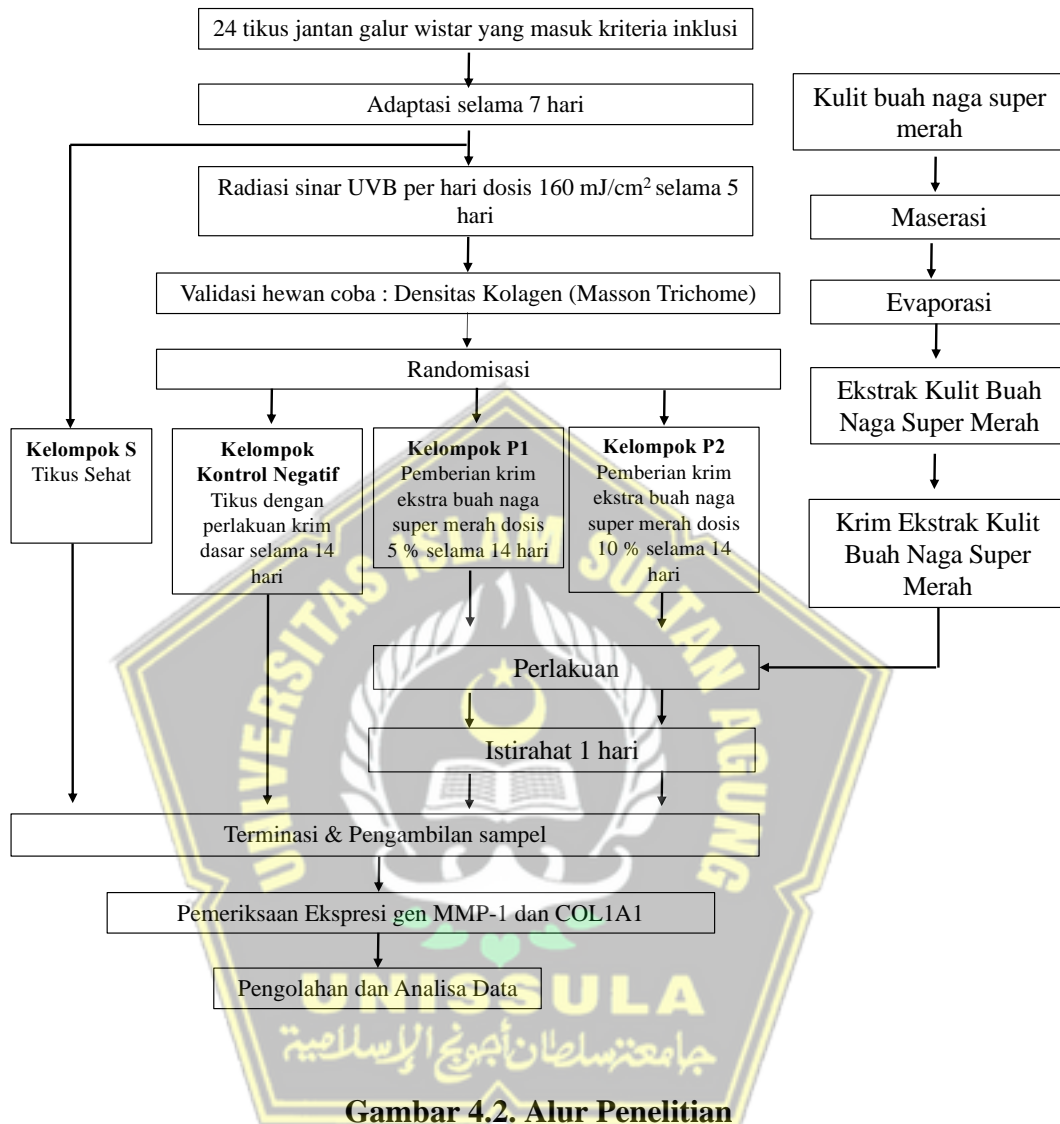
Perhitungan ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 dengan menggunakan RT-PCR yang akan dihitung oleh computer.

4.7. Analisis Data

Data ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 pada tikus jantan galur wistar antar kelompok disajikan dalam grafik dan tabel. Kemudian data diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Uji *One-Way Anova* dilakukan pada data dengan distribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Kemudian dilakukan uji *Post-Hoc* dengan uji Tukey. Apabila distribusi data tidak normal atau tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Februari-Maret 2023 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200-250 gram yang di induksi sinar UVB dengan waktu penyinaran 15 menit dengan dosis 160 mJ/cm^2 selama 5 hari. Selama penelitian berlangsung, tidak ada hewan coba yang mengalami *dropout*. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat, kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang diberi krim base selama 14 hari, kelompok P1 adalah kelompok yang diberi paparan sinar UVB dan perlakuan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% selama 14 hari, dan kelompok P2 adalah kelompok yang diberi paparan sinar UVB dan perlakuan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 10% selama 14 hari.

5.1.1 Determinasi dan Ekstraksi Buah Naga Super Merah

Buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari perkebunan di Kota Semarang. Determinasi bahan dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang.

Tabel 5.1. Determinasi buah naga super merah

Nama Sampel	Buah naga super merah
Sampel	Tanaman Lengkap dan Simplisia
Kingdom	Plantae
Divisio	Magnoliophyta
Classis	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Ordo	Cactales
Familia	Cactaceae
Genus	Hylocereus
Species	Hylocereus costaricensis (F.A.C Weber) Britton & Ros
Varietas	Sabila Merah
Nama Lokal	Buah naga dengan warna yang sangat merah

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

5.1.2. Uji Kualitatif Skrining Fitokimia dan Uji Kadar Flavonoid Total

Uji kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Hal – hal yang berperan penting pada skrining fitokimia antara lain pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Dalam hasil skrining senyawa fitokimia ekstrak kulit buah naga super merah

(*Hylocereus costaricensis*) dapat dinilai kandungan senyawa metabolit sekunder yang dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing – masing senyawa. Uji skrining fitokimia terdiri dari uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin, uji tanin, uji steroid, dan uji triterpenoid, dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Profil Fitokimia ekstrak kulit buah naga super merah

Parameter Uji	Hasil Uji Kualitatif	Metode
Alkaloid	+	Wagner
Saponin	+	Forth
Tannin	+	FeCl ₃ 1%
Flavonoid	+	Willstatter
Steroid	+	Lieberman Burchard
Triterpenoid	+	Lieberman Burchard

Pada uji kualitatif flavonoid dengan pereaksi warna, jika setelah ditambahkan serbuk magnesium dan HCL 2N terbentuk warna merah hingga merah muda maka menunjukkan adanya flavonoid. Uji flavonoid secara kuantitatif dengan menganalisis kandungan flavonoid total pada ekstrak etanol kulit buah naga super merah. Hasil kadar rata – rata flavonoid total adalah $53,28 \pm 0,66$.

Tabel 5.3. Hasil uji Kadar Flavonoid Total

Extract Concentration	TFC
1000 ppm	57,63
1000 ppm	52,19
1000 ppm	50,02

5.1.3 Uji validasi penurunan kolagen

Pembuatan model tikus dengan penurunan kolagen dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Tikus dengan berat 200-250 gram diberikan penyinaran waktu penyinaran 15 menit dengan dosis 160 mJ/cm^2 selama 5 hari. Tikus dilakukan terminasi kemudian dilakukan biopsi kulit dan dilakukan pengecatan dengan menggunakan Masson Trichome.



Gambar 5.1. Uji validasi penurunan kolagen dengan pengecatan Masson Trichome. Gambar (a) menunjukkan kulit tikus dengan penurunan kolagen, gambar (b) kulit tikus tanpa penyinaran, kolagen ditunjukkan pada panah hitam.

5.1.4 Ekspresi gen MMP-1 pada tikus wistar yang diradiasi penyinaran UVB setelah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah

Data variabel ekspresi gen MMP-1 sudah dilakukan analisis normalitas sebaran/distribusi data menggunakan uji *Shapiro wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$, dan uji homogenitas varian data menggunakan uji *levene test* menghasilkan nilai $p < 0,05$. Data variabel

ekspresi gen MMP-1 dapat disimpulkan data berdistribusi normal namun tidak homogen, kemudian dilanjutkan analisis data menggunakan uji parametrik *one way anova*. Hasil uji *one way anova* menunjukkan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$), sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna antar dua kelompok perlakuan.

Tabel 5.4. Hasil rerata ekspresi gen MMP-1

Variabel	Kelompok				P value
	Sham n=6 Mean±SD	Kontrol Negatif n=6 Mean±SD	P1 n=6 Mean±SD	P2 n=6 Mean±SD	
Ekspresi gen MMP-1	1±0	8,51±2,92	2,49±1,15	1,19±0,69	
<i>Saphiro wilk</i>	0,00	0,27	0,50	0,80	
<i>Levene test</i>					0,00

Perbedaan kelompok ini dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

Tabel 5.5. Uji Tukey ekspresi gen MMP-1 antar kelompok perlakuan

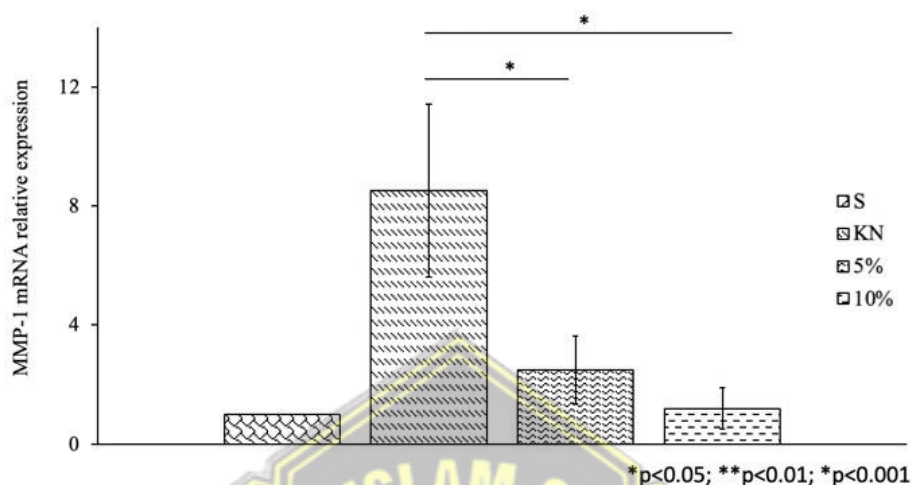
Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Sham	Kontrol Negatif	0.00
	P1	0,39
	P2	0,99
Kontrol Negatif	P1	0,00
	P2	0,00
Kontrol P1	P2	0,51

Uji Post Hoc:

*means difference significant $P<0,05$

^{ns}means not difference significant $P>0,05$

MMP-1



Gambar 5.2. Ekspresi gen MMP-1 pada kelompok; Sham : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol negatif : subyek induksi penyinaran UVB tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% , P2 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 10%.

Hasil uji beda antar kelompok menggunakan uji *Tukey* mendapatkan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$) antar kelompok sham dengan kontrol negatif, antar kelompok kontrol negatif dengan P1, serta antar kelompok kontrol negatif dengan P2 sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan ekspresi gen MMP-1 yang signifikan pada kelompok tersebut.

5.1.5 Ekspresi gen COL1A1 pada tikus wistar yang diradiasi penyinaran UVB setelah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah

Data variabel ekspresi gen COL1A1 sudah dilakukan analisis normalitas sebaran/distribusi data menggunakan uji *Shapiro wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$, dan uji homogenitas varian data menggunakan uji *levene test* menghasilkan nilai $p < 0,05$. Data variabel ekspresi gen COL1A1 dapat disimpulkan data berdistribusi normal namun tidak homogen, kemudian dilanjutkan analisis data menggunakan uji parametrik *one way anova*. Hasil uji *one way anova* menunjukkan nilai $p = 0,01$ ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna antar dua kelompok perlakuan.

Tabel 5.6. Hasil rerata ekspresi gen COL1A1

Variabel	Kelompok				P value
	Sham n=6 Mean±SD	Kontrol Negatif n=6 Mean±SD	P1 n=6 Mean±SD	P2 n=6 Mean±SD	
Ekspresi gen COL1A1	1±0	0,18±0,76	1,28±0,90	1,56±0,97	
<i>Saphiro wilk</i>	0,000	0,14	0,31	0,24	
<i>Levene test</i>					0,003

Perbedaan kelompok ini dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

Tabel 5.7. Uji Tukey ekspresi gen COL1A1 antar kelompok perlakuan

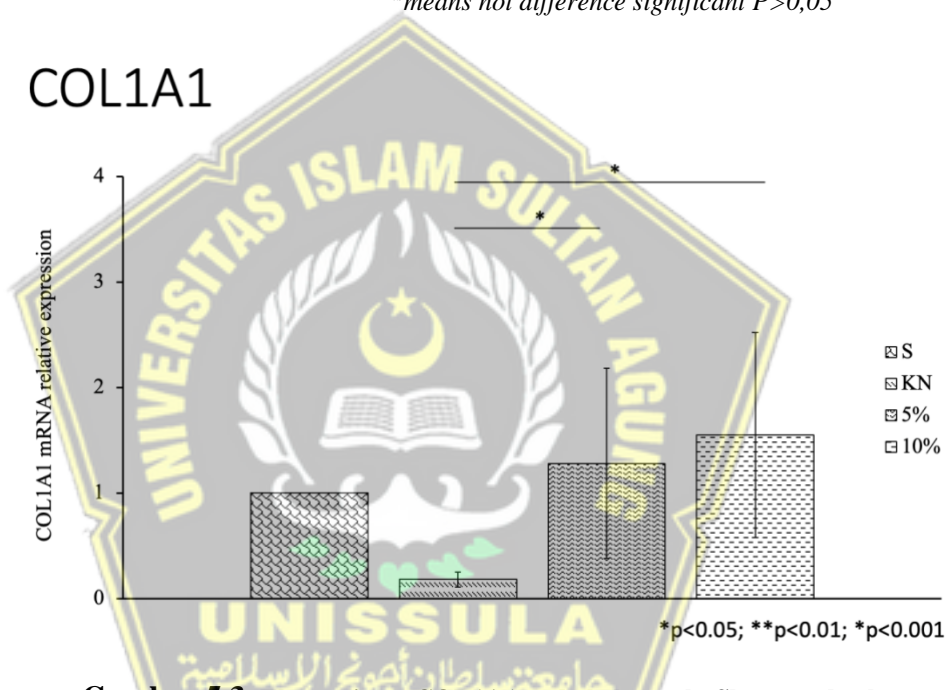
Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Sham	Kontrol Negatif	0,18
	P1	0,88
	P2	0,48
Kontrol Negatif	P1	0,04
	P2	0,00
Kontrol P1	P2	0,89

Uji Post Hoc:

*means difference significant $P < 0,05$

ns means not difference significant $P > 0,05$

COL1A1



Gambar 5.3. Ekspresi gen COL1A1 pada kelompok; Sham : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol negatif : subyek induksi penyinaran UVB tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% , P2 : subyek radiasi penyinaran UVB yang diberikan krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 10%.

Hasil uji beda antar kelompok menggunakan uji *Tukey* mendapatkan nilai $p=0,04$ ($p < 0,05$) antar kelompok kontrol negatif dengan P1 dan $p=0,00$ ($p < 0,05$) antar kelompok kontrol negatif dengan P2, sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan ekspresi gen COL1A1 yang signifikan pada kelompok tersebut.

5.2. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan radiasi penyinaran UVB untuk menurunkan kolagen dan dilakukan pemeriksaan ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1 setelah penyinaran. Hasil induksi penyinaran UVB pada tikus wistar menunjukkan penurunan kolagen yang terlihat pada pengecatan *Masson Trichome*. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa dengan waktu penyinaran 15 menit dengan dosis 160 mJ/cm² selama 5 hari dapat menurunkan kolagen pada kulit tikus.

Ekstrak kulit buah naga merah telah melalui uji kualitatif skrining fitokimia, dari uji tersebut terdapat alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, steroid, dan triterpenoid, hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu. Hasil kadar rata-rata flavonoid total adalah $53,28 \pm 0,66$.

Paparan sinar UVB dapat menurunkan kolagen dan fosforilasi jalur MAPK. Penurunan kolagen akibat radiasi UVB dibagi menjadi 2 jalur yaitu stimulasi pemecahan kolagen dan penurunan produksi kolagen³⁹. Fosforilasi jalur MAPK akan mengaktifkan jalur pensinyalan Nf-kB, AP-1, dan MMP-1³³. Induksi AP-1 menyebabkan penurunan ekspresi gen prokolagen tipe 1 dan 3. Ekspresi TGF-beta yang merupakan regulator mayor produksi prokolagen tipe 1 mengalami penurunan akibat adanya AP-1. AP-1 faktor transkripsi yang terdiri dari c-Fos dan c-Jun dimana memiliki fungsi terhadap transkripsi MMP-1. MMP-1 bertanggung jawab terhadap pemecahan kolagen tipe 1¹⁶. Pada penuaan kulit, transkripsi gen kolagen tipe 1 dipengaruhi oleh jalur Nf-kB. Aktivasi Nf-kB menginduksi up-regulasi ekspresi sitokin pro

inflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IFN- γ . Sitokin yang diinduksi merupakan stimulator kuat untuk ekspresi MMP-1⁴⁰.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa flavonoid pada tumbuhan efektif dalam menurunkan insiden *photoaging* melalui aksinya sebagai anti inflamasi, antioksidan, dan fotoprotektif. Antosianin tersebar luas pada berbagai macam sayuran, buah, dan biji-bijian memiliki aktivitas sebagai antioksidan, anti inflamasi, dan anti bakteri. Antosianin pada ekstrak beras hitam⁴¹. Antosianin yang didapat dari ekstrak ubi ungu secara signifikan dapat mensupresi fosforilasi jalur MAPK²⁶. Antosianin bekerja pada ARE melalui jalur KEAP1-Nrf2 dengan mengatur ekspresi gen antioksidan fase II sehingga sel akan terlindungi dari stres oksidatif⁴². Antosianin pada penelitian sebelumnya dapat mengontrol ekspresi dan sekresi faktor inflamasi dengan menghambat transkripsi Nf-kB⁴³.

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian krim ekstrak kulit buah naga merah super merah menurunkan ekspresi gen MMP-1 dengan dosis 5% dan 10% pada kulit tikus wistar yang dipapar UVB. Hasil ini memiliki perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini diduga karena kandungan antosianin yang terdapat di dalam kulit buah naga merah berperan sebagai scavenger radikal bebas sehingga menghambat kerusakan yang dimediasi ROS³⁷. Selain berperan sebagai antioksidan, penurunan ekspresi gen MMP-1 juga dapat turun karena peran antosianin menurunkan ekspresi jalur MAPK sehingga menghambat ekspresi AP-1, Nf-kB, dan MMP-1^{41,43}. Paparan sinar UVB menyebabkan penurunan

ekspresi Nrf2, dengan pemberian antosianin diduga meningkatkan ekspresi Nrf2 sehingga pertahanan antioksidan endogen meningkat⁴².

Sejalan dengan hal tersebut, penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan ekspresi gen COL1A1 secara signifikan pada kelompok P1 dan P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Penelitian terdahulu mengatakan, pemberian krim ekstrak jagung ungu meningkatkan deposit kolagen pada kultur fibroblas manusia yang dipapar UVB⁴⁴. Penelitian lain mengatakan, terjadi upregulasi ekspresi kolagen tipe 1 setelah pemberian krim ekstrak beras hitam⁴¹. Dari pembahasan tersebut, pemberian krim ekstrak kulit buah naga merah dapat digunakan untuk memperbaiki kerusakan kulit dan mempertahankan stabilitas kulit dari paparan sinar UVB.

5.3. Keterbatasan Penelitian

Peneliti tidak melakukan pengukuran ekspresi gen AP-1, kadar sitokin pro inflamasi, ekspresi gen Nf-kB, dan kadar GSH baik sebelum perlakuan maupun sesudah perlakuan, sehingga tidak diketahui kadarnya.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- 6.1.1. Krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% menurunkan ekspresi gen MMP-1 dan meningkatkan ekspresi gen COL1A1 pada tikus jantan galur wistar yang mengalami penurunan kolagen.
- 6.1.2. Krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 10% menurunkan ekspresi gen MMP-1 dan meningkatkan ekspresi gen COL1A1 pada tikus jantan galur wistar yang mengalami penurunan kolagen.
- 6.1.3. Krim ekstrak kulit buah naga super merah dosis 5% sudah menurunkan ekspresi gen MMP-1 dan meningkatkan ekspresi gen COL1A1.

6.2. Saran

- 6.2.1. Perlu dilakukan pengembangan penelitian untuk ekspresi gen AP-1 sebelum dan sesudah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah untuk mengetahui mekanisme perbaikan *photodamage*.
- 6.2.2. Perlu dilakukan pengembangan penelitian untuk ekspresi gen Nf-kB sebelum dan sesudah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah untuk mengetahui mekanisme perbaikan *photodamage*.
- 6.2.3. Perlu dilakukan pengembangan penelitian untuk kadar sitokin proinflamasi sebelum dan sesudah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah untuk mengetahui mekanisme perbaikan *photodamage*.

- 6.2.4. Perlu dilakukan pengembangan penelitian untuk kadar GSH sebelum dan sesudah pemberian krim ekstrak kulit buah naga super merah untuk mengetahui mekanisme perbaikan *photodamage*.



DAFTAR PUSTAKA

1. Sonal Choudhary, MD; Jennifer Carol Tang, BS; Angel Leiva; Keyvan Nouri M. Photodamage, Part 1: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Photoprotection. *Cosmetic Dermatology*. 2010;
2. Sonal Choudhary, MD; Jennifer Carol Tang, BS; Angel Leiva; Keyvan Nouri M. Photodamage, Part 1: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Photoprotection. *Cosmetic Dermatology*. 2010;
3. Yolanda , Rosi Helfrich, MD., Dana, L., Sachs, MD., John J, Voorhees. M. Overview of Skin Aging and Photoaging. *Dermatology Nursing*. 2008. 177–183 p.
4. Brenneisen P, Sies H SKK. Ultraviolet B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;
5. Baswan SM, Leverett J PJ. Clinical evaluation of the lightening effect of cytidine on hyperpigmented skin. *J Cosmet Dermatol*. 2019;
6. Miny Samuel, corresponding author Rebecca Brooke, Sally Hollis and CEG. Interventions for photodamaged skin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;
7. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. Vol. 31, *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 65–74.
8. Beckenbach L, Baron JM, Merk HF, Löffler H, Amann PM. Retinoid treatment of skin diseases. Vol. 25, *European Journal of Dermatology*. John Libbey Eurotext; 2015. p. 384–91.
9. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*. 2017;61(1).
10. Savoia P, Raina G, Camillo L, Farruggio S, Mary D, Veronese F, et al. Anti-oxidative effects of 17 β -estradiol and genistein in human skin fibroblasts and keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2018;92(1):62–77.
11. Jo K, Bae GY, Cho K, Park SS, Suh HJ, Hong KB. An anthocyanin-enriched extract from *vaccinium uliginosum* improves signs of skin aging in uvb-induced photodamage. *Antioxidants*. 2020;9(9):1–13.

12. Yukke Nilla Permata, Atina Husaana C. PENGARUH KRIM EKSTRAK UBI UNGU (*Ipomoea Batatas* Var *Ayumurasaki*) TERHADAP MATRIKS METALLOPROTEINASE-1 DAN JUMLAH KOLAGEN DERMIS TIPE-I DAN TIPE-III (Penelitian Eksperimental Pada Mencit BALB/c yang Dipapar Sinar UV-B). *Tunas Medika Jurnal Kedokteran & Kesehatan*. 2021;
13. Lee HJ, Im AR, Kim SM, Kang HS, Lee JD, Chae S. The flavonoid hesperidin exerts anti-photoaging effect by downregulating matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression via mitogen activated protein kinase (MAPK)-dependent signaling pathways. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):1–9.
14. Reilly DM, Lozano J. Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. *Plast Aesthet Res*. 2021;2021.
15. Wongnapa Nakyai¹, Aurasorn Saraphanchotiwitthaya¹, Céline Viennet², Philippe Humbert^{*2} and Jarupa Viyoch. An In Vitro Model for Fibroblast Photoaging Comparing Single and Repeated UVA Irradiations. *Photochem Photobiol*. 2017;
16. Pittayapruek P, Meehansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
17. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, Juarranz A, Devmurari A, Chalensouk-Khaosaat J, et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants*. 2015;4(2):248–68.
18. Pavida Pittayapruek ¹ , Jitlada Meehansan ² , Ornicha Prapapan ³ , Mayumi Komine ⁴ MO. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;
19. Terra VA, Souza-Neto FP, Frade MAC, Ramalho LNZ, Andrade TAM, Pasta AAC, et al. Genistein prevents ultraviolet B radiation-induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation. *J Photochem Photobiol B*. 2015;144:20–7.
20. Meidayanti Putri N, Gunawan I, Suarsa I. Aktivitas Antioksidan Antosianin Dalam Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Super Merah (*Hylocereus Costaricensis*) Dan Analisis Kadar Totalnya. *Jurnal Kimia*. 2015;9(2):243–51.
21. Sander, C. S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P., Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004;

22. Maria Cavinato, Birgit Waltenberger, Giorgia Baraldo, Carla V. C. Grade HS& PJD. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 2017;
23. Sun, L., W. He, G. Xin, P. Cai, Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Wei, B. Sun and XW. Volatile components, total phenolic compounds, and antioxidant capacities of worm-infected *Gomphidius rutilus*. *Food Science and Human Wellness*. 2018;
24. Abdel-Aal JS and ESM. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*. 2010;
25. Wang , LS., Stoner GD. Anthocyanins And Their Role in Cancer Prevention. Department of Internal Medicine and Comprehensive Cancer Center, Ohio State University College of Medicine, Columbus. 2008;
26. Zhi, Q., Lei, L., Li, F., Zhao, J., Yin, R., & Ming J. The anthocyanin extracts from purple-fleshed sweet potato exhibited anti-photoaging effects on ultraviolet B-irradiated BALB/c-nu mouse skin. *J Funct Foods*. 2019;
27. Li K, Zhang M, Chen H, Peng J, Jiang F, Shi X, et al. Anthocyanins from black peanut skin protect against UV-B induced keratinocyte cell and skin oxidative damage through activating Nrf 2 signaling. *Food Funct*. 2019 Oct 1;10(10):6815–28.
28. Gao W, Wang Y shuai, Hwang E, Lin P, Bae J, Seo SA, et al. *Rubus idaeus* L. (red raspberry) blocks UVB-induced MMP production and promotes type I procollagen synthesis via inhibition of MAPK/AP-1, NF- κ B and stimulation of TGF- β /Smad, Nrf2 in normal human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Aug 1;185:241–53.
29. Poljšak B, Dahmane R. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol Res Pract*. 2012;2012.
30. Brugè F, Tiano L, Astolfi P, Emanuelli M, Damiani E. Prevention of UVA-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts by new UV filters, assessed using a novel In Vitro experimental system. *PLoS One*. 2014;9(1).
31. Wagener FADTG, Carels CE, Lundvig DMS. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9126–67.
32. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(11):2015–25.

33. Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM, et al. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2012;674(2–3):80–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.016>
34. Wang L, Lee WW, Oh JY, Cui YR, Ryu BM, Jeon YJ. Protective effect of sulfated polysaccharides from celluclast-assisted extract of hizikia fusiforme against ultraviolet B-induced skin damage by regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs signaling pathways in vitro in human dermal fibroblasts. *Mar Drugs*. 2018;16(7).
35. Bell S, Degitz K, Quirling M, Jilg N, Page S, Brand K. Involvement of NF- κ B signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal*. 2003;15(1):1–7.
36. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK, et al. Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- κ B. *Int J Mol Med*. 2013;31(2):477–83.
37. Nichols JA, Santosh K Katiyar. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch dermatol Res* [Internet]. 2010; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19898857/>
38. Garcia C, Blesso CN. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. Vol. 172, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2021. p. 152–66.
39. Wang J, Lian W, Cao Y, Wang X, Wang G, Qi C, et al. Overexpression of BoNAC019, a NAC transcription factor from Brassica oleracea, negatively regulates the dehydration response and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
40. Bigot N, Beauchef G, Hervieu M, Oddos T, Demoor M, Boumediene K, et al. NF- κ B accumulation associated with COL1A1 transactivators defects during chronological aging represses type I collagen expression through a 112/61-bp region of the COL1A1 promoter in human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(10):2360–7.
41. Palungwachira P, Tancharoen S, Phruksaniyom C, Klungsaeng S, Srichan R, Kikuchi K, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Anthocyanins Extracted from *Oryza sativa* L. In *Primary Dermal Fibroblasts*. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.

42. Li K, Zhang M, Chen H, Peng J, Jiang F, Shi X, et al. Anthocyanins from black peanut skin protect against UV-B induced keratinocyte cell and skin oxidative damage through activating Nrf 2 signaling. *Food Funct.* 2019 Oct 1;10(10):6815–28.
43. Ying-Yu Cui C, Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer LINKED ARTICLES. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2017;174:1226. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v174.11/>
44. Rimdusit T, Thapphasaraphong S, Puthongking P, Priprem A. Effects of anthocyanins and melatonin from purple waxy corn by-products on collagen production by cultured human fibroblasts. *Nat Prod Commun.* 2019;14(7).

