

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP
EKSPRESI GEN α -SMA DAN KOLAGEN TIPE 1
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi
yang Terpapar UVB)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:
Cici Rahma Ustika
MBK 2118010252

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

TESIS
PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP
EKSPRESI GEN α -SMA DAN KOLAGEN TIPE 1
(Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi
yang Terpapar UVB)

Disusun oleh :

Cici Rahma Ustika
(MBK 2118010252)

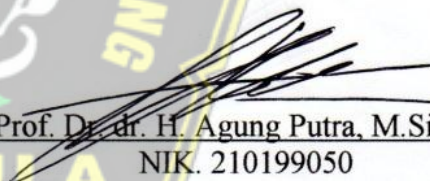
Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 6 Desember 2023 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. dr. Sri Priyantini, Sp.A
NIK. 210105097


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

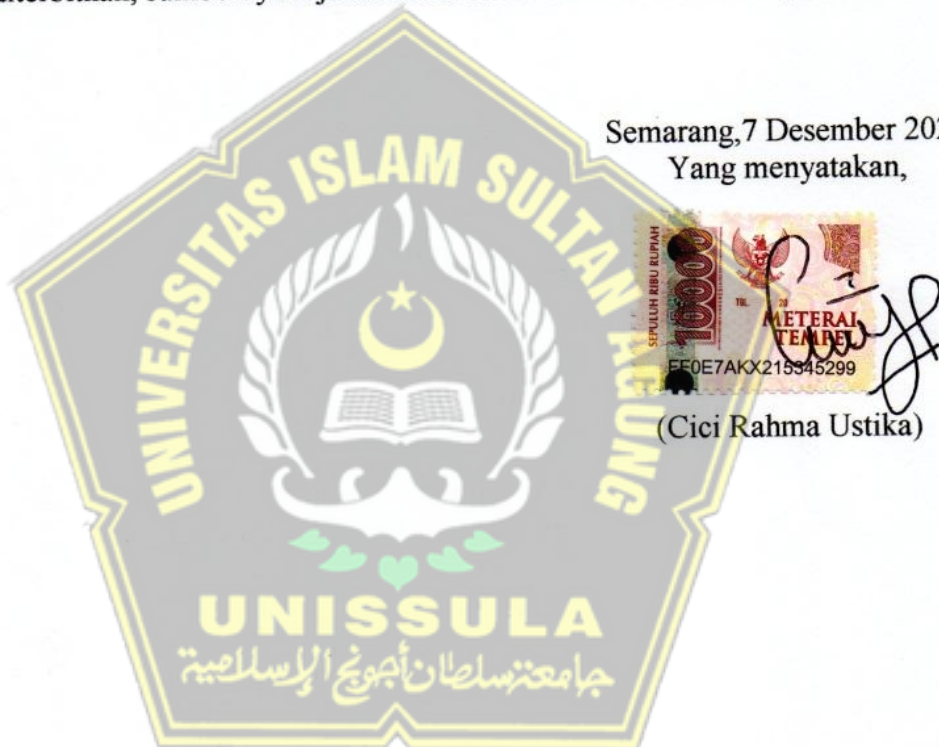
Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula


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

PERNYATAAN

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

Semarang, 7 Desember 2023
Yang menyatakan,



(Cici Rahma Ustika)

ABSTRAK

Latar belakang: Paparan Sinar UVB dengan intensitas tinggi secara berkepanjangan dapat menginduksi terbentuknya Reactive Oksigen Species (ROS) yang menyebabkan inhibisi *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) sehingga menghambat sintesis kolagen tipe 1. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit petai diketahui berperan dalam menghambat produksi ROS akibat paparan sinar UVB. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan ekspresi gen kolagen tipe 1 pada jaringan kulit tikus yang terpapar UVB intensitas tinggi.

Metode: Desain penelitian ini posttest only control grup dengan metode rancang acak lengkap. Sampel yang diteliti 24 ekor tikus dengan paparan sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm dan energi 390mj/cm²/hari sebanyak 3 kali seminggu selama 2 minggu. Penelitian ini dilakukan empat kelompok yaitu kelompok sehat (K1), kelompok kontrol negatif (K2), perlakuan 1 (K3) dengan gel ekstrak kulit petai 10% dan perlakuan 2 (K4) dengan gel ekstrak kulit petai 20%. Ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Analisis qRT-PCR menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata ekspresi relatif gen α -SMA yang signifikan antara K4 ($3,11 \pm 1,08$) dibandingkan kontrol negatif ($0,67 \pm 0,17$) dengan nilai $p < 0,05$. Analisis ekspresi gen kolagen tipe 1 juga menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata ekspresi gen kolagen tipe 1 yang signifikan pada K3 ($2,21 \pm 0,68$) dan K4 ($2,12 \pm 0,73$) dibandingkan kontrol negatif ($0,51 \pm 0,14$) dengan nilai $p < 0,05$.

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak kulit petai dapat meningkatkan ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

Kata kunci : Paparan UVB, ekstrak kulit petai, α -SMA, kolagen tipe 1.

ABSTRACT

Background: Prolonged exposure to high-intensity UVB radiation can induce the formation of Reactive Oxygen Species (ROS), leading to the inhibition of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and, consequently, impeding the synthesis of collagen type 1. Compounds present in the extract of stink bean peel are known to play a role in inhibiting ROS production due to UVB exposure. This study aims to investigate the effect of applying stink bean peel extract gel on the expression of α -SMA and collagen type 1 genes in the skin tissue of rats exposed to high-intensity UVB.

Method: The research design employed a posttest-only control group with a complete random design. The study included 24 rats exposed to UVB radiation with a wavelength of 302 nm and energy of 390 mj/cm²/day three times a week for two weeks. The study comprised four groups: a healthy group (K1), a negative control group (K2), treatment 1 (K3) with 10% stink bean peel extract gel, and treatment 2 (K4) with 20% stink bean peel extract gel. The expression of α -SMA and collagen type 1 genes was analyzed using qRT-PCR.

Results: qRT-PCR analysis indicated a significant increase in the mean relative expression of the α -SMA gene in K4 (3.11 ± 1.08) compared to the negative control (0.67 ± 0.17) with a p-value < 0.05 . Analysis of collagen type 1 gene expression also showed a significant increase in mean expression in K3 (2.21 ± 0.68) and K4 (2.12 ± 0.73) compared to the negative control (0.51 ± 0.14) with a p-value < 0.05 .

Conclusion: The administration of stink bean peel extract gel can enhance the expression of α -SMA and collagen type 1 genes in a rat model of hyperpigmentation exposed to UVB radiation.

Keywords: UVB exposure, stink bean peel extract, α -SMA, collagen type 1.

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Cici Rahma Ustika
Tempat, tanggal lahir : Ambon, 20 Maret 1991
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Ibu Jenab 1 Cianjur : Lulus tahun 2003
2. SMPN 7 Medan : Lulus tahun 2006
3. SMAT KRIDA NUSANTARA : Lulus tahun 2009
4. FK Universitas Jenderal Achmad Yani : Lulus tahun 2014
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2021— sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. RS Bhayangkara Bogor (2019-2019)
2. Poliklinik Yonzipur 10/K Pasuruan (2019-2020)
3. Danoufa Aesthetic & Laser Clinic (2020-2021)
4. Rinanda skincare Bogor (2021— sekarang)

D. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua :

Ayah : H. Nono Suharsono, S.I.P., M.Si

Ibu : Hj. Andi Aminah

Nama Suami : Muhamad Agusetiadi, S.Hub.Int

Nama Anak : 1. Azifhran Ramdan Djoharsono
2. Adrian Afnan Djoharsono
3. Bianca Almahyra Djoharsono

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP EKSPRESI GEN α -SMA DAN KOLAGEN TIPE 1 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)** Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen penguji yang telah bersedia meluangkan waktu untuk memberi arahan dan masukan pada penulis.
- 3 Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen

pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

4. Dr. dr. Sri Priyantini, Sp. A selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. KK(K) dan Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarwati, M.Kes selaku dosen penguji yang banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis.
6. Seluruh staf pengajar dan staf administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat serta bantuan selama ini melaksanakan Pendidikan.
7. Segenap Staf Laboratorium SCCR Semarang, Mas Ariq, Mas Ifan, Mba Dina, Mas Ardi, Mas Husein, Mba Santi yang telah banyak membantu penulis dalam proses menyelesaikan tugas akhir.
8. Orang tua (kukung, yangti, abah, oma), Suami dan anak-anak tercinta, serta Keluarga dan pasien-pasien loyal yang selalu mendukung dan mendoakan penulis selama melaksanakan Pendidikan magister biomedik.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Desember 2023
Penulis,

(Cici Rahma Ustika)



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i> (α -SMA)	8
2.1.1. Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen .	8
2.2. Kolagen Tipe 1	10
2.2.1. Definisi Kolagen Tipe 1	10
2.2.2. Jenis Kolagen.....	11
2.2.3. Mekanisme Kerusakan Kolagen.....	13

2.2.4. Sintesis Kolagen	14
2.2.5. Sintesis Prokollagen	14
2.3. Gel ekstrak Kulit Petai	18
2.3.1. Definisi Gel ekstrak Kulit Petai.....	18
2.3.2. Kandungan Senyawa Aktif Kulit Petai.....	19
2.3.3. Manfaat Kulit Petai pada Penuaan Dini	20
2.3.4. Manfaat Kulit Petai pada Penurunan Kolagen	20
2.4. Efek Kulit Petai Terhadap Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen tipe 1.....	21
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	23
3.1. Kerangka Teori.....	23
3.2. Kerangka Konsep	26
3.3. Hipotesis.....	26
BAB IV METODE PENELITIAN	27
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	27
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	28
4.2.1. Variabel Penelitian	28
4.2.2. Definisi Operasional	28
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	29
4.3.1. Subjek Penelitian.....	29
4.3.2. Sampel Penelitian	30
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian	31
4.3.4. Besar Sampel	31
4.4. Alat dan Bahan	32
4.4.1. Alat	32
4.4.2. Bahan	32
4.5. Cara Penelitian	32
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	32
4.5.2. Cara Pembuatan Gel ekstrak Kulit Petai	33
4.5.3. Pembuatan Gel ekstrak Kulit Petai.....	33
4.5.4. Pemeriksaan Kandungan Alkaloid	34
4.5.5. Pemeriksaan Kandungan Saponin	34

4.5.6. Pemeriksaan Kandungan Tanin.....	35
4.5.7. Pemeriksaan Kandungan Flavonoid	35
4.5.8. Pemeriksaan Kandungan Steroid dan Triterpenoid.....	36
4.5.9. Pemeriksaan Flavonoid Total Gel ekstrak Kulit Petai.....	36
4.5.10. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB	38
4.5.11. Validasi Peningkatan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin.....	38
4.5.12. Pengambilan Sampel Jaringan.....	39
4.5.13. Analisis Kuantitatif Ekspresi α -SMA dan Kolagen Tipe 1 menggunakan RT-PCR.....	40
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	41
4.7. Analisa Data	41
4.8. Alur Penelitian.....	43
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	44
5.1. Hasil Penelitian	44
5.1.1. Gel ekstraksi Kulit Petai	44
5.1.2. Validasi Model Hiperpigmentasi.....	45
5.1.3. Efek Pemberian Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen α -SMA	46
5.1.4. Efek Pemberian Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen Kolagen Tipe 1.....	49
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	51
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1. Kesimpulan.....	55
6.2. Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β	10
Gambar 2.2.	Ilustrasi skematis ekspresi dan lokalisasi kolagen individu di kulit.....	12
Gambar 2.3.	Sintesis Kolagen	17
Gambar 2.4.	Kulit Petai	19
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	25
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	26
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	27
Gambar 4.2.	Validasi jumlah melanin dengan Fontana-Masson.....	39
Gambar 4.3.	Alur Penelitian.....	43
Gambar 5.1.	Validasi hiperpigmentasi dengan pewarnaan fontana masson (A) Tikus sehat dan (B) Tikus yang mendapatkan irradiasi UVB.	46
Gambar 5.2.	Grafik ekspresi gen α -SMA Pada Seluruh Kelompok Penelitian .	48
Gambar 5.3.	Grafik ekspresi gen kolagen tipe 1 pada seluruh kelompok penelitian	50

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1.	Formula gel ekstrak kulit petai	34
Tabel 4.2.	Komponen PCR Mix	41
Tabel 5.1.	Data hasil Penelitian Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen Tipe 1.....	46
Tabel 5.2.	Uji Mann Whitney ekspresi gen α -SMA pada Masing-masing Kelompok.....	48
Tabel 5.3.	Uji Mann-Whitney densitas kolagen pada Masing-masing Kelompok.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearence</i>	65
Lampiran 2.	Analisis statistik	66
Lampiran 3.	Hasil skrining fitokimia.....	70
Lampiran 4.	Uji Kuantitatif Gel ekstrak.....	71
Lampiran 5.	Foto Kegiatan Penelitian.....	72



DAFTAR SINGKATAN

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

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

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) yang diemisikan oleh matahari dapat memicu timbulnya berbagai masalah kulit seperti hiperpigmentasi.¹ Paparan Sinar UVB secara berkepanjangan dapat menginduksi terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) pada kulit yang mengaktifasi sitokin pro inflamasi sehingga meningkatkan produksi melanin.² Peningkatan ROS juga menghambat proliferasi sel fibroblast yang ditandai dengan penurunan ekspresi *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) dan peningkatan degradasi kolagen tipe 1.³⁻⁵ Tingginya penurunan ekspresi α -SMA dan penghambatan ekspresi gen kolagen tipe 1 berdampak pada berkurangnya densitas kolagen dan peningkatan produksi melanin yang menyebabkan timbulnya hiperpigmentasi.^{6,7}

Pemberian antioksidan terbukti dapat menurunkan kadar ROS sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada inisiasi sintesis kolagen tipe 1.⁸ Kulit petai (*Parkia speciosa*) diketahui memiliki kandungan senyawa antioksidan tinggi seperti flavonoid (quercetin, luteolin), alkaloid, tannin, dan saponin yang mampu mengurangi kadar ROS.^{9,10} Penggunaan senyawa antioksidan dapat menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu produksi α -SMA melalui aktivasi *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) yang berperan dalam produksi kolagen dengan mengaktifasi kompleks SMAD *family member 2/3* (smad2/3).^{11,12}

Aktivasi ini akan menginduksi perubahan fibroblast menjadi myofibroblast sehingga mengekspresikan α -SMA.¹³ Senyawa polifenol kulit petai seperti *cinnamic acid*, *isoferulic acid*, *caffeic acid*, dan *ferulic acid* memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat degradasi melanosit sehingga tidak terjadi hipermelanogenesis.^{10,14}

Beberapa terapi standart hiperpigmentasi seperti retinol, hidrokuinon, dan asam tranexamat menyebabkan timbulnya kanker pada penggunaan jangka panjang.¹⁵ Pengobatan standar hiperpigmentasi kulit berfokus pada perlindungan fisik dan kimia terhadap paparan UVB tanpa mempengaruhi jalur produksi melanin.¹⁶ Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan untuk mencegah hiperpigmentasi akibat paparan UVB, salah satunya menggunakan senyawa antioksidan alami.

Pada tahun 2015, 4.2% dari 142 subjek positif mengalami hiperpigmentasi setelah terpapar tiga kali UVB dengan *minimal erythema dose* (MED) 390mj/cm². Kasus hiperpigmentasi semakin meningkat pada tahun 2020 hingga ~100.350 kasus baru.¹⁷ Kultur sel primer fibroblast yang terpapar UVB 40-60% nya menunjukkan peningkatan sitokin proinflamasi, penurunan proliferasi, penurunan ekspresi α -SMA¹⁸, dan penurunan sintesis kolagen baik kolagen tipe 1 dan kolagen tipe 3 yang menyebabkan peningkatan produksi melanin.^{19,20} Namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada kulit hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian gel ekstrak mengandung flavonoid dan polifenol secara topikal ataupun oral dapat menurunkan ROS²¹ sehingga berpotensi untuk membuktikan pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai yang diberikan terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada kulit tikus hiperpigmentasi yang terinduksi sinar UVB. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus galur wistar hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pemberian gel ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% dapat meningkatkan ekspresi gen α -SMA pada tikus

jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

- b. Membuktikan pemberian gel ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% dapat meningkatkan ekspresi gen kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada kasus hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan gel ekstrak kulit petai dalam mencegah hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB pada kulit.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Hwee-Leng siow, Gan Chee-Yuen, 2013 ¹⁰	<i>Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from Parkia speciosa seeds</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Gel ekstrak petai memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC ₅₀ 80.2 ug/ml
2	Nor-Hidayah Mustafa, Azizah Ugusman, Juriyati Jalil, Yusof Kamisah, 2018 ²²	<i>Anti-inflammatory property of Parkia speciosa empty pod extract in human embilical vein endothelial celss</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Gel ekstrak etanol <i>Parkia speciosa</i> dosis 25ug/ml memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan ekspresi Nf-kB p65, iNOS, COX-2, dan VCAM-1 pada sel HUVEC.
3	J S Gui, J Jalil, Z Jubri, Y Kamisah, 2019 ²³	<i>Parkia speciosa empy pod extract exerts anti-inflammatory properties by modulating NfκB and MAPK pathways in cardiomyocytes exposed to tumor necrosis factor-α</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Gel ekstrak <i>Parkia speciosa</i> 500ug/ml menurunkan ekspresi NF-kB p65, p38 MAPK, iNOS pada sel H9c2 cardiomyocytes
4	Zukhiroh, Agung Putra, Chodidjah, Titiek Sumarawati, Prosetyowati Subchan, Setyo Trisnadi, Nurul Hidayah,	<i>Effect of Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats</i>	Eksperimental, <i>Invivo</i>	Induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur wistar dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm ² sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan <i>spesifik staining</i> melanin pada hari ke 14.

Nur Dina
Amalina²⁴

5	Irah Yunita Iqbal ²⁵	<i>Pemberian Krim Gel ekstrak Etanol Biji Petai 20% sama efektif dengan krim hidrokuinon 4% dalam menghambat pembentukan jumlah melanin pada kulit marmot yang dipapar sinar UVB</i>	Eksperimental, invivo	Gel ekstrak etanol biji petai konsentrasi 20% menghambat pembentuka melanin pada kulit marmot yang diinduksi UVB
---	------------------------------------	--	--------------------------	--

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian gel ekstrak petai memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 80.2 ug/ml.¹⁰ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa gel ekstrak etanol *Parkia speciosa* dosis 25ug/ml memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan ekspresi NF-kB p65, iNOS, COX-2, dan VCAM-1 pada sel HUVEC.²² Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa gel ekstrak *Parkia speciosa* 500ug/ml menurunkan ekspresi NF-kB p65, p38 MAPK, iNOS pada sel H9c2 cardiomyocytes.²³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi

sinar UVB dan di analisis ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur wistar dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm² sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan *spesifik staining* melanin pada hari ke 14.²⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1. Penelitian terdahulu melaporkan gel ekstrak etanol biji petai konsentrasi 20% menghambat pembentukan melanin pada kulit marmot yang diinduksi UVB.²⁵ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)*

Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) adalah isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42 kDa. α -SMA diekspresikan oleh *myofibroblast* dan ekspresi α -SMA berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast* ²⁶. *Myofibroblast* merupakan bentuk sel fibroblas yang telah berdiferensiasi sebagian menuju fenotipe *smooth-muscle* termasuk ke dalam fibroblas metabolik, dan memiliki morfologis yang khas. *Myofibroblast* yang teraktivasi akan berhenti berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak ²⁷. α -SMA yang diekspresikan oleh *myofibroblast* merupakan sumber utama kolagen fibrillar, yaitu kolagen tipe I, II, III, V, dan XI yang sangat penting untuk *tensile strength* dan *mechanical properties* kulit, sehingga mencegah kerutan dan pigmentasi kulit ^{28,29}.

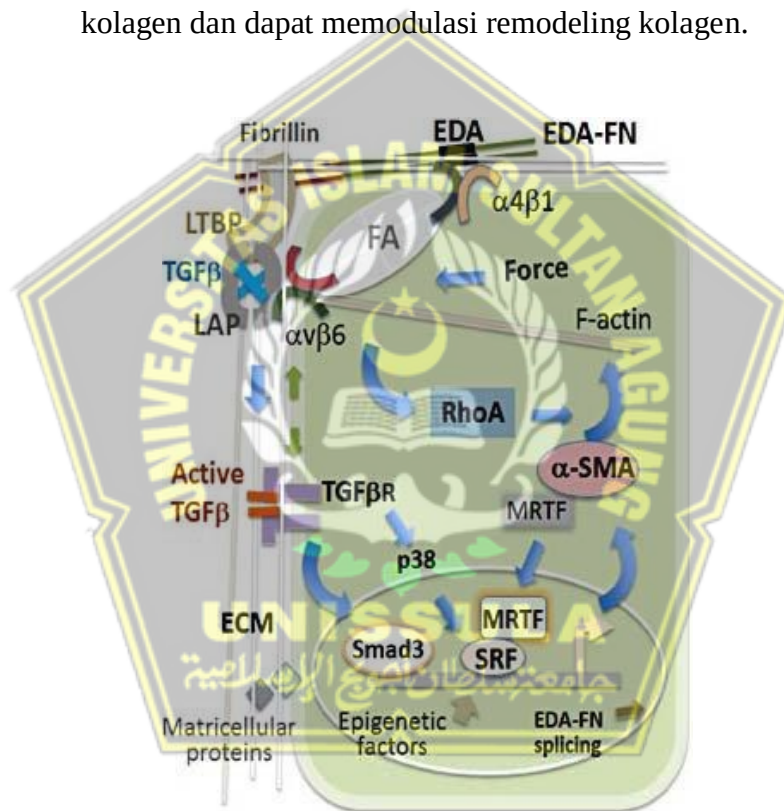
2.1.1. Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen

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

Adanya luka terbuka dapat menginduksi penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel yang disebut dengan photoaging.³⁰ Photoaging merupakan perubahan karakteristik pada kulit akibat paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi radikal bebas dan peroksidasi lipid dalam sel dan merusak serat kolagen dan serat elastis di jaringan dermal. Interaksi serat kolagen, fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler, seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler, seperti α -SMA.

α -SMA adalah *stress fibers* yang terlibat dalam aktivitas kontraktile fibroblas dan reorganisasi kolagen⁹. *Myofibroblast* yang mengekspresikan α -SMA diregulasi oleh sitokin *transforming growth factor beta* (TGF- β). TGF- β 1 yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β *receptor* (TGF- β R) yang menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA. Transduksi mekanis ECM ke sel melalui jalur *focal adhesion* (FA) mengaktifkan RhoA yang mengarah pada produksi *stress fibers* α -SMA^{31,32}. Selain itu, *extra-domain A containing fibronectin* (EDA-FN) yang diaktifkan TGF- β 1 meningkatkan protein EDA-FN dalam ECM dan kontraksi sel yang dilakukan oleh *stress fibers* α -SMA mengubah konformasi *latency associated peptide* (LAP) melalui interaksi integrin/LAP yang melepaskan TGF- β 1 dari LAP^{33,34}.

Perakitan G-aktin (monomer α -SMA) menjadi F-aktin (*stress fibers*) memungkinkan keluarnya *myocardin-related transcription factor* (MRTF) dari sekuestrasi G-aktin di sitosol dan translokasi nuklirnya serta aktivasi *serum response factor* (SRF), yang pada gilirannya menyebarkan α -SMA dan produksi *stress fibers* (Gambar 2.1). Produksi α -SMA yang meningkat menyebabkan terjadinya sintesis kolagen dan dapat memodulasi remodeling kolagen.



Gambar 2.1. Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β^{28}

2.2. Kolagen Tipe 1

2.2.1. Definisi Kolagen Tipe 1

Kolagen tipe 1 adalah komponen matriks ekstraseluler tertua di dunia hewan. Saat ini, 29 trimer homo dan hetero telah diidentifikasi,

semuanya memiliki kesamaan pengulangan asam amino $[Gly-X-Y]_n$ yang membedakan struktur primernya dari protein lain dan memungkinkan struktur kuaterner khas, heliks rangkap tiga.³⁵ Berdasarkan struktur agregat, kolagen telah diklasifikasikan sebagai kolagen berserat, non-berserat, berserabut dan terkait fibril dengan heliks tiga terputus. Kolagen terdiri dari beberapa jenis, salah satunya adalah kolagen tipe I yang paling melimpah di jaringan mamalia. Sekitar 70-90% dari kolagen yang ditemukan di tubuh merupakan kolagen tipe I. Kolagen tipe I adalah elemen struktural utama dari semua jaringan ikat yang berfungsi untuk menyediakan perancah struktural untuk komponen lain terutama karena jalur pengikatan silang lisil oksidase. Kolagen tipe I juga terkait dengan interaksi sel, migrasi, perlekatan, diferensiasi, dan organisasi.^{36,37}

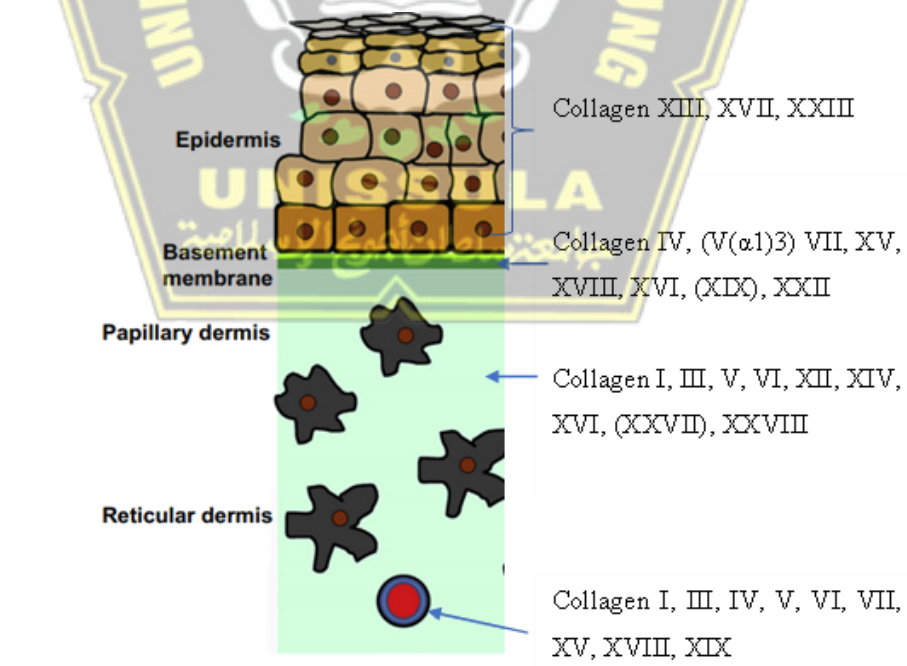
2.2.2. Jenis Kolagen

Kolagen adalah keluarga protein matriks ekstraseluler yang paling melimpah pada vertebrata. Protein dalam superfamili kolagen semuanya memiliki tiga rantai polipeptida dengan urutan berulang - Gly-Xaa-Yaa- yang diperlukan, Xaa dan Yaa tersusun atas prolin dan 4-hidroksiprolin masing-masing. Saat ini, kolagen diklasifikasikan ke dalam 28 jenis sebagai tipe I, II, III, ..., XXVIII. Kolagen tersebut juga disebut 'kolagen tipe N', atau 'kolagen N'.³⁸

Berdasarkan 28 jenis yang telah teridentifikasi, kolagen diklasifikasikan sebagai kolagen fibrilar klasik (I, II, III, V, dan XI),

kolagen membran basal (IV), kolagen zona membran basal (XV dan XVIII), kolagen tipe VI, kolagen tipe VII, kolagen rantai pendek (VIII dan X), *fibril-associated collagen with interrupted triple helices* (IX, XII, dan XIV), kolagen mirip FACIT (XVI, XIX, XX, XXI, dan XXII), kolagen transmembran (XIII, XVII, XXIII, dan XXV), kolagen fibrilar baru (XXIV dan XXVII), kolagen tipe XXVI, dan kolagen tipe XXVIII.

Kolagen berkontribusi 70-80% dari berat kering kulit. Berdasarkan 28 jenis kolagen yang diketahui ada bukti bahwa 18 kolagen diekspresikan di kulit baik selama perkembangan atau pada orang dewasa. Hal ini mencerminkan pentingnya komposisi kolagen pada permukaan kulit.



Gambar 2.2. Ilustrasi skematis ekspresi dan lokalisasi kolagen individu di kulit³⁸

2.2.3. Mekanisme Kerusakan Kolagen

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat Ultraviolet. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro* kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMP. Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya³⁹. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UVB pada jaringan kulit. Paparan ultraviolet (panah bergerigi) mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan keratinosit dan fibroblast. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam fibroblas, AP-1 juga menghambat ekspresi gen prokolagen. MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dan memecah kolagen dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna akan mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan

kolagen yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{40,41}.

2.2.4. Sintesis Kolagen

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai prokolagen α , dimana terjalin dalam sisterna retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam kolagen dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁴².

2.2.5. Sintesis Prokollagen

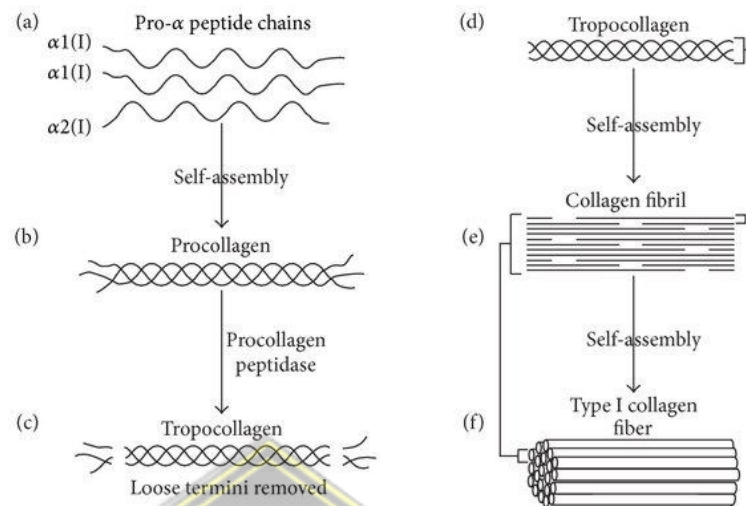
Bentuk *triple helix* dari rantai α berbentuk molekul prokolagen seperti sebuah batang, di mana kolagen tipe 1 dan 2 berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul prokolagen mungkin homotrimerik, di mana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, di mana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai prokolagen α sangat bertanggungjawab atas bermacam-macam tipe dari kolagen dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada kolagen tipe I, II, III, molekul kolagen bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril.⁴³

Kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini. Sintesis dari protein penting ini meliputi beberapa tingkat, di mana disimpulkan pada gambar 2.3⁴⁴:

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

melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.

5. Di luar sel, protease spesifik disebut peptidase prokolagen menyingkirkan perpanjangan propeptida, perubahan dari molekul prokolagen menjadi molekul kolagen. Sekarang ini sesuai untuk pembentukan sendiri kedalam fibril kolagen polimerik, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.
6. Pada beberapa tipe kolagen, fibril berkumpul membentuk fiber. Proteoglikan tertentu dan tipe kolagen (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul kolagen untuk membentuk fibril-fibril dan formasi fiber yang berasal dari fibril dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen ekstraselular matrik lainnya.
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul kolagen, sebuah proses dikatalisis oleh enzim lisil oksidase.



Gambar 2.3. Sintesis Kolagen ⁴⁵

Proses Hidroksilasi dan glikosilasi pada rantai α prokolagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan prokolagen. Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α prokolagen dan produksi kolagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa kolagen yang telah dijelaskan ⁴⁶.

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Massa 1 buah molecular kira-kira 100 kDa, terjalin helix pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan helix, dengan jarak 8,6 nm.

Panjang setiap molekul tropokolagen adalah 300nm dan lebarnya 1,5 nm⁴⁵.

2.3. Ekstrak Kulit Petai

2.3.1. Definisi ekstrak Kulit Petai

Kulit petai (*Parkia speciosa*) merupakan tanaman yang dapat tumbuh di daerah dataran rendah sampai di daerah pegunungan dengan ketinggian 1.500 m di atas permukaan laut. Namun tanaman ini akan tumbuh baik dan berproduksi tinggi pada daerah antara 500 - 1.000 m di atas permukaan laut. Menurut Seidemann (2005), petai (*Parkia speciosa* Hassk.) termasuk suku Mimosaceae dengan klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Capparales

Famili : Fabales

Genus : Mimosaceae

Spesies : *Parkia speciosa* Hassk.



Gambar 2.4. Kulit Petai
(dokumen pribadi)

2.3.2. Kandungan Senyawa Aktif Kulit Petai

Kulit petai dapat dijadikan sebagai sumber energi, memiliki protein, karbohidrat, fosfor, vitamin A, dan zat besi. Petai juga mengandung vitamin C yang cukup tinggi dan vitamin C sangat penting peranannya dalam proses hidroksilasi asam amino prolin dan lisin menjadi hidroksi prolin dan hidroksi lisin. Perannya adalah dalam proses penyembuhan luka serta daya tahan tubuh melawan infeksi dan stress karena aktivitas antioksidan yang tinggi. Tanaman petai mengandung alkaloid, saponin, terpenoid, fenolik, flavonoid, dan tanin. Senyawa yang terkandung pada kulit buah petai antara lain lektin, sisteina, stigmast-4-en-on, polisulfida siklik (heksationana, tetratiana, tritiolana, pentatiepana, pentatiokana, dan tetratiepana, formaldehida, tiol, dan asam tiazolidina-4-karboksilat.¹⁴

2.3.3. Manfaat Kulit Petai pada Penuaan Dini

Paparan UVB diketahui dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan faktor inflamasi yang dapat berujung pada penurunan kolagen hingga terjadinya penuaan dini akibat dari peningkatan enzim matrix metalloproteinase MMP dan penurunan TGF- β .⁴⁷ Peningkatan enzim MMP akan mendegradasi kolagen pada kulit sehingga menyebabkan hilangnya kekenyalan kulit serta timbulnya kerutan pada kulit. Faktor pertumbuhan TGF- β merupakan faktor kunci dalam aktivasi sel fibroblas untuk memproduksi kolagen, sehingga penurunan TGF- β berujung pada penurunan densitas kolagen.^{34,48}

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam kulit petai diketahui mampu menghambat jalur NF- κ B, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF- α yang berperan dalam peningkatan enzim MMP. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa pemberian flavonoid and polifenol mampu meningkatkan densitas kolagen dan mencegah produksi melanin berlebihan pada kulit yang terpapar UVB.⁴⁹

2.3.4. Manfaat Kulit Petai pada Penurunan Kolagen

Berdasarkan penelitian terdahulu Paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF alpha, IL-6, IL-1 yang berakibat pada peningkatan enzim matrix metalloproteinase

(MMP) serta penurunan densitas kolagen. Peningkatan produksi MMP-3 juga dapat berakibat pada aktivasi α -SMA yang merupakan protein kunci dalam apoptosis sel, termasuk sel fibroblast yang merupakan sel utama memproduksi kolagen. Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit sehingga berujung pada hilangnya kekenyalan kulit hingga timbulnya kerutan pada kulit. Hingga saat ini kajian mengenai peran kulit petai dalam memperbaiki kulit yang mengalami penuaan dini akibat paparan UVB masih jarang dilakukan. Namun berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada kulit petai kemungkinan dapat memperbaiki kulit yang mengalami penurunan kolagen. Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam kulit petai diketahui mampu menghambat jalur NF- κ B, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk kadar TNF- α , IL-6 dan IL-1. Penurunan faktor inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti.⁵⁰

2.4. Efek Kulit Petai Terhadap Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen tipe 1

Gel ekstrak kulit petai mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, triterpenoid, dan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Potensi antioksidan yang berasal dari ekstrak kulit petai memiliki kemampuan menekan kadar ROS.²³ Penurunan kadar ROS ini akan menghambat aktivasi NF- κ B

sehingga mencegah ekspresi MMP dalam hal ini MMP-1 yang paling berperan di kulit. MMP-1 adalah mediator utama timbulnya degradasi fibril kolagen dan elastin, sehingga dengan adanya senyawa metabolit sekunder gel ekstrak gel ekstrak kulit petai berperan dalam produksi prokolagen tipe 1.⁵¹

Penurunan kadar ROS dapat memicu aktivasi jalur TGF- β yang berikatan dengan reseptor membrane sel fibroblas akan mengaktifkan protein pada sitoplasma sampai ke nucleus (jalur proliferasi) sehingga terjadi proliferasi fibroblas dan terjadi kenaikan jumlah fibroblast sehingga terjadi produksi kolagen.⁵² Penggunaan senyawa antioksidan dapat mencegah aktivasi jalur MITF yang menyebabkan tyrosinase tidak aktif dan berdampak pada pencegahan produksi melanin berlebihan.⁵⁰

Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa flavonoid secara langsung mampu menghambat ekspresi NF-kB yang secara signifikan menghambat jalur PI3K sehingga terjadi α -SMA yang berujung pada induksi kolagen.^{19,53} α -SMA adalah protein yang menunjukkan aktivitas myofibroblast yang mengendalikan sintesis dan pembentukan kolagen. Studi menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang mengandung berbagai metabolit sekunder dapat meningkatkan aktivitas α -SMA dan meningkatkan sintesis kolagen tipe 1 pada hiperpigmentasi. Maka dengan adanya gel ekstrak kulit petai merupakan kandidat yang mampu mencegah hiperpigmentasi.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

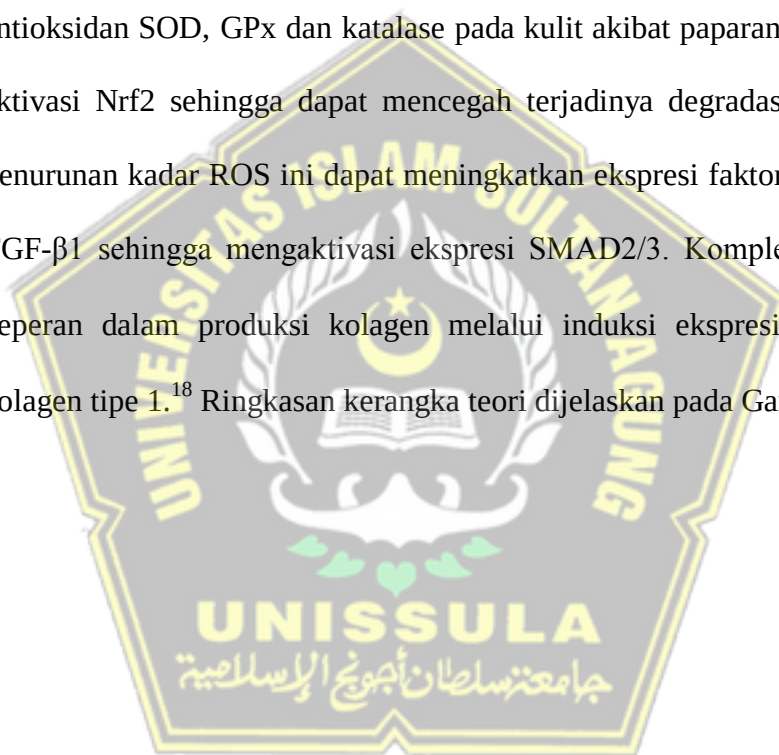
3.1. Kerangka Teori

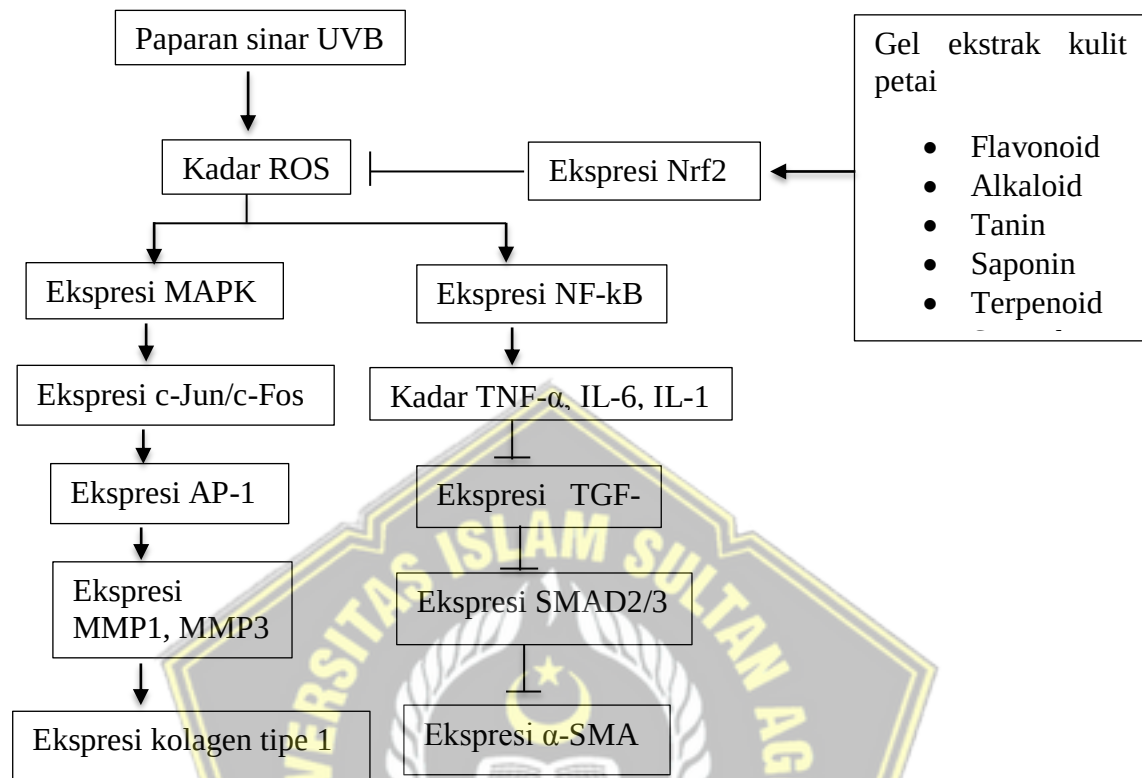
Hiperpigmentasi yang ditandai dengan hilangnya elastisitas kulit dan peningkatan produksi melanin adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV.² Mekanisme hiperpigmentasi pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS.⁵⁴ Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).³⁵ MAPK adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun *NH2-terminal kinase* (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun.^{55,56} Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3 dan mengakibatkan penghambatan sintesis kolagen tipe 1.^{57,58}

ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF- κ B yang bertanggung jawab atas up-regulasi α -SMA pada fibroblas dermal.⁵⁹ Peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF- κ B memproduksi koenzim dan memicu sekresi sitokin inflamasi salah satunya interleukin (IL)-6, TNF- α , dan IL-10. Peningkatan sitokin proinflamasi menghambat ekspresi TGF- β 1 melalui aktivasi kompleks smad2 dan smad3 yang terhambat juga sehingga

berujung pada penurunan ekspresi α -SMA dan sintesis prokolagen 1 sebagai prekursor kolagen tipe 1.⁶⁰

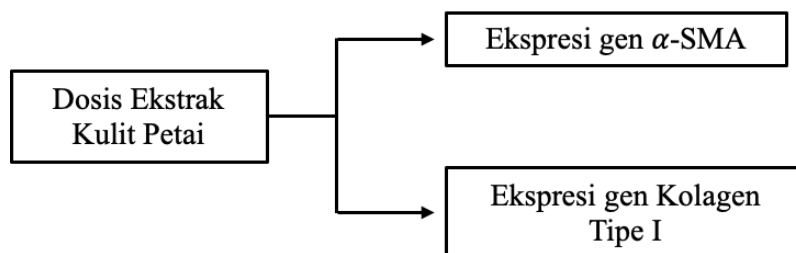
Ekstrak kulit petai diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid, alkaloid, steroid, triterpenoid, dan polifenol yang berperan sebagai antioksidan.⁶¹ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat produksi ROS dengan meningkatkan produksi enzim antioksidan SOD, GPx dan katalase pada kulit akibat paparan UVB melalui aktivasi Nrf2 sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen.^{62,63} Penurunan kadar ROS ini dapat meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 sehingga mengaktivasi ekspresi SMAD2/3. Kompleks SMAD2/3 berperan dalam produksi kolagen melalui induksi ekspresi α -SMA dan kolagen tipe 1.¹⁸ Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1





Gambar 3.1. Kerangka Teori

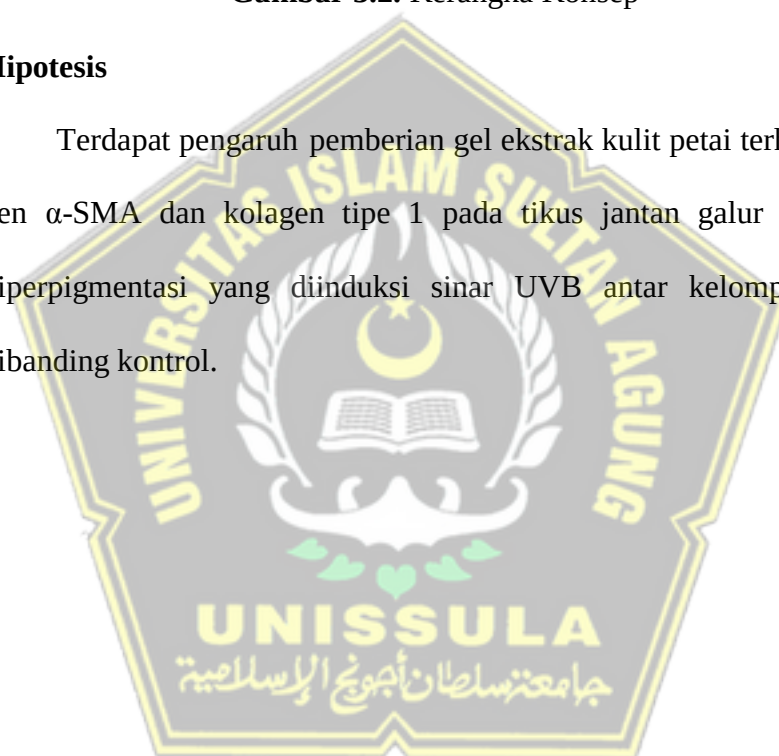
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

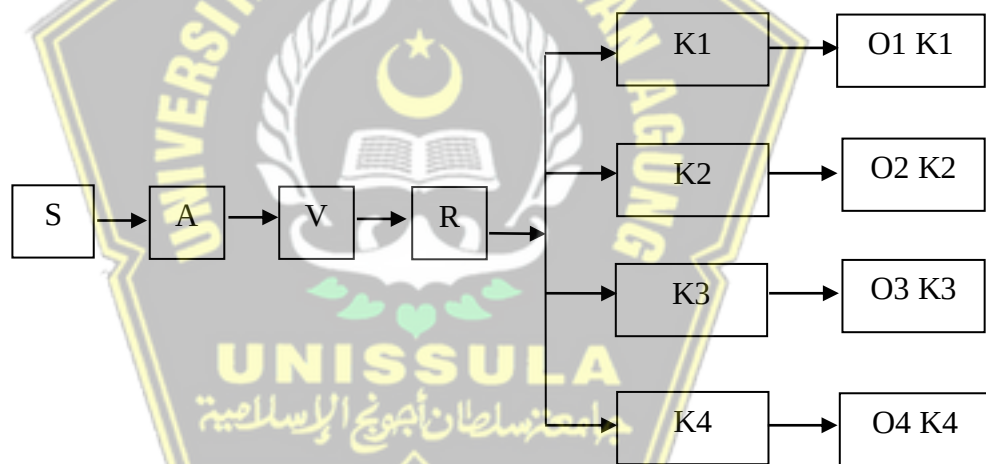


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol) dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1 : Tikus Sehat

Perlakuan : K2: Kontrol Negatif (Tikus model hiperpigmentasi dengan induksi sinar UVB tanpa pemberian terapi)

- Perlakuan : K3: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian gel ekstrak kulit petai dosis 10%.
- Perlakuan : K4: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian gel ekstrak kulit petai dosis 20%.
- O : Observasi

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Gel ekstrak kulit petai yang diberikan secara topikal.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen α -SMA dan ekspresi gen kolagen 1.

4.2.1.3. Variabel Prekondisi

Paparan sinar UVB

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Ekstrak kulit petai

Ekstrak kulit petai adalah cairan kental hasil ekstraksi kulit petai kering dengan metode remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dikentalkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Gel ekstrak kulit petai dibuat dalam sediaan topikal dengan dosis 10% dan 20%.

Satuan: gram

Skala: rasio

4.2.2.2. Ekspresi gen kolagen tipe 1

Ekspresi gen kolagen tipe 1 adalah rasio ekspresi gen protein matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblast yang teraktivasi pada hari 14 setelah awal pemberian perlakuan yang dibandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level kolagen tipe 1/GAPDH

Skala: rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen α -SMA

Ekspresi gen α -SMA adalah gene isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis. Ekspresi gen α -SMA dianalisis dari jaringan kulit pada hari ke 14 setelah awal pemberian perlakuan yang dibandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level α -SMA /GAPDH

Skala: rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang

dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang dipapar sinar UVB sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 20 cm.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar yang terpapar sinar UVB dengan panjang gelombang sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 20 cm terhadap punggung tikus yang dicukur bulunya. Tikus terkonfirmasi terjadi peningkatan kadar melanin.
2. Kondisi sehat.
3. Berat badan 200-250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

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

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sehat (tikus sehat tanpa penuaan dini akibat paparan UVB), Kontrol negatif (tikus model yang dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 (tikus model dipapar UVB dan diberi gel ekstrak kulit petai secara topikal dosis 10%) dan Perlakuan 2 (tikus model dipapar UVB dan diberi gel ekstrak kulit petai secara topikal dosis 20%).

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

$$\text{Rumus Federer} : (t-1)(n-1) \geq 15$$

$$\text{Sampel tiap Kelompok} : (4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 6$$

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

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Pelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2. Bahan

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

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Kulit Petai

Kulit petai ± 500 gram dipotong menjadi bagian kecil, dikeringkan pada suhu 50 – 60°C dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Kemudian bubuk kering diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol 70% selama 72 jam kemudian disaring dan filtrat tersebut ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Kandungan ekstrak divalidasi dengan mengukur senyawa metabolit sekunder secara kualitatif dengan reaksi tetes yaitu pengukuran flavonoid, alkaloid, terpenoid, tannin, saponin, dan steroid. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan dalam suhu 2-8°C.

4.5.3. Pembuatan Gel ekstrak Kulit Petai

Hasil evaporasi kemudian dikentalkan dengan menggunakan waterbath. Ekstrak kental yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan gel. Pembuatan gel dilakukan dengan mencampurkan basis gel hydrogel (Katecho) sebanyak 200 mg dengan ekstrak kulit petai kental pada K3 sebanyak 10% dan K4 sebanyak 20%. Selanjutnya untuk menghilangkan aroma pada pete ditambahkan minyak atsiri buah lemon. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop.

Tabel 4.1. Formula gel ekstrak kulit petai

Komposisi	Dosis 10%	Dosis 20%
Hydrogel (Katecho)	180 mg	160 mg
Sodium alginate 4.0		
Glycol 86% 10		
Dimethyl sulfoxide 2		
Purified water up to 100		
Esktrak kulit petai	20 mg	40 mg

4.5.4. Pemeriksaan Kandungan Alkaloid

Pemeriksaan kandungan alkaloid menggunakan pemeriksaan

Wagner. Prosedur pemeriksaan Wagner:

1. Ekstra kulit petai sebanyak 3 mL diletakkan dalam cawan porselin
2. Ditambahkan 5 mL HCl 2 M
3. Diaduk dan didinginkan pada temperatur ruangan.
4. Ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring.
5. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes
6. Filtrat ditambah pereaksi Wagner
7. Terbentuknya endapan menandakan adanya kandungan alkaloid.

4.5.5. Pemeriksaan Kandungan Saponin

Pemeriksaan kandungan saponin menggunakan pemeriksaan

Forth. Prosedur pemeriksaan Forth adalah:

1. Gel ekstrak kulit petai sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 10 mL akuades
3. Dikocok selama 30 detik

4. Diamati perubahan yang terjadi.
5. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

4.5.6. Pemeriksaan Kandungan Tanin

Pemeriksaan kandungan tanin menggunakan pemeriksaan FeCl_3 1%. Prosedur pemeriksaan FeCl_3 1% adalah:

1. 3 mL ekstrak kulit petai dicampur aquades panas
2. Dinginkan ekstrak
3. Tambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring.
4. Filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%
5. Diamati perubahan yang terjadi.
6. Apabila filtrat mengalami perubahan warna maka identifikasi menunjukkan adanya tannin

4.5.7. Pemeriksaan Kandungan Flavonoid

Pemeriksaan kandungan flavonoid menggunakan pemeriksaan Wilstater. Prosedur pemeriksaan Wilstater adalah:

1. Sebanyak 3 mL ekstrak kulit petai diuapkan,
2. Dicuci dengan heksana sampai jernih.
3. Residu dilarutkan dalam 20 mL etanol kemudian disaring.
4. Filtrat ditambahkan 0,5 mL HCl dan logam Mg
5. Diamati perubahan warna yang terjadi

6. Perubahan warna filtrat dari merah tua hingga jingga menunjukkan adanya flavonoid.

4.5.8. Pemeriksaan Kandungan Steroid dan Triterpenoid

Pemeriksaan kandungan steroid dan triterpenoid menggunakan pemeriksaan Lieberman-Burchard. Prosedur pemeriksaan Lieberman-Burchard adalah:

1. Ekstrak diuapkan sampai kering.
2. Kemudian ditambahkan kedalamnya 10 mL heksana
3. Diaduk selama beberapa menit lalu biarkan.
4. Selanjutnya diuapkan diatas penangas air dan ditambahkan 0,1 g Na_2SO_4 anhidrat lalu diaduk.
5. Larutan disaring sehingga diperoleh filtrat.
6. Kemudian filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi asam asetat glasial dan H_2SO_4 , Perubahan warna menjadi merah hingga ungu menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid.

4.5.9. Pemeriksaan Flavonoid Total Gel ekstrak Kulit Petai

4.5.9.1. Pembuatan Kurva Standar Quersetin

Metode untuk penentuan kandungan total flavonoid dengan membuat kurva kalibrasi standar quersetin. Prosedur pembuatan larutan quersetin:

1. Pembuatan variasi konsentrasi larutan quersetin sebesar 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/L:
2. Masing-masing larutan diambil sebanyak 2 mL

3. Ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% dan 0,1 mL CH_3COONa 1 M.
4. Campuran didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit
5. Dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum pada salah satu konsentrasi.
6. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengukur absorbansi dari masing-masing fraksi

4.5.9.2. Penentuan Total Flavonoid ekstrak Kulit Petai

Penentuan total flavonoid pada ekstrak kulit petai adalah:

1. Masing-masing fraksi ditimbang 0,06 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol.
2. Larutan tersebut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% dan 0,1 mL CH_3COONa 1 M.
3. Campuran didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang.
4. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 433 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
5. Hasil pengukuran panjang gelombang ini kemudian dibandingkan dengan kurva standar quersetin.

4.5.10. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama lima hari dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 390 mJ/cm²/hari yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu dengan jarak lampu 20 cm selama 2 minggu. Pemberian gel ekstrak kulit petai dilakukan pada jam yang sama setiap hari, yaitu jam 9 pagi dimulai pada hari ke-nol.
4. Tikus Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak kulit petai dengan dosis 10% dan 20% dengan sebanyak 200 mg tiap tikus yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari selama penyinaran UVB.

4.5.11. Validasi Peningkatan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan

Melanin

Jaringan kulit dipotong secara membujur untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan di Laboratorium SCCR Semarang dengan menggunakan

protokol pengecatan Fontana-Masson dengan tahapan pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64°C. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan didinginkan selama 10 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dihematigoksin besi weigert selama 5 menit. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit dan inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit dan diamati di bawah mikroskop. Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan dibandingkan kelompok sehat berdasarkan penelitian sebelumnya (Gambar 4.2).²⁴



Gambar 4.2. Validasi jumlah melanin dengan Fontana-Masson²⁴

4.5.12. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari 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 di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan dibagi menjadi dua dan

dilakukan pemotongan dengan arah pemotongan jaringan vertikal, sehingga bisa didapatkan semua lapisan jaringan kemudian difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Dan dimasukkan didalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.13. Analisis Kuantitatif Ekspresi α -SMA dan Kolagen Tipe 1 menggunakan RT-PCR

1. Gel ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁶⁴ Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cyclers C1000 (Bio-Rad).
2. Penentuan ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.

Tabel 4.2. Komponen PCR Mix

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward α -SMA	5'-TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC-3'
	Reverse α -SMA	5'-GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'
Primer	Forward Kolagen tipe 1	5'-GCTGAATCCTTCCGTGTT-3'
	Reverse Kolagen tipe 1	5'-AGGGAGGGGACTTATCTG=3'
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
cDNA	SYBR Green	

3. Perhitungan ekspresi gen Ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research* Indonesia. Penelitian dilakukan pada Oktober – November 2023.

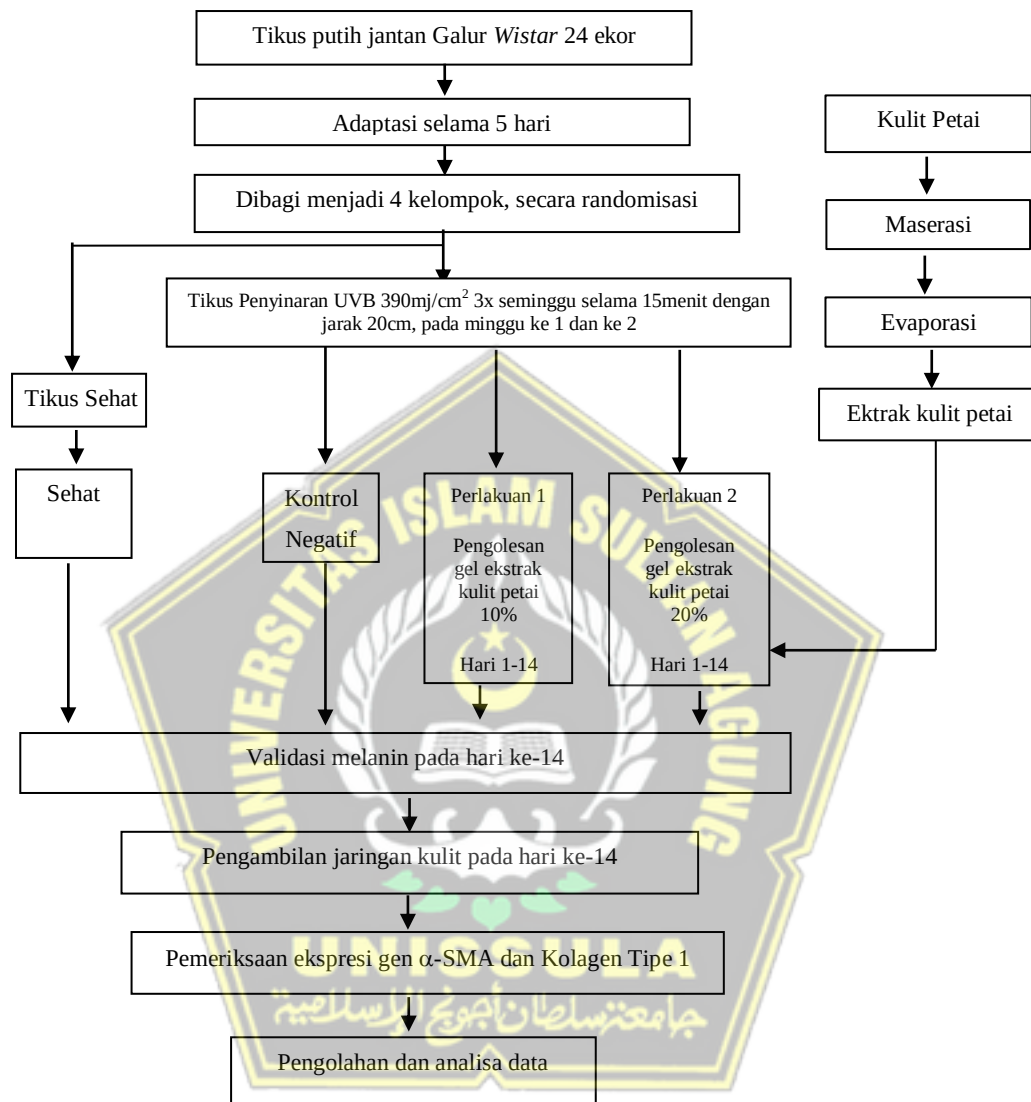
4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal*

Wallis. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus model hiperpigmentasi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Oktober hingga November 2023 bertempat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang.

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian yang diinduksi hiperpigmentasi menggunakan UV-B 302 nm dengan intensitas energi 390mJ/cm² selama tiga kali seminggu sepanjang dua minggu⁶⁵. Jumlah tikus yang digunakan adalah 24 ekor tikus sesuai kriteria fedderer. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok yang diberikan gel ekstrak kulit petai dosis 10% dan kelompok yang diberikan gel ekstrak kulit petai dosis 20%. Gel ekstrak kulit petai yang digunakan dalam penelitian ini diekstraksi dari kulit petai species *Parkia speciosa* berdasarkan hasil determinasi tanaman.

5.1. Hasil Penelitian

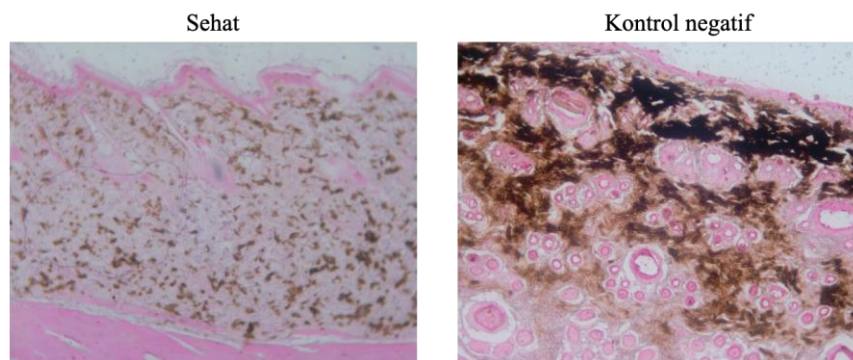
5.1.1. Ekstraksi Kulit Petai

Ekstrak kulit petai pada penelitian ini diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 8,00%. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit petai menunjukkan bahwa kulit petai positif mengandung senyawa golongan fenol, fenolik, tannin, flavonoid, terpenoid, dan saponin

(Lampiran. Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan total flavonoid dan fenolik dalam ekstrak kulit petai dengan menggunakan metode spektrofotometri. Dalam 1 gram ekstrak kulit petai mengandung flavonoid sebesar $65,27\text{mg} \pm 1,20$ dan fenolik sebesar $44,70\text{mg} \pm 1,22$. Hasil ini membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung didalam ekstrak kulit petai adalah golongan flavonoid.

5.1.2. Validasi Model Hiperpigmentasi

Pada penelitian ini Menggunakan model hiperpigmentasi. Hewan model diinduksi hiperpigmentasi dengan irradiasi UVB 302 nm dengan intensitas energi 390 mJ/cm^2 selama tiga kali seminggu sepanjang dua minggu. Validasi hiperpigmentasi diamati pada hari ke 14. Pada pewarnaan *Fontana masson* menunjukan bahwa terjadi peningkatan produksi melanin secara signifikan yang ditandai dengan pigmen berwarna coklat pada bagian epidermis (sel melanosit). Pada kelompok yang diberikan irradiasi UVB (kontrol negatif) jumlah melanin meningkat hingga 46,5% (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Validasi hiperpigmentasi dengan pewarnaan fontana masson (A) Tikus sehat dan (B) Tikus yang mendapatkan irradiasi UVB.

5.1.3. Efek Pemberian Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20%

Terhadap Ekspresi Gen α -SMA

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu meningkatkan ekspresi gen α -SMA dan kolagen tipe 1 pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.2).

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen Tipe 1

Variabel	Kelompok				pvalue
	Sehat=5 Mean $\pm$ SD (K1)	Kontrol negatif n=5 Mean $\pm$ SD (K2)	Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 10% n=5 Mean $\pm$ SD (K3)	Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 20% n=5 Mean $\pm$ SD (K4)	
Ekspresi gen α -SMA	1,03 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,17	2,93 $\pm$ 0,85	3,11 $\pm$ 1,08	
<i>Saphiro wilk</i>	0,167*	0,836*	0,008	0,477*	
<i>Levene test</i>					0,001
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0,001***
Densitas kolagen	1,01 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,14	2,22 $\pm$ 0,68	2,12 $\pm$ 0,73	
<i>Saphiro wilk</i>	0,004	0,028	0,033	0,535*	
<i>Levene test</i>					0,001
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0,000***

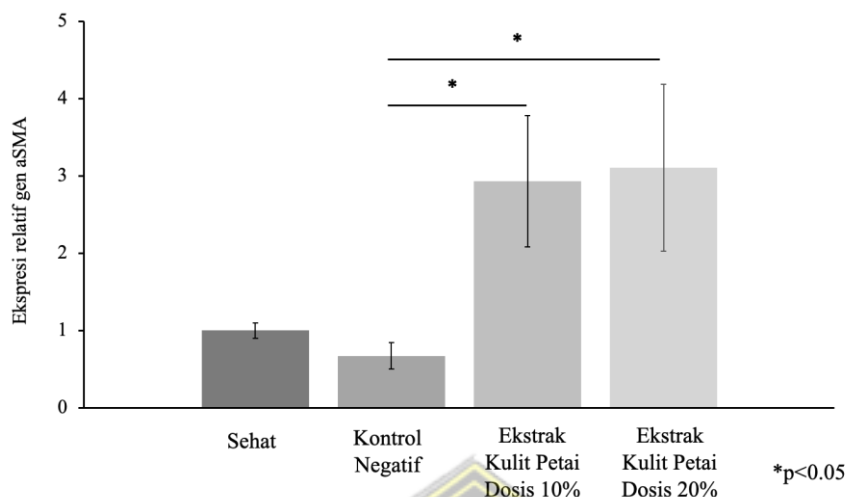
Keterangan :

*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

** Levene's Test ($p > 0,05$ = homogen)

*** Krsuskal Wallis ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.1. Rerata ekspresi gen α -SMA dikelompok K4 yang tertinggi ($3,11 \pm 1,08$), kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen α -SMA kelompok K3 ($2,93 \pm 0,85$). Rasio terendah pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K2) sebesar $0,67 \pm 0,17$. Data ekspresi gen α -SMA selain kelompok K3, berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen α -SMA tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji non parametrik *Kruskall Wallis* menghasilkan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen α -SMA yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskall Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.2. Grafik ekspresi gen α -SMA Pada Seluruh Kelompok Penelitian

Tabel 5.2. Uji Mann Whitney ekspresi gen α -SMA pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2	0,012	-2,345	0,897
	K3	0,000	-1,562	-1,782
	K4	0,000	-1,245	-1,675
K2	K3*	0,000	-2,882	0,001
	K4	0,000	0,786	-2,564
K3	K4*	0,077	-0,678	-2,367

Tanda * ($p < 0.05$) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

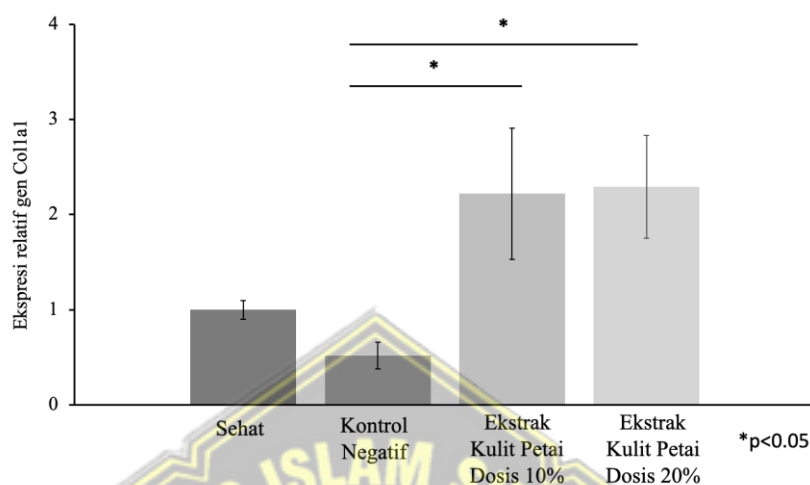
Berdasarkan data diatas didapatkan rerata perbandingan antara kelompok K2 dengan K3 (0,000) dan K2 dengan K4 (0,000) yang menunjukan terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan perbandingan kelompok K3 dan K4 (0,077) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan K2 dan K4 diperoleh nilai 0,000 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Peningkatan ekspresi α -SMA paling signifikan ditunjukkan pada pemberian gel ekstrak kulit petai 20% dengan nilai

batas bawah 0,786 dan nilai batas atas -2,564. Hasil uji *Mann Whitney* pada data ekspresi gen α -SMA menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat meningkatkan ekspresi gen α -SMA pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

5.1.4. Efek Pemberian Gel ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen Kolagen Tipe 1

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu meningkatkan ekspresi gen kolagen tipe 1 pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.3). Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.1 Rerata ekspresi gen kolagen tipe 1 di kelompok K3 ($2,22 \pm 0,68$) yang tertinggi, kemudian di ikuti oleh rerata ekspresi gen kolagen tipe 1 kelompok K4 ($2,21 \pm 0,73$). Data ekspresi gen kolagen tipe 1 terendah yaitu pada kelompok kontrol negatif sebesar $0,52 \pm 0,14$. Data ekspresi gen kolagen tipe 1 kelompok K4 berdistribusi normal, namun data kelompok K1, K2, dan K3 ($p < 0,005$) tidak terdistribusi normal berdasarkan hasil *Shapiro Wilk*. Distribusi data ekspresi gen kolagen tipe 1 tidak normal, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen kolagen tipe 1 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal-*

Wallis yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.3. Grafik ekspresi gen kolagen tipe 1 pada seluruh kelompok penelitian

Tabel 5.3. Uji *Mann-Whitney* densitas kolagen pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2*	0,003	0,225	0,771
	K3	0,077	-2,538	0,135
	K4	0,132	-2,528	0,315
K2	K3*	0,015	-3,002	-0,396
	K4*	0,026	-2,992	-0,215
K3	K4	1,000	-1,373	1,563

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan perbandingan rerata K2 (kontrol negatif) dengan K3 (gel ekstrak kulit petai 10%) (0,015) dan K4 (gel ekstrak kulit petai 20%) (0,026) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan K3 dan K4 (1,000) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan kelompok K1 dan K2 diperoleh nilai 0,003 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang

bermakna antara kedua kelompok tersebut. Nilai ekspresi gen kolagen tipe 1 tertinggi paling signifikan ditunjukkan pada pemberian gel ekstrak kulit petai 10% dengan nilai batas bawah -3,002 dan nilai batas atas -0,396. Hasil uji *Mann-whitney* pada data ekspresi gen kolagen tipe 1 menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat meningkatkan ekspresi gen kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan sinar UVB merupakan penyebab utama timbulnya pigmentasi pada kulit yang ditandai dengan peningkatan jumlah melanin. Peningkatan jumlah melanin disebabkan oleh kombinasi faktor intrinsik dan faktor ekstrinsik, termasuk radiasi sinar UVB. Kulit yang terpapar UVB menghasilkan peningkatan jumlah *reactive oxygen species* (ROS), yang bereaksi dengan asam deoksiribonukleat (DNA), protein, dan asam lemak, yang mengakibatkan kerusakan oksidatif.⁶⁶ Stres oksidatif memulai kaskade jalur pensinyalan, dengan menginduksi protein aktivator 1 (AP-1) dan *down-regulation* TGF- β , diikuti oleh hambatan ekspresi α -SMA dan penghambatan sintesis kolagen.⁶⁷ Peningkatan ROS yang berlebihan juga akan mengaktifasi jalur protein kinase yang kemudian memicu peningkatan produksi enzim MMP yang disekresikan oleh neutrofil untuk mendegradasi kolagen.⁵⁹ Sisi lain, peningkatan ROS juga berdampak pada produksi berbagai sitokin proinflamasi, seperti interleukin-6 (IL-6) sehingga berdampak pada apoptosis sel.⁶⁸ Kondisi proinflamasi yang berkelanjutan

berdampak pada inhibisi produksi *growth factor* prokolagen seperti TGF- β yang akan menekan produksi α -SMA sehingga menghambat sintesis kolagen tipe 1.⁶⁹ Kulit petai memiliki senyawa aktif salah satunya adalah flavonoid, alkaloid, tannin, dan saponin dimana berperan sebagai antioksidan dan anti inflamasi, sehingga mampu berperan dalam menekan stress oksidatif yang dapat menginduksi produksi α -SMA dan kolagen tipe 1 sehingga mencegah produksi melanin.^{14,70}

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen α -SMA pada kelompok K3 (gel ekstrak kulit petai 10%) dan K4 (gel ekstrak kulit petai 20%) mengalami peningkatan secara signifikan dibandingkan kelompok tikus hiperpigmentasi yang tidak mendapatkan terapi (Kontrol negatif). Hal ini menunjukan bahwa peningkatan ekspresi gen α -SMA dapat mencegah hiperpigmentasi dan meningkatkan pembentukan kolagen melalui peningkatan ekspresi gen kolagen tipe 1, yang merupakan komponen penting dari matriks ekstraseluler. Senyawa flavonoid yang berasal dari gel ekstrak kulit petai mungkin dapat mengaktifkan jalur PI3K melalui jalur TGF- β yang melibatkan TGF- β reseptor I dan II. Aktivasi PI3K akan mengaktifkan Akt yang berdampak pada aktivasi mTOR. mTOR yang aktif akan menginduksi ekspresi SMAD2/3 yang berujung pada aktivasi SMAD2/3. SMAD2/3 yang dilepaskan memicu pelepasan α -SMA sehingga terjadi perubahan fibroblast menjadi myofibroblast yang berujung pada induksi kolagen tipe 1.²³ Senyawa lain pada gel ekstrak kulit petai seperti flavonoid dan fenol memiliki peran sebagai pengkkelat ion logam dan menstabilkan

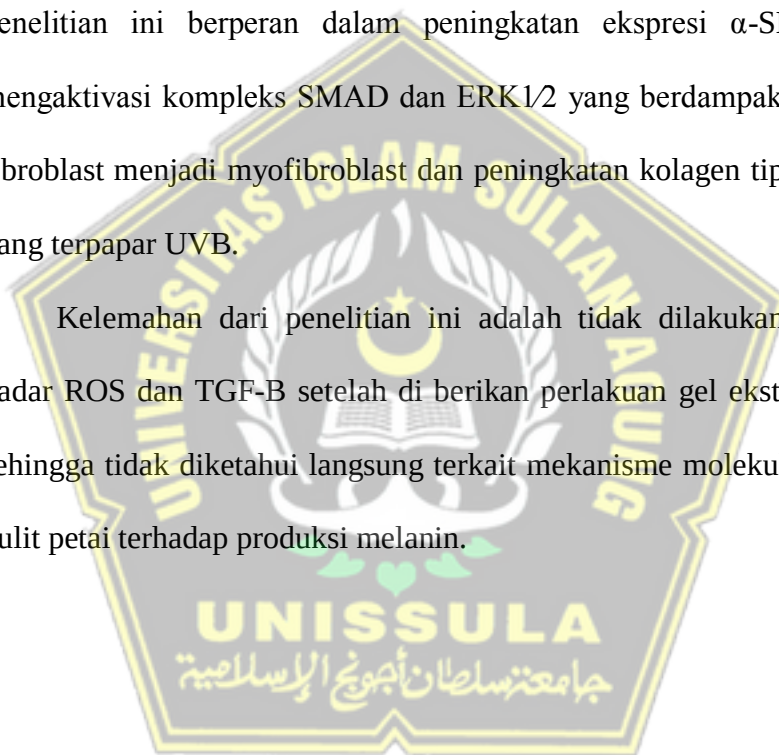
atom hidrogen dari gugus hidroksil yang mengurangi pembentukan ROS dan menghambat terjadinya fotoaging.¹⁰

Pada penelitian ini, peningkatan ekspresi α -SMA *inline* dengan peningkatan ekspresi gen kolagen tipe 1. Over ekspresi ROS juga dapat mengaktifkan NF-kB yang kemudian ditranslokasi ke dalam nukleus untuk menginduksi aktivasi transkripsi dan regulasi transkripsi MMP-1, faktor utama degradasi kolagen tipe 1.^{1,58,71,72} Hal ini sejalan dengan hasil penelitian saat ini yang menunjukkan bahwa paparan sinar UVB dapat menurunkan ekspresi gen α -SMA dan ekspresi gen kolagen tipe 1. Peningkatan kolagen pada kulit tikus UVB yang diberi gel ekstrak kulit petai dosis 10% dan 20% juga berkorelasi dengan peningkatan ekspresi α -SMA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel kulit petai dosis 10% dan 20% meningkatkan ekspresi relatif gen kolagen tipe 1 secara signifikan dibandingkan kontrol negatif ($P < 0.05$).

α -SMA adalah sitokin fibrogenik prototipe, yang dapat meningkatkan ekspresi gen matriks ekstraseluler (ECM) pada sel fibroblast teraktivasi dan mengatur penurunan enzim pendegradasi matriks melalui jalur SMAD, terutama terkait dengan sintesis kolagen.⁵⁸ Untuk berinteraksi dengan serat kolagen, fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler. Myofibroblast diregulasi oleh TGF- β 1 yang akan berikatan dengan kompleks TGF- β reseptor (TGF- β R) dan menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -

SMA untuk mengaktivasi jalur smad 2/3 yang berdampak pada sintesis type 1 procollagen lalu menjadi kolagen.^{18,60,73} Smad 2/3 yang teraktivasi akan berikatan dengan smad 4 yang berdampak pada masuknya kompleks protein tersebut ke inti sel. Disisi lain TGF- β melalui jalur ERK1/2 mengaktivasi protein co-factor, lalu masuk ke inti sel dan membantu penempelan kompleks smad pada gene site pro-collagen-1.^{12,74,75} Kulit petai pada penelitian ini berperan dalam peningkatan ekspresi α -SMA sehingga mengaktivasi kompleks SMAD dan ERK1/2 yang berdampak pada aktivasi fibroblast menjadi myofibroblast dan peningkatan kolagen tipe 1 pada kulit yang terpapar UVB.

Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan kadar ROS dan TGF-B setelah di berikan perlakuan gel ekstrak kulit petai sehingga tidak diketahui langsung terkait mekanisme molekuler gel ekstrak kulit petai terhadap produksi melanin.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

- 6.1.1. Pemberian gel ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen α -SMA pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.
- 6.1.2. Pemberian gel ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen kolagen tipe 1 pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

- 6.2.1 Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut tentang pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel ekstrak kulit petai pada tikus galur *Wistar* model hiperpigmentasi.
- 6.2.2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis gel ekstrak kulit petai > 20% pada tikus galur *Wistar* model hiperpigmentasi.
- 6.2.3 Perlu dilakukan penelitian tentang efek samping pengolesan gel ekstrak kulit petai pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar UV-B

DAFTAR PUSTAKA

1. Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C, et al. Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol*. 2008;43(7):633–7.
2. Wölfl U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(9):1081–93.
3. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*. 2019;9(11).
4. Ryu JY, Na EJ. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. *Biomedical Dermatology*. 2018 Dec;2(1).
5. Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci* [Internet]. 2018;210:201–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.056>
6. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2009;14(1):20–4.
7. Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G, et al. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- α -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):1–14.
8. Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients*. 2016;8(10):8–11.
9. Andy S, Najatullah, Nugroho Trilaksana, Neni Susilaningsih. The Effect of Ethanollic Extract from Moringa oleifera Leaves in Collagen Density and Numbers of New Capillary Vessel Count on Wistar Rats Burn Wound.

- Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research. 2022;6(6):1936–41.
10. Siow HL, Gan CY. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. Food Chem. 2013;141(4):3435–42.
 11. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY, et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. Journal of the Formosan Medical Association. 2017;116(5):351–8.
 12. He T, Quan T, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Oxidative exposure impairs TGF- β pathway via reduction of type II receptor and SMAD3 in human skin fibroblasts. Age (Omaha). 2014;36(3):1079–94.
 13. Holm Nielsen S, Willumsen N, Leeming DJ, Daniels SJ, Brix S, Karsdal MA, et al. Serological Assessment of Activated Fibroblasts by alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA): A Noninvasive Biomarker of Activated Fibroblasts in Lung Disorders. Transl Oncol. 2019;12(2):368–74.
 14. Izzah Ahmad N, Abdul Rahman S, Leong YH, Azizul NH. A Review on the Phytochemicals of *Parkia Speciosa*, Stinky Beans as Potential Phytomedicine. J Food Sci Nutr Res. 2019;02(03).
 15. Hada M, Mondul AM, Weinstein SJ, Albanes D. Serum retinol and risk of overall and site-specific cancer in the ATBC study. Am J Epidemiol. 2020 Jun 1;189(6):532–42.
 16. Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. Int J Dermatol. 1991;30(12):893–5.
 17. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. Int J Mol Sci. 2021;22(8).
 18. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D, et al. Impact of Ultraviolet Radiation on Expression of Transforming Growth Factor-

- beta, Smad2, Metalloproteinases, Cathepsin K and Progerin. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(1):42–9.
19. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY, et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* [Internet]. 2017;116(5):351–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2016.07.014>
 20. Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
 21. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):1–14.
 22. Mustafa NH, Ugusman A, Jalil J, Kamisah Y. Anti-inflammatory property of *Parkia speciosa* empty pod extract in human umbilical vein endothelial cells. *J Appl Pharm Sci*. 2018 Jan 1;8(1):152–8.
 23. Gui JS, Jalil J, Jubri Z, Kamisah Y. *Parkia speciosa* empty pod extract exerts anti-inflammatory properties by modulating NFκB and MAPK pathways in cardiomyocytes exposed to tumor necrosis factor-α. *Cytotechnology*. 2019 Feb 15;71(1):79–89.
 24. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S, et al. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2022 Dec 15;10(A):1–7. Available from: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/10348>
 25. Iqbal IY. Pemberian Krim Gel ekstrak Etanol Biji Petai (*Parkia Speciosa*) 20% Sama Efektif Dengan Krim Hidrokuinon 4% Dalam Menghambat Pembentukan Jumlah Melanin Pada Kulit Marmut (*Cavia Porcellus*) Yang Dipapar Sinar Ultraviolet B Irah Yunita Iqbal. Denpasar, Indonesia;

26. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(4):376–9.
27. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Vol. 7, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. Dove Medical Press Ltd.; 2014. p. 301–11.
28. Lunardi LO, Martinelli CR, Lombardi T, Soares EG, Martinelli C. Modulation of MCP-1 , TGF- β 1 , and α -SMA Expressions in Granulation Tissue of Cutaneous Wounds Treated with Local Vitamin B Complex : An Experimental Study. 2014;98–107.
29. Baillie R, Coombes RC, Smith J. Multiple forms of TGF- β 1 in breast tissue: A biologically active form of the small latent complex of TGF- β 1. *European Journal of Cancer Part A*. 1996;32(9):1566–73.
30. Xia R, Sheng X, Xu X, Yu C, Lu H. Hesperidin induces apoptosis and G0/G1 arrest in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):464–72.
31. Talele NP, Fradette J, Davies JE, Kapus A, Hinz B. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2015;4(6):1016–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.05.004>
32. Sousa AM, Liu T, Guevara O, Stevens JA, Fanburg BL, Gaestel M, et al. Smooth muscle α -actin expression and myofibroblast differentiation by TGF β are dependent upon MK2. *J Cell Biochem*. 2007;100(6):1581–92.
33. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B, et al. TGF-b Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring harbor Perspectives Biology*. 2018;1–49.
34. Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y, et al. Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules*. 2019 Jan 2;24(1).

35. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6).
36. Rockey DC, Du Q, Shi Z. Smooth Muscle α -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *American Journal of Pathology*. 2019 Nov 1;189(11):2209–20.
37. Kim YJ, Seo DH, Lee SH, Lee SH, An GH, Ahn HJ, et al. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Res*. 2018;16(April):96–102.
38. Zhang JA, Yin Z, Ma LW, Yin ZQ, Hu YY, Xu Y, et al. The protective effect of baicalin against UVB irradiation induced photoaging: An in vitro and in vivo study. *PLoS One*. 2014;9(6).
39. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(18):6098–107.
40. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC, et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research*. 2012;32(6):428–38.
41. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Front Microbiol*. 2018;8(JAN):1–13.
42. Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol*. 1967;33:27–42.
43. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005;118(7):1341–53.

44. Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* [Internet]. 2020;1–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.06.002>
45. Xi Q. Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type. Vol. 2018, *Advances in Difference Equations*. 2018.
46. Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* [Internet]. 2013;1833(11):2479–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.008>
47. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*. 2015.
48. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology*. 2007;179(6):1311–23.
49. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*. 2018;
50. Ramli S, Ruangrunsi N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. Vol. 4, *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science*. 2021.
51. Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res*. 2011;27(1):1.
52. Ribeiro FM, Volpato H, Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, de Souza RO, Fonseca MJV, et al. The extended production of UV-induced reactive oxygen species in L929 fibroblasts is attenuated by posttreatment with *Arrabidaea chica* through scavenging mechanisms. *J Photochem Photobiol*

- B [Internet]. 2018;178(November 2017):175–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.002>
53. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36(8):1482–91.
 54. Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang S bin, Park SJ, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via shp-2 oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(16):2528–40.
 55. Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2012;1820(10):1693–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.011>
 56. Currò M, Risitano R, Ferlazzo N, Cirimi S, Gangemi C, Caccamo D, et al. Citrus bergamia Juice Extract Attenuates β -Amyloid-Induced Pro-Inflammatory Activation of THP-1 Cells Through MAPK and AP-1 Pathways. *Sci Rep*. 2016;6(February):1–11.
 57. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biology* [Internet]. 2008;27(8):682–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2008.07.005>
 58. Chan ZCK, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett* [Internet]. 2020;724:134822. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134822>
 59. Hwang IS, Kim JE, Choi S il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6

- weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392–400.
60. Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of smad2/3-dependent signaling pathways: Potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med*. 2013;31(5):1148–52.
 61. Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009;64(4):303–11.
 62. Imamsari M, Keontjoro MP, Nurhayati AP, Isiantoni, Prasetyo EN. In-Vivo Preliminary Examination Of *Moringa Oleifera* Leaves Extract As Antiaging Candidate In Swiss Webster Male Mice (*Mus Musculus*). *Int J Pharm Sci Res*. 2018;9(9):3638–46.
 63. Yong-Bing X, Gui-Lin C, Ming-Quan G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *moringa oleifera* from kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*. 2019;8(8).
 64. Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, Miller KJ, Ehanire T, Quiles C, et al. A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;22(6):755–64.
 65. You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC, et al. Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants*. 2019;8(7):1–16.
 66. Ismardianita E, Elianora D, Rosalina W, Nofrike L, Khairani VY. The effectiveness methanol extract clausena excavate on number of fibroblast and density of collagen fibers after tooth extraction. 2019;4(3):170–5.
 67. Seol JE, Ahn SW, Seol B, Yun HR, Park N, Kim HK, et al. Echinochrome A Protects against Ultraviolet B-induced Photoaging by Lowering Collagen Degradation and Inflammatory Cell Infiltration in Hairless Mice. 2021;

68. Schmidt-Arras D, Rose-John S. Endosomes as Signaling Platforms for IL-6 Family Cytokine Receptors. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
69. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF- β mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. Vol. 48, *Kidney International*. 1995.
70. Chhikara N, Devi HR, Jaglan S, Sharma P, Gupta P, Panghal A. Bioactive compounds, food applications and health benefits of *Parkia speciosa* (stinky beans): A review. Vol. 7, *Agriculture and Food Security*. BioMed Central Ltd.; 2018.
71. Yoshida M, Clinic Y, Arai T, Kagaku D, Kabushiki K, Hoshino S, et al. IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor- β -Induction of Type I Collagen mRNA Expression via Both JNK and p38 Pathways in Human Lung Fibroblasts Original article : IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor - β - Induction of Type I Collagen mRNA Expressio. 2005;(August).
72. Galicka A, Jolanta N. Stimulation of collagen biosynthesis by flavonoid glycosides in skin fibroblasts of osteogenesis imperfecta type I and the potential mechanism of their action. *Int J Mol Med*. 2007;20(6):889–95.
73. Putra A, Alif I, Hamra N, Santosa O, Ar K, Am M, et al. MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of.pdf. 2020;16(2):73–9.
74. Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(12):8737–49.
75. Li Q, Du X, Pan Z, Zhang L, Li Q. The transcription factor SMAD4 and miR-10b contribute to E2 release and cell apoptosis in ovarian granulosa cells by targeting CYP19A1. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018;476:84–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.012>