

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI
TERHADAP EKSPRESI GEN MITF DAN JUMLAH MELANIN
(Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi
yang Terpapar UVB)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Nama : Maya Rianti Amalia

NIM : MBK 218010260

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

2023

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP KADAR MITF DAN JUMLAH MELANIN (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)

Disusun oleh :

Maya Rianti Amalia

MBK 218010260

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 7 Desember 2023 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K)
NIK. 210104084

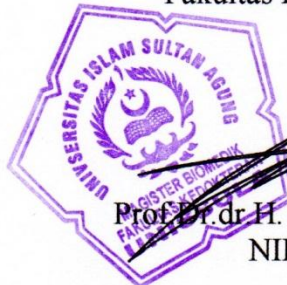
Pembimbing II



Dr. dr. Pasia Harlisa, Sp.KK
NIK. 8951110021

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula



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

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di 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.



RIWAYAT HIDUP

A. Data Pribadi

Nama : Maya Rianti Amalia
TTL : Jambi, 03 mei 1987
Jenis kelamin : Perempuan
Agama : Islam

B. Latar Belakang Pendidikan

1. TK. Islam Al-Azhar : Lulus tahun
2. SD Islam Al-Falah (1992 – 1998) : Lulus tahun 1998
3. SMP N 11 Jambi (1998 – 2001) : Lulus tahun 2001
4. SMA Islam Al-Falah (2001 – 2004) : Lulus tahun 2004
5. Universitas Jambi Fakultas Kedokteran : Lulus tahun 2005
6. Magister Biomedik FK Unissula : – sekarang

C. PENGALAMAN KERJA

1. Inasa skin care 2014 s/d 2017 (Jakarta)
2. Orchide de beaute 2019 s/d 2021 (Jakarta)
3. Madeline 2019 s/d 2021 (Jakarta)
4. Maya Clinic 2021- Sekarang

D. Riwayat Keluarga

Nama Suami : Mayor Kav Wahyudha Saputra, S.H
Nama Anak : Aqueena Azzahra almayra

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 KADAR MITF DAN JUMLAH MELANIN (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB).**

Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) 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 sedalamdalamnya 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.
3. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan selaku dosen penguji yang banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis.

4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K) selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Dr. dr. Pasid Harlisa, Sp.KK selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Dr. dr. Joko Wahyu W, M.kes dan Dr. Atina Husaana M.Si.Apt selaku dosen penguji yang banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis.
7. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
8. Suami dan anak tercinta, orang tua, keluarga yang selalu memberikan dukungan dan doa selama penulis menjalani pendidikan.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, 06 Desember 2023
Penulis,

Maya Rianti Amalia

ABSTRAK

Latar belakang: Paparan Sinar UVB dengan intensitas tinggi secara berkepanjangan dapat menginduksi terbentuknya *Reactive Oksigen Species* (ROS) yang menyebabkan aktivasi *melanocyte inducing transcription factor* (MITF) sehingga menginduksi sintesis melanin. 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 MITF dan jumlah melanin 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 MITF dianalisis menggunakan qRT-PCR dan melanin diamati dengan pewarnaan spesifik dengan fontana-masson.

Hasil: Analisis qRT-PCR menunjukkan bahwa terdapat penurunan ekspresi gen MITF yang signifikan antara kelompok K4 dan K3 dibandingkan dengan kelompok K2. Analisis jumlah melanin juga menunjukkan bahwa terdapat penurunan rerata secara signifikan pada kelompok K3 dan K4 dibandingkan dengan K2 dengan nilai $p < 0,05$.

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak kulit petai dapat menurunkan ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus model hiperpigmentasi yang dipaparkan sinar UVB.

Kata kunci : Paparan UVB, ekstrak kulit petai, MITF, melanin

ABSTRACT

Background: Prolonged exposure to high intensity UVB rays can induce the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) which causes MITF activation thereby inducing melanin synthesis. Compounds contained in petai peel extract are known to play a role in inhibiting ROS production due to exposure to UVB rays. This study aims to determine the effect of administering petai peel extract gel on MITF gene expression and the amount of melanin in the skin tissue of mice exposed to high-intensity UVB.

Method: The research design was posttest only control group with a completely randomized design method. The samples studied were 24 mice exposed to UVB light with a wavelength of 302 nm and an energy of 390 mJ/cm²/day 3 times a week for 2 weeks. This research was carried out in four groups, namely the healthy group (K1), the negative control group (K2), treatment 1 (K3) with 10% petai peel extract gel and treatment 2 (K4) with 20% petai peel extract gel. MITF gene expression was analyzed using qRT-PCR and melanin was observed by specific staining with fontana-masson.

Results: qRT-PCR analysis showed that there was a significant decrease in MITF gene expression between groups K4 and K3 compared to group K2. Analysis of the amount of melanin also showed that there was a significant decrease in the mean in the K3 and K4 groups compared to K2 with a p value <0.05.

Conclusion: Administration of petai peel extract gel can reduce the expression of the MITF gene and the amount of melanin in hyperpigmentation mice exposed to UVB light.

Keywords: UVB exposure, petai peel extract, MITF, melanin

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Penelitian	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Umum.....	4
1.3.2. Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Teoritis.....	5
1.4.2. Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Melanocyte inducing transcription factor	8
2.2. Melanin	11
2.3. Hiperpigmentasi.....	16
2.4. Mekanisme Induksi MITF dan Melanin oleh UVB.....	17
2.5. Kulit Petai	19

2.6. Peran antioksidan dalam mencegah hiperpigmentasi akibat paparan UVB	22
2.7. Sediaan Gel	24
2.8. Pengaruh kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin ..	25
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	27
3.1. Kerangka Teori	27
3.2. Kerangka Konsep	30
3.3. Hipotesis	30
BAB IV METODE PENELITIAN	31
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	31
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	32
4.2.1. Variabel Penelitian	32
4.2.2. Definisi Operasional	33
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	34
4.3.1. Subjek Penelitian	34
4.3.2. Sampel Penelitian	34
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	35
4.3.4. Besar Sampel	36
4.4. Alat dan Bahan	36
4.4.1. Alat	36
4.4.2. Bahan	37
4.5. Cara Penelitian	37
4.5.1. Perolehan Ethical Clearance	37
4.5.2. Cara Pembuatan Gel Ekstrak Kulit Petai	37
4.5.3. Penetapan Dosis	38
4.5.4. Paparan UV-B	39
4.5.5. Pembuatan Blok Parafin	39
4.5.6. Validasi dan analisis pengecatan Melanin pasca UVB dan perlakuan	40
4.5.7. Analisa Kuantitatif Ekspresi Gen MITF menggunakan RT-PCR	41

4.5.8. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan.....	42
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian.....	43
4.7. Analisa Data.....	43
4.8. Alur Penelitian	44
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
5.1. Hasil Penelitian.....	45
5.1.1. Ekstraksi Kulit Petai.....	45
5.1.2. Validasi Model Hiperpigmentasi	46
5.1.3. Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen MITF.....	47
5.1.4. Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi melanin.....	50
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	52
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1. Kesimpulan.....	55
6.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR SINGKATAN

DCT	: <i>Dopachrome Tautomerase</i>
GSH	: <i>Glutathion</i>
L-DOPA	: <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-Related Protein-1</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B (UVB)</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1.	Formula gel ekstrak kulit petai	38
Tabel 4.2.	komponen PCR Mix CXCL8.....	42
Tabel 5.1.	Data hasil Penelitian Ekspresi Gen MITF dan Melanin	47
Tabel 5.2.	Uji Post Hoc Tamhane ekspresi gen MITF pada Masing-masing Kelompok.....	49
Tabel 5.3.	Uji Post Hoc LSD jumlah melanin pada Masing-masing Kelompok.....	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema kaskade tranduksi sinyal melanogenesis ⁴⁷	13
Gambar 2.2.	Kulit Petai.....	19
Gambar 2.3.	Mekanisme keseimbangan redoks di kulit ⁷⁶	24
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	29
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	30
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian.....	31
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	44
Gambar 5.1.	Validasi hiperpigmentasi dengan pewarnaan fontana masson (A) Tikus sehat dan (B) Tikus yang mendapatkan irradiasi UVB. 100x perbesaran. Panah hitam menunjukan positif melanin.....	47
Gambar 5.2.	Grafik ekspresi gen MITF Pada Seluruh Kelompok Penelitian..	49
Gambar 5.3.	(A) Gambaran pewarnaan melanin pada semua kelompok perlakuan dan (B) Grafik jumlah melanin pada seluruh kelompok penelitian. 100x perbesaran, tanda panah hitam menunjukan sel positif melanin.	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearens</i>	67
Lampiran 2. Analisa Statistika	68
Lampiran 3. Gambaran Makroskopis Tikus.....	71
Lampiran 4. Hasil skrining fitokimia	72
Lampiran 5. Foto Kegiatan Penelitian.....	73



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi sinar ultraviolet B (UVB) merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi, terhentinya sintesis kolagen dan timbulnya inflamasi pada kulit.¹⁻³ Hiperpigmentasi adalah kondisi di mana terjadi peningkatan jumlah melanin pada kulit yang secara visual dapat diamati dengan adanya pigmen berwarna kecoklatan kemudian menghitam.^{4,5} Hiperpigmentasi yang disebabkan oleh paparan sinar UVB dikendalikan oleh gen, protein, dan enzim tertentu, seperti tyrosinase, faktor transkripsi yang terkait dengan *melanocyte inducing transcription factor* (MITF), protein terkait *tyrosinase-1* (TRP-1), serta *dopachrome tautomerase* (TRP-2).⁶ Aktivasi MITF menyebabkan peningkatan produksi melanin yang berlebihan pada kulit.⁷

Peningkatan paparan sinar UVB akibat kerusakan lapisan ozon dalam beberapa tahun terakhir dan perubahan gaya hidup telah menjadi perhatian penting karena dapat menginduksi hiperpigmentasi yang meningkatkan kasus penuaan kulit.¹⁻³ Orang dengan kulit cerah dan usia yang lebih tua memiliki risiko yang lebih tinggi terhadap efek hiperpigmentasi.^{4,5} Meskipun masih sedikit penelitian yang dilakukan mengenai kejadian hiperpigmentasi secara spesifik, kejadian melasma pada pria sebesar 10%, sedangkan wanita prevalensinya lebih besar terutama pada usia 20-45 tahun. Perbandingan kasus melasma pada wanita dan pria di Indonesia adalah 24:1.⁵ Diantara gejala penuaan yang umum, hiperpigmentasi dan kerutan

wajah yang paling sering terjadi, kondisi ini dapat mempengaruhi interaksi sosial seseorang⁶. Hingga saat ini, pengobatan dengan beberapa agen kimiawi seperti arbutin, asam azelaic, asam kojic, dan hidrokuinon merupakan pilihan utama untuk mencegah atau mengobati hiperpigmentasi kulit dan menginduksi sintesis kolagen.^{7,8} Namun, dilaporkan bahwa agen kimia tersebut menimbulkan efek samping yang merugikan seperti genotoksisitas, iritasi kulit, dermatitis kontak, dan kanker kulit.⁹⁻¹¹ Oleh karena itu, perlu dicari suatu agen alami yang mampu mengatasi hiperpigmentasi yang bertindak sebagai antioksidan dan antiinflamasi salah satunya adalah kulit petai.^{12,13}

Secara tradisional, biji petai telah digunakan oleh masyarakat setempat sebagai pengobatan untuk berbagai penyakit, terutama penyakit kulit.^{14,15} Berdasarkan penjelasan diatas biji petai sudah banyak dimanfaatkan. Namun kulit petai oleh masyarakat hanya dibuang begitu saja dan belum banyak dimanfaatkan. Oleh karena itu kulit petai dimanfaatkan dalam bentuk inovasi menjadi gel ekstrak kulit petai yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Kulit Petai juga mengandung berbagai jenis polifenol dan flavonoid yang dipercaya sebagai sumber potensial senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan.¹⁶ Menurut Isromi,¹² kulit petai (*Parkia speciosa*) mengandung senyawa flavonoid, fenol, dan tanin yang dapat digunakan sebagai antiinflamasi topikal.¹³ Menurut Rianti,¹⁷ kulit petai mengandung flavonoid dan fenol yang dapat berperan sebagai

antioksidan. Penelitian yang lainnya juga melaporkan bahwa petai memiliki sifat antioksidan¹⁸⁻²⁰ dan antiinflamasi.^{16,21}

Penelitian sebelumnya juga telah melaporkan bahwa hiperpigmentasi yang disebabkan oleh paparan sinar UVB diatur oleh berbagai gen, protein, dan enzim seperti tirosinase, dan MITF.²² Dalam jalur produksi melanin, tirosinase berperan dalam mengubah *L-tyrosine* menjadi *L-3,4-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA).²³ L-DOPA kemudian dioksidasi menjadi *L-DOPAquinone*, yang kemudian membentuk eumelanin dan pheomelanin.²⁴ Penelitian yang lain juga menunjukkan bahwa paparan sinar UVB kronis dapat menyebabkan stres oksidatif, yang mengaktifkan fosforilasi *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) seperti ERK, JNK, dan p53 yang mempercepat produksi melanin. Aktivasi jalur-jalur tersebut meningkatkan transkripsi MITF, yang merupakan faktor kunci dalam aktivasi enzim tirosinase, TRP-1, dan TRP-2, yang berperan dalam produksi melanin.^{25,26} Kandungan flavonoid pada ekstrak petai dapat menghambat ROS, yang berujung pada penekanan ekspresi MITF.^{27,28} Penelitian lain melaporkan bahwa senyawa flavonoid dapat meningkatkan ekspresi antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) sehingga dapat menghambat MITF *pathway* menyebabkan produksi melanin berkurang.²⁹ Senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kulit petai diduga memiliki kemampuan dalam menurunkan produksi melanin melalui mekanisme antioksidan.^{30,31} Namun, studi mengenai pengaruh gel topikal ekstrak kulit petai terhadap melanin dan MITF pada model hiperpigmentasi

akibat paparan sinar UVB masih belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti ingin menganalisis pengaruh ekstrak kulit petai dalam bentuk gel topikal terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada kulit tikus hiperpigmentasi yang dipapar UVB.

1.2. Rumusan Penelitian

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus wistar model hiperpigmentasi yang terpapar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus wistar model hiperpigmentasi yang terpapar UVB.

1.3.2. Khusus

1. Menganalisa pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF pada tikus wistar model hiperpigmentasi yang terpapar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
2. Menganalisa pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap jumlah melanin pada tikus wistar model

hiperpigmentasi yang terpapar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

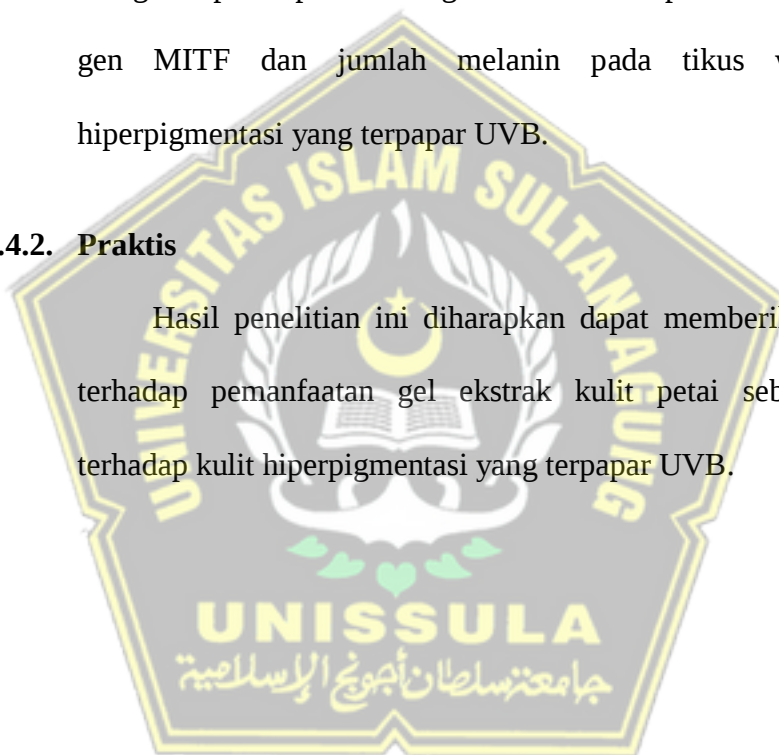
1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus wistar model hiperpigmentasi yang terpapar UVB.

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dukungan terhadap pemanfaatan gel ekstrak kulit petai sebagai proteksi terhadap kulit hiperpigmentasi yang terpapar UVB.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Gui JS, Jalil J, Jubri Z, Kamisah Y ²⁹ .	<i>Parkia speciosa</i> empty pod extract exerts anti-inflammatory properties by modulating NFκB and MAPK pathways in cardiomyocytes exposed to tumor necrosis factor-α	<i>In vitro</i>	Ekstrak kulit petai menurunkan level inflamasi, seperti penurunan ekspresi TNFα, p65, iNOS, dan COX2.
Iqbal, IY ⁴⁰ .	Pemberian krim ekstrak etanol biji petai (<i>Parkia speciosa</i>) 20% sama efektif dengan krim Hidrokuinon 4% dalam menghambat Pembentukan jumlah melanin pada kulit Marmut (<i>Cavia porcellus</i>) yang dipapar sinar Ultraviolet B	<i>In vivo</i>	Ekstrak kulit petai menghambat peningkatan persentase melanin
Ningsih SW, Utami TR, Stevana A, Wijayanti A ⁴¹ .	Kandungan Senyawa Ekstrak Kulit Petai dengan pelarut etanol 70% dan Etil Asetat	<i>In vitro</i>	Ekstrak kulit petai mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan steroid.
Batran RA, Bayaty FA, Obaidi MMJA, Abdulkader AM, Hadi HA, Ali HM, Abdulla MA.	<i>In vivo Antioxidant and Antiulcer of Parkia speciosa Ethanolic Leaf Extract against Ethanol Induced Gastric Ulcer in Rats</i>	<i>In vivo</i>	Ekstrak kulit petai meningkatkan HSP-70 dan menurunkan protein proapoptosis bax, meningkatkan enzim antioksidan GSH dan SOD serta menurunkan MDA.

Kamisah Y, Zuhair JSF, Juliana AH, Kamisah J	<i>Parkia speciosa empty pod prevents hypertension and cardiac damage in rats given N(G)-nitro-L-arginine Methyl Ester</i>	<i>In vivo</i>	Ekstrak methanol kulit petai menghambat kemungkinan hipertensi melalui penurunan <i>nitric oxide</i> , <i>angiotensin-converting enzyme</i> dan ROS.
--	--	----------------	--

Berdasarkan Tabel 1 yang terdiri dari beberapa penelitian terdahulu mengenai manfaat ekstrak kulit petai, ditemukan beberapa temuan menarik. Ekstrak kulit petai dapat menurunkan tingkat inflamasi dengan mengurangi ekspresi TNF α , p65, iNOS, dan COX2.²¹ Ekstrak kulit petai memiliki efek menghambat peningkatan persentase melanin pada kulit tikus dengan hiperpigmentasi.³² Wijayanti *et al*³³ mengidentifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid dalam ekstrak kulit petai. Ekstrak kulit petai dapat meningkatkan produksi HSP-70 (*heat shock protein*) dan mengurangi protein proapoptosis bax, serta meningkatkan aktivitas enzim antioksidan GSH dan SOD sambil mengurangi MDA (*malondialdehyde*).³⁴ Ekstrak metanol kulit petai dapat mengurangi kadar *nitric oxide*, *angiotensin-converting enzyme*, dan ROS (*reactive oxygen species*), berdasarkan pendekatan ini membuktikan bahwa ekstrak kulit petai berpotensi sebagai antioksidan.¹⁵ Namun, penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian-penelitian sebelumnya, pada penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki pengaruh gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus wistar yang terpapar sinar UVB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Melanocyte inducing transcription factor*

Melanocyte inducing Transcription Factor (MITF), adalah sejenis faktor transkripsi yang memiliki peran penting dalam pengaturan ekspresi genetik dan perkembangan sel-sel melanosit dalam tubuh manusia. Faktor transkripsi adalah protein yang berperan dalam mengendalikan proses transkripsi gen, yaitu langkah pertama dalam sintesis protein di dalam sel.³⁵ MITF terlibat dalam regulasi produksi melanin, pigmen yang memberikan warna pada kulit, rambut, dan mata manusia. MITF memainkan peran utama dalam pengembangan melanosit, sel-sel khusus yang bertanggung jawab untuk produksi melanin. Aktivasi MITF mengarah pada peningkatan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam sintesis melanin, seperti gen *tyrosinase* dan *tyrosinase-related protein-1* (TRP-1).

MITF memainkan peran penting dalam regulasi produksi melanin, yang terkait dengan hiperpigmentasi.³⁵ MITF terlibat dalam mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis melanin, termasuk enzim-enzim kunci seperti *tyrosinase*.³⁶ MITF berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengikat ke daerah pengaturan pada DNA untuk mengaktifkan atau menekan ekspresi gen tertentu. Dalam konteks hiperpigmentasi, MITF dapat mempengaruhi jumlah dan aktivitas melanosit, sel yang menghasilkan melanin, serta produksi melanin itu sendiri.³⁷

Studi menunjukkan bahwa MITF memiliki peran dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan yang terjadi dalam beberapa kondisi hiperpigmentasi seperti melasma dan lentigo.³⁸ Faktor-faktor eksternal seperti paparan sinar matahari berlebihan atau perubahan hormon dapat mempengaruhi ekspresi dan aktivitas MITF, yang pada gilirannya mempengaruhi produksi melanin.³⁹ Selain itu, mutasi atau variasi genetik pada gen MITF dapat menyebabkan gangguan dalam regulasi melanogenesis (proses pembentukan melanin) dan berkontribusi pada hiperpigmentasi yang terkait dengan kondisi seperti sindrom piebaldisme atau sindrom Waardenburg.⁴⁰⁻⁴²

Peran *melanocyte inducing transcription factor* (MITF) dalam hiperpigmentasi melibatkan pengaturan produksi melanin yang berlebihan oleh melanosit, sel-sel yang menghasilkan pigmen melanin. MITF merupakan regulator utama dalam jalur biokimia yang terlibat dalam melanogenesis, yaitu proses produksi melanin.⁴³ MITF mengontrol ekspresi gen-gen yang terlibat dalam sintesis melanin, termasuk gen-gen seperti TYR (*tyrosinase*), TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan DCT (*dopachrome tautomerase*). Gen tersebut berperan dalam konversi asam amino tirosin menjadi melanin. Dengan mengatur ekspresi gen, MITF mempengaruhi jumlah dan aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam produksi melanin.^{39,44} Seperti pada melasma, peningkatan aktivitas MITF dapat disebabkan oleh perubahan hormon seperti kehamilan atau kontrasepsi hormonal.⁴³ Secara molekuler, MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*)

berperan dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan terkait dengan hiperpigmentasi melalui interaksi dengan jalur-jalur sinyal dan komponen seluler yang terlibat dalam melanogenesis.⁴¹ Berikut adalah beberapa aspek molekuler MITF dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan:

1. Aktivasi gen melanogenesis: MITF berikatan pada DNA untuk mengaktifkan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi melanin, seperti TYR (*tyrosinase*), TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan DCT (*dopachrome tautomerase*). Ini melibatkan interaksi protein-protein dan pengenalan dengan motif pengikatan DNA khusus.
2. Transkripsi melalui kompleks transkripsi: MITF bekerja sebagai faktor transkripsi yang terlibat dalam kompleks transkripsi, yang melibatkan interaksi dengan komponen seperti koaktivator, korepresor, dan faktor-faktor transkripsi lainnya. Ini memodulasi proses transkripsi dan mempengaruhi tingkat ekspresi gen-gen melanogenesis.
3. Interaksi dengan faktor-faktor transkripsi lainnya: MITF berinteraksi dengan faktor-faktor transkripsi lainnya, seperti SOX10 dan PAX3, yang juga terlibat dalam regulasi produksi melanin. Interaksi ini dapat memperkuat pengaruh MITF dalam mengatur ekspresi gen-gen melanogenesis dan melibatkan proses molekuler seperti pembentukan kompleks protein-protein.
4. Pengaruh pos-translasi: MITF mengalami modifikasi pos-translasi, termasuk fosforilasi dan glikosilasi, yang dapat mempengaruhi stabilitas,

aktivitas, dan translokasi MITF. Modifikasi pos-translasi ini dapat memodulasi regulasi MITF dalam produksi melanin yang berlebihan.

5. Regulasi melalui sinyal jalur terkait: MITF juga dapat terpengaruh oleh berbagai jalur sinyal terkait, seperti jalur Wnt/ β -katenin, jalur MAPK, dan jalur β -adrenergik. Sinyal-sinyal ini dapat memengaruhi aktivitas dan ekspresi MITF, serta memodulasi produksi melanin yang berlebihan.

Dengan interaksi kompleks dan regulasi melalui jalur sinyal serta modifikasi pos-translasi, MITF secara molekuler berperan dalam mengatur produksi melanin yang berlebihan pada hiperpigmentasi. Memahami aspek molekuler MITF dalam regulasi ini dapat membantu dalam pengembangan pendekatan terapeutik yang ditargetkan untuk mengendalikan produksi melanin berlebihan dan mengurangi hiperpigmentasi.^{39,41}

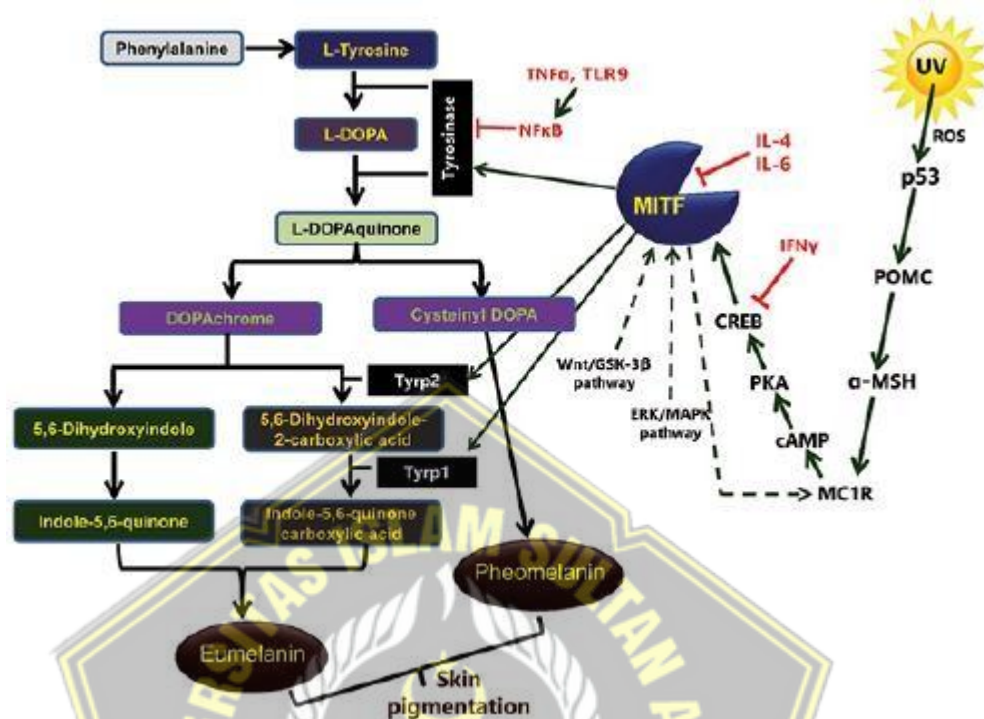
2.2. Melanin

Melanin adalah pigmen pengatur warna kulit yang diproduksi melalui proses melanogenesis.⁴⁵ Melanogenesis adalah proses fisiologis yang menghasilkan sintesis biopolimer yang menghasilkan pigmen berwarna gelap.⁴⁵ Melanin disintesis oleh melanosom dan organel terkait lisosom dalam melanosit. Melanin berfungsi membantu melindungi kulit dari efek berbahaya sinar matahari dan bahan kimia.⁴⁶

Terdapat dua jenis melanin yaitu eumelanin dan pheomelanin.⁴⁷ Dalam jalur melanogenesis, terdapat tiga enzim utama yang terlibat yaitu *tyrosinase*, *tyrosinase-related protein 1* (TRP-1, yang biasa disebut gp75 *glycoprotein* atau gp75), dan *tyrosinase-related protein 2* (TRP-2, yang

biasa disebut *dopachrome tautomerase* atau Dct). Proses melanogenesis dimulai baik dengan hidroksilasi fenilalanin menjadi L-tirosin atau langsung oleh L-tirosin, yang kemudian dihidroksilasi menjadi L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi *L-DOPAquinone*. Kedua reaksi ini dikatalisis oleh *tyrosinase*, yang oleh karena itu merupakan enzim kunci dalam melanogenesis.^{46–48}

Jalur *downstream* melanogenesis melibatkan penambahan intramolekuler dari gugus amino ke TRP-2 sehingga menghasilkan *DOPACHrome*. Setelah pembentukan *L-DOPAquinone*, jalur *downstream* melanogenesis dibagi menjadi 2 bagian yaitu yang mengarah ke sintesis “*black-brownish eumelanin*” dan “*red- yellow pheomelanin*”. Dalam jalur eumelanogenesis, DOPA chrome secara spontan diubah menjadi 5,6-dihidroksiindol atau secara enzimatis diubah menjadi asam 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat oleh TRP-2. Akhirnya, polimerisasi indol dan kuinon menghasilkan pembentukan eumelanin.⁴⁹ Sintesis pheomelanin bergantung pada keberadaan sistein, yang bereaksi dengan *L-DOPAquinone* membentuk sisteinil-DOPA dan selanjutnya diubah menjadi kuinolin, kemudian, akhirnya, berpolimerisasi menjadi pheomelanin (Gambar 1). Meskipun melanin memainkan peran kunci dalam melindungi kulit dari radiasi ultraviolet (UVB) yang berbahaya, produksi dan akumulasi melanin yang tinggi secara tidak normal di kulit dapat menyebabkan gangguan hiperpigmentasi.^{47,48}



Gambar 2.1. Skema kaskade transduksi sinyal melanogenesis⁴⁷

Melanogenesis diatur melalui serangkaian multistep kaskade transduksi sinyal yang terkait dengan enzim *tyrosinase*, TRP-1 dan TRP-2 (Gambar 1).⁴⁷ Mekanisme utama regulasi melanin melalui paparan radiasi ultraviolet yang menginduksi melanogenesis melalui p53.⁴⁷ Tumor supresor protein p53 yang diinduksi radiasi UVB secara kritis mengatur ekspresi dan aktivitas tirosinase dan TRP-1.^{47,50} Promotor proopiomelanokortin (POMC) berisi urutan konsensus p53, dimana p53 mengikat dan mengatur ekspresi gen ini.⁴⁷ Aktivasi p53 yang diinduksi paparan UVB menghasilkan peningkatan ekspresi POMC, yang kemudian dibelah menjadi peptida kecil, seperti ACTH, α -, β -, dan γ -MSH⁴⁷. α -MSH yang diturunkan POMC menstimulasi reseptor melanokortin-1 (MC1R) pada melanosit,

menghasilkan peningkatan produksi eumelanin. Selain itu, radiasi UVB meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) di keratinosit dan melanosit, dan pada konsentrasi tinggi ROS menyebabkan kerusakan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut sehingga memicu melanogenesis.^{47,51}

Mekanisme kedua yaitu regulasi intrinsik melanogenesis melalui *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF).⁴⁷ MITF adalah faktor transkripsi, yang berisi struktur dasar *helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-LZ) dan bertindak sebagai pengatur utama perkembangan melanosit, kelangsungan hidup, dan fungsinya. MITF mengatur enzim utama melanogenik seperti tirosinase, TRP-1 dan TRP-2.^{51,52} Beberapa jalur pensinyalan yang terlibat dalam regulasi MITF sebagai berikut:

1. *cAMP-dependent signalling pathway*. Setelah reseptor MC1R pada melanosit distimulasi oleh α -MSH dan memicu produksi cAMP melalui aktivasi adenylyl cyclase. cAMP selanjutnya mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang memfosforilasi pengikat elemen respons cAMP (CREB) dan mengarahkan pada regulasi MITF.³⁸ MITF mengatur transkripsi gen pigmen yang mengkode melanogenesis-related protein (MRP) melalui interaksi dengan M- dan E- box yang ada di wilayah promotor tirosinase, TRP-1 dan TRP-2.⁵³

2. *ERK / MAPK signalling pathway*.

Penghambatan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) akan menghambat pergantian MITF dengan keberadaan sikloheksimida, sehingga melibatkan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) /

MAPK dalam degradasi MITF.⁵⁴ Dalam jalur ini, interaksi reseptor ligan mengaktifkan protein Ras, yang selanjutnya mengaktifkan B-Raf kinase dan akibatnya ERK1/2. MAPK memfosforilasi protein MITF yang mengarah ke ubiquitination dan degradasi MITF yang mengakibatkan penurunan ekspresi gen yang berhubungan dengan melanogenesis.⁵⁵

3. Melanogenesis yang dimodulasi akibat sistem kekebalan.

Melanosit adalah faktor aktif dalam sistem kekebalan kulit, memainkan peran penting dalam respons imun, dan memiliki sifat imunomodulator. Di sisi lain, mediator imun, seperti sitokin, secara langsung atau tidak langsung mengatur proliferasi, diferensiasi melanosit, dan melanogenesis. Misalnya, IL-4 menghambat melanogenesis dan menurunkan ekspresi gen terkait melanogenesis melalui aktivasi jalur JAK2-STAT6. IL-6 menekan melanogenesis dengan mengurangi ekspresi tirosinase dan transkrip MITF. TNF- α menghambat melanogenesis terutama melalui *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan mengurangi waktu paruh tirosinase. Interferon-gamma (IFN- γ) juga terlibat dalam patogenesis vitiligo, di mana IFN- γ diketahui menginduksi apoptosis pada melanosit. Hal ini menghambat melanogenesis dengan mengubah ekspresi enzim melanogenik dan menghambat pengikatan CREB ke promotor MITF melalui STAT1. Selain itu, IFN- γ mempertahankan homeostasis pigmentasi kulit dan memediasi hipopigmentasi melalui IRF1, yang selanjutnya mengontrol pematangan melanosom dalam melanosit. *Toll-like receptors* (TLRs),

yang mengenali pola molekuler terkait patogen (PAMP) yang ada dalam mikroba, secara negatif juga mengatur melanogenesis. Melanosit manusia secara konstitutif mengekspresikan mRNA dan protein untuk TLR 2, 3, 4, 5, 7, 9 dan 10, dan TLR ini memainkan peran penting dalam modulasi melanogenesis. Namun, mekanisme pasti yang digunakan TLR untuk mengontrol melanogenesis tidak dipahami dengan jelas. Sebuah studi terbaru menunjukkan bahwa TLR9 mengatur melanogenesis melalui aktivasi NF- κ B.⁵⁶

2.3. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi yang ditandai oleh peningkatan produksi melanin, pigmen yang memberikan warna pada kulit, rambut, dan mata⁵⁷. Hal ini menyebabkan timbulnya area kulit yang lebih gelap dari warna kulit normal. Hiperpigmentasi dapat terjadi akibat berbagai faktor, termasuk paparan sinar matahari, perubahan hormon, peradangan, dan kondisi genetik. Salah satu bentuk hiperpigmentasi yang umum adalah melasma, yang ditandai oleh munculnya bercak gelap pada wajah, terutama di daerah pipi, dahi, dan dagu. Melasma sering kali terkait dengan perubahan hormonal, seperti kehamilan atau kontrasepsi hormonal, serta paparan sinar matahari berlebihan⁵⁸.

Selain melasma, ada juga kondisi hiperpigmentasi lainnya, seperti lentigo, efelides (bintik-bintik tahi lalat), postinflamasi hiperpigmentasi (PIH) akibat peradangan atau luka, serta beberapa kondisi genetik seperti sindrom piebaldisme atau sindrom Waardenburg⁴⁰. Dalam hiperpigmentasi,

peran utama dalam produksi melanin berlebihan dijalankan oleh MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*)²⁵. MITF adalah faktor transkripsi yang mengontrol ekspresi gen-gen yang terlibat dalam melanogenesis, termasuk gen-gen yang mengodekan enzim-enzim seperti tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), dan dopachrome tautomerase (DCT)²⁵. Paparan sinar matahari dan faktor-faktor lain dapat mempengaruhi aktivitas MITF, yang pada gilirannya meningkatkan produksi melanin. Aktivasi MITF melibatkan berbagai jalur sinyal intraseluler, seperti jalur JNK/AP-1, jalur p38 MAPK, jalur cAMP/PKA, dan jalur Wnt/ β -catenin⁵².

Dalam penelitian terkait hiperpigmentasi, penting untuk memahami mekanisme molekuler yang terlibat dalam regulasi produksi melanin oleh MITF serta jalur-jalur sinyal yang berperan. Pemahaman ini dapat membantu dalam pengembangan pendekatan terapeutik yang ditargetkan untuk mengendalikan produksi melanin berlebihan atau mengurangi hiperpigmentasi secara efektif^{25,54}.

2.4. Mekanisme Induksi MITF dan Melanin oleh UVB

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) dapat menginduksi ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) dan produksi melanin dalam sel-sel melanosit⁵⁹. Berikut adalah mekanisme umum yang terlibat dalam induksi MITF dan melanin oleh UVB:

1. Aktivasi jalur JNK/AP-1: UVB dapat mengaktifkan jalur sinyal JNK (c-Jun N-terminal kinase) yang mengarah pada aktivasi faktor transkripsi

AP-1 (Activator Protein-1). Aktivasi AP-1 akan merangsang ekspresi MITF melalui pengikatan ke daerah promotor gen MITF.

2. Aktivasi jalur p38 MAPK: UVB juga dapat mengaktifkan jalur sinyal p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), yang berperan dalam mengatur ekspresi gen MITF. Aktivasi p38 MAPK dapat mengarah pada fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi, termasuk MITF.
3. Regulasi ekspresi gen-gen melanogenesis: Setelah diinduksi, MITF akan mengikat ke daerah pengaturan pada DNA dan mengaktifkan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam melanogenesis, seperti TYR (*tyrosinase*), TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan DCT (*dopachrome tautomerase*). Gen-gen ini bertanggung jawab untuk sintesis melanin.
4. Stimulasi produksi melanin: Ekspresi gen-gen melanogenesis yang diinduksi oleh MITF akan menghasilkan peningkatan produksi enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis melanin. Misalnya, tyrosinase (terkodifikasi oleh gen TYR) adalah enzim kunci dalam konversi asam amino tirosin menjadi melanin.

Dalam kombinasi, aktivasi jalur JNK/AP-1 dan p38 MAPK serta regulasi ekspresi gen-gen melanogenesis oleh MITF akan merangsang produksi melanin dalam respons terhadap paparan UVB. Hal ini terjadi sebagai mekanisme perlindungan alami kulit melawan kerusakan sinar UV dan berfungsi untuk melindungi sel-sel kulit dari kerusakan lebih lanjut⁵⁹.

2.5. 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 *Integrated Taxonomic Information System*⁶⁰ klasifikasi petai (*Parkia speciosa* Hassk.) sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
 Divisi : Tracheophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Capparales
 Suku : Fabales
 Marga : *Parkia*
 Spesies : *Parkia speciosa* Hassk.



Gambar 2.2. 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 lisin¹⁵. Perannya adalah dalam proses penyembuhan luka serta daya tahan tubuh melawan infeksi dan stress karena aktivitas antioksidan yang tinggi. 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-karboksilat¹⁵.

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam kulit petai diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, 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 UVB⁶¹.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, paparan sinar UVB dapat memicu produksi Reactive Oxygen Species (ROS), yang merupakan molekul radikal bebas, yang kemudian memicu pelepasan beberapa faktor inflamasi, seperti TNF alpha, IL-6, dan IL-1. Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam kulit petai diketahui mampu menghambat jalur NF-kB, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk kadar TNF alpha, IL-6

dan IL-1⁶². TNF- α telah terbukti menghambat melanogenesis dengan menekan aktivitas tirosinase dan TRP1, dua enzim kunci yang terlibat dalam sintesis melanin. Penghambatan ini diperkirakan terjadi melalui aktivasi jalur NF- κ B dan JNK, yang merupakan target hilir pensinyalan TNF- α ⁶³.

Ekstrak kulit petai mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, triterpenoid, dan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Potensi antioksidan yang berasal dari ekstrak kulit petai memiliki kemampuan menekan kadar ROS⁶⁴. ROS dapat mengaktifkan beberapa jalur pensinyalan yang terlibat dalam melanogenesis, termasuk jalur protein kinase A dan jalur protein kinase yang diaktifkan mitogen. Jalur ini dapat mengaktifkan ekspresi MITF dan mendorong ekspresi gen terkait melanogenesis, yang mengarah pada peningkatan sintesis melanin. Disisi lain irradiasi UVB menyebabkan peningkatan produksi ROS, yang mengaktifkan jalur pensinyalan ROS-ERK⁶⁵. Hal ini menyebabkan fosforilasi dan degradasi proteasomal dari faktor transkripsi *BTB Domain and CNC Homolog 1* (BACH1), yang biasanya menghambat ekspresi MITF. Akibatnya, ekspresi MITF meningkat, menyebabkan peningkatan melanogenesis⁶⁶. Penggunaan senyawa antioksidan dapat mencegah aktivasi jalur MITF yang menyebabkan tirosinase tidak aktif dan berdampak pada pencegahan produksi melanin berlebihan^{25,54,59}.

Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa flavonoid secara langsung mampu menghambat ekspresi NF- κ B yang secara signifikan

menghambat jalur PI3K sehingga terjadi α -SMA yang berujung pada induksi kolagen^{52,67}. Adanya ekstrak kulit petai merupakan kandidat yang mampu mencegah hiperpigmentasi⁶⁸.

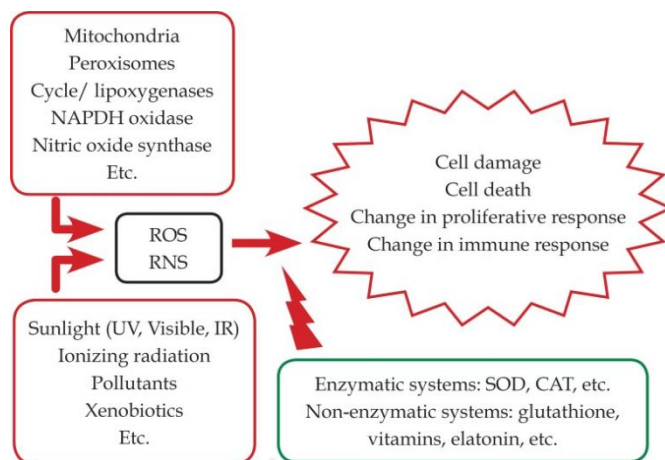
2.6. Peran antioksidan dalam mencegah hiperpigmentasi akibat paparan UVB

Stres oksidatif akibat paparan UVB dapat memicu peradangan dan merangsang melanosit untuk memproduksi melanin berlebihan sehingga menyebabkan hiperpigmentasi. Antioksidan, seperti flavonoid, vitamin C dan E dapat membantu memperbaiki kerusakan kulit akibat radikal bebas dan radiasi UVB dengan cara menangkal radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. ROS adalah radikal hidroksil ($\text{HO}\cdot$) dan superoksida ($\text{O}_2\cdot^-$), radikal peroksil dan alkoxyl ($\text{RO}_2\cdot$ dan $\text{RO}\cdot$), oksigen singlet ($^1\text{O}_2$)³⁻⁵, serta hidrogen peroksida (H_2O_2) dan peroksida organik (ROOH). Selain kerusakan langsung pada molekul seperti lipid, asam amino dan DNA, ROS dapat mengaktifkan respons seluler enzimatik dan non-enzimatik, dengan potensi untuk memodifikasi proses lain yang akhirnya mengganggu dengan ekspresi gen⁶⁹.

Antioksidan adalah zat yang bergabung untuk menetralkan spesies oksigen reaktif yang mencegah kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan. Sistem antioksidan kulit terdiri dari zat enzimatik dan non-enzimatik. Di antara antioksidan enzimatik, glutathione peroksidase (GPx), katalase (CAT) dan superoksida dismutase (SOD)⁷⁰. Aktivasi Nrf2 oleh senyawa antioksidan menyebabkan produksi beberapa enzim antioksidan, termasuk

superoksida SOD, CAT, GPx, dan heme oksigenase-1 (HO-1)⁷¹. Enzim-enzim ini memainkan peran penting dalam detoksifikasi dan eliminasi ROS dan oksidan lain yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan sel dan jaringan. Aktivasi Nrf2 juga telah terbukti menghambat melanogenesis dengan memodulasi jalur pensinyalan PI3K/Akt⁷². Penelitian lain melaporkan aktivasi Nrf2 ditemukan berkorelasi dengan induksi fosforilasi p53 Ser46⁷³, sehingga menyebabkan aktivasi p53 yang dapat penurunan regulasi MITF dan ekspresi tirosinase, yang mengakibatkan penurunan melanogenesis.

Di antara beberapa mekanisme antioksidan, SOD memainkan peran sentral dalam berbagai molekul reaktif yang dinetralkan. Meskipun masih belum ada korelasi langsung, model hewan menunjukkan bahwa kurangnya SOD menyebabkan perubahan degeneratif dengan berkurangnya kolagen. Mungkin, vitamin C akan berdampak positif pada status pengurangan SOD yang mencegah atrofi karena degradasi kolagen⁷⁴. Sebuah klinis juga mempelajari sistem antioksidan endogen pada pasien dengan melasma menunjukkan konsumsi yang signifikan dari SOD dan glutathione peroksidase menyebabkan pecahnya keseimbangan redoks⁷⁵.



Gambar 2.3. Mekanisme keseimbangan redoks di kulit⁷⁶

2.7. Sediaan Gel

Sediaan gel adalah formulasi farmasi yang terdiri dari fase padat yang terdispersi dalam fase cair. Mereka biasanya digunakan untuk aplikasi topikal pada kulit karena kemampuan mereka untuk menyerap dengan baik dan cepat. Sediaan gel memiliki beberapa keuntungan:⁷⁷

1. Penyerapan cepat. Sediaan gel memiliki basis air yang ringan, sehingga dapat menyerap dengan cepat pada kulit. Hal ini memungkinkan zat aktif seperti ekstrak untuk dengan mudah menembus lapisan kulit dan mencapai target dengan lebih efektif.
2. Meningkatkan kestabilan ekstrak. Sediaan gel dapat membantu menjaga stabilitas ekstrak tanaman dari pengaruh lingkungan yang merusak seperti cahaya, oksigen, dan suhu tinggi.
3. Memaksimalkan penyerapan melalui kontak kulit yang lama. Gel memungkinkan kontak langsung antara kulit dan ekstrak, memaksimalkan penyerapan dan manfaatnya.

4. Kenyamanan Penggunaan. Sediaan gel seringkali lebih nyaman digunakan dibandingkan formulasi lain seperti krim atau lotion. Gel tidak meninggalkan residu berminyak atau lengket dan mudah diserap oleh kulit.
5. Kestabilan Fisik dan Kimia. Gel cenderung memiliki stabilitas fisik dan kimia yang baik, memastikan bahwa ekstrak dan bahan-bahan lain dalam formulasi tetap efektif selama masa simpan.⁷⁸

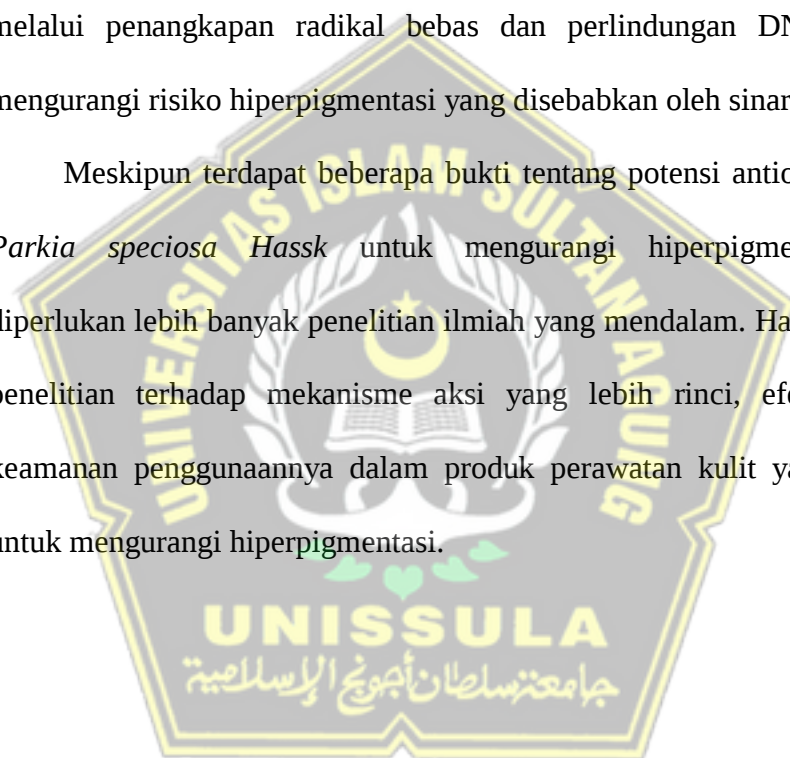
2.8. Pengaruh kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin

Parkia speciosa Hassk, yang juga dikenal sebagai petai, adalah tumbuhan yang memiliki kandungan antioksidan yang penting⁷⁹. Antioksidan tersebut termasuk senyawa seperti flavonoid, asam fenolat, dan senyawa lainnya⁷⁹. Antioksidan dikenal memiliki kemampuan untuk melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan stres oksidatif. Dalam konteks hiperpigmentasi, antioksidan dalam *Parkia speciosa* Hassk dapat memberikan manfaat penting. Proses hiperpigmentasi seringkali melibatkan stres oksidatif dan peradangan pada kulit, yang dapat memicu produksi melanin yang berlebihan. Dalam hal ini, antioksidan dalam *Parkia speciosa* Hassk dapat membantu melawan kerusakan sel dan meredakan peradangan, sehingga mengurangi produksi melanin yang berlebihan⁷⁹.

Beberapa penelitian ilmiah telah menunjukkan potensi senyawa antioksidan dalam menghambat aktivitas enzim tyrosinase, yang bertanggung jawab atas produksi melanin⁸⁰. Penghambatan aktivitas

tyrosinase oleh antioksidan dapat membantu mengontrol produksi melanin dan mencegah terjadinya hiperpigmentasi. Selain itu, antioksidan juga dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan DNA oleh sinar UV⁸⁰. Paparan sinar matahari yang berlebihan dapat merusak DNA kulit, yang dapat menyebabkan munculnya hiperpigmentasi. Dalam hal ini, antioksidan dalam *Parkia speciosa* Hassk dapat memberikan perlindungan tambahan melalui penangkapan radikal bebas dan perlindungan DNA, sehingga mengurangi risiko hiperpigmentasi yang disebabkan oleh sinar UV^{14,15,21,34}.

Meskipun terdapat beberapa bukti tentang potensi antioksidan dalam *Parkia speciosa* Hassk untuk mengurangi hiperpigmentasi, masih diperlukan lebih banyak penelitian ilmiah yang mendalam. Hal ini termasuk penelitian terhadap mekanisme aksi yang lebih rinci, efektivitas, dan keamanan penggunaannya dalam produk perawatan kulit yang ditujukan untuk mengurangi hiperpigmentasi.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

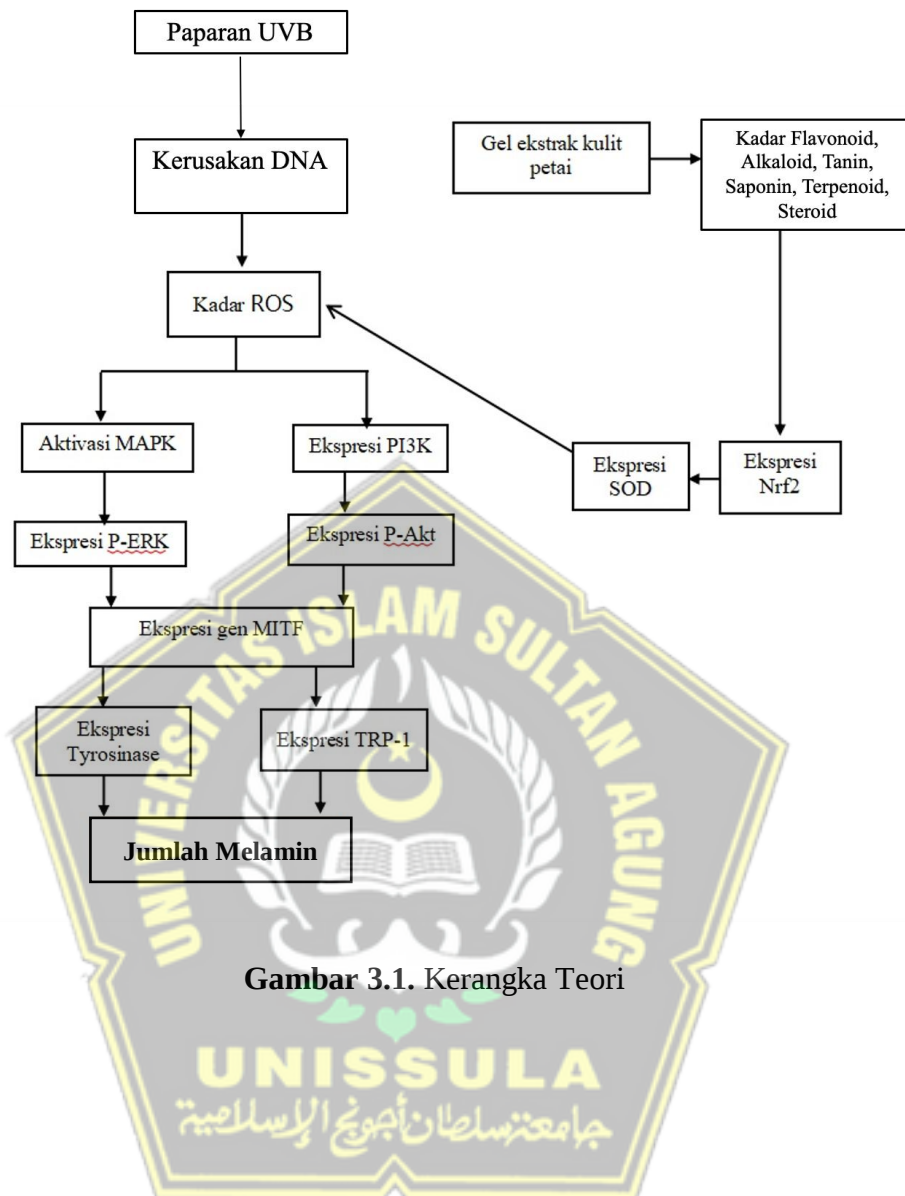
3.1. Kerangka Teori

Paparan terhadap radiasi UVB akut atau kronis dapat menginduksi penuaan kulit dini (hiperpigmentasi), menyebabkan perubahan kolagen dermal, hiperpigmentasi, peradangan kulit dan kanker kulit^{81,82}. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA dan produksi. Jalur pensinyalan seperti p38 MAPK dan Akt peran penting dalam respons terhadap ROS pathway yang diinduksi UVB, yang mengarah ke proses melanogenesis melalui jalur P53⁸¹. Protein P53 menginduksi respon sinyal faktor transkripsi MITF yang berujung pada ekspresi tirosinase dan TRP-1. Ekspresi kedua molekul tersebut memicu akumulasi pigmen melanin pada kulit⁸³.

Sifat antioksidan kulit petai menghambat produksi ROS yang diinduksi UVB dan melindungi sel kulit dari stres oksidatif. Kulit petai diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid yang berperan sebagai antioksidan⁸⁴. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB⁸⁵. Selain itu, flavonoid juga diketahui dapat mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Kompleks Nrf2 yang terikat bersama di dalam sitoplasma, ketika teraktivasi maka akan melepaskan diri melalui ubiquitinasi dan mentranslokasi ke dalam nukleus; kemudian Nrf2 mengaktifkan gen antioksidan (transkripsi gen antioksidan) yaitu SOD⁸⁶.

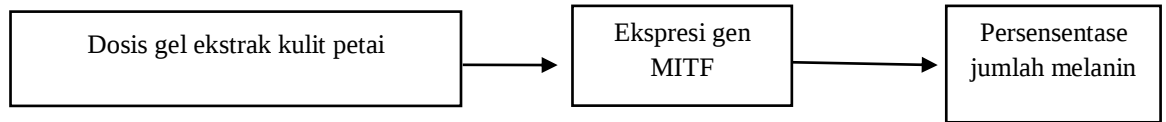
Respon antioksidan tersebut berupa mengurangi kadar ROS. Penurunan kadar ROS berdampak pada penghambatan aktivasi P53 yang kemudian akan mengurangi aktivasi MITF. Penurunan MITF akan berdampak pada penghambatan aktivitas tirosinase yang berdampak pada penurunan kadar melanin dalam kulit^{25,54,59}.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

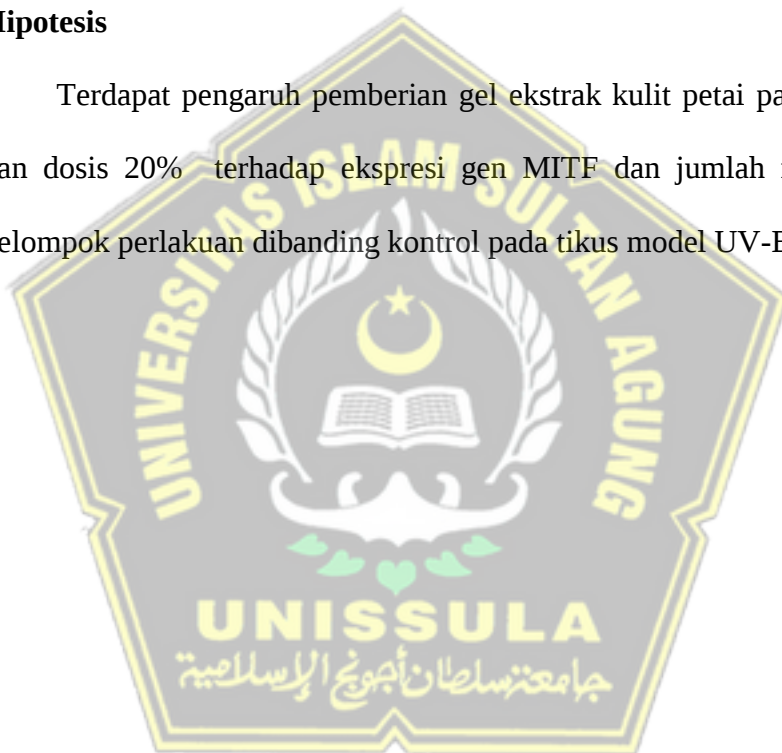
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan dosis 20% terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada tikus model UV-B.



BAB IV

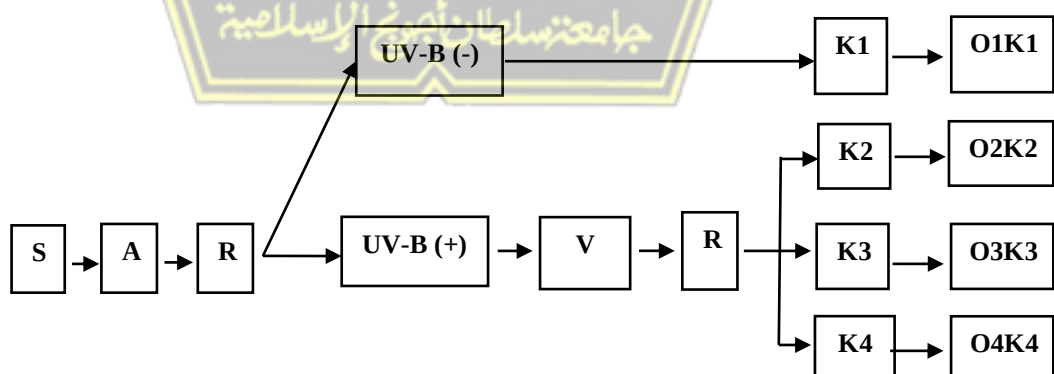
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan post test only control group dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan 200-250 gr.

Perlakuan terdiri dari:

1. Tikus sehat tanpa penyinaran UVB.
2. Kontrol Negatif (Tikus yang di induksi UVB dengan perlakuan base gel),
3. Perlakuan 1 (Tikus yang di induksi UVB dengan perlakuan gel ekstrak kulit petai dosis 10% secara topikal).
4. Perlakuan 2 (Tikus yang di induksi UVB dengan perlakuan gel ekstrak kulit petai dosis 20% secara topikal)



Gambar 4.1. Alur 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 ekstrak kulit petai dosis 10%.

Perlakuan : K4: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian 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 dosis 10% dan 20% secara topikal.

4.2.1.2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen MITF dan jumlah melanin.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Gel ekstrak kulit petai (*Parkia speciosa*)

Yang dimaksud gel ekstrak kulit petai adalah ekstrak dari kulit petai yang dilarutkan dengan etanol dan dibuat menjadi sediaan gel (dosis 10% dan 20%). Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. 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 P1 sebanyak 20mg dan P2 sebanyak 40mg satu kali sehari selama 14 hari. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop. Gel ekstrak kulit petai di oleskan pada hari ke 1 hingga ke 14 sebanyak 200 mg setiap hewan model.

Skala : Rasio.

4.2.2.2. MITF

Ekspresi gen MITF adalah konsentrasi MITF yang diproduksi oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi gen MITF dianalisis menggunakan *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Unit : Pg/mL

Skala : rasio

4.2.2.3. Melanin

Jumlah melanin adalah jumlah fraksi area melanin yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Jumlah melanin dianalisis menggunakan metode spesifik staining Masson Fontana. Kuantifikasi jumlah melanin di hitung dengan jumlah sel melanosit berwarna hitam dengan aplikasi imageJ.

Unit : persen fraksi area (%)

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 oleh team Stem Cell and Cancer Research Indonesia.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penlitain ini adalah tikus wistar yang dipapar sinar UVB intensitas 302 nm dengan jarak 20 cm dan MED 390 mJ/cm² selama 6 kali dalam 2 minggu hingga terjadi penurunan presentase melanin.

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar
2. Umur 2-3 bulan.
4. Tikus sehat dan aktif selama masa aklimatisasi
5. Berat badan 200-250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang masuk kriteria drop out pada penelitian ini adalah Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok 1 tikus sehat, kelompok 2 kontrol negatif (tikus model hiperpigmentasi akibat iradiasi UVB dan diberi perlakuan dengan base gel), kelompok 3 perlakuan 1 (tikus model hiperpigmentasi akibat iradiasi UVB dan diberi gel ekstrak kulit petai secara topikal dosis 10%) dan kelompok 4 perlakuan 2 (tikus model hiperpigmentasi akibat iradiasi UVB dan diberi gel ekstrak kulit petai secara topikal dosis 20%).

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Frederer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dari rumus tersebut didapat hasil n adalah 6. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan yaitu 4 dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan. Sehingga sampel yang digunakan adalah 6 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 4 kelompok sehingga jumlahnya adalah 24 ekor tikus.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 390 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*

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

4.5.2. Cara Pembuatan Gel Ekstrak Kulit Petai

Kulit petai sebanyak ± 600 gram dipotong menjadi bagian kecil, dikeringkan pada suhu $50-60^{\circ}\text{C}$ dan dihaluskan menjadi bubuk kering. Proses pembuatan ekstrak kulit petai menggunakan teknik maserasi. Bubuk kuli petai kering diekstraksi menggunakan etanol 70% kemudian disaring dan filtrat tersebut ditampung, residu kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Pemilihan pelarut ini dikarenakan etanol mampu menyaring bahan aktif yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Diharapkan menghasilkan jumlah ekstrak yang optimal. Kandungan etanol diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. 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 P1 sebanyak 10% dan P2 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) https://www.katecho.com/hydrogel/	180 mg	160 mg
Esktrak kulit petai	20 mg	40 mg

4.5.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Penelitian sebelumnya menggunakan gel ekstrak yang mengandung flavonoid dengan dosis 20% untuk penggunaan secara topikal dapat menurunkan kadar melanin⁸⁷. Penggunaan gel ekstrak kulit petai dilakukan setiap hari sebanyak 200 mg/tikus sehingga dosis ekstra kulit petai yang digunakan adalah 20 mg ekstrak dalam 180mg gel per tikus untuk dosis 10% dan 40 mg ekstrak dalam 160 mg gel per tikus untuk dosis 20% (Table 4.1)⁸⁸.

4.5.4. Paparan UV-B

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamin (60 mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal tikus cukur hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm
3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 390 mJ/cm² 15 menit enam kali dalam dua minggu.
4. Tikus Perlakuan 1 (gel ekstrak kulit petai dosis 10%) dan Perlakuan 2 (gel ekstrak kulit petai dosis 20%) kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak kulit petai yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari pasca penyinaran UV-B.

4.5.5. Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi
Masukan potongan jaringan dalam alcohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.
2. Parafinisasi dan Embedding
Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal

4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukkan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.6. Validasi dan analisis pengecatan Melanin pasca UVB dan perlakuan

Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan Masson Fontana dengan tahapan sebagai berikut :

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Slide diinkubasi dalam Working Silver Solution selama 2 menit, kemudian bilas dengan air.
3. Slide diinkubasi dalam larutan 0.1% Gold chloride 10 menit, kemudian dibilas dengan air.
4. Slide diinkubasi dalam larutan 5% Hypo selama 5 menit kemudian dibilas dengan air.
5. Slide diinkubasi dalam larutan Nuclear-fast red selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang desk glass.
7. Analisis jumlah melanin dilakukan dengan metode analisis digital berdasarkan dimana slide difoto menggunakan mikroskop Olympus CX41 (Olympus, Japan) pada pembesaran 400 kali menggunakan kamera Optilab Pro (Miconos, Indonesia). Masing

masing preparat difoto sebanyak 3 lapangan pandang dengan menggunakan format JPEG. Hasil foto diedit menggunakan piranti lunak Adobe Photoshop CS3 versi 10.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, U.S.A) untuk memilih lapisan epidermis menggunakan tool *Polygonal Lasso*. Penghitungan luas epidermis dalam satuan *pixel* dilakukan dengan menggunakan piranti lunak ImageJ versi 1.47t (National Institutes of Health, Bethesda, MD) menggunakan *channel red* pada RGB *stack* dengan mengatur *threshold* sampai mendekati maksimal. Luas epidermis diperlukan untuk menormalisasi jumlah melanin. Perhitungan jumlah melanin dalam satuan *pixel* dilakukan dengan menggunakan piranti lunak ImageJ versi 1.47t menggunakan *channel red* dengan mengatur *threshold*. Jumlah melanin yang ternormalisasi dihitung berdasarkan rumus berikut untuk per lapangan pandang.⁸⁸

$$\text{Jumlah melanin} = \frac{\text{Pixel melanin}}{\text{Pixel epidermis}} \times 100\%$$

4.5.7. Analisa Kuantitatif Ekspresi Gen MITF menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript

gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

2. Penentuan Ekspresi Gen MITF

MITF diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

Tabel 4.2. komponen PCR Mix CXCL8

Komponen	Jenis
Primer	Forward MITF 5'-GCTGGAGACGGAAGTCTGCT-3' Reverse MITF 5'-GAGTGGGAGGGAGAGTGAGG-3'
Reagen	Trizol Reagen
Rna Transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription
cDNA	SYBR Green

4.5.8. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan jaringan. Jaringan kulit diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang diinduksi. Sampel jaringan kulit dipreservasi dalam larutan RNA later untuk mempertahankan kualitas RNA. Sampel kulit dalam RNA disimpan dalam suhu -20°C hingga proses analisis PCR dilakukan.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

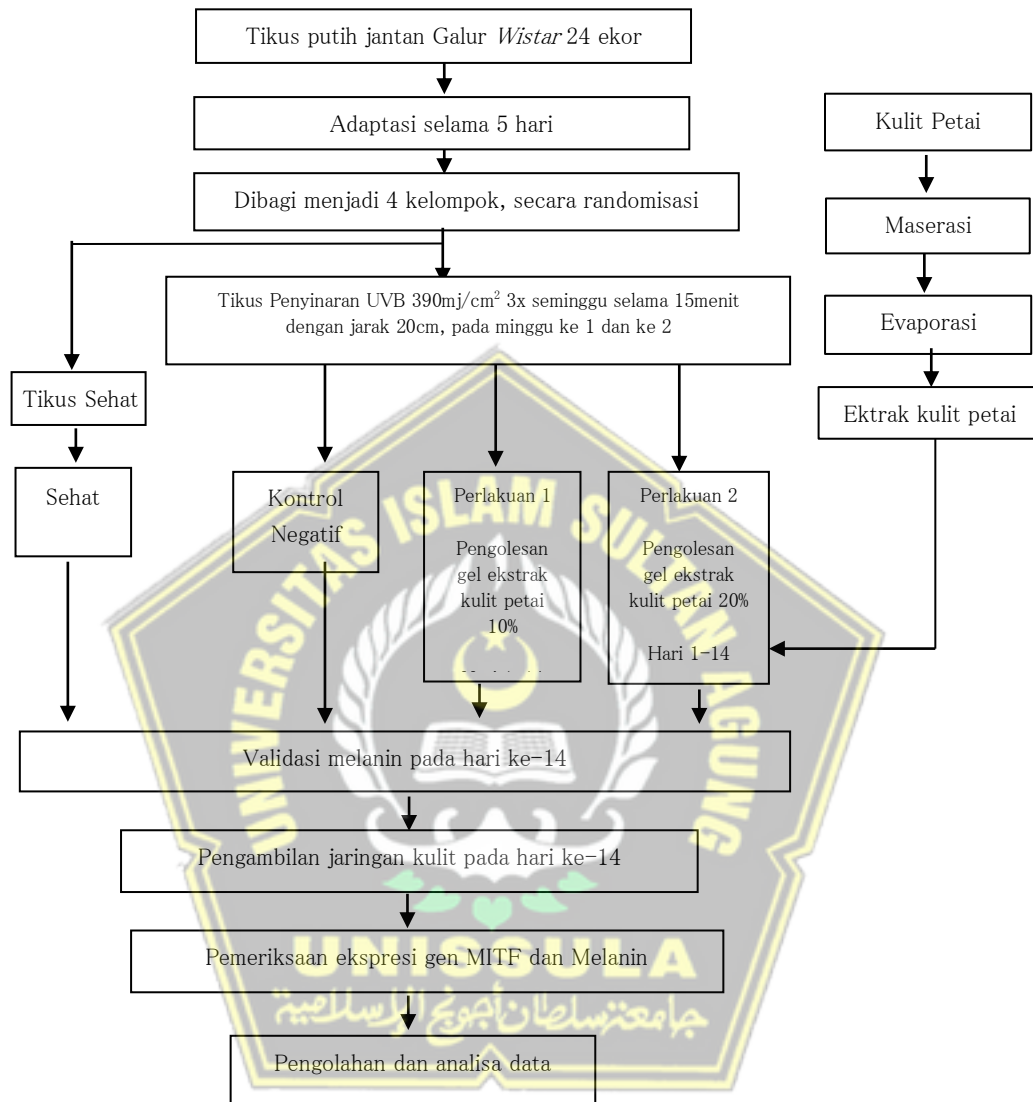
Penelitian dilakukan di laboratorium SCCR Semarang. Penelitian dilakukan pada November 2023.

4.7. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang dihasilkan normal dan homogen ($P > 0,05$), maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan diperoleh hasil signifikan ($P < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin 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 minggu⁸⁹. 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%. Ekstrak kulit petai yang digunakan dalam penelitian ini diekstraksi dari kulit petai species *Parkia speciosa* berdasarkan hasil determinasi tanaman.

5.1. Hasil Penelitian

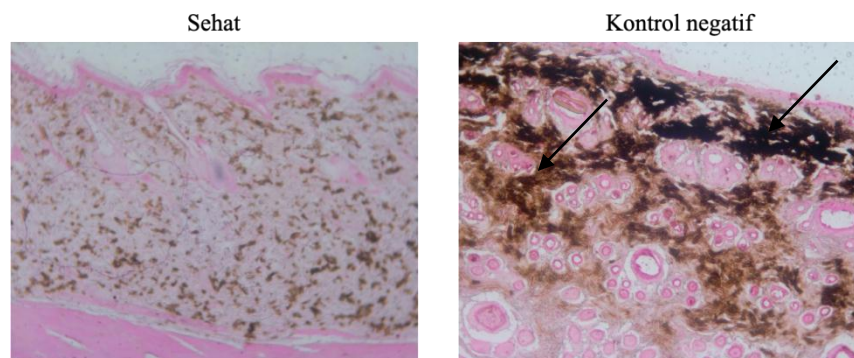
5.1.1. Ekstraksi Kulit Petai

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 di dalam 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 $390\text{mJ}/\text{cm}^2$ selama tiga kali seminggu sepanjang dua minggu. Validasi hiperpigmentasi diamati pada hari ke 14. Pada pewarnaan *Fontana masson* menunjukkan 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 sebesar meningkat hingga 46,5% (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Validasi hiperpigmentasi dengan pewarnaan fontana masson (A) Tikus sehat dan (B) Tikus yang mendapatkan iradiasi UVB. 100x perbesaran. Panah hitam menunjukan positif melanin.

5.1.3. Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen MITF

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu menurunkan ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.2).

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen MITF dan Melanin

Variabel	Kelompok			
	Sehat=5 Mean±SD K1	Kontrol negatif n=5 Mean±SD K2	Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% n=5 Mean±SD K3	Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 20% n=5 Mean±SD K4
Ekspresi gen MITF	1,03±0,01	3,52±0,84	0,84±0,05	0,80±0,15
<i>Saphiro wilk</i>	0,415*	0,723*	0,181	0,362
<i>Levene test</i>				0,001**
<i>One way ANOVA</i>				0,000***
Jumlah Melanin	10,95±2,48	32,36±3,92	27,98±2,58	28,34±2,24
<i>Saphiro wilk</i>	0,627	0,251	0,963	0,675
<i>Levene test</i>				0,687
<i>One way ANOVA</i>				0,000***

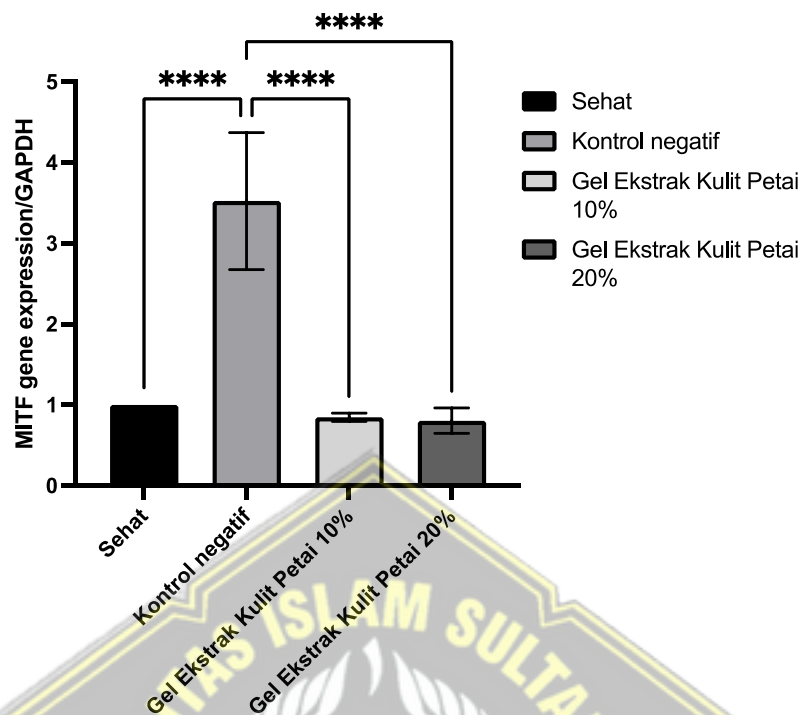
Keterangan :

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

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

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

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.1. Rerata ekspresi gen MITF dikelompok gel ekstrak kulit petai dosis 20% (K4) yang terendah ($0,80 \pm 0,15$), kemudian di ikuti oleh rerata ekspresi gen MITF kelompok gel ekstrak kulit petai dosis 10% (K3) ($0,84 \pm 0,05$). Rasio tertinggi pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K2) sebesar $3,52 \pm 0,84$. Data ekspresi gen MITF semua kelompok 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 MITF normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan *One way-ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen MITF yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *One way ANOVA* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.2. Grafik ekspresi gen MITF Pada Seluruh Kelompok Penelitian

Tabel 5.2. Uji Post Hoc Tamhane ekspresi gen MITF pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2	0,005*	-3,9532	-1,0502
	K3	0,002*	0,0891	0,2642
	K4	0,111	-0,0561	0,4883
K2	K3*	0,003*	1,2298	4,1269
	K4	0,003*	1,2936	4,1464
K3	K4*	0,993	-0,2182	0,3015

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

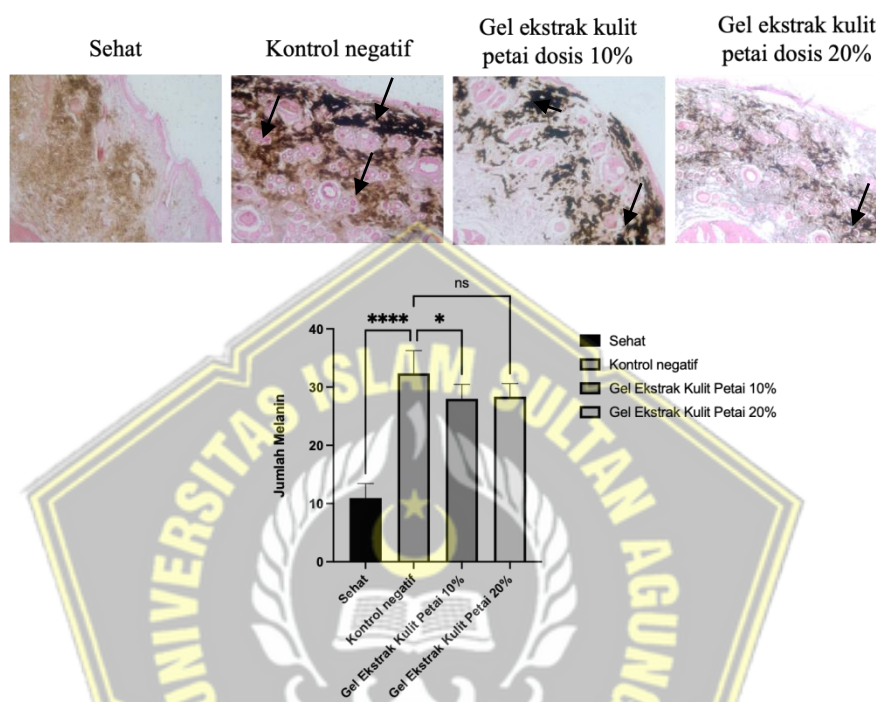
Berdasarkan data diatas didapatkan rerata perbandingan antara kelompok K2 dengan K3 (0,003) dan K2 dengan K4 (0,003) yang menunjukan terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan perbandingan kelompok K3 dan K4 (0,993) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan K1 dan K2 diperoleh nilai 0,005

($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Penurunan ekspresi gen MITF paling signifikan ditunjukkan pada pemberian ekstrak kulit petai 20% dengan nilai batas bawah 1,2936 dan nilai batas atas 4,1464. Hasil uji *post hoc tamhane* pada data ekspresi gen MITF menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat menurunkan ekspresi gen MITF pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

5.1.4. Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi melanin

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu menurunkan jumlah melanin pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.3). Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.1. Rerata jumlah melanin dikelompok K3 ($27,98 \pm 2,58$) yang terendah, kemudian di ikuti oleh rerata jumlah melanin kelompok K4 ($28,34 \pm 2,24$). Data jumlah melanin tertinggi yaitu pada kelompok kontrol negatif sebesar $32,36 \pm 3,92$. Data jumlah melanin semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0,05$) berdasarkan hasil *Shapiro Wilk*. Berdasarkan analisis homogenitas dengan Levene test menunjukan data homogen ($p > 0,05$). Distribusi data jumlah melanin normal dan homogen sehingga dilakukan analisis statistik parameterik dengan *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata

jumlah melanin yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *one way ANOVA* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.3. (A) Gambaran pewarnaan melanin pada semua kelompok perlakuan dan (B) Grafik jumlah melanin pada seluruh kelompok penelitian. 100x perbesaran, tanda panah hitam menunjukan sel positif melanin.

Tabel 5.3. Uji *Post Hoc LSD* jumlah melanin pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2*	0,001*	-24,8654	17,9580
	K3	0,001*	-20,4904	-13,5830
	K4	0,001*	-20,8520	-13,9446
K2	K3*	0,016*	0,9213	7,8287
	K4*	0,025*	0,5596	7,4670
K3	K4	0,829	-3,8154	3,0920

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan perbandingan rerata K2 (kontrol negatif) dengan K3 (gel ekstrak kulit petai 10%) (0,016) dan K4 (gel ekstrak kulit petai 20%) (0,025) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan K3 dan K4 (0,829) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan kelompok K1 dan K2 diperoleh nilai 0,001 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Nilai jumlah melanin tertinggi paling signifikan ditunjukkan pada pemberian gel ekstrak kulit petai 10% dengan nilai batas bawah 0,9213 dan nilai batas atas 7,8187. Hasil uji *post hoc* LSD pada data jumlah melanin menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat menurunkan jumlah melanin pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan UVB adalah faktor resiko utama hiperpigmentasi kulit yang ditandai dengan peningkatan ekspresi protein pembentuk melanin seperti MITF.⁸⁹ Iradiasi sinar UVB menginduksi kerusakan DNA melalui pembentukan ROS oksidatif, yang mengakibatkan aktivasi beberapa jalur melanogenesis.⁹⁰ Penelitian terkini membuktikan bahwa ekstrak kulit petai yang mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tannin, dan saponin dapat menekan pembentuk ROS karena memiliki aktivitas antioksidan. Kemampuan ekstrak yang dapat menekan ROS dimungkinkan dapat mencegah produksi melanin.^{31,91} Penelitian ini

bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen MITF dan jumlah melanin pada tikus model hiperpigmentasi. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar karena termasuk vertebrata mamalia dengan struktur kulit mirip kulit manusia. Hewan uji di induksi paparan sinar UVB 302 nm dengan intensitas energi $390\text{mJ}/\text{cm}^2$ sebanyak tiga kali seminggu selama 2 minggu⁸⁹.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen MITF pada kelompok K3 (gel ekstrak kulit petai 10%) dan K4 (gel ekstrak kulit petai 20%) mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan kelompok tikus hiperpigmentasi yang tidak mendapatkan terapi (Kontrol negatif). Hal ini menunjukan bahwa penurunan ekspresi gen MITF dapat mencegah hiperpigmentasi. Senyawa flavonoid yang berasal dari ekstrak kulit petai mungkin dapat menghambat TGF- β sehingga menghambat aktivitas MITF melalui penghambatan jalur PI3K/Akt.⁹² Penekanan TGF- β berpotensi menghambat biosintesis melanin pada sel melanoma B16. Kemampuan senyawa flavonoid menghambat TGF- β juga telah dilaporkan dapat menghambat jalur cAMP / protein kinase A dan menginduksi GLI2, yang kemudian menekan MITF, faktor transkripsi sentral melanogenesis.⁹³ Sedangkan melalui jalur SMAD, penekanan TGF- β dalam menghambat proses melanogenesis dengan mengirimkan sinyal melalui reseptor heteromerik spesifik ligan, yaitu reseptor serin/treonin kinase yang berfungsi untuk fosforilasi dan aktivasi reseptor (R)-Smad, yang mengarah ke

pembentukan kompleks dengan (Co)-Smad, Smad4, dan regulasi transkripsi dari gen target sehingga menekan ekspresi MITF⁹⁴.

Penelitian ini lebih lanjut menunjukkan efek penghambatan gel ekstrak kulit petai pada jumlah melanin. Hal ini disebabkan ekstrak kulit petai yang menghambat MITF sehingga memblok aktivitas TRP-1 dan TRP-2 berkorelasi dengan aktivasi jalur pembentukan eumelanin dan pheomelanin. Penekanan ekspresi TRP-1 yang berlebihan dapat menghambat sintesis melanin⁹⁵. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa peningkatan ekspresi TRP-1 berkorelasi dengan peningkatan jumlah melanin akibat iradiasi UVB. Namun, peningkatan ekspresi TRP-2 berkaitan dengan proliferasi sel melanoma⁹⁶. Pada penelitian ini pemberian gel ekstrak kulit petai secara signifikan dan tergantung dosis menurunkan jumlah melanin. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai melalui downregulasi MITF sehingga mencegah pembentukan melanin pada sel melanosit.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan kadar ROS, TGF-B, dan TRP1/2 setelah di berikan perlakuan gel ekstrak kulit petai sehingga tidak diketahui langsung terkait mekanisme molekuler ekstrak kulit petai terhadap pencegahan produksi melanin.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% secara bermakna berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen MITF pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.
2. Pemberian ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% secara bermakna berpengaruh terhadap penurunan jumlah melanin pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut tentang pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel ekstrak kulit petai pada tikus galur *Wistar* model hiperpigmentasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis ekstrak kulit petai lebih besar dari 20% pada tikus galur *Wistar* model hiperpigmentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Dale Wilson B, Moon S, Armstrong F. Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012; **5**: 18–23.
- 2 Merin KA, Shaji M, Kameswaran R. A Review on Sun Exposure and Skin Diseases. *Indian J Dermatol* 2022; **67**: 625.
- 3 Amaro-Ortiz A, Yan B, D’Orazio J. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules* 2014; **19**: 6202–6219.
- 4 Durai PC, Thappa DM, Kumari R, Malathi M. Aging in elderly: chronological versus photoaging. *Indian J Dermatol* 2012; **57**: 343–52.
- 5 Hughes MCB, Williams GM, Paegeon H, Fourtanier A, Green AC. Dietary Antioxidant Capacity and Skin Photoaging: A 15-Year Longitudinal Study. *Journal of Investigative Dermatology* 2021; **141**: 1111-1118.e2.
- 6 Samson N, Fink B, Matts PJ. Visible skin condition and perception of human facial appearance. *Int J Cosmet Sci* 2010; **32**: 167–184.
- 7 Solano F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules* 2020; **25**: 1537.
- 8 Markiewicz E, Idowu O.

Melanogenic Difference Consideration in Ethnic Skin Type: A Balance Approach Between Skin Brightening Applications and Beneficial Sun Exposure

. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020; **Volume 13**: 215–232.
- 9 Tangau MJ, Chong YK, Yeong KY. Advances in cosmeceutical nanotechnology for hyperpigmentation treatment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2022; **24**. doi:10.1007/s11051-022-05534-z.
- 10 Couteau C, Coiffard L. Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products. *Cosmetics* 2016; **3**: 27.

- 11 Saeedi M, Khezri K, Seyed Zakaryaei A, Mohammadamini H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytotherapy Research* 2021; **35**: 4136–4154.
- 12 Isromi T, Winahyu DA, Tutik T. Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Petai (*Parkia speciosa*) Sebagai Antiinflamasi Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar Yang Di Induksi Karagenan. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan* 2023; **10**: 1605–1614.
- 13 Maulana I, Kurniati Roddu A, Suriani S. Uji Efektifitas Ekstrak Kulit Petai (*Parkia speciosa* Hassk) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Sebagai Anti Inflamasi. *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian* 2020; **1**: 80.
- 14 Azemi AK, Nordin ML, Hambali KA, Noralidin NA, Mokhtar SS, Rasool AHG. Phytochemical Contents and Pharmacological Potential of *Parkia speciosa* Hassk. for Diabetic Vasculopathy: A Review. *Antioxidants* 2022; **11**: 431.
- 15 Kamisah Y, Othman F, Qodriyah HMS, Jaarin K. *Parkia speciosa* Hassk.: A Potential Phytomedicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; **2013**: 1–9.
- 16 Azemi AK, Nordin ML, Hambali KA, Noralidin NA, Mokhtar SS, Rasool AHG. Phytochemical Contents and Pharmacological Potential of *Parkia speciosa* Hassk. for Diabetic Vasculopathy: A Review. *Antioxidants (Basel)* 2022; **11**. doi:10.3390/antiox11020431.
- 17 Rianti A, Parassih EK, Novenia AE, Christpoher A, Lestari D, Kiyat W El. Potensi Ekstrak Kulit Petai (*Parkia speciosa*) Sebagai Sumber Antioksidan. *Jurnal Dunia Gizi* 2018; **1**: 10.
- 18 Saleh MSM, Jalil J, Zainalabidin S, Asmadi AY, Mustafa NH, Kamisah Y. Genus *Parkia*: Phytochemical, Medicinal Uses, and Pharmacological Properties. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 618.
- 19 Mustafa Khalid N, Babji AS. Antioxidative and Antihypertensive Activities of Selected Malaysian ulam (salad), Vegetables and Herbs. *J Food Res* 2018; **7**: 27.

- 20 Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Bukhori MFM, Rahmat MH, Rahmat A. Assessment and comparison of phytochemical constituents and biological activities of bitter bean (*Parkia speciosa* Hassk.) collected from different locations in Malaysia. *Chem Cent J* 2018; **12**: 12.
- 21 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; **71**: 79–89.
- 22 Wawrzyk-Bochenek I, Rahnama M, Stachura M, Wilczyński S, Wawrzyk A. Evaluation of the Reduction of Skin Hyperpigmentation Changes under the Influence of a Preparation Containing Kojic Acid Using Hyperspectral Imaging—Preliminary Study. *J Clin Med* 2023; **12**. doi:10.3390/jcm12072710.
- 23 Hori I, Nihei K, Kubo I. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytotherapy Research* 2004; **18**: 475–479.
- 24 Galván I, Wakamatsu K, Alonso-Alvarez C, Solano F. Buthionine sulfoximine diverts the melanogenesis pathway toward the production of more soluble and degradable pigments. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; **24**: 2150–2154.
- 25 Lee S-J. Suppression of α-MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int J Mol Med* 2011. doi:10.3892/ijmm.2011.807.
- 26 Kim D-S, Park S-H, Park K-C. Transforming growth factor-β1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 1482–1491.
- 27 Hwang YP, Oh KN, Yun HJ, Jeong HG. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 2011; **61**: 23–31.

- 28 Butarbutar RH, Robiyanto R, Untari EK. Potensi Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Pada Plasma Tikus yang Mengalami Stres Oksidatif. *Pharmaceutical Sciences and Research* 2016; **3**: 97–106.
- 29 Zhan JYX, Wang XF, Liu YH, Zhang ZB, Wang L, Chen JN *et al.* Andrographolide sodium bisulfate prevents uv-induced skin photoaging through inhibiting oxidative stress and inflammation. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/3271451.
- 30 Siow HL, Gan CY. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chem* 2013; **141**: 3435–3442.
- 31 Izzah Ahmad N, Abdul Rahman S, Leong Y-H, Azizul NH. A Review on the Phytochemicals of *Parkia Speciosa*, Stinky Beans as Potential Phytomedicine. *J Food Sci Nutr Res* 2019; **02**. doi:10.26502/jfsnr.2642-11000017.
- 32 Iqbal IY. Pemberian krim 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. 2019.
- 33 Wijayanti A. Karakteristik Ekstrak Kulit Petai (*Parkia speciosa* Hassk) dengan Pelarut Ethanol 70% dan etil Asetat. *JURNAL ILMU KESEHATAN BHAKTI SETYA MEDIKA* 2021; **6**: 123–127.
- 34 Al Batran R, Al-Bayaty F, Jamil Al-Obaidi MM, Abdualkader AM, Hadi HA, Ali HM *et al.* In Vivo Antioxidant and Antiulcer Activity of *Parkia speciosa* Ethanolic Leaf Extract against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. *PLoS One* 2013; **8**: e64751.
- 35 Chen Y-S, Lee S-M, Lin C-C, Liu C-Y. Hispolon Decreases Melanin Production and Induces Apoptosis in Melanoma Cells through the Downregulation of Tyrosinase and Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) Expressions and the Activation of Caspase-3, -8 and -9. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 1201–1215.

- 36 Wei B, Zhang Y-P, Yan H-Z, Xu Y, Du T-M. Cilostazol promotes production of melanin by activating the microphthalmia-associated transcription factor (MITF). *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **443**: 617–621.
- 37 Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014; **563**: 28–34.
- 38 Lee SE, Park S-H, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al.* Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 14958.
- 39 D'Mello S, Finlay G, Baguley B, Askarian-Amiri M. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**: 1144.
- 40 Baxter LL, Pavan WJ. The etiology and molecular genetics of human pigmentation disorders. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013; **2**: 379–392.
- 41 Videira IF dos S, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol* 2013; **88**: 76–83.
- 42 Hida T, Kamiya T, Kawakami A, Ogino J, Sohma H, Uhara H *et al.* Elucidation of Melanogenesis Cascade for Identifying Pathophysiology and Therapeutic Approach of Pigmentary Disorders and Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 6129.
- 43 Lee SJ, Lee WJ, Chang SE, Lee G-Y. Antimelanogenic effect of ginsenoside Rg3 through extracellular signal-regulated kinase-mediated inhibition of microphthalmia-associated transcription factor. *J Ginseng Res* 2015; **39**: 238–242.
- 44 Wang J-H, Hwang S-J, Lee S-K, Choi Y, Byun CK, Son C-G. Anti-Melanogenic Effects of Fractioned Cynanchum atratum by Regulation of cAMP/MITF Pathway in a UVB-Stimulated Mice Model. *Cells* 2023; **12**: 1390.
- 45 Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**: 8962–8968.

- 46 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; **445**: 843–850.
- 47 Kumari S, Thng S, Verma N, Gautam H. Melanogenesis Inhibitors. *Acta Dermato Venereologica* 2018; **98**: 924–931.
- 48 Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, Jung S-H. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *J Med Chem* 2018; **61**: 7395–7418.
- 49 Nguyen NT, Fisher DE. <scp>MITF</scp> and <scp>UV</scp> responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 224–236.
- 50 Vance KW, Goding CR. The Transcription Network Regulating Melanocyte Development and Melanoma. *Pigment Cell Res* 2004; **17**: 318–325.
- 51 Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ETH *et al.* Regulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor MITF Protein Levels by Association with the Ubiquitin-Conjugating Enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 2000; **255**: 135–143.
- 52 Alam MB, Bajpai VK, Lee J, Zhao P, Byeon J-H, Ra J-S *et al.* Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Sci Rep* 2017; **7**: 45858.
- 53 Hong Y, Song B, Chen H-D, Gao X-H. Melanocytes and Skin Immunity. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2015; **17**: 37–39.
- 54 Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 101–110.
- 55 Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia- associated transcription factor in melanoma development and <scp>MAP</scp> - kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; **28**: 390–406.
- 56 Kawai T, Akira S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 460–469.

- 57 Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, Thawabteh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules* 2023; **28**: 4839.
- 58 Moolla S, Miller-Monthrope Y. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs Context* 2022; **11**: 1–14.
- 59 Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 224–236.
- 60 Integrated Taxonomic Information System. Taxonomic Hierarchy : *Parkia speciosa* Hassk. 2023.
- 61 Choy KW, Murugan D, Leong X-F, Abas R, Alias A, Mustafa MR. Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. *Front Pharmacol* 2019; **10**. doi:10.3389/fphar.2019.01295.
- 62 Qin Z, Balimunkwe RM, Quan T. Age- related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin *in vivo*. *British Journal of Dermatology* 2017; **177**: 1337–1348.
- 63 Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 1998; **255**: 139–146.
- 64 Kim D-S, Park S-H, Park K-C. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 1482–1491.
- 65 Liu F, Fu Y, Meyskens FL. MiTF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **129**: 422–431.
- 66 Kaminski K, Kazimierczak U, Kolenda T. Oxidative stress in melanogenesis and melanoma development. *Wspolczesna Onkologia*. 2022; **26**: 1–7.

- 67 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 68 Zhao W, Wang X, Sun K-H, Zhou L. α -smooth muscle actin is not a marker of fibrogenic cell activity in skeletal muscle fibrosis. *PLoS One* 2018; **13**: e0191031.
- 69 Wölfle 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**: 1081–1093.
- 70 Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord* 2019; **18**: 437–443.
- 71 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; **1863**: 585–597.
- 72 Shin JM, Kim MY, Sohn KC, Jung SY, Lee HE, Lim JW *et al.* Nrf2 negatively regulates melanogenesis by modulating PI3K/Akt signaling. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0096035.
- 73 Garufi A, Pistritto G, D'orazi V, Cirone M, D'orazi G. The Impact of NRF2 Inhibition on Drug-Induced Colon Cancer Cell Death and p53 Activity: A Pilot Study. *Biomolecules* 2022; **12**. doi:10.3390/biom12030461.
- 74 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 75 Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol* 2016; **15**: 160–173.
- 76 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.

- 77 A. Satyanarayana D, K. Kulkarni P, G. Shivakumar H. Gels and Jellies as a Dosage Form for Dysphagia Patients: A Review. *Curr Drug ther* 2011; **6**: 79–86.
- 78 Bowlby M, Blume P, Schmidt B, Donegan R. Safety and efficacy of Becaplermin gel in the treatment of diabetic foot ulcers. *Chronic Wound Care Management and Research* 2014; : 11.
- 79 Mayori H, . K, . M, Purnama D, Maulina Sari R. Systematic Review Efektivitas Limbah Kulit Petai (*Parkia speciosa* Hassk) sebagai Fitomedicine untuk Mengobati Masalah Kesehatan Tertentu. *JURNAL BIOSHELL* 2023; **12**: 66–76.
- 80 Varela MT, Ferrarini M, Mercaldi VG, Sufi B da S, Padovani G, Nazato LIS *et al.* Coumaric acid derivatives as tyrosinase inhibitors: Efficacy studies through in silico, in vitro and ex vivo approaches. *Bioorg Chem* 2020; **103**: 104108.
- 81 Ke Y, Wang X-J. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology* 2021; **141**: 1104–1110.
- 82 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 930164.
- 83 Speeckaert R, Van Gele M, Speeckaert MM, Lambert J, van Geel N. The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; **27**: 512–524.
- 84 Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel M, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules* 2015; **5**: 545–589.
- 85 Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuźnicka M, Kuryłowicz A. Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 6814.
- 86 Wu PY, Lyu JL, Liu YJ, Chien TY, Hsu HC, Wen KC *et al.* Fisetin regulates Nrf2 expression and the inflammation-related signaling pathway to prevent UVB-induced skin damage in hairless mice. *Int J Mol Sci* 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18102118.

- 87 Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Nature Publishing Group, 2008, pp 20–24.
- 88 Iqbal IY. Pemberian Krim 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.
- 89 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**: 1–16.
- 90 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* 2018; **210**: 201–208.
- 91 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. *Agric Food Secur.* 2018; **7**. doi:10.1186/s40066-018-0197-x.
- 92 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; **71**: 79–89.
- 93 Lee SE, Park SH, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al.* Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR-α/p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–12.
- 94 Pierrat MJ, Marsaud V, Mauviel A, Javelaud D. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor-β. *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 17996–18004.

- 95 Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ *et al.* Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**: 617–622.
- 96 Nishioka E, Funasaka Y, Kondoh H, Chakraborty AK, Mishima Y, Ichihashi M. Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis. *Melanoma Res.* 1999; **9**: 433–443.

